

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

На правах рукописи

БРЫЗГУНОВА ОЛЬГА ЕВГЕНЬЕВНА

**Внеклеточные микроРНК и
аберрантно-метилованные ДНК как маркеры
онкологических заболеваний
предстательной железы**

1.5.4 – биохимия

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук**



Новосибирск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Научный консультант:

Лактионов Павел Петрович, к.б.н.

Официальные оппоненты:

Рихтер Владимир Александрович, д.б.н., ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, зав. лабораторией.

Гуляева Людмила Федоровна, д.б.н., Институт молекулярной биологии и биофизики, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», рук. лаборатории; Институт медицины и медицинских технологий НГУ, зав. кафедрой клинической биохимии; профессор кафедры химии ИЕСЭН НГПУ.

Малек Анастасия Валерьевна, д.м.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, зав. лабораторией.

Защита состоится «__» _____ 202__ г. в _____ часов

на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН) по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИХБФМ СО РАН и на сайте ИАС <http://www.niboch.nsc.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 202__ г.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук



Пестряков П.Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. По данным разных стран в последующие годы в мире ожидается резкий рост заболеваемости раком, и в течение следующих двух десятилетий число новых случаев составит более 30,2 миллионов, что приведет к увеличению примерно на 30% число людей, проживших 5 и более лет после постановки диагноза. Рак предстательной железы (РПЖ) за последний год сравнялся по заболеваемости с раком лёгкого (занимавшего ранее лидирующие позиции), и теперь оба этих онкологических недуга делят первое место среди мужского населения не только в России, но и в мире.

Несмотря на быстрое развитие методов молекулярной биологии, включая высокопроизводительное секвенирование, которое постепенно начинает использоваться в клинической диагностике, нехватка высокоточных маркеров онкологических заболеваний предстательной железы (ПЖ), пригодных для широкого рутинного использования, ощущается очень остро. Связано это в том числе и с характеристикой используемых на сегодняшний день диагностических методов, являющихся либо инвазивными, либо обладающими низкими показателями чувствительности и/или специфичности. Используемые для диагностики РПЖ генетические маркеры обладают существенно лучшими диагностическими характеристиками, но, тем не менее, для их повсеместного применения нуждаются в улучшении.

«Золотым стандартом» диагностики, а также морфологических и иммуногистохимических анализов для характеристики онкологического заболевания до сих пор является биопсия ткани. Однако это инвазивная процедура, которая может быть довольно сложной в зависимости от состояния пациента и расположения опухоли. Кроме того, биопсия ткани в связи с гетерогенностью опухоли зачастую не позволяет получить информацию об интегральном клональном составе опухоли, не говоря про генетические особенности метастатических очагов.

Исследования внеклеточных ДНК (внДНК), начатые в 70-е годы прошлого века, инициировали начало интенсивных работ по поиску молекулярных биомаркеров в составе различных жидкостей организма — «жидкостной биопсии», имеющей ряд преимуществ: неинвазивность и отсутствие потребности в специальных условиях для забора образца или госпитализации, возможность многократного забора образцов для анализа в любой момент времени, отсутствие побочных эффектов, возможность получения информации о клеточном составе опухоли и метастазов, потенциальная возможность оценки ответа опухоли на лечение, состояния ремиссии и рецидива. Появление высокопроизводительных и информативных молекулярных методов (ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени, digital ПЦР, высокопроизводительное секвенирование и т.д.), которые позволили

выполнять как скрининговые исследования, так и глубокий анализ молекулярной гетерогенности опухолей, революционизировали эту область.

Одними из наиболее исследуемых молекул биожидкостей на сегодняшний день являются внДНК и внеклеточные микроРНК (вн-микроРНК). Первые попытки использовать внДНК для диагностики рака были предприняты еще в 1993 году, а первый опыт использования вн-микроРНК был описан много позднее — в 2008 году. Оказалось, что, несмотря на давно известную нестабильность молекул РНК в биологических жидкостях, микроРНК могут длительно циркулировать в крови, находясь в комплексах с биополимерами или в составе везикулярных структур.

МикроРНК (18-25 н.) — некодирующие молекулы РНК, основной механизм работы которых заключается в негативной регуляции экспрессии генов-мишеней, причём одна микроРНК может регулировать активность до нескольких сотен генов, отвечающих за работу различных биологических процессов, определяющих, в том числе, и фенотип опухоли, и её чувствительность к проводимому лечению. Однако, несмотря на высокий интерес исследователей к микроРНК и огромные финансовые вложения в эту область исследований, на медицинском рынке до сих пор нет диагностических/прогностических тестов на их основе, одобренных FDA.

Другим вариантом эпигенетической регуляции активности генов является метилирование/деметилирование цитозинов в составе CpG-островков их промоторных областей. В отличие от микроРНК метилирование промотора (первого экзона) затрагивает только экспрессию нижележащего гена (генов). Методология исследования метилирования ДНК хорошо разработана и основана на использовании специфичных нуклеаз или химической конверсии ДНК. При этом довольно высоки чувствительность и специфичность выявления метилированных форм ДНК (достаточно иметь на старте фентограммы и пикограммы ДНК). При помощи ПЦР можно выявить метилированную форму ДНК в присутствии более чем 99% неметилированной формы, а высокопроизводительное секвенирование позволяет ещё на несколько порядков увеличить не только чувствительность, но и специфичность анализа метилированных последовательностей. В связи с этим исследование aberrантного метилирования ДНК при развитии онкологических заболеваний и попытки поиска aberrантно метилированных маркеров предпринимаются ещё с 80-х годов прошлого века. Тем не менее, 15 лет исследований в этой области завершились созданием только двух диагностических тестов, основанных на детекции метилированных форм генов (Epi proColon® и Epi proLung®), одобренных для использования в Европейском союзе и Китае, и только одного теста (Epi proColon®), одобренного FDA в США, что указывает на наличие фундаментальных и

технических научных проблем, осложняющих поиск aberrантно метилированных онкомаркеров.

Настоящее исследование было направлено на выяснение фундаментальных причин, ограничивающих использование aberrантно-метилованных ДНК-онкомаркеров, вн-микроРНК, разработку методических подходов и решений, которые позволили бы приблизиться к созданию высокоточных диагностикумов РПЖ.

Цель работы. Целью представленного исследования являлось изучение внеклеточных микроРНК крови и мочи и локус-специфичного метилирования внДНК крови больных онкологическими заболеваниями предстательной железы и здоровых доноров, а также оценка возможности создания на основе полученных знаний диагностикумов для выявления онкологических заболеваний предстательной железы. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1) разработать быстрые, простые, надёжные и высокоэффективные методы выделения микроРНК из крови и мочи, пригодные для эффективной работы с образцами доноров и использования в рутинных клинических лабораториях;

2) изучить внеклеточные везикулы (ВВ) мочи здоровых доноров (ЗД) и больных РПЖ, а именно морфологию, распределение по размерам, а также содержание в них белка, ДНК и РНК, включая микроРНК;

3) изучить распределение микроРНК в парных образцах бесклеточной фракции и фракции суммарных внеклеточных везикул (СВВ) мочи в группах ЗД и пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) и РПЖ с использованием микрочиповых технологий;

4) на основе полученных результатов и их анализа разработать стратегию алгоритма анализа данных, позволяющую выявлять диагностические микроРНК и формировать панели микроРНК, пригодные для дифференциальной диагностики онкологических заболеваний ПЖ;

5) при помощи количественной петлевой ОТ-ПЦР верифицировать панели микроРНК-онкомаркеров;

6) при помощи локус-специфичного высокопроизводительного секвенирования исследовать молекулярные паттерны метилирования промоторных областей генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* в составе внДНК плазмы и суммарного пула внДНК (сумм-внДНК) крови (свободных плазмы и связанных с поверхностью клеток крови); оценить возможность использования локус-специфичного метилирования вышеперечисленных генов в составе внДНК плазмы и сумм-внДНК крови для дифференциальной диагностики опухолей предстательной железы.

Научная новизна и практическая значимость работы. Для исследования изучаемых вн-микроРНК были разработаны высокоэффективные, быстрые, простые в исполнении и экономичные методы их выделения из плазмы крови и мочи. Такие методы выделения вн-микроРНК из биологических жидкостей

(без необходимости использования опасных/высокотоксичных реагентов) были предложены впервые. Предложенный метод выделения из различных фракций крови и мочи вн-микроРНК в присутствии октановой кислоты не требует специального оборудования, условий и высококвалифицированного персонала и может быть использован для изготовления коммерческих наборов для клинических диагностических лабораторий.

В рамках работы с использованием микрочиповых технологий впервые выполнено исследование распределения вн-микроРНК в парных образцах СМ и фракции СВВ мочи в группах ЗД и пациентов с ДГПЖ и РПЖ. Показано, что состав и концентрации микроРНК СМ и СВВ отличаются, кроме того, во фракции СВВ больных и ЗД встречается больше дифференциально экспрессированных микроРНК, причем их концентрации также отличаются сильнее, чем во фракции СМ. Полученные данные верифицированы при помощи ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Показано, что вн-микроРНК ВВ мочи являются удобным источником диагностического материала для дифференциальной диагностики онкологических заболеваний ПЖ. Предложен новый подход использования данных об отношении концентраций отдельных пар вн-микроРНК в составе биологических жидкостей, позволяющий выбрать устойчивую панель микроРНК-маркеров ДГПЖ и РПЖ. Наилучшие комбинации микроРНК в составе различных фракций биологических жидкостей, позволяющие отличить все три исследуемые группы доноров между собой, были впервые предложены и охарактеризованы с последующей оценкой их диагностической ценности. Предложена панель, состоящая из восьми микроРНК, позволяющая классифицировать пациентов с РПЖ, ДГПЖ и ЗД с абсолютными показателями чувствительности и специфичности.

При помощи локус-специфичного высокопроизводительного секвенирования промоторных областей генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* в образцах внДНК крови после химической конверсии показано, что отдельные цитозины в составе CpG динуклеотидов могут быть произвольно метилированы, однако встречаются позиции и профили метилирования отдельных молекул ДНК отличающие больных ДГПЖ и РПЖ от ЗД. Этим же методом впервые показано, что уровень метилирования внДНК выше в пуле сумм-внДНК крови, что свидетельствует о нём как о более удобном источнике диагностических aberrантно-метилованных ДНК. Анализ данных высокопроизводительного локус-специфичного метилирования генов *GSTP1* и *RNF219* в пуле сумм-внДНК позволил классифицировать пациентов всех исследуемых групп со 100% чувствительностью и специфичностью.

Полученные результаты анализа изменений концентраций вн-микроРНК и статуса метилирования внДНК биологических жидкостей ЗД и больных с опухолями ПЖ могут быть использованы для скрининга на этапах постановки диагноза, а диагностическая система, представляющая собой панель из восьми микроРНК-маркеров, может быть рекомендована для подготовки технической

документации, необходимой для регистрации медицинских изделий для диагностики *in vitro*.

Объект исследования. Вн-микроРНК плазмы крови и мочи и внДНК крови ЗД и пациентов с ДГПЖ и РПЖ, а также внДНК в культурах клеток человека.

Методы исследования. Исследования выполнены на образцах крови и мочи больных ДГПЖ и РПЖ; в качестве контрольных были использованы аналогичные образцы биологических жидкостей здоровых мужчин. В ходе выполнения исследования разработаны и использованы методы выделения РНК, включая методы с использованием силикатных носителей, масштабная количественная SYBR Green ОТ-ПЦР микроРНК-мишеней с LNA-праймерами в рамках микрочипового исследования экспрессии микроРНК, количественная петлевая ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени, локус-специфичное высокопроизводительное секвенирование внДНК после химической конверсии, биоинформатические и статистические методы анализа данных.

Положения, выносимые на защиту: 1) предложенные протоколы выделения коротких РНК из крови и мочи превосходят существующие аналоги по эффективности выделения, скорости, трудоёмкости и простоте использования. Выделенные образцы РНК не содержат ингибиторов ПЦР и пригодны для дальнейшего исследования современными методами (количественная ОТ-ПЦР, секвенирование и т.д.);

2) в моче ЗД и больных РПЖ присутствуют ВВ различного размера и белкового состава, содержащие ДНК, РНК и микроРНК. ВВ, выделенные из мочи онкологических больных с заболеваниями предстательной железы, содержат микроРНК ассоциированные с развитием опухолей ПЖ;

3) анализ данных масштабного исследования представленности 84-х микроРНК во фракциях СМ и ВВ мочи ЗД и онкологических больных с заболеваниями ПЖ позволяет идентифицировать микроРНК наиболее характерные для опухолей ПЖ. Биоинформационный анализ мишеней выявленных микроРНК, их участия в регуляции экспрессии белков, сигнальных каскадах, в том числе связанных с развитием РПЖ, может быть использован для уточнения панели потенциальных микроРНК-маркеров.

4) предложены подходы к формированию панели микроРНК-маркеров, и сформирована такая панель, позволяющая с высокой точностью и специфичностью классифицировать все группы доноров, входящих в исследование, а именно здоровых мужчин и больных ДГПЖ и РПЖ, причем ВВ содержат больше диагностически значимых микроРНК;

5) при помощи TaqMap ОТ-ПЦР исследована представленность 12-ти микроРНК из выбранной панели в составе фракций СМ, ВВ мочи и в плазме крови на независимых группах испытуемых. Определение в пуле ВВ мочи концентраций восьми микроРНК в составе шести пар позволяет классифицировать пациентов с РПЖ, ДГПЖ и ЗД с абсолютными показателями чувствительности и специфичности;

б) данные локус-специфичного высокопроизводительного секвенирования промоторных областей генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* в составе вДНК крови после бисульфитной конверсии демонстрируют множественные паттерны метилирования цитозинов отдельных молекул ДНК исследуемых локусов. Выбраны паттерны метилирования индивидуальных ДНК, на основании которых с абсолютной чувствительностью и специфичностью удалось классифицировать все исследуемые группы доноров (ЗД, ДГПЖ и РПЖ). Сумм-вДНК крови являются более предпочтительным источником aberrantly метилированных ДНК для диагностики больных РПЖ, чем вДНК плазмы крови и могут быть использованы для эффективной диагностики РПЖ.

Публикации и апробация работы. По результатам диссертационной работы опубликовано 20 печатных работ в рецензируемых журналах, индексируемых в международных базах Web of Science и/или Scopus, получены 2 патента РФ на изобретение и 1 разработанная база данных внесена в Реестр РФ. Материалы диссертации были представлены на российских и зарубежных конференциях, включая «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013); «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2013); «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2013); VIII съезд онкологов и радиологов СНГ и Евразии (Казань, 2014); Международную конференцию по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии (Москва, 2014); «EMBO Workshop» (Томск, 2015); «CNAPS IX, X, XI» (Berlin, 2015; Montpellier, 2017; Jerusalem, 2019); II, III, IV, V, VI Петербургские онкологические форумы «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020); III Международную конференцию молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, 2016); V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, конференцию ADFLIM (Сочи, 2016); II, III Всероссийские конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2016, 2017); IX Международный конгресс (Москва, 2017); International conference «Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications» (Томск, 2017); Всероссийские конференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2017, 2019); XII Международный Конгресс Российского общества онкоурологов (Москва, 2017); Конференцию «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты» (Горно-Алтайск, 2018); V Международную конференцию ПОСТГЕНОМ'2018 (Казань, 2018); «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров» (Санкт-Петербург, 2019); 44th ESMO Congress (Barcelona, 2019).

Личный вклад автора. Все представленные в работе результаты получены лично автором или при его непосредственном участии и руководстве на всех этапах исследования, в том числе и при выполнении кандидатских и студенческих дипломных работ. Публикации за первым авторством автора

диссертации написаны непосредственно самим автором, остальные были написаны и подготовлены к публикации при его непосредственном участии.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка цитированной литературы, списка иллюстративного материала и таблиц, приложений. Материал работы изложен на 339 страницах машинописного текста (12 шрифт, интервал 1,5) и содержит 35 рисунков, 37 таблиц, 8 приложений. Библиография включает 866 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Разработка методов выделения вн-микроРНК из крови и мочи

Известно, что биологические жидкости содержат в своём составе большое количество биополимеров нуклеотидной природы, а именно белки, липопротеины, липиды и их комплексы, включая различные комплексы с микроРНК (Tutanov O, et al., 2022). Эти биомолекулы могут, как препятствовать выделению, так и влиять на качество выделенной микроРНК, мешая работе ферментов, используемых для их анализа. Кроме того, РНК-гидролизующие ферменты могут влиять на количество выделенной микроРНК, и необходимость их ингибирования не должна быть упущена из виду. Для внедрения в клиническую практику предлагаемые методы выделения микроРНК должны быть простыми, воспроизводимыми и производительными. Существующие же на сегодняшний день наборы, основанные на использовании Тризола, отличаются трудоемкостью, плохой воспроизводимостью, дороговизной, а наборы от компании Exiqon неплохо подходят для выделения микроРНК из крови, но совершенно не подходят для выделения микроРНК из мочи. Кроме того, оказалось, что все протестированные нами наборы и методики для выделения микроРНК в тесте на разведение демонстрируют наличие ингибиторов ПЦР.

Нами были предложены два метода выделения вн-микроРНК из биологических жидкостей: 1) метод, основанный на использовании раствора Фолча (истинный однофазный раствор хлороформа в воде (Folch J, et al., 1957)), гуанидинизотиоцианата (GuSCN) и микроколонок со стекловолокнистым сорбентом производства ООО «БиоСилика»; 2) метод, в основе которого лежит разрушение надмолекулярных комплексов и осаждение биополимеров биологических жидкостей при помощи комбинации октановой кислоты и GuSCN с последующим использованием таких же микроколонок.

Усовершенствованные протоколы по сравнению с коммерческими более универсальны и эффективны, позволяют выделять высококачественные препараты коротких РНК, включая микроРНК, из крови и мочи с высокой воспроизводимостью и эффективностью не менее 70%. Полученные препараты пригодны для дальнейших исследований, в том числе и методами, в

основе которых лежит ОТ-ПЦР, а разработанные методы выделения занимают меньше времени относительно стандартных, что является несомненным плюсом при ежедневной работе с большим количеством образцов. Метод, основанный на использовании раствора Фолча, хорошо подходит для выделения микроРНК из растворов с большим количеством липидов. Метод, основанный на использовании октановой кислоты прост в исполнении, дешев, в 7,2 раза эффективнее экстракции фенол-хлороформом, обеспечивает выделение микроРНК без ингибиторов ПЦР из плазмы крови, мочи и ВВ этих жидкостей, удобен при работе с большим количеством образцов, с образцами большого объема (моча), и поэтому был использован при работе с основной частью образцов доноров.

2. Особенности циркуляции и состав внеклеточных микроРНК при развитии онкологических заболеваний предстательной железы

Работа с донорами и пациентами была одобрена этическим комитетом ИХБФМ СО РАН и проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (указ Президента РФ от 24.12.1993 №2288).

Известно, что микроРНК биологических жидкостей могут быть упакованы в надмолекулярные комплексы с биомолекулами или в покрытые мембраной частицы и попадать во внеклеточную среду, как с помощью активной секреции, так и в результате клеточной смерти. Состав микроРНК-содержащих структур биожидкостей определяется механизмом их возникновения, циркуляции (распределения по органам и тканям) и выведения. Вклад механизмов высвобождения комплексов микроРНК, клеточных популяций, высвобождающих микроРНК, и особенности биожидкостей, например клубочковая фильтрация, реабсорбция, контакт с протоком, на то в каком виде вн-микроРНК представлены в этих жидкостях и ПЖ, влияют какие клетки вносят вклад в их появление во внеклеточном пространстве (Harita Y. 2023).

В рамках этого исследования мы не работали с клетками седимента мочи, как это делается при анализе *PCA3*, а использовали бесклеточную фракцию мочи. Как известно, секрет ПЖ попадает в мочу, а клубочковая фильтрация позволяет проникать в мочу из крови комплексам размером не более 6,4 нм и с молекулярным весом, не превышающим 70 кДа. Для оценки вклада различных механизмов в формирование суммарного пула микроРНК мочи, мы использовали осветленную мочу (т.е. СМ после осаждения клеток и клеточного дебриса) и фракции ВВ мочи. Для этого мочу разделяли на четыре фракции: 1 - обедненная клетками моча (супернатант 1), т.е. супернатант, полученный после центрифугирования мочи при 400 g; 2 - супернатант, полученный после центрифугирования супернатанта 1 при 17000 g (супернатант 2); 3 - фракция, содержащая СВВ, представляющая собой осадок после ультрацентрифугирования супернатанта 2 (при 100000 g) и состоящая из экзосомоподобных частиц, а также микровезикул до 200-300 нм; 4 - фракция,

обогащённая мелкими везикулами, включая экзосомы (ФОЭ), полученная путём фильтрации фракции СВВ через фильтры с диаметром пор 0,1 мкм. После выделения изучали состав СВВ и ФОЭ и концентрацию микроРНК во всех полученных фракциях мочи.

2.1. Сравнительное исследование внеклеточных везикул мочи здоровых людей и больных раком предстательной железы

Для описания ВВ, в том числе и экзосом, обычно используется комбинация параметров: размер, морфология, наличие специфических поверхностных маркеров. Основываясь на данных ТЭМ, нами было показано, что фракции СВВ мочи ЗД и больных РПЖ содержат ВВ размером от 20 до 230 нм. Большинство везикул имели вид сферических пузырей или «чашечек», что указывает на их экзосомальное/эндоцитарное происхождение (Рис. 1 А). Доля везикул размером от 30 до 120 нм (размер экзосом) составила 95% и 90% от общего числа везикул в образцах СВВ ЗД и больных РПЖ, соответственно (согласно критерию Манна-Уитни эта разница была незначительной); доля крупных частиц (до 230 нм) не превышала 5% и 10%, соответственно. Фильтрация фракции СВВ сквозь фильтр с диаметром пор 0,1 мкм увеличивала долю экзосомоподобных везикул размером от 30 до 120 нм почти до 100%, удаляя практически полностью везикулы размером более 110 нм. Связывание антител к CD9, CD24 и CD63 с поверхностью экзосомоподобных частиц наблюдалось практически для всех везикул размером от 30 до 100 нм и позволяет предположить, что эти частицы являются экзосомами (Рис. 1 Б).

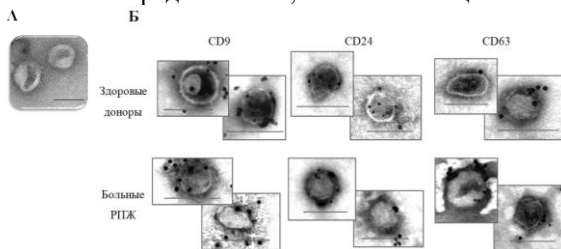


Рисунок 1. Внешний вид и размер ВВ мочи. (А) Ультраструктура отдельных экзосомоподобных микрочастиц мочи. (Б) ТЭМ-изображения ВВ мочи здоровых доноров и больных РПЖ до и после фильтрации сквозь фильтры с диаметром пор 0,1 мкм, меченые антителами к CD9, CD24 и CD63. Масштабная линия - 100 нм.

Таким образом, показано, что в моче ЗД и больных РПЖ как СВВ, так и ФОЭ не отличаются по строению и состоят из частиц сходного размера, количественная представленность которых во фракциях между больными и здоровыми донорами так же не отличается.

2.2. Количественное определение общего белка в составе внеклеточных везикул мочи

Косвенно количество микровезикул и экзосом можно оценить по концентрации общего белка в их препаратах. В литературе есть сообщения о том, что 48% общего белка мочи содержится в её осадке, 49% находится в растворимом виде (Pisitkun T, et al., 2006) и 3% присутствует в составе экзосом (Merchant ML, et al., 2010), которые содержат как универсальные (Moon P-G, et al., 2011), так и уникальные наборы белков (Dimov I, et al., 2009).

Концентрация белка в препаратах ВВ мочи была определена с помощью набора NanoOrange Protein Quantification Kit, в котором флуоресцентный краситель имеет высокую специфичность к белку, а протокол пробоподготовки включает в себя стадию нагрева образца с детергентом, т.е. позволяет лизировать ВВ и оценивать реальную концентрацию растворимых и мембранных белков. Достоверных отличий в концентрациях белка в препаратах ВВ мочи у больных РПЖ и ЗД обнаружено не было. Концентрации белка в препаратах ВВ мочи составили $12 \pm 0,7$ мг/мл (СВВ) и $9 \pm 0,4$ мг/мл (ФОЭ), что соответствует 171 ± 22 нг и 140 ± 21 нг на мл мочи, соответственно. С учетом нормальной концентрации белка в моче около 33 мкг/мл, препараты ВВ содержали не более 3 нг/мл, что составляет 0,6% от общего белка мочи. Следует отметить, что только 75% общего белка СВВ было связано с ФОЭ, которые составляют 90-95% всех ВВ. Таким образом, 5–10% крупных ВВ (>110 нм) содержали 25% всего белка, ассоциированного с ВВ, что свидетельствует о разной природе мелких и крупных, богатых белком ВВ. Например, часть крупных везикул могут быть эктосомами, отличающимися от экзосом механизмом высвобождения и составом, в том числе и белковым.

2.3. Исследование нуклеиновых кислот внеклеточных везикул мочи

На момент начала нашего исследования было известно, что в составе экзосом встречаются мРНК и микроРНК, а относительно ДНК были несистемные и плохо стыкующиеся друг с другом данные. Поскольку нами было обнаружено, что в ВВ мочи находится много белка, было исследовано также содержание ДНК и РНК. ДНК в составе фракции СВВ и ФОЭ мочи оценивали при помощи мультиплексной TaqMan ПЦР (α -сателлитные элементы и повторы LINE1).

В нашем исследовании не было обнаружено достоверных отличий в концентрациях внДНК в препаратах СВВ и ФОЭ мочи больных РПЖ и ЗД. Значение медианы для концентрации ДНК во фракции СВВ составило 18 пг/мл (максимальное значение было 200 пг/мл), а во ФОЭ – 2,6 пг/мл (максимальное значение - 50 пг/мл). Известно, что концентрация внДНК в моче здорового мужчины составляет 6-50 нг/мл (*Bryzgunova OE, et al., 2006*). Таким образом, во фракции микрочастиц содержится не более 0,2% общей внДНК мочи, что составляет всего несколько геном-эквивалентов ДНК. Учитывая, что в составе внДНК ДНК опухолевых клеток могут составлять не более 1-10%, такая низкая концентрация внДНК во фракции ВВ не позволяет использовать её для диагностики, а получение достоверных результатов общего исследования технически сложно и трудоемко. Предположительно, внДНК может быть связана с поверхностью ВВ мочи, подобно фрагментам ДНК размером 25–1500 н., чувствительным к обработке ДНКазой и обнаруженным в препаратах экзосом мочи (*Miranda KC, et al., 2010*).

Концентрация РНК во ФОЭ и СВВ мочи у ЗД и больных РПЖ не превышала 290 пг/мл мочи. Ранее показано, что концентрация внРНК в моче здорового мужчины составляет 24-140 нг/мл (*Bryzgunova OE, et al., 2006*), т.е. в составе

ВВ мочи содержится не более 0,2% суммарной внРНК. Размер суммарной РНК в составе ВВ мочи ЗД и пациентов с РПЖ в обеих фракциях ВВ варьировал от 30 до 180 н. Такие профили предполагают наличие тРНК (73-93 н.), 5,8 рРНК (~150 н.), snoРНК (10-20 н.), snРНК (60-300 н.), рiРНК (29-30 н.), miРНК (20-25 н.), siРНК (21-25 п.н.) и фрагментированных РНК (Li M, et al., 2014). С точки зрения практического использования микроРНК по-прежнему считаются выгодными мишенями для диагностики, а их концентрации во фракциях ВВ мочи в диапазоне десятков пг/мл согласно математическим расчётам достаточны для надежной детекции.

2.4. МикроРНК мочи

Для того чтобы выяснить как распределены микроРНК в моче, мы при помощи TaqMan ОТ-ПЦР в режиме реального времени исследовали концентрации микроРНК-19b, -25, -205, -125b (в супернатантах, полученных после центрифугирования мочи при 400 g и 17000 g, а также во фракциях СВВ и ФОЭ), которые предлагались в качестве потенциальных маркеров РПЖ (Jackson B, et al., 2014). МикроРНК-16, характеризующаяся относительно стабильной экспрессией, была использована в качестве нормализатора (Рис. 2).

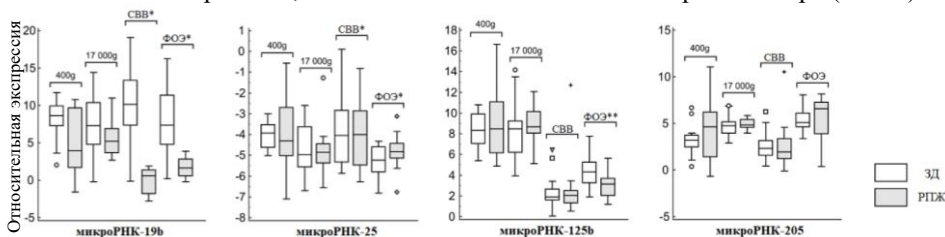


Рисунок 2. Уровень относительной экспрессии микроРНК в моче. * $P < 0,0001$; ** $P = 0,0150$.

С использованием критерия Манна-Уитни найдены статистически значимые различия между значениями dCt микроРНК-19b во фракциях СВВ и ФОЭ и dCt микроРНК-125b во фракциях ФОЭ у ЗД и пациентов с РПЖ (Табл. 1). ROC-анализ экспрессии микроРНК во всех фракциях мочи показал, что диагностически значимой была только разница в концентрациях микроРНК-19b во фракциях ВВ. Это позволило дифференцировать больных РПЖ от клинически ЗД с 93% чувствительностью при 100% специфичности и с 79% чувствительностью при 95% специфичности для фракций СВВ и ФОЭ, соответственно (Табл. 1). Таким образом, количественное определение микроРНК в ВВ мочи может быть использовано в качестве основного или, по крайней мере, вспомогательного критерия для диагностики РПЖ.

Для изучения распределения микроРНК между фракциями были рассчитаны коэффициенты корреляции между концентрациями микроРНК в пересчёте на исходный объем мочи с учетом всех разведений и в предположении равной эффективности ОТ и ПЦР. Показано (Табл. 2), что микроРНК присутствуют как во фракциях ВВ, так и во фракциях их не содержащих. Значимые

корреляции ($|R| > 0,6$, $P < 0,05$) концентраций микроРНК в разных фракциях мочи информируют о том, что эти микроРНК одинаково представлены и с более-менее близкой эффективностью могут быть выделены из этих фракций.

Таблица 1. Экспрессия и диагностический потенциал микроРНК в образцах мочи здоровых доноров и больных РПЖ

Фракция мочи				
микроРНК-205	400 g	17000 g	СВВ	ФОЭ
ddCt, ЗД/РПЖ	-1,03	-0,40	-0,81	-0,25
Чувствительность/Специфичность	64%/87%	71%/55%	64%/42%	57%/75%
P value	0,2658	0,1324	0,9855	0,6618
микроРНК-125b				
ddCt, ЗД/РПЖ	-0,97	-0,35	-0,38	1,26
Чувствительность/Специфичность	50%/67%	71%/65%	64%/53%	86%/65%
P value	0,7107	0,2142	0,9564	0,0150
микроРНК-25				
ddCt, ЗД/РПЖ	-0,01	0,11	0,39	-0,46
Чувствительность/Специфичность	43%/80%	64%/55%	50%/53%	71%/60%
P value	0,8272	0,5403	0,5848	0,1369
микроРНК-19b				
ddCt, ЗД/РПЖ	2,94	0,70	11,01	6,08
Чувствительность/Специфичность	50%/87%	50%/60%	93%/100%	79%/95%
P value	0,6784	0,6119	<0,0001	<0,0001

Таблица 2. Корреляция Спирмена для оценки изменений экспрессии микроРНК между различными фракциями мочи*

Здоровые доноры				Больные РПЖ		
17000 g		СВВ	ФОЭ	17000 g	СВВ	ФОЭ
микроРНК-16						
400 g	0,08 (P=0,7)	0,58 (P=0,009)	0,43 (P=0,058)	0,009 (P=1,0)	-0,03 (P=0,9)	-0,09 (P=0,75)
17000 g		0,12 (P=0,62)	0,06 (P=0,8)		0,03 (P=0,9)	0,2 (P=0,49)
CBB			0,9 (P<0,00001)			0,89(P=0,00002)
микроРНК-19b						
400 g	-0,35 (P=0,1)	0,16 (P=0,52)	-0,006 (P=0,98)	0,22 (P=0,5)	0,32 (P=0,3)	0,37 (P=0,19)
17000 g		0,16 (P=0,5)	0,12 (P=0,6)		0,33 (P=0,3)	0,32 (P=0,27)
CBB			0,42 (P=0,07)			0,89(P=0,00002)
микроРНК-25						
400 g	0,27 (P=0,3)	0,43 (P=0,06)	0,26 (P=0,27)	-0,51 (P=0,1)	0,13 (P=0,7)	0,39 (P=0,17)
17000 g		-0,02 (P=0,94)	-0,29 (P=0,21)		-0,64 (P=0,02)	-0,39 (P=0,17)
CBB			0,74 (P=0,0003)			0,46 (P=0,09)
микроРНК-205						
400 g	-0,04 (P=0,9)	0,53 (P=0,02)	0,57 (P=0,009)	0,42 (P=0,1)	0,43 (P=0,1)	0,43 (P=0,13)
17000 g		0,21 (P=0,4)	0,02 (P=0,95)		0,43 (P=0,1)	0,15 (P=0,6)
CBB			0,9 (P<0,00001)			0,74 (P=0,002)
микроРНК-125b						
400 g	0,25 (P=0,3)	0,25 (P=0,3)	0,31 (P=0,18)	-0,19 (P=0,5)	0,28 (P=0,3)	0,28 (P=0,33)
17000 g		0,32 (P=0,2)	0,37 (P=0,11)		-0,28 (P=0,3)	-0,35 (P=0,22)
CBB			0,95 (P<0,00001)			0,95(P<0,00001)

*все данные были нормированы на исходный объем мочи

Перераспределение микроРНК между фракциями ВВ мочи и безвезикулярными фракциями предположительно происходит при развитии онкологического заболевания ПЖ. Действительно, у ЗД микроРНК-25 преимущественно упакована в ВВ (фракции ФОЭ/СВВ мочи ($R=0,74$, $P=0,0003$)), а у больных РПЖ ее количество возрастает в СМ после 17000 g ($R=-0,64$, $P=0,015$, 17000 г/микровезикулы), т.е. наряду с упакованной во ВВ появляются комплексы этой микроРНК, не закрытые мембраной.

Таким образом, распределение микроРНК между безвезикулярными комплексами и различными типами ВВ может быть дополнительным диагностическим критерием наряду с изменениями экспрессии микроРНК. Использование ВВ в качестве источника микроРНК-биомаркеров вместо супернатантов мочи позволит преодолеть некоторые технические трудности работы с большими объемами жидкости при выделении РНК.

2.5. *Исследование вн-микроРНК мочи при помощи микрочипового анализа*

2.5.1. *Концентрации микроРНК в различных фракциях мочи при развитии заболеваний предстательной железы*

Известно, что надмолекулярные комплексы микроРНК могут попадать в мочу из клеток эндотелия мочевого пузыря и мочеточника, равно как и из секрета ПЖ. Особенности распределения микроРНК между фракциями мочи особенно важны для выбора оптимального источника микроРНК, попадающих в мочу именно из ПЖ и являющихся потенциальными маркерами заболеваний этого органа. Это исследование было выполнено на платформе miRCURY LNA miRNA qPCR Panels, основанной на количественной SYBR Green ПЦР с использованием LNA праймеров. Нами была исследована экспрессия 84-х микроРНК, из которых 68 микроРНК входили в панель Exiqon для исследования микроРНК мочи, а остальные, специфичные для РПЖ, были добавлены нами исходя из литературных данных (Табл. 3).

Для сравнительного анализа экспрессии микроРНК в разных фракциях мочи в исследование были включены образцы СВВ и СМ (17000 g), полученные от трёх групп доноров (по 10 человек в каждой группе): ЗД, с ДГПЖ и РПЖ.

Таблица 3. Набор микроРНК для профилирования на платформе miRCURY LNA PCR

микроРНК в составе стандартной панели Exiqon (n=68)	дополнительные микроРНК, (n=16)
101-3p, 103a-3p, 106a-5p, 106b-5p, 107, 125b-5p, 126-3p, 141-3p, 145-5p, 148a-3p, 149-5p, 16-5p, 17-5p, 187-3p, 191-5p, 193b-3p, 195-5p, 200a-3p, 200b-3p, 200c-3p, 20a-5p, 210, 21-5p, 221-3p, 222-3p, 23b-3p, 24-3p, 25-3p, 26b-5p, 27b-3p, 29a-3p, 29b-3p, 29c-3p, 30a-5p, 30b-5p, 30c-5p, 30d-5p, 30e-3p, 30e-5p, 34a-5p, 375, 429, 574-3p, 92a-3p, 93-5p, 99b-5p, 133a, 151a-5p, 22-3p, 22-5p, 378a-3p, 423-5p, 425-5p, 582-5p, 660-5p, 10b-5p, 15a-5p, 15b-5p, 31-3p, 31-5p, let-7a-5p, let-7b-5p, let-7d-3p, let-7d-5p, let-7e-5p, let-7f-5p, let-7g-5p, let-7i-5p	346, 451a, 483-5p, 214, 331-3p, 130a-3p, 33a-5p, 19b, 205, 1285, 100, 183, 146a-5p, 484, 143, let-7c

В каждом исследуемом образце было обнаружено не менее 70-ти из 84-х микроРНК; более чем в 70% образцов выявлено 72 микроРНК. В таблице 4 представлены результаты сравнения экспрессии микроРНК между фракциями СВВ и СМ у разных групп доноров (ddCt), достоверно отличающейся между фракциями мочи хотя бы в одной из исследуемых групп доноров/пациентов.

Различия в представленности микроРНК во фракциях мочи были в основном качественными, но были обнаружены и микроРНК, концентрация которых в одной из фракций мочи была много больше, чем в другой. Например, микроРНК-451a и микроРНК-143-3р, были обнаружены в СМ и практически отсутствовали в образцах СВВ. Присутствие микроРНК-451a именно в СМ может объясняться её появлением из крови, поскольку экспрессия этой микроРНК ассоциирована с гемолизом (*Givens, R., et al., 2013*), при этом, выделение фракции СВВ мочи позволяет избавиться от балластных микроРНК крови. Наибольшее количество достоверных различий в уровнях микроРНК между фракциями мочи, оценённое с использованием критерия Уилкоксона, наблюдалось в группе больных РПЖ (38 микроРНК), наименьшее – в группе здоровых доноров (15 микроРНК) (Табл. 4).

Для последующего анализа мишеней и функций микроРНК, основываясь на данных таблицы 4, были выбраны две группы микроРНК, причём для их формирования принимали во внимание, как значимость различий, так и их характер и амплитуду. В первую группу были включены 9 микроРНК (let-7i-5р, микроРНК-22-3р, -23b-3р, -30b-5р, -30c-5р, -92a-3р, -93-5р, -331-3р, -429), ассоциированные, предположительно, с одной из изучаемых фракций вне зависимости от группы доноров, для которых значимые различия были выявлены в СМ и фракции СВВ. Во вторую группу вошли микроРНК, потенциально связанные с развитием РПЖ или какой-либо патологией ПЖ, поскольку их экспрессия значительно отличалась между фракциями мочи только в группе ЗД или больных РПЖ (let-7a-5р, -7d-3р, микроРНК-26b-5р, -27b-3р, -30a-5р, -30e-5р, -107, -375, -582-5р) или не отличалась только у ЗД (микроРНК-29a-3р, -29b-3р, -29c-3р, -101-3р, -141-3р, -423-5р), но имелись различия в двух оставшихся группах. Мы предположили, что именно эти микроРНК могут быть связаны с развитием онкологических заболеваний ПЖ. С использованием базы данных DIANA были проанализированы общие для обеих групп мишени микроРНК. К сожалению, впоследствии в рамках категорий KEGG не было обнаружено прямой взаимосвязи между микроРНК-мишенями из первой группы и механизмами секреции или функциями ВВ. Среди общих мишеней части микроРНК присутствовали гены, участвующие в синтезе жирных кислот (Fatty acid biosynthesis – FASN) и ряде сигнальных путей: Hippo signaling pathway (11 генов), pathways in cancer (22 гена), p53 signaling pathway (9 генов). Поиск же общих мишеней микроРНК из первой группы в рамках категорий GO показал, что этот набор микроРНК регулирует экспрессию некоторых РНК-связывающих белков (например, AGO1, ANNAK,

HNRNPM, NUCKS1, NUFIP2, RC3H2), часть из которых были ранее экспериментально обнаружены в экзосомах (по данным Exocarta 5).

Таблица 4. Результаты сравнения экспрессии микроРНК между фракциями мочи, полученные с помощью микрочипового анализа

микроРНК	РПЖ		ДГПЖ		ЗД	
	P-value	ddCt (CBB - CM)	P-value	ddCt (CBB - CM)	P-value	ddCt (CBB - CM)
let-7a-5p	0,6523	0,2596	0,5781	-0,3358	0,0469	-1,2472
let-7b-5p	0,0977	-1,9521	0,0156	-1,9732	0,0391	-2,8268
let-7c-5p	0,0781	-1,1113	0,0313	-0,8976	0,0547	-1,6267
let-7d-3p	0,0078	-1,1815	0,2188	-0,4889	0,0547	-0,5068
let-7i-5p	0,0273	-1,7690	0,0156	-1,9217	0,0313	-1,6297
miR-15a-5p	0,0039	-0,8210	0,9375	0,1126	0,1484	-0,9342
miR-22-3p	0,0039	-1,8357	0,0313	-1,3648	0,0156	-1,7192
miR-23b-3p	0,0039	1,0138	0,0313	0,6452	0,0078	0,7962
miR-25-3p	0,0039	-1,6459	0,0156	-1,5436	0,0156	-1,3614
miR-26b-5p	0,0391	1,2291	0,0781	0,6546	0,9453	-0,1485
miR-27b-3p	0,0195	0,7474	0,2969	0,2305	0,3125	-0,2335
miR-29a-3p	0,0078	0,7380	0,0313	0,8929	0,5469	-0,2138
miR-29b-3p	0,0039	1,4939	0,0469	1,0169	0,3828	0,1817
miR-29c-3p	0,0078	0,6175	0,0313	0,6002	0,7422	0,0017
miR-30a-5p	0,0078	0,9227	0,1563	0,3559	0,5469	0,1076
miR-30b-5p	0,0039	1,6768	0,0156	1,1478	0,0391	0,7509
miR-30c-5p	0,0039	2,1381	0,0156	1,1340	0,0078	1,1448
miR-30e-5p	0,0391	0,6934	0,2188	0,2621	0,6406	-0,3790
miR-31-3p	0,0313	1,3094	0,0313	0,8869	0,0547	1,1269
miR-31-5p	0,0039	0,7300	0,0313	1,0441	0,2500	0,2783
miR-34a-5p	0,0117	-1,0906	0,0781	-0,9627	0,0313	-1,4074
miR-92a-3p	0,0039	1,0340	0,0156	0,8423	0,0234	1,0953
miR-100-5p	0,0195	-0,9161	0,0469	-0,9736	0,0547	-1,1450
miR-101-3p	0,0039	0,9452	0,0156	1,0734	0,3828	0,2155
miR-106b-5p	0,5703	0,2037	0,0313	0,7032	0,2969	0,1872
miR-107	0,0273	0,4468	1,0000	0,0529	0,6406	0,1529
miR-141-3p	0,0195	0,8915	0,0156	1,3346	0,1953	0,3761
miR-146a-5p	0,0313	-1,1711	0,1250	-1,2522	0,1875	-0,8803
miR-193b-3p	0,0039	-1,2846	0,0313	-1,2351	0,1563	-1,1112
miR-200a-3p	0,0391	0,3168	0,0781	0,4157	0,7422	-0,1160
miR-205-5p	0,0195	-1,0134	0,0781	-0,8749	0,1563	-1,0264
miR-210-3p	0,0078	-1,5356	0,8125	-0,2770	0,0313	-0,9959
miR-221-3p	0,0547	-0,7723	0,0313	-0,9054	0,0156	-1,5029
miR-331-3p	0,0039	1,9201	0,0156	1,2673	0,0156	1,1551
miR-375	0,0078	-2,3628	0,0625	-1,8577	0,1094	-0,7023
miR-378a-3p	0,0039	-2,0432	0,0781	-1,2028	0,0234	-1,3745
miR-423-5p	0,0156	-2,1558	0,0156	-2,5596	0,1250	-1,2498
miR-425-5p	0,0078	-1,1336	0,2188	-0,9404	1,0000	0,0648
miR-429	0,0078	1,1766	0,0313	0,7491	0,0078	0,5323
miR-574-3p	0,0273	1,1174	0,4375	0,0890	0,5469	0,5830
miR-582-5p	0,0078	1,7516	0,0625	1,1115	0,3125	0,5471
miR-660-5p	0,0391	0,4908	0,4688	0,1660	1,0000	-0,0315

*CBB – фракция; CM – супернатант мочи после 17000 g. Жирным выделены значения P < 0,05.

Таким образом, можно предположить, что секреция микроРНК в составе везикул или иных комплексов определяется внутриклеточными механизмами селекции способа секреции каждой конкретной микроРНК.

Что касается мишеней микроРНК из второй группы, несмотря на другой характер распределения микроРНК между фракциями мочи, результаты анализа с использованием KEGG во многом были схожие. Также были обнаружены ферменты синтеза жирных кислот, вовлечение этих микроРНК в регуляцию p53 signaling (8 генов), Hippo signaling pathway (9 генов), cell cycle (13 генов), PI3K-Akt signaling (21 ген), и включая связанные со злокачественной трансформацией: Transcriptional misregulation in cancer (11 генов). Несмотря на то, что мы выделили лишь две группы микроРНК, основываясь на особенностях их распределения между фракциями мочи, при работе с базой данных DIANA оказалось, что в этих группах прослеживаются подгруппы, в основе которых лежит пересечение наборов мишеней родственных микроРНК (например, микроРНК-29a, -29b, -29c и -30a, -30e). Это доказывает необходимость поиска иных дополнительных способов стратификации выбранных микроРНК для уменьшения неоднородности выборки и выполнения глубокого анализа их регуляторных сетей для наиболее адекватного анализа связи микроРНК во фракции СВВ с развитием РПЖ.

Именно поэтому мы попытались иначе проанализировать полученные данные об экспрессии 84-х микроРНК в СМ и СВВ мочи. Однако необходимо учитывать, что если сравнение экспрессии одной и той же микроРНК между фракциями мочи одного донора можно сделать без какой-либо нормализации, то для сравнений между донорами нормализация данных является обязательным условием. Одним из оптимальных вариантов является нормализация экспрессии индивидуальной микроРНК на средний уровень экспрессии всех микроРНК, однако он хорош только при использовании масштабных методов исследования. Более удобным при использовании счетного числа мишеней является парная нормализация, при которой уровень одной микроРНК нормируется на каждую из оставшихся микроРНК. Далее выбираются характеристические пары микроРНК (*Boeri M., et al., 2011*), наиболее подходящие для разделения исследуемых групп. После этого, с использованием метода Random Forests с селекцией Boruta, нами были статистически обработаны такие данные, как относительная встречаемость отдельных значимых пар микроРНК относительно общего числа сравнений (запусков), разность медиан, доверительный интервал и значимость (p). Для отбора лучших диагностических пар микроРНК были сформулированы критерии (условия) их включения в диагностическую панель: №1. дифференциальная экспрессия в максимальном количестве доноров/пациентов; №2. наибольшее расстояние между медианами (dCt) в рассматриваемых группах доноров; №3. наибольшая удаленность 95% доверительного интервала (CI) для разности медиан от 0, но не менее 0,1;

№4. наименьшее значение radj (уровень значимости с поправкой на множественные сравнения) (Табл. 5).

Таблица 5. Значимые пары микроРНК для разделения групп ЗД и больных ДГПЖ и РПЖ*.

пары микроРНК	Частота встречаемости**, %	ΔCt (95% CI)	AUC	P	Radj
СМ: ЗД-РПЖ (1770 пар)					
-107/-26b-5p	74,8	-0,74 (-1,94;-0,33)	0,93	0,001	0,02
-93-5p/-29b-3p	36,3	-0,54 (-1,31;-0,26)	0,92	0,002	0,02
-22-3p/-30e-5p	36,0	-0,76 (-1,95;-0,23)	0,86	0,007	0,03
-375/-26b-5p	6,2	-1,71 (-3,92;-0,17)	0,83	0,014	0,03
-29b-3p/-205-5p	4,6	1,92 (0,25;2,81)	0,88	0,004	0,02
-331-3p/-205-5p	0,3	1,72 (0,24;3,06)	0,79	0,002	0,04
-205-5p/-26b-5p	15,2	-1,4 (-3,17;-0,55)	0,88	0,004	0,02
-29a-3p/-205-5p	10,3	1,69 (0,57;2,74)	0,83	0,013	0,03
-151a-5p/-205-5p	6,3	1,18 (0,43;3,29)	0,84	0,01	0,03
let-7e-5p/-23b-3p	15,8	0,88 (0,27;1,35)	0,92	0,002	0,02
СМ: ЗД-ДГПЖ (254 пары)					
-30a-5p/let-7g-5p	98,5	0,57 (0,28;1,09)	0,83	0,014	0,04
-200a-3p/let-7a-5p	3,9	0,53 (0,03;1,34)	0,7	0,005	0,14
-205-5p/let-7a-5p	0,2	0,86 (0,06;2,71)	0,78	0,041	0,06
СМ: ДГПЖ-РПЖ (254 пары)					
-103a-3p/-30c-5p	28,6	1,03 (0,03;1,45)	0,79	0,034	0,05
-30c-5p/-30e-5p	21,8	-0,43 (-1,13;-0,17)	0,83	0,014	0,04
-100-5p/-30e-3p	18,9	0,73 (0,02;1,02)	0,77	0,05	0,05
-30c-5p/-16-5p	15,2	-0,74 (-1,36;-0,01)	0,84	0,011	0,04
-23b-3p/-103a-3p	8,8	-0,41 (-0,99;-0,03)	0,78	0,041	0,05
-100-5p/-30a-5p	7,2	0,52 (0,09;1,39)	0,79	0,034	0,05
СВВ: ЗД-РПЖ (849 пар)					
-20a-5p/-16-5p	50,3	0,39 (0,17;0,8)	0,89	0,003	0,02
-24-3p/-200b-3p	12,0	0,47 (0,13;1,08)	0,88	0,006	0,02
-101-3p/-30e-5p	11,8	-0,28 (-0,46;-0,09)	0,82	0,018	0,03
-24-3p/-16-5p	5,3	0,45 (0,09;0,95)	0,85	0,008	0,02
-99b-5p/-24-3p	3,5	-0,25 (-0,86;-0,06)	0,76	0,01	0,05
-30b-5p/-125b-5p	3,3	0,32 (0,06;0,91)	0,8	0,023	0,03
-31-5p/-16-5p	1,7	0,77 (0,08;1,23)	0,85	0,012	0,03
-30c-5p/-16-5p	0,3	0,42 (0;0,9)	0,82	0,016	0,03
-30b-5p/-16-5p	0,1	0,85 (0,08;1,5)	0,79	0,028	0,03
СВВ: ЗД-ДГПЖ (849 пар)					
-107/-31-5p	95,3	-0,73 (-1,95;-0,27)	0,87	0,007	0,01
-31-5p/-16-5p	61,5	0,79 (0,31;1,25)	0,89	0,004	0,01
-31-5p/-30e-3p	43,8	0,69 (0,15;1,5)	0,88	0,006	0,01
-31-5p/-200b-3p	23,9	0,58 (0,18;1,3)	0,88	0,006	0,01
-31-5p/-660-5p	22,1	0,74 (0,08;1,79)	0,84	0,002	0,01
-29a-3p/-660-5p	20,4	0,65 (0,38;1,06)	0,86	0,009	0,01
-31-5p/-200c-3p	17,3	0,63 (0,25;1,24)	0,83	0,014	0,02
-107/-141-3p	5,6	-0,79 (-1,95;-0,09)	0,78	0,041	0,04
-29a-3p/-30e-3p	1,6	0,82 (0,04;1,16)	0,84	0,011	0,01
-660-5p/-24-3p	0,8	-0,58 (-1,16;-0,05)	0,87	0,007	0,01

пары микроРНК	Частота встречаемости**, %	ΔC_t (95% CI)	AUC	P	Padj
СВВ: ДГПЖ-РПЖ (254 пары)					
-191-5p/-31-5p	22,7	0,41 (0,16;1,09)	0,91	0,003	0,01
-100-5p/-30d-5p	11,1	0,32 (0,15;1,27)	0,84	0,011	0,02
-106b-5p/-191-5p	7,4	-0,71 (-1,34;-0,29)	0,88	0,004	0,01
-93-5p/-22-3p	2,9	-0,4 (-0,75;-0,02)	0,78	0,003	0,04
-191-5p/-200b-3p	0,3	0,54 (0,02;1,21)	0,83	0,013	0,02
-22-3p/-92a-3p	0,1	0,44 (0,12;0,89)	0,78	0,041	0,04
-191-5p/-200a-3p	0,1	0,69 (0,17;1,13)	0,83	0,013	0,02

*СВВ – фракция суммарных внеклеточных везикул, СМ - супернатант мочи.

**Указана частота встречаемости комбинации за 1000 запусков алгоритма Boruta

Таким образом, условие №1 позволяет отобрать пары, во-первых, наименее чувствительные к выбросам, а, во-вторых, микроРНК в составе этих пар потенциально могут более эффективно комбинироваться с оставшимися микроРНК для разделения исследуемых групп доноров. Условия №2 и №3 дают информацию о «разнесённости» значений в группах сравнения и важны для оценки практической применимости выполненного исследования. Условие №4 позволяет отобрать пары микроРНК, имеющие наибольшие отличия с точки зрения статистического анализа. Панель формировали из пар микроРНК, которые максимально соответствовали четырём перечисленным критериям. Далее для каждой выбранной пары был выполнен ROC анализ (Табл. 5).

Таким образом, парная нормализация (в отличие от нормализации на глобальное среднее) позволила идентифицировать существенно большее количество диагностических сигнатур и выявить в каждой группе сравнения уникальные наборы пар микроРНК (Табл. 5).

Для разделения групп ЗД и РПЖ с использованием микроРНК СМ наилучшие показатели наблюдались для следующих пар микроРНК: -375/-26b-5p и -29a-3p/-205-5p (наилучшие показатели доверительного интервала разности медиан от нуля); -331-3p/-205-5p, -205-5p/-26b-5p, -29b-3p/-205-5p и -151a-5p/-205-5p (наибольшая разность медиан). Самый высокий процент встречаемости наблюдался для пары -107/-26b-5p, однако разница медиан между этими двумя группами составила менее 1. При разделении этих же двух групп доноров, но с использованием фракции СВВ наибольшая выявляемость (50,3%) наблюдалась для пары -20a-5p/-16-5p, однако разница медиан была невысокой (не превышала 0,39), в отличие от пар -31-5p/-16-5p и -30b-5p/-16-5p, для которых разница медиан составила 0,77 и 0,85, соответственно.

Для выявления больных ДГПЖ, т.е. разделения групп ЗД-ДГПЖ и ДГПЖ-РПЖ с использованием микроРНК СМ были выявлены 3 и 6 пар микроРНК, соответственно. При этом у некоторых пациентов микроРНК из состава этих пар не были обнаружены, что сильно уменьшало их диагностическую ценность. Нами была выявлена лишь одна значимая (с частотой 98,5%) пара микроРНК, способная разделить группы ЗД и ДГПЖ - микроРНК-30a-5p/

let-7g-5p. При использовании фракции СВВ для разделения групп 3Д-ДГПЖ наибольшая разница медиан (0,82) была обнаружена для пары -29a-3p/-30e-3p, однако 95% CI практически не отличался от 0; наибольший процент выявляемости (95,3%) наблюдался для пары -107/-31-5p. Для разделения групп ДГПЖ-РПЖ с использованием СВВ наилучшие показатели наблюдались для пар -191-5p/-31-5p и -106b-5p/-191-5p (Табл. 5).

Однако, несмотря на наличие уникальных пар для каждой из шести групп сравнения, часть микроРНК была обнаружена одновременно в нескольких группах. Ещё раз стоит отметить факт присутствия части микроРНК только в СМ (-23b-3p, -30a-5p, -205-5p) или только во фракции СВВ (-24-3p, -31-5p, -200b-3p). Интересно, что внутри каждой группы сравнения присутствуют микроРНК, многократно встречающиеся в разных комбинациях. Например, при сравнении 3Д-РПЖ в СМ микроРНК-205-5p и -26b-5p были обнаружены в 50% и 40% комбинаций, соответственно, а 3Д-ДГПЖ в СВВ микроРНК-31-5p встречалась в 6 из 10 пар (Табл. 5). Предположительно, наиболее часто встречающиеся микроРНК являются опухолеспецифическими, а индивидуальные микроРНК, входящие в состав этих пар, могут использоваться в качестве нормализаторов. Этот принцип будет использован нами для создания алгоритма с целью разделения групп доноров между собой.

Необходимо отметить, что из-за возможности наличия в ПЖ у пациентов с ДГПЖ недиагностированных очагов с признаками малигнизации, а у больных РПЖ – участков гиперплазии, в СМ наблюдалось небольшое отличие по значимости в парах микроРНК (Табл. 5).

Далее для выбранных пар микроРНК была оценена чувствительность и специфичность при разделении исследуемых групп. Показано, что при 100% специфичности наибольшей диагностической эффективностью обладают пары микроРНК-107/-26b-5p (AUC=0,93), -375-3p/-26b-5p (AUC=0,83) для группы сравнения СМ: 3Д-РПЖ и пары -31-5p/-16-5p (AUC=0,89), -31-5p/-200b (AUC=0,88), -31-5p/-30e-3p (AUC=0,88) и -31-5p/-660-5p (AUC=0,84) для группы сравнения СВВ: 3Д-ДГПЖ. С помощью диаграмм распределений была выполнена оценка степени разделения этих пар микроРНК в группах сравнения (Рис. 3). Показано, что наиболее значимыми показателями для разделения групп 3Д-РПЖ обладает пара -375-3p/-26b-5p, присутствующая в СМ, а для разделения групп 3Д-ДГПЖ – пара -31-5p/-660-5p в составе СВВ. Для всех остальных пар микроРНК в различных группах сравнения наблюдалось более «плотное» расположение значений отношений.

В результате выполненного анализа в составе двух фракций мочи у трёх групп доноров наибольшее число диагностически значимых пар микроРНК было обнаружено для разделения групп 3Д-РПЖ независимо от выбранной фракции мочи. Наилучшими статистическими показателями обладали пары микроРНК-107/-26b-5p и микроРНК-375-3p/-26b-5p в составе СМ.

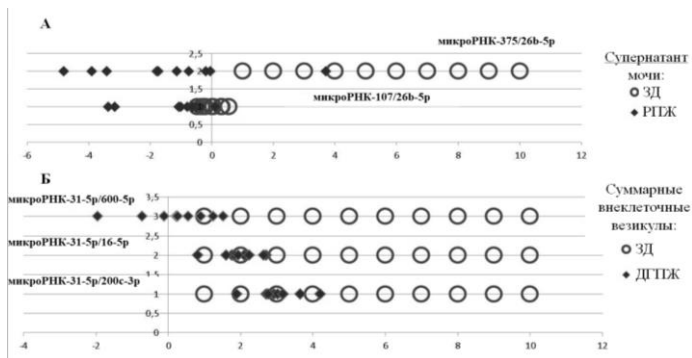


Рисунок 3. Диаграмма разделения некоторых пар микроРНК в составе СМ (А) и фракции СВВ мочи (Б).

При ином сравнении групп доноров (ЗД-ДГПЖ и ДГПЖ-РПЖ), к сожалению, при используемой статистической обработке полученных данных не удалось выявить достоверно отличающиеся пары микроРНК во фракции СВВ, а во фракции СМ достоверность отличий некоторых пар микроРНК находилась на границе значимости. Однако при сравнении групп ЗД-ДГПЖ во фракции СВВ было обнаружено наибольшее число диагностически значимых пар микроРНК: -31-5p/-16-5p, -31-5p/-200b, -31-5p/-30e-3p, -31-5p/-660-5p, что свидетельствует о возможном использовании этой фракции мочи при создании диагностикумов онкологических заболеваний ПЖ.

Полученные нами результаты говорят о необходимости использования нескольких, а не одной, комбинаций микроРНК для создания диагностических систем (чему и посвящена наша дальнейшая работа), позволяющих с абсолютными показателями чувствительности и специфичности разделять исследуемые группы доноров между собой.

2.5.2. Создание алгоритма анализа данных на основе оценки уровня внеклеточных микроРНК мочи для диагностики онкологических заболеваний предстательной железы

В отличие от «вычислительного алгоритма», который реализован в виде компьютерной программы или отдельного программного обеспечения, в нашем исследовании мы используем термин «алгоритм» в более широком и традиционном смысле. Представленный здесь алгоритм описывает ряд шагов, необходимых для определения значений cut-off и последовательного анализа данных экспрессии микроРНК в соответствии с выбранными значениями cut-off, для более простой классификации доноров в группах случай/контроль. Пары микроРНК выбирали в порядке наибольшей чувствительности при 100%-ной специфичности, принимая также во внимание уровень экспрессии маркеров. Создание такой диагностической системы включает следующие этапы (Рис. 4, на примере систем для постановки диагноза «точно РПЖ»):

Шаг 1. Выбираем группу сравнения (в данном случае «РПЖ») и контрольную (здесь «ЗД+ДГПЖ»). Анализируем отношение уровней выбранных пар микроРНК во фракции СМ или СВВ. Если распределение

значений является нормальным, то рассчитываем среднее значение и стандартное отклонение (SD) для контрольной группы; если же условие нормальности не выполнено, то выполняем расчёты медианы и квантилей 5% и 95% (Q5, Q95). В настоящем исследовании для всех случаев было подтверждено нормальное распределение, поэтому были рассчитаны средние значения и стандартное отклонение.

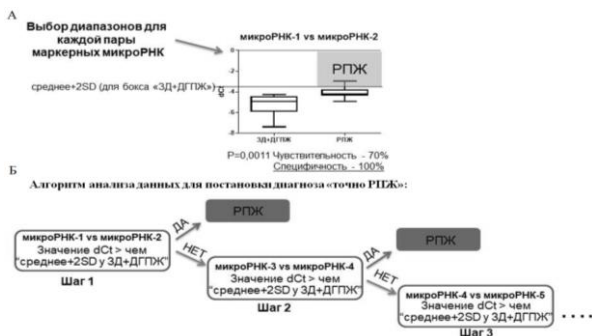


Рисунок 4. Общая схема алгоритма анализа данных для выявления и мониторинга больных РПЖ. (А) Определение диапазона для каждой пары маркерных микроРНК; (Б) Общая схема алгоритма анализа данных для постановки диагноза «точно РПЖ».

Шаг 2. Анализируем данные об отношениях микроРНК в образцах выбранной фракции мочи пациентов с РПЖ. Пороговое значение следует определять как «среднее+2SD» или «среднее-2SD», полученное из анализа отношений пар микроРНК в контрольной группе «ЗД+ДГПЖ». Если в большинстве случаев значения у группы сравнения были меньше, чем у контрольной группы, то используется «-2SD», в противном случае используется «+2SD» (Рис. 4). Считается, что группа сравнения со значениями dCt/ddCt определенной пары микроРНК в одной и той же фракции мочи за пределами cut-off относится к РПЖ.

Шаг 3. Для оставшихся пациентов выполняем оценку отношений уровня либо той же пары микроРНК, но в другой фракции мочи, либо следующей пары микроРНК в той же/другой фракции мочи. Выявление больного РПЖ происходит так же, как описано в шагах 1-2.

Шаг 4. Шаги 2 и 3 повторяются с использованием следующих пар микроРНК при условии невозможности отнесения образца группы сравнения в группу «точно РПЖ» на предыдущих шагах. Алгоритм повторяется до тех пор, пока все пациенты не будут правильно классифицированы или не будет исчерпан пул аналитических систем.

Такая структура алгоритма позволяет использовать наименьшее количество аналитических систем. Для увеличения достоверности анализа и статистической мощности один и тот же подход можно повторить с использованием разных комбинаций пар микроРНК и с использованием различных сочетаний групп в качестве контролей. Например, наряду с описанным алгоритмом для постановки диагноза «точно РПЖ», можно составить блоки для постановки диагнозов «точно болен» (ДГПЖ+РПЖ

относительно группы ЗД (контроль)), «точно не РПЖ» (ЗД+ДГПЖ относительно группы РПЖ (контроль)), «точно здоров» (ЗД относительно группы ДГПЖ+РПЖ (контроль)).

Таким образом, предложенный алгоритм анализа данных позволил:

- определить пациентов, страдающих ДГПЖ или РПЖ с абсолютной чувствительностью и специфичностью (Табл. 6), используя анализ уровня экспрессии семи микроРНК (в составе четырёх систем);
- выявить пациентов с РПЖ с 90% чувствительностью при 100% специфичности: девять микроРНК в составе пяти систем (Табл. 7);
- с абсолютной чувствительностью и специфичностью выявить пациентов, не имеющих признаков РПЖ (ЗД и ДГПЖ) (Табл. 8), анализируя уровень экспрессии девяти микроРНК (вошедших в пять аналитических систем);
- со 100% чувствительностью и специфичностью выявить ЗД (Табл. 9), анализируя уровень пяти микроРНК (три аналитические системы).

Поскольку нам не удалось идентифицировать одного пациента, как больного РПЖ (Табл. 7), но получилось отнести его к группе пациентов с онкологическими заболеваниями ПЖ (Табл. 6), точность предложенного алгоритма анализа данных составила 97,5%.

Таблица 6. Пример использования алгоритма анализа данных для выявления больных с онкологическими заболеваниями ПЖ. ДГПЖ+РПЖ относительно группы ЗД (контроль)

№ Образца	Шаг 1 микроРНК-331/-92a (CM)	Шаг 2 микроРНК-23b/let-7g (CM)	Шаг 3 микроРНК-148a/-24 (CBV)	Шаг 4 микроРНК-148a/-29b (CM/CBV)	Количество систем, давших положительный результат
Пациенты с ДГПЖ					
1	☹				1
2	☹				1
3	☹	☹	☹		3
4			☹		1
5			☹		1
6			☹		1
7	☹	☹		☹	3
8				☹	1
9		☹			1
10	☹				1
Пациенты с РПЖ					
1	☹				1
2		☹			1
3			☹	☹	2
4	☹				1
5		☹	☹	☹	3
6	☹	☹	☹	☹	4
7	☹				1
8	☹	☹			2
9		☹			1
10		☹		☹	2

Таблица 7. Пример использования алгоритма анализа данных для выявления больных РПЖ. РПЖ относительно группы ЗД+ДГПЖ (контроль)

№ Образца РПЖ	Шаг 1 микроРНК -30a/-125b (СМ)	Шаг 2 микроРНК -425/-331 (СМ)	Шаг 3 микроРНК -29b/-21 (СМ/СВВ)	Шаг 4 микроРНК -191/-200a (СМ)	Шаг 5 микроРНК -331/-106b (СМ/СВВ)	Количество систем, выдавших положительный результат
1	⊗					1
2						0
3	⊗	⊗	⊗			3
4				⊗	⊗	1
5		⊗			⊗	1
6	⊗	⊗		⊗		4
7						1
8	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	5
9			⊗			1
10			⊗			1

Выбранные диагностические системы показали определенную степень избыточности, т.е. некоторые пациенты могут быть классифицированы как больные РПЖ (Табл. 7) или как не имеющие признаков РПЖ (Табл. 8) на основе анализа уровня экспрессии одной, двух или более пар микроРНК.

Таблица 8. Пример использования алгоритма анализа данных для выявления доноров, не имеющих признаков РПЖ. ЗД+ДГПЖ относительно группы РПЖ (контроль).

№ Образца	Шаг 1 микроРНК -106b/-191 (СВВ)	Шаг 2 микроРНК -100/-30с (СМ)	Шаг 3 микроРНК -31/-29b (СМ/СВВ)	Шаг 4 микроРНК -22/-103a (СВВ)	Шаг 5 микроРНК -106/-34a (СВВ)	Количество систем, давших положительный результат
Здоровые доноры						
1	⊗	⊗				2
2			⊗	⊗		1
3						1
4				⊗		1
5				⊗		1
6	⊗					1
7		⊗				1
8	⊗	⊗	⊗	⊗		4
9		⊗				1
10	⊗					1
Пациенты с ДГПЖ						
1	⊗		⊗			2
2	⊗	⊗	⊗			3
3	⊗	⊗	⊗	⊗		4
4	⊗					1
5		⊗				1
6	⊗					1
7					⊗	1
8	⊗				⊗	2
9			⊗	⊗		2
10					⊗	1

Таблица 9. Пример использования алгоритма анализа данных для выявления группы ЗД.
ЗД относительно группы ДГПЖ+РПЖ (контроль).

№ Образца РПЖ	Шаг 1 микроРНК -29a/-200b (СМ/СВВ)	Шаг 2 let-7f/ микроРНК-205 (СМ)	Шаг 3 микроРНК -200a/-200b (СВВ)	Количество систем, выдавших положительный результат
1	☼			1
2			☼	1
3	☼		☼	2
4	☼			1
5	☼			1
6		☼		1
7		☼		1
8		☼		1
9		☼		1
10	☼			1

Такой аналитический подход (с использованием избыточности данных) позволяет увеличить устойчивость диагностической системы и отнести донора к верной группе более чем в 90% случаев, а также обеспечивает отсутствие ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Анализируя aberrantную экспрессию микроРНК в различных фракциях мочи и объединяя полученные данные, мы смогли увеличить диагностическую эффективность предложенного алгоритма, что является принципиально важным моментом при необходимости постановки диагноза на ранних стадиях заболевания.

Таким образом, на данном этапе работы, предложенная диагностическая панель включает в себя 24 микроРНК (микроРНК-21, -22, -23b, -24, -29a, -29b, -30a, -30c, -31, -34a, -92a, -100, -103a, -106b, -125b, -148a, -191, -200a, 200b, -205, -331, -425 и let-7f, let-7g).

2.6. Верификация панели из 12 внеклеточных микроРНК – потенциальных биомаркеров новообразований предстательной железы

Анализируя aberrantную экспрессию микроРНК в различных биологических жидкостях, необходимо учитывать факт небольшой разницы в концентрациях микроРНК – потенциальных онкомаркеров – между исследуемыми группами доноров. Такая особенность микроРНК приводит исследователя к необходимости более тщательно продумывать дизайн экспериментов, включая количество и тип spike-in контролей, количество необходимых повторений, а также разработку нескольких критериев включения и/или исключения как донорских образцов крови и мочи, так и самих микроРНК, полученных из этих образцов. Сформулировав все эти требования и разработав аналитические системы, можно приступить к выполнению следующего шага исследования – верификации полученных данных на независимых выборках доноров.

Основываясь на данных, описанных в предыдущей главе, нами была выполнена верификация полученных результатов с использованием

сравнительного анализа уровня экспрессии 12-ти микроРНК (в составе 31-ой пары) во фракциях мочи (СВВ и СМ) и плазме крови при помощи количественной петлевой ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для всех микроРНК были разработаны системы TaqMan ОТ-ПЦР с рабочим диапазоном 24-38 Ct. Отрицательные контроли для всех TaqMan ОТ-ПЦР систем либо вообще не давали флуоресцентного сигнала, либо полученный сигнал имел значение Ct минимум на семь циклов выше минимального обнаруживаемого значения в анализируемом образце. В качестве внутреннего контроля использовали микроРНК нематод *cel-miR-39*, сигнал от которой наблюдался во всех исследуемых образцах при значениях Ct 25 ± 1 .

В таблицах 10 и 11 показаны статистически значимые результаты сравнительного анализа соотношений (dCt и $ddCt$) экспрессии микроРНК или значений $dddCt$ в соответствующих группах. К сожалению, в плазме крови достоверных межгрупповых различий нами не было выявлено. Основным источником большинства соотношений дифференциально экспрессируемых микроРНК была фракция СВВ мочи. Эти результаты согласуются с последней тенденцией, предполагающей, что ВВ являются мощным источником биомаркеров (таких как PCA3 и TMPRSS2:ERG (*Sanguedolce F, et al. 2016*)).

Аберрантные изменения 15-ти пар микроРНК (состоящие из 12-ти микроРНК), по крайней мере, в одной из изучаемых фракций биологических жидкостей позволили дифференцировать ЗД и пациентов с РПЖ (Табл. 10 (группа сравнения РПЖ-ЗД)). Среди них 14 пар были обнаружены во фракции СВВ мочи и одна в СМ. Анализ уровней экспрессии десяти микроРНК (входящих в состав 20-ти пар: 14 в составе СВВ и 9 в СМ) позволил разделить группы пациентов с РПЖ и ДГПЖ. Особый интерес представляют собой десять пар микроРНК, для которых значения dCt в группах ЗД и ДГПЖ были выше или ниже таковых для группы пациентов с РПЖ (т.е. значения dCt имели одинаковый знак). Такая общая направленность различий значений при сравнении групп РПЖ со ЗД и ДГПЖ позволяет предположить, что эти микроРНК потенциально могут дифференцировать не только группу ЗД, но и разделять между собой пациентов со злокачественными и доброкачественными новообразованиями (Табл. 10, выделены серым цветом).

Наконец, анализ отношений 15-ти пар микроРНК (15 в составе СВВ и две - в СМ) позволил разделить между собой группы ЗД и ДГПЖ. Для пяти пар микроРНК разница значений dCt между группами ЗД и РПЖ или ДГПЖ имела одинаковую направленность (Табл. 10, выделены серым цветом). Принимая во внимание статистическое распределение данных, минимальный размер выборки для подтверждения полученных результатов при 95% значимости и мощности не превышал 18 участников на группу, увеличиваясь до 35 на группу при 99% значимости.

Изучение репрезентативности микроРНК выявило 20 пар со значимыми различиями в значениях $dddCt$ для любых двух фракций биологических

жидкостей между пациентами с РПЖ и ЗД (Табл. 11), в том числе 16 соотношений, по-разному распределенных между фракцией СВВ и СМ, а также одно и 15 соотношений между плазмой и СМ или СВВ, соответственно.

Таблица 10. Значения ddCt для дифференциально экспрессируемых пар микроРНК в следующих группах сравнения: РПЖ-ЗД, РПЖ-ДГПЖ, ДГПЖ-ЗД.

Пары микроРНК	РПЖ - ЗД		РПЖ - ДГПЖ		ДГПЖ - ЗД	
	СВВ	СМ	СВВ	СМ	СВВ	СМ
22/19b		-1,7 *	3,2 ***		-2,2 **	-1,6 *
19b/92a	-8,2 ***		-8,4 ***	1,5 *		
378a/19b	1,8 **		2,5 ***	-1,7 *		
425/19b	1,0 **		1,6 ***			
22/92a	-6,7 ***		-4,7 ***			
378a/92a	-5,9 ***		-5,4 ***			
425/92a	-6,7 ***		-6,3 ***			
22/378a				1,5 *	-1,5 *	-1,5 *
22/425			1,6 ***		-1,6 **	
31/30e	-7,4 ***				-4,8 **	
125b/30e	-6,0 ***		5,6 ***	-1,3 *		
200b/30e	-8,4 ***				-5,3 **	
205/30e	-7,0 ***		-5,8 ***			
375/30e	-5,0 **		-3,5 **			
660/30e	-4,4 ***		-5,9 ***		1,5 *	
125b/31				-3,0 *	4,3 **	
205/31				-0,74 *		
375/31					3,3 *	
660/31					6,3 **	
200b/125b				3,4 *	-4,9 **	
375/125b			2,1 *			
660/125b	1,7 *				2,0 *	
205/200b				-2,8 *	4,1 *	
375/200b	3,3*				3,8 *	
660/200b				-2,9 *	6,8 *	
660/375			-2,4 *		3,0 *	
Количество аберрантно экспрессируемых пар микроРНК	14	1	14	9	15	2

Серым выделены значения ddCt с общей направленностью различий при сравнении групп РПЖ и ЗД. ***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05. СВВ: значения ddCt пар микроРНК во фракции суммарных внеклеточных везикул мочи; СМ: значения ddCt пар микроРНК в супернатанте мочи

Точно так же 15 пар микроРНК были по-разному распределены между пациентами с РПЖ и ДГПЖ (13 для фракций СВВ-СМ, ни одного для СМ-Пл, 11 для СВВ-Пл). Общая направленность различий в сравнении РПЖ с группами ЗД и ДГПЖ была обнаружена для 21 значения dddCt (Табл. 12, выделены серым цветом). Были обнаружены значимые отличия между пациентами с ДГПЖ и ЗД в значениях девяти пар микроРНК при анализе группы СВВ-Пл. При сравнении групп РПЖ-ЗД и РПЖ-ДГПЖ 21 соотношение микроРНК имело одинаковый знак различий в распределении, в

то время как при сравнении групп ЗД-РПЖ и ЗД-ДГПЖ число тех же соотношений с одинаковыми знаками было всего семь. Две пары микроРНК (-31/-30е и -200б/-30е) в составе СВВ мочи и плазмы крови были по-разному распределены между тремя группами, причём в прогрессивном порядке (Табл. 11). Минимальный размер выборки, необходимый для проверки данных, описанных в таблице 11, составил не более 35 доноров при 95% значимости и мощности и 40 доноров при 99% значимости (за исключением отношения микроРНК-660/-375, которому необходимо 75 доноров в группе).

Таблица 11. Значения dddCt для дифференциально экспрессируемых пар микроРНК в следующих группах сравнения: РПЖ-ЗД, РПЖ-ДГПЖ, ДГПЖ-ЗД.

Пары микроРНК	РПЖ - ЗД			РПЖ - ДГПЖ			ДГПЖ - ЗД		
	СВВ-СМ	Пл-СМ	СВВ-Пл	СВВ-СМ	Пл-СМ	СВВ-Пл	СВВ-СМ	Пл-СМ	СВВ-Пл
22/19b	2,9***	-2,3*		3,4***		2,1*			
19b/92a	-9,2***		-8,5***	-9,9***		-7,5***			
378a/19b	3,2**			4,4***					
425/19b	2,8**			2,8**					
22/92a	-6,1***		-7,3***	-6,0**		-4,8**			
378a/92a	-5,6**		-6,0***	-5,2**		-5,4***			
425/92a	-6,2***		-7,2***	-6,5***		-6,2***			
22/378a			-1,4*						2,1*
22/425						1,4*			-1,5*
31/30e	-8,0***		-9,5**	-3,9**					-4,2*
125b/30e	5,8***		-7,5***	-4,3***		-6,1***			
200b/30e	-9,5***		-11,8***	-5,3*		-5,0**			-4,3***
205/30e	-6,7***		-9,4***	-5,1*		-7,0*			
375/30e	-3,3**		-5,9***			-4,3**			
660/30e	-4,4***		-4,0***	-5,4***		-5,7***			
200b/125b			-4,3***						-2,8**
375/125b	2,4*								
660/125b			3,5***						2,5**
375/200b			5,9***	3,0**					3,2**
660/200b	5,1*		7,8***						5,3***
660/375	-1,1*								2,0*
Количество аберрантно экспрессируемых пар микроРНК	16	1	15	13	0	11	0	0	9

Серым выделены значения dddCt с общей направленностью различий при сравнении групп РПЖ и ЗД. *** P<0,001; ** P<0,01; *P<0,05. СВВ-СМ: значения dddCt пар микроРНК между фракциями суммарных внеклеточных везикул и супернатантом мочи; Пл-СМ: значения dddCt пар микроРНК между плазмой крови и супернатантом мочи; СВВ-Пл: значения dddCt пар микроРНК между фракцией суммарных внеклеточных везикул и плазмой крови.

Оценка диагностической эффективности соотношений микроРНК для классификации групп доноров была выполнена при помощи анализа ROC-кривой. В таблице 12 показаны полученные значения чувствительности при 100% специфичности для разделения больных РПЖ от контрольной группы (ДГПЖ+ЗД) и попарной дискриминации исследуемых групп.

Таблица 12. Данные анализа ROC-кривых (чувствительность при 100% специфичности) больных РПЖ в сравнении с группой «ЗД+ДГПЖ».

Пары микроРНК	СВВ	СМ	Плазма	СВВ-СМ	Плазма-СМ	СВВ-Плазма
РПЖ vs ЗД+ДГПЖ						
19b/92a	100			100		90
22/19b				90		
22/92a	70			60		60
378a/19b	80			90		
378a/92a	60			60		60
425/19b	70					
425/92a	80			70		90
125b/30e	100			100		100
200b/30e	100			90		100
205/30e	100			80		
31/30e	100			100		60
375/30e						80
660/30e	100			60		
РПЖ vs ЗД						
19b/92a	100			100		90
22/19b		70		90	90	
22/92a	80			60		100
378a/19b	78			90		
378a/92a	70					
425/19b	67			70	80	
425/92a	90			70		90
125b/30e	100			100		100
200b/30e	100			90		100
205/30e	100		60	90		100
31/30e	100			100		70
375/30e	90					
378a/425	70					
660/30e	100					
РПЖ vs ДГПЖ						
19b/92a	100	70	70	100		90
22/19b	100		70	90		70
22/92a	70			70		60
378a/19b	100		60	90		
378a/92a	60			60		60
425/19b	100		70			
425/92a	80					90
22/425	80					
125b/30e	100			100		100
125b/31	100				70	
200b/125b	100					
200b/30e	100			100		100
205/200b		70				
205/30e	100			80		
31/30e	100			100		60
375a/200b				70		100
375a/30e				80		
660/125b				80		

Пары микроРНК	СВВ	СМ	Плазма	СВВ-СМ	Плазма-СМ	СВВ-Плазма
660/200b	100	80				
660/30e	100	70		100		100
660/31	100			80		
660/375a			60	90		
ДГПЖ vs ЗД						
22/19b		75				
22/378a	62					
22/92a	100					100
22/425	75					
425/92a						62
125b/30e		87				
125b/31		62				
200b/30e		75				87
200b/125b		87				
205/30e			62			
375/205			75			

СВВ: dCt значений уровня микроРНК во фракции СВВ; СМ: dCt значений уровня микроРНК в супернатанте мочи; Плазма: dCt значений уровня микроРНК в плазме; СВВ-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракциях СВВ и СМ; Плазма-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК в СМ и плазме; СВВ-Плазма: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракции СВВ и плазме. Соотношения с наибольшей чувствительностью выделены жирным шрифтом.

МикроРНК СВВ мочи, входящие в состав шести пар (микроРНК-125b/-30e; -200b/-30e; -205/-30e; -31/-30e; -660/-30e и -19b/-92a), показали наивысшую диагностическую ценность, что позволяет разделять пациентов с РПЖ от объединенной контрольной группы «ЗД+ДГПЖ» с абсолютными показателями чувствительности и специфичности (Табл. 12). Обнаружено, что четыре дополнительных соотношения могут дифференцировать пациентов с РПЖ и контрольную группу с чувствительностью от 80% до 100% при 100% специфичности: микроРНК-375/-30e; -22/-19b; -378a/-19b и -425/-92a.

Анализ распределения между различными фракциями может повысить чувствительность диагностической системы, как показано, например, для пар микроРНК-22/-19b, -378a/-19b и -425/-92a. В ряде случаев классификация достигла абсолютной чувствительности и специфичности, например, для пар микроРНК-30e/-31, -19b/-92a и -125b/-30e, однако во всех этих случаях анализ изменений экспрессии пар микроРНК только во фракции СВВ мочи дает такую же эффективность диагностики (Табл. 12). Разделение групп пациентов с РПЖ и ЗД со 100% чувствительностью и специфичностью может быть достигнуто с помощью анализа изменений уровней экспрессии следующих пар микроРНК: во фракции СВВ мочи dCt микроРНК-125b/-30e; -200b/-30e; -205/-30e; -31/-30e; -19b/-92a и ddCt в группе СВВ – плазма для микроРНК-22/-92a. Еще три пары микроРНК дискриминировали больных РПЖ и ЗД со 100% специфичностью и чувствительностью 80% или 90%: микроРНК-378a/-19b; -425/-92a (dCt для СВВ мочи) и -22/-19b (ddCt для СМ - плазма) (Табл. 12).

Следующие соотношения микроРНК с абсолютными показателями чувствительности и специфичности позволяют разделить между собой группы РПЖ и ДГПЖ: микроРНК-125b/-30e; -125b/-31; -200b/-125b; -200b/-30e; -205/-30e; -31/-30e; -660/-200b; -660/-30e; -660/-31; -19b/-92a; -22/-19b; -378a/-19b; -425/-19b в составе СВВ мочи и микроРНК-375/-200b при анализе ddCt СВВ-плазма. Анализ изменений пяти дополнительных соотношений с более низкой чувствительность (80-100%) дискриминировал пациентов с РПЖ и ДГПЖ: микроРНК-22/-425 (СВВ мочи); -425/-92a (ddCt СВВ – плазма); -375/-30e; -660/-375 и -660/-125b (ddCt СВВ – СМ). Только пара микроРНК-22/-92a во фракции СВВ мочи разделяла пациентов с ДГПЖ от ЗД со 100% чувствительностью при 100% специфичности. Три пары микроРНК обладали более низкой чувствительностью (80-100%): микроРНК-125b/-30e; -200b/-125b (СМ); -200b/-30e (ddCt СВВ – плазма) (Табл. 12).

Для выбора наиболее диагностически эффективных пар микроРНК мы использовали модификацию алгоритма, описанного в главе 2.5.2. Здесь мы выполнили только первые два шага для пар микроРНК с самой высокой чувствительностью (50% и выше) для получения перекрывающейся панели с максимальной стабильностью. Нормальность распределения была подтверждена для всех отношений микроРНК – кандидатов в биомаркеры, поэтому для выбора пороговых значений использовались средние значения и значения SD. В таблице 13 показан процент случаев правильно классифицированных по сравнению с контрольной группой по каждой паре микроРНК. Каждого из пациентов с РПЖ можно было отличить от контрольной группы (ЗД+ДГПЖ) на основании анализа от семи до 21-ого соотношения dCt или ddCt микроРНК. В целом, для полного разделения всех групп доноров достаточно использования 11-ти микроРНК (Табл. 13).

С обратной стороны каждый из доноров в комбинированной неонкологической группе (ЗД+ДГПЖ) отличался от контрольной группы (пациенты с РПЖ) на основании соотношения 14-23 dCt или ddCt микроРНК. Для разделения групп, таким образом, использовали 12 микроРНК (Табл. 13).

Таким образом, нам удалось отделить всех пациентов с РПЖ и всех, кроме одного пациента с ДГПЖ, от ЗД на основании анализа соотношений 2-14 dCt или ddCt микроРНК. Оставшийся пациент с ДГПЖ был дискриминирован только с использованием ddCt микроРНК-22/-92a между фракцией СВВ мочи и плазмой крови. Для полного разделения этих групп использовали 10 микроРНК (Табл. 13). В завершении, ЗД можно было отделить от контрольной группы пациентов с РПЖ и ДГПЖ на основании анализа соотношения 5-9 dCt или ddCt микроРНК. К сожалению, нам не удалось правильно дискриминировать одного ЗД ни по одному из соотношений ни в одном типе выборки. Однако, при включении в алгоритм анализ значений ddCt микроРНК-375/-30e между фракциями СВВ и плазмой крови этот донор был верно отнесён к группе здоровых (Табл. 13).

Таблица 13. Процент правильно диагностированных:

Пары микроРНК	СВВ	СМ	СВВ-СМ	СВВ-Плазма	Все фракции
больных РПЖ относительно контрольной группы (ЗД+ДГПЖ)					
19b/92a	100%		90%	70%	100%
22/92a	70%		60%	60%	70%
378a/92a	60%		60%	60%	60%
425/92a	80%		70%	80%	90%
125/30e	100%		100%	100%	100%
200b/30e				60%	50%
205/30e	60%				60%
375/30e	50%			70%	60%
660/30e	100%		70%	70%	100%
Все отношения	100%		100%	100%	100%
доноров без признаков РПЖ относительно контрольной группы (РПЖ)					
19b/92a			63%		63%
22/425	58%				58%
378a/425	74%				74%
125b/30e	100%		100%	100%	100%
200b/30e	100%			68%	100%
205/30e	100%		53%	89%	100%
31/30e	100%		100%		100%
375/30e	84%				58%
660/30e	100%		84%	89%	100%
205/31	74%				74%
660/125b				53%	53%
205/200b	53%				53%
660/200b				53%	53%
660/205				53%	63%
Все отношения	100%		100%	100%	100%
ЗД относительно контрольной группы (ДГПЖ+РПЖ)					
31/30e	63%				63%
200b/30e	63%			81%	91%
375/31			54%	63%	73%
660/31	63%			72%	91%
200b/125b	63%			63%	91%
660/125b	54%			82%	91%
375/200b	54%			63%	82%
660/200b	63%		63%	91%	91%
Все отношения				91%	91%
всех больных (ДГПЖ и РПЖ) относительно контрольной группы (ЗД)					
22/19b		50%			50%
22/92a	50%			72%	72%
378a/92a	50%				50%
425/92a	55%			61%	61%
125b/30e	55%		55%	55%	55%
200b/30e				83%	83%
205/30e				66%	66%
660/30e	55%				55%
19b/92a	55%		55%		55%
Все отношения	55%	50%	55%	100%	100%

Несмотря на межгрупповые различия в возрасте доноров (ЗД 50-60 лет, пациенты с РПЖ 54-71 год и пациенты с ДГПЖ 63-81 год), мы не обнаружили значимой связи между соотношением микроРНК и возрастом. Это является важным открытием, поскольку в тканях ПЖ наблюдается множество возрастных изменений, которые часто ошибочно идентифицируются как новообразования (в том числе и РПЖ) имеющимися на сегодняшний день диагностическими методами, что приводит к лишним дополнительным тестам и ложноположительным диагнозам. Отсутствие корреляции между экспрессией микроРНК и возрастом дополнительно подтверждает потенциал отдельных пар микроРНК в качестве онкомаркеров для диагностики РПЖ.

Таким образом, в настоящей работе мы использовали несколько подходов для анализа данных об aberrантной экспрессии микроРНК и выбора наиболее подходящих соотношений микроРНК для диагностики РПЖ (Рис. 5). На рисунке 5 показан ход исследования и то, какие соотношения микроРНК были лучшими в соответствии с каждой частью анализа данных. В результате нашего исследования наиболее перспективными соотношениями микроРНК для диагностики РПЖ оказались микроРНК-125b/-30e; -200b/-30e; -205/-30e; -31/-30e; -660/-30e и -19b/-92a. Анализ этих пар позволил различить пациентов с РПЖ с абсолютными показателями чувствительности и специфичности. Такой анализ мог быть дополнен четырьмя другими микроРНК (-375, -378a, -22, -425) для создания четырех дополнительных соотношений с меньшей чувствительностью (80%-90%) для увеличения веса диагностической системы.

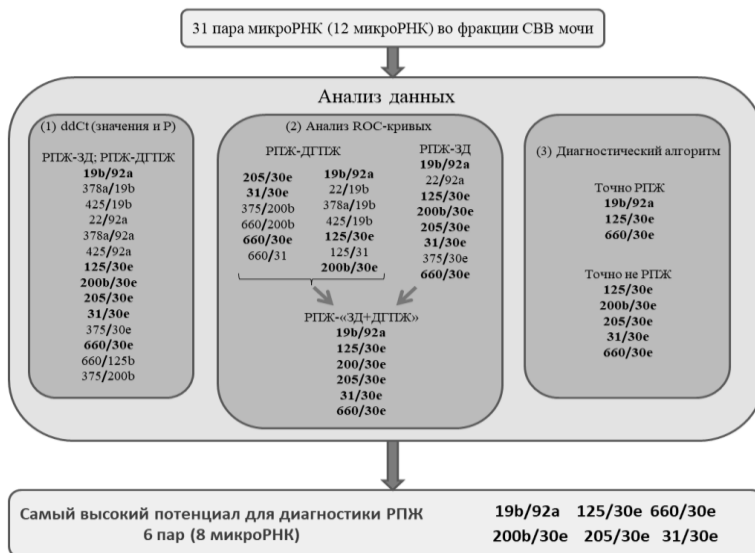


Рисунок 5. Пошаговая схема исследования.

Анализ диагностического алгоритма, включающего эти соотношения микроРНК, показал, что наиболее стабильными для разделения пациентов с РПЖ от контрольной группы (ЗД+ДГПЖ) являются пары микроРНК-125b/-30e, -660/-30e и -19b/-92a. Таким образом, наиболее многообещающим в решении проблемы дифференциальной диагностики поражений ПЖ является изучение микроРНК-19b, -30e, -31, -92a, -125b, -200b, -205 и -660 во фракции СВВ мочи у пациентов с РПЖ и ДГПЖ.

3. Аберрантные изменения внеклеточных ДНК

Другой вид нуклеиновой кислоты, циркулирующей в крови – опухолевая вДНК, может содержать те же генетические мутации и изменения, что и основная опухоль (*Andersson D, et al., 2021*). Разнообразие профилей метилирования, обнаруженное во вДНК крови ЗД и онкологических больных с помощью метода локус-специфичного массового параллельного бисульфитного пиросеквенирования, заставило серьезно задуматься о механизмах метилирования ДНК в норме и патологии, механизмах генерации и циркуляции метилированной вДНК (*Korshunova Y, et al., 2008*).

3.1. Особенности метилирования внеклеточной ДНК в культуре первичных и трансформированных клеток

Для оценки влияния функционального состояния клеток (фазы клеточного цикла) на метилирование было выполнено сравнительное исследование статуса метилирования CpG-динуклеотидов геномной ДНК (генДНК) и вДНК с помощью методов MS-qPCR и пиросеквенирования. В качестве исследуемого локуса был выбран фрагмент гена *RARBeta2* (X56849.1, 924-1117), содержащий 13 сайтов CpG. За уровень метилирования (ML) было принято отношение концентрации метилированной формы гена *RARBeta2* к его суммарной концентрации $\times 100\%$.

Данные MS-qPCR показали, что вДНК и генДНК из клеток линии HeLa имеют в целом сходный уровень метилирования (100%), за исключением клеток после 24 часов культивирования, когда метилирование вДНК снижалось до 37%. Относительное метилирование гена *RARBeta2* в составе вДНК первичных клеток линии HUVEC зачастую было выше (8,9%), чем в генДНК (1,6%). Необходимо отметить, что ML гена *RARBeta2* повышался при увеличении клеточных пассажей и варьировал в зависимости от линии первичных клеток (донора).

Данные CpG-метилирования гена *RARBeta2* в составе ДНК из клеток линии HeLa, полученные методом пиросеквенирования, показали сходный профиль метилирования вДНК и генДНК. Однако пониженное содержание метилированной ДНК в клетках, культивируемых в течение 24 часов, определенное методом MS-qPCR, пиросеквенированием не подтвердилось.

В клетках линии HUVEC ML практически всех сайтов составлял $3\pm 0,25\%$, как в составе вДНК, так и в генДНК, однако периодически зависел от номера

пассажа и отличался между внДНК и генДНК. Полученные данные о метилировании внДНК и генДНК первичных клеток показывают присутствие aberrантно-метилованных форм ДНК и в нормальных клетках.

Принципиальным фактом, обнаруженным при помощи пиросеквенирования, являлся различный уровень метилирования индивидуальных цитозинов в составе внДНК и генДНК. А именно, во-первых, во внеклеточной и геномной ДНК могут быть метилированы разные цитозины; во-вторых, неравномерное метилирование отдельных цитозинов в составе CpG динуклеотидов локуса свидетельствует о том, что «распространение» метилирования и наличие полностью метилированных и полностью неметилованных локусов не является абсолютной истиной. Метод пиросеквенирования дает информацию о соотношении метилированного и неметилованного цитозина лишь в определенной позиции. Учитывая, что уровень метилирования разных цитозинов отличается, возникает закономерный вопрос о том, какая комбинация молекул его обеспечивает. Действительно, расхождение между данными, полученными с использованием методов пиросеквенирования и MS-qPCR, может быть связано с тем, что методы предоставляют данные о метилировании конкретных CpG, причем в суммарном виде (для пиросеквенирования) или метилирования отдельных молекул, которые являются комплементарными мишенями для праймеров (зонда).

Таким образом, данные MS-qPCR и пиросеквенирования демонстрируют, что пул внДНК может быть сформирован из множества молекул с разным профилем метилирования отдельных цитозинов, как это и было обнаружено в (Korshunova Y, et al., 2008). При этом свой вклад в формирование такого пула aberrантно-метилованных внДНК могут вносить как клетки нормальных тканей, так и клетки опухолей. По-видимому, эта особенность метилирования ДНК сильно осложняет поиск маркеров при помощи MS-qPCR. Действительно, анализ пула молекул с разным профилем метилирования цитозинов и поиск aberrантно-метилованных молекул, которые были бы характерны для опухолевых клеток, возможен исключительно при помощи методов, предоставляющих информацию о профиле метилирования каждой молекулы ДНК, т.е. при помощи метил-специфичного полногеномного секвенирования ДНК после бисульфитной конверсии.

3.2. Особенности метилирования внеклеточной ДНК, циркулирующей в крови при онкологических заболеваниях предстательной железы

Особенности генерации и циркуляции внДНК делают её удобным источником диагностического материала, в частности, небольшой период полураспада, который составляет около 1,5 часов, позволяет отслеживать рецидив опухоли, оценивать действия лекарственных препаратов в режиме реального времени (Lu L., et al, 2018). Уже в ранних работах при РПЖ были обнаружены aberrантно-метилованные гены, такие как *GSTP1* и *SFRP2*

(Martignano F., et al, 2016; Liu R., et al, 2019). В исследовании с использованием микрочипов в лаборатории A. Petronis было идентифицировано несколько новых маркеров aberrантного метилирования ДНК (Cortese R., et al, 2012). Данные о том, что метилированные ДНК более стабильны в крови, чем неметилированные, дольше циркулируют в крови, более эффективно связываются с клетками крови, делают этот тип молекул ещё более привлекательным источником диагностического материала. При этом, как уже было сказано выше, профиль метилирования цитозинов в составе отдельных молекул ДНК может существенно отличаться, т.е. необходим анализ aberrантно-метилированных ДНК с однонуклеотидным разрешением. Принимая во внимание концентрацию вДНК и содержание опухолеспецифичных молекул в пуле вДНК крови, наиболее разумным вариантом анализа такого метилирования может служить локус-специфичное полногеномное секвенирование ДНК после бисульфитной конверсии.

В этом исследовании мы изучили метилирование на уровне разрешения отдельных динуклеотидов CpG, используя метод локус-специфичного секвенирования NGS, с целью поиска циркулирующей в крови aberrантно-метилированной вДНК, специфичной для опухолей ПЖ. Были изучены три гена – *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* – которые, как было показано ранее, изменяют статус метилирования у пациентов с опухолями ПЖ.

3.2.1. Количественная оценка внеклеточных ДНК, циркулирующих в крови

Однако прежде чем исследовать циркулирующие вДНК при помощи NGS, необходимо было оценить их количество в крови ЗД и пациентов. Известно, что в среднем 1 мл плазмы крови онкологического больного содержит примерно 1500 эквивалентов диплоидного генома (ГЭ) (~10 нг ДНК). Типичный забор крови объёмом 10 мл позволяет получить в среднем 4 мл плазмы, содержащей 6000 ГЭ (12×10^3 молекул на область или ген) (Heitzer E. 2019). Концентрация опухолеспецифичной ДНК в плазме крови колеблется от 1% до 10%, что соответствует 60-600 ГЭ, доступных для анализа. Таким образом, теоретический предел чувствительности составляет ~0,01% (то есть способность обнаруживать 1 фрагмент из 12000 копий).

Учитывая неоднородную представленность геномной ДНК в циркуляции, отмеченные выше сложности с метилированной ДНК, а также специфичность и чувствительность ПЦР, обнаружение таких маркеров представляет собой непростую задачу. Одним из подходов к преодолению этих сложностей является увеличение количества вДНК. Ранее нами была обнаружена вДНК, связанная с поверхностью клеток крови, в количествах, как минимум сравнимых с вДНК в плазме, и в этой фракции были обнаружены aberrантно-метилированные ДНК, пригодные для секвенирования.

Для дальнейшего исследования вДНК при помощи метода NGS, её количество в плазме крови и в виде, связанном с поверхностью клеток крови

оценивали с помощью флуоресцентного красителя Hoechst 33258. Было показано, что критериям, удовлетворяющим распределению Гаусса, соответствуют значения концентраций во всех группах доноров (данные представлены в виде среднее $\pm$ SE), за исключением концентрации вДНК на поверхности клеток у здоровых мужчин (данные представлены в виде медианы и разброса значений). Концентрации вДНК у ЗД составили в плазме $11,8 \pm 2,04$ нг/мл крови и на поверхности клеток – $712,5$ нг/мл ($193-2435$ нг/мл). У пациентов с ДГПЖ и РПЖ значения концентраций практически не отличались и составляли в плазме $85,4 \pm 26,1$ нг/мл и $46,1 \pm 21$ нг/мл, а на поверхности клеток крови – $57,5 \pm 6$ нг/мл и $60,6 \pm 9,9$ нг/мл, соответственно. Одной из причин такого изменения в концентрациях ДНК в крови при развитии онкологических заболеваний ПЖ может служить перераспределение ДНК между фракциями крови.

Нами было показано, что при развитии как ДГПЖ, так и РПЖ происходит уменьшение доли вДНК, связанной с клеточной поверхностью, и увеличение доли свободной вДНК в плазме крови. Пул вДНК, связанных с поверхностью клеток крови, является дополнительным и очень ценным источником диагностических молекул ДНК, а наиболее точная диагностическая информация может быть получена при анализе суммарной (свободной + связанной с поверхностью клеток крови) вДНК.

*3.2.2. Анализ локус-специфичного метилирования генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* в составе вДНК крови ЗД и пациентов с онкологическими заболеваниями ПЖ*

Схема исследования заключалась в следующем: после выделения, бисульфитной конверсии и количественного определения свободной и суммарной вДНК (сумм-вДНК), её использовали для локус-специфичной амплификации, подготовки ДНК-библиотек с последующим секвенированием NGS и обработкой полученных данных. Всего нами было получено 6,3, 9,0 и 9,2 миллиона прочтений для областей генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539*, соответственно, путем секвенирования парных концов длиной 250 п.н. Выбранные локусы были секвенированы с охватом от 23509 до 143953. После анализа первичных данных был выполнен подсчет количества молекул с аналогичным профилем метилирования для каждого гена у каждого пациента.

Аберрантное метилирование генов в составе свободной вДНК плазмы

Доли последовательностей с метилированным цитозином в каждом из положений молекулы в группах ЗД, больных РПЖ и ДГПЖ представлены на диаграммах (рис. 6). Из этих данных видно, что метилирование С9 в исследуемом локусе гена *GSTP1* является наиболее характерным событием, связанным с развитием опухолей ПЖ, по сравнению с метилированием в других одиночных положениях локуса. Метилирование 3-го и 13-го цитозинов одного и того же локуса достоверно различается у ЗД и больных с опухолями

ПЖ. Больные ДГПЖ и РПЖ наиболее различаются по метилированию 2-го и 16-го цитозинов одного и того же локуса гена *GSTP1*. Суммарный уровень метилирования отдельных позиций цитозинов в генах *RNF219* и *KIAA1539* в исследованных группах доноров достоверно не различался.

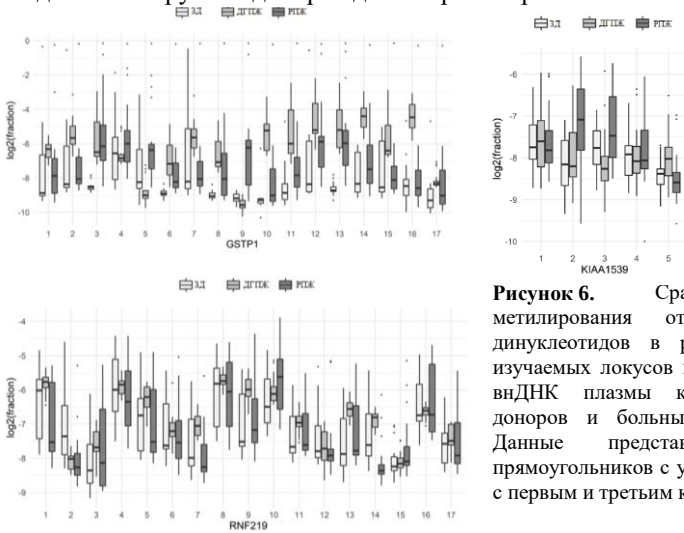


Рисунок 6. Сравнение уровня метилирования отдельных CpG - динуклеотидов в разных положениях изучаемых локусов в составе свободной виДНК плазмы крови у здоровых доноров и больных ДГПЖ и РПЖ. Данные представлены в виде прямоугольников с указанием медианы и с первым и третьим кватрилями.

Анализ корреляции между метилированием отдельных CpG-динуклеотидов для гена *GSTP1* (рис. 7) показал, что метилирование отдельных цитозинов коррелирует в группах ЗД и ДГПЖ (а именно, C7-C12 у ЗД и C3-C15 у пациентов с ДГПЖ; $r > 0,9$), тогда как у больных РПЖ высокая корреляция ($r > 0,9$) наблюдалась для aberrantного метилирования C2 со статусом метилирования цитозинов в положениях C6, -7, -10, -15 и -17; C6 со статусом C2, -7, -10, -11, -15, -16 и -17; и C10 со статусом C15, -16 и -17.

Рисунок 7. Фрагмент рисунка корреляции между метилированием отдельных цитозинов изучаемого локуса гена *GSTP1* и составом ДНК в циркулирующей крови исследуемых больных. Двоичные логарифмы переменных использовались для всех графиков. В диагональных ячейках представлены графики плотности для групп РПЖ (красный), ДГПЖ (зеленый) и ЗД (синий) для каждой из переменных. Каждая диагональная ячейка имеет собственную шкалу оси Y, которая не обозначена. «ЗД», «ДГПЖ» и «РПЖ» обозначают соответствующие корреляции Пирсона для каждой из групп. «Корр» обозначает корреляцию Пирсона для всех объединенных групп; корреляции рассчитаны для двоичных логарифмов переменных. В ячейках под диагональю представлены диаграммы рассеяния для каждой пары переменных.



Помимо метилирования отдельных цитозинов в пределах исследованных локусов, мы рассматривали попарное метилирование молекул или, точнее, вводили переменные, отражающие одновременное метилирование, метилирование одного и отсутствие метилирования второго или отсутствие метилирования обоих цитозинов в одной молекуле ДНК.

Результаты сравнения между больными РПЖ и группой доноров ЗД и ДГПЖ представлены в таблице 14. Перечислены только переменные с $p \times 3 \times 1167 < 0.005$ и чувствительностью (для 100% специфичности) $> 70\%$. Кроме того, в качестве примеров приведены результаты для моделей с несколькими переменными-предикторами. Необходимо отметить, что переменные, описывающие статус метилирования гена *GSTP1*, имеют наибольшую диагностическую значимость.

Таблица 14. Сравнение статуса метилирования цитозинов в составе свободной вДНК плазмы крови у пациентов с РПЖ с объединенной группой, включающей ЗД и пациентов с ДГПЖ.

Ген, Позиция, Статус (С или Т после конверсии)	P-значение $> 3 \times 1167$	Среднее, %	Чувствительность для 100% специфичности, %	Специфичность для 100% чувствительности, %	Пороговое значение, %	СЧ точность, %	СЧ чувствительность, %	СЧ специфичность, %	СЧ AUC, % (Dr, Long & CD)
PCA	.016		10.0	55.6		75.0	65.0	80.6	83.9 (73.5, 94.2)
GSTP1.C9 + RNF219.C2 + GSTP1.C2			100	100		100	100	100	100
GSTP1.C9 + RNF219.C2 + GSTP1.C16			100	100		100	100	100	100
GSTP1.C9 + RNF219.C2.T10			95.0	97.1		94.5	90.0	97.1	92.4 (83.2, 100)
GSTP1.C3.C9	.00000073	8.03/.0394	80.0	54.3	.101	87.3	80.0	91.4	93.0 (85.1, 100)
GSTP1.C9	.00000090	8.35/.160	80.0	48.6	.215	90.9	80.0	97.1	92.6 (83.2, 100)
GSTP1.C9.T17	.0000011	4.04/.143	80.0	37.1	.198	89.1	80.0	94.3	93.1 (83.5, 100)
GSTP1.T2.C9	.0000011	3.71/.142	75.0	45.7	.177	87.3	80.0	91.4	93.0 (84.7, 100)
GSTP1.T1.C9	.0000024	3.94/.142	75.0	34.3	.199	89.1	80.0	94.3	92.1 (82.2, 100)
GSTP1.T6.C9	.0000024	3.71/.142	70.0	51.4	.177	87.3	80.0	91.4	92.6 (84.4, 100)
GSTP1.T4.C9	.0000029	3.71/.142	75.0	51.4	.179	87.3	80.0	91.4	92.1 (83.1, 100)
GSTP1.C9.T16	.0000050	4.01/.140	70.0	48.6	.190	89.1	85.0	91.4	92.0 (83.4, 100)
GSTP1.C9.T14	.0000070	3.90/.138	70.0	34.3	.190	87.3	85.0	88.6	91.9 (82.3, 100)
GSTP1.T5.C9	.0000084	3.67/.143	75.0	42.9	.188	87.3	80.0	91.4	91.7 (82.9, 100)
GSTP1.C9.C13	.0044	4.76/.0197	70.0	40.0	.0512	85.5	70.0	94.3	85.0 (73.0, 97.0)

Чувствительность (при 100% специфичности) других позиций CpG в пределах локуса гена *GSTP1* была несколько ниже, однако одновременное использование данных по статусу метилирования нескольких динуклеотидов CpG позволило построить диагностические системы с абсолютными показателями чувствительности и специфичности. В результате выполненного исследования было выявлено 80 переменных, соответствующих двум одновременно метилированным цитозинам в каждом локусе гена, которые позволили полностью различить пациентов с ДГПЖ с $p < 0,0000000001$. Из этих переменных 77 были получены для гена *RNF219*, а три — для гена *GSTP1*. Кроме того, 46 переменных отличали группы сравнения при 100% чувствительности со специфичностью в 94% и $p < 0,00001$.

Таким образом, описанный подход способствовал выявлению потенциальных маркеров, позволяющих различать группы сравнения со 100% чувствительностью и специфичностью.

Аберрантное метилирование генов в составе суммарной внеклеточной ДНК крови (свободной внеклеточной ДНК плазмы и внеклеточной ДНК, связанной с клеточной поверхностью)

Поскольку мы показали возможность использования NGS-локус-специфичного секвенирования свободной внДНК для выявления опухолеспецифичного метилирования, мы задались вопросом, будет ли пул сумм-внДНК крови также применим для идентификации опухолеспецифичных аберрантно-метилированных молекул ДНК этим же методом.

Полученные нами данные демонстрируют более высокую долю метилированной ДНК в пуле сумм-внДНК (рис. 8) и значительно более высокий диагностический потенциал сумм-внДНК по сравнению со свободной внДНК плазмы крови. Это утверждение верно для генов *GSTP1* и *RNF219*.

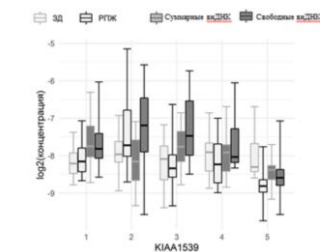
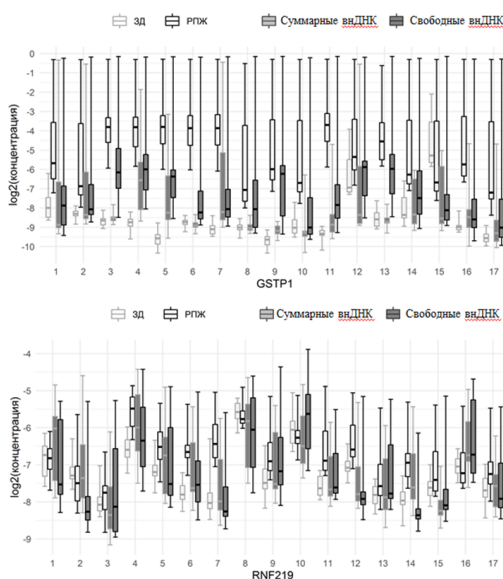


Рисунок 8. Сравнение уровня метилирования отдельных CpG - динуклеотидов в разных положениях изучаемых локусов в составе суммарной и свободной внДНК крови у здоровых доноров и больных РПЖ. Данные представлены в виде прямоугольников с указанием медианы с первым и третьим квартилями. Усы отражают минимумы и максимумы.

Действительно, при изучении внДНК плазмы крови для больных РПЖ было характерно повышение уровня метилирования только для положения С9 локуса гена *GSTP1* (рис. 6 и 8). В пуле сумм-внДНК ряд метилированных цитозинов (например, С3-С7 и др.) резко различался у больных РПЖ и ЗД.

Уровни суммарного метилирования отдельных цитозинов генов *RNF219* и *KIAA1539* в обеих фракциях внДНК крови в исследуемых группах пациентов достоверно не различались, за исключением С4, С6, С7 и С14 в сумм-внДНК гена *RNF219*. Кроме того, у больных РПЖ обнаружены корреляции между

метилированием отдельных цитозинов (а именно, C1-C2, 8-10,12,14-17; C2-C8-10,12-17; C3-C4-7,11,12; C4-C5-7,11,12; C5-C6,7,11,12; C6-C7,11,12; C7-C11,12; C8-C9,10,12,14-17; C9-C10,12,14-17; C10-C11,14-17; C11-C12; C12-C14-17; C14-C15-17; C15-C16,17; $r > 0.9$) в гене *GSTP1*. При этом у больных РПЖ для C6-C5 и C8-C15 коэффициент корреляции составил $r=0.999$, а для комбинации C7-C6 – $r=1.000$, тогда как для группы 3Д высокая корреляция ($r > 0.8$) наблюдалась только для метилирования C12 с C1 и C10. Анализ метилирования гена *GSTP1*, по-видимому, является наиболее подходящим подходом для выявления больных РПЖ.

На основании полученных данных мы попытались рассчитать возможность создания праймеров и TaqMan зонда для ПЦР. В анализ были включены только те комбинации последовательностей, которые позволили разделить изучаемые группы доноров с абсолютными чувствительностью и специфичностью. Наилучшие результаты были получены для гена *GSTP1*. Изучаемый участок гена *GSTP1* был условно разделен на три части из-за необходимости использования при создании системы для TaqMan ПЦР двух праймеров и зонда. Однако оказалось, что количество молекул сумм-внДНК с необходимой комбинацией цитозинов в среднем немного превышает 6%, что в пересчете на количество ДНК в крови недостаточно для обнаружения их методом TaqMan ПЦР. Теоретически, если бы внесение «ошибок» в центр праймеров и зонда не снижало эффективности ПЦР, то количество детектируемых молекул, возможно, могло бы увеличиться, однако молекулы с различными комбинациями возможных «ошибок» вообще не были обнаружены в пуле сумм-внДНК. К сожалению, для генов *RNF219* и *KIAA1539* не было найдено комбинаций молекул, подходящих для создания праймеров и зонда для ПЦР, или их количество не превышало 0,5%.

Таким образом, несмотря на все достоинства выполненного исследования, есть один недостаток, мешающий созданию относительно недорогих TaqMan ПЦР-наборов для диагностики РПЖ в клиниках. Это связано с небольшим количеством молекул со специфическим профилем метилирования, необходимым для отжига праймеров и зонда. Однако, независимая от метилирования амплификация локусов *GSTP1* в сочетании с последующим однонуклеотидным удлинением нескольких праймеров, масс-спектрометрией и оценкой уровня cut-off может обладать потенциалом.

Повышенное содержание метилированной формы ДНК в пуле сумм-внДНК также может привести к увеличению точности диагностического теста. В пользу этого факта свидетельствуют данные о том, что длинные фрагменты ДНК (более 10 т.п.н.) в основном связаны с поверхностью клеток крови, а также данные о сверхпредставленности метилированной ДНК в пуле внДНК, связанной с клеточной поверхностью.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны высокоэффективные, надёжные, быстрые протоколы выделения РНК из различных биологических жидкостей на основе аналога раствора Фолча (хлороформ/этанол/вода + гуанидинизотиоцианат) и октановой кислоты. Протоколы превосходят имеющиеся аналоги по таким параметрам, как эффективность выделения, скорость, трудоёмкость, простота использования и удаление ингибиторов ПЦР. Полученные препараты РНК содержат микроРНК и подходят для дальнейшего исследования с использованием микрочипов или количественной ОТ-ПЦР.

2. В моче здоровых доноров и больных раком предстательной железы обнаружены внеклеточные везикулы различного размера и белкового состава, содержащие в себе ДНК, РНК и микроРНК. Показано, что внеклеточные везикулы мочи пациентов с РПЖ, содержат онкоспецифичные микроРНК.

3. При помощи микрочипов miRCURY LNA miRNA qPCR определены концентрации 84-х микроРНК в составе внеклеточных везикул и в супернатанте мочи здоровых доноров и пациентов с ДГПЖ и РПЖ (наибольшее количество достоверных различий в уровнях микроРНК между фракциями мочи наблюдалось в группе больных РПЖ (38 микроРНК), наименьшее – в группе ЗД (15 микроРНК)). С использованием парной нормализации и построения логистических регрессионных моделей с перебором всех возможных соотношений микроРНК, выбраны микроРНК пары, являющиеся наиболее информативными маркерами РПЖ. Показано, что dCt этих пар микроРНК не зависят от возраста пациентов. Определены мишени отобранных микроРНК и участие в регуляции сигнальных путей, в том числе связанных с патогенезом РПЖ.

4. На основании анализа данных микрочипового исследования и биоинформационного анализа предложен подход к формированию диагностической панели микроРНК для дифференциальной диагностики опухолей ПЖ. Панель включает 24 микроРНК, входящих в состав 17-ти аналитических пар, и позволяет классифицировать пациентов исследуемых групп с диагнозами РПЖ и ДГПЖ, а также здоровых доноров со 100% специфичностью и 90% чувствительностью.

5. При помощи TaqMan ОТ-ПЦР на независимых группах пациентов и доноров верифицированы данные об экспрессии 12-ти выбранных микроРНК (-19b, -22, -92a, -378, -425, -30e, -31, -125b, -200b, -205, -375, -660) во фракциях мочи и плазме крови больных РПЖ, ДГПЖ и здоровых доноров. Показано, что TaqMan ОТ-ПЦР восемью микроРНК внеклеточных везикул мочи (-19b, -30e, -31, -92a, -125, -200, -205, -660) в составе шести пар идентифицирует больных РПЖ и здоровых доноров исследуемых групп вне зависимости от возраста с абсолютной чувствительностью и специфичностью.

6. С помощью локус-специфичного массового параллельного секвенирования впервые получены данные о метилировании промоторных

областей генов *RNF219*, *KIAA1539* и *GSTP1* в пуле свободных вДНК плазмы крови и суммарном пуле вДНК (свободных + связанных с поверхностью клеток крови) у здоровых доноров и больных РПЖ и ДГПЖ. Показано, что в суммарном пуле вДНК крови доля молекул с онкоспецифичным профилем метилирования ДНК выше, чем в пуле свободных вДНК крови, и ДНК этого пула представляют собой более удобный источник диагностического материала. Показана принципиальная возможность использования локус-специфичного массового параллельного секвенирования для классификации пациентов исследуемых групп с онкологическими заболеваниями предстательной железы и здоровых доноров вне зависимости от их возраста со 100% чувствительностью и специфичностью.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

Свидетельство о регистрации и патенты:

1. **Брызгунова О.Е.**, Морозкин Е.С., Попов А.В., Бондарь А.А., Тамкович С.Н., Зарипов М.М., Покушалов Е.А., Лактионов П.П. База данных учета биологических образцов и описания клинико-патологических характеристик пациентов с заболеваниями предстательной железы (БД-ЗПЖ)/ Database for registration of biological samples and clinico-pathological characteristics of prostate tumor and non-tumor patients (DRBS-PSiP). Внесена в Реестр баз данных РФ 28.03.2014 №2014620509.
2. Запорожченко И.А., Лактионов П.П., Морозкин Е.С., Скворцова Т.Э., **Брызгунова О.Е.**, Власов В.В. Способ выделения коротких РНК из биологических жидкостей. Патент на изобретение РФ № 2558292 от 01.07.2015.
3. **Брызгунова О.Е.**, Рузанкин П.С., Тарасенко А.С., Лактионов П.П. Способ ранней диагностики опухолей предстательной железы. Патент на изобретение РФ № 2756643 от 21.01.2021.

Статьи в научных журналах:

1. Tamkovich S.N., **Bryzgunova O.E.**, Rykova E.Yu., Permyakova V.I., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors // Clin. Chem. -2005. -V. 51. -P. 1317-1319. DOI: 10.1373/clinchem.2004.045062.
2. Skvortsova T.E., **Bryzgunova O.E.**, Lebedeva A.O., Mak V.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Methylated Cell-free DNA in Vitro and in Vivo // «Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum». Ed P.B. Gahan, Springer. -2011. -P. 185-194. DOI 10.1007/978-90-481-9382-0_25.
3. **Bryzgunova O.E.**, Laktionov P.P. Generation of Blood Circulating DNAs: Sources, Features of Struction and Circulation // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. -2014. -V. 8(3). -P. 203-219. DOI: 10.1134/S1990750814030020. Обзор.

Брызгунова О.Е., Лактионов П.П. Формирование пула циркулирующих ДНК крови: источники, особенности строения и циркуляции // Биомедицинская химия. - 2015. –Т. 61(4): -С. 409-426. DOI: 10.18097/PBMC20156104409. Обзор.

4. Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Skvortsova T.E., **Bryzgunova O.E.**, Bondar A.A., Loseva E.M., Vlassov V.V., Laktionov P.P. A phenol-free method for isolation of microRNA from biological fluids // Anal Biochem. -2015. -V. 479. –P. 43-47. DOI: 10.1016/j.ab.2015.03.028.

5. **Брызгунова О.Е.,** Тамкович С.Н., Черепанова А.В., Ярмошук С.В., Пермякова В.И., Аникеева О.Ю., Лактионов П.П. Перераспределение свободных и связанных с форменными элементами циркулирующих ДНК при доброкачественных и злокачественных заболеваниях предстательной железы // Acta Naturae. -2015. –V. 7(2). –P. 125-128.

Bryzgunova O.E., Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Yarmoshchuk S.V., Permyakova V.I., Anykeeva O.Y., Laktionov P.P. Redistribution of Free- and Cell-Surface-Bound DNA in Blood of Benign and Malignant Prostate Tumor Patients // Acta Naturae. -2015. –V. 7(2). –P. 115-118.

6. **Брызгунова О.Е.,** Лактионов П.П. Внеклеточные нуклеиновые кислоты мочи: источники, состав, использование в диагностике // Acta Naturae. -2015. – V. 7(3). –P. 54-60. Обзор.

Bryzgunova O.E., Laktionov P.P. Extracellular nucleic acids in urine: sources, structure, diagnostic potential. Acta Naturae. -2015. –V. 7(3). –P. 48-54. Обзор.

7. **Bryzgunova O.E.,** Zaripov M.M., Skvortsova T.E., Lekchnov E.A., Grigor'eva A.E., Morozkin E.S., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Ryabchikova E.I., Yurchenko Yu.B., Voitsitskiy V.E., Laktionov P.P. Comparative Study of Extracellular Vesicles from the Urine of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients // PLoS One. -2016. –V. 11. –P. e0157566. DOI: 10.1371/journal.pone.0157566.

8. Lekchnov E.A., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., **Bryzgunova O.E.,** Vlassov V.V., Laktionov P.P. Protocol for miRNA isolation from biofluids // Anal Biochem. - 2016. –V. 499. –P. 78-84. DOI: 10.1016/j.ab.2016.01.025.

9. Григорьева А., Дырхеева Н., **Брызгунова О.,** Тамкович С., Челобанов Б., Рябчикова Е. Контаминация препаратов экзосом, выделенных из биологических жидкостей // Биомедицинская химия. -2017. –Т. 63. –С. 91-96. DOI: 10.18097/PBMC20176301091

Grigor'eva A., Dyrkheeva N., **Bryzgunova O.,** Tamkovich S., Chelobanov B., Ryabchikova E. Contamination of exosome preparations, isolated from biological fluids // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. -2017. –N. 11. –P. 265-271. DOI: 10.1134/S1990750817030040.

10. **Брызгунова О.Е.,** Лактионов П.П. Современные методы исследования метилирования внеклеточных ДНК // Молекулярная биология. -2017. -Т. 51(2). – P. 195–214. DOI: 10.7868/S0026898417010074. Обзор.

Bryzgunova O.E., Laktionov P.P. Current Methods of Extracellular DNA Methylation Analysis // Molecular Biology (Russian). -2017. –N. 51(2). –P. 167–183. DOI: 10.1134/S0026893317010071.

11. **Bryzgunova O.E.,** Lekchnov E.A., Zaripov M.M., Yurchenko Yu.B., Yarmoschuk S.V., Pashkovskaya O.A., Rykova E.Yu., Zheravin A.A., Laktionov P.P. Bioinformatics analysis for evaluation of the diagnostic potentialities of miR-19b, -125b and -205 as

liquid biopsy markers of prostate cancer // AIP Conference Proceedings. -2017. – V. 1882. –P. 020009. DOI: 10.1063/1.5001588.

12. Запорожченко И.А., **Брызгунова О.Е.**, Лехнов Е.А., Осипов И.Д., Зарипов М.М., Юрченко Ю.Б., Ярмошук С.В., Пашковская О.А., Рыкова Е.Ю., Жеравин А.А., Лактионов П.П. Анализ представленности микроРНК в микровезикулах мочи и бесклеточной моче при заболеваниях предстательной железы // Биомедицинская химия. -2018. –Т. 64. –С. 38-45. DOI: 10.18097/PBMC20186401038.

Zaporozhchenko I.A., **Bryzgunova O.E.**, Lekchnov E.A., Osipov I.D., Zaripov M.M., Yurchenko Y.B., Yarmoschuk S.V., Pashkovskaya O.A., Rykova E.Y., Zheravin A.A., Laktionov P.P. Representation analysis of miRNA from clarified urine and urine microvesicles in prostate malignancies and non-malignant neoplasms. Biomed Khim. - 2018. V. 64(1). –P. 38-45. DOI: 10.1134/S1990750818020142.

13. **Bryzgunova O.E.**, Konoshenko M.Y., Laktionov P.P. MicroRNA-guided gene expression in prostate cancer: Literature and database overview. J Gene Med. -2018. – V. E3016. DOI: 10.1002/jgm.3016. **Обзор.**

14. Lekchnov E.A., Amelina E.V., **Bryzgunova O.E.**, Zaporozhchenko I.A., Konoshenko M.Yu., Yarmoschuk S.V., Murashov I.S., Pashkovskaya O.A., Gorizkii A.M., Zheravin A.A., Laktionov P.P. Searching for the Novel Specific Predictors of Prostate Cancer in Urine: The Analysis of 84 miRNA Expression // Int. J. Mol. Sci. - 2018. –V. 19(12). –P. 4088. DOI:10.3390/ijms19124088.

15. **Bryzgunova O.E.**, Zaporozhchenko I.A., Lekchnov E.A., Amelina E.V., Konoshenko M.Yu., Yarmoschuk S.V., Pashkovskaya O.A., Zheravin A.A., Pak S.V., Rykova E.Yu., Laktionov P.P. Data analysis algorithm for the development of extracellular miRNA-based diagnostic systems for prostate cancer // PLoS ONE. -2019. –V. 14(4). –P. e0215003. DOI: 10.1371/journal.pone.0215003.

16. Konoshenko M.Yu., Lekchnov E.A., **Bryzgunova O.E.**, Zaporozhchenko I.A., Yarmoschuk S.V., Pashkovskaya O.A., Pak S.V., Laktionov P.P. The Panel of 12 Cell-Free MicroRNAs as Potential Biomarkers in Prostate Neoplasms // Diagnostics (Basel). -2020. –V. 10(1). –P. 38. DOI: 10.3390/diagnostics10010038.

17. **Bryzgunova O.E.**, Konoshenko M.Y., Laktionov P.P. Concentration of cell-free DNA in different tumor types // Expert Rev Mol Diagn. -2021. –V. 21(1). –P. 63-75. DOI: 10.1080/14737159.2020.1860021. **Обзор.**

18. **Bryzgunova O.**, Konoshenko M., Zaporozhchenko I., Yakovlev A., Laktionov P. Isolation of Cell-Free miRNA from Biological Fluids: Influencing Factors and Methods // Diagnostics. -2021. –V. 11. –P. 865. DOI: 10.3390/diagnostics11050865. **Обзор.**

19. **Bryzgunova O.**, Bondar A., Ruzankin P., Laktionov P., Tarasenko A., Kurilshikov A., Epifanov R., Zaripov M., Kabilov M., Laktionov P. Locus-Specific Methylation of GSTP1, RNF219, and KIAA1539 Genes with Single Molecule Resolution in Cell-Free DNA from Healthy Donors and Prostate Tumor Patients: Application in Diagnostics // Cancers. -2021. –V. 13(24). –P. 6234. DOI: 10.3390/cancers13246234

20. **Bryzgunova O.**, Bondar A., Ruzankin P., Tarasenko A., Zaripov M., Kabilov M., Laktionov P. Locus-Specific Bisulfate NGS Sequencing of GSTP1, RNF219, and KIAA1539 Genes in the Total Pool of Cell-Free and Cell-Surface-Bound DNA in Prostate Cancer: A Novel Approach for Prostate Cancer Diagnostics // Cancers. -2023. – V. 15. –P. 431. DOI: 10.3390/cancers15020431.