

На правах рукописи

Веряскина Юлия Андреевна

«Профилирование экспрессии микроРНК в опухолях молочной железы и опухолях головы и шеи. Сравнительный анализ»

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск 2016

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Колесников Николай Николаевич**
доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск.

Оппоненты: **Кочетов Алексей Владимирович,**
доктор биологических наук, зам. директора по научной работе, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск.

Рыкова Елена Юрьевна,
доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной медицины, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена РАН, г. Москва.

Защита состоится: _____ 2016 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-373-02-49, +7- 952-916-7858, e-mail: kokoza@mcb.nsc.ru С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН www.mcb.nsc.ru Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е. Б. Кокоза

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. МикроРНК (миРНК) – это класс не кодирующих РНК, участвующих в регуляции экспрессии белок-кодирующих генов на посттранскрипционном уровне. МиРНК связываются с комплементарными участками 3'UTR районов генов-мишеней, приводя либо к расщеплению мРНК гена-мишени, либо к подавлению трансляции. Особенность взаимодействия миРНК:мРНК, допускающая неполную комплементарность в участке связывания, обуславливает наличие у одной миРНК порядка 100 генов-мишеней; в свою очередь, один ген может быть под контролем десятка разных миРНК. Многочисленные данные, накопленные к настоящему моменту, свидетельствуют о ключевой роли миРНК в процессах метаболизма, эмбрионального развития, пролиферации, дифференцировки, в иммунном ответе, геномном импринтинге, а также при разных патологиях, включая рак (Lee, Dutta, 2009). МиРНК дифференциально экспрессируются в опухолях различного генеза по сравнению с клетками нормальных тканей, что позволило высказать предположение об их роли в инициации, развитии и прогрессировании опухолей различного генеза (Blenkiron, Goldstein, 2007; Adams *et al.*, 2008; Hayes *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2014).

В 2005 году стартовал проект «Атлас ракового генома» (АРГ, The Cancer Genome Atlas, TCGA) целью которого является систематизация данных о генетических изменениях, приводящих к возникновению и прогрессированию опухолей различного генеза (Weinstein *et al.*, 2013). В ходе развития проекта показано, что для молекулярно-генетической характеристики опухолей различной локализации необходимо исследование, включающее в себя анализ многих молекулярных маркеров онкогенеза и, в частности, уровней экспрессии миРНК.

Разработка методов ранней диагностики онкологических заболеваний является общей проблемой для опухолей различной локализации. В свою очередь опухоли различного генеза отличаются рядом специфических трудностей при диагностике. Так при канцерогенезе опухолей молочной железы необходимо учитывать вклад стероидных гормонов в развитие опухоли, и, следовательно, учитывать молекулярно-генетическое разнообразие при разработке тактики лечения заболевания (Кушлинский *и др.*, 2005). Опухоли щитовидной железы различаются морфологически

в зависимости от типа клеток, из которых образована неоплазия и, следовательно, возникают трудности цитологической и гистологической характеристики опухоли (Полоз *и др.*, 2011). Клиническое течение плоскоклеточных карцином головы и шеи (ПКГШ) отличается высокой агрессивностью и длительным бессимптомным течением, а местные рецидивы и метастазы в лимфоузлы шеи сокращают 5-летнюю выживаемость пациентов практически вдвое (Чойнзонов, 2003). Для улучшения результатов лечения важно определить риск развития метастазов до их клинической реализации, что требует поиска и разработки новых прогностических маркеров метастазирования.

Представленная работа была направлена на выявление различий экспрессии панели миРНК, включающей в себя миРНК-21, -221, -222, -155, -205, -20a, -125b, -146b, -200a, -126, -181b в опухолях различного генеза. Важным этапом исследовательской работы является не только сравнение уровней экспрессии, как в опухолевой, так и в нормальной ткани, но также сравнительный анализ экспрессии миРНК в различных молекулярно-генетических подтипах опухолей в пределах одного органа. Стоит подчеркнуть, что миРНК характеризуются высокой стабильностью, в отличие от мРНК, что позволяет выделять их даже из материала, нанесенного на цитологические стекла. Это качество миРНК позволило провести исследования, связанные с оценкой возможности использования миРНК в качестве диагностических и прогностических маркеров, а именно в качестве маркеров, повышающих точность и информативность как цитологических, так и гистологических заключений.

Цель исследования: определение профиля и сравнительный анализ экспрессии миРНК в новообразованиях различного генеза, а именно, опухолях щитовидной железы, опухолях молочной железы, плоскоклеточных карциномах головы и шеи, и выявление значимых маркеров, позволяющих дифференцировать различные молекулярно-генетические подтипы опухолей в пределах одного органа.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ профилей экспрессии миРНК-21, -221, -222, -155, -205, -20a, -125b, -146b, -200a, -126, -181b в операционном материале доброкачественных и злокачественных новообразований различного генеза.

2. Провести сравнительный анализ профилей экспрессии миРНК-21, -221, -222, -155, -205, -20a, -125b, -146b, -200a в доброкачественных и злокачественных новообразованиях молочной железы на материале, полученном при экстракции с цитологических препаратов тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии (ТАПБ).

3. Определить значимые маркеры для дифференцирования различных молекулярно-генетических подтипов опухолей в пределах одного органа.

Научная новизна. В представленной работе проведен сравнительный анализ профилей экспрессии миРНК-21, -221, -222, -155, -205, -20a, -125b, -146b, -200a в опухолевых тканях различного генеза, а также анализ вариабельности уровней экспрессии миРНК в различных молекулярно-генетических подтипах злокачественных опухолей в пределах одного органа. Впервые показано, что уровень экспрессии миРНК может быть использован в качестве маркера при определении молекулярно-генетических подтипов рака молочной железы (РМЖ) в дооперационных образцах, полученных экстракцией с цитологических препаратов материала биопсии.

Научно-практическая ценность. Разработан методический подход экстракции нуклеиновых кислот с цитологических препаратов материала биопсии опухолей молочной железы. Профилирование экспрессии миРНК в образцах, полученных при экстракции материала, нанесенного на цитологические стекла, позволит отличать доброкачественные и злокачественные новообразования на дооперационном этапе и повысит точность и информативность цитологического заключения. Также как профилирование экспрессии миРНК в операционных образцах позволит повысить точность и информативность гистологического заключения. Сравнительный анализ уровней экспрессии миРНК, измеренных в дооперационном и операционном материале может быть использован в качестве динамической оценки развития заболевания.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Вариабельность экспрессии онко-миРНК в опухолях различного генеза является одним из критических компонентов молекулярной гетерогенности раковых клеток. Этот факт необходимо учитывать при разработке подходов использования

миРНК в качестве молекулярных маркеров диагностики новообразований.

2. МиРНК-21, -221, -222, -155, -205, -20a, -125b, -146b, -200a, -126, -181b дифференциально экспрессируются в злокачественных и доброкачественных опухолях различной локализации, а также в различных молекулярно-генетических подтипах опухолей одного органа.

3. Профилирование экспрессии миРНК может способствовать повышению точности и информативности как цитологического, так и гистологического заключений.

4. Измерение абсолютного количества миРНК в материале, полученном экстракцией цитологических препаратов ТАПБ опухолей молочной железы может быть использовано для разработки тест-систем, позволяющих отличить злокачественные опухоли от доброкачественных, а также дифференцировать различные молекулярно-генетические подтипы опухоли в пределах одного органа на дооперационном этапе.

Личный вклад автора. Основные экспериментальные результаты получены автором самостоятельно. Автором самостоятельно проведена статистическая обработка всех экспериментальных результатов. Работа по измерению экспрессии миРНК в опухолях щитовидной железы проведена Титовым С.Е. и Климовой О.А.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: Всероссийская конференция молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В.Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» Томск, 2014 и 2015гг.

Публикации. Результаты исследования представлены в 5 статьях, 4 из которых опубликованы в изданиях из перечня ВАК, 2 патентах и 13 тезисах по материалам конференций.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста и содержит 15 рисунков, 18 таблиц и 1 приложение. Текст состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов, результатов, обсуждения и выводов, а также списка цитируемой литературы, в который входит 197 ссылок.

Благодарности. Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю д.б.н. Н.Н. Колесникову за

постановку задач, научное руководство и всестороннюю поддержку. Автор благодарен к.б.н. С.Е. Титову за участие в планировании и проведении экспериментов.

Характеристика исследуемого материала. *Операционный материал.* В исследование включены 728 операционных образцов включающих в себя как образцы опухоли, так и образцы прилежащей морфологически неизменной ткани, полученные от пациентов с диагнозами: РМЖ (n=78), фиброаденома молочной железы (ФА МЖ) (n=23), папиллярный рак щитовидной железы (ПР ЩЖ) (n=108), фолликулярный рак щитовидной железы (ФР ЩЖ) (n=15), фолликулярная аденома щитовидной железы (ФА ЩЖ) (n=41), доброкачественные узлы щитовидной железы (зоб ЩЖ) (n=39); плоскоклеточные карциномы гортани (ПКГ) (n=60). Полученный в ходе операции биоматериал помещали в раствор для стабилизации РНК RNAlater для последующего выделения и анализа миРНК. *Цитологические препараты.* В исследование включены: 51 цитологический препарат, полученный от пациента с диагнозом РМЖ и 29 цитологических препаратов, полученных от пациентов с диагнозом ФА МЖ, проходивших обследование с целью верификации диагноза.

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение нуклеиновых кислот из клинических операционных образцов и образцов, полученных экстракцией материала, нанесенного на цитологические стекла, проводилось с использованием набора реагентов «Реал Бест экстракция 100» («ЗАО Вектор-Бест», Россия).

ОТ-ПЦР в реальном времени. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали готовые реакционные смеси «Реал Бест Мастер микс ОТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Полученную реакционную смесь, содержащую кДНК, сразу использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР в реальном времени на приборе CFX 96 (Bio-Rad, США). В качестве референсного гена использовали малую РНК *U6*. Системы праймеров и зондов, а также *Taq*-полимераза разработаны компанией ЗАО «Вектор-Бест», и эффективность реакции составляет 85-100%. Анализ полученных данных пороговых циклов ПЦР проводился $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ методом (Livak, Schmittgen, 2001). Изменение уровня экспрессии миРНК между опухолевой и морфологически неизменной тканями оценивалось путем

сравнительного анализа медианных значений ΔCt исследуемых подгрупп. Изменение уровня экспрессии миРНК между различными молекулярно-генетическими подтипами опухоли оценивалось путем сравнительного анализа медианных значений $\Delta\Delta Ct$ исследуемых подгрупп пациентов.

Цифровая капельная ПЦР (ЦК-ПЦР) проводилась с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка результатов. Статистическая достоверность полученных данных оценивалась при помощи непараметрического коэффициента Манна-Уитни. Значимость исследуемых классификаторов для дифференциации двух подгрупп оценивалась методом ROC-анализа и значение $AUC \geq 0.8$ принято допустимым и достаточным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ уровней экспрессии миРНК в опухолевых новообразованиях различного генеза. Существует множество работ, описывающих изменения уровней экспрессии миРНК как в опухолевых образцах по сравнению с прилежащими морфологически неизменными тканями, так и между опухолями различного генеза (Iorio *et al.*, 2011; Hayes *et al.*, 2014). Однако данные полученные в разных лабораториях могут варьировать в зависимости от метода измерения экспрессии, набора используемых реагентов, а также дизайна праймеров исследуемых миРНК. В Российской Федерации не зарегистрировано готовых диагностических панелей в основе которых лежит анализ экспрессии миРНК, позволяющих различать молекулярно-генетические подтипы опухолей различного генеза и способствующих улучшению методов персонализированной терапии. Таким образом, вопрос о создании тест-систем на основе анализа экспрессии миРНК остается открытым и на сегодняшний день.

Доброкачественные опухоли. При исследовании изменений уровней экспрессии миРНК в образцах ФА МЖ, ФА ЩЖ, доброкачественных узлов щитовидной железы по отношению к прилежащим морфологически неизменным тканям статистически достоверных различий не выявлено. Возможно, полученные результаты незначительных, статистически недостоверных

изменений подчеркивают отсутствие динамики развития опухоли и являются характеристикой доброкачественных опухолей различного генеза.

Однако стоит отметить, что при сравнении образцов опухолей ФА МЖ и прилежащей морфологически неизменной ткани исследуемая группа (n=23) распалась на 2 подгруппы по уровню экспрессии миРНК-205. Так для миРНК-21, -221, -222, -155, -20a, -125b, -146b, -200a медианные значения относительных уровней экспрессии миРНК, и значения 0,25 и 0,75 квартилей лежат в интервале (0;4), что говорит о незначительных изменениях уровней экспрессии миРНК и диапазон изменчивости укладывается в пределы нормальной вариации. Однако диапазон изменчивости уровня экспрессии миРНК-205 находится в интервале (0;30), что говорит о неоднородности исследуемой выборки операционных образцов по уровню экспрессии миРНК-205. Для дальнейшего анализа экспрессии миРНК в доброкачественных опухолях молочной железы исследуемая выборка пациентов с диагнозом ФА МЖ была разделена на 2 подгруппы по уровню экспрессии миРНК-205: ФА-1 – незначительные изменения уровня экспрессии миРНК-205 в интервале (0;4), ФА-2 – уровень экспрессии миРНК-205 находится в интервале (4;30). Медианные значения уровней экспрессии миРНК-205 между подгруппами ФА-1 (n=16) и ФА-2 (n=7) различается в 3 раза (p=0.00000). В подгруппе ФА-2 мы наблюдали увеличение уровня экспрессии миРНК-205 почти в 30 раз в опухолевых образцах по отношению к прилежащей морфологически неизменной ткани (p=0.02214). Полученные данные можно объяснить наличием гетерогенности среди доброкачественных опухолей молочной железы. Так существует подтип ФА МЖ - филоидная ФА МЖ. Эта опухоль, как и фиброаденома, содержит эпителиальный и соединительнотканый компоненты, однако имеет три состояния и может быть доброкачественной, пограничной и злокачественной. Таким образом, анализ профилирования экспрессии миРНК выявил молекулярную гетерогенность среди ФА МЖ, не различимую по морфологическим критериям. В дальнейшем сравнительном анализе будут использованы данные, полученные для подгруппы ФА-1, ввиду того, что именно подгруппа ФА-1 определена в качестве истинной ФА МЖ без переходных процессов к РМЖ.

Злокачественные опухоли. В представленной работе получены статистически достоверные результаты значимого увеличения уровня экспрессии миРНК-21 более чем в 3 раза в образцах РМЖ, ПР ЩЖ и ПКГ по отношению к прилежащим морфологически неизменным тканям ($p < 0.05$) (Табл. 1).

Табл. 1. Медианные значения относительных уровней экспрессии миРНК в ПР ЩЖ, ФР ЩЖ, ПКГ, РМЖ, ФА МЖ, ФА ЩЖ, зоб ЩЖ.

	Доброкачественные опухоли			Злокачественные опухоли			
	ФА МЖ (n=16)	Зоб ЩЖ (n=39)	ФА ЩЖ (n=41)	РМЖ (n=78)	ПКГ (n=51)	ПР ЩЖ (n=108)	ФР ЩЖ (n=15)
миРНК-21	0.66	1.04	1.03	4.07	3.37	5.21	1.35
миРНК-221	0.26	0.76	1.2	0.67	1.3	16.32	9.14
миРНК-222	0.71	0.68	0.84	0.50	1.01	16.34	4.3
миРНК-155	3.94	-	-	5.06	2.71	-	-
миРНК-205	0.89	0.68	0.56	0.43	1.17	2	0.08
миРНК-20a	0.68	0.59	0.58	0.83	0.82	1.26	0.83
миРНК-125b	0.62	-	-	0.14	0.27	-	-
миРНК-146b	1.32	0.98	0.74	1.12	1.65	58.82	1.4
миРНК-200a	1.29	0.52	0,37	2.09	0.97	1.36	0.72
миРНК-126	-	-	-	-	6.13	-	-
миРНК-181b	-	1.22	1.04	-	2.63	3.7	1.34

Примечание: статистически значимые различия между опухолевой тканью и прилежащей морфологически неизменной тканью выделены полужирным начертанием. Прочерк означает, что значение пороговых циклов Ct при проведении ОТ-ПЦР в реальном времени было более 39 циклов.

В опухолевых образцах ФР ЩЖ сохраняется тенденция к повышению уровня экспрессии миРНК-21, однако изменение незначительно и, возможно, для получения статистически достоверных значимых различий необходимо увеличить размер исследуемой выборки. Кроме того, миРНК-21 является значимым классификатором при дифференциации РМЖ от ФА МЖ (AUC=0.894, Sn=51.3%, Sp=100%) и ПР ЩЖ от подгруппы доброкачественных узлов ЩЖ (AUC=0.916, Sn=83.3%, Sp=89.7%) (Рис. 1). Таким образом, миРНК-21 может выступать в качестве маркера развития патологических процессов в клетках различных органов, а также в качестве классификатора, обладающего высокой чувствительностью и специфичностью при дифференциации злокачественных опухолей различного генеза от доброкачественных новообразований.

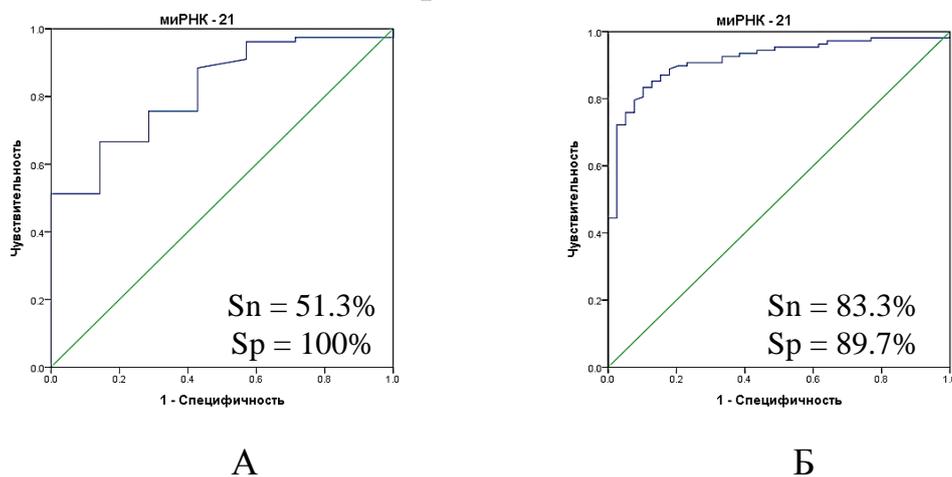


Рис. 1. Определение значимости классификатора миРНК-21 при сравнении РМЖ с ФА МЖ (А) и ПР ЩЖ с подгруппой доброкачественных узлов ЩЖ (Б) методом ROC анализа. Здесь и далее: ось абсцисс показывает – 1-специфичность (Sp), ось ординат – чувствительность (Sn).

При анализе уровня экспрессии кластера миРНК-221/222 в опухолях различного генеза получены противоположные данные динамики изменения уровня экспрессии при РМЖ и раке щитовидной железы (РЩЖ) (Табл. 1). Так получены результаты значительного увеличения уровней экспрессии миРНК-221 и миРНК-222 в образцах ПР ЩЖ и ФР ЩЖ по отношению к прилежащим морфологически неизменным тканям ($p < 0.05$). Однако в образцах РМЖ наблюдается тенденция к уменьшению уровня экспрессии кластера миРНК-221/222 по сравнению с морфологически неизменной тканью ($p < 0.05$). По литературным данным одной из мишеней миРНК-221/222 является рецептор

эстрогена (РЭ) (Di Leva *et al.*, 2010). В исследуемой выборке порядка 80% образцов характеризуются положительным РЭ статусом. Таким образом, пониженный уровень экспрессии миРНК-222 коррелирует с РЭ-положительным статусом опухолей молочной железы. В свою очередь по литературным данным повышенная экспрессия кластера миРНК-221/222 в линиях РЦЖ способствовала пролиферации за счет подавления онко-супрессоров *TIMP3* и *PTEN* (Garofalo *et al.*, 2009; Pallante *et al.*, 2006). Кроме того, в представленной работе получены данные, характеризующие миРНК-221/222 в качестве значимых маркеров злокачественных фолликулярно-клеточных опухолей щитовидной железы в отличие от доброкачественных опухолей щитовидной железы, а именно, ФР ЩЖ от ФА ЩЖ (миРНК-221: AUC=0.880, Sn=87.5%, Sp=85.4%; миРНК-222: AUC=0.912, Sn=81.3%, Sp=90.2%), ПР ЩЖ от доброкачественных узлов ЩЖ (миРНК-221: AUC=0.969, Sn=94.4%, Sp=89.7%; миРНК-222: AUC=0.976, Sn=92.6%, Sp=94.9%) (Рис. 2).

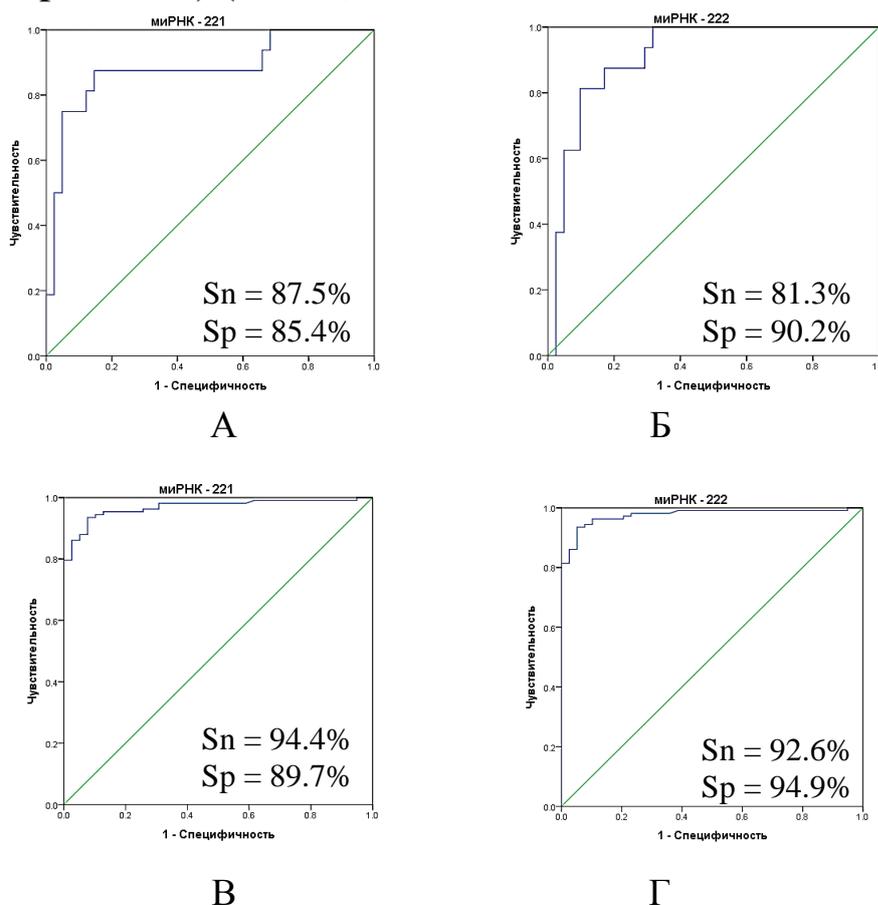


Рис. 2. Определение значимости классификаторов миРНК-221 (А), миРНК-222 (Б) при сравнении ФР ЩЖ и ФА ЩЖ и миРНК-221 (В), миРНК-222 (Г) при сравнении ПР ЩЖ и доброкачественных узлов ЩЖ методом ROC анализа.

При анализе уровня экспрессии миРНК-221 и миРНК-222 в образцах ПКГ в сравнении с прилежащей морфологически неизменной тканью различий не выявлено ($p=0.99733$ и $p=0.59078$ соответственно).

В представленной работе получены статистически значимые данные увеличения уровня экспрессии миРНК-155 в образцах РМЖ и ПКГ по сравнению с прилежащими морфологически неизменными тканями ($p<0.05$) (Табл. 1). Возможно, повышенная экспрессия миРНК-155 связана с её функцией в качестве регулятора иммунного ответа (Lind *et al.*, 2014). Кроме того, миРНК-155 является значимым классификатором, позволяющим отличать злокачественные опухоли молочной железы от доброкачественных опухолей (AUC=0.823, Sn=71.8%, Sp=100%) и повышенный уровень экспрессии, возможно, обусловлен ее функцией в качестве онкогена, способствующего ангиогенезу и, как следствие, метастазированию и развитию опухоли (Kong *et al.*, 2014) (Рис. 3).

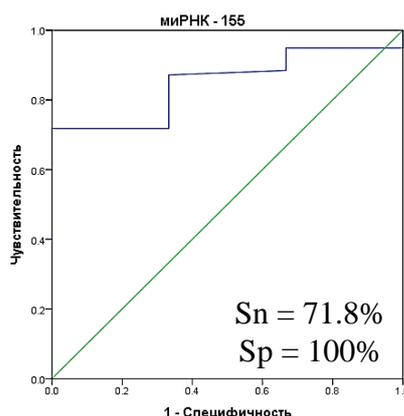


Рис. 3. Определение значимости классификатора миРНК-155 при сравнении РМЖ и ФА МЖ методом ROC анализа.

При анализе экспрессии миРНК-155 в образцах ПР ЩЖ и ФР ЩЖ методом ОТ-ПЦР в реальном времени значения пороговых циклов C_t превышали 39 цикл. Таким образом, обсуждение уровня экспрессии миРНК-155 в образцах РЩЖ проводиться не будет.

Уровень экспрессии миРНК-205 является значительно пониженным в опухолевых образцах ФР ЩЖ по сравнению с прилежащими морфологически неизменными тканями (Табл. 1). По литературным данным миРНК-205 является негативным регулятором метастазирования (Jiang *et al.*, 2006). В свою очередь,

метастазирование является отличительной характеристикой ФР ЩЖ от ПР ЩЖ. Таким образом, полученные результаты сопоставимы с литературными данными и пониженный уровень экспрессии миРНК-205 коррелирует с развитием метастаз. В образцах опухолей РМЖ, ПКГ и ПР ЩЖ значительных изменений уровня экспрессии миРНК-205 не выявлено.

Уровень экспрессии миРНК-125b значительно понижен в образцах РМЖ по сравнению с прилежащей морфологически неизменной тканью ($p < 0.05$) (Табл. 1). Возможно, полученные данные связаны с функцией миРНК-125b в качестве онко-супрессора. При анализе уровня экспрессии миРНК-125b в образцах ПКГ наблюдается тенденция к снижению уровня экспрессии, однако изменения незначительны. В образцах ПР ЩЖ и ФР ЩЖ измерения уровня экспрессии миРНК-125b не проводилось ввиду того, что по литературным данным изменения уровней экспрессии миРНК-125b не являются специфичными событиями для опухолей щитовидной железы.

При анализе различий уровней экспрессии миРНК-146b в образцах РМЖ, ПКГ и ФР ЩЖ по сравнению с прилежащей морфологически неизменной тканью значимых различий не выявлено (Табл. 1). Однако, в представленной работе получены результаты значительного увеличения уровня экспрессии миРНК-146b в опухолевых образцах ПР ЩЖ по сравнению с прилежащей морфологически неизменной тканью. Кроме того, миРНК-146b является значимым классификатором при дифференциации ПР ЩЖ от подгруппы доброкачественных узлов ЩЖ ($AUC=0.979$, $Sn=96.3\%$, $Sp=100\%$) (Рис. 4).

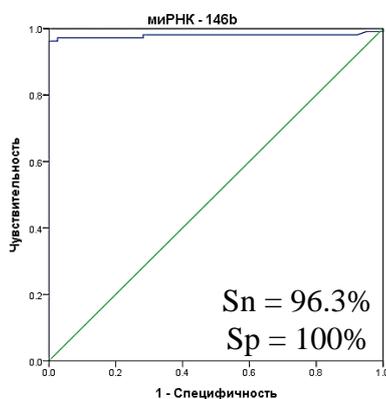


Рис. 4. Определение значимости классификатора миРНК-146b при сравнении ПР ЩЖ с доброкачественными узлами ЩЖ методом ROC анализа.

По литературным данным мишенью миРНК-146b является *TGF-β* негативно регулирующий рост фолликулярных клеток ЩЖ (Geraldo *et al.*, 2012). Таким образом, значительное повышение уровня экспрессии миРНК-146b определено в качестве характерного события для ПР ЩЖ.

В представленной работе получены статистически достоверные результаты увеличения уровня экспрессии миРНК-126 в опухолевых образцах ПКГ по сравнению с прилежащей морфологически неизменной тканью ($p < 0.05$). Кроме того, миРНК-126 является значимым классификатором при дифференциации подгруппы опухолей гортани с наличием метастаз от подгруппы опухолей гортани с отсутствием процессов метастазирования, что возможно, характеризуется способностью миРНК-126 регулировать процессы ангиогенеза и миграции клеток (Wang *et al.*, 2009) (AUC=0.981, Sn=100%, Sp=83%) (Рис. 5).

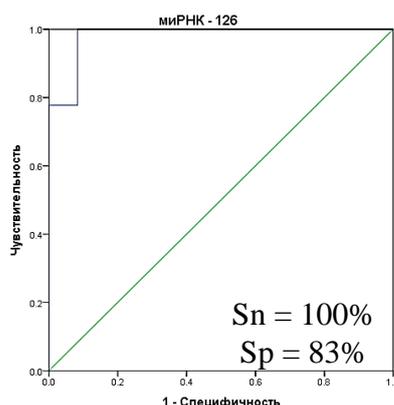


Рис. 5. Определение значимости классификатора миРНК-126 при сравнении ПКГ стадии T3-4N0-3M0-1 по отношению к ПКГ стадии T3-4N0M0 методом ROC.

Несмотря на то, что миРНК-126 является доказанным супрессором опухолевого роста, существует ряд исследований, свидетельствующих об онкогенной роли миРНК в развитии опухолей (Watahiki *et al.*, 2011). Анализ экспрессии миРНК-126 в образцах опухолей РМЖ, ПР ЩЖ и ФР ЩЖ не проводился, ввиду того, что по литературным данным изменения экспрессии, данной миРНК не является характерной особенностью этих опухолей.

Проведя сравнительный анализ уровней экспрессии миРНК-181b между опухолевыми образцами различного генеза и прилежащими к ним морфологически неизменёнными тканями выявлены значимые изменения уровня экспрессии в опухолевых

образцах ПКГ и ПР ЩЖ (Табл. 1). Кроме того, миРНК-181b является значимым классификатором при дифференциации ПР ЩЖ от подгруппы доброкачественных узлов ЩЖ (AUC=0.883, Sn=96.3%, Sp=100%) (Рис. 6). По литературным данным избыточная экспрессия миРНК-181b усиливает противоопухолевый ответ и способствует развитию воспалительных Т-клеток (Lind *et al.*, 2014). Анализ изменения экспрессии миРНК-181b в опухолевых образцах РМЖ не проводился ввиду того, что по литературным данным изменения экспрессии данной миРНК не являются характерным событием для опухолей молочной железы. При анализе уровня экспрессии миРНК-181b в опухолевых образцах ФР ЩЖ по отношению к прилежащей морфологически неизменённой ткани различия незначительны, возможно это обусловлено небольшим объемом исследуемой выборки.

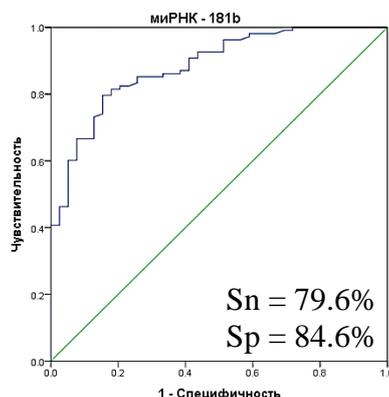


Рис. 6. Определение значимости классификатора миРНК-181b при сравнении ПР ЩЖ с узловым зобом ЩЖ методом ROC анализа.

Подводя итог сравнительного анализа уровней экспрессии миРНК в опухолевых новообразованиях различного генеза можно сделать вывод, что опухоли различного генеза характеризуются уникальным профилем миРНК, который отличает их как от нормальной ткани, так и от других типов новообразований. Очевидно, что в дополнении к молекулярным маркерам, получившим признанные в клинической онкологии, большинство видов рака могут быть дополнительно подразделены на прогностические группы на основании профилирования миРНК, что в свою очередь делает необходимыми дальнейшие исследования, направленные на формирование профилей экспрессии миРНК в молекулярно-генетических подтипах

опухолей различного генеза. Результаты этих исследований будут способствовать развитию персонализированной терапии. А различия в экспрессии миРНК в опухолевых клетках и условно нормальных клетках органа могут свидетельствовать о нарушениях в регуляции процессов, ассоциированных с развитием рака, таких как апоптоз, пролиферация, ангиогенез, метастазированием и прочие.

Сравнительный анализ уровней экспрессии миРНК в дооперационном и операционном материале доброкачественных и злокачественных опухолей молочной железы.

При сравнительном анализе уровней экспрессии миРНК между доброкачественными и злокачественными опухолями молочной железы в предоперационном и операционном материалах профили экспрессии миРНК оказались различными. Так при анализе экспрессии миРНК в цитологических образцах опухолей молочной железы получены статистически достоверные результаты изменений уровней экспрессии миРНК-21 ($p=0.00116$), -221 ($p=0.01903$), -205 ($p=0.00141$), -125b ($p=0.00000$), -200a ($p=0.00377$) в материале РМЖ по сравнению с ФА МЖ. Однако методом ROC-анализа лишь миРНК-125b является значимым классификатором, обладающим высокой чувствительностью и специфичностью при дифференциации РМЖ от ФА МЖ в предоперационной диагностике ($AUC=0.862$, $Sn=84.3\%$, $Sp=82.1\%$) (Рис. 7).

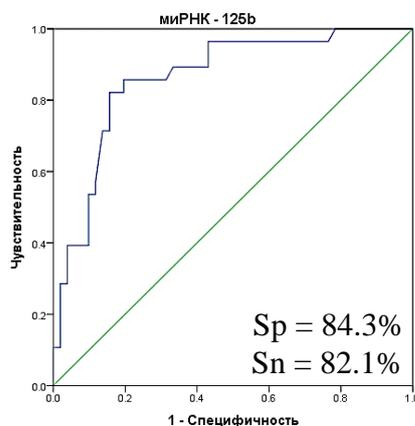


Рис. 7. Определение значимости классификатора миРНК-125b для дифференциации злокачественных опухолей молочной железы в дооперационной диагностике методом ROC анализа.

По литературным данным снижение экспрессии миРНК-125b также коррелирует с развитием опухолевого образования (Feliciano *et al.*, 2013).

При сравнительном анализе экспрессии миРНК между злокачественными и доброкачественными опухолями молочной железы в операционных образцах статистически достоверные изменения уровней экспрессии наблюдались для миРНК-21 ($p=0.00000$), -155 ($p=0.00090$), -125b ($p=0.0378$). Однако, методом ROC-анализа значимыми классификаторами, обладающими высокой чувствительностью и специфичностью при дифференциации РМЖ в операционных образцах, являются только миРНК-21 (AUC=0.894, Sn=51.3%, Sp=100%) и миРНК-155 (AUC=0.823, Sn=71.8%, Sp=100%) (Рис. 1А, Рис. 3). Таким образом, в предоперационной диагностике значимым классификатором для дифференциации РМЖ от ФА МЖ является миРНК-125b, а при операционной диагностике уже миРНК-21 и миРНК-155. Таким образом, на первичном этапе диагностики опухоль характеризуется лишь снижением противоопухолевого агента. Однако при анализе операционного материала наблюдается увеличение экспрессии онкогенных миРНК-21 и миРНК-155, способствующих развитию и прогрессированию опухоли (Pallante *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2014).

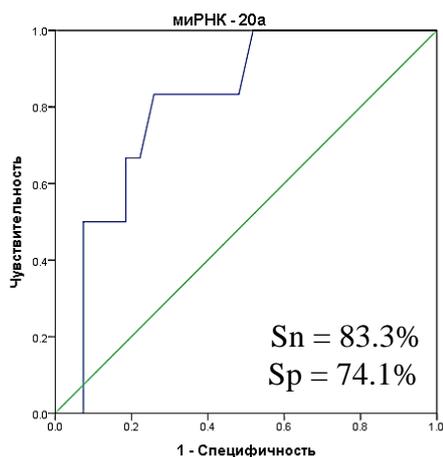
Сравнительный анализ уровней экспрессии миРНК в дооперационном и операционном материале различных молекулярно-генетических подтипов рака молочной железы.

При сравнительном анализе уровней экспрессии сформированной панели миРНК в предоперационных образцах тройного негативного рака молочной железы (ТНРМЖ) и люминального РМЖ методом ОТ-ПЦР в реальном времени получены статистически достоверные изменения уровней экспрессии миРНК-222 ($p=0.03089$), -155 ($p=0.00337$), -20a ($p=0.01786$) (Табл. 2). Однако методом ROC-анализа показано, что лишь миРНК-20a является значимым классификатором при дифференциации ТНРМЖ от люминального РМЖ в дооперационной диагностике методом ОТ-ПЦР в реальном времени (AUC=0.809, Sn=83.3%, Sp=74.1%) (Рис. 8А).

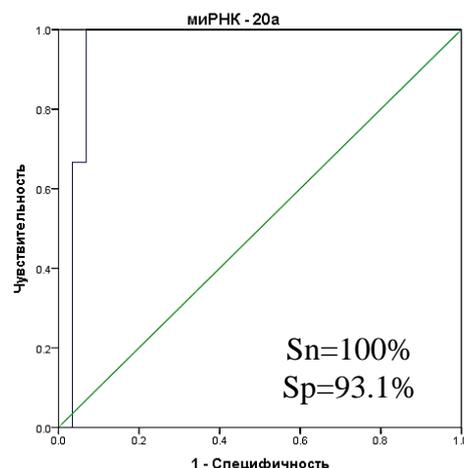
Табл. 2. Динамика изменения уровней экспрессии миРНК в ТНРМЖ по отношению к люминальному РМЖ в предоперационном и операционном материалах различными методами ПЦР.

миРНК	Операционный материал	Цитологические препараты	
	ОТ-ПЦР в реальном времени	ОТ-ПЦР в реальном времени	ЦК-ПЦР
миРНК-21	↑1.76	↑1.63	↑ 5.9
миРНК-221	↑1.35	↑1.54	↑ 12
миРНК-222	↑1.11	↑2.15	↑ 13.3
миРНК-155	↑2.86	↑9.12	-
миРНК-205	↓0.26	↑1.87	↑2
миРНК-20a	↑ 8.18	↑ 5.66	↑ 6.1
миРНК-125b	↓0.54	↑1.41	↑4.6
миРНК-146b	↑2.5	↑1.30	-
миРНК-200a	↑2.35	↑1.08	-

Примечания: жирным начертанием выделены изменения, характеризующиеся статистической достоверностью, оцененной методом Манна-Уитни ($p < 0.05$) и являющиеся значимыми классификаторами на основе метода ROC анализа ($AUC > 0.8$). Прочерк означает, что для миРНК измерения не проводились.



А



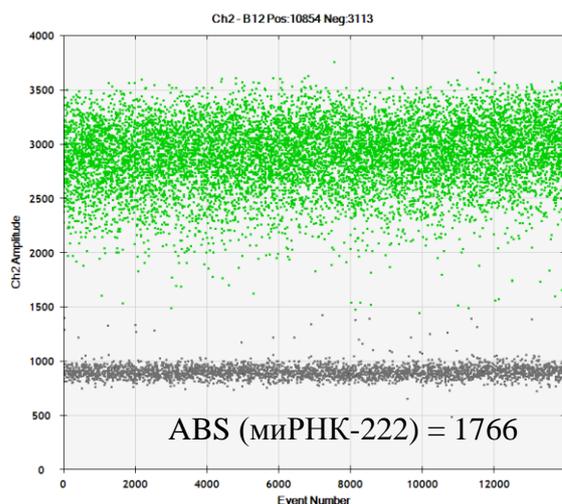
Б

Рис. 8. Определение значимости классификатора миРНК-20а для дифференциации ТНРМЖ в дооперационной (А) и операционной диагностике (Б) методом ROC анализа.

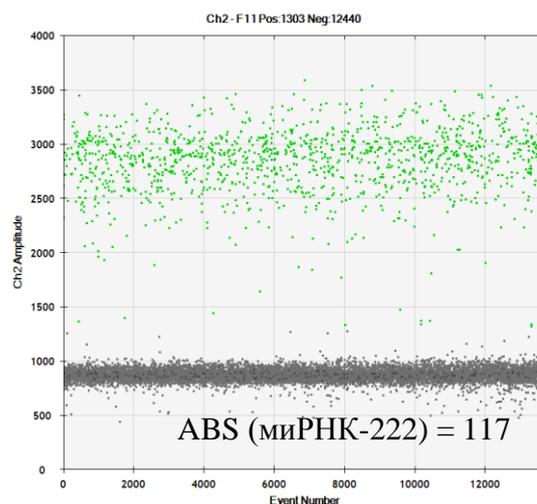
Таким образом, анализ экспрессии миРНК в дооперационных образцах РМЖ может служить в качестве дополнительного уточняющего маркера, способного индивидуализировать проводимую терапию. С целью повышения точности и информативности гистологического заключения проведен сравнительный анализ уровней экспрессии сформированной панели миРНК в операционных образцах ТНРМЖ и люминального РМЖ методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Получены статистически достоверные изменения уровней экспрессии миРНК-125b ($p=0.00122$), -146b ($p=0.02773$), -20a ($p=0.00007$) (Табл. 2). Однако методом ROC-анализа показано, что лишь миРНК-20а является значимым классификатором, обладающим высокой чувствительностью и специфичностью, при дифференциации ТНРМЖ от люминального РМЖ в операционной диагностике методом ОТ-ПЦР в реальном времени ($AUC=0.954$, $Sn=100\%$, $Sp=91.3\%$) (Рис. 8Б).

По литературным данным миРНК-20а является онкогеном, способствующим прогрессированию и развитию опухолей, регулируя такие процессы как ангиогенез и инвазия (Sambri *et al.*, 2015). В дооперационном материале уровень экспрессии миРНК-20а повышен порядка 5 раз в ТНРМЖ по сравнению с люминальным РМЖ, в то время как в операционном материале уровень её экспрессии повышен уже более чем в 8 раз, что, по-видимому, указывает на факт развития и прогрессирования

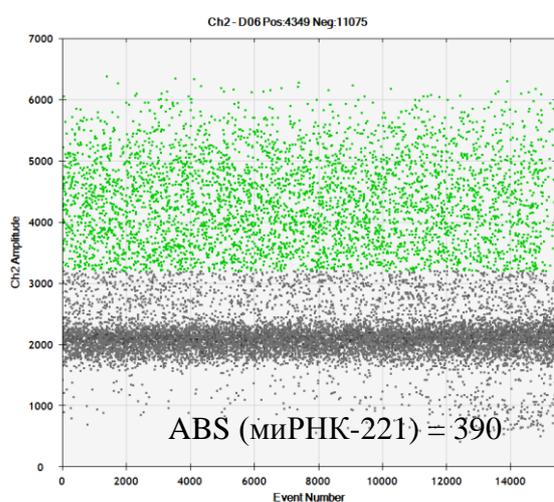
опухоли между моментом первичной диагностики и операцией. Однако стоит отметить тот факт, что при нанесении материала ТАПБ на цитологические стекла происходит дополнительная обработка исследуемого материала, в отличие от операционных образцов, погруженных в RNAlater без дополнительных манипуляций. Этот факт может вносить изменения в общее количество выделенной РНК и как следствие в количество миРНК. На следующем этапе представленной работы был проведен сравнительный анализ уровней экспрессии миРНК-21, -221, -222, -205, -20a, -125b в тех же предоперационных образцах ТНРМЖ и люминального РМЖ, что описаны выше, но уже методом ЦК-ПЦР. На рисунке 9 приведены примеры визуального представления абсолютного значения миРНК-221,-222,-20a в программном обеспечении системы QX-200, Bio-Rad.



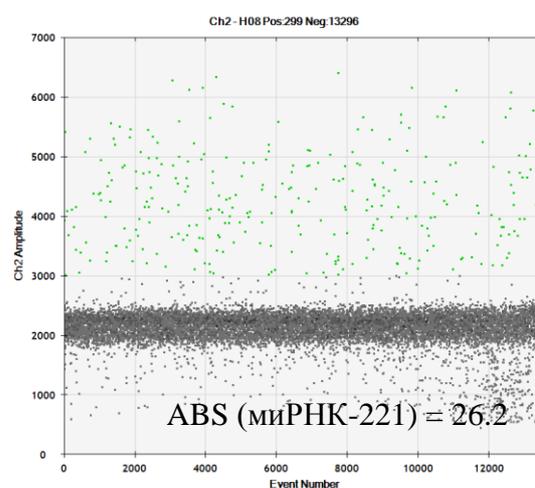
А



Б



В



Г

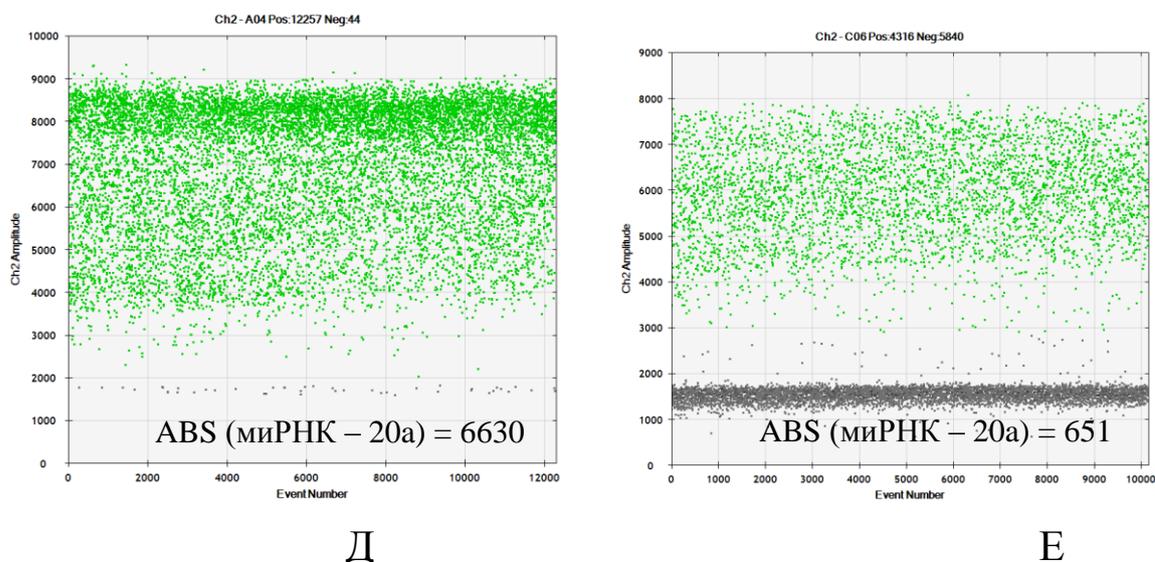


Рис. 9. Абсолютные значения миРНК в предоперационных образцах ТНРМЖ и люминального РМЖ. А – абсолютное значение миРНК-222 в образце ТНРМЖ, Б – абсолютное значение миРНК-222 в образце люминального РМЖ, В – абсолютное значение миРНК-221 в образце ТНРМЖ, Г – абсолютное значение миРНК-221 в образце люминального РМЖ, Д – абсолютное значение миРНК-20а в образце ТНРМЖ, Е – абсолютное значение миРНК-20а в образце люминального РМЖ.

Получены статистически достоверные изменения уровней экспрессии миРНК-21 ($p=0.01314$), -221 ($p=0.00274$), -222 ($p=0.00072$), -20а ($p=0.00361$) в образцах ТНРМЖ по отношению к люминальному РМЖ (Табл. 2). Методом ROC-анализа также показано, что миРНК-21, -221, -222, -20а являются значимыми классификаторами при дифференциации ТНРМЖ в дооперационной диагностике методом ЦК-ПЦР (миРНК-21: $AUC=0.833$, $Sn=100\%$, $Sp=80\%$; миРНК-221: $AUC=0.875$, $Sn=67\%$, $Sp=92.9\%$; миРНК-222: $AUC=0.923$, $Sn=100\%$, $Sp=84.2\%$; миРНК-20а: $AUC=0.932$, $Sn=100\%$, $Sp=86.4\%$) (Рис. 10).

Таким образом, при измерении экспрессии миРНК в предоперационных образцах РМЖ методом ОТ-ПЦР в реальном времени значимым классификатором является лишь миРНК-20а, а при измерении методом ЦК-ПЦР значимыми классификаторами являются миРНК-21, -221, -222, -20а. Полученные различия могут быть обусловлены не только применением различных методических подходов при измерении экспрессии миРНК, а именно двух поколений ПЦР, но и использованием различных реагентов при проведении реакции.

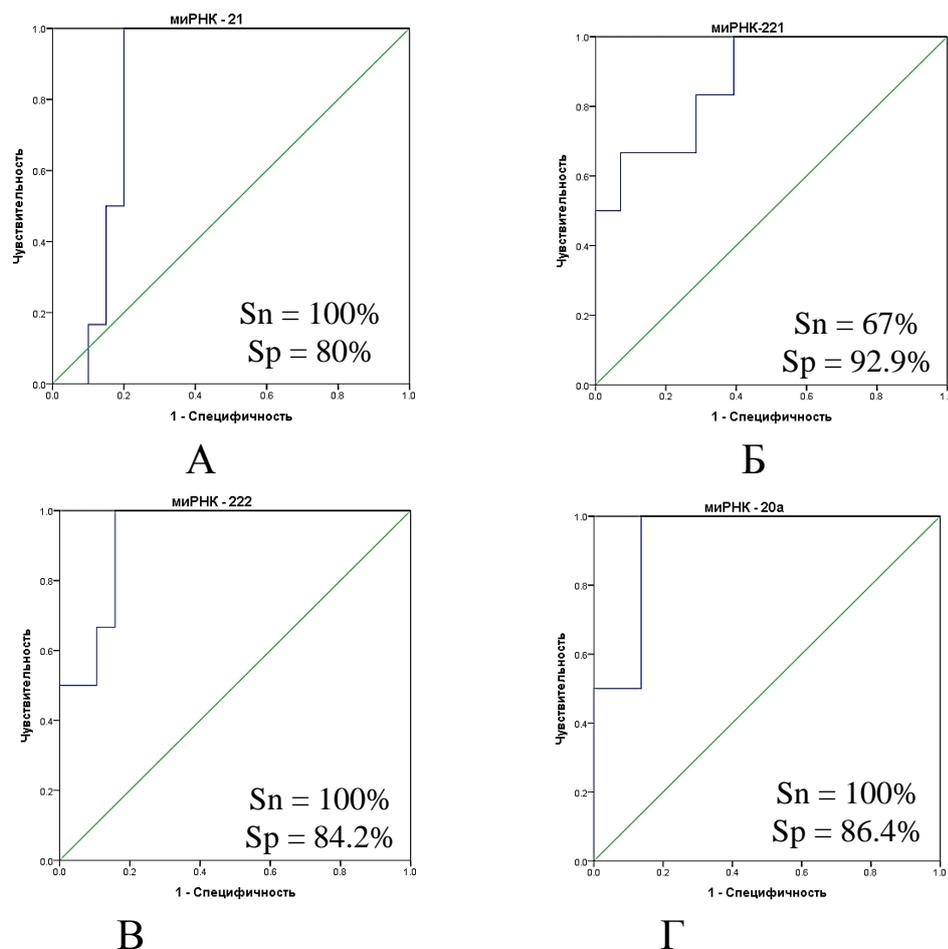


Рис. 10. Определение значимости классификаторов методом ROC анализа при дифференциации ТНРМЖ методом ЦК-ПЦР. А – миРНК-21; Б – миРНК-221; В – миРНК-222; Г – миРНК-20a.

Выполненное комплексное исследование свидетельствует о том, что результаты анализа экспрессии миРНК в дооперационном и операционном материале, могут быть использованы в качестве динамической оценки развития опухоли между моментом первичного забора материала при помощи биопсии с целью установки диагноза и моментом проведения операции. Эти данные могут быть использованы в качестве дополнительных маркеров, позволяющих повысить точность и информативность цитологических и гистологических заключений. Так анализ экспрессии миРНК-20a может быть использован в качестве маркера, позволяющего дифференцировать тройной негативный РМЖ от люминального РМЖ как в дооперационной, так и в операционной диагностике различными методами ПЦР анализа. Стоит отметить, что метод ОТ-ПЦР в реальном времени является полуколичественным методом оценки экспрессии миРНК, в то

время как метод ЦК-ПЦР является абсолютно количественным методом анализа экспрессии, характеризующимся высокой чувствительностью и воспроизводимостью результатов. Этот факт определяет перспективность использования метода ЦК-ПЦР при анализе изменений уровня экспрессии миРНК с целью повышения точности и информативности как цитологического, так и гистологического заключений.

ВЫВОДЫ

1. МиРНК-21 и миРНК-155 являются значимыми классификаторами при дифференциации злокачественных от доброкачественных опухолей молочной железы в операционных образцах
2. МиРНК-125b является значимым классификатором при дифференциации злокачественных от доброкачественных опухолей молочной железы в дооперационных образцах
3. МиРНК-20a является значимым классификатором при дифференциации тройного негативного рака молочной железы от люминальных опухолей молочной железы, как в дооперационном, так и в операционном материале
4. МиРНК-21, миРНК-221, миРНК-155 и миРНК-20a являются значимыми классификаторами при дифференциации тройного негативного рака молочной железы в цитологических препаратах при анализе экспрессии методом цифровой капельной ПЦР
5. МиРНК-126 является значимым классификатором при дифференциации случаев плоскоклеточных карцином гортани с развитием процессов метастазирования
6. МиРНК-221/222 являются значимыми классификаторами при дифференциации фолликулярноклеточных злокачественных опухолей щитовидной железы от доброкачественных опухолей щитовидной железы
7. МиРНК-21, миРНК-221/222, миРНК-146b, миРНК-181b являются значимыми классификаторами при дифференциации папиллярного рака щитовидной железы от доброкачественных узлов щитовидной железы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи:

1. Колесников Н.Н., Титов С.Е., **Веряскина Ю.А.**, Карпинская Е.В., Шевченко С.П., Ахмерова Л.Г., Иванов М.К., Козлов В.В., Елисафенко Е.А., Гуляева Л.Ф., Жимулев И.Ф. МикроРНК, эволюция и рак // Цитология. – 2013. – Т. 55. – №3. – С. 159 – 164.
2. **Веряскина Ю.А.**, Какурина Г.В., Журавлев Е.С., Титов С.Е., Кондакова И.В., Черемисина О.В., Шишкин Д.А., Жимулев И.Ф., Чойнзонов Е.Л., Колесников Н.Н. Экспрессионный профиль микроРНК при плоскоклеточном раке головы и шеи // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – № 6. – С. 33–38.
3. **Веряскина Ю.А.**, Титов С.Е., Родионов В.В., Генинг Т.П., Абакумова Т.В., Кометова В.В., Торосян М.Х., Жимулев И.Ф., Колесников Н.Н. Экспрессия микроРНК в молекулярно-генетических подтипах рака молочной // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5
4. Titov S.E., Ivanov M.K., Karpinskaya E.V., Tsivlikova E.V., Shevchenko S.P., **Veryaskina Y.A.**, Akhmerova L.G., Poloz T.L., Klimova O.A., Gulyaeva L.F., Zhimulev I.F., Kolesnikov N.N. 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(1).
5. Колесников Н.Н., Титов С.Е., **Веряскина Ю.А.**, Владимирова А.В., Самсонов Р.Б., Артемьева А.С., Новик В.И., Берштейн Л.М., Жимулев И.Ф., Малек А.В. Повышение точности и информативности тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии опухолей молочной железы путем анализа микроРНК в материале цитологического мазка // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – Т. 3. – №1. – С. 44–52.

Тезисы конференций:

6. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Карпинская Е.В., Шевченко С.П., **Веряскина Ю.А.**, Ахмерова Л.Г., Иванов М.К., Гуляева Л.Ф., Жимулев И.Ф. Онкомир. Роль микроРНК в диагностике, прогнозе и потенциальной терапии онкологических заболеваний человека // Тезисы II международной научно-

практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика». Новосибирск, 14-17 ноября 2011г. – С. 43.

7. **Веряскина Ю.А.**, Козлов В.В., Ахмерова Л.Г., Буренкова Н.Н., Титов С.Е., Иванов М.К., Войцицкий В.Е., Сидоров С.В., Гуляева Л.Ф., Колесников Н.Н., Жимулев И.Ф. Изменение экспрессии и структурно-функциональная организация генов микроРНК, участвующих в онкогенезе молочной железы человека // Материалы международной конференции «ХРОМОСОМА 2012». Новосибирск, 2–7 сентября 2012г. – С. 68-69.
8. Козлов В.В., **Веряскина Ю.А.**, Ахмерова Л.Г., Буренкова Н.Н., Титов С.Е., Иванов М.К., Войцицкий В.Е., Сидоров С.В., Гуляева Л.Ф., Колесников Н.Н., Жимулев И.Ф. Изменение экспрессии и структурно-функциональная организация генов микроРНК, участвующих в онкогенезе молочной железы человека // Тезисы работ XVI Российского онкологического конгресса Злокачественные опухоли. Москва, 13-15 ноября 2012г. – Т. 02. – № 2 Русскоязычное издание. – С. 132 - 133.
9. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Карпинская Е.В., Шевченко С.П., **Веряскина Ю.А.**, Ахмерова Л.Г., Иванов М.К., Гуляева Л.Ф., Жимулев И.Ф. Диагностика и типирование опухолей щитовидной железы с помощью анализа экспрессии микроРНК // Сборник тезисов III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань, 22-24 ноября 2012г. – С. 123–124.
10. Карпинская Е.В., Титов С.Е., **Веряскина Ю.А.**, Шевченко С.П., Колесников Н.Н. Уровень экспрессии микроРНК при узловатой патологии щитовидной железы // Материалы I Междисциплинарного конгресса по заболеваниям органов головы и шеи. Медицина XXI века – междисциплинарный подход к патологии органов головы и шеи. Опухоли головы и шеи. Москва, 27-29 мая 2013г. – Т. 5. – Спецвыпуск №1. – С.166.

11. **Веряскина Ю.А.**, Какурина Г.В., Титов С.Е., Колесников Н.Н. Профилирование экспрессии микроРНК в диагностике плоскоклеточного рака головы и шеи // Материалы всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В.Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии». Томск, 25 апреля 2014г. - Сибирский онкологический журнал. – Приложение 1. – С. 30.
12. Poloz T.L., Kolesnikov N.N., S.E. Titov, Shevchenko S.P., Karpinskaya E.V., Ivanov M.K., Achmerova L.G., **Veryaskina J.A.** MicroRNA profiling as a potential diagnostic tool for thyroid follicular neoplasms . //- Journal of Cytopathology. 38th European Congress of Cytopathology. - Switzerland, Geneva, September 27-30, 2014. – V. 25. – P22-25.
13. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Полоз Т.Л., Иванов М.К., Карпинская Е.В., Шевченко С.П., Ахмерова Л.Г., **Веряскина Ю.А.**, Жимулев И.Ф. МикроРНК профилирование как потенциальный метод диагностики опухолей щитовидной железы // Материалы расширенного пленума центрального исполнительного совета ассоциации клинических цитологов России. - Новости клинической цитологии России. - Анапа, 2-5 октября 2014, Т. 18. – № 1-2. – С. 53.
14. **Веряскина Ю.А.** МикроРНК – тканеспецифичный маркер процессов метастазирования // Сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Васильева Н.В. «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии». Томск, 22 мая, 2015г. – Сибирский онкологический журнал. – Приложение 1. – С. 19.
15. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Малахина Е.С., Полоз Т.Л., Иванов М.К., Ахмерова Л.Г., **Веряскина Ю.А.**, Шевченко С.П., Журавлев Е.С., Жимулев И.Ф. МикроРНК как клинические биомаркеры в диагностике онкологических заболеваний // Материалы международной научно-практической конференции «Репродуктивные технологии в онкологии». Исследования и практика в медицине. – Обнинск, 22-23 мая 2015г. – С. 55.

16. **Веряскина Ю.А.** Молекулярно-генетическая характеристика опухолей молочной железы и плоскоклеточных карцином головы и шеи на основе микроРНК // Тезисы VIII Всероссийского с международным участием Конгресса молодых ученых-биологов. Симбиоз – Россия 2015. – Новосибирск, 5–9 октября 2015г. – С. 65-66.
17. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Малахина Е.С., Полоз Т.Л., Иванов М.К., Ахмерова Л.Г., **Веряскина Ю.А.**, Шевченко С.П., Журавлев Е.С., Жимулев И.Ф. Молекулярные технологии в цитологической диагностике материала пункционной биопсии узловых образований щитовидной железы // Материалы XI съезда ассоциации клинических цитологов России. Звенигород, 9–12 октября 2015 г. – С. 22–23.
18. Kolesnikov N.N., S.E. Titov, Malakhina E.S., Poloz T.L., Ivanov M.K., Shevchenko S.P., Achmerova L.G., **Veryaskina J.A.**, Zhimulev I.F. MicroRNA and somatic mutations in the preoperative diagnostic of thyroid noduls // 21st International Charles Heidelberger Symposium. Moscow, 25–27 may 2016. – P. 24–25.

Патенты:

1. Патент № 2548773. Российская Федерация. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Ахмерова Л.Г., **Веряскина Ю.А.**, Иванов М.К., Шевченко С.П., Карпинская Е.В., Жимулев И.Ф. Способ определения доброкачественных и злокачественных новообразований щитовидной железы человека.
2. Патент № 2014140764. Российская Федерация. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Ахмерова Л.Г., **Веряскина Ю.А.**, Иванов М.К., Цивликова Е.С., Полоз Т.Л., Шевченко С.П., Карпинская Е.В., Жимулев И.Ф. Способ дифференциальной диагностики новообразований щитовидной железы человека.