

БИОХИМИЯ

© АЛЬНИКИН А.Б., 2024

Альникин А.Б.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ПРОГНОЗА РЕЦИДИВА РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ОПЕРАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», 344022, Ростов-на-Дону, Россия

Целью работы явилось изучение динамики циркулирующих миРНК после операции для построения модели прогноза рецидивирования фолликулярной карциномы щитовидной железы (ЩЖ). В исследование включены 133 больных фолликулярной карциномой ЩЖ. Экспрессию миРНК в опухолевой ткани операционных образцов и в сыворотке крови определяли методом ПЦР в режиме реального времени. Проведён корреляционный анализ между значениями экспрессии миРНК-146b, -222, -221 в опухолевой ткани щитовидной железы с уровнями экспрессии миРНК, полученными в сыворотке крови. Показатели экспрессии циркулирующих миРНК в динамике ретроспективно сопоставлены с фактом рецидивирования злокачественного заболевания. Методом ROC анализа определён разделительный уровень относительного значения амплитуды изменения экспрессии циркулирующих миРНК для прогнозирования рецидива заболевания. Выявлена прямая статистически значимая связь между экспрессионной активностью в опухолевых клетках и сыворотке крови для миРНК-146b, миРНК-222 и обратная корреляционная зависимость для миРНК-221. Установлено, что повышение экспрессионной активности циркулирующей миРНК-221 через 6 месяцев после операции с превышением логарифмированного значения кратности изменения экспрессии разделительной точки 0,67, позволяло сделать вывод о высоком риске рецидивирования фолликулярного рака ЩЖ в течение двух лет после тиреоидэктомии. Диагностическая чувствительность разработанного прогностического правила составила 86,7%, специфичность 93,2%. Оценка экспрессионной активности циркулирующей миРНК-221 после операции у больных раком ЩЖ информативна в отношении прогноза рецидива заболевания.

Ключевые слова: рак щитовидной железы; молекулярная диагностика; микроРНК; рецидив; прогноз

Для цитирования: Альникин А.Б. Молекулярные маркеры прогноза рецидива рака щитовидной железы после оперативного лечения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (5): 178-183.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-5-178-183>

Для корреспонденции: Альникин Александр Борисович, канд. мед. наук, доцент, главный врач клиники; e-mail: alnikin_ab@rostgmu.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.02.2024
Принята к печати 20.02.2024
Опубликовано 25.04.2024

Alnikin A.B.

MOLECULAR MARKERS FOR PREDICTION OF THYROID CANCER RECURRENCE AFTER SURGERY TREATMENT

Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 344002, Rostov-on-Don, Russia

The aim of the work was to study the dynamics of circulating miRNAs after surgery to build a model for predicting the recurrence of follicular thyroid carcinoma (TC). The study included 133 patients with follicular TC. The expression of miRNAs in tumor tissue of surgical samples and in blood serum was determined by real-time PCR. A correlation analysis was carried out between the expression values of miRNA-146b, -222, -221 in thyroid tumor tissue with the expression levels of miRNA obtained in blood serum. The expression of circulating miRNAs over time was retrospectively compared with the fact of recurrence of the malignant disease. The ROC analysis method was used to determine the separation level of the relative value of the amplitude of changes in the expression of circulating miRNAs to predict disease relapse. A direct statistically significant relationship was revealed between the expression activity in tumor cells and blood serum for miRNA-146b, miRNA-222 and an inverse correlation for miRNA-221. It was established that the increase in the expression activity of circulating miRNA-221 6 months after surgery exceeded the logarithmic fold value changes in the expression of the dividing point 0,67, allowed us to conclude a high risk of recurrence of follicular thyroid cancer within two years after thyroidectomy. The diagnostic sensitivity of the developed prognostic rule was 86,7%, and the specificity was 93,2%. Thus, assessment of the expression activity of circulating miRNA-221 after surgery in patients with thyroid cancer is informative regarding the prognosis of disease relapse.

Key words: thyroid cancer; molecular diagnostics; microRNA; relapse; prognosis

For citation: Alnikin A.B. Molecular markers for prediction of thyroid cancer recurrence after surgery treatment. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (5): 178-183 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-5-178-183>

For correspondence: *Alnikin A.B.*, candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Chief physician of the clinic; e-mail: alnikin_ab@rostgmu.ru

Information about author:

Alnikin A.B., <https://orcid.org/0000-0002-6853-766X>.

Acknowledgments. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interest. *The author declare no conflicts of interests.*

Received 02.02.2024

Accepted 20.02.2024

Published 25.04.2024

Введение. МикроРНК (миРНК) представляют собой небольшие некодирующие РНК и являются мощными посттранскрипционными регуляторами экспрессии генов и соответствующих белков [1]. Одна миРНК может модулировать сотни таргентных матричных РНК (мРНК) [2]. Опосредованная регуляция генов и синтез белков посредством миРНК при раке щитовидной железы (ЩЖ) известна для широкого спектра молекул [3]. Для миРНК-146, -222, -221 доказано их участие в модуляции сигнальных путей и биологических процессов, связанных с развитием рака щитовидной железы различных гистологических типов [4]. Функциональная активность миРНК-146, -222, -221 сопряжена с регуляцией синтеза молекул внеклеточного матрикса, интерлейкинов и рецепторов к ним, что может способствовать более агрессивному поведению и прогрессированию опухоли [4]. Биоинформационный анализ с использованием баз данных Атласа генома рака показал, что опосредованная посредством миРНК аберрантная экспрессия генов, отвечающих за синтез компонентов внеклеточного матрикса и цитокинов, часто встречается при дифференцированных раках ЩЖ и связана с агрессивным поведением опухоли и снижением общей выживаемости [5]. миРНК находятся как внутриклеточно, так и внеклеточно, попадая в кровь, слюну, мочу, спинномозговую жидкость, суставную жидкость и др. [6,7]. Дифференциальная экспрессия миРНК опухолевыми клетками - давно установленный факт, который используется в диагностических целях в онкологии [8-10]. Создано несколько доступных коммерческих диагностических панелей, таких как классификатор экспрессии генов Afirma (Gene Expression Classifier, GEC), ThyGenX TEST, ThyraMIR, ThyroSeq TEST. Эксперты Американской и Европейской тиреоидологических ассоциаций, Российского общества эндокринологов продолжают обсуждение, следует ли использовать молекулярные тесты в обычной клинической практике.

Для циркулирующих миРНК прогностический потенциал при раке ЩЖ полностью не раскрыт. После проведения радикальных операций ткань опухоли удаляется и мониторировать экспрессию миРНК опухолевыми клетками не представляется возможным. Циркулирующие миРНК остаются доступными для исследования, в связи с чем оценка динамики уровня этих маркеров после операции может оказаться ценной для построения прогноза течения рака ЩЖ, что и объясняет научный интерес к тематике. В связи с вышеизложенным, целью работы явилось изучить динамику циркулирующих миРНК после операции для построения модели прогноза рецидивирования фолликулярной

карциномы щитовидной железы.

Материал и методы. В исследование включены 133 больных фолликулярной карциномой ЩЖ: 39 (29,3%) мужчин и 94 (70,7%) женщин. Средний возраст пациентов составил $44,5 \pm 2,4$ лет.

В зависимости от размера опухоли (категория Т) пациенты распределились следующим образом: Т1b – у 7 (5,3%), Т2 – у 44 (33,1%), Т3a – у 49 (36,8%), Т3b – у 33 (24,8%) больных.

Критериями включения пациентов в исследование явились: верифицированная фолликулярная карцинома ЩЖ по итогам гистологического исследования операционных образцов опухоли.

Критерии исключения: противоопухолевое лечение до операции, онкологические заболевания иной локализации.

Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие для участия в исследовании. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России. Соблюдались этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

После радикальной операции по результатам гистологического исследования операционных образцов опухолевой ткани ЩЖ у 133 больных выявлена фолликулярная карцинома.

После операции за два года наблюдения у 15 (11,3%) больных выявлены рецидивы рака ЩЖ. При этом отмечены местные рецидивы, поражение шейных и подключичных лимфатических узлов, отдалённые метастазы в лёгкие.

Методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) экспрессию миРНК определяли в опухолевых клетках операционных образцов однократно, циркулирующие миРНК в сыворотке крови до операции, в конце госпитального этапа и через 6 месяцев после операции. Тотальную миРНК выделяли с помощью набора реагентов PureLink RNA Mini Kit (Thermo Scientific, США). Общую концентрацию и оценку качества выделенной РНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). Путём обратной транскрипции получали кДНК, используя набор компании «Альгимед-Техно» (Беларусь). Оценка изменения экспрессии каждой миРНК в субстрате исследовалась методом dCt относительно референсной миРНК-7a (Let-7a) ($dCt = 2^{(Ct_{\text{миРНК-X}} - Ct_{\text{миРНК-7a}})}$).

Проведён корреляционный анализ между значениями

экспрессии миРНК-146b, -222, -221 в опухолевой ткани щитовидной железы с уровнями экспрессии миРНК, полученными в сыворотке крови. Показатели экспрессии циркулирующих миРНК в динамике ретроспективно сопоставлены с фактом рецидива злокачественного заболевания. При этом наибольшее внимание уделяли градиенту изменения экспрессии сывороточных миРНК в зависимости от рецидивирования в течение двух лет после операции: определяли амплитудные изменения экспрессии миРНК на различных этапах по отношению к исходному уровню, осуществляли логарифмическое преобразование кратности динамических изменений показателя.

Методом ROC анализа определён разделительный уровень относительного значения амплитуды изменения экспрессии циркулирующих миРНК для прогнози-

рования рецидива заболевания.

Статистический анализ результатов исследования осуществляли с помощью программы Statistica 12 (StatSoft, США).

Результаты и обсуждение. Исходно у пациентов с фолликулярной карциномой ЩЖ медиана экспрессии циркулирующей миРНК-146b была 1,41 с межквартильным диапазоном 1,10-1,53, миРНК-222-2,35 [1,44-2,93] и миРНК-221 0,20 [0,12-0,34] (табл. 1). В опухолевых клетках экспрессионная активность миРНК-146b, -222 и -221 была высокой (см. табл. 1). Установлена прямая статистически значимая связь между экспрессионной активностью в опухолевых клетках и сыворотке крови для миРНК-146b, миРНК-222 и обратная корреляционная зависимость для миРНК-221.

Таблица 1

Исходные уровни экспрессии миРНК (Ме [25-75]) в опухолевых клетках и сыворотке крови у больных фолликулярной карциномой ЩЖ (n=133)

Биологическая среда	миРНК-146b	миРНК- 222	миРНК- 221
Опухолевые клетки	9,56 [8,54-10,16]	15,07 [13,81-16,46]	7,35 [5,38-9,09]
Сыворотка крови	1,41 [1,10-1,53]	2,35 [1,44-2,93]	0,20 [0,12-0,34]
Коэффициент корреляции, <i>p</i>	0,64, <i>p</i> =0,005	0,72, <i>p</i> <0,001	-0,61, <i>p</i> =0,047

Примечание. *p* - уровень значимости коэффициента корреляции.

Установлена зависимость концентрации миРНК-146b, -222 и -221 в крови от уровня экспрессии молекулярных маркеров в опухолевой ткани.

В единичных исследованиях экспрессионную активность миРНК-146b и миРНК-222 начинают рассматривать с точки зрения формирования прогноза рака ЩЖ. Так, у 100 больных с папиллярной карциномой ЩЖ после радикальной операции установлена более высокая летальность при наличии исходной высокой экспрессии миРНК-146b в опухолевых клетках [11]. Авторы подчёркивают способность миРНК-146b усиливать миграцию и инвазивный потенциал опухолевых клеток. При этом уровень циркулирующей миРНК-146b в динамике изучен не был. В других работах уста-

новлено, что риск рецидива выше у пациентов с папиллярной карциномой ЩЖ при усилении экспрессионной активности миРНК-146b-5p, -222-3p и снижении уровня миРНК-1179 и -7-2-3p опять же в опухолевых клетках [12,13]. При мониторинговании циркулирующей миРНК после операции могут открыться новые возможности в формировании прогноза течения онкологического заболевания.

Мониторинг концентрации любого маркера предполагает сравнение с его исходным уровнем. После тиреоидэктомии в конце госпитального периода у всех пациентов уровень циркулирующих миРНК в крови снизился (табл. 2), что подчёркивает дифференциальную экспрессию молекулярных маркеров в опухолевых клетках.

Таблица 2

Изменение экспрессии миРНК-146b, -222, -221 в сыворотке крови у пациентов фолликулярной карциномой ЩЖ (n=133) после операции (Ме [25-75])

Этап	миРНК-146b	миРНК- 222	миРНК- 221
Исходно	1,41 [1,10-1,53]	2,35 [1,44-2,93]	0,20 [0,12-0,34]
После операции	0,27 [0,19-0,44]	0,18 [0,12-0,30]	0,04 [0,01-0,07]
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001

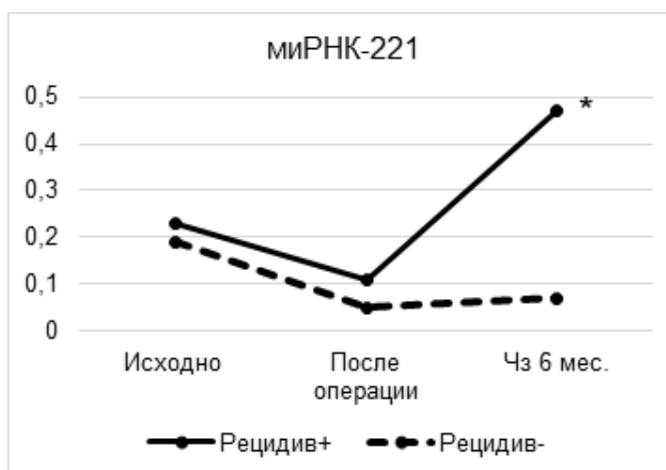
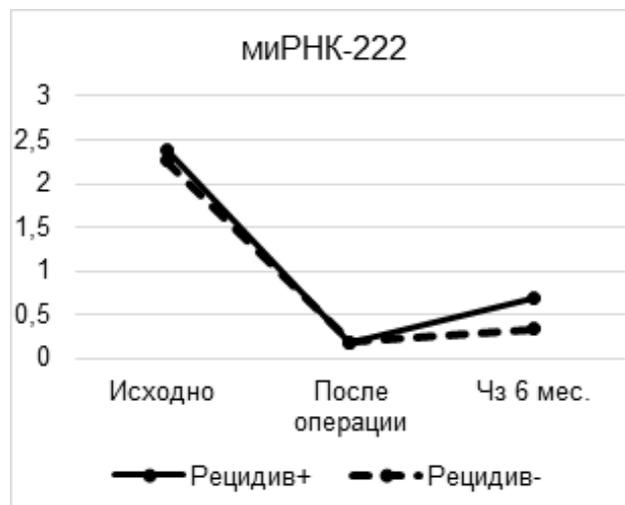
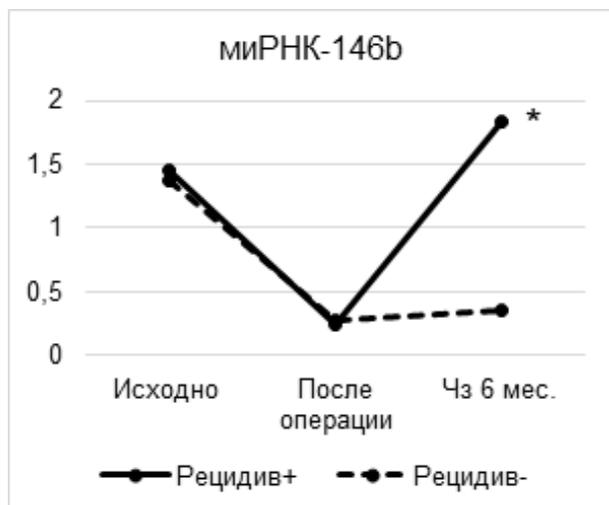
Согласно современным клиническим рекомендациям опухолевое поражение регионарных лимфатических узлов в первые три месяца после операции, отдалённые метастазы в первые шесть месяцев после операции рассматриваются как первично диагностированные [14]. В связи с данным обстоятельством, исходный

уровень миРНК в крови до операции не анализировали в зависимости от поражения лимфоузлов в этот период, а отдалённые метастазы у пациентов отсутствовали. Выявление опухолевого поражения в лимфоузлах и отдалённых органах после 6 месяцев приравнивается к рецидиву болезни [14]. В связи с этим, у обследуе-

мых пациентов экспрессию миРНК-146b, миРНК-222 и миРНК-221 в крови оценивали через 6 месяцев и рассчитывали амплитудные характеристики изменения изучаемых показателей в динамике.

Через 6 месяцев после операции у пациентов в общем по группе уровни экспрессии всех трёх миРНК оставались низкими по сравнению с исходными параметрами. Исходно и через 6 месяцев после операции экспрессионная активность миРНК-146b соответствовала

1,41 [1,10-1,53] и 0,39 [0,25-0,48], для миРНК-222-2,35 [1,44-2,93] и 0,43 [0,31-0,55] и для миРНК-221 - 0,20 [0,12-0,34] и 0,10 [0,08-0,14]. Динамика экспрессии изучаемых миРНК различная у пациентов с рецидивами рака ЩЖ и при их отсутствии ($p < 0,05$). Рецидивы заболевания диагностировали в течение 24 месяцев после операции, динамику маркёров ретроспективно анализировали в двух подгруппах в зависимости от течения онкологического заболевания (см. рисунок).



Динамика экспрессии миРНК-146b, -222 и -221 у больных фолликулярной карциномой ЩЖ с учётом рецидива заболевания. * - статистически значимые различия показателя между подгруппами.

Методом ROC анализа найден статистически значимый разделительный уровень относительного показателя амплитуды изменения экспрессии по отношению к дооперационной величине только для миРНК-221 (табл. 3).

У больных фолликулярной карциномой ЩЖ при повышении экспрессии миРНК-221 относительно исходного уровня через 6 месяцев после радикальной операции необходимо определить кратность изменения путём деления одной величины на другую $E_{6мес}/E_{исх}$. Затем надо осуществить логарифмическое преобразование, используя функцию логарифма по основанию 2.

Оценка относительного изменения экспрессии миРНК в крови после операции по сравнению с исходной величиной, выраженная в процентном соотношении, ненадёжна, поскольку зависит от исходного абсолютного значения показателя. В связи с этим, кратность изменения экспрессии маркёров подвергается стандартной методике преобразования. При превышении $\log_2(E_{6мес}/E_{исх})$ величины 0,67 с диагностической чувствительностью 86,7% и специфичностью 93,2% формируется заключение о высоком риске рецидивирования фолликулярного рака ЩЖ в течение двух лет после опера-

ции ($p < 0,001$). Сроки развития рецидива заболевания рака ЩЖ за двухлетний срок наблюдения варьировали в диапазоне от 11 месяцев до 21 месяца после операции. Поскольку повышение экспрессии миРНК-221 выявлено уже через 6 месяцев после тиреоидэктомии,

то можно говорить о высоком прогностическом потенциале мониторинга экспрессионной активности циркулирующей миРНК-221 после операции для оценки риска прогрессирования злокачественного заболевания в дальнейшем.

Таблица 3

Прогностическая значимость изменения экспрессии циркулирующих миРНК-146b, -222 и -221 у больных фолликулярной карциномой ЩЖ для оценки риска рецидива заболевания

Показатель	миРНК-146b	миРНК-222	миРНК-221
Амплитуда изменения экспрессии, $\Delta\%$ (Ме [25-75])	25,6 [19,0-30,6]	-71,5 [-78,9 -	104,3 [88,5-111,7]
$\log_2(E_{\text{бмсс}}/E_{\text{исх}})$	0,33	-1,81	1,03
cut-off $\log_2(E_{\text{бмсс}}/E_{\text{исх}})$	-	-	0,67
Диагностическая чувствительность, %	-	-	86,7
Диагностическая специфичность, %	-	-	93,2
Диагностическая точность, %	-	-	92,5
p	-	-	<0,001

Примечание. E – экспрессия, \log_2 – логарифмированное значение показателя по основанию 2, cut-off – дифференциальный разделительный уровень.

Заключение. Повышение экспрессионной активности циркулирующей миРНК-221 через 6 месяце после операции с превышением логарифмированного значения кратности изменения экспрессии разделительной точки 0,67 позволяет сделать вывод о высоком риске рецидива фолликулярного рака ЩЖ в течение двух лет после тиреоидэктомии. Диагностическая чувствительность разработанного прогностического правила составила 86,7%, специфичность 93,2%. Определение циркулирующей миРНК-221 после оперативного лечения фолликулярной карциномы ЩЖ имеет прогностическую информативность для оценки риска развития рецидива заболевания.

ская лабораторная диагностика. 2023; 68(1): 56-64.

- Кушлинский Н.Е., Уткин Д.О., Логинов В.И., Филиппова Е.А., Бурденный А.М., Кушлинский Д.Н. и др. Клиническая значимость метилирования группы генов микроРНК у больных раком яичников. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(5): 321-7.
- Миронова О.Ю., Бердышева М.В., Елфимова Е.М. МикроРНК: взгляд клинициста на состояние проблемы. Часть 1. История вопроса. *Евразийский кардиологический журнал*. 2023; (1): 100-7.
- Бельцевич Д.Г., Мудунов А.М., Ванушко В.Э., Румянцев П.О., Мельниченко Г.А., Кузнецов Н.С. и др. Дифференцированный рак щитовидной железы. *Современная онкология*. 2020; 22(4): 30-44.

REFERENCES

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 1, 4, 7, 11-13 СМ. REFERENCES)

- Воропаева Е.Н., Пospelova Т.И., Нестерец А.М., Максимов В.Н. Связь микро-РНК кластера miR-143/145 с онкогенезом: тканевой и клеточный контекст. *Сибирский онкологический журнал*. 2023; 22(3): 134-43.
- Аметов А.С., Дэшоу Т.И., Позднякова Н.В., Чемякова А.Р., Филатова Г.А. Генетические маркеры в диагностике рака щитовидной железы. *Эндокринология: новости, мнения, обучение*. 2018; 7(1): 42-9.
- Михайлова А.А., Шестаков А.В., Чубакова К.А., Колоколова Е.В., Елисеев В.Ю., Костяева М.Я. и др. Современные концепции молекулярного патогенеза рака щитовидной железы. *Успехи молекулярной онкологии*. 2021; 8(2): 8-22.
- Гареев И.Ф., Бейлерли О.А. Циркулирующие микроРНК как биомаркеры: какие перспективы? *Профилактическая медицина*. 2018; 21(6): 142-50.
- Брага Э.А., Пронина И.В., Филиппова Е.А., Бурденный А.М., Лукина С.С., Логинов В.И. и др. Функциональная и клиническая значимость метилирования и экспрессии группы генов микроРНК в опухолях больных метастатическим раком яичников. *Клиниче-*

- Celano M., Rosignolo F., Maggiano V., Pecce V, Iannone M, Russo D. et al. MicroRNAs as biomarkers in thyroid carcinoma. *Int. J. Genomics*. 2017; 2017: 6496570. DOI: 10.1155/2017/6496570.
- Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Nesterets A.M., Maksimov V.N. Relationship between cluster miR-143/145 micro-RNAs with oncogenesis: tissue and cellular context. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal*. 2023; 22(3): 134-43. DOI: 10.21294/1814-4861-2023-22-3-134-143. (in Russian)
- Ametov A.S., Depui T.I., Pozdnyakova N.V., Chemekova A.R., Filatova G.A. Genetic markers in the diagnosis of thyroid cancer. *Endokrinologiya: novosti, mneniya, obuchenie*. 2018; 7 (1): 42-9. DOI: 10.24411/2304-9529-2018-00004. (in Russian)
- Geraldo M., Kimura E. Integrated analysis of thyroid cancer public datasets reveals role of post-transcriptional regulation on tumor progression by targeting of immune system mediators. *PLoS One*. 2015; 10(11): e0141726. DOI: 10.1371/journal.pone.0141726.
- Mikhaylova A.A., Shestakov A.V., Chubakova K.A., Kolokolova E.V., Eliseev V.Yu., Kostyaeva M.Ya. et al. Modern concepts of molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2021; 8(2): 8-22. DOI: 10.17650/2313-805X2021-8-2-8-22. (in Russian)
- Gareev I.F., Beylerli O.A. Circulating microRNAs as biomarkers: what are perspectives? *Profilakticheskaya Meditsina*. 2018; 21(6): 142-50. DOI: 10.17116/profmed201821061142. (in Russian)
- Weber J., Baxter D., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J.

- et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* 2010; 56(11): 1733-41. DOI: 10.1373/clinchem.2010.147405.
8. Braga E.A., Pronina I.V., Filippova E.A., Burdenny A.M., Lukina S.S., Loginov V.I. et al. Clinical significance of methylation of a group of miRNA genes in patients with ovarian cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2023; 68(1):56-64. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-1-56-64. (in Russian)
 9. Kushlinskii N.E., Utkin D.O., Loginov V.I., Filippova E.A., Burdonyy A.M. et al. Clinical significance of methylation of a group of miRNA genes in ovarian cancer patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2020; 65(5): 321-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-5-321-327. (in Russian)
 10. Mironova O. Yu., Berdysheva M.V., Elfimova E.M. MicroRNA: a clinician's view of the state of the problem. Part 1. History of the issue. *Evrasiyskiy kardiologicheskiy zhurnal.* 2023; (1): 100-7. DOI: 10.38109/2225-1685-2023-1-100-107. (in Russian)
 11. Chou C., Yang K., Chou F., Huang C.C., Lan Y.W., Lee Y.F. et al. Prognostic implications of MiR-146b expression and its functional role in papillary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013; 98(2): E196-205. DOI: 10.1210/jc.2012-2666.
 12. Rosignolo F., Sponziello M., Giacomelli L., Russo D., Pecce V., Bifonfi M. et al. Identification of thyroid-associated serum microRNA profiles and their potential use in thyroid cancer follow-up. *J. Endocr. Soc.* 2017; 1(1):3-13. DOI: 10.1210/js.2016-1032.
 13. Rosignolo F., Memeo L., Monzani F., Colarossi C., Pecce V., Verrienti A. et al. MicroRNA-based molecular classification of papillary thyroid carcinoma. *Int. J. Oncol.* 2017; 50(5):1767-77. DOI: 10.3892/ijo.2017.3960.
 14. Bel'tsevich D.G., Mudunov A.M., Vanushko V.E., Rummyantsev P.O., Mel'nichenko G.A., Kuznetsov N.S. et al. Differentiated thyroid cancer. Clinical recommendations. *Sovremennaya onkologiya.* 2020; 22(4): 30-44. DOI: 10.26442/18151434.2020.4.200507. (in Russian)