

Анализ относительной экспрессии гена *HMGA2* и онкогенной микроРНК-221 в цитологических препаратах, полученных при тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы

С.Е. Титов^{1,2}, М.К. Иванов^{1,2}, Е.В. Цивликова², М.С. Ганжа², Е.С. Малахина¹, А.В. Малек^{3,4}, Т.Л. Полоз⁵, С.П. Шевченко⁶, **Н.Н. Колесников¹**

¹ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН;
Россия, 630090 Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева, 8/2;

²АО «Вектор-Бест»; Россия, 630559 Новосибирская область, пос. Колъцово, Научно-производственная зона, корпус 36;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России;
Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

⁴ООО «Онко-система»; Россия, 194356 Санкт-Петербург, ул. Хошимина, 11;

⁵НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Новосибирск-Главный ОАО «РЖД»; Россия, 630003 Новосибирск,
Владимировский спуск, 2а;

⁶ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 1»; Россия, 630047 Новосибирск, ул. Залесского, 6

Контакты: Сергей Евгеньевич Титов titovse78@gmail.com

Введение. Цитологический анализ препаратов тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии является «золотым стандартом» дооперационной диагностики рака щитовидной железы (ЩЖ). Однако этот метод не всегда позволяет надежно дифференцировать доброкачественные и злокачественные узлы ЩЖ. Так, цитологическое заключение «фолликулярная опухоль или подозрение на фолликулярную опухоль» предполагает оперативное вмешательство. Однако в большинстве случаев это заключение соответствует не фолликулярному раку, а доброкачественной фолликулярной аденоме, в отношении которой хирургическое вмешательство оказывается избыточным. В связи с этим актуален поиск биологических маркеров, анализ содержания которых мог бы повысить специфичность определения злокачественных опухолей. К таким маркерам может относиться повышение уровня экспрессии онкогенов или изменение экспрессии микроРНК, поскольку известно, что при развитии опухолей ЩЖ существенно меняется содержание целого ряда микроРНК.

Материалы и методы. С помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с детекцией в реальном времени проведен анализ уровня экспрессии гена *HMGA2*, в норме активного на эмбриональной стадии, и онкогенной микроРНК *miRNC-221* в 713 цитологических препаратах ЩЖ (окрашенный материал, высушенный на стеклах), полученных при выполнении стандартной тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии. Выборка включала препараты, соответствующие разным цитологическим заключениям: доброкачественные образования ($n = 375$), фолликулярные опухоли или подозрение на фолликулярную опухоль ($n = 143$), медулярный рак ($n = 7$), папиллярный рак ($n = 186$), анапластический рак ($n = 2$).

Результаты. Содержание матричной РНК (мРНК) *HMGA2* ($P = 1,6 \times 10^{-66}$; площадь под ROC-кривой 0,927) оказалось достоверно повышенным при папиллярном раке по сравнению с доброкачественными опухолями. Фолликулярные опухоли продемонстрировали существенную неоднородность по содержанию обоих молекулярных маркеров. При этом для образцов из этой группы с повышенным (в среднем в 85 раз) уровнем экспрессии гена *HMGA2* был характерен также повышенный (в среднем в 3 раза) уровень *miRNC-221*. Группа фолликулярных опухолей, в которых не выявлены повышенные уровни мРНК гена *HMGA2*, по содержанию перечисленных маркеров не отличалась от группы доброкачественных образований.

Заключение. Полученные результаты показывают, что оценка экспрессии мРНК *HMGA2* и онкогенной *miRNC-221* позволяет дифференцировать на дооперационной стадии папиллярный рак ЩЖ и доброкачественные неопухолевые образования, а по содержанию мРНК *HMGA2* можно разделить группу фолликулярных опухолей на подгруппы, предположительно различающиеся по риску злокачественности.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, молекулярные маркеры, *HMGA2*, микроРНК-221, тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-4-24-31

Analysis of relative expression of the *HMGA2* gene and oncogenic microRNA-221 in cytological slides obtained by a fine-needle aspiration biopsy of the thyroid nodules

S.E. Titov^{1,2}, M.K. Ivanov^{1,2}, E.V. Tsivlikova², M.S. Ganzha², E.S. Malakhina¹, A.V. Malek^{3,4}, T.L. Poloz⁵, S.P. Shevchenko⁶, **N.N. Kolesnikov¹**

¹Institute of Molecular and Cell Biology Siberian branch of Russian Academy of Sciences; 8/2 Acad. Lavrent'eva prospect, Novosibirsk 630090, Russia;

²Vector-Best; build. 36 Scientific-production zone, Kol'tsovo, Novosibirsk Oblast 630559, Russia;

³N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochnyy Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;

⁴Oncosystem; 11 Khoshimina St., Saint Petersburg 194356, Russia;

⁵Railway Clinical Hospital on the Station Novosibirsk-Glavny; 2a Vladimirovskiy Spusk, Novosibirsk 630003, Russia;

⁶City Clinical Hospital No. 1; 6 Zalesskogo St., Novosibirsk 630047, Russia

Background. Fine-needle aspiration biopsy is recognized as the “gold standard” in the preoperative diagnosis of thyroid cancer. However, this method does not always allow reliable differentiation between benign and malignant thyroid nodules. Thus, the cytological report of a “follicular neoplasm or suspicious for a follicular neoplasm” suggests surgical lobectomy. However, in most cases, this conclusion does not point to follicular cancer but to benign neoplasm, follicular adenoma, where the surgical intervention is excessive. This implies the great relevance of finding biological markers capable of enhancing the specificity of detecting malignant neoplasms. Such markers may include an increase in the level of expression of oncogenes or a change in the expression of microRNA, since it is known that the content of a number of microRNAs changes significantly during the development of thyroid tumors.

Materials and methods. The expression level of the *HMGA2* gene, normally active at the embryonic stage, and oncogenic *miR-221* microRNA was analyzed using real-time reverse transcription polymerase chain reaction in 713 cytological preparations of the thyroid gland (stained material dried on glasses) obtained by standard fine-needle aspiration biopsy. The sample included preparations corresponding to different cytological diagnoses: benign ($n = 375$), follicular neoplasm or suspicious for a follicular neoplasm ($n = 143$), medullary carcinoma ($n = 7$), papillary carcinoma ($n = 186$) and anaplastic carcinoma ($n = 2$).

Results. The content of messenger RNA (mRNA) *HMGA2* ($P = 1.6 \times 10^{-66}$, area under curve ROC 0.946) and *miR-221* ($P = 6.3 \times 10^{-61}$, area under curve ROC 0.927) proved to be significantly elevated in papillary carcinoma compared to benign tumors. Follicular neoplasms showed significant heterogeneity in the quantity of both molecular markers. At the same time, an elevated level of *miR-221* (3 times on average) was also characteristic of samples from this group with an increased level of expression of the *HMGA2* gene (an average of 85 times). With regard to the quantity of these markers, the group of follicular neoplasms, in which no increase in the *HMGA2* mRNA level was detected, did not differ from the group of benign nodules.

Conclusions. The obtained results show that assessing the expression of *HMGA2* mRNA and oncogenic *miR-221* makes it possible to differentiate the papillary thyroid carcinoma from goiter at the preoperative stage, and based on the content of the *HMGA2* mRNA, the group of follicular neoplasms can be divided into subgroups presumably differing in the risk of malignancy.

Key words: thyroid cancer, molecular markers, *HMGA2*, microRNA-221, fine needle aspiration biopsy

Введение

Среди всех заболеваний эндокринной системы узловые патологии щитовидной железы (ЩЖ) преобладают по распространенности и встречаются (по различным данным) у 4–10 % населения. Большинство (~95 %) узлов доброкачественные и не требуют оперативного вмешательства [1]. Точность дооперационного определения типа узловой патологии принципиальна, поскольку диагноз определяет необходимость и объем хирургического вмешательства. Основной метод дооперационной диагностики – цитологическое исследование препарата, полученного с помощью направляемой ультразвуком тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии. Несмотря на то, что цитологический анализ на данный момент является «золотым стандартом» дооперационной диагностики, его технические ограничения и зависимость от подготовки исполнителя в ряде случаев не позволяют надежно дифференцировать доброкачественные и злокачественные узлы [2]. Особенно это касается фолликулярных опухолей. Цитологический анализ не в состоянии разделить доброкачественные фолликулярные аденомы (ФА), не требующие хирургического вмешательства, и фолликулярный рак (ФР). В результате пациентов, у которых развивается ФА, по результатам цитологического анализа направляют на операцию, которая является ненужной и может иметь долговременные отрицательные последствия для здоровья. Применение на стадии дооперационной диагностики дополнитель-

ных диагностических тестов с более высокой положительной предсказательной ценностью в отношении злокачественных опухолей могло бы помочь снизить долю нежелательных медицинских манипуляций.

Негистоновые белки хроматина из семейства *HMGA* (high mobility group A), являющиеся архитектурными факторами транскрипции, достаточно давно известны как маркеры злокачественности и быстрой прогрессии [3]. Белки *HMGA* влияют на целый спектр биологических процессов в клетке, включая рост, пролиферацию и дифференцировку. Оба гена, кодирующие белки *HMGA* (*HMGA1* и *HMGA2*), активно экспрессируются на эмбриональном этапе развития, в то время как в клетках взрослого организма их экспрессия находится на фоновом уровне [4]. Однако при развитии злокачественных опухолей эпителиального происхождения уровень экспрессии этих генов опять значительно повышается. Увеличение уровня экспрессии гена *HMGA2* было отмечено при раке толстой кишки [5], мочевого пузыря [6], ЩЖ [7], кожи [8], яичников [9] и др.

Возможность оценки уровня экспрессии гена *HMGA2* для стратификации злокачественных и доброкачественных опухолей и неопухолевых образований в препаратах ЩЖ с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) впервые показана почти 10 лет назад [10]. Авторы проанализировали выборку гистологических препаратов ($n = 61$), представленную преимущественно образцами папиллярного рака (ПР; $n = 28$), ФА ($n = 19$) и ФР ($n = 9$),

и выявили повышение уровня экспрессии этого гена в злокачественных опухолях по сравнению с доброкачественными. Чувствительность и специфичность определения злокачественных новообразований, основанные на оценке содержания матричной РНК (мРНК) *HMGA2*, составили 95,9 и 93,9 % соответственно [10]. Схожая методика использована в работе [11], в которой был проведен анализ экспрессии *HMGA2* в 115 цитологических препаратах с известным гистологическим заключением. Несмотря на высокую (97 %) специфичность определения злокачественных новообразований, диагностическая чувствительность составила лишь 71 %, что может быть связано с иной структурой выборки, в которой лишь небольшую ($n = 22$ (19,1 %)) долю составили образцы ПР, но при этом 80 (69,6 %) образцов представляли собой фолликулярные опухоли. В работе [12] на выборке из 170 гистологических и 226 цитологических препаратов узлов ЩЖ было подтверждено существенное повышение уровня экспрессии гена *HMGA2* в большинстве злокачественных опухолей по сравнению с доброкачественными опухолями и образованиями, а также продемонстрирована высокая корреляция между результатами цитологического и гистологического исследования препаратов. В то же время в некоторых работах авторам не удалось выявить достоверных различий в уровне экспрессии гена *HMGA2* в злокачественных и доброкачественных опухолях и образованиях с помощью количественной ПЦР [13, 14].

Таким образом, существует консенсус относительно роли гена *HMGA2* в процессах образования злокачественных опухолей, в том числе ЩЖ, однако выводы относительно применимости данного маркера для диагностических целей, полученные разными авторами, расходятся, что может быть связано не только с техническими особенностями используемых методов, но и со структурой анализируемых выборок. Следует подчеркнуть, что во всех упомянутых работах выборки включали относительно небольшую долю доброкачественных неопухолевых образований.

Результаты исследований последних лет показали, что при развитии разных опухолей ЩЖ существенно изменяется содержание целого ряда клеточных микроРНК, в том числе миРНК-221. Эта микроРНК высоко консервативна для позвоночных и у ряда млекопитающих, включая человека, кодируется X-хромосомой в тандеме с миРНК-222. Повышенная экспрессия миРНК-221 отмечена при ряде онкологических заболеваний [15]. К ее мишеням относится белок CD117, рецептор одной из тирозинкиназ [16], а также регулятор клеточного цикла p27Kip1 [17]. Нарушения экспрессии миРНК-221 могут приводить к нарушениям клеточного цикла и дедифференцировке, а также способствовать клеточной миграции и aberrantному ангиогенезу. Таким образом, миРНК-221 является классической онкогенной микроРНК.

Повышение содержания миРНК-221 при развитии опухолей ЩЖ впервые продемонстрировано более

10 лет назад [18] и позже подтверждено в ряде работ. Большинство этих исследований касалось ПР ЩЖ. В то же время показано, что повышенный уровень миРНК-221 характерен и для ФР ЩЖ как обычных, так и В-клеточных [19]. Также было продемонстрировано, что ФА ЩЖ различаются по уровню экспрессии миРНК-221: в классических ФА он не изменен (как и в доброкачественных образованиях), а в В-клеточных — повышен [19]. М. Dettmer и соавт. показали, что лишь для кластера миРНК-221/222 характерно выраженное увеличение содержания для разных типов рака ЩЖ, включая ПР и ФР [20]. Это позволило авторам предположить, что повышенная экспрессия любой из этих микроРНК может рассматриваться как универсальный маркер злокачественности клеток ЩЖ. В то же время в работе В. Wojtas и соавт. было продемонстрировано, что повышение уровня миРНК-221 при ФР, в отличие от ПР, не ассоциировано с инвазией и метастазированием и может являться ранним событием при трансформации фолликулярных клеток, происходящим уже на стадии доброкачественных новообразований [21].

Цель исследования — анализ экспрессии гена *HMGA2* и микроРНК миРНК-221 с помощью ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в выборке из 713 цитологических препаратов, полученных на стадии дооперационного типирования узлов ЩЖ, соответствующих в дальнейшем разным цитологическим заключениям.

Материалы и методы

Клинический материал. В работе использовали 713 цитологических образцов, полученных в период с 2014 по 2016 г. при проведении стандартной тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии в Центре новых медицинских технологий (г. Новосибирск) и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова (г. Санкт-Петербург). В соответствии с законодательством России цитологический материал от каждого пациента был получен при наличии информированного согласия на его использование, все данные были деперсонализированы. Образцы классифицированы в соответствии с системой Бетесда [22]: категория II по системе Бетесда: доброкачественные образования ($n = 375$); категория IV по системе Бетесда: фолликулярная опухоль или подозрение на фолликулярную опухоль ($n = 143$); категория VI по системе Бетесда: медуллярный рак ($n = 7$), ПР ($n = 186$), анапластический рак ($n = 2$). Послеоперационные гистологические диагнозы для всех образцов нам не были доступны.

Выделение нуклеиновых кислот из цитологических препаратов и анализ содержания микроРНК выполняли, как описано ранее [23]. Нормировку уровня миРНК-221 проводили на содержание референсной миРНК-197 [24] по формуле: $2^{(Ct_{197} - Ct_{221})}$, где Ct — пороговый цикл реакции для соответствующей микроРНК.

Полуколичественная оценка содержания мРНК *HMGA2*. Для ОТ-ПЦР-РВ использовали специфические праймеры

и флуоресцентно меченные зонды для выявления мРНК гена *HMGA2* и гена домашнего хозяйства *PGK1* (фосфолицераткиназа), применяемого в качестве нормализатора. Все праймеры и зонды были синтезированы в АО «Вектор-Бест» (Россия). Олигонуклеотиды выбирали с использованием онлайн-сервиса PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index/>). Эффективность амплификации для каждой системы оценивали с помощью калибровочной кривой, построенной по разведениям очищенного препарата РНК, выделенной из операционного материала от пациента с ПР ЩЖ, в котором было выявлено высокое содержание мРНК *HMGA2*. Значение E для амплификации гена *PGK1* составило ~100 %, для гена *HMGA2* – ~99 %.

Последовательности олигонуклеотидов для детекции мРНК *HMGA2*:

HMGA2-F: 5'-TCCCTCTAAAGCAGCTCAAAA (прямой праймер);

HMGA2-R: 5'-ACTTGTTGTGGCCATTTCCT (обратный праймер);

HMGA2-P: 5'-(ROX)-CAGAAGCCAC (T-BHQ2) GGAGAAAACGGCCAA-p (флуоресцентно меченный зонд).

Последовательности олигонуклеотидов для детекции мРНК *PGK1*:

PGK-F: 5'-GGAGAACCTCCGCTTTCAT (прямой праймер);

PGK-R: 5'-GCTGGCTCGGCTTTAAC (обратный праймер);

PGK-P: 5'-(ROX)-TTCCAGAAAGCA (T-BHQ2) CTTTCCCTCCCTTCT-p (флуоресцентно меченный зонд).

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ использовали термоциклер CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) и лиофилизованные смеси Мастер-микс ОТ-ПЦР (АО «Вектор-Бест», Россия). Температурный режим реакции: 45 °С – 30 мин, 94 °С – 2 мин, 50 циклов: денатурация при 94 °С – 10 с, отжиг и элонгация: 60 °С – 20 с. Концентрация праймеров в реакции – 0,5 мкМ, флуоресцентно меченного зонда – 0,25 мкМ.

Для оценки уровня экспрессии гена *HMGA2* использовали нормировку на ген домашнего хозяйства *PGK1*. Расчеты уровня относительной экспрессии

производили по формуле: $2^{(Ct_{PGK} - Ct_{HMGA})}$, где Ct – пороговый цикл реакции для соответствующей мРНК. Если для образца не было получено значений Ct для мРНК *HMGA2*, в то время как значения Ct для мРНК *PGK1* находились в пределах стандартных значений для цитологических препаратов ($Ct < 36$), экспрессию *HMGA2* в этом образце считали недетектируемой. Образцы с низким содержанием мРНК *PGK1* ($Ct > 36$) исключали из анализа.

Статистическую обработку данных выполняли в программе Statistica 9.1 (StatSoft Inc., США). Сравнение 2 независимых выборок по количественному признаку проводили с помощью критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости был принят равным 0,05. Для расчета диагностических характеристик применяли ROC-анализ.

Результаты

На рис. 1 представлены относительные уровни экспрессии гена *HMGA2* в образцах с разными цитологическими диагнозами, на рис. 2 – медианные значения и диаграмма размаха.

Из рис. 1 и 2 видно, что для доброкачественных образований характерен относительно невысокий уровень экспрессии гена *HMGA2* и микроРНК-221 по сравнению с ПР. В образцах ПР содержание микроРНК-221 в среднем было выше в 6 раз, чем в образцах доброкачественных образований, а *HMGA2* – в 200 раз. Фолликулярные опухоли занимают промежуточное положение значений относительного уровня экспрессии гена *HMGA2* и микроРНК-221 по сравнению с другими группами. Статистическую значимость полученных различий определяли с помощью критерия Манна–Уитни, результаты представлены в табл. 1, из которой видно, что показанные нами различия в уровне экспрессии *HMGA2* и микроРНК-221 между доброкачественными образованиями, с одной стороны, и ПР, с другой стороны, статистически значимы.

Кроме того, статистически значимые различия выявлены между доброкачественными образованиями и фолликулярными опухолями, с одной стороны, и фолликулярными опухолями и ПР – с другой.

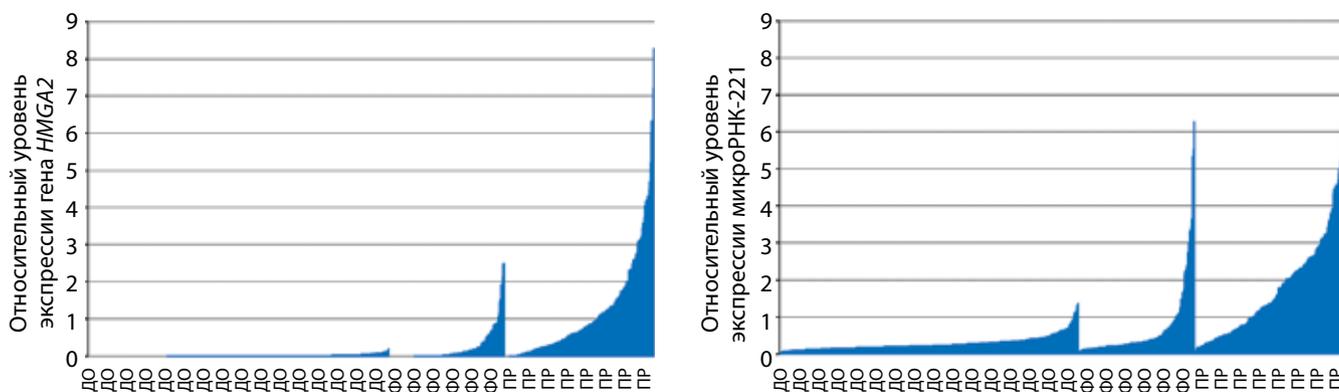


Рис. 1. Все значения относительных уровней экспрессии гена *HMGA2* и микроРНК-221 в порядке возрастания в цитологических образцах. ДО – доброкачественные образования ($n = 375$); ФО – фолликулярные опухоли ($n = 143$); ПР – папиллярный рак ($n = 186$)

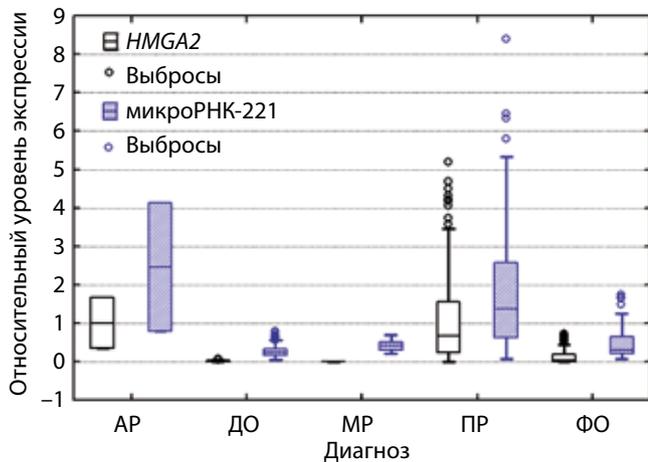


Рис. 2. Диаграмма размаха относительных уровней экспрессии гена *HMG2* и микроРНК-221 в цитологических образцах. Средняя линия обозначает медиану, «ящик» – интерквартильный размах, «усы» – минимальные и максимальные значения без выбросов; выбросы обозначены кружками. AP – анапластический рак; ДО – доброкачественные образования; MP – медулярный рак; PP – папиллярный рак; ФО – фолликулярные опухоли

Для оценки диагностических характеристик уровня экспрессии *HMG2* и миРНК-221 как диагностических маркеров, позволяющих дифференцировать доброкачественные неопухолевые образования и злокачественные опухоли, с использованием ROC-анализа, мы взяли 2 гомогенные в отношении признака доброкачественности/злокачественности группы образцов: доброкачественные образования и ПР. Результаты анализа приведены в табл. 2. Очевидно, что деление по уровню экспрессии *HMG2* обладает более высокими диагностическими характеристиками, чем по уровню экспрессии миРНК-221, что, возможно, связано с большим размахом значений уровня экспрессии *HMG2*.

При использовании отсечки значения относительного уровня экспрессии *HMG2*, равной 0,2, достигается максимальная (100 %) специфичность определения

образцов с ПР, чувствительность при этом составляет 79 %. Если применить эту отсечку к фолликулярным опухолям, то 24,5 % таких образцов попадают в группу с уровнем экспрессии *HMG2* >0,2, который рассматривается нами как повышенный и в которую не попадает ни одно доброкачественное образование (рис. 3).

Разница в уровне экспрессии гена *HMG2* между группами фолликулярных опухолей с его повышенным и «нормальным» содержанием достигает 85 раз, а разница в уровне экспрессии миРНК-221 между этими группами составляет в среднем 3 раза (рис. 4). При этом в существенной части (23 %) образцов фолликулярных опухолей с низким содержанием мРНК *HMG2*, а также в небольшой части образцов доброкачественных образований уровень миРНК-221 был повышен. Обратная ситуация (уровень миРНК-221 низкий, а уровень *HMG2* повышен) оказалась нехарактерной для нашей выборки.

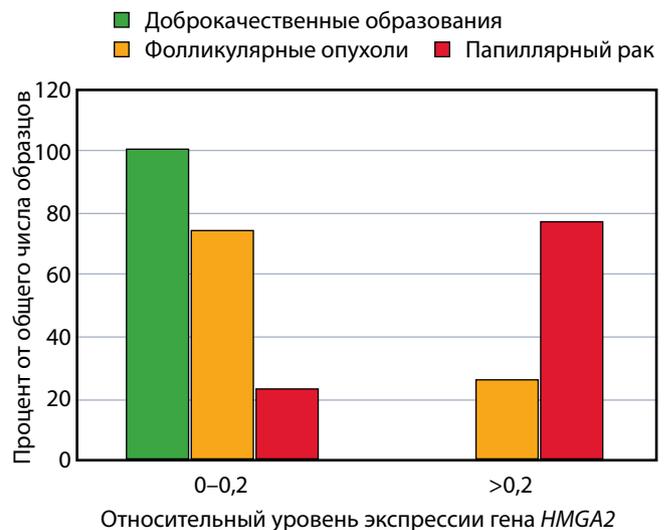


Рис. 3. Распределение образцов опухолей и образований щитовидной железы с разными цитологическими диагнозами по уровням экспрессии гена *HMG2* (повышен/не повышен)

Таблица 1. Парное сравнение разных групп опухолей щитовидной железы по уровню экспрессии гена *HMG2* и микроРНК-221 и значимость различий

Группа, количество образцов		Me (Q1–Q3) <i>HMG2</i>			Me (Q1–Q3) микроРНК-221		
1-я	2-я	1-я группа	2-я группа	<i>p</i>	1-я группа	2-я группа	<i>p</i>
ДО, 375	AP, 2	0,003 (0–0,016)	1,011 (0,36–1,66)	0,014	0,226 (0,171–0,328)	2,457 (0,789–4,130)	0,018
ДО, 375	MP, 7	0,003 (0–0,016)	0 (0–0,012)	0,310	0,226 (0,171–0,328)	0,426 (0,3–0,509)	0,010
ДО, 375	PP, 186	0,003 (0–0,016)	0,67 (0,24–1,55)	0	0,226 (0,171–0,328)	1,374 (0,624–2,570)	0
ДО, 375	ФО, 143	0,003 (0–0,016)	0,03 (0,0005–0,19)	5 × 10⁻¹¹	0,226 (0,171–0,328)	0,303 (0,212–0,650)	1 × 10⁻⁶
ФО, 143	PP, 186	0,03 (0,0005–0,19)	0,67 (0,24–1,55)	2 × 10⁻²³	0,303 (0,212–0,650)	1,374 (0,624–2,570)	3 × 10⁻²²

Примечание. Me (Q1–Q3) – медиана (межквартильный размах), жирным шрифтом выделены значимые различия. ДО – доброкачественные образования; AP – анапластический рак; MP – медулярный рак; PP – папиллярный рак; ФО – фолликулярные опухоли.

Таблица 2. ROC-анализ и диагностические характеристики уровня экспрессии гена *HMGA2* и микроРНК-221 при дифференцировании доброкачественных опухолей и папиллярного рака

Характеристика	<i>HMGA2</i>		микроРНК-221	
Площадь под ROC-кривой, %	94,6		92,7	
P_1	$1,6 \times 10^{-66}$		$6,3 \times 10^{-61}$	
95 % доверительный интервал	92,1–97,2		90,1–95,2	
Отсечка	0,0944	0,1962	0,4583	1,3698
Специфичность, %	97,9	100	89,3	100
Чувствительность, %	86,5	79,0	84,4	50,5
ПЦПР, %	95,3	100	79,7	100
ПЦОР, %	93,6	90,6	92,0	80,3

Примечание. P_1 – нулевая гипотеза (действительная площадь 0,5); ПЦПР – предсказательная ценность положительного результата; ПЦОР – предсказательная ценность отрицательного результата.

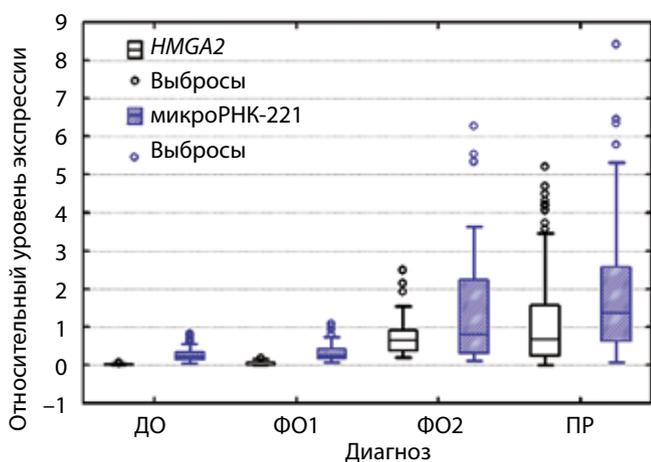


Рис. 4. Диаграмма размаха относительных уровней экспрессии гена *HMGA2* и микроРНК-221 в цитологических образцах доброкачественных образований, фолликулярных опухолей и папиллярного рака. Средняя линия обозначает медиану, «ящик» – интерквартильный размах, «усы» – минимальные и максимальные значения без выбросов; выбросы обозначены кружками. ДО – доброкачественные образования; ФО1 – фолликулярные опухоли с пониженным содержанием мРНК *HMGA2*; ФО2 – фолликулярные опухоли с повышенным содержанием мРНК *HMGA2*; ПР – папиллярный рак

Обсуждение

Несмотря на то, что роль повышения экспрессии гена *HMGA2* в развитии разнообразных злокачественных опухолей эпителиального происхождения хорошо известна и исследована, попытки использования уровня экспрессии *HMGA2* в качестве маркера злокачественных процессов в ЩЖ приводят к неоднозначным результатам. С одной стороны, выявление белков *HMGA2* с помощью иммуногистохимии [25, 26] либо экспрессии гена *HMGA2* с помощью ОТ-ПЦР [10–12, 25] в ряде работ позволило достоверно дифференцировать злокачественные и доброкачественные опухоли. С другой стороны, есть работы, в которых утверждается, что повышенная экспрессия гена *HMGA2* не является надежным диагностическим маркером [13, 14].

Несовпадение результатов разных работ может быть вызвано как применяемыми техниками анализа, так и различиями в составе проанализированных выборок и вкладом человеческого фактора (поскольку в качестве референсного метода используется гистологическое заключение, надежность которого существенно зависит от квалификации исполнителя).

Мы провели оценку возможности анализа экспрессии гена *HMGA2* в качестве способа дифференцирования злокачественных и доброкачественных опухолей и неопухолевых образований ЩЖ, используя собственные реактивы и наборы олигонуклеотидов для ОТ-ПЦР. Наши результаты, в целом близкие к результатам работ [11] и [12], указывают на то, что повышение уровня экспрессии *HMGA2* может быть характерно для карцином, происходящих из фолликулярных клеток ЩЖ, как высоко-, так и низкодифференцированных. Лишь в 1 из 7 медуллярных карцином, происходящих из парафолликулярных нейроэндокринных клеток (С-клеток), был зарегистрирован высокий уровень экспрессии *HMGA2*. В обеих анапластических (низкодифференцированных) карциномах уровень экспрессии *HMGA2* оказался значительно повышен. Это согласуется с данными других исследователей. Так, в работах [12, 25] обнаружено, что уровень экспрессии *HMGA2* был повышен во всех исследованных образцах анапластической карциномы.

ПР является самым распространенным типом рака ЩЖ, поэтому в нашей работе он также был представлен наибольшим количеством образцов. Для данной группы образцов уровень экспрессии гена *HMGA2* оказался повышен по сравнению с доброкачественными образованиями в среднем в 200 раз, что хорошо согласуется с результатами работы [10]. Повышенная экспрессия *HMGA2* выявлена нами в 86 % образцов ПР. Увеличение экспрессии *HMGA2* при ПР по сравнению с доброкачественными образованиями ЩЖ показано в ряде работ, хотя доля образцов ПР с повышенным

уровнем экспрессии этого гена в разных работах различается: 92 % [25], 77 % [11], а в работе [12] при классическом варианте ПР – 97 %, при фолликулярном варианте – 75 %, в среднем – 86 %. Эти различия можно объяснить особенностями проанализированных выборок, используемыми техниками анализа экспрессии *HMGA2*, а также выбранными значениями уровня экспрессии этого гена, рассматриваемыми как «повышенный».

Особенностью нашей выборки по сравнению с другими известными нам работами на эту тему является высокая доля доброкачественных неопухолевых образований. В реальном потоке образцов тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии, направляемых на цитологический анализ, именно доброкачественные образования (категория II по системе Бетесда) составляет подавляющее большинство. Поэтому оценка реальной предсказательной ценности молекулярного маркера (в нашем случае – уровня экспрессии гена *HMGA2*), на наш взгляд, не может быть корректной без анализа достаточной выборки доброкачественных образований. Полученные нами данные убедительно свидетельствуют, что уровень экспрессии *HMGA2* не превышает определенной величины в группе, относящейся ко II категории по системе Бетесда. Таким образом, выявление повышенного содержания этой мРНК обладает высокой (100 %) положительной предсказательной ценностью в отношении злокачественных опухолей (кроме ФР). Отрицательная предсказательная ценность такого анализа в отношении выявления злокачественных опухолей несколько ниже (89,3 %), поскольку для ряда случаев ПР, а также для большинства медуллярных раков повышение уровня мРНК *HMGA2* не выявлено.

В рамках проведенного исследования мы не могли оценить напрямую достоверные различия уровня экспрессии *HMGA2* между ФР (злокачественными опухолями) и ФА (доброкачественными опухолями), поскольку анализировали препараты, для которых было известно только цитологическое заключение, не позволяющее дифференцировать ФР и ФА. Таким образом, можно было предположить, что в отношении злокачественности группа фолликулярных опухолей является гетерогенной. И действительно, нами была выявлена очевидная неоднородность этой группы в отношении содержания как мРНК *HMGA2*, так и миРНК-221. При этом опухоли с повышенным содержанием мРНК *HMGA2*, как и ПР, характеризовались достоверно ($p = 0,0001$) повышенным уровнем экспрессии миРНК-221. Количественное соотношение 2 подгрупп образцов фолликулярных опухолей, отличающихся по уровню экспрес-

сии *HMGA2* (в 26 % таких образцов этот уровень был повышен, в 74 % повышение не наблюдалось, см. рис. 3), также соответствует известному из литературы соотношению доброкачественных и злокачественных опухолей, выявляемых среди образцов с цитологическим диагнозом, соответствующим IV категории по системе Бетесда. Согласно системе Бетесда [22] риск злокачественности для этой категории составляет 15–30 %.

Исходя из полученных результатов, у нас есть основания предполагать, что выявленная неоднородность экспрессии мРНК *HMGA2* и миРНК-221 в цитологических препаратах отражает гетерогенность выборки образцов фолликулярных опухолей: часть из них, с повышенным уровнем мРНК *HMGA2*, представлена преимущественно или исключительно злокачественными опухолями, а другая часть – доброкачественными (ФА). При этом уровень экспрессии миРНК-221 оказался повышен также и в некоторых образцах фолликулярных опухолей, для которых не обнаружено повышение экспрессии *HMGA2*. Доля таких образцов составила 23 %. Согласно данным литературы уровень миРНК-221 может быть повышен и в некоторых фолликулярных опухолях, не рассматриваемых как злокачественные [19]. В связи с этим диагностическая ценность этого маркера для выявления злокачественных опухолей ниже, чем ценность мРНК *HMGA2*.

Заключение

Таким образом, нами показано, что содержание мРНК онкогена *HMGA2* и онкогенной миРНК-221 достоверно отличается между ПР ЩЖ и доброкачественными образованиями (II категория по системе Бетесда), а также существенно варьирует в гетерогенной группе образцов, объединенных цитологическим диагнозом «фолликулярная опухоль или подозрение на фолликулярную опухоль». При этом в одних фолликулярных опухолях содержание этих маркеров повышено в той же степени, что при ПР, а в других является относительно низким, что сближает их с доброкачественными образованиями. При этом для опухолей с повышенным содержанием мРНК *HMGA2* характерен также повышенный уровень экспрессии миРНК-221. Указанные различия могут быть выявлены на стадии дооперационного типирования узловых новообразований ЩЖ с помощью полуколичественной ОТ-ПЦР. Это позволяет рассматривать мРНК *HMGA2* и, в меньшей степени, миРНК-221 как перспективные молекулярные маркеры, оценка содержания которых может способствовать повышению точности типирования новообразований ЩЖ на дооперационной стадии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке фундаментальных научных исследований по темам 0310-2014-0002; 0310-2015-0003; 0310-2015-0007.

Financing. The study was conducted with financial support for basic scientific research under the projects 0310-2014-0002; 0310-2015-0003; 0310-2015-0007.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ghossein R. Problems and controversies in the histopathology of thyroid carcinomas of follicular cell origin. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133(5):683–91.
2. Baloch Z.W., Sack M.J., Yu G.H. et al. Fine-needle aspiration of thyroid: an institutional experience. *Thyroid* 1998;8(7):565–9.
3. Pallante P., Sepe R., Puca F., Fusco A. High mobility group a proteins as tumor markers. *Front Med (Lausanne)* 2015;2:15.
4. Cleynen I., Van de Ven W.J. The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *Int J Oncol* 2008;32(2):289–305.
5. Wang X., Liu X., Li A.Y. et al. Overexpression of *HMGA2* promotes metastasis and impacts survival of colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 2011;17(8):2570–80.
6. Ding X., Wang Y., Ma X. et al. Expression of *HMGA2* in bladder cancer and its association with epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Prolif* 2014;47(2):146–51.
7. Chiappetta G., Tallini G., De Biasio M.C. et al. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. *Cancer Res* 1998;58(18):4193–8.
8. Raskin L., Fullen D.R., Giordano T.J. et al. Transcriptome profiling identifies *HMGA2* as a biomarker of melanoma progression and prognosis. *J Invest Dermatol* 2013;133(11):2585–92.
9. Malek A., Bakhidze E., Noske A. et al. *HMGA2* gene is a promising target for ovarian cancer silencing therapy. *Int J Cancer* 2008;123(2):348–56.
10. Belge G., Meyer A., Klemke M. et al. Up-regulation of *HMGA2* in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47(1):56–63.
11. Lappinga P.J., Kip N.S., Jin L. et al. *HMGA2* gene expression analysis performed on cytologic smears to distinguish benign from malignant thyroid nodules. *Cancer Cytopathol* 2010;118(5):287–97.
12. Jin L., Lloyd R.V., Nassar A. et al. *HMGA2* expression analysis in cytological and paraffin-embedded tissue specimens of thyroid tumors by relative quantitative RT-PCR. *Diagn Mol Pathol* 2011;20(2):71–80.
13. Nagar S., Ahmed S., Peeples C. et al. Evaluation of genetic biomarkers for distinguishing benign from malignant thyroid neoplasms. *Am J Surg* 2014;207(4):596–601.
14. Берёзкина И.С., Саприна Т.В., Зима А.П. и др. Исследование галектина-3, Ki-67, убиквитина, *HMGA2* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в пункционном материале при узловом зобе. Клиническая и экспериментальная тиреоидология 2016;12(2):19–27. [Berezkina I.S., Saprina T.V., Zima A.P. et al. The study of galectin-3, Ki-67, ubiquitin, *HMGA2* by polymerase chain reaction in real time (RT-PCR) in the puncture specimens of nodular goiter. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya = Clinical and Experimental Thyroidology* 2016;12(2):19–27. (In Russ.)].
15. Garofalo M., Quintavalle C., Romano G. et al. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. *Curr Mol Med* 2012;12(1):27–33.
16. Urbich C., Kuehbach A., Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovascular Res* 2008;79(4):581–8.
17. Galardi S., Mercatelli N., Giorda E. et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27kip1. *J Biol Chem* 2007;282(32):23716–24.
18. He H., Jazdzewski K., Li W. et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(52):19075–80.
19. 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.
20. Dettmer M., Vogetseder A., Durso M.B. et al. MicroRNA expression array identifies novel diagnostic markers for conventional and oncocytic follicular thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(1):E1–7.
21. Wojtas B., Ferraz C., Stokowy T. et al. Differential miRNA expression defines migration and reduced apoptosis in follicular thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol* 2014;388(1–2):1–9.
22. Cibas E.S., Ali S.Z. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *Am J Clin Pathol* 2009;132(5):658–65.
23. 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.
24. Titov S.E., Demenkov P.S., Ivanov M.K. et al. Selection and validation of miRNAs as normalizers for profiling expression of microRNAs isolated from thyroid fine needle aspiration smears. *Oncol Rep* 2016;36(5):2501–10.
25. Chiappetta G., Ferraro A., Vuttariello E. et al. *HMGA2* mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias. *Eur J Cancer* 2008;44(7):1015–21.
26. Jang M.H., Jung K.C., Min H.S. The diagnostic usefulness of *HMGA2*, Survivin, CEACAM6, and SFN/14-3-3 δ in follicular thyroid carcinoma. *J Pathol Transl Med* 2015;49(2):112–7.

Статья поступила: 30.10.2017. Принята в печать: 09.11.2017.

Article received: 30.10.2017. Accepted for publication: 09.11.2017.