

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

**Лехнов Евгений Анатольевич**

---

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД  
об основных результатах выполненной  
научно-квалификационной работы**

**МикроРНК в составе микрочастиц мочи как маркер  
неинвазивной диагностики рака предстательной железы**

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.01.03 Биохимия

Новосибирск – 2018

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность

К середине 90-х годов в связи с увеличением средней продолжительности жизни и снижением смертности населения от других конкурирующих причин, рак предстательной железы (РПЖ) во многих странах мира стал выходить в лидеры по встречаемости злокачественных новообразований у мужчин. Так, в России РПЖ в структуре онкологических заболеваний в 2015 г. переместился с 4 на 2 место и составил уже 14% от всех злокачественных новообразований, встречающихся у мужчин. РПЖ в целом имеет тенденцию к росту заболеваемости во всем мире и находится на втором месте по заболеваемости среди всех онкологических заболеваний у мужчин. В развитых странах (US), согласно American Cancer Society 2017, показатель 5-летней выживаемости больных с локальными формами РПЖ составляет почти 100%, однако при распространенных формах этот показатель снижается до 29%. Причинами поздней диагностики РПЖ являются длительное бессимптомное течение заболевания, несовершенство методов первичной диагностики РПЖ, в том числе асимптомных микроскопических очагов, сложность дифференциальной диагностики очагов РПЖ и очагов доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ), несвоевременное оказание медицинской помощи (в том числе и по причине недостаточного уровня образованности населения или по экономическим причинам), недостаточное техническое оснащение медицинских учреждений, а также несовершенство клинично-инструментальной базы. Несмотря на то, что на сегодняшний день разработаны различные тесты для диагностики и прогноза РПЖ, широкое их внедрение в клиническую практику ограничено в виду недостаточной их предикторной способности, инвазивности процедуры или вследствие дороговизны теста. Кроме того, такие клинические параметры, как простатспецифический антиген (ПСА), методы визуальной (лучевой) диагностики и гистопатологический индекс Глисона стратифицируют риски РПЖ, но не позволяют оценить прогноз на индивидуальном уровне у конкретного пациента, что в дальнейшем отражается на качестве лечения. Таким образом, в онкоурологии существует острая необходимость в эффективных маркерах РПЖ для решения различных клинических задач, включая эффективную диагностику ранних стадий РПЖ, оптимизацию терапии и мониторинг процесса. То есть требуются маркеры, которые позволили бы надежно и однозначно детектировать опухолевый процесс на доклинических стадиях (при отсутствии клинических проявлений), достоверно дифференцировать очаги РПЖ от других объемных образований предстательной железы (ПЖ), а также контролировать эффективность процесса лечения.

Так называемая “жидкая биопсия” является новым подходом, основанным на исследовании внеклеточных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях человека, таких, как кровь или моча, включая ДНК и РНК. В крови и других биологических жидкостях были обнаружены и ассоциированные с опухолями микроРНК, которые, как оказалось, являются наиболее представленным классом внеклеточных РНК внеклеточных жидкостей. Эти молекулы отличаются высокой стабильностью во внеклеточных средах которая обеспечивается их способностью формировать комплексы с белками, липопротеинами или упаковываться во внеклеточные везикулы. Известно, что некодирующие РНК (включая и микроРНК) составляют более половины транскриптома и более 80% циркулирующих РНК, что позволяет уверенно детектировать эти молекулы современными методами анализа и делает их удобными диагностическими мишенями. Более того, микроРНК играют важную роль в регуляции процессов метаболизма, эмбрионального развития, пролиферации, дифференцировки, старения, иммунном и стрессовом ответах, геномном импринтинге, а также непосредственно участвуют в регуляции основных путей сигнальной трансдукции и могут выступать в качестве драйверов развития онкологического процесса. Известно, что злокачественная трансформация клеток и прогрессия онкологического процесса связаны с изменением профиля экспрессии микроРНК по сравнению с нормальными клетками. Т.е. уровень экспрессии отдельных микроРНК может либо повышаться, либо снижаться. Поэтому анализ и выявление гипо- или гиперэкспрессированных микроРНК является перспективным не только для ранней диагностики РПЖ, а также для дифференциальной диагностики объемных образований предстательной железы с выявлением злокачественных и агрессивных форм.

МикроРНК, ассоциированные с разными гистотипами опухолей или стадиями заболевания, могут выступать в роли молекулярных биомаркеров, которые могут быть использованы для диагностики и прогноза течения заболевания, а также быть потенциальными терапевтическими мишенями.

Интерес к циркулирующим микроРНК как потенциальным биомаркерам для целей ранней диагностики заболеваний человека постоянно растёт; по данным Pub Med наблюдается стойкий рост числа публикаций по теме внеклеточных микроРНК при РПЖ. Однако, на сегодняшний день, на рынке нет одобренных для диагностики онкологических заболеваний клинических тестов основанных на анализе внеклеточных микроРНК. При этом в последнее время стало очевидно, что поиск одного-двух микроРНК маркеров РПЖ не позволит решить хотя бы части диагностических задач в силу гетерогенности

заболевания и сопутствующих процессов, и такая задача может быть решена только при помощи использования панели микроРНК-маркеров.

Кроме того, решение некоторых методологических проблем, в частности эффективного и производительного выделения микроРНК из комплексов с биополимерами внеклеточных сред, выявление оптимальных источников диагностических микроРНК (упакованных в комплексы с биополимерами или в микрочастицы) так же ждет своего решения.

В связи с этим поиск микроРНК, связанных с развитием РПЖ, анализ их представленности у больных с разной клинической манифестацией РПЖ представляет большой научный и практический интерес, поскольку не только позволит новые данные о развитии процессов канцерогенеза, выявить ключевые регуляторные молекулы этого процесса, но и выявить потенциальные маркеры злокачественных новообразований ПЖ, которые могут быть использованы в диагностике РПЖ.

**Целью работы** являлось изучение внеклеточных микроРНК мочи у пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и больных раком предстательной железы с целью выявления маркеров РПЖ.

**Научная новизна работы.** Разработан и оптимизирован оригинальный протокол выделения микро-РНК из мочи и плазмы здоровых доноров – аналог miRCURY™ RNA Isolation Kit фирмы Qiagen A/S, Denmark. Протокол отличается простотой, скоростью исполнения, отсутствием опасных реагентов и отличается высокой эффективностью выделения микроРНК из различных биологических жидкостей организма (кровь, моча) по сравнению с традиционными методами выделения и коммерческим аналогом. Показано, опухольспецифические микроРНК могут быть обнаружены как во фракциях супернатанта мочи после 17 тыс. g, так и во внеклеточных везикулах (ВВ) мочи. Выбраны и охарактеризованы по нескольким критериям наилучшие комбинации микроРНК обеих фракций мочи, позволяющие отличить группы здоровых доноров, больных ДППЖ и больных РПЖ между собой, а также определена диагностическая значимость таких пар микроРНК. Предложена панель микроРНК для диагностики РПЖ во фракции супернатанта мочи (hsa.miR-107-hsa.miR-26b-5p и hsa.miR-375-3p-hsa.miR-26b-5p), а также панель микроРНК для диагностики пациентов с аденомами ПЖ во фракции ВВ (hsa.miR-31.5p-hsa.miR-16-5p, hsa.miR-31.5p-hsa.miR-200b, hsa.miR.31.5p-hsa.miR.30e.3p и hsa.miR-31.5p- hsa.miR-660.5p).

## **Теоретическая и практическая значимость.**

Разработан способ высокоэффективного выделения микроРНК, позволяющий не только выделять микроРНК с высокой эффективностью, но и минимизировать количество ингибиторов ПЦР в полученных препаратах микроРНК. Обнаружено достоверное изменение экспрессии микроРНК во фракциях мочи у больных с ДГПЖ и РПЖ. Обнаружены ассоциированные с опухолью микроРНК, выявлены процессы, регулируемые этими микроРНК. Выполнен биоинформационный анализ данных относительно сравнительной экспрессии микроРНК в исследуемых группах пациентов и обнаружены микроРНК, которые могут быть использованы в диагностических и прогностических целях. Предложена панель микроРНК-марксов РПЖ и диагностический алгоритм их использования в качестве диагностикума РПЖ.

## **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Разработан и оптимизирован эффективный протокол выделения микроРНК из плазмы крови и мочи здоровых доноров, превосходящий аналоги.
2. В результате сравнительного анализа профиля экспрессии микроРНК во фракциях супернатанта мочи после 17 тыс. г и ВВ мочи здоровых доноров, пациентов с ДГПЖ и больных РПЖ было выявлено пары микроРНК, позволяющие отличить три группы доноров между собой.
3. Анализ чувствительности и специфичности комбинаций пар микроРНК показал, что наибольшей диагностической эффективностью обладают пары hsa.miR-107-hsa.miR-26b-5p (AUC 0.93, 80% чувствительность и 100% специфичность), hsa.miR-375-3p-hsa.miR-26b-5p (AUC 0.83, 70% чувствительность и 100% специфичность) в группе сравнения здоровые - больные РПЖ во фракции супернатанта мочи, а так же hsa.miR-31.5p-hsa.miR-16-5p (AUC 0.89, 80% чувствительность и 100% специфичность), hsa.miR-31.5p-hsa.miR-200b (AUC 0.88, 70% чувствительность и 100% специфичность), hsa.miR.31.5p-hsa.miR.30e.3p (AUC 0.88, 80% чувствительность и 100% специфичность) и hsa.miR-31.5p- hsa.miR-660.5p (AUC 0.84, 70% чувствительность и 100% специфичность) в группе здоровые доноры – пациенты с ДГПЖ во фракции ВВ мочи.
4. Предложена панель микроРНК для диагностики РПЖ во фракции супернатанта мочи (hsa.miR-107-hsa.miR-26b-5p и hsa.miR-375-3p-hsa.miR-26b-5p), а также панель микроРНК для диагностики пациентов с аденомами ПЖ во фракции ВВ (hsa.miR-

31.5p-hsa.miR-16-5p, hsa.miR-31.5p-hsa.miR-200b, hsa.miR.31.5p-hsa.miR.30e.3p и hsa.miR-31.5p- hsa.miR-660.5p).

**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертации опубликовано 5 статей и 14 тезисов. Результаты работы были представлены на конференциях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Работа изложена на 84 страницах машинописного текста (12 шрифт, двойной интервал), содержит 5 рисунков и таблиц. Библиография включает 167 литературных источников.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Подбор оптимальных условий выделения микроРНК из плазмы крови и мочи здоровых доноров**

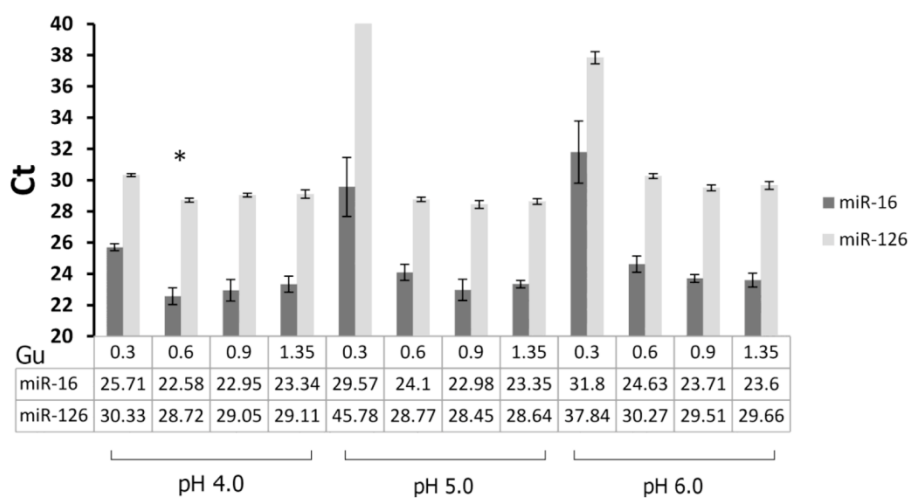
Более 50 лет назад было показано, что в низких (0,04 М) концентрации октановая кислота (ОсА) (и нескольких других жирных кислот) формирует нерастворимые комплексы с большинством белков плазмы крови, включая  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулины, а в более высоких концентрациях - с альбуминами и глобулинами. Позднее ОсА была успешно использована для выделения иммуноглобулинов из плазмы крови.

Так как хаотропные эффекты только одного гуанидина изотиоцианата (Gu) неспособны в полной мере разрушить комплексы микроРНК с белками и другими биополимерами [24], требуется добавление соединений, препятствующих гидрофобным взаимодействиям, для высвобождения микроРНК из комплексов. Из-за сродства ОсА к гидрофобным остаткам (способность образовывать / разрушать гидрофобные взаимодействия) он способен эффективно связывать / разрушать биологические мембраны и комплексы липопротеинов. Таким образом, мы предлагаем использовать комбинацию двух денатурирующих / осаждающих агентов - Gu и ОсА. Осаждение белков или разрушение циркулирующих комплексов микроРНК и микрочастиц, покрытых оболочкой, в присутствии как ОсА, так и Gu трудно предсказать. Поэтому был выбран широкий диапазон условий, который позволил бы решить эту проблему.

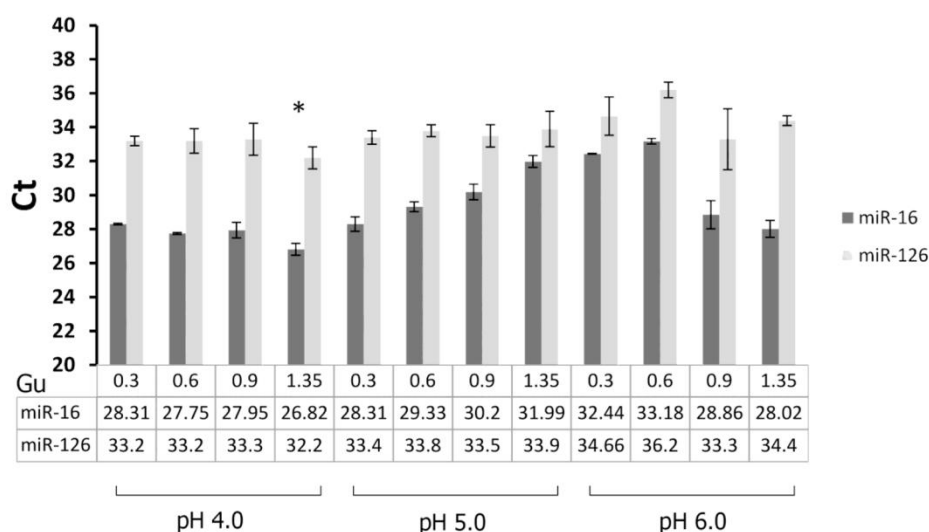
Чтобы оценить эффективность протокола, различные концентрации Gu и ОсА добавляли к 200 мкл плазмы крови или 400 мкл мочи, полученной от здоровых доноров. Остаточное количество белка в супернатанте определяли с использованием спектрофотометра Genesys 10 UV (Thermo Scientific, США) на 260 и 280 нм. Перед

проведением измерений образцы разбавляли в 10 раз 0,02 М Tris / HCl и 0,15 М NaCl, pH 7,5 (TBS). Испытывалась зависимость эффективности осаждения белка от pH и пропорций обоих химических агентов, а также выход микроРНК при разных значениях pH и концентрациях Gu и Oса.

Концентрации miR-16 и miR-126 в супернатантах измеряли с помощью количественной RT-PCR. Значения Ct микроРНК и значения поглощения учитывались для оптимальных условий выделения микроРНК из плазмы крови и мочи.



**Рисунок 1:** Зависимость выхода микроРНК от концентрации Gu и pH. Образцы плазмы крови 10 здоровых доноров были объединены и использовались для всех выделений. На графике показано среднее Ct и стандартное отклонение (Ct SD) для конечной концентрации Oса на 0,5%. Звездочка (\*) указывает на оптимальные условия выделения микроРНК.



**Рисунок 2:** Эффективность выделения микроРНК в зависимости от концентрации Gu и pH. Образцы мочи 10 здоровых доноров объединяли и использовали для всех выделений. На графике показано среднее Ct и стандартное отклонение (Ct SD) при использовании 1,5% Оса. Звездочка (\*) указывает на оптимальные условия выделения микроРНК.

Данные, представленные на рисунке 1, ясно показывают, что выделение микроРНК из плазмы крови наиболее эффективно при pH 4,0 и в присутствии 0,6 М Gu и 0,5% Оса. Когда 0,3 М Gu использовался при том же pH и концентрации Оса, супернатант содержал меньше белка, причем значительная часть микроРНК предположительно соосаждалась с осадком. Напротив, при более высоких концентрациях Gu белки осаждались Оса менее эффективно и, таким образом, выход микроРНК снижался. Эффективность экстракции микроРНК была близка к оптимальной при 0,9 М Gu, 0,5% Оса и pH 5,0, однако воспроизводимость была низкой и расход реагентов было значительно выше. Стоит отметить, что в присутствии 0,6 М Gu и 0,5% Оса при pH 4,0 остаточное количество белка, обнаруженное в супернатантах плазмы крови, было минимальным (таблица 2).



**Таблица 2:** Эффективность выделения микроРНК при различных концентрациях ОсА и Гу и pH. Все выделения были выполнены из того же объема образца сыворотки здорового донора. В таблице показано среднее и стандартное отклонение (CtSD), полученные в трех независимых экспериментах.

sample number	guanidine, M	octanoic acid,%	pH	miR-16		miR-126		A, нм	
				Ct mean	Ct SD	Ct mean	Ct SD	260	280
1	0.3	0.5	4	25.71	0.22	30.33	0.1	0.664	0.267
2	0.6		4	22.58	0.54	28.72	0.13	0.807	0.29
3	0.9		4	22.95	0.69	29.05	0.12	0.96	0.351
4	1.35		4	23.34	0.515	29.11	0.27	1.464	0.67
5	0.3		5	29.57	1.8895	45.78	1.73	1.105	0.758
6	0.6		5	24.1	0.512	28.77	0.14	0.826	0.284
7	0.9		5	22.98	0.676	28.45	0.25	0.953	0.313
8	1.35		5	23.35	0.238	28.64	0.18	1.343	0.543
9	0.3		6	31.8	1.9945	37.84	0.39	1.597	1.398
10	0.6		6	24.63	0.514	30.27	0.16	0.906	0.362
11	0.9		6	23.71	0.2515	29.51	0.19	1.006	0.436
12	1.35		6	23.6	0.442	29.66	0.25	1.617	0.8
1	0.3	1.5	4	25.37	0.31	28.63	0.3	0.67	0.27
2	0.6		4	25.28	0.86	29.01	0.1	0.791	0.282
3	0.9		4	25.33	0.28	28.17	0.39	0.909	0.301
4	1.35		4	32.6	1.45	27.87	0.51	1.125	0.422
5	0.3		5	30.19	0.45	35.36	0.15	0.679	0.26
6	0.6		5	26.01	0.67	28.26	0.31	0.76	0.249
7	0.9		5	25.96	0.05	28.21	0.62	0.863	0.263
8	1.35		5	25.98	0.24	28.44	0.24	1.12	0.349
9	0.3		6	25.87	0.08	37.46	0.52	0.987	0.743
10	0.6		6	26.09	0.2	28.41	0.25	0.816	0.274

11	0.9		6	26.17	0.27	28.04	0.32	0.944	0.333
12	1.35		6	25.39	0.07	28.52	0.46	1.312	0.563
1	0.3	2.5	4	26.66	0.02	30.08	0.24	0.647	0.271
2	0.6		4	24.32	0.45	28.78	0.12	0.745	0.271
3	0.9		4	24.48	0.14	28.14	0.11	0.888	0.298
4	1.35		4	24.05	0.38	28.3	0.36	1.374	0.6
5	0.3		5	36.64	0.64	36.45	0.37	0.669	0.275
6	0.6		5	24.63	0.71	28.62	0.23	0.746	0.25
7	0.9		5	24.33	0.57	28.37	0.33	0.871	0.27
8	1.35		5	24.17	0.27	28.75	0.1	0.981	0.284
9	0.3		6	46.22	N/A	39.78	0.93	0.891	0.614
10	0.6		6	27.05	0.16	30.78	0.14	0.825	0.316
11	0.9		6	25.62	0.21	29.29	0.25	0.888	0.269
12	1.35		6	24.78	0.43	28.66	0.21	1.134	0.407

В отличие от выделения из плазмы крови, несколько наборов условий выделения микроРНК от мочи приводили к высоким выходам. Оптимальные условия были определены как 1,35 М Gu и 1,5% ОсА при рН 4,0 (**рисунок 2**). В этих условиях наибольшее количество белка удалялось из супернатанта мочи (**таблица 3**).

**Таблица 3:** эффективность выделения микроРНК при различных концентрациях ОсА и Gu и рН. Все выделения были сделаны из того же объема мочи образцов здоровых доноров. В таблице показано среднее и стандартное отклонение (CtSD), полученные в трех независимых экспериментах.

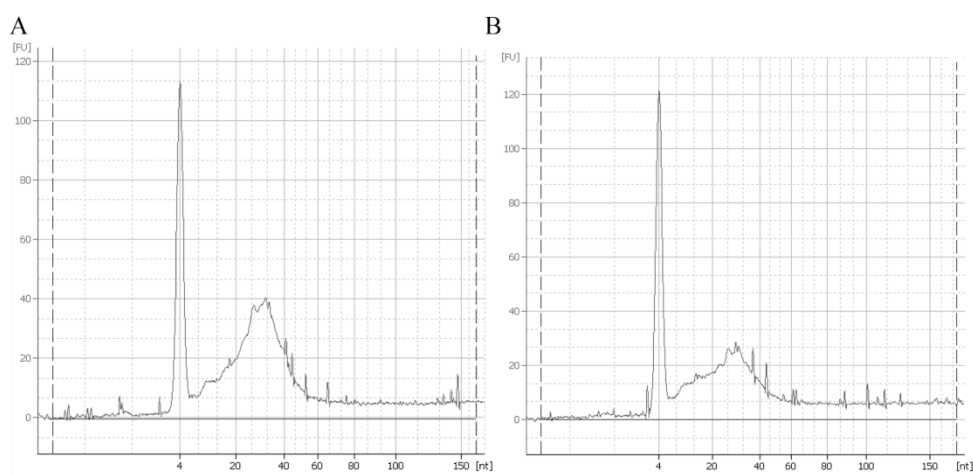
sample number	guanidine, M	octanoic acid,%	pH	miR-16		miR-126		A, нм	
				Ct mean	Ct SD	Ct mean	Ct SD	260	280
1	0.3	0.5	4	29.28	0.13	33.5	0.73	0.578	0.47
2	0.6		4	27.13	0.16	32.5	0.03	0.748	0.504
3	0.9		4	27.29	0.02	33.5	0.16	0.799	0.456

4	1.35		4	27.62	0.31	34.5	0.62	0.96	0.457
5	0.3		5	35.59	0.08	34.5	0.25	0.536	0.418
6	0.6		5	28.38	0.09	35.1	0.4	0.649	0.416
7	0.9		5	28.32	0.22	34.8	1.01	0.763	0.411
8	1.35		5	28.01	0.55	35	2.158	0.941	0.441
9	0.3		6	35.75	0.98	41.1	0.75	0.588	0.445
10	0.6		6	29.67	0.77	33.8	0.57	0.632	0.395
11	0.9		6	27.41	0.05	34.5	0.28	0.759	0.418
12	1.35		6	27.11	0.06	33.6	0.721	0.969	0.436
1	0.3	1.5	4	28.31	0.46	33.2	0.94	0.564	0.468
2	0.6		4	27.75	0.35	33.2	0.65	0.657	0.436
3	0.9		4	27.95	0.43	33.3	0.4	0.721	0.412
4	1.35		4	26.82	0.29	32.2	0.35	0.911	0.438
5	0.3		5	28.31	0.46	33.4	0.66	0.577	0.448
6	0.6		5	29.33	0.35	33.8	1.04	0.632	0.407
7	0.9		5	30.2	0.023	33.5	1.13	0.72	0.405
8	1.35		5	31.99	0.16	33.9	0.46	0.908	0.432
9	0.3		6	32.44	0.83	34.66	1.79	0.557	0.42
10	0.6		6	33.18	0.5	36.2	0.29	0.668	0.422
11	0.9		6	28.86	0.15	33.3	1.24	0.727	0.407
12	1.35		6	28.02	0.29	34.4	0.02	0.896	0.411
1	0.3	2.5	4	34.16	0.49	34.4	2.5	0.569	0.454
2	0.6		4	34.86	0.34	38.3	0.67	0.648	0.433
3	0.9		4	41.73	1.38	35.2	0.4	0.764	0.448
4	1.35		4	24.95	0.42	32.3	0.54	0.906	0.434
5	0.3		5	42.89	2.3	33.1	0.81	0.485	0.383
6	0.6		5	32.97	0.79	35.2	0.44	0.651	0.431
7	0.9		5	40.57	1.34	36	1.23	0.704	0.387
8	1.35		5	43.53	0.98	34	1.87	0.868	0.393

9	0.3	6	44.81	1.4	42.6	0.43	0.547	0.423
10	0.6	6	36.13	0.72	35.1	0.55	0.662	0.419
11	0.9	6	38.46	0.36	34.3	1.6	0.733	0.422
12	1.35	6	42.64	0.22	37.9	0.04	0.929	0.433

Эти экспериментальные данные показывают, что комбинация OsA и Gu может эффективно высвобождать микроРНК из комплексов, присутствующих в крови и моче, и обеспечивать эффективное осаждение избыточных биополимеров.

Для оценки размера и качества микроРНК, полученных с помощью протокола OsA, препараты РНК, выделенные из плазмы крови и мочи, анализировали с использованием Bioanalyzer Agilent 2100 (Small RNA Analysis Kits). Small RNA Analysis Kit позволяет детектировать малые РНК в интервале 6-150 нуклеотидов, включая область микроРНК (18-25 нуклеотидов). Электрогерограммы биоанализера показали присутствие коротких молекул РНК в образцах, полученных из плазмы крови и мочи (рис. 3). Протокол Gu / OsA позволяет выделять прежде всего короткую РНК (10-50 нт) из плазмы крови и мочи.



**Рисунок 3.** Анализ образцов микроРНК при помощи Bioanalyzer Agilent 2100, полученных из плазмы крови (А) и мочи (В). Электроперограммы показывают интенсивность флуоресценции и распределение по размеру нуклеотидов (nt) микроРНК. Пик при 4 нт является внутренним стандартом.

Таким образом, экспериментальные результаты показывают, что протокол Gu / OcA позволяет эффективно выделять микроРНК из биологических жидкостей.

Тем не менее, эффективность выделения микроРНК должна быть исследована в сравнительном исследовании. Таким образом, мы оценили эффективность экстракции микроРНК из крови и мочи с использованием трех протоколов: фенол-хлороформной экстракции, miRCURY RNA Isolation Kit -Biofluids (Exiqon) и протокол Gu / OcA.

**Сравнение эффективности выделения микроРНК из биологических жидкостей при помощи протокола с октановой кислотой, фенол-хлороформной экстракции и Exiqon miRCURY biofluids kit (Exiqon, Дания)**

МикроРНК была выделена от 10 образцов плазмы крови и 10 образцов мочи, полученных от разных здоровых доноров по протоколам, описанным в **Материалах и методах**. Все манипуляции с miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids проводились в соответствии с рекомендациями производителя. В каждом случае выделенные микроРНК соосаждались гликогеном. Для оценки эффективности протоколов мы измеряли уровни экспрессии двух miRNAs (miR-16 и miR-126) в качестве наиболее распространенных miRNAs в плазме крови.

**Таблица 4.** Сравнение эффективности выделения МикроРНК от плазмы крови и мочи различными протоколами.

		Gu/OcA		miRCURY Biofluids Kit		Кислая фенол-хлороформная экстракция	
		Ct Mean	Ct SD	Ct Mean	Ct SD	Ct Mean	Ct SD
Плазма крови	miR- 16	21.92	1.66	22.64	1.48	22.77	1.53
	miR- 126	30.66	0.64	32.17	1.43	31.18	0.27
Моча	miR- 16	29.8	1.93	36.95	1.03	31	1.03
	miR- 126	34.16	1.94	ND <sup>1</sup>	ND	34.72	1.14

<sup>1</sup> Не детектировано.

Значения порогового цикла (Ct) miR-16 и miR-126 сравнивались в образцах, выделенных различными протоколами из биожидкостей, полученных от одних и тех же доноров. Было показано, что протокол Gu / OcA превосходит все другие методы выделения микроРНК из плазмы крови. Протокол Gu / OcA был в 7,2 раз более эффективным, чем кислая фенол-хлороформная экстракция, и в 1,65 раза эффективнее, чем miRURY Biofluids при выделении miR-16. Эффективность выделения miR-126 методом Gu / OcA также превосходила фенол-хлороформную экстракцию и miRURY Biofluids (в 1,43- и 2,85 раз соответственно).

Протокол Gu / OcA также превосходил другие методы выделения микроРНК из образцов мочи. Он оказался в 2,29 раз более эффективным, чем кислая фенол-хлороформная экстракция по miR-16. В случае miR-126 кислая фенол-хлороформная экстракция превосходила Gu/OcA в 1,47 раз. Протокол Gu / OcA также значительно превзошел miRCURY biofluids kit при выделении микроРНК из мочи. Выход MiR-16 при выделении Gu / OcA был в 142 раза выше, чем miRCURY biofluids kit, тогда как уровень экспрессии miR-126 не был обнаружен (**таблица 4**). Таким образом, наши результаты показывают, что Gu / OcA превзошел другие методы выделения с высоким выходом микроРНК из плазмы и мочи (**таблица 4**).

В целом, по сравнению с кислой фенол-хлороформной экстракцией, метод miRURY Biofluids оказался более эффективным при выделении miR-16 из плазмы крови, но при выделении miR-16 из мочи был значительно хуже.

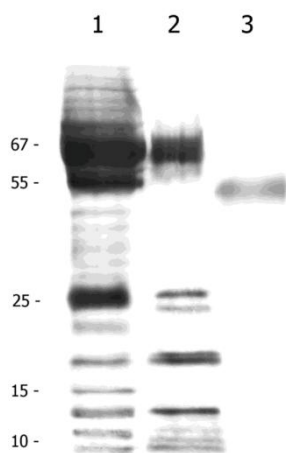
#### **Анализ белкового состава супернатантов плазмы крови, обработанные Gu / OcA и miRCURY biofluids kit методом SDS-PAGE**

Стоит отметить, что протокол Gu / OcA и miRCURY biofluids имеют общий фундаментальный подход к выделению микроРНК, однако удаление / уменьшение белков достигается различными химическими агентами. Чтобы сравнить эффективность удаления белка с помощью miRCURY biofluids kit и протокола Gu / OcA, мы измерили значения поглощения супернатантов, полученных обоими методами при 260 и 280 нм, и исследовали оставшиеся белки с помощью SDS PAGE.

Химические вещества, используемые в miRCURY biofluids kit, удаляют белки из крови с более высокой эффективностью, чем протокол Gu / OcA (A260 / A280 0,45 / 0,16 против 0,54 / 0,27). Напротив, Gu / OcA более эффективен в удалении биополимеров из мочи (A260 / A280 для Gu / OcA составляет 0,88 / 0,73 против 1,12 / 0,88). SDS PAGE в супернатанте плазмы крови обработанной miRCURY biofluids kit выявил минорный белок

52 кДа, (предположительно антитромбин III, каталитическая цепь карбоксипептидазы N или предшественник изоформы 1 витамина D-связывающего белка) и не менее 10 белков, включая альбумин и IgG в супернатантах после осаждения Gu / OcA. Эти данные показывают, что более агрессивное осаждение белков miRCURY biofluids kit может привести соосаждению части микроРНК.

Очевидно, что белки, остающиеся в супернатанте после осаждения Gu / OcA, не мешают выделению микроРНК, по крайней мере в присутствии 0,6 М Gu, и сильно отличаются от белков, оставшихся в образце после стадии осаждения miRCURY biofluids kit. Состав осаждающего раствора в miRCURY biofluids kit неизвестен, однако наши данные показывают разницу в осаждающем агенте, используемом в методе Gu / OcA (октановая кислота), и осадителе, используемом в коммерческом наборе (**рисунок 4**).



**Рисунок 4.** SDS-PAGE супернатанта плазмы крови, после осаждения miRCURY Biofluids kit и Gu / OcA. 1 - плазма крови; 2 - супернатант плазмы крови, обработанный Gu / OcA; 3- супернатант плазмы крови, обработанный miRCURY biofluids kit.

Сопоставление между опубликованными статьями и полученными данными приводит к выводу, что miRCURY biofluids kit более эффективен при экстракции miRNA из плазмы крови, чем из мочи. Стоит отметить, что в протоколе Gu / OcA и miRCURY biofluids используется общий фундаментальный подход к выделению микроРНК, однако удаление / уменьшение белков достигается различными химическими агентами.

Таким образом, метод Gu / OcA позволяет быстро и эффективно выделить микроРНК из плазмы крови и особенно от мочи. Полученные в результате препараты РНК

высоко обогащены микроРНК, согласно количественному анализу ОТ-ПЦР. Способ может быть выполнен на столе и легко адаптирован к различным биологическим жидкостям.

### **Описание внеклеточных везикул мочи здоровых доноров и больных РПЖ**

По данным ТЭМ образцы мочи здоровых доноров и больных пациентов содержат многочисленные микровезикулы размер основной части которых варьирует от 20 до 230 нм. Среди этих частиц были идентифицированы экзосомы, имеющие вид сферических пузырьков, либо «чашек». Доля экзосомо-подобных частиц размером 30-100 нм в моче составляла около 95% у здоровых доноров и 90% у больных РПЖ, а крупных частиц (100-230 нм) – 5 и 10% от всех микрочастиц, соответственно. Методика замера микрочастиц описана выше. Подсчет проводили с препаратов микрочастиц, полученных от 3-х здоровых доноров и 3-х больных РПЖ. На каждого пациента делалось не менее 6 фотографий различных полей, в каждом поле было от 5 до 72 частиц различного размера. Подсчет частиц проводили вручную, объединяли их в группы с шагом в 10 нм, например, группа «31-40 нм» содержит частицы размером >30 нм (т.е. от 30.01 нм), но ≤40 нм. По критерию Манна-Уитни эти отличия не достоверны.

### **Сравнительный анализ профиля экспрессии микроРНК во фракциях супернатанта мочи после 17 тыс. g и внеклеточных везикул мочи здоровых доноров, пациентов с ДГПЖ и больных РПЖ**

На первом этапе были получены нормализованные значения dCt при помощи метода парных отношений, который позволяет оценить экспрессию возможных комбинаций пар микроРНК. Сравнения проводили между группами: здоровые доноры – больные РПЖ (**h-c**), здоровые доноры – пациенты с ДГПЖ (**h-b**) и пациенты с ДГПЖ – больные РПЖ (**b-c**) во фракции супернатанта мочи после 17000g, а также между названными группами внутри фракции ВВ (**hm-cm**, **hm-bm** и **bm-cm**, соответственно).

Далее при помощи Random Forests with Boruta feature selection method были получены данные относительно встречаемости отдельных значимых пар микроРНК на общее число сравнений (запусков), разность медиан, доверительный интервал и значимость (p) как было описано в “Материалах и методах”, таблица 2.

В таблице 2 приведены лучшие комбинации микроРНК, отобранные по следующим критериям: 3 пары с наибольшей встречаемостью, 3 пары с наибольшим расстоянием



между медианами  $\Delta C_t$  между группами доноров (Cutoff для разницы  $\Delta C_t$  был принят за 1), 3 пары с наибольшей удаленностью 95% доверительного интервал (CI) для разности медиан от 0 (но не менее 0.1) и 3 пары с наименьшим значением  $p_{adj}$ . Такие критерии позволяют отразить некоторые отличия в подходах к сопоставлению групп. Критерий наибольшей встречаемости комбинации микроРНК в 1000 итерациях, как значимого фактора алгоритма Voruta, на наш взгляд, позволяет отобрать те комбинации, которые наименее чувствительны к выбросам отдельных значений, а также в дальнейшем будут эффективно комбинироваться с другими парами. Критерий наибольшего расстояния между медианами  $\Delta C_t$  группам, как и критерий наибольшей удаленности 95% доверительного интервал (CI) разности медиан от 0, ориентирован на практическую применимость. Он отражает «разнесенность» значений в различных группах. Так как при сильной близости данных небольшие погрешности измерений экспрессии микроРНК (техническая и выборочная вариация) могут сильно повлиять на идентификацию группы на практике (качество аналитической системы). Пары с наименьшим значением  $p_{adj}$  были отобраны, как наиболее отличающиеся с точки зрения статистического критерия. В целом, так как эти критерии направлены на разделение групп, то пары достаточно часто пересекались. Если какая-либо пара была лучшей по нескольким критериям, то в итоговую выборку она включалась однократно. Для каждой отобранной пары микроРНК был проведен ROC анализ и определена площадь под кривой (AUC).

**Таблица 5.** Значимые предикторы групп сравнения. Указана частота встречаемости комбинации за 1000 запусков алгоритма Voruta, разность дельта  $C_t$  и доверительный интервал, AUC, значения статистической значимости P и скорректированные P ( $p_{adj}$ ).

№	miRNA pairs	Frequency,%	Median distance (95% CI)	AUC	p	$p_{adj}$
h-c comparison, 1770 pairs						
1	miR-107-miR-26b.5p	74.8	-0.74 [-1.94;-0.33]	0.93	0.0012	0.0237
2	miR-93.5p-miR-29b.3p	36.3	-0.54 [-1.31;-0.26]	0.92	0.0019	0.0212
3	miR-22.3p-miR-30e.5p	36.0	-0.76 [-1.95;-0.23]	0.86	0.0065	0.0256
4	miR-375-miR-26b.5p	6.2	-1.71 [-3.92;-0.17]	0.83	0.0143	0.0249
5	miR-29b.3p-miR-205.5p	4.6	1.92 [0.25;2.81]	0.88	0.0041	0.0202
6	miR-331.3p-miR-205.5p	0.3	1.72 [0.24;3.06]	0.79	0.0018	0.0373
7	miR-205.5p-miR-26b.5p	15.2	-1.4 [-3.17;-0.55]	0.88	0.0041	0.0237

8	miR-29a.3p-miR-205.5p	10.3	1.69 [0.57;2.74]	0.83	0.0126	0.0252
9	miR-151a.5p-miR-205.5p	6.3	1.18 [0.43;3.29]	0.84	0.0102	0.0252
10	let-7e.5p-miR-23b.3p	15.8	0.88 [0.27;1.35]	0.92	0.0019	0.0237
h-b comparison, 254 pairs						
1	miR-30a.5p-let-7g.5p	98.5	0.57 [0.28;1.09]	0.83	0.0143	0.0429
2	miR-200a.3p-let-7a.5p	3.9	0.53 [0.03;1.34]	0.7	0.0054	0.1416
3	miR-205.5p-let-7a.5p	0.2	0.86 [0.06;2.71]	0.78	0.0412	0.0618
b-c comparison, 254 pairs						
1	miR-103a.3p-miR-30c.5p	28.6	1.03 [0.03;1.45]	0.79	0.0338	0.0495
2	hsa-miR-30c.5p-miR-30e.5p	21.8	-0.43 [-1.13;-0.17]	0.83	0.0143	0.0429
3	miR-100.5p-miR-30e.3p	18.9	0.73 [0.02;1.02]	0.77	0.05	0.05
4	miR-30c.5p-miR-16.5p	15.2	-0.74 [-1.36;-0.01]	0.84	0.0114	0.0429
5	miR-23b.3p-miR-103a.3p	8.8	-0.41 [-0.99;-0.03]	0.78	0.0412	0.0495
6	miR-100.5p-miR-30a.5p	7.2	0.52 [0.09;1.39]	0.79	0.0338	0.0495
hm-cm comparison, 849 pairs						
1	miR-20a.5p-miR-16.5p	50.3	0.39 [0.17;0.8]	0.89	0.0032	0.0245
2	miR-24.3p-miR-200b.3p	12.0	0.47 [0.13;1.08]	0.88	0.0055	0.0245
3	miR-101.3p-miR-30e.5p	11.8	-0.28 [-0.46;-0.09]	0.82	0.0179	0.0268
4	miR-24.3p-miR-16.5p	5.3	0.45 [0.09;0.95]	0.85	0.0082	0.0245
5	miR-99b.5p-miR-24.3p	3.5	-0.25 [-0.86;-0.06]	0.76	0.0102	0.0494
6	miR-30b.5p-miR-125b.5p	3.3	0.32 [0.06;0.91]	0.8	0.0233	0.03
7	miR-31.5p-miR-16.5p	1.7	0.77 [0.08;1.23]	0.85	0.0118	0.0267
8	miR-30c.5p-miR-16.5p	0.3	0.42 [0;0.9]	0.82	0.0156	0.0268
9	miR-30b.5p-miR-16.5p	0.1	0.85 [0.08;1.5]	0.79	0.0284	0.0319
hm-bm comparison, 849 pairs						
1	miR-107-miR-31.5p	95.3	-0.73 [-1.95;-0.27]	0.87	0.0071	0.0141
2	miR-31.5p-miR-16.5p	61.5	0.79 [0.31;1.25]	0.89	0.0043	0.0141
3	miR-31.5p-miR-30e.3p	43.8	0.69 [0.15;1.5]	0.88	0.0055	0.0141
4	miR-31.5p-miR-200b.3p	23.9	0.58 [0.18;1.3]	0.88	0.0055	0.0141
5	miR-31.5p-miR-660.5p	22.1	0.74 [0.08;1.79]	0.84	0.0023	0.0142
6	miR-29a.3p-miR-660.5p	20.4	0.65 [0.38;1.06]	0.86	0.009	0.0142
7	miR-31.5p-miR-200c.3p	17.3	0.63 [0.25;1.24]	0.83	0.0143	0.0159
8	miR-107-miR-141.3p	5.6	-0.79 [-1.95;-0.09]	0.78	0.0412	0.0412

9	miR-29a.3p-miR-30e.3p	1.6	0.82 [0.04;1.16]	0.84	0.0114	0.0142
10	miR-660.5p-miR-24.3p	0.8	-0.58 [-1.16;-0.05]	0.87	0.0071	0.0141
bm-cm comparison, 254 pairs						
1	miR-191.5p-miR-31.5p	22.7	0.41 [0.16;1.09]	0.91	0.0025	0.0143
2	miR-100.5p-miR-30d.5p	11.1	0.32 [0.15;1.27]	0.84	0.0114	0.0177
3	miR-106b.5p-miR-191.5p	7.4	-0.71 [-1.34;-0.29]	0.88	0.0041	0.0143
4	miR-93.5p-miR-22.3p	2.9	-0.4 [-0.75;-0.02]	0.78	0.0034	0.0412
5	miR-191.5p-miR-200b.3p	0.3	0.54 [0.02;1.21]	0.83	0.0126	0.0177
6	miR-22.3p-miR-92a.3p	0.1	0.44 [0.12;0.89]	0.78	0.0412	0.0412
7	miR-191.5p-miR-200a.3p	0.1	0.69 [0.17;1.13]	0.83	0.0126	0.0177

При первичном анализе обращает на себя внимание большое число значимых микроРНК, например, в группе сравнения h-c, а также уникальные наборы пар микроРНК для каждой группы сравнения, **таблица 5**.

Примечательно, что отдельные пары предикторов по частоте встречаемости резко выделяются среди других комбинаций микроРНК: hsa.miR.107-hsa.miR.26b.5p (74.8%, h-c), hsa.miR.30a.5p-hsa.let.7g.5p (98.5%, h-b), hsa.miR.20a.5p-hsa.miR.16.5p (50.3%, hm-cm) и hsa.miR.107-hsa.miR.31.5p (95.3%, hm-bm). AUC ROC для представленных пар микроРНК составил от 0.70 до 0.93.

Для супернатанта мочи в группе сравнения h-c наилучшими являлись следующие комбинации: hsa.miR.375-hsa.miR.26b.5p, hsa.miR.29a.3p-hsa.miR.205.5p, hsa.miR.331.3p-hsa.miR.205.5p, hsa.miR.205.5p-hsa.miR.26b.5p, hsa.miR.29b.3p-hsa.miR.205.5p и hsa.miR.151a.5p-hsa.miR.205.5p. Пара hsa.miR.29b.3p-hsa.miR.205.5p имела наибольшую разность медиан, а комбинация hsa.miR.29a.3p-hsa.miR.205.5p – наибольшее отдаление доверительного интервала разности медиан от нуля. Комбинацию hsa.miR.107-hsa.miR.26b.5p отличал высокий процент встречаемости в группе сравнения, но с разницей  $\Delta C_t$  менее 1, **таблица 5**.

В группах h-b и b-c было выявлено по 3 и 6, соответственно, комбинаций микроРНК с пограничной значимостью, что связано, в том числе и с тем, что сигнал от некоторых микроРНК у отдельных доноров этих групп был ниже уровня детекции микрочипового метода в нашем исследовании. Единственной значимой (по границе значимости) парой, отличающей здоровых доноров от пациентов с ДГПЖ, является hsa.miR.30a.5p-hsa.let.7g.5p с высоким процентом выявляемости в 98.5%, а пара

hsa.miR.103a.3p-hsa.miR.30c.5p отличалась наибольшей выявляемостью (28.6%) и разницей медиан (больше 1) в группе b-c.

Во фракции ВВ здоровых доноров и больных РПЖ (hm-cm) наиболее часто (50.3%) встречается пара hsa.miR.20a.5p-hsa.miR.16.5p, но разница медиан группы сравнения не превышала 0.39. Наибольшая разница медиан характерна для пар hsa.miR.31.5p-hsa.miR.16.5p и hsa.miR.30b.5p-hsa.miR.16.5p и составляет 0.77 и 0.85, соответственно. Пара hsa.miR.29a.3p-hsa.miR.30e.3p обладает наибольшей разницей медиан (0.82) в группе сравнения hm-bm (фракция ВВ), но доверительный интервал для этой пары мало отличается от 0. Наиболее часто в этой группе сравнения встречается пара hsa.miR.107- hsa.miR.31.5p (95.3%).

Комбинация hsa.miR.191.5p-hsa.miR.31.5p наиболее часто встречается в группе bm-cm, а пара hsa.miR.106b.5p-hsa.miR.191.5p отличается максимальной разницей  $\Delta C_t$  (0.71), **таблица 5.**

Стоит отметить, что, несмотря на уникальность пар предикторов, характерных для каждой из 6 групп, одни и те же микроРНК обнаруживаются одновременно в нескольких группах сравнения, **таблица 3.** Интересно, что некоторые микроРНК были выявлены только во фракции супернатанта мочи (hsa.miR.23b.3p, hsa.miR.30a.5p, hsa.miR.205.5p), другие – только во фракции ВВ (hsa.miR.24.3p, hsa.miR.31.5p и hsa.miR.200b.3p), **таблица 6.**

**Таблица 6.** Встречаемость отдельных микроРНК в парах среди групп сравнений фракций супернатанта мочи после 17000g и ВВ мочи.

	h-c	h-b	b-c	hm-cm	hm-bm	bm-cm
hsa.miR.16.5p			•	•	•	
hsa.miR.22.3p	•					•
hsa.miR.24.3p				•	•	
hsa.miR.23b.3p	•		•			
hsa.miR.29a.3p	•				•	
hsa.miR.30a.5p		•	•			

hsa.miR.30c.5p		•	•		
hsa.miR.30e.5p	•	•	•	•	
hsa.miR.31.5p			•	•	•
hsa.miR.93.5	•				•
hsa.miR.100.5p		•			•
hsa.miR.107	•			•	
hsa.miR.200a.3p		•			•
hsa.miR.200b.3p			•	•	•
hsa.miR.205.5p	•	•			

Стоит подчеркнуть, что в каждой группе сравнения есть микроРНК, которые многократно встречаются в различных комбинациях внутри каждой группы сравнения, **таблица 7**. Так, в группе h-c микроРНК hsa.miR.205.5p и hsa.miR.26b.5p входит в состав 50% и 40% комбинаций, соответственно. hsa.miR.30c.5p в группе h-b встречается во всех трех парах микроРНК, а hsa.miR.31.5p в группе hm-bm встречается в 6 комбинациях из 10, **таблица 7**.

**Таблица 7.** Встречаемость отдельных микроРНК внутри групп сравнений двух фракций супернатанта мочи после 17000g и ВВ мочи.

		Встречаемость микроРНК в группе сравнения, %	Общее число пар микроРНК в группе сравнения
h-c	hsa.miR.205.5p	50	10
	hsa.miR.26b.5p	40	
	hsa.miR.29b.3p	20	
h-b	hsa.miR.30c.5p	100	3
b-c	hsa.miR.30c.5p	50	6
	hsa.miR.30e.5p	33.34	
	hsa.miR.100.5p	33.34	
	hsa.miR.103a.3p	33.34	

hm-cm	hsa.miR.16.5p	55.56	9
	hsa.miR.24.3p	33.34	
	hsa.miR.30b.5p	22.23	
hm-bm	hsa.miR.31.5p	60	10
	hsa.miR.660.5p	30	
	hsa.miR.107	20	
	hsa.miR.30e.3p	20	
	hsa.miR.29a.3p	20	
bm-cm	hsa.miR.191.5p	57.15	7
	hsa.miR.22.3p	28.58	

Несмотря на то, что при анализе экспрессии микроРНК в биологических жидкостях, в частности в моче, для нормализации используются различные подходы, метод парных отношений позволяет обнаружить наибольшее количество возможных комбинаций пар микроРНК, которые могут участвовать в патологических процессах и может быть применим к нашему исследованию при РПЖ. При использовании данного подхода, определенные микроРНК встречаются чаще (**таблица 7**) и, вероятно, являются опухольспецифическими, тогда как другие микроРНК внутри каждой индивидуальной пары (парные) являются нормализаторами к последним. Таким образом, данный подход позволяет подобрать необходимую панель онкоспецифичных микроРНК.

Хотелось бы обратить внимание на то, что в нашем исследовании в парах микроРНК групп h-b и hm-bm были обнаружены онкомикроРНК (**таблица 6**), а также на то, что группы b и c супернанта мочи слабо отличались по значимости друг от друга (**таблица 5**).

Это может быть связано с возможностью присутствия в предстательной железе недиагностированных очагов с признаками малигнизации у пациентов с ДППЖ, равно как и очагов гиперплазии при РПЖ. Кроме того, на фоне доброкачественных гиперпластических процессов в предстательной железе возможно появление значительной части дерегулированных микроРНК, которые при своей тканеспецифичности, не являются опухольспецифичными.

## Биоинформационный анализ профиля экспрессии микроРНК обеих фракций мочи больных РПЖ при помощи баз данных OncomiRDB и DIANA-TarBase

С целью оценки возможного участия микроРНК в патогенезе РПЖ, при помощи баз данных OncomiRDB и DIANA-TarBase, содержащих экспериментально верифицированные онкогенные и онкосупрессорные микроРНК, были проанализированы микроРНК из всех комбинаций **таблицы 5** (за исключением пар hsa.miR- let-7a, hsa-miR-let-7g h-b, так как значения  $p$  этих пар были больше 0.05). Большинство этих микроРНК были идентифицированы обеими базами данных. Согласно OncomiRDB и DIANA-TarBase, 52.8% и 65% из этих микроРНК являются простатспецифическими и принимают участие в процессах развития РПЖ. В качестве наглядного примера в **таблице 8** приведены результаты поиска микроРНК с помощью OncomiRDB. Кроме того, большинство наиболее часто встречающихся микроРНК в каждой группе сравнения также могут быть связаны с развитием РПЖ (**таблица 7**), что может быть учтено при разработке аналитических диагностических систем.

Таким образом, детекция таких онкомикроРНК, участвующих в различных путях патогенеза РПЖ может быть использована для диагностики и лечения различных типов/вариантов течения этого заболевания.

**Таблица 8.** Участие найденных предикторов в развитии и прогрессии РПЖ, согласно базе OncomiRDB.

	miRNA function	Sum effect	Direct targets
hsa-miR-16-5p	reduce cell proliferation inhibit tumor growth	tumor-suppressive	FGF2 FGFR1
hsa-miR-20a-5p	increase cell proliferation increase colony formation	oncogenic	CX43
hsa-miR-23b-3p	inhibit cell proliferation inhibit colony formation inhibit cell migration inhibit cell invasion induce cell cycle G0/G1 arrest	tumor-suppressive	SRC AKT1

	induce apoptosis inhibit epithelial-mesenchymal transition		
hsa-miR-26b-5p	inhibit cell proliferation	tumor-suppressive	
hsa-miR-29a-3p	inhibit cell growth inhibit cell invasion		TRIM68
hsa-miR-29b-3p	inhibit wound healing inhibit cell invasion inhibit colony formation	tumor-suppressive	
hsa-miR-30d-5p	promote cell proliferation promote cell invasion	oncogenic	SOCS1
hsa-miR-101-3p	inhibit cell growth inhibit tumor growth	tumor-suppressive	COX2
hsa-miR-106b-5p	increase cell adhesion promote cell growth	oncogenic	CASP7
hsa-miR-125b-5p			MUC1
hsa-miR-141-3p	enhance cell growth	oncogenic	
hsa-miR-200a-3p	inhibit cell invasion	tumor-suppressive	GNAI3
hsa-miR-200b-3p	inhibit cell migration inhibit cell invasion reduce cell adhesion reduce cell detachment	tumor-suppressive	
hsa-miR-200c-3p	increase adhesion reduce cell invasion reduce cell migration	tumor-suppressive	
hsa-miR-205-5p	increase adhesion reduce cell invasion	tumor-suppressive	ZEB1



	reduce cell migration inhibit epithelial-mesenchymal transition inhibit cell migration		VIM
hsa-miR-31-5p	inhibit cell proliferation inhibit cell invasion inhibit cell migration	tumor-suppressive	
hsa-miR-99b-5p	inhibit cell growth	tumor-suppressive	SMARCA5 SMARCD1 MTOR
hsa-miR-100-5p	inhibit cell growth	tumor-suppressive	SMARCA5 SMARCD1 MTOR
hsa-miR-331-3p	inhibit cell proliferation	tumor-suppressive	DOHH

**Определение диагностически значимых пар микроРНК фракций мочи, позволяющих отличить группы здоровых доноров, пациентов с ДГПЖ и больных РПЖ**

Для лучших комбинаций пар микроРНК был выполнен сравнительный анализ чувствительности и специфичности, который показал, что наибольшей диагностической эффективностью обладают пары hsa.miR-107-hsa.miR-26b-5p (AUC 0.93, 80% чувствительность и 100% специфичность), hsa.miR-375-3p-hsa.miR-26b-5p (AUC 0.83, 70% чувствительность и 100% специфичность) в группе сравнения h-с, а так же hsa.miR-31.5p-hsa.miR-16-5p (AUC 0.89, 80% чувствительность и 100% специфичность), hsa.miR-31.5p-hsa.miR-200b (AUC 0.88, 70% чувствительность и 100% специфичность), hsa.miR.31.5p-hsa.miR.30e.3p (AUC 0.88, 80% чувствительность и 100% специфичность) и hsa.miR-31.5p-hsa.miR-660.5p (AUC 0.84, 70% чувствительность и 100% специфичность) в группе hm-bm, **таблица 9.**

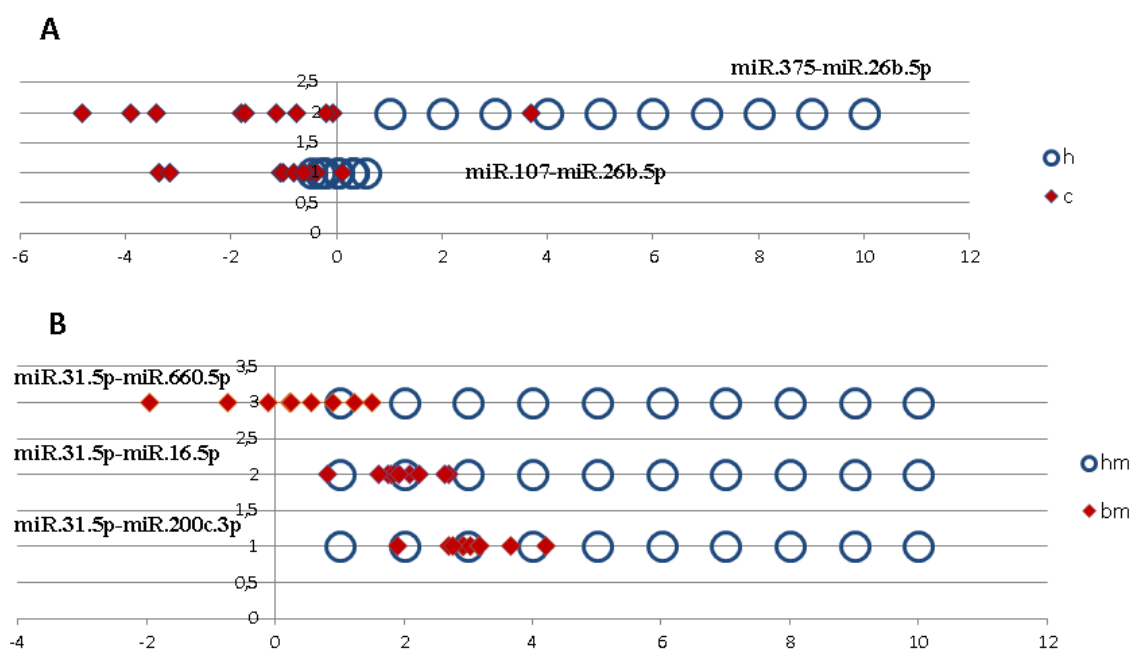
**Таблица 9.** Диагностическая значимость наилучших предикторов микроРНК во фракции супернатанта мочи после 17000g и фракции ВВ мочи при сравнении различных групп доноров между собой.

		AUC	Threshold	95% CI	Sensitivity%	Specificity%
<b>h-c</b>	miR-205.5p-miR-26b.5p	0.88	< -3.365	0.7212 - 1.039	30	100
	miR-107-miR-26b.5p	0.93	< -0.4896	0.8074 - 1.053	80	100
	miR-375-miR-26b.5p	0.83	< -0.6851	0.6293 - 1.037	70	100
	miR-151a.5p-miR-205.5p	0.84	> 3.152	0.6506 - 1.029	30	100
	miR-29b.3p-miR-205.5p	0.88	> 2.034	0.7278 - 1.032	50	100
	miR-29a.3p-miR-205.5p	0.83	> 3.344	0.6368 - 1.023	20	100
	miR-331.3p-miR-205.5p	0.79	> 5.651	0.5624 - 1.015	10	100
<b>h-b</b>	miR-30a.5p-let-7g.5p	0.83	< -2.323	0.6107 - 1.056	33	100
<b>b-c</b>	miR-30c.5p-miR-30e.5p	0.83	> -0.7914	0.6351 - 1.032	20	100
	miR-103a.3p-miR-30c.5p	0.79	< 1.153	0.5727 - 1.005	60	100
<b>hm-cm</b>	miR-20a.5p-miR-16.5p	0.85	< 0.7185	0.6502 - 1.047	56	100
	miR-30b.5p-miR-16.5p	0.83	< -2.959	0.6355 - 1.021	22	100
	miR-31.5p-miR-16.5p	0.79	< 1.833	0.5630 - 1.012	37.5	100
	miR-24.3p-miR-200b.3p	0.93	< 1.307	0.8231 - 1.044	67	100
<b>hm-bm</b>	miR-31.5p-miR-200c.3p	0.83	< 3.063	0.6356 - 1.031	60	100
	miR-31.5p-miR-16.5p	0.89	< 2.256	0.7312 - 1.047	80	100
	miR-107-miR-141.3p	0.78	> 5.213	0.5454 - 1.010	10	100
	miR-31.5p-miR-200b.3p	0.88	< 3.104	0.7168 - 1.039	70	100
	miR-31.5p-miR-30e.3p	0.88	< 1.252	0.7067 - 1.049	80	100
	miR-29a.3p-miR-30e.3p	0.84	< -0.1366	0.6625 - 1.026	40	100
	miR-31.5p-miR-660.5p	0.84	< 0.5698	0.6630 - 1.026	70	100
	miR-29a.3p-miR-660.5p	0.86	< -0.7334	0.6679 - 1.043	20	100
	miR-20a.5p-miR-16.5p	0.73	< 0.8182	0.4669 - 0.9931	70	100
	miR-107-miR-31.5p	0.87	> 1.324	0.6716 - 1.062	10	100

bm-cm	miR-191.5p-miR-200a.3p	0.83	< 2.595	0.6479 - 1.012	40	100
	miR-191.5p-miR-31.5p	0.91	< 0.07563	0.7707 - 1.052	33	100
	let-7i.5p-let-7a.5p	0.83	< 4.612	0.6117-1.039	57.14	100
	miR-100.5p-miR-200b.3p	0.81	< 3.867	0.6002-1.022	55.56	100
	miR-106b.5p-miR-191.5p	0.88	> 0.3940	0.7234 – 1.037	30	100

Для оценки разделения значений наиболее диагностически значимых пар микроРНК в группах сравнения были построены диаграммы распределения нормализованных значений пар микроРНК, **рисунок 5**.

Из **рисунка 5** видно, что значения пары hsa.miR-107- hsa.miR-26b-5p больных и здоровых доноров прилежат достаточно плотно друг к другу, что может затруднить их разделение из-за ошибки измерения. В тоже время шансы отличить здоровых доноров от больных РПЖ с использованием предиктора hsa.miR-375-3p-hsa.miR-26b-5p кажутся более высокими, **рисунок 5 А**.



**Рисунок 5: А.** Диаграмма распределения нормализованных значений здоровых доноров и больных РПЖ, пары hsa.miR-375-3p- hsa.miR-26b-5p и hsa.miR-107- hsa.miR-26b-5p.

**В.** Диаграмма распределения нормализованных значений здоровых доноров и пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы на примере комбинаций следующих микроРНК: hsa.miR-31.5p- hsa.miR-660.5p, hsa.miR-31.5p- hsa.miR-16-5p, hsa.miR.31.5p- hsa.miR.30e.3p и hsa.miR-31.5p- hsa.miR-200b.

Аналогичная картина складывается и в группе сравнения hm-bm, где значения в парах hsa.miR-31.5p-hsa.miR-660.5p достаточно хорошо разнесены. Однако в парах hsa.miR-31.5p-hsa.miR-16-5p и hsa.miR-31.5p-hsa.miR-200b нормализованные значения больных ДГПЖ лежат близко или внутри распределения значений группы здоровых доноров, снижая вероятность разделения этих групп между собой, **рисунок 5 В.**

### **Выводы**

1. Изучение эффективности выделения микроРНК при помощи протокола Gu/Oct из различных биологических жидкостей (включая плазму крови и мочу) показал, что наиболее оптимально удаление полимеров нуклеотидной природы и выделение микроРНК из плазмы крови происходит при pH 4,0, концентрации гуанидин изотиоцианата 0,6 М и концентрации октановой кислоты 0,5%, а из мочи - при pH 4,0, концентрации гуанидин изотиоцианата 1.35М и концентрации октановой кислоты 1.5%.
2. Gu / OcA по эффективности выделения превзошел метод кислой фенол-хлороформной экстракции и коммерческий miRCURY Biofluids Kit с высоким выходом микроРНК (mir-16 и mir-126) из плазмы и мочи.
3. В результате сравнительного анализа профиля экспрессии микроРНК во фракциях супернатанта мочи после 17 тыс. g и ВВ мочи здоровых доноров, пациентов с ДГПЖ и больных РПЖ было выявлено пары микроРНК максимальным процентом встречаемости и наибольшей разницей медиан. Было отмечено, что одни и те же микроРНК обнаруживаются одновременно в нескольких группах сравнения, как во фракциях супернатанта мочи после 17 тыс. g, так и во фракции ВВ. Кроме того, было обнаружено, что в каждой группе сравнения есть микроРНК, которые многократно встречаются в различных комбинациях пар микроРНК внутри каждой группы сравнения. Биоинформационный анализ профиля экспрессии микроРНК обеих фракций мочи больных РПЖ при помощи баз данных OncomiRDB и DIANA-TarBase показал, что 52.8% и 65% микроРНК из всех комбинаций из всех комбинаций **таблицы 5** являются простатспецифическими и принимают участие в процессах развития РПЖ.

4. Сравнительный анализ чувствительности и специфичности комбинаций пар микроРНК показал, что наибольшей диагностической эффективностью обладают пары hsa.miR-107-hsa.miR-26b-5p (AUC 0.93, 80% чувствительность и 100% специфичность), hsa.miR-375-3p-hsa.miR-26b-5p (AUC 0.83, 70% чувствительность и 100% специфичность) в группе сравнения здоровые - больные РПЖ во фракции супернатанта мочи, а так же hsa.miR-31.5p-hsa.miR-16-5p (AUC 0.89, 80% чувствительность и 100% специфичность), hsa.miR-31.5p-hsa.miR-200b (AUC 0.88, 70% чувствительность и 100% специфичность), hsa.miR.31.5p-hsa.miR.30e.3p (AUC 0.88, 80% чувствительность и 100% специфичность) и hsa.miR-31.5p- hsa.miR-660.5p (AUC 0.84, 70% чувствительность и 100% специфичность) в группе здоровые доноры – пациенты с ДГПЖ во фракции ВВ мочи.

5. Оценка распределения значений наиболее диагностически значимых пар микроРНК в группах сравнения показала, что значения таких пар как hsa.miR-107-hsa.miR-26b-5p супернатанта мочи после 17 тыс. г. в группе больных и здоровых доноров или hsa.miR-31.5p-hsa.miR-16-5p и hsa.miR-31.5p-hsa.miR-200b в группе здоровых доноров и больных ДГПЖ во фракции внеклеточных везикул ДГПЖ лежат близко или внутри распределения значений группы, тем самым снижая вероятность разделения этих групп между собой.

В то же время значения других пар хорошо разнесены друг от друга и, таким образом, такие пары позволят лучше отличить группы сравнения (hsa.miR-375-3p-hsa.miR-26b-5p группы здоровых доноров и больные РПЖ во фракции супернатанта мочи после 17 тыс. г. или hsa.miR-31.5p-hsa.miR-660.5p в группе здоровых доноров и больных ДГПЖ во фракции ВВ).

#### **Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах**

1. O.E. Bryzgunova, M.M. Zaripov, E.A. Lekchnov, T.E. Skvortsova, A.E. Grigor'eva, E.S. Morozkin, I.A. Zaporozhchenko, E.I. Ryabchikova, P.P. Laktionov. Comparative Study of Extracellular Vesicles from the Urine of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients. PLoS One. 2016. 11: e0157566. doi: 10.1371/journal.pone.0157566.
2. Lekchnov EA, Zaporozhchenko IA, Morozkin ES, Bryzgunova OE, Vlassov VV, Laktionov PP. Protocol for miRNA isolation from biofluids. Anal Biochem. 2016; 499:78-84. doi: 10.1016/j.ab.2016.01.025.

3. Bioinformatics analysis for evaluation of the diagnostic potentialities of miR-19b, -125b and -205 as liquid biopsy markers of prostate cancer. O. E. Bryzgunova, E. A. Lekchnov, M. M. Zaripov, Yu. B. Yurchenko, S. V. Yarmoschuk, O. A. Pashkovskaya, E. Yu. Rykova, A. A. Zheravin, P. P. Laktionov. AIP Conference Proceedings 1882, 020009 (2017); doi: <http://dx.doi.org/10.1063/1.5001588>

4. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. BioMed Research International. 2018;2018: 1–27. doi:10.1155/2018/8545347

#### Патенты

1. Лактионов П.П., Морозкин Е.С., Запорожченко И.А., Власов В.В. Способ выделения микроРНК из биологических жидкостей. Патент № 2585232. Опубликовано 27.05.2016

Отчет о проверке текста  
научно-квалификационной работы  
на объем заимствования

Лехнов Евгений Анатольевич

«МикроРНК в составе микрочастиц мочи как маркер неинвазивной  
диагностики рака предстательной железы»

Оценка оригинальности: 91.49%

Заимствования: 8.51%

№ документа: 995659

Имя исходного файла: Научный\_доклад\_Лехнов.docx

Размер файла: 516.6 КБ

Размер текста: 42920

Слов в тексте: 6737

Число предложений: 1550

Источники (доля в тексте – ссылка):

8.3% <https://sibac.info/studconf/natur/1/70501>

9.7% <http://www.optimapharm.com.ua/urologia/rannyaya-diagnostika-raka-predstatelnoj-zhelezy>

6.7% <http://www.mif-ua.com/archive/article/6515>

5.5% [http://con-med.ru:80/magazines/hypertension/hypertension-01-2016/mikrornk\\_v\\_diagnosti...](http://con-med.ru:80/magazines/hypertension/hypertension-01-2016/mikrornk_v_diagnosti...)

6.4% <http://med-pomosh.com/?p=6897>

5.2% <https://4science.ru/conference2015/theses/14.579.21.0054>

5.4% <https://habr.com/post/419375/>

7.6% <http://naukarus.com/tsirkuliruyuschie-mikrornk-krovi-pri-rake-legkogo-perspektivy-isp...>

11.1% <https://kiai.com.ua/ru-issue-article-261/Perspektivy-izucheniya-i-primeneniya-mikroRN...>

9.15% <http://ecuro.ru/node/3576>

11.2% <http://www.dslib.net/onkologia/mikrornk-markery-dlja-maloinvazivnoj-diagnostiki-raka-...>

12.05625% <http://www.freepatent.ru/patents/2585232>

7.9% <http://www.findpatent.ru/patent/257/2571507.html>

5.8% <https://edrid.ru/rid/217.015.a925.html>

7.1% <http://rupubmed.com/rak/rak-grudi/61501>

7.1% <https://vestnikrgmu.ru/archive/2017/4/5/content?lang=ru>

14.8% <http://www.findpatent.ru/patent/258/2585232.html>

7.4% <https://sibac.info/conf/innovation/xxv/34221>  
18.0% <https://ecuro.ru/article/vydelenie-i-analiz-ekzosomalnoi-mikro-rnk-iz-mochi-novy-met...>  
8.3% <http://www.fesmu.ru/elib/search.aspx?keyword=%22%EC%EE%F7%E0%22>  
5.7%  
<https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%A0%D0%9D%D0%9A>  
8.2% <http://www.dslib.net/onkologia/pattern-jekspressii-mikror-nk-pri-predopuholevyh-zabole...>  
7.1% <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4531514/>  
24.1% <http://bankpatentov.ru/node/649012>  
24.1% <https://patents.google.com/patent/RU2585232C1/ru>  
24.1% <https://edrid.ru/rid/216.015.4223.html>  
6.9% <http://ecuro.ru/article/vydelenie-i-analiz-ekzosomalnoi-mikro-rnk-iz-mochi-novy-meto...>  
5.0% <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5831698/>  
7.1% <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0157566>  
9.2% <https://www.scilit.net/article/de45f44e343fd4795ad243b78a30bbe1>  
20.0% <http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/structure/labs/lak>

Оригинальность работы составляет 91.49 % , что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» на сайте [www.antiplagius.ru](http://www.antiplagius.ru)  
06.09.2018 г.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.б.н. К.В. Разум