

# Стратификация риска рецидива папиллярного рака щитовидной железы на основании результатов молекулярно-генетических исследований

С.А. Лукьянов<sup>1</sup>, С.В. Сергейко<sup>1</sup>, С.Е. Титов<sup>2-4</sup>, И.В. Решетов<sup>5</sup>, Ю.А. Веряскина<sup>2</sup>, А.В. Важенин<sup>1, 6</sup>,  
А.В. Гостимский<sup>7</sup>, Л.И. Ипполитов<sup>5</sup>, М.О. Рогова<sup>5</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России;  
Россия, 454092 Челябинск, ул. Воровского, 64;

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук»;  
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8/2;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»;  
Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1;

<sup>4</sup>АО «Вектор-Бест»; Россия, 630117 Новосибирская обл., пос. Кольцово, научно-производственная зона, корп. 36;

<sup>5</sup>ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России;  
Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

<sup>6</sup>ГБУЗ «Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины»;  
Россия, 454087 Челябинск, ул. Блюхера, 42;

<sup>7</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;  
Россия, 194100 Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2;

**Контакты:** Сергей Анатольевич Лукьянов 11111@mail.ru

**Введение.** Посттранскрипционные механизмы определяют биологическое течение и клинические проявления папиллярного рака щитовидной железы (ПРЩЖ). Последние исследования показывают, что увеличение содержания онкогенных микроРНК или снижение содержания онкосупрессорных микроРНК повышает агрессивность опухоли и коррелирует с неблагоприятным прогнозом лечения, что позволяет использовать их для индивидуализации лечения пациентов с ПРЩЖ.

**Цель исследования** – сравнить уровень экспрессии 12 специфичных для ПРЩЖ микроРНК и частоту мутации V600E гена BRAF у пациентов с разным риском рецидива.

**Материалы и методы.** В исследование включены 175 пациентов с ПРЩЖ. Для количественного анализа экспрессии микроРНК использовали реакцию обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени в фиксированных формалином парафиновых блоках. Вычислили коэффициент корреляции между уровнем экспрессии 12 микроРНК и наличием мутации BRAF, различных клинико-анатомических особенностей ПРЩЖ, уровнем риска рецидива по системе стратификации риска (Risk Stratification System), разработанной Американской тиреоидологической ассоциацией (American Thyroid Association) в 2009 г.

**Результаты.** Экспрессия miR-146b, miR-221, miR-144, miR-451a и miR-7 коррелировала с такими признаками, как экстрагипероидный рост опухоли, больший размер, многоочаговость, метастазирование в лимфатические узлы и наличие отдаленных метастазов ПРЩЖ. Наиболее важно, что экспрессия miR-221, miR-144, miR-451a и miR-7 коррелировала с уровнями риска. Это позволяет предположить, что они могут служить критериями стратификации риска рецидива ПРЩЖ. Связи клинической картины ПРЩЖ и наличия мутации гена BRAF не установлено.

**Заключение.** Полученные в результате исследования данные будут способствовать индивидуальному подбору дооперационной лечебной тактики для пациентов с ПРЩЖ.

**Ключевые слова:** стратификация риска рецидива, микроРНК, папиллярный рак щитовидной железы

**Для цитирования:** Лукьянов С.А., Сергейко С.В., Титов С.Е. и др. Стратификация риска рецидива папиллярного рака щитовидной железы на основании результатов молекулярно-генетических исследований. Опухоли головы и шеи 2020;10(1):93–100.

DOI: 10.17650/2222-1468-2020-10-1-93-100



## Stratification of papillary thyroid cancer relapse risk based on the results of molecular genetic studies

S.A. Lukyanov<sup>1</sup>, S.V. Sergiyko<sup>1</sup>, S.E. Titov<sup>2-4</sup>, I.V. Reshetov<sup>5</sup>, Yu.A. Veryaskina<sup>2</sup>, A.V. Vazhenin<sup>1, 6</sup>, A.V. Gostimsky<sup>7</sup>, L.I. Ippolitov<sup>5</sup>, M.O. Rogova<sup>5</sup>

<sup>1</sup>South Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia; 64 Vorovskogo St., Chelyabinsk 454092, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8/2 Acad. Lavrentiev Ave.,  
Novosibirsk 630090, Russia;

<sup>3</sup>Novosibirsk State University; 1 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia;

<sup>4</sup>Vector-Best Ltd.; Bld. 36, research and production zone, Koltsovo Settlement, Novosibirsk District 630117, Russia;

<sup>5</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

<sup>6</sup>Chelyabinsk Regional Clinical Center of Oncology and Nuclear Medicine; 42 Bluchera St., Chelyabinsk 454087, Russia;

<sup>7</sup>Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Litovskaya St., Saint Petersburg 194100, Russia;

**Introduction.** Post-transcriptional mechanisms play a crucial role in the biological course and clinical manifestations of papillary thyroid cancer (PTC). Recent studies show that an increased content of oncogenic or reduced content of oncosuppressive microRNAs increases the aggressiveness of the tumor and correlates with an unfavorable prognosis of treatment, which allows them to be used in personalizing the treatment tactics of patients with PTC.

**The study objective** is to compare the level of expression of 12 PTC-specific microRNAs and the frequency of V600E mutation of the *BRAF* gene in patients with different risk of relapse.

**Materials and methods.** The study included 175 patients with PTC. For quantitative analysis of microRNA expression, a reverse transcription reaction followed by a real-time polymerase chain reaction in formalin-fixed paraffin blocks was used. Correlations between 12 microRNA expression and *BRAF* mutation with different clinical and anatomical features of PTC the risk of relapse according to the American Thyroid Association Risk Stratification System (2009) were analyzed.

**Results.** We demonstrated that miR-146b, miR-221, miR-144, miR-451a, and miR-7 expression correlated with features such as extrathyroid tumor growth, larger size, multifocus, lymph node metastasis, and the presence of distant metastases of the PTC. Most importantly, miR-221, miR-144, miR-451a, and miR-7 expression correlated with risk levels, suggesting their potential significance in stratifying the risk of relapsing PTC. The dependence of the clinical behavior of PTC on the *BRAF* mutation has not been established.

**Conclusion.** The result of the study will contribute to the individual choice of preoperative treatment tactics for patients with PTC.

**Key words:** stratification of relapse risk, microRNA, papillary thyroid cancer

**For citation:** Lukyanov S.A., Sergiyko S.V., Titov S.E. et al. Stratification of papillary thyroid cancer relapse risk based on the results of molecular genetic studies. *Opukholy golovy i shei = Head and Neck Tumors* 2020;10(1):93–100. (In Russ.).

## Введение

Папиллярный рак — наиболее распространенная опухоль щитовидной железы. Вследствие широкого внедрения в клиническую практику ультразвукового исследования щитовидной железы ежегодно выявляется все больше новых случаев этого заболевания [1]. У большинства больных папиллярным раком щитовидной железы (ПРЩЖ) прогноз хороший, и для их лечения достаточно органосохраняющей операции на щитовидной железе, при этом 5-летняя выживаемость колеблется от 91 до 98 % [2]. Однако примерно у 40 % пациентов развиваются рецидивы заболевания [3], а в ряде случаев агрессивные формы ПРЩЖ в процессе комбинированного лечения становятся нечувствительными к радиоiodтерапии, что обуславливает относительно высокую летальность [4]. В связи с этим для выбора оптимальной тактики ведения пациентов в периоперационном периоде необходимо оценивать риск рецидива ПРЩЖ. Общепринятой в настоящее время считается система стратификации риска (Risk Stratification System with Proposed Modifications), разработанная Американской тиреоидологической ассоциацией (American Thyroid Association, АТА) в 2009 г. В соответствии с ней на основании клинических данных выделяют 3 группы пациентов — с высоким, промежуточным и низким риском рецидива ПРЩЖ [5]. В многочисленных исследованиях было установлено, что частота рецидивов широко варьирует в группах риска, что, вероятно, отражает гетерогенность опухолей. Для дальнейшего совершенствования трехуровневой

системы риска было предложено использовать молекулярные маркеры агрессивности, и первым маркером, включенным в этот список, стала мутация гена *BRAF*. Однако изолированное от клинических данных использование мутации V600E гена *BRAF* в качестве маркера агрессивности не оправдало надежды исследователей [6]. В настоящее время продолжается поиск новых биомаркеров агрессивности ПРЩЖ, и одним из перспективных направлений стало исследование уровня экспрессии специфических микроРНК в ткани опухоли.

**Цель исследования** — сравнить уровень экспрессии 12 специфических для ПРЩЖ микроРНК и частоту мутации V600E гена *BRAF* у пациентов с разным риском рецидива по АТА.

## Материалы и методы

В исследование включены 175 пациентов с ПРЩЖ, оперированных в городской клинической больнице № 1 (г. Челябинск), Челябинском областном клиническом центре онкологии и ядерной медицины, Клиническом центре Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (г. Москва) и Центре хирургии и онкологии органов эндокринной системы при городской больнице № 26 (г. Санкт-Петербург) с 2014 по 2019 г. Клинические данные и данные для дальнейшей стратификации риска по системе АТА (2009) были получены путем анализа медицинской документации пациентов.

Гистологическое исследование проведено штатными патологоанатомами вышеуказанных учреждений.

Парафиновые блоки с образцами ткани ПРЩЖ были отправлены в Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, где выполнено молекулярно-генетическое исследование – определение относительного уровня экспрессии 12 микроРНК и выявление соматической мутации V600E в гене *BRAF* [7]. МикроРНК для исследования выбирали на основании данных научной литературы и экспериментальных разработок Института молекулярной и клеточной биологии. В итоге был сформирован список из 12 микроРНК, обнаруживаемых при раке щитовидной железы (miR-144, miR-145, miR-155, miR-146b, miR-183, miR-199b, miR-221, miR-31, miR-375, miR-451a, miR-551b, miR-7). Для каждой микроРНК отдельно проводили реакцию обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени [8]. Нормировка содержания микроРНК выполнена с помощью геометрического среднего содержания 3 референсных микроРНК методом  $2^{-\Delta Cq}$ . Повышение уровня экспрессии онкогенных микроРНК (miR-146b, miR-221, miR-31, miR-375, miR-551b, miR-155 и miR-183) и/или снижение уровня экспрессии онкосупрессорных микроРНК (miR-144, miR-451a, miR-7, miR-145 и miR-199) рассматривали как прогностический фактор агрессивного течения ПРЩЖ.

Дизайн исследования был одобрен решением этического комитета Южно-Уральского государственного медицинского университета от 18.04.2019 (протокол №3).

Статистический анализ проводили с использованием программы SPSS Statistics 23 (IBM, США). Данные представлены в виде медианы, 1-го и 3-го квартилей. Для проверки нулевой гипотезы использовали критерий Манна–Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . С целью объективной оценки прогностической значимости уровня экспрессии различных микроРНК для выявления агрессивных форм ПРЩЖ была использована бинарная классификация с построением ROC-кривых. ROC-кривая отражает зависимость количества истинно положительных случаев от количества ложноотрицательных случаев. Оценивали чувствительность и специфичность. Сравнение тестов проводили с учетом площади под ROC-кривой (area under curve, AUC). С допущениями можно считать, что чем ближе AUC к 1,0, тем большей прогностической силой обладает тест. О качестве модели можно судить по значениям AUC: 0,9–1,0 – отличное, 0,8–0,9 – очень хорошее, 0,7–0,8 – хорошее, 0,6–0,7 – среднее, 0,5–0,6 – неудовлетворительное. Определено также отношение шансов с 95 % доверительным интервалом.

### Результаты

Среди 175 пациентов с ПРЩЖ было 153 (87 %) женщины и 22 (13 %) мужчины. Средний возраст на момент постановки диагноза составил  $45,4 \pm 20,9$  года

(самому молодому пациенту было 11 лет, самому старшему – 84 года). Средний диаметр опухоли составил 1,81 см (минимальный – 0,5 см, максимальный – 6,0 см). Микрокарциномы (диаметром  $\leq 1$  см) выявлены у 74 (42 %) пациентов. В 19 (11 %) случаях имело место многоочаговое поражение. Метастазы в лимфатических узлах (ЛУ) центральной части шеи обнаружены у 76 (43 %) пациентов, боковой части шеи – у 36 (21 %), отдаленные метастазы – у 13 (7 %). У 63 (36 %) пациентов наблюдалось экстрагитреоидное распространение опухоли.

У 75 (43 %) пациентов выполнена гемитиреоидэктомия, у 100 (57 %) – тиреоидэктомия, у 76 из них она сочеталась с селективной центральной лимфаденэктомией, у 36 – с боковой. По системе TNM у 95 (54 %) пациентов установлена I стадия заболевания, у 27 (15 %) – II стадия, у 33 (19 %) – III стадия, у 20 (12 %) – IV стадия. По системе ATA 82 (47 %) пациента были отнесены к группе низкого риска рецидива, 75 (43 %) – к группе среднего риска, 18 (10 %) – к группе высокого риска.

Уровень экспрессии 12 микроРНК и частоту выявления мутации V600E гена *BRAF* оценивали в зависимости от клинико-анатомических характеристик ПРЩЖ в группах разного риска. По гендерному составу сравниваемые группы не различались. Мутация *BRAF* обнаружена в 64 % микрокарцином и в 60 % опухолей диаметром  $>1,0$  см; в 59 % одиночных карцином и в 61 % многоочаговых. Среди опухолей с мутацией *BRAF* 65 % не распространялись за пределы железы. Среди опухолей с экстрагитреоидным ростом мутация выявлена в 56 %. Мутация *BRAF* установлена у 62 % пациентов с метастазами в ЛУ шеи и у 64 % пациентов без метастазов в ЛУ шеи, у 54 % пациентов с отдаленными метастазами и у 63 % пациентов без отдаленных метастазов. В группе высокого риска мутация *BRAF* наблюдалась у 61 % пациентов, в группе промежуточного риска – у 59 %, в группе низкого риска – у 65 %. Статистически значимой зависимости клинических характеристик ПРЩЖ от мутации *BRAF* не установлено.

Выявлены различия в уровне экспрессии 9 из 12 микроРНК – онкогенных miR-146b, miR-183, miR-375, miR-221, miR-551b и онкосупрессорных miR-144, miR-145, miR-451a, miR-7.

Уровень экспрессии miR-146b коррелировал с размером опухоли, многоочаговостью и наличием метастазов в ЛУ шеи. Ее уровень был выше в опухолях диаметром  $>1,0$  см, чем в микрокарциномах ( $p = 0,0003$ ), выше в многофокусных карциномах, чем в одиночных ( $p = 0,02$ ), и выше при поражении ЛУ шеи, чем при его отсутствии ( $p = 0,001$ ). Различий между группами риска рецидива по этому показателю выявлено не было (табл. 1).

Уровень экспрессии miR-183, miR-375, miR-145 и miR-551b коррелировал только с размером опухоли. В опухолях диаметром  $>1,0$  см уровень экспрессии

онкогенных miR-183, miR-375 и miR-551b был выше, чем в микрокарциномах (соответственно  $p = 0,02$ ,  $p = 0,006$  и  $p = 0,0006$ ). Экспрессия онкосупрессорной miR-145 в карциномах диаметром  $>1,0$  см, наоборот, была ниже, чем в микрокарциномах ( $p = 0,05$ ) (табл. 2).

**Таблица 1.** Уровень экспрессии онкогенной miR-146b в зависимости от клинико-анатомических характеристик папиллярного рака щитовидной железы

**Table 1.** Level of expression of oncogenic miR-146b, depending on the clinical and anatomical characteristics of papillary thyroid cancer

Характеристика Characteristic	Уровень экспрессии, Ме (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) Expression level, Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	p
Размер опухоли: Tumor size: микрокарциномы (≤1 см) microcarcinoma (≤1 cm) опухоли >1 см tumor >1 cm	3,4 (1,2-5,5) 4,4 (1,8-9,3)	0,015
Многоочаговость: Multifocal tumors: нет по да yes	3,5 (1,4-7,2) 5,8 (3,8-9,7)	0,03
Метастазы в лимфатических узлах шеи: Lymph node metastases: нет по есть yes	3,3 (1,0-5,5) 6,0 (2,2-9,3)	0,002

**Таблица 2.** Уровень экспрессии онкогенных miR-183, miR-375, miR-551b и онкосупрессорной miR-145 в зависимости от размера опухоли

**Table 2.** Level of expression of oncogenic miR-183, miR-375, miR-551b and oncosuppressive miR-145 depending on the size of the tumor

Микро-РНК Micro-RNA	Уровень экспрессии, Ме (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) Expression level, Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )		p
	в микрокарциномах (≤1 см) in microcarcinoma (≤1 cm)	в опухолях диаметром >1 см in tumors >1 cm	
miR-183	0,008 (0,006-0,010)	0,010 (0,070-0,020)	0,02
miR-375	0,070 (0,020-0,120)	0,120 (0,030-0,200)	0,006
miR-551b	0,030 (0,008-0,074)	0,060 (0,023-0,110)	0,0006
miR-145	0,270 (0,170-0,400)	0,200 (0,150-0,300)	0,05

Экспрессия miR-221 различалась в зависимости от многих клинико-анатомических характеристик ПРЩЖ (табл. 3). Она коррелировала с наличием регионарных

**Таблица 3.** Уровень экспрессии онкогенной miR-221 в зависимости от клинико-анатомических характеристик папиллярного рака щитовидной железы

**Table 3.** Level of expression of oncogenic miR-221 depending on the clinical and anatomical characteristics of papillary thyroid cancer

Характеристика Characteristic	Уровень экспрессии, Ме (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) Expression level, Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	p
Многоочаговость: Multifocal tumors: нет по да yes	0,45 (0,17-0,92) 0,80 (0,30-1,70)	0,005
Метастазы в лимфатических узлах шеи: Lymph node metastases: нет по есть yes	0,30 (0,14-0,67) 0,70 (0,30-1,30)	<0,0001
Экстратиреоидный рост опухоли: Extrathyroid extension: нет по есть yes	0,40 (0,16-0,83) 0,70 (0,27-1,30)	0,02
Отдаленные метастазы: Distant metastasis: нет по есть yes	0,49 (0,17-0,92) 1,30 (0,76-1,70)	0,0005
Риск рецидива по системе Американской тиреологической ассоциации: American Thyroid Association risk stratification: низкий low промежуточный intermediate высокий high	0,30 (0,14-0,70) 0,47 (0,23-0,95) 1,27 (0,77-1,70)	0,006* 0,003** <0,0001***

\*При сравнении уровня экспрессии при низком и промежуточном риске.

\*\*При сравнении уровня экспрессии при высоком и промежуточном риске.

\*\*\*При сравнении уровня экспрессии при низком и высоком риске.

\*When comparing the level of expression at low and intermediate risk.

\*\*When comparing the level of expression at high and intermediate risk.

\*\*\*When comparing the level of expression at low and high risk.

( $p < 0,0001$ ) и отдаленных метастазов ( $p = 0,0005$ ), инвазии в капсулу железы ( $p = 0,02$ ) и многоочаговостью ( $p = 0,005$ ). Кроме того, уровень экспрессии miR-221

был статистически значимо выше в группах высокого и промежуточного риска, чем в группе низкого риска ( $p < 0,0001$  и  $p = 0,006$ ).

Выше был уровень экспрессии онкосупрессорной miR-144 в одиночных опухолях ( $p = 0,009$ ) и в опухолях при отсутствии отдаленных метастазов ( $p < 0,0001$ ). Отмечена выраженная корреляция уровня ее экспрессии с риском рецидива. В группе высокого риска экспрессия miR-144 была значительно ниже, чем в группах промежуточного ( $p = 0,0007$ ) и низкого ( $p < 0,0001$ ) риска (табл. 4).

**Таблица 4.** Уровень экспрессии онкосупрессорной miR-144 в зависимости от клинико-анатомических характеристик папиллярного рака щитовидной железы

Table 4. Level of expression of oncosuppressive miR-144, depending on the clinical and anatomical characteristics of papillary thyroid cancer

Характеристика Characteristic	Уровень экспрессии, Ме (Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub> ) Expression level, Me (Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub> )	p
Многоочаговость: Multifocal tumors:		
нет no	0,0020 (0,001–0,0060)	0,009
да yes	0,0016 (0,0010–0,0030)	
Отдаленные метастазы: Distant metastasis:		
нет no	0,0040 (0,0010–0,0120)	<0,0001
есть yes	0,0010 (0,0006–0,0015)	
Риск рецидива по системе Американской тиреоидологической ассоциации: American Thyroid Association risk stratification:		
низкий low	0,0040 (0,0020–0,0130)	0,0007*
промежуточный intermediate	0,0040 (0,0010–0,0110)	
высокий high	0,0010 (0,0006–0,0018)	

\*При сравнении уровня экспрессии при высоком и промежуточном риске.

\*\*При сравнении уровня экспрессии при низком и высоком риске.

\*When comparing the level of expression at high and intermediate risk.

\*\*When comparing the level of expression at low and high risk.

Онкосупрессорная miR-451a экспрессируется в большей степени в одиночных опухолях ( $p = 0,03$ ) и в опухолях без отдаленных метастазов ( $p = 0,003$ ). У больных группы высокого риска экспрессия miR-451a была ниже, чем в группе низкого ( $p = 0,004$ ) и промежуточного риска ( $p = 0,005$ ). Различий между группами промежуточного и низкого риска не выявлено (табл. 5).

**Таблица 5.** Уровень экспрессии онкосупрессорной miR-451a в зависимости от клинико-анатомических характеристик папиллярного рака щитовидной железы

Table 5. Level of expression of oncosuppressive miR-451a, depending on the clinical and anatomical characteristics of papillary thyroid cancer

Характеристика Characteristic	Уровень экспрессии, Ме (Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub> ) Expression level, Me (Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub> )	p
Многоочаговость: Multifocal tumors:		
нет no	2,90 (1,60–6,60)	0,03
да yes	1,90 (1,00–3,30)	
Отдаленные метастазы: Distant metastasis:		
нет no	4,19 (1,50–15,80)	0,003
есть yes	1,28 (0,40–1,80)	
Риск рецидива по системе Американской тиреоидологической ассоциации: American Thyroid Association risk stratification:		
низкий low	4,20 (1,60–15,60)	0,005*
промежуточный intermediate	4,20 (1,50–15,60)	
высокий high	1,30 (0,45–2,10)	

\*При сравнении уровня экспрессии при высоком и промежуточном риске.

\*\*При сравнении уровня экспрессии при низком и высоком риске.

\*When comparing the level of expression at high and intermediate risk.

\*\*When comparing the level of expression at low and high risk.

При сравнении клинико-анатомических характеристик в зависимости от уровня экспрессии онкосупрессорной miR-7, установлено, что он был ниже в агрессивных формах ПРЩЖ (табл. 6): в опухолях диаметром  $> 1,0$  см ( $p < 0,0001$ ), многоочаговых карциномах ( $p = 0,03$ ), при наличии регионарных ( $p < 0,0001$ ) и отдаленных метастазов ( $p = 0,04$ ), при экстрагитроидном росте ( $p < 0,0001$ ). Экспрессия miR-7 была статистически значимо ниже в группах высокого и промежуточного риска рецидива, чем в группе низкого риска ( $p < 0,0001$ ).

Были рассчитаны AUC при разграничении разных групп риска по системе АТА (2009) для каждой микроРНК (табл. 7). Наибольшие значения AUC были получены для miR-144 при разграничении групп низкого и высокого риска (0,79), а также промежуточного и высокого риска (0,75); для miR-451a при разграничении групп низкого и высокого риска (0,7), а также промежуточного и высокого риска (0,7); для miR-7 при разграничении групп низкого и промежуточного риска (0,72), а также низкого и высокого риска (0,79).

**Таблица 6.** Уровень экспрессии онкосупрессорной miR-7 в зависимости от клинико-анатомических характеристик папиллярного рака щитовидной железы

Table 6. Level of expression of oncosuppressive miR-7, depending on the clinical and anatomical characteristics of papillary thyroid cancer

Характеристика Characteristic	Уровень экспрессии, Ме (Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub> ) Expression level, Me (Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub> )	p
Размер опухоли: Tumor size: микрокарциномы (≤ 1 см) microcarcinoma (≤1 cm) опухоли >1 см tumor >1 cm	0,08 (0,03–0,20) 0,03 (0,01–0,10)	<0,0001
Многоочаговость: Multifocal tumors: нет no да yes	0,05 (0,01–0,14) 0,02 (0,01–0,04)	0,03
Метастазы в лимфатических узлах шеи: Lymph node metastases: нет no есть yes	0,08 (0,03–0,17) 0,02 (0,01–0,05)	<0,0001
Экстратиреоидный рост опухоли: Extrathyroid extension: нет no есть yes	0,07 (0,02–0,15) 0,02 (0,01–0,07)	<0,0001
Отдаленные метастазы: Distant metastasis: нет no есть yes	0,06 (0,02–0,15) 0,02 (0,01–0,06)	0,04
Риск рецидива по системе Американской тиреологической ассоциации: American Thyroid Association risk stratification: низкий low промежуточный intermediate высокий high	0,10 (0,04–0,20) 0,04 (0,01–0,09) 0,01 (0,01–0,05)	<0,0001* <0,0001**

\*При сравнении уровня экспрессии при низком и промежуточном риске.

\*\*При сравнении уровня экспрессии при низком и высоком риске.

\*When comparing the level of expression at low and intermediate risk.

\*\*When comparing the level of expression at low and high risk.

Наибольшую прогностическую силу для оценки риска рецидива имела miR-221. При уровне ее экспрессии более 1,0 AUC составила 0,83 для разграничения групп

низкого и высокого риска (чувствительность 67 %, специфичность 83 %). Отношение шансов составило 9,7 при 95 % доверительном интервале 3,1–29,5 (вероятность наличия агрессивной формы ПРЩЖ в 9,7 раз выше в случае уровня экспрессии miR-221 >1,0).

**Таблица 7.** Прогностическая ценность различных микроРНК в оценке риска рецидива по системе Американской тиреологической ассоциации (2009) на основании расчета площади под ROC-кривой

Table 7. Predictive value of various microRNAs in risk assessment according to American Thyroid Association Risk Stratification System (2009) based on the calculation of the area under the ROC curve

МикроРНК MicroRNA	Разграничение низкого и промежуточного риска Low/intermediate risk	Разграничение низкого и высокого риска Low/high risk	Разграничение промежуточного и высокого риска Intermediate/high risk
miR-144	0,520	0,789	0,746
miR-221	0,594	0,830	0,761
miR-451a	0,547	0,703	0,711
miR-7	0,722	0,789	0,553

### Обсуждение

Своевременное хирургическое лечение обеспечивает достаточно высокую 5-летнюю выживаемость большинства больных ПРЩЖ, но в 20 % случаев после первичной операции выявляется метастатическое поражение регионарных ЛУ шеи или развивается местный рецидив опухоли [9, 10]. Более точная стратификация риска рецидива ПРЩЖ необходима для того, чтобы предотвратить чрезмерно активное лечение пациентов с благоприятным прогнозом и, наоборот, обеспечить более активное лечение пациентов с агрессивным типом карциномы. Ни одна из систем определения стадии рака щитовидной железы до недавнего времени не включала результаты молекулярного-генетического тестирования. Только в руководстве ATA 2015 г. было предложено выявлять мутации *BRAF* и *TERT* как маркеры рака с менее благоприятным прогнозом. В метаанализе 2012 г., охватывающем 14 публикаций, был сделан вывод о том, что мутация *BRAF* ассоциирована с экстратиреоидным ростом опухоли и наличием метастазов в ЛУ шеи [11]. В другом, более позднем метаанализе (2017), напротив, указано на отсутствие этой связи в 11 из 27 исследований [12]. Мы не обнаружили корреляции между наличием мутации *BRAF* и степенью агрессивности ПРЩЖ. В последние годы общее мнение заключается в том, что одного этого генетического маркера недостаточно для оценки вероятности агрессивного течения ПРЩЖ и выбора лечебной тактики. Ввиду этого дальнейший поиск информативных маркеров по-прежнему крайне необходим для точной стратификации риска рецидива ПРЩЖ [6, 13].

С тех пор как Н. Не и соавт. сообщили о потенциальной роли микроРНК в патогенезе ПРЩЖ [14], было выявлено большое количество как онкогенных, так и онкосупрессорных микроРНК [15–18]. Установлено, что экспрессия различных микроРНК коррелировала с такими признаками агрессивности опухоли, как экстрагистеодный рост, метастазирование в ЛУ, отдаленные метастазы и рецидивы заболевания. Предварительные результаты, полученные авторами, указывают на большой потенциал отдельных микроРНК в прогнозе риска рецидива ПРЩЖ [15–18]. При этом исследований, учитывающих роль всех потенциальных молекулярно-генетических маркеров, крайне мало.

В нашем исследовании была оценена связь 12 микроРНК с различными клинико-анатомическими характеристиками ПРЩЖ. Уровни экспрессии miR-183, miR-375, miR-145 и miR-551b различались только в зависимости от размера опухоли: содержание онкогенных miR-183, miR-375 и miR-551b в микрокарциномах было ниже, чем в крупных опухолях, а онкосупрессорных miR-145, соответственно, выше. Мы продемонстрировали, что экспрессия miR-146 и miR-221 была значительно повышена при наличии таких признаков, как инвазия в капсулу железы, большой размер опухоли, многоочаговость и появление метастазов. В отличие от онкогенных микроРНК, экспрессия онкосупрессорных miR-144, miR-451a и miR-7 была статистически значимо ниже в тех же подгруппах.

Оценив уровни экспрессии микроРНК в разных группах риска рецидива, мы установили, что экспрессия онкогенной miR-221 в них значительно различалась. Наиболее высокая экспрессия была зарегистрирована в группе высокого риска, а наименьшая – в группе низкого риска ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,006$ ). Различались и уровни экспрессии 3 онкосупрессорных микроРНК – miR-144, miR-451a и miR-7. Их содержание было значительно ниже в группе высокого риска и выше в группах низкого и промежуточного риска ( $p < 0,0001$  для miR-144 и miR-7,  $p = 0,004$  для miR-451a).

### Заключение

Определение экспрессии изученных нами микроРНК возможно на дооперационном этапе при тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы [19]. Полученные в результате исследования данные позволят индивидуализировать лечебную тактику у пациентов с ПРЩЖ до операции. Однако в настоящее исследование не включены пациенты с рецидивом ПРЩЖ, и отсутствие отдаленных результатов наблюдения за ними затрудняет возможность проспективной оценки полученных данных. Мы считаем, что будущие исследования в этом направлении должны быть направлены на устранение этих ограничений, а также на поиск других молекулярно-генетических маркеров и их комбинаций для оценки риска рецидива ПРЩЖ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Davies L., Welch H.G. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA* 2006;295(18):2164–7. DOI: 10.1001/jama.295.18.2164.
- Goldfarb M., Casillas J. Unmet information and support needs in newly diagnosed thyroid cancer: comparison of adolescents/young adults (AYA) and older patients. *J Cancer Surviv* 2014;8(3):394–401. DOI: 10.1007/s11764-014-0345-7.
- Onkendi E.O., McKenzie T.J., Richards M.L. et al. Reoperative experience with papillary thyroid cancer. *World J Surg* 2014;38(3):645–52. DOI: 10.1007/s00268-013-2379-9.
- Kim H.J., Lee J.I., Kim N.K. et al. Prognostic implications of radioiodine avidity and serum thyroglobulin in differentiated thyroid carcinoma with distant metastasis. *World J Surg* 2013;37(12):2845–52. DOI: 10.1007/s00268-013-2213-4.
- Cooper D.S., Doherty G.M., Haugen B.R. et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19(11):1167–214. DOI: 10.1089/thy.2009.0110.
- Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C. et al. 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. *Thyroid* 2016;26(1):1–133. DOI: 10.1089/thy.2015.0020.
- Titov S.E., Ivanov M.K., Demenkov P.S. et al. Combined quantitation of HMGA2 mRNA, microRNAs, and mitochondrial-DNA content enables the identification and typing of thyroid tumors in fine-needle aspiration smears. *BMC Cancer* 2019;19(1):1010. DOI: 10.1186/s12885-019-6154-7.
- Titov S.E., Ivanov M.K., Karpinskaya E.V. et al. miRNA profiling, detection of *BRAF* V600E mutation and *RET-PTC1* translocation in patients from Novosibirsk oblast (Russia) with different types of thyroid tumors. *BMC Cancer* 2016;16:201. DOI: 10.1186/s12885-016-2240-2.
- Chen J.H., Faquin W.C., Lloyd R.V., Nosé V. Clinicopathological and molecular characterization of nine cases of columnar cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2011;24(5):739–49. DOI: 10.1038/modpathol.2011.2.
- Falvo L., Catania A., D'Andrea V. et al. Prognostic importance of histologic vascular invasion in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg* 2005;241(4):640–6. DOI: 10.1097/01.sla.0000157317.60536.08.
- Tufano R.P., Teixeira G.V., Bishop J. et al. *BRAF* mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2012;91(5):274–86. DOI: 10.1097/md.0b013e31826a9c71.
- Rodrigues A.C., Penna G., Rodrigues E. et al. The genetics of papillary microcarcinomas of the thyroid: diagnostic and prognostic implications. *Curr Genomics* 2017;18(3):244–54. DOI: 10.2174/1389202918666170105094459.

13. Ito Y., Yoshida H., Kihara M. et al. *BRAF* (V600E) mutation analysis in papillary thyroid carcinoma: is it useful for all patients? *World J Surg* 2014;38(3):679–87. DOI: 10.1007/s00268-013-2223-2.
14. He H., Jazdzewski K., Li W. et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(52):19075–80. DOI: 10.1073/pnas.0509603102.
15. Pallante P., Visone R., Ferracin M. et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 2006;13(2):497–508. DOI: 10.1677/erc.1.01209.
16. Colamaio M., Borbone E., Russo L. et al. miR-191 down-regulation plays a role in thyroid follicular tumors through CDK6 targeting. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(12):E1915–24. DOI: 10.1210/jc.2011-0408.
17. De la Chapelle A., Jazdzewski K. MicroRNAs in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(11):3326–36. DOI: 10.1210/jc.2011-1004.
18. Esposito F., Tornincasa M., Pallante P. et al. Down-regulation of the miR-25 and miR-30d contributes to the development of anaplastic thyroid carcinoma targeting the polycomb protein EZH2. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(5):E710–8. DOI: 10.1210/jc.2011-3068.
19. Сергийко С.В., Лукьянов С.А., Титов С.Е., Веряскина Ю.А. Молекулярно-генетическое тестирование в дифференциальной диагностике узловых образований щитовидной железы с цитологическим заключением «фолликулярная опухоль Bethesda IV». *Практическая медицина* 2019;17(4):149–52. [Sergiyko S.V., Lukyanov S.A., Titov S.E., Veryaskina Yu.A. Molecular-genetic testing in differential diagnostics of node lesions in thyroid gland with cytological conclusion of “follicular tumor Bethesda IV”. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine* 2019;17(4):149–52. (In Russ.)]. DOI: 10.32000/2072-1757-2019-4-149-152.

#### Вклад авторов

С.А. Лукьянов: разработка концепции и дизайна исследования, отбор пациентов, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

С.В. Сергийко: разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных, научное редактирование статьи;

С.Е. Титов: разработка концепции и дизайна исследования, проведение молекулярно-генетического тестирования, научное редактирование статьи;

И.В. Решетов, А.В. Важенин: отбор пациентов, научное редактирование статьи;

Ю.А. Веряскина: проведение молекулярно-генетического тестирования, анализ полученных данных;

А.В. Гостимский, Л.И. Ипполитов, М.О. Рогова: отбор пациентов.

#### Authors' contributions

S.A. Lukyanov: developing the research design, selection of patients, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;

S.V. Sergiyko: developing the research design, analysis of the obtained data, scientific editing of the article;

S.E. Titov: developing the research design, molecular genetic testing, scientific editing of the article;

I.V. Reshetov, A.V. Vazhenin: selection of patients, scientific editing of the article;

Yu.A. Veryaskina: molecular genetic testing, analysis of the obtained data;

A.V. Gostimsky, L.I. Ippolotov, M.O. Rogova: selection of patients.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

С.А. Лукьянов/S.A. Lukyanov: <http://orcid.org/0000-0001-5559-9872>

С.В. Сергийко/S.V. Sergiyko: <http://orcid.org/0000-0001-6694-9030>

С.Е. Титов/S.E. Titov: <http://orcid.org/0000-0001-9401-5737>

Ю.А. Веряскина/Yu.A. Veryaskina: <http://orcid.org/0000-0002-3799-9407>

М.О. Рогова/M.O. Rogova: <http://orcid.org/0000-0002-1470-7803>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Информированное согласие.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Informed consent.** All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 07.03.2020. Принята к публикации: 20.03.2020.

Article submitted: 07.03.2020. Accepted for publication: 20.03.2020.