

ПРЕДИКТИВНАЯ ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МИКРО-РНК И КОЛИЧЕСТВА РАЙОНОВ ЯДРЫШКОВЫХ ОРГАНИЗАТОРОВ ПРИ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ОПУХОЛИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕОПРЕДЕЛЕННОГО ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА

Татьяна Евгеньевна Ильина¹, Евгений Леонидович Казачков²,
Сергей Владимирович Сергийко³

Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

¹ chlorid@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4186-8108>

² doctorkel@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4512-3421>

³ ssv_1964@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6694-9030>

Аннотация

Введение. В статье приведены современные представления о фолликулярной опухоли щитовидной железы неопределенного злокачественного потенциала (ФОНЗП) с учётом принципов классификации ВОЗ. В качестве методов выявления потенциальных предикторов онкодиагностики приводят молекулярно-генетическое исследование с идентификацией мутации ряда генов, а также определение уровня экспрессии некоторых микроРНК. Показано, что состояние областей ядрышковых организаторов является маркером скорости клеточной пролиферации. **Цель исследования** – оценить прогностическую значимость уровня экспрессии некоторых микроРНК и количества районов ядрышковых организаторов в ткани щитовидной железы при ФОНЗП. Материалы и методы. Изучены профиль, уровень экспрессии микроРНК методом ПЦР в режиме реального времени и районов ядрышковых организаторов в 98 наблюдениях ФОНЗП, составивших 4,75% от всех оперированных за четыре года по поводу опухолей щитовидной железы. **Результаты.** В 29 (29,6%) наблюдениях в ткани ФОНЗП зарегистрирован спектр микроРНК, характерный для злокачественных новообразований. В остальных 69 (70,4%) случаях из 98 наблюдений спектр и уровень экспрессии микроРНК соответствовали фолликулярной аденоме. Внутри сформированных подгрупп были выявлены статистически значимые различия показателей среднего количества AgNORs и соотношения между площадью клетки и количеством гранул AgNORs. **Обсуждение.** Увеличение среднего количества AgNORs и соотношения площади ядра к количеству гранул азотнокислого серебра во 2-ой подгруппе по отношению к 1-ой, а также наличие клеток II типа свидетельствует о появлении пролиферирующих опухолевых клеток в новообразовании и может рассматриваться как прогностические критерии малигнизации опухоли. Данные результаты согласуются с полученными показателями молекулярно-генетического исследования. **Заключение.** Данные литературы и полученные результаты изучения профиля и уровня экспрессии ряда микроРНК, морфометрических характеристик и подсчёт районов ядрышковых организаторов тиреоцитов могут служить в качестве дополнительных критериев оценки пролиферативной активности фолликулярного эпителия при неоплазиях щитовидной железы, в частности, для уточнения потенциала злокачественности. Диагностируемый до операции условно злокачественный вариант ФОНЗП позволит обосновать необходимость и объём хирургического вмешательства, а при выявлении комплекса критериев условно доброкачественной ФОНЗП – придерживаться выжидательной тактики и отказаться от оперативного воздействия.

Ключевые слова: фолликулярная опухоль щитовидной железы неопределенного злокачественного потенциала, микроРНК, районы ядрышковых организаторов тиреоцитов.

Для цитирования: Ильина Т.Е., Казачков Е.Л., Сергийко С.В. Предиктивная оценка уровня экспрессии микро-РНК и количества районов ядрышковых организаторов при фолликулярной опухоли щитовидной железы неопределенного злокачественного потенциала. Уральский медицинский журнал 2023;22(2):74-83. <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2023-22-2-74-83>.

PREDICTIVE ASSESSMENT OF MICRO RNA EXPRESSION LEVEL AND NUMBER OF NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS WITH FOLLICULAR THYROID TUMOR OF UNDETERMINED MALIGNANT POTENTIAL

Tat'yana E. Il'ina¹, Evgenij L. Kazachkov², Sergej V. Sergijko³

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

¹ chlorid@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4186-8108>

² doctorkel@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4512-3421>

³ ssv_1964@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6694-9030>

Abstract

Introduction This article presents the current views on follicular thyroid tumor of undetermined malignant potential (FTUMP) taking into account the principles of WHO classification. Molecular genetic study with identification of mutation of some genes as well as determination of expression level of some microRNAs are given as methods for detection of potential predictors of oncodiagnostics. It was shown that the state of nucleus organizer regions is a marker of cell proliferation rate. **The aim** of the investigation was to estimate prognostic significance of expression level of some microRNAs and amount of regions of the nucleus organizers in the thyroid tissue at FTUMP to objectify approaches to development of adequate surgical tactics. **Materials and methods** Profile, microRNA expression level by real time PCR and regions of the nucleus organizers were studied in 98 cases of FTUMP which made up 4.75% of all cases of thyroid tumors operated on during four years. **Results** In 29 (29.6%) cases the spectrum of microRNA typical for malignant neoplasms was registered in the tissue of the FTUMP. In the remaining 69 (70.4%) cases out of 98 observations the spectrum and the expression level of microRNA corresponded to the follicular adenoma. Statistically significant differences in the average number of AgNORs and correlation between the cell area and the number of AgNORs granules were found within the formed subgroups. **Discussion** Increase of the mean number of AgNORs and the ratio of the nucleus area to the number of silver nitrate granules in the 2nd subgroup in comparison with the 1st one, as well as the appearance of the type II cells testifies to the appearance of the proliferating tumor cells in a new tumor growth and can be considered as prognostic criteria of tumor malignization. These results correlate with the findings of molecular-genetic study. **Conclusion** The data of the literature and the results obtained by studying the profile and the expression level of a number of microRNAs, morphometric characteristics and counting of thyrocyte nucleus organizer regions may serve as additional criteria for evaluation of the proliferative activity of the follicular epithelium in thyroid neoplasms, in particular to clarify the malignancy potential. Preoperatively diagnosed conditionally malignant FTUMP will allow to justify the necessity and amount of surgical intervention, and if a complex of criteria of conditionally benign FTUMP is revealed, to stick to the waiting tactics and refuse surgical intervention.

Key words: follicular thyroid tumor of undetermined malignant potential, micro-RNA, thyroid nucleus organizer regions.

For citation:

Il'ina TE, Kazachkov EL, Sergijko SV. Predictive assessment of micro RNA expression level and number of nucleolar organizer regions with follicular thyroid tumor of undetermined malignant potential. Ural medical journal 2023;22(2):74-83. (In Russ.). <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2023-22-2-74-83>

ВВЕДЕНИЕ

Фолликулярная опухоль щитовидной железы неопределенного злокачественного потенциала (ФОНЗП) как нозологическая форма впервые вошла в международную классификацию новообразований эндокринных органов ВОЗ в 2017 году [1]. Для дооперационной диагностики карцином щитовидной железы в действующей редакции клинических рекомендаций предлагается тонкоигльная аспирационная биопсия с последующим цитологическим исследованием аспирата [2]. При

этом результаты цитологического исследования указывают не на конкретную нозологическую форму, а на группу процессов со сходными цитологическими критериями (цитологическая классификация Bethesda) [3]. Хирургическое удаление узла регламентировано уже при Bethesda IV, однако указывается, что при этом гистологическое исследование резектата верифицирует злокачественное новообразование лишь в 15–30% [4]. Таким образом, 70–85% оперативных вмешательств осуществляется в связи с доброкачественными опухолями

щитовидной железы либо ФОНЗП, когда активная хирургическая тактика не общепризнана целесообразной [5; 6]. Поэтому разработка путей совершенствования структурной диагностики опухолей щитовидной железы является, безусловно, актуальной задачей, особенно в аспекте получения возможности полноценной оценки потенциала злокачественности новообразования на дооперационном этапе.

Сегодня предиктивными молекулярно-генетическими факторами опухолевого роста принято считать мутации ряда генов (BRAF V600E, транслокация RET-PTC1 в гене RET и пр.) [7; 8], а также определение уровня экспрессии некоторых микроРНК [9; 10]. МикроРНК – короткие молекулы (18–24 нуклеотида, в среднем 22), регулирующие экспрессию множества генов на посттранскрипционной стадии, причём наиболее часто – подавляющие экспрессию тех генов, матричная РНК которых имеет комплементарность к последовательности этих микроРНК [11]. Согласно современным представлениям [12], микроРНК выполняют свою функцию, модулируя экспрессию эукариотических генов и ориентируясь на транскрипты, кодирующие белки, оказывающие влияние на «судьбу» клетки. *В соответствии с литературными данными [13–15], для типирования новообразований щитовидной железы возможно использование ряда микроРНК, среди которых упоминают микроРНК-146b, -199b, -221, -223, -31, -375, -451a, -551b и др.*

У отдельных микроРНК зарегистрирован ряд доминирующих функций: микроРНК-375 экспрессируется в поджелудочной железе, головном мозге и непосредственно связывает общий транскрипт гена-мишени, кодирующий миотрофин (инсулиноподобный фактор роста, белок, участвующий в слиянии гранул инсулина), который, в свою очередь, регулирует экзоцитоз и высвобождение гормонов [16].

Ряд микроРНК являются онкогенными. Так, микроРНК-221 снижает продукцию белка Kit (CD117 или рецептора фактора роста тучных и стволовых клеток), который является важным звеном в регулировании ангиогенеза и восстановлении сосудистой стенки [17]. Согласно данным Н. He et al. [18], у 5 из 10 пациентов с папиллярной карциномой щитовидной железы в окружающей ткани органа зарегистрирован высокий уровень экспрессии микроРНК-221, в связи с чем авторы расценивают микроРНК-221 в качестве маркера раннего этапа канцерогенеза щитовидной железы.

Вместе с тем ряд микроРНК характеризуются онкопротекторными свойствами. Н-р, микроРНК-199b ингибирует миграцию и инвазию раковых клеток, поэтому уровень её экспрессии значительно снижен в клетках карцином [19]. МикроРНК-551b оказывает супрессивное действие на клеточные элементы колоректального рака и карциномы желудка, вероятно, направляя клетки

этих новообразований по пути аутофагического апоптоза [20].

Экспрессия одной и той же микроРНК может иметь разнонаправленную функциональную нагрузку. Так, при карциноме молочной железы микроРНК-31 ингибирует метастазирование и способствует регрессу метастазов [21], в то время как при лёгочной карциноме и колоректальном раке эта же микроРНК действует как онкогенный фактор путём подавления специфических супрессоров опухоли [22]. Экспрессия микроРНК-451 разнонаправленно изменяется при злокачественных новообразованиях человека, что указывает на значимую роль этой микроРНК в онкогенезе [23].

С середины 80-х годов XX века в диагностической онкоморфологии стал активно применяться анализ ядрышковых организаторов путём визуального подсчёта гранул серебра в ядрышках (считается, что в интерфазных ядрах гранула серебра соответствует одному ядрышковому организатору) либо с помощью компьютерной морфометрии ядерно-ядрышкового аппарата [24–26]. Ядрышковые организаторы (англ. Nucleolus organizer regions, NOR) – участки хромосом, образующие внутри ядра клетки так называемое ядрышко. У человека ядрышковые организаторы составлены участками, расположенными на коротких плечах акроцентрических хромосом 13, 14, 15, 21, 22 и содержащими гены 45S рРНК – предшественника 5.8S, 18S, 28S рРНК. В число генов, расположенных в области организаторов рибосом, входят RUNX2, UBTF, APC [27].

Установлено, что состояние районов ядрышковых организаторов рибосом (AgNORs) является маркером скорости клеточной пролиферации, поскольку AgNORs участвуют в регуляции митотического цикла [28]. В другом исследовании [29] обнаружено нарастающее изменение параметров ядер и количества AgNORs при сравнении одноимённых показателей нормальной щитовидной железы и фолликулярной аденомы, а также при сравнении изучаемых значений при дифференцированной фолликулярной и анапластической карциноме.

Таким образом, несмотря на обширные научные источники, отражающие структурные изменения щитовидной железы при её опухолевом поражении, в доступной литературе нам не удалось обнаружить исследований, посвящённых прогностическим морфологическим особенностям ФОНПЗ. Полагаем, что установление предиктивных факторов опухолевой прогрессии от ФОНПЗ к фолликулярной карциноме щитовидной железы сможет повысить роль патологоанатома до ключевой в диагностическом процессе и существенно повлиять на выбор адекватной лечебной тактики.

Цель исследования – оценить прогностическую значимость уровня экспрессии некоторых микроРНК и количества районов ядрышковых организаторов в ткани щитовидной железы при ФОНПЗ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами проведен ретроспективный анализ протоколов гистологического исследования операционного материала от 3960 пациентов, которым было проведено хирургическое лечение различных тиреоидопатий в 2018–2021 гг. на базе тиреоидного центра ГАУЗ ГKB №1 г. Челябинска. Из них 2063 больных прооперированы по поводу опухолевой патологии щитовидной железы. В этой группе в 98 случаях (группа исследования) двумя независимыми патологоанатомами была диагностирована ФОНПЗ с учётом верификации морфологических критериев новообразования [1], что составило 4,75% всей хирургической опухолевой патологии за данный период времени.

Критерии включения в группу исследования: узловое инкапсулированное новообразование щитовидной железы фолликулярного строения, с сомнительной капсулярной и/или сосудистой инвазией, отсутствие изменений ядер, характерных для папиллярной карциномы, наличие в архиве патологоанатомического отделения ГАУЗ ГKB №1 г. Челябинска микропрепаратов и/или парафиновых блоков, информированное согласие на участие в исследовании и публикацию его результатов в открытой печати. **Критерии невключения:** достоверная капсулярная и/или сосудистая инвазия, наличие изменений ядер, характерных для папиллярной карциномы, отсутствие в архиве патологоанатомического отделения ГАУЗ ГKB №1 г. Челябинска микропрепаратов и/или парафиновых блоков, отсутствие информированного согласия на участие в исследовании и публикацию его результатов в открытой печати.

На основе результатов ретроспективного гистологического изучения микропрепаратов группы исследования из архива парафиновых блоков выбирали один с наибольшим размером тканевого фрагмента не менее 1 см, который соответствовал наиболее характерной микроскопической картине ФОНПЗ. С отобранных 98 парафиновых блоков делали срезы толщиной 5 мкм и после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике [30]. При помощи цифрового гистосканера AperioCS2 (USA) с каждого микропрепарата было получено по одному изображению для последующего морфометрического исследования.

Изучение профиля микроРНК методом ПЦР в режиме реального времени выполнена на базе ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» СО РАН г. Новосибирска с формированием на основе полученных результатов внутри группы исследования двух подгрупп, различающихся по предиктивным потенциалам. Для анализа спектра и уровня экспрессии микроРНК поэтапно проводили депарафинизацию материала с использованием минерального масла, экстракцию РНК, реакцию обратной транскрипции и ПЦР в реальном вре-

мени. Был исследован ряд микроРНК, на основании литературных данных [13–15], позволяющий провести дифференциальную диагностику между фолликулярноклеточными неоплазиями (карциномами и аденомами). Нормировку содержания микроРНК проводили с учётом среднего содержания трех референсных микроРНК (-146b, -221, -375) с помощью запатентованных методов [31, 32]. Исследование заканчивалось составлением заключения о наличии и типе новообразования щитовидной железы. Это заключение базировалось на комплексном критерии, который рассчитывался на основе средних значений уровней экспрессии микроРНК в тканях щитовидной железы в норме и при разных типах её новообразований: доброкачественное узловое образование (аденома), злокачественное узловое образование, включающее папиллярный, фолликулярный, медуллярный, Гюртле-клеточный рак.

Далее на отсканированных микропрепаратах ФОНПЗ были изучены некоторые морфометрические показатели (площадь ядра и площадь клетки, периметр ядра и периметр клетки, наибольший и наименьший размер ядра, наибольший и наименьший размер клетки) с помощью автоматизированного алгоритма подсчета QuPath (USA) [33] (рис. 1). Во всех случаях выбиралось наиболее информативное поле зрения микропрепарата, в котором подсчитывали каждый из анализируемых морфометрических параметров на 200 клеток.

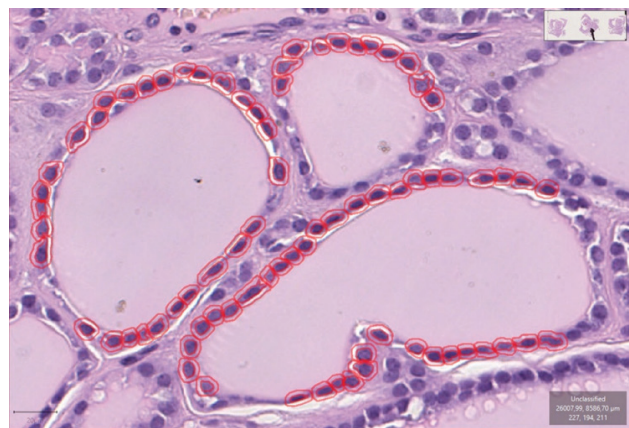


Рис. 1. Рабочий этап изучения морфометрических показателей опухолевых клеток с применением автоматизированного алгоритма подсчета QuPath. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 1000$.

Для выявления ядрышковых организаторов был использован метод импрегнации гистологических срезов 50% коллоидным раствором нитрата серебра по J. Crocker [34, 35]. Для этого депарафинированные срезы инкубировали 45 минут в свежеприготовленном 50% коллоидном растворе нитрата серебра во влажной камере в темноте, обезживали и без докраски заключали в бальзам. Учет реакции проводился в 100 эпителиоцитах новообразования при увеличении $\times 1000$ с

масляной иммерсией и зеленым светофильтром, редуцирующим хромосомные абберации, при помощи микроскопа Zeiss Primo Star (Germany).

В зависимости от топики районов ядрышковых организаторов и в соответствии с рекомендациями J. Crocker et al. [36], клетки подразделяли на 3 типа: I тип – выявляются целиком прокрашенные ядрышкам или гранулы серебра только внутри ядрышек (покоящиеся клетки); II тип – гранулы серебра как внутри ядрышек, так и свободно диспергируемые по ядру (пролиферирующие клетки); III тип – множественные свободно лежащие в ядре депозиты серебра различных размеров и форм, ядрышки не дифференцируются (злокачественные клетки).

При подсчете AgNORs (рис. 2) с помощью компьютерной программы QuPath определяли общее количество гранул, плотность гранул и их расположение: внутриядрышковое и внеядрышковое. Общую площадь и плотность областей ядрышковых организаторов определяли дважды в 30 полях зрения, выбранных произвольно.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы IBM SPSS Statistics 23 (оценка нормальности распределения посредством критерия Колмогорова-Смирнова, расчет для количественных величин средних значений – Me [25%-75%]). Признаки, распределение которых отличались от нормального, представили в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1; Q3). Сравнение между двумя группами проводили с помощью непараметрических статистических методов с использованием критерия Манна-Уитни; для сравнения в более чем двух независимых группах применяли критерий Краскала-Уоллиса. При оценке качественных показателей вычисляли фактические и процентные частоты наблюдений (n, %). Величину вероятности ошибки устанавливали на уровне, равном 0,05. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [37].

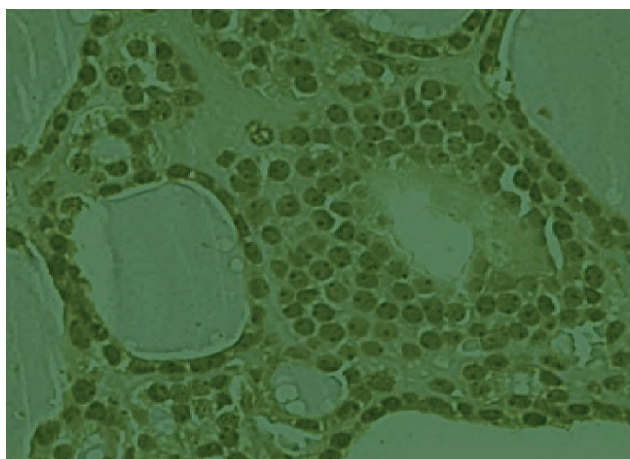


Рис. 2. Определение AgNORs в клетках I типа с применением автоматизированного алгоритма подсчета QuPath. Окраска – импрегнация 50 % коллоидным раствором серебра, зеленый светофильтр; $\times 1000$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведен углублённый морфологический и морфометрический анализ удалённых фрагментов опухоли щитовидной железы, верифицированной как ФОНЗП, в 98 наблюдениях из 2063 пациентов, прооперированных в связи с новообразованиями этого органа, что составило 4,75% (группа исследования). Среди больных было 11 (11,2%) мужчин и 87 (88,8%) женщин, их средний возраст составил 54,3[42–66] лет.

Проведенный анализ спектра и уровня экспрессии микроРНК с учётом их референсных значений [35, 36] показал, что в 29 (29,6 %) из 98 наблюдений ФОНЗП в ткани щитовидной железы зарегистрировано повышение уровня экспрессии микроРНК-146bm3 ($> -1,12$), микроРНК-375m4 ($> -10,04$), микроРНК-221m2 ($> -1,11$), микроРНК-7m2 ($> 4,8$ и $< -27,79$), микроРНК-145 ($> -2,475$), что соответствовало спектру микроРНК, характерному для злокачественных новообразований. Из них в 18 случаях уровень экспрессии микроРНК указывал на молекулярно-генетический профиль, ассоциированный с фолликулярной карциномой щитовидной железы, в 6 – с папиллярной карциномой, в 5 наблюдениях – с онкоцитарной (Гюртле-клеточной) опухолью.

В остальных 69 (70,4%) из 98 наблюдений ФОНЗП спектр и уровень экспрессии микроРНК не был характерен для злокачественной опухоли, а соответствовал молекулярно-генетическому профилю фолликулярной аденомы щитовидной железы.

Таким образом, анализ установленных различий в уровне экспрессии микроРНК методом ПЦР в режиме реального времени позволил сформировать в группе исследования из 98 наблюдений ФОНЗП две подгруппы, отличающиеся по характеру прогноза течения заболевания: *потенциально доброкачественные ФОНЗП* (1-я подгруппа, 69 наблюдений) и *потенциально злокачественные ФОНЗП* (2-я подгруппа, 29 наблюдений). Дальнейшие сравнительные морфометрические исследования некоторых показателей опухоли проводили в этих подгруппах (табл. 1).

Во 2-й подгруппе (условно злокачественных новообразований) отмечена тенденция к некоторому увеличению размеров ФОНЗП, средних показателей площади, периметра, наибольшего размера ядер опухолевых клеток, а также средних значений площади, периметра, наименьшего размера самих клеток по сравнению с одноимёнными параметрами условно доброкачественных новообразований 1-й подгруппы (табл. 1). Однако статистически значимых отличий между морфометрическими показателями в сравниваемых подгруппах выявлено не было.

Таблица 1.

Сравнительная количественная характеристика некоторых параметров потенциально доброкачественных (1-я подгруппа) и потенциально злокачественных (2-я подгруппа) ФОНЗП

Морфометрические показатели	Me [25%-75%]		p=
	1-я подгруппа, n = 69	2-я подгруппа, n = 29	
Размер опухоли, мм	25,0 [13,5-34,0]	27,0 [18,5-49,0]	0,13
Площадь ядра, мкм ²	29,8 [26,3-35,0]	32,0 [26,4-35,0]	0,96
Периметр ядра, мкм	21,3 [20,3-23,2]	22,4 [20,5-23,2]	0,75
Наибольший размер ядра, мкм	7,9 [7,4-8,7]	8,1 [7,7-8,6]	0,40
Наименьший размер ядра, мкм	5,3 [4,8-5,7]	5,4 [4,8-5,7]	0,74
Площадь клетки, мкм ²	81,1 [67,5-100,5]	97,3 [68,2-110,9]	0,60
Периметр клетки, мкм ²	33,8 [30,4-38,1]	36,6 [30,4-40,2]	0,54
Наибольший размер клетки, мкм	0,87 [0,85-0,89]	0,87 [0,84-0,88]	0,35
Наименьший размер клетки, мкм	8,9 [8,0-9,8]	9,6 [7,6-10,4]	0,55
Ядерно-цитоплазматическое соотношение	0,40 [0,33-0,44]	0,37 [0,31-0,42]	0,20

Морфометрическое изучение районов ядрышковых организаторов в клетках ФОНЗП выполнено в 20 образцах этого новообразования (по 10 наблюдений из каждой подгруппы) путём импрегнации срезов 50% коллоидным раствором нитрата серебра с помощью автома-

тизированного алгоритма подсчета QuPath. Для этого рассчитывалась средняя площадь ядра, среднее количество ядрышек, среднее количество ядрышек на ядро, средняя площадь ядрышек, отношение площади ядра к площади ядрышек (табл. 2).

Таблица 2.

Сравнительная количественная характеристика районов ядрышковых организаторов в опухолевых клетках потенциально доброкачественных (1-я подгруппа) и потенциально злокачественных (2-я подгруппа) ФОНЗП

Морфометрические показатели	Me [25%-75%]		p=
	1-я подгруппа, n = 10	2-я подгруппа, n = 10	
Средняя площадь ядра, мкм	29,25 [27,22-35,56]	31,75 [24,50-33,53]	0,98
Среднее количество AgNORs	1,00 [1,00-1,13]	2,00 [1,75-3,00]	0,02
Соотношение: площадь ядра, мкм ² / количество AgNORs	27,7 [25,43-30,69]	15,9 [9,41-20,30]	0,01
Средняя площадь AgNORs, мкм ²	0,2532 [0,25-0,25]	0,2532 [0,25-0,51]	0,10
Соотношение: площадь ядра, мкм ² / средняя площадь AgNORs, мкм ²	115,52 [100,8-128,8]	125,39 [71,6-133,6]	0,24

В подгруппе потенциально злокачественных опухолей (2-я подгруппа) отмечено статистически значимое увеличение показателя среднего количества AgNORs и статистически значимое снижение соотношения площадь ядра / количество AgNORs в 1,74 раза по сравнению с одноимёнными параметрами образцов щитовидной железы 1-й подгруппы (табл. 2).

Большинство районов ядрышковых организаторов располагались внутри ядрышек примерно на одинаковом расстоянии друг от друга. При этом в 1-й подгруппе все организаторы рибосом были расположены внутри ядрышек, имели округлую форму, ровные края, а, следовательно, с учётом рекомендаций J. Crocker et al. [38], были отнесены нами к покоящимся клетками I-го типа. В образцах 2-й подгруппы выявляли как покоящиеся клетки I-го типа (30-40%), так и клетки II-го типа (60-70%), когда гранулы серебра обнаруживали как внутри ядрышек, так и свободно лежащими в ядре вне ядрышек (пролиферирующие клетки). Клетки

III-го типа со свободно лежащими в ядре депозитами серебра без визуализации четких ядрышек в сравниваемых подгруппах не выявлялись.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами проведен ретроспективный анализ тканевых образцов щитовидной железы 98 пациентов с ФОНЗП из 2063 больных, прооперированных за четырёхлетний период по поводу опухолевой патологии щитовидной железы, что составило 4,75%. Вместе с тем по данным Y. Ito et al. [39], в Kuma Hospital города Кобе (Japan) при ретроспективном пересмотре тканевого материала оперированной щитовидной железы за 2010-2018 гг. на долю ФОНЗП пришлось 3% наблюдений.

В современной доступной литературе нам не удалось встретить исследований, указывающих на критерии выбора хирургической тактики при ФОНЗП. Полагаем, что подход к тактике ведения пациентов этой группы должен базироваться не только и не столько на клинических и лаборатор-

ных методах исследования, результаты которых зачастую неспецифичны. Принято считать, что ключом к решению проблемы ограниченных возможностей в до-операционной оценке потенциала злокачественности опухоли щитовидной железы является понимание различных генетических трансформаций опухолевой клетки, таких как точечные мутации, вставки и делеции, слияния генов, перестройки или транслокации генов [40; 41], причём микроРНК занимают в этом перечне особое место.

При дифференциальной диагностике узловых образований щитовидной железы следует иметь в виду, что для папиллярной карциномы этого органа характерна высокая экспрессия микроРНК-146b, -221, -222, -181b, -21 [42; 43], а для фолликулярного рака – экспрессия микроРНК-637, -181с-3р, -206, -7-5р [44]. При установлении отличий фолликулярной аденомы от карциномы показано, что уровень экспрессии микроРНК-197 и -346 значительно выше при фолликулярном раке [45]. D. Abraham et al. [46] отмечают высокую экспрессию микроРНК-183 и -375 в медуллярной карциноме щитовидной железы с тенденцией к метастазированию опухоли в шейные лимфоузлы и ухудшению прогноза.

Мы провели анализ спектра и уровня экспрессии ряда микроРНК (-146bm3; -375m4; -221m2; -7m2; -145) тканями ФОНЗП и получили данные о молекулярно-генетической неоднородности этой опухоли, позволившие разделить группу исследования на две подгруппы. В 70,4% из 98 наблюдений профиль микроРНК свидетельствовал о потенциально доброкачественных ФОНЗП, в 29,6% – о потенциально злокачественных опухолях этой группы. О возможности верифицировать прогностические факторы доброкачественности и злокачественности опухолей щитовидной железы на дооперационном этапе свидетельствуют и другие авторы [40, 47].

Известно, что представительство AgNORs является маркером скорости клеточной пролиферации, так как ядрышковые организаторы участвуют в регуляции митотического цикла [27]. По литературным данным [27; 28], при поражениях щитовидной железы различного характера более низкие показатели ядрышковых организаторов регистрируются при зобных изменениях органа и тиреоидитах, составляя: $2,0 \pm 0,03$ – при диффузном коллоидном зобе, $2,3 \pm 0,01$ – при узловом зобе,

$3,5 \pm 0,03$ – при пролиферирующем зобе, при разных формах аутоиммунного тиреоидита – от 1,6 до 3,2, однако при наличии карциномы щитовидной железы показатели AgNORs существенно возрастают – от 5,04 до 7,67 в зависимости от степени дифференцировки новообразования.

Полученные результаты изучения районов ядрышковых организаторов в нашем исследовании указывают на значимые различия внутри подгрупп. Увеличение среднего количества AgNORS и соотношения площади ядра к числу гранул азотнокислого серебра, а также появление клеток II типа [38] во 2-ой подгруппе наблюдений ФОНЗП, свидетельствует о возрастании пролиферативной активности клеток опухоли от условно доброкачественных к условно злокачественным. Полученные данные согласуются с результатами проведенного нами молекулярно-генетического исследования, а также демонстрируют перспективность применения данных методов исследования на до-операционном этапе диагностического процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ многочисленных публикации убедительно показал целесообразность применения морфометрических и молекулярно-генетических исследований для дифференциальной диагностики и определения степени злокачественности узловых образований щитовидной железы у пациентов с ФОНЗП. Полученные нами результаты изучения профиля и уровня экспрессии ряда микроРНК, морфометрических характеристик и подсчёт районов ядрышковых организаторов тиреоцитов могут служить в качестве основы для дополнительных критериев уточнения потенциала злокачественности посредством оценки пролиферативной активности фолликулярного эпителия при ФОНЗП. Верификация на дооперационном этапе условно злокачественного варианта ФОНЗП (по нашим данным, регистрируется на операционном материале примерно у 1/3 пациентов с данной опухолью), позволит обосновать необходимость и объём хирургического вмешательства на щитовидной железе. При выявлении комплекса молекулярно-генетических и морфометрических критериев условно доброкачественной ФОНЗП (по нашим данным, на операционном материале – до 2/3 наблюдений) обсуждается возможность использования выжидательной тактики [5; 6].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J. WHO Classification of tumours of endocrine organs. 4th ed. Lyon: IARC; 2017. pp. 65–144.
2. Hahn SY, Shin JH, Na DG et al. Ethanol Ablation of the Thyroid Nodules: 2018 Consensus statement by the Korean Society of Thyroid Radiology. *Korean J Radiol* 2019;20(4):609–620. <https://doi.org/10.3348/kjr.2018.0696>.
3. Абросимов А.Ю., Абдулхабинова Ф.М. Система классификации цитопатологии щитовидной железы Бетесда (пересмотр 2017 г.). перспективы диагностики опухолей щитовидной железы и оптимизация тактики ведения пациентов. *Новости клинической цитологии России* 2017;21(3–4):23–31.
- Abrosimov AY, Abdulkhabirova FM. The classification system of thyroid cytopathology Bethesda (revised 2017). prospects

for the diagnosis of thyroid tumors and optimization of patient management tactics. *News of clinical cytology of Russia* 2017;21(3–4):23–31. (In Russ).

4. Качко В.А., Семкина Г.В., Платонова Н.М. с соавт. Диагностика новообразований щитовидной железы. *Эндокринная хирургия* 2018;12(3):109–127. <https://doi.org/10.14341/serg9977>.

Kachko VA, Semkina GV, Abrosimov AY et al. Diagnosis of thyroid neoplasms: state of the art on 2018. *Endocrine Surgery* 2018;12(3):109–127. (In Russ.). <https://doi.org/10.14341/serg9977>.

5. Костромина Е.В., Красильникова Л.А., Денискин О.Н. с соавт. Мультидисциплинарный подход в диагностике очаговых изменений щитовидной железы: учебное пособие. Санкт-Петербург; 2022. С. 89–102.

Kostromina EV, Krasilnikova LA, Deniskin ON et al. Multidisciplinary approach in the diagnosis of focal thyroid changes: textbook. Saint Petersburg; 2022. pp. 89–102. (In Russ.).

URL: https://www.niioncologii.ru/filesapi/files/luchev/Костромина_Е.В._Диагностика_изменений_ЩЖ_2022.pdf?ysclid=leqsm6dq5291557559.

6. Xu L, Zhou Y, Li Y et al. Reducing Unnecessary Biopsy of American College of Radiology Thyroid Imaging Reporting and Data System Category 4 Nodules. *J Ultrasound Med* 2021;40(2):227–236. <https://doi.org/10.1002/jum.15391>.

7. Мусаелян А.А., Лапин С.В., Назаров В.Д. с соавт. Диагностическая и прогностическая значимость выявления мутаций в генах BRAF, TERT, RAS и транслокаций RET/PTC и PAX8/PPARG в материале тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы IV цитологической категории (Bethesda, 2017). *Опухоли головы и шеи* 2022;12(2):71–78. <https://doi.org/10.17650/2222-1468-2022-12-2-71-78>.

Musaelyan AA, Lapin SV, Nazarov VD et al. Diagnostic and prognostic significance of detection of mutations in the genes BRAF, TERT, RAS and translocations RET / PTC and PAX8 / PPARG in the material of fine needle aspiration biopsy of thyroid nodes of the IV cytological category (Bethesda, 2017). *Tumors of the head and neck* 2022;12(2):71–78. (In Russ.). <https://doi.org/10.17650/2222-1468-2022-12-2-71-78>.

8. Partyka KL, Trevino K, Randolph ML et al. Risk of malignancy and neoplasia predicted by three molecular testing platforms in indeterminate thyroid nodules on fine-needle aspiration. *Diagn Cytopathol* 2019;47(9):853–862. <https://doi.org/10.1002/dc.24250>.

9. Великий Д.А., Гичкун О.Е., Шевченко А.О. МикроРНК: роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, перспективы клинического применения. *Клиническая лабораторная диагностика* 2018;63(7):403–409. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-403-409>.

Velikiy DA, Gichkun OE, Shevchenko AO. microRNA: role in the development of cardiovascular diseases, prospects for clinical application. *Clinical laboratory diagnostics* 2018;63(7):403–409. (In Russ.). <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-403-409>.

10. Гареев И.Ф., Бейлерли О.А. Циркулирующие микроРНК как биомаркеры: какие перспективы? *Профилактическая медицина* 2018;21(6):142–150. <https://doi.org/10.17116/profmed201821061142>.

Gareev IF, Beylerli OA. Circulating microRNAs as biomarkers: what are perspectives? *Profilakticheskaya Meditsina = Preventive medicine* 2018;21(6):142–150. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/profmed201821061142>.

11. Аушев В.Н. МикроРНК: малые молекулы с большим значением. *Клиническая онкогематология* 2015;8(1):1–12. Aushev VN. MicroRNA: small molecules of great significance. *Clin Onkogematol* 2015; 8(1):1–12 (In Russ).

12. Сердюкова О.С., Титов С.Е., Малахина Е.С., Рымар О.Д. МикроРНК – перспективные молекулярные маркеры обнаружения рака в узлах щитовидной железы. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология* 2018;14(3):140–148. <https://doi.org/10.14341/ket9774>.

Serdyukova OS, Titov SE, Malakhina ES, Rymar OD. MicroRNAs – promising molecular markers for detecting cancer in thyroid nodules. *Clinical and experimental thyroidology* 2018;14(3):140–148. (In Russ.). <https://doi.org/10.14341/ket9774>.

13. Nikiforova MN, Chiosea SI, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiles in thyroid tumors. *Endocrine Pathology* 2009;20(2):85–91. <https://doi.org/10.1007/s12022-009-9069-z>.

14. Santiago K, Wongworawat YC, Khan S. Differential microRNA-signatures in thyroid cancer subtypes. *J Oncol* 2020;2052396. <https://doi.org/10.1155/2020/2052396>

15. Shen R, Liyanarachchi S, Li W et al. MicroRNA signature in thyroid fine needle aspiration cytology applied to “atypia of undetermined significance” cases. *Thyroid* 2012;22(1):9–16. <https://doi.org/10.1089/thy.2011.0081>.

16. Baroukh NN, Van Obberghen E. Function of microRNA-375 and microRNA-124a in pancreas and brain. *FEBS J* 2009;276(22):6509–6521. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07353.x>.

17. Кукава Н.Г., Шахнович Р.М., Осьмак Г.Ж. с соавт. Участие микроРНК в развитии ишемической болезни сердца. *Кардиология* 2019;59(10):78–87. <https://doi.org/10.18087/cardio.2019.10.n558>.

Kukava NG, Shakhnovich RM, Osmak GZh et al. The role of microRNA in the development of ischemic heart disease. *Kardiologiia= Cardiology* 2019;59(10):78–87. (In Russ.). <https://doi.org/10.18087/cardio.2019.10.n558>.

18. He H, Jazdzewski K, Li W et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 2005;102(52):19075–19080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509603102>.

19. Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N et al. Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer. *Cancer Sci* 2017;108(8):1681–1692. <https://doi.org/10.1111/cas.13298>.

20. Kim KS, Jeong D, Sari IN et al. miR551b regulates colorectal cancer progression by targeting the ZEB1 signaling axis. *Cancers (Basel)* 2019;11(5):735. <https://doi.org/10.3390/cancers11050735>.

21. Valastyan S, Chang A, Benaich N et al. Activation of miR-31 function in already-established metastases elicits metastatic regression. *Genes Dev* 2011;25(6):646–659. <https://doi.org/10.1101/gad.2004211>.

22. Slaby O, Svoboda M, Fabian P et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 2007;72(5–6):397–402. <https://doi.org/10.1159/000113489>.

23. Pan X, Wang R, Wang ZX. The potential role of miR-451 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *Mol Cancer Ther* 2013;12(7):1153–1162. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0802>.
24. Гордеев В.В., Антонов А.Г., Евсеев А.Н. с соавт. Роль компьютерной морфометрии зон ядрышкового организатора рибосом в алгоритме ведения пациентов с простатической интраэпителиальной неоплазией. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2011;1:23–25.
Gordeev VV, Antonov AG, Evseev AN et al. The role of computer morphometry of nucleolar ribosome organizer zones in the algorithm of management of patients with prostatic intra-epithelial neoplasia. *Pacific Medical Journal* 2011;1:23–25. (In Russ.).
25. Кобяков Д.С., Бычкова Е.Ю., Авдалян А.М. с соавт. Взаимосвязь аргирофильных белков ядрышкообразующих районов с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью больных при немелкоклеточном раке легкого. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена* 2014;3(4):19–24.
Kobyakov DS, Bychkova EYu, Avdalian AM et al. Relationship of argyrophilic nucleolar organizer region-associated proteins to clinical and morphological parameters and survival in patients with non-small cell lung cancer. *P.A. Herzen Journal of Oncology* 2014;3(4):19–24. (In Russ.).
26. Akhavan A, Keith JD, Bastacky SI et al. The proportion of cores with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on extended pattern needle biopsy is significantly associated with prostate cancer on site-directed repeat biopsy. *BJU Int* 2007;99(4):765–769. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2006.06681.x>.
27. Боташева В.С., Калоева А.А., Эркенова Л.Д. Характер морфологических изменений при эндемическом зобе. *Фундаментальные исследования* 2015;1–1:36–40.
Botasheva VS, Kaloeva AA, Erkenova LD. The nature of morphological changes in endemic goiter. *Fundamental research* 2015;1–1:36–40. (In Russ.).
28. Джикаев Г.Д. Морфологические критерии диагностики хронического аутоиммунного тиреоидита. Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: 14.03.02. Волгоград, 2016. С. 92–98.
Dzhikaev G.D. Morphological criteria for the diagnosis of chronic autoimmune thyroiditis. Dissertation for the degree of Candidate of Medical Sciences: 14.03.02. Volgograd, 2016. pp. 92–98. (In Russ.).
https://www.volgmed.ru/uploads/dsovet/thesis/1-748-dzhikaev_grigorij_davido_vich.pdf?ysclid=ldb1p26sng956556624.
29. Riüschhoff J, Prasser C, Cortez T et al. Diagnostic value of AgNOR staining in follicular cell neoplasms of the thyroid: comparison of evaluation methods and nucleolar features. *Amer J Surg Pathol* 1993;17(12):1281–1288. <https://doi.org/10.1097/00000478-199312000-00010>.
30. Меркулов Г.А. Курс патологоанатомической техники. Ленинград, 1961; С. 114–131.
Merkulov GA. Course of pathoanatomic technique. Leningrad, 1961; pp. 114–131. (In Russ.).
31. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Ахмерова Л.Г. с соавт. Способ дифференциальной диагностики новообразований щитовидной железы человека. Патент RU 2569154 C1: опубл. 20.11.2015.
Kolesnikov NN, Titov SE, Akhmerova LG et al. Method of differential diagnosis of human thyroid neoplasms. Patent RU 2569154 C1: date of publication: 20.11.2015. (In Russ.).
32. Титов С.Е., Веряскина Ю.А. Способ дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы человека. Патент RU 2757347 C1: опубл. 13.10.2021.
Titov SE, Veryaskina YuA. Method for differential diagnosis of nodular formations of the human thyroid gland. Patent RU 2757347 C1: date of publication: 13.10.2021. (In Russ.).
33. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017;7(1):16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>.
34. Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 1987;151(2):111–118. <https://doi.org/10.1002/path.1711510203>.
35. Smith PJ, Skilbeck N, Harrison A, Crocker J. The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. *J Pathol* 1988;155(2):109–112. <https://doi.org/10.1002/path.1711550206>.
36. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count Ag ORs? Proposals for standardized approach. *J Pathol* 1989;158(3):185–188. <https://doi.org/10.1002/path.1711580303>.
37. Ланг Т.А., Сессик М. Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов: пер. с англ. под ред. Леонова В.П. М.: Практическая медицина; 2011. С. 64–79.
Lang TA, Sessik M. How to describe statistics in medicine. An annotated guide for authors, editors and reviewers: translated from English, edit. Leonov VP. M.: Practical Medicine; 2011, pp. 64–79. (In Russ.).
38. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count Ag ORs? Proposals for standardized approach. *J Pathol* 1989;158(3):185–188. <https://doi.org/10.1002/path.1711580303>.
39. Ito Y, Hirokawa M, Hayashi T et al. Clinical outcomes of follicular tumor of uncertain malignant potential of the thyroid: real-world data. *Endocr J* 2022;69(7):757–761. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ21-0723>.
40. Лукьянов С.А., Сергийко С.В., Ильина Т.Е. Посттранскрипционные микроРНК в диагностике и персонализации лечения больных опухолями щитовидной железы: обзор литературы. *Пермский медицинский журнал* 2022;39(5):80–92. <https://doi.org/10.17816/pmj39580%92>.
- Lukyanov SA, Sergiyko SV, Ilyina TE. Post-transcriptional microRNAs in the diagnosis and personalization of treatment of patients with thyroid tumors: literature review. *Perm Medical Journal* 2022;39(5):80–92. (In Russ.). <https://doi.org/10.17816/pmj39580%92>.
41. Lupo MA, Walts AE, Sistrunk JW et al. Multiplatform molecular test performance in indeterminate thyroid nodules. *Diagn Cytopathol* 2020; 48(12):1254–1264. <https://doi.org/10.1002/dc.24564>.
42. Sheu SY, Grabellus F, Schwertheim S et al. Differential miRNA expression profiles in variants of papillary thyroid

carcinoma and encapsulated follicular thyroid tumours. *Br J Cancer* 2010;102(2):376–382. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605493>.

43. Gill A, Gundara JS, Ip JC et al. MicroRNA-222 and microRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer. *Cancer* 2013;119(24):4358–4365. <https://doi.org/10.1002/cncr.28254>.

44. Stokowy T, Wojtaś B, Fajarewicz K et al. miRNAs with the potential to distinguish follicular thyroid carcinomas from benign follicular thyroid tumors: results of a meta-analysis. *Horm Metab Res* 2014;46(3):171–180. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363264>.

45. Celano M, Rosignolo F, Maggisano V et al. MicroRNAs as biomarkers in thyroid carcinoma. *Int J Genomics* 2017;2017:6496570. <https://doi.org/10.1155/2017/6496570>.

46. Abraham D, Jackson N, Gundara JS et al. MicroRNA profiling of sporadic and hereditary medullary thyroid cancer identifies predictors of nodal metastasis, prognosis, and potential therapeutic targets. *Clin Cancer Res* 2011;17(14):4772–4781. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0242>.

47. Santiago K, Wongworawat YC, Khan S. Differential MicroRNA-Signatures in Thyroid Cancer Subtypes. *J Oncol* 2020;2020(6):1–14. <https://doi.org/10.1155/2020/2052396>.

Сведения об авторах:

Т.Е. Ильина – ассистент кафедры, аспирант;

Е.Л. Казачков – доктор медицинских наук, профессор;

С.В. Сергийко – доктор медицинских наук, профессор.

Information about the authors:

T.E. Il'ina – Department assistant, Postgraduate student;

E.L. Kazachkov – Doctor of Science (Medicine), Professor;

S.V. Sergijko – Doctor of Science (Medicine), Professor.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of interests The authors declare no conflicts of interests.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Funding source This study was not supported by any external sources of funding.

Этическая экспертиза. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 8 от 20.09.2021).

Ethics approval The study was approved by the local Ethics Committee of the South Ural State Medical University (#8 from 20.09.2021).

Информированное согласие В соответствии с положениями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы научных и медицинских исследований с участием человека» (2008), все пациенты были ознакомлены с целью работы и дали информированное согласие на участие в исследовании и публикацию его результатов в открытой печати.

Informed consent In accordance with the World Medical Association's Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Scientific and Medical Research Involving Human Subjects" (2008), all patients were made aware of the purpose of the work and gave informed consent to participate in the study and publish the results in the open press.

Статья поступила в редакцию 07.02.2023; одобрена после рецензирования 14.03.2023; принята к публикации 01.04.2023.

The article was submitted 07.02.2023; approved after reviewing 14.03.2023; accepted for publication 01.04.2023.