

На правах рукописи

ЗАПОРОЖЧЕНКО ИВАН АНДРЕЕВИЧ

**МИКРОРНК ПЛАЗМЫ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО:
ПРОБОПОДГОТОВКА, ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ,
БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ВЕРИФИКАЦИЯ
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

Лактионов Павел Петрович, к.б.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук, г.н.с.

Официальные оппоненты:

Гуляева Людмила Федоровна, д.б.н., профессор

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Федеральный исследовательский центр фундаментальной и
трансляционной медицины, заведующая лабораторией

Малек Анастасия Валерьевна, к.м.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени
Н.Н. Петрова Министерства здравоохранения Российской Федерации,
заведующая лабораторией

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения
Российской академии наук

Защита состоится « 21 » декабря 2018 г. в 12⁰⁰ часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: 630090, Новосибирск-90, пр. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической
биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент

Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Рак легкого (РЛ) является одним из наиболее распространенных (более 50 случаев на 100 тыс. населения, 1,8 млн. новых случаев в год) и смертоносных раков в мире при 87% смертности (Ferlay et al., 2012). Несмотря на успехи в изучении патогенеза РЛ и значительные усилия по созданию и совершенствованию методов диагностики и лечения этого заболевания, заболеваемость и смертность от РЛ продолжает оставаться на относительно высоком уровне как в развивающихся, так и в развитых странах (19,7 смертей на 100 тыс. населения). При этом исследования молекулярных механизмов онкогенеза рака легкого показывают, что генетические и эпигенетические события в клетках опухоли могут быть использованы для выявления и диагностики заболевания, а также в качестве мишеней для направленной терапии РЛ (Chang et al., 2013). Разработка методов, пригодных для поиска и оценки концентрации таких маркеров, которые могут быть использованы для мониторинга заболевания и оптимизации терапии, является важнейшим направлением в борьбе с эпидемией онкологических заболеваний.

Эпигенетическая регуляция экспрессии играет ключевую роль в контроле многих клеточных процессов. Исследования последних десятилетий показали, что важными участниками эпигенетической регуляции являются некодирующие РНК, в том числе микроРНК, представляющие собой класс коротких некодирующих РНК (19-24 п.н.), играющих важную роль в регуляции клеточного цикла и апоптоза, пролиферации и дифференцировки клеток, миграции, реакции на стресс и т.д. (Almeida et al., 2011). Впервые микроРНК были обнаружены в 1993 году (Lee et al., 1993), однако их активное исследование началось только с начала 2000-ых гг. после того как была найдена микроРНК let-7 и установлена связь между изменением экспрессии микроРНК и злокачественной трансформацией клеток (Calin et al., 2002). Предполагают, что микроРНК могут контролировать экспрессию до 50% генов человека (Almeida et al., 2011). Показано, что микроРНК пост-транскрипционно подавляют экспрессию генов за счет деградации или обратимой инактивации мРНК-мишеней (Fabian et al., 2010; Wilczynska et al., 2015). Однако есть данные, что микроРНК могут действовать и по механизмам, не связанным с подавлением трансляции (Wilczynska et al., 2015).

Будучи вовлеченными в регуляцию большого количества мишеней и регуляцию жизнедеятельности клеток, микроРНК являются одними из ключевых участников патогенеза онкологических заболеваний (Сросе, 2009). Изменения профиля экспрессии микроРНК обнаружены при развитии большинства злокачественных опухолей, причем микроРНК

могут выступать в роли онкогенов, опухолевых супрессоров и являться драйверами злокачественной трансформации (Croce, 2009; Farazi et al., 2013).

Более того, изменения профиля экспрессии микроРНК, отражающие изменения в клетках опухоли, обнаружены в биологических жидкостях, в том числе в крови онкологических больных (Montani et al., 2016). Внеклеточные опухоль-специфичные микроРНК могут быть использованы в качестве биомаркеров, а их использование позволяет расширить объем диагностической информации, необходимой для улучшения диагностики и лечения онкологических заболеваний, и в первую очередь РЛ. Особенно перспективной представляется разработка методов «жидкой биопсии» на основе циркулирующих в крови опухолевых микроРНК. Тем не менее, на сегодняшний день в этой области остаются значительные пробелы, связанные как с необходимостью оптимизации и стандартизации технических и аналитических подходов к анализу микроРНК-онкомаркеров, так и с методологией поиска диагностически-значимых микроРНК, а также с оценкой вклада индивидуальных циркулирующих микроРНК в патогенез и клиническую диагностику рака легкого (Sozzi et al., 2014).

Объект исследования. Циркулирующие микроРНК плазмы крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого.

Методы исследования. Исследования выполнены на образцах плазмы крови здоровых доноров, больных немелкоклеточным раком легкого и эндобронхитом. В работе разработаны и использованы методы выделения РНК, в том числе при помощи силикатных носителей, количественная ОТ-ПЦР с TaqMan зондами, масштабная количественная SYBR Green ОТ-ПЦР микроРНК-мишеней с LNA-праймерами, биоинформатические и статистические методы анализа данных, в том числе построение и перевыборочная (bootstrap) оптимизация регуляризованных (LASSO) регрессионных моделей. В работе использован биостатистический анализ данных по экспрессии микроРНК в клетках опухолей легкого, полученных из базы данных проекта The Cancer Genome Atlas.

Целью работы являлся поиск маркеров рака легкого при помощи двух подходов: иррационального, основанного на анализе существующих данных, и рационального, основанного на масштабном анализе экспрессии множества маркеров в пуле циркулирующих микроРНК крови, а также разработка диагностической системы на основе панели найденных маркеров, оценка ее точности, устойчивости и пригодности для уточнения диагностики первичного немелкоклеточного рака легкого, мониторинга эффективности терапии и оценки прогноза течения

заболевания.

Для достижения поставленной цели планировалось решить следующие **задачи**:

- 1) Разработать эффективные и надежные способы получения препаратов микроРНК из плазмы крови с учетом биологических особенностей циркуляции микроРНК и ее концентрации в биологических жидкостях.
- 2) Сравнить экспрессию микроРНК-маркеров выявленных в результате анализа литературных данных в группах здоровых доноров и больных немелкоклеточным раком легкого, оценить возможность использования микроРНК в качестве диагностических, тераностических и прогностических маркеров рака легкого (иррациональный подход).
- 3) Провести масштабный анализ экспрессии микроРНК в плазме крови здоровых доноров, больных эндобронхитом и немелкоклеточным раком легкого разных стадий; оценить взаимосвязь уровня экспрессии циркулирующих микроРНК с клинико-патологическими характеристиками опухолевого процесса (рациональный подход).
- 4) Выявить перспективные микроРНК-маркеры, предложить способы формирования панелей, сформировать кандидатную панель микроРНК-маркеров для диагностики немелкоклеточного рака легкого и оценить ее эффективность.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В данной работе предложен оригинальный метод для эффективного и специфичного выделения микроРНК из плазмы крови при помощи однофазной водно-органической смеси. Подход к выделению нуклеиновых кислот, и в том числе циркулирующих микроРНК, из биологических жидкостей на основе такого принципа предложен впервые. Метод может быть использован в качестве основы для изготовления коммерческих наборов, предназначенных для получения препаратов микроРНК из плазмы крови, пригодных для использования в клинических диагностических лабораториях.

В рамках работы подтверждена перспективность использования циркулирующих микроРНК крови для диагностики немелкоклеточного рака легкого. Тем не менее, показано, что недостаточная стабильность отдельных микроРНК, а также иррационально подобранных панелей микроРНК, не позволяет использовать их в качестве надежных систем эффективной диагностики рака легкого.

Выполнено профилирование экспрессии 179-ти микроРНК в крови больных и здоровых доноров и проведен масштабный

двухстадийный поиск микроРНК-маркеров немелкоклеточного рака легкого. Предложен новый подход к анализу данных профилирования микроРНК плазмы крови, сочетающий использование статистических и биоинформатических подходов с данными о биологической активности отдельных микроРНК, который позволяет выбрать устойчивую панель микроРНК-маркеров рака легкого. Комбинация вышеперечисленных подходов была впервые предложена в данной работе.

На основании полученных данных предложена панель из 10 пар, состоящих из 14 микроРНК, которая позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью детектировать немелкоклеточный рак легкого, и может быть использована для выявления, дифференциальной диагностики и мониторинга прогрессирования заболевания.

Положения, выносимые на защиту:

1. Предложен однофазный метод выделения циркулирующих микроРНК плазмы крови человека, позволяющий получать препараты микроРНК, свободные от примесей и ингибиторов обратной транскриптазы и термостабильной полимеразы, и не уступающий по эффективности методу экстракции фенол-хлороформом.
2. Показано, что из 7-ми микроРНК-маркеров рака легкого, выбранных из литературных данных, только уровни экспрессии miR-19b и miR-183 позволяют выявлять больных раком легкого с чувствительностью 94,74% и специфичностью 95,24%, а отношение концентраций miR-125b и miR-19b изменяется в ходе неoadъювантной химиотерапии и коррелирует с эффективностью лечения и выживаемостью пациентов.
3. Исследована экспрессия 179-ти микроРНК в плазме крови больных немелкоклеточным раком легкого и здоровых доноров и выявлены дифференциально экспрессируемые микроРНК, причем выявленные изменения в экспрессии микроРНК согласуются с данными проекта The Cancer Genome Atlas об экспрессии микроРНК в клетках плоскоклеточных опухолей легкого.
4. С помощью логистических регрессионных моделей из 241 пар микроРНК, экспрессия которых достоверно отличается в плазме крови больных раком легкого и здоровых доноров, выбраны микроРНК, являющиеся наиболее информативными маркерами рака легкого, и сформирована панель из 19-ти микроРНК для верификации. Проведена верификация этой панели на независимой выборке и подтверждена стабильность и диагностическая значимость экспрессии 35-ти пар микроРНК. Показано, что экспрессия 14-ти пар микроРНК достоверно зависит от анатомической стадии рака легкого, экспрессия 39-ти пар

связана с размером опухоли, а экспрессия 18-ти пар – со степенью распространения в лимфатические узлы.

5. При помощи bootstrap-оптимизированной LASSO-пенализованной логистической регрессии из 15-ти наиболее диагностически-значимых пар микроРНК сформирована панель из 10 пар микроРНК, одновременный анализ экспрессии которых позволяет разделять больных раком легкого и доноров контрольной группы с высокой эффективностью (AUC=0,979).

Личный вклад автора. Все описанные в работе результаты получены самим автором или при его непосредственном участии. Публикации за первым авторством автора диссертации написаны непосредственно самим автором, остальные статьи были написаны и подготовлены в публикации при непосредственном участии автора.

Публикации и апробация работы. По результатам работы опубликовано 6 научных публикаций в рецензируемых журналах, индексируемых в международных базах Web of Science и/или Scopus.

Результаты работы представлены на российских и зарубежных конференциях, в том числе FEBS Workshop “Decoding non-coding RNAs in development and cancer” (Капри, Италия, 2014), «Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS IX)» (Берлин, Германия, 2015), EMBO Workshop «Cellular and molecular mechanism of tumour-microenvironment crosstalk» (Томск, Россия, 2015), The European Cancer Congress 2015 (Вена, Австрия, 2015), Молекулярная онкология: итоги и перспективы (Москва, Россия, 2015), II Петербургский онкологический форум «Белые Ночи – 2016» (Санкт-Петербург, Россия, 2016), The International Symposium: Systems Biology and Biomedicine 2016 (Новосибирск, Россия, 2016), V Съезд биохимиков России (Сочи, Россия, 2016), Химическая биология (Новосибирск, Россия, 2016), IX Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2017), ESMO 2017 Congress (Мадрид, Испания, 2017).

На разработанный в ходе работы метод выделения микроРНК из плазмы крови получен патент РФ (№ 2558292 от 1 июля 2015 г.).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка литературы и 2 приложений. Материал работы изложен на 170 страницах и содержит 24 рисунка, 17 таблиц, 2 приложения и список литературы из 643 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В данной работе представлены данные о полном цикле предварительных исследований, направленных на поиск микроРНК-

маркеров РЛ и предложена диагностическая панель из 10-ти пар микроРНК для выявления РЛ.

1.1. Разработка метода получения препаратов микроРНК из плазмы крови

Известно, что циркулирующие в крови микроРНК заключены в мембранные частицы или находятся в комплексах с белками и липопротеинами, которые не только защищают микроРНК от гидролиза, но и препятствуют ее эффективному выделению (Turchinovich et al., 2012). Для получения препаратов циркулирующих микроРНК необходимо разрушить содержащие их комплексы, обеспечить защиту свободных микроРНК от РНКаз, количественно выделить микроРНК из раствора и очистить препарат от примесей и ингибиторов ферментов. Для решения этой задачи был предложен *однофазный метод* выделения микроРНК из плазмы крови и других биологических жидкостей без применения фенол-хлороформной экстракции (рисунок 1), основанный на системах растворителей для экстракции и фракционирования липидов (Folch et al., 1957). Белковые и липопротеиновые комплексы в образце разрушают при помощи гуанидин изотиоцианата (ГИТЦ) в присутствии ингибитора РНКазной активности (2-меркаптоэтанол), а затем гидрофобные взаимодействия разрушают в системе растворителей этанол:хлороформ:вода (2:1:1). Из полученного раствора получают препарат микроРНК при помощи очистки на микроколонках с силикатным носителем.

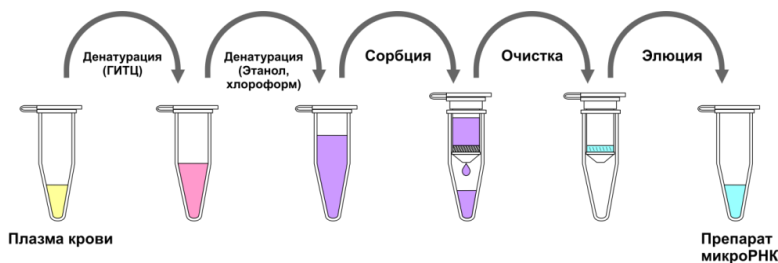


Рис 1. Схема однофазного метода для выделения микроРНК из крови.

В работе показано, что наибольшая эффективность выделения микроРНК достигалась при обработке 4М ГИТЦ (таблица 1). Выход микроРНК при использовании однофазного метода составил 72,5% и 54,9% при выделении из водного раствора и плазмы крови, соответственно.

Таблица 1. Выбор концентрации ГИТЦ

	Потери*	Проскок	Сорбент**	Элюат
Однофазный метод				
К, 4М ГИТЦ	0±0%***	0,8±0,7%	8,1±2,2%	72,5±3,6%
П, 4М ГИТЦ	15,3±1,8%	23,3±3,2%	6,1±2,1%	54,9±3,1%
П, 2М ГИТЦ	56,3±5,1%	12,2±1,7%	3,9±1,8%	24,8±4,8%
П, 1М ГИТЦ	63,1±4,9%	11,4±2,6%	3,1±1,5%	14,1±3,7%
Кислый фенол-хлороформ				
К	18,4±2,1%	9,2±1,5%	15,6±3,1%	56,4±3,6%
П	22,1±3,4%	21,3±2,2%	14,7±2,3%	40,9±4,4%

*Органическая фаза или осадок **Остаточная радиоактивность микроколони; ***В отсутствие плазмы осадок не формировался; К – контроль, П- плазма крови; Среднее±SD вычислены по 10 независимым повторам.

ОТ-ПЦР анализ препаратов РНК (n=5) подтвердил высокую эффективность однофазного протокола и сохранность микроРНК в препаратах (рисунок 2А). Линейный характер кривой разведения, полученных серийным разведением препарата циркулирующих микроРНК свидетельствует об отсутствии ингибиторов ферментативных реакций в образцах РНК. (рисунок 2Б).

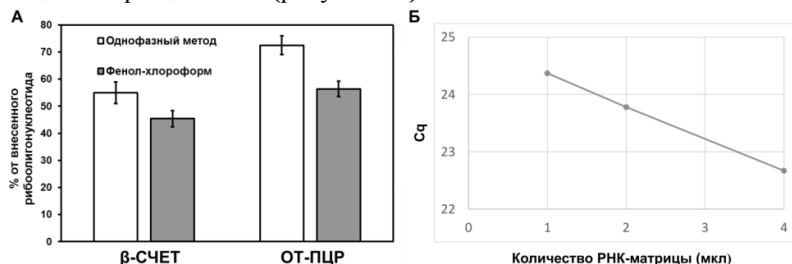


Рис 2. (А) Эффективность выделения рибоолигонуклеотида из плазмы крови. **(Б)** Пример кривой разбавления. По вертикальной оси отложены значения Cq miR-16. Стандартное отклонение не превышало 0,2 цикла по сумме 10 независимых экспериментов.

Для сравнения эффективности однофазного метода и экстракции фенол-хлороформом в полученных образцах определяли концентрацию трех микроРНК (miR-16, miR-21, miR-126) при помощи ОТ-ПЦР. Результаты, демонстрируют отсутствие статистические различий значений порогового цикла (Cq) между методами (таблица 2). При помощи ОТ-ПЦР 7-ми микроРНК, которые встречаются не только в циркулирующих нуклеопротеиновых комплексах, но и в мембранных

везикулах (Gallo et al., 2012; Li et al., 2014; Lunavat et al., 2015), показано все микроРНК определяются в препаратах на уровне уверенной детекции (18-35 цикл), а данные хорошо согласуются с другими работами (Hu et al., 2014; Liu et al., 2013; Markou et al., 2013).

Таблица 2. Эффективность выделения эндогенных микроРНК

		miR-16	miR-126	miR-21
Однофазный метод	Среднее Cq	20,78	25,23	28,91
	Cq SD	1,43	1,44	2,50
Фенол-хлороформ	Среднее Cq	21,03	25,00	28,73
	Cq SD	1,81	1,62	1,97

Данные представлены как среднее±SD по результатам 10 независимых повторов.

Полученные данные позволяют утверждать, что разработанный однофазный метод не уступает эффективностью экстракции кислым фенол-хлороформом, позволяет получать препараты эндогенных микроРНК плазмы крови пригодные для анализа при помощи высокоточных методов и может быть использован в дальнейшей работе.

1.2. Исследование онкоспецифических микроРНК в крови

Известно, что в крови больных РЛ присутствуют онкоспецифичные микроРНК, отражающие фенотип клеток опухоли, концентрация которых коррелирует с развитием заболевания (Montani et al., 2016). Для пилотного исследования из литературных данных была выбрана панель из 7-ми перспективных микроРНК-маркеров (miR-19b, miR-21, miR-25, miR-125b, miR-126, miR-205, miR-183), которые регулируют ключевых участников онкогенных сигнальных путей и являются потенциальными маркерами для обнаружения, прогноза течения РЛ, мониторинга терапии и раннего выявления рецидивов. Второй целью этого этапа являлась оценка пригодности однофазного метода для анализа диагностических маркеров в крови. Концентрация микроРНК была определена в образцах плазмы крови здоровых доноров (ЗД), первичных больных аденокарциномой (АКЛ) и плоскоклеточным РЛ (ПКРЛ), а также образцах от пациентов на разных стадиях комбинированной противоопухолевой терапии. Для определения уровня экспрессии микроРНК была использована количественная ОТ-ПЦР с TaqMan-зондами (Chen et al., 2005). Для нормализации данных ОТ-ПЦР использовали уровень экспрессии miR-16.

Был выполнен анализ зависимости экспрессии микроРНК от демографических и клинико-патологических характеристик доноров. Для трех возрастных групп: < 60 лет; 60-70 лет; > 70 лет, было показано, что

средняя концентрация miR-19b была повышена в более возрастных группах, а концентрация miR-126 изменялась колоколообразно. Исследование зависимости экспрессии микроРНК от клинических характеристик пациентов не показало связи экспрессии микроРНК с объемом и локализацией опухоли (центральная или периферическая). Однако, экспрессия miR-205 была достоверно различна ($P=0,022$) в плазме крови больных АКЛ и ПКРЛ, что коррелирует с ранее опубликованными данными (Zhang et al., 2012; Hamamoto et al., 2013; Dacic et al., 2010).

Сравнение уровней экспрессии микроРНК между ЗД и больными РЛ показало наличие четырех достоверно отличающихся по уровню экспрессии микроРНК (miR-19b, miR-21, miR-25, miR-183, $P<0,05$) (рисунок 3). При этом амплитуда различий была существенна только для трех микроРНК – miR-19b, miR-25 и miR-183. При ПКРЛ экспрессия четырех микроРНК (miR-19b, miR-126, miR-25, miR-205) была изменена по сравнению с ЗД, а при АКЛ – только двух (miR-19b, miR-183).

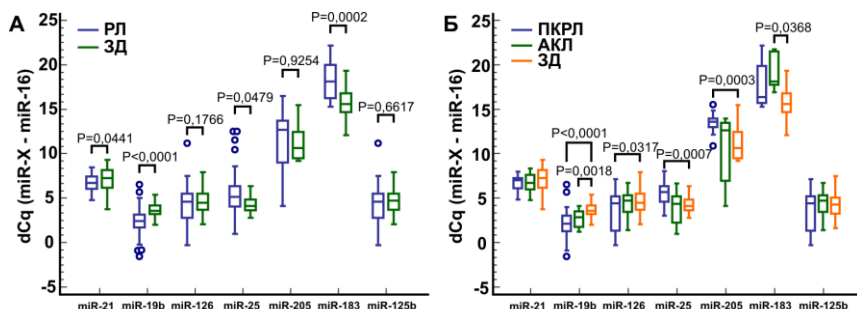


Рис 3. Экспрессия микроРНК в плазме крови больных НМКЛ и ЗД. (А) Сравнение групп НМКЛ и ЗД.; (Б) Сравнение групп ПКРЛ, АКЛ и ЗД.

Для определения диагностической значимости различий в экспрессии микроРНК был проведен ROC-анализ (рисунок 4). Из всех микроРНК miR-19b лучше всего выявляла больных ПКРЛ (чувствительность 75%, специфичность 90,7%) и РЛ в целом (чувствительность 69%, специфичность 93%), а для АКЛ наиболее эффективным маркером была miR-183 (чувствительность 100%, специфичность 81%). Комбинация miR-19b и miR-183 с помощью бинарной логистической регрессии позволила выявлять больных РЛ с чувствительностью 94,74% и специфичностью 95,24% (AUC: 0,99).

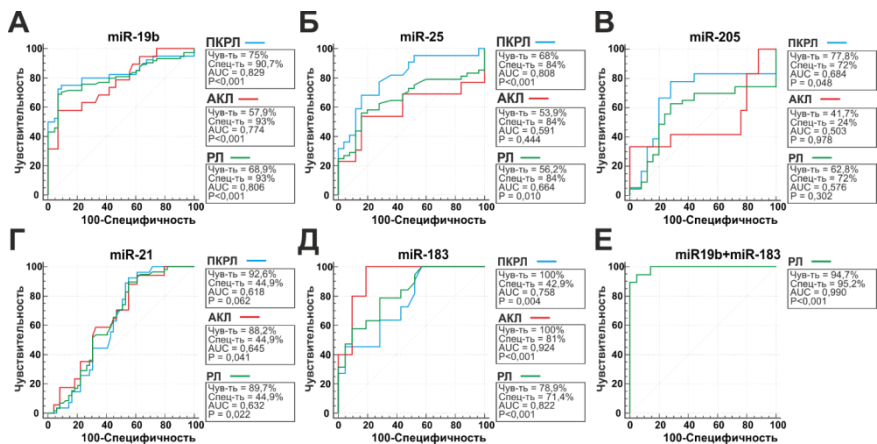


Рис 4. ROC-кривые диагностической значимости микроРНК. (А) – (Д) Отдельные микроРНК; (Е) Классификатор на основе бинарной логистической регрессии miR-19b и miR-183. На ROC-кривых представлены результаты разделения групп больных ПКРЛ, АКЛ или объединенной группы больных НМКЛ и ЗД.

В результате противоопухолевой терапии происходит активное разрушение опухолевых клеток, изменение клонального состава и фенотипа клеток опухоли, сопровождающиеся изменением экспрессии микроРНК в клетках опухоли и крови больных (McGranahan et al., 2017). Эти изменения могут служить индикатором эффективности терапии и могут быть использованы для мониторинга возможного рецидива заболевания. В работе была исследована динамика экспрессии 5-ти микроРНК (miR-19b, miR-25, miR-205, miR-125b, miR-126) в плазме больных РЛ в ходе комбинированной противоопухолевой терапии (рисунок 5). Изменение концентрации miR-19b и miR-125b было достоверно связано с ответом на химиотерапию ($P=0,035$ и $P=0,029$) и оперативное вмешательство ($P=0,035$, только miR-19b), при этом их поведение в группах пациентов с частичным ответом на противоопухолевую терапию и пациентов со стабилизацией или прогрессией заболевания также было различным. Интересно, что отношение концентраций miR-19b и miR-125b также достоверно менялось в ответ на терапию ($P=0,04$), показывая перспективность подхода парной нормализации для поиска микроРНК-маркеров.

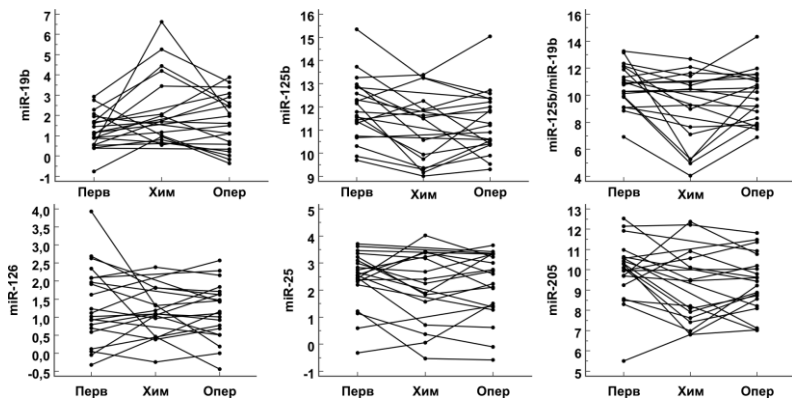


Рис 5. Экспрессия микроРНК в плазме больных РЛ до терапии (Перв), после химиотерапии (Хим) и после оперативного удаления опухоли (Опер). Линии соединяют данные от одного пациента.

Была проанализирована связь экспрессии микроРНК с выживаемостью пациентов (рисунок 6). Выживаемость пациентов с высокой экспрессией miR-19b относительно значения медианы по группе больных РЛ была выше, чем у больных с низкой экспрессией этой микроРНК в плазме крови. Низкий уровень miR-21 был связан с повышением выживаемости после 10 месяцев, а низкая экспрессия miR-205 и miR-25 - с краткосрочной выживаемостью.

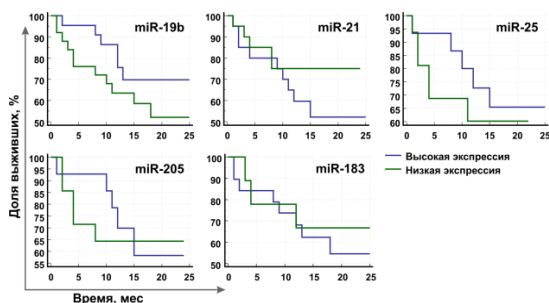


Рис 6. Кривые выживаемости Каплана-Мейера для первичных больных РЛ в зависимости от экспрессии микроРНК.

В группе мониторинга терапии для пациентов с низким отношением miR-19b/miR-125b был характерен ранний рецидив заболевания (рисунок 7).

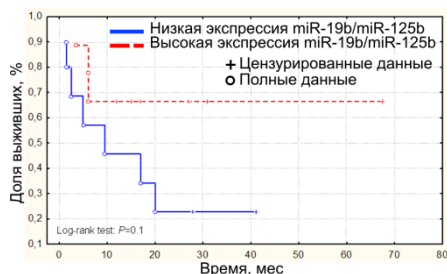


Рис 7. Кривые выживаемости Каплана-Мейера для пациентов группы мониторинга терапии в зависимости от экспрессии miR-19b/miR-125b.

Таким образом, микроРНК показали себя эффективными маркерами РЛ, но, несмотря на высокую чувствительность и специфичность miR-19b и miR-183, современная практика показывает, что система, состоящая из двух микроРНК-маркеров и единственного нормализатора, является недостаточно устойчивой для внедрения в клиническую практику.

1.3. Масштабный поиск микроРНК-маркеров РЛ в плазмы крови

Для создания более надежной диагностической панели был проведен масштабный поиск маркеров РЛ в плазме крови. Сначала были получены и проанализированы данные об экспрессии микроРНК в плазме крови больных РЛ и ЗД. Данные были верифицированы с использованием независимой выборки, включающей группу больных с хроническим воспалительным заболеванием легкого - эндобронхитом (ЭБ), и была выбрана перспективная панель микроРНК для диагностики РЛ.

Масштабный анализ профиля циркулирующих микроРНК в препаратах микроРНК, полученных из плазмы крови больных ПКРЛ (n=14), АКЛ (n=6) и ЗД (n=10), проводили с помощью платформы miRCURY LNA miRNA qPCR Panels Serum/Plasma (Exiqon, Дания), которая позволяет с высокой чувствительностью проанализировать экспрессию 179-ти микроРНК в образцах с низким содержанием РНК (Jensen et al., 2011). В среднем в каждом образце достоверно обнаруживалось 149 микроРНК. Во всех препаратах, кроме образца H02 от ЗД, отсутствовали ингибиторы ОТ-ПЦР и гемолиз. Наиболее подходящим нормализатором для данных согласно алгоритму NormFinder (Andersen et al., 2004) был признан усредненный уровень экспрессии всех микроРНК в образцах (глобальное среднее) (Mestdagh et al., 2008). Обзорный анализ данных при помощи метода главных компонент не выявил формирования групп по статусу донора (больной РЛ или ЗД) или гистологическому типу РЛ. Неконтролируемый кластерный анализ 47-ми

наиболее вариабельных микроРНК показал средние тенденции к кластеризации образцов больных РЛ и ЗД и выявил существование групп дифференциально экспрессированных микроРНК (рисунок 9).

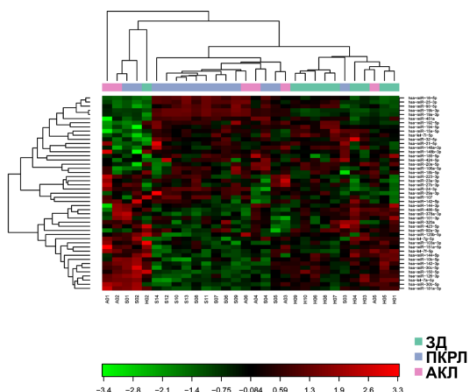


Рис 9. Тепловая карта и неконтролируемый иерархический кластерный анализ для 47-ми наиболее дифференциально экспрессированных микроРНК

Концентрация 18 микроРНК достоверно ($p < 0,05$ после поправки Бенджамини-Хочберга) отличалась между группами ЗД и больных ПКРЛ (рисунок 10), однако достоверных различий между АКЛ и ЗД, а также АКЛ и ПКРЛ найдено не было. Среди выявленных микроРНК стоит отметить уже исследованную miR-19b и микроРНК miR-486 и miR-15b, которые ранее уже были предложены в качестве маркеров РЛ (Boeri et al., 2011; Hennessey et al., 2012).

Для того, чтобы выяснить как экспрессия микроРНК в клетках опухолей связана с экспрессией циркулирующих микроРНК и выбрать циркулирующие микроРНК, наиболее вероятным источником которых являются клетки опухолей, были использованы транскриптомные данные онкологических больных проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA). В результате исследования экспрессии зрелых микроРНК и пре-микроРНК в парных образцах опухоли и прилежащей здоровой ткани легкого больных ПКРЛ ($n=45$) было обнаружено, что дифференциально экспрессированные в плазме микроРНК также deregulированы в опухолевой ткани ($P < 0,05$ после поправки Бенджамини-Хочберга). Так, экспрессия зрелых miR-210 и miR-130b и их предшественников была достоверно повышена в клетках опухолей, в то время как для miR-19a, miR-19b, miR-15b и miR-324 изменения были выявлены только на уровне предшественников. Экспрессия как зрелых miR-144, miR-150, miR-29b, miR-29c, miR-486, miR-22 и их предшественников была понижена в опухоли, в то время как экспрессия зрелых miR-30e и miR-425 в опухолевой ткани была достоверно снижена, а их предшественников - нет. Эти данные

демонстрируют, что источником как минимум части циркулирующих микроРНК могут быть клетки опухолей. При этом нарушении экспрессии микроРНК в ткани опухоли не всегда сопровождается изменением ее уровня в крови. Если ткань опухоли не является основным источником данной микроРНК в крови, то эффект может «маскироваться» молекулами, происходящими из других источников, например, клеток крови (Pritchard et al., 2012).

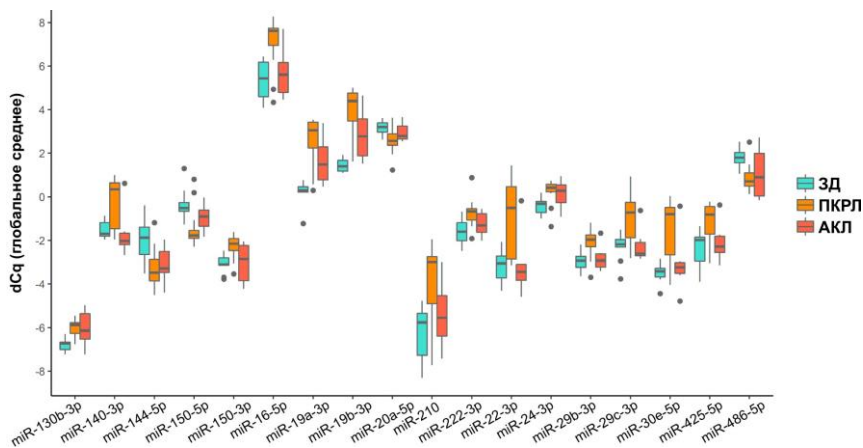


Рис 10. Дифференциально экспрессированные микроРНК между группами ЗД и ПКРЛ. Значения dCq нормализованы на глобальное среднее.

На основе данных был проведен выбор наиболее диагностически значимых микроРНК при помощи метода попарных отношений экспрессии микроРНК, ранее использованного в работах Boeri и Landoni с соавторами (Boeri et al., 2011; Landoni et al., 2015). Такой подход позволил авторам успешно выявить пары микроРНК с дифференциальной экспрессией, однако недостатком такого подхода является рост числа анализируемых переменных, что усложняет статистический анализ результатов и повышает вероятность получения ложноположительных результатов. Из анализа был исключен образец ЗД (H02), а образцы всех онкологических больных были объединены в единую группу, для увеличения размера и разнообразия выборки.

Экспрессия микроРНК была нормализована при помощи построения 9729 парных отношений 140 микроРНК, экспрессия которых определялась в более чем 80% образцов, причем не менее чем в 50%

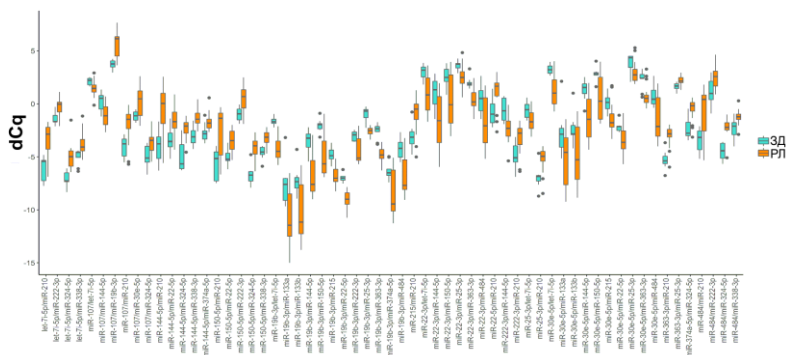


Рис 13. Экспрессия пар, содержащих 19 выбранных микроРНК в группах ЗД и больных РЛ.

Для того, чтобы оценить экспериментальную воспроизводимость экспрессии выбранных мишеней, экспрессия 19-ти микроРНК была верифицирована на независимой выборке больных раком легкого ($n=30$), больных ЭБ ($n=10$) и ЗД ($n=20$) с использованием miRCURY LNA miRNA qPCR. Циркулирующие микроРНК уверенно детектировались во всех образцах (в среднем 18 микроРНК в образце). Два образца (РЛ и ЭБ) с низким качеством данных были исключены из анализа. К данным была применена парная нормализация и показано, что экспрессия 26-ти пар микроРНК достоверно отличалась между больными РЛ и ЗД, в то время как больных эндобронхитом от больных РЛ и ЗД отличали 56 и 29 пар, соответственно ($P<0,05$ после поправки Бенджамини-Хочберга). Экспрессия 20-ти пар микроРНК достоверно отличала больных РЛ и обе контрольные группы ($P<0,05$ после поправки Бенджамини-Хочберга). Сравнение данных двух экспериментов показало, что воспроизвелась только часть данных относительно экспрессии микроРНК, что совпадает литературными данными (Pritchard et al., 2012). На основании результатов данные об экспрессии 35-ти пар микроРНК, дифференциально экспрессированных в обоих экспериментах, были объединены в одну выборку, включающую 50 больных РЛ, 9 больных ЭБ и 28 ЗД.

Была исследована связь экспрессии микроРНК с клинико-патологическими показателями пациентов. Экспрессия 39-ти пар (например, let-7i-5p/miR-222-3p и miR-484/miR-374a-5p) была связана с размером опухоли. Экспрессия 18-ти пар микроРНК отличалась у больных с распространением РЛ в лимфатические узлы (N_{1-2}), больными, без опухолевых клеток в лимфатической системе (N_0) и ЗД. Показано, что

miR-107/miR-484 достоверно отличает больных I стадии от ЗД, miR-484/miR-324-5p имеет куполообразную зависимость от стадии заболевания, а miR-374a/miR-133b отличает больных II-III стадии от больных I стадии и ЗД. Кроме того уровень экспрессии нескольких пар микроРНК отличал больных III стадии от больных более ранних стадий.

ROC-анализ диагностической значимости выбранных пар микроРНК для группы онкологических больных (ПКРЛ и АКЛ) и контрольной группы (ЗД и ЭБ) показал, что ни одна из пар микроРНК не обладала достаточной чувствительностью и специфичностью для полного разделения групп доноров. (рисунок 14). Только для пар miR-484/miR-222-3p и miR-484/miR-324-5p значение AUC превышало 0,8.

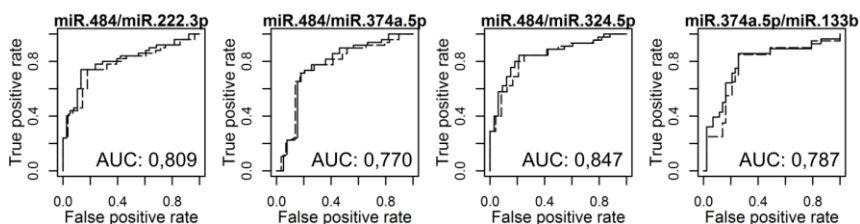


Рис 14. ROC-кривые классификации групп ПКРЛ+АКЛ и ЗД+ЭБ (сплошная линия) или ПКРЛ+АКЛ и ЗД (прерывистая линия) на основании экспрессии пар микроРНК. Представлены ROC-кривые со значением площади под кривой (AUC) не менее 0,75.

Для выбора компактной и надежной диагностической панели br 15-ти пар микроРНК с $AUC > 0,7$ использовали LASSO-пенализованную логистическую регрессию, параметры которой оптимизировали методом bootstrap (рисунок 15). По результатам построения 2000 bootstrap-моделей со средним AUC 0,9312 (95% CI 0,9305-0,9320) был выбран состав и подобраны оптимальные коэффициенты для финальной регрессионной модели, в которую вошли 10 пар микроРНК (14 микроРНК): miR-22-3p/miR-210; miR-107/miR-222-3p; miR-19b-3p/miR-484; miR-150-5p/miR-144-5p; miR-484/miR-374a-5p; miR-484/miR-338-3p; miR-484/miR-324-5p; let-7i-5p/miR-222-3p; miR-22-5p/miR-324-5p; miR-374a-5p/miR-133b. При помощи такого сочетания пар микроРНК достигалась чувствительность 94,8% и специфичность 90% (AUC 0,979) при классификации доноров на группу онкологических больных и контрольную группу. Из вошедших в диагностическую панель пар miR-374a-5p/miR-133b связана с анатомической стадией рака легкого, miR-484/miR-374a-5p – с размером

опухоли на ранней стадии, а let-7i-5p/miR-222-3p – с распространением в лимфатические узлы и размером опухоли.

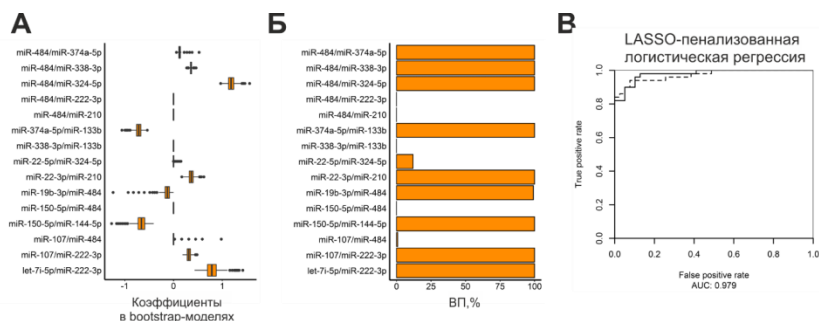


Рис 15. Оптимизация LASSO-пенализованной модели для логистической регрессии экспрессии микроРНК в плазме крови. (А) Распределение коэффициентов для членов регрессии в перевыборочных наборах данных; (Б) Важность переменных; (В) ROC-кривые для оптимизированной (непрерывная линия) и «наивной» модели (прерывистая линия).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование «жидкой биопсии» для диагностики рака предполагает необходимость разработки надежных компонентов диагностической системы: протокола пробоподготовки, набора эффективных диагностических маркеров и аналитической системы для определения их концентраций. В работе была исследована экспрессия циркулирующих микроРНК плазмы крови и по результатам исследования предложена панель микроРНК в качестве диагностического инструмента для выявления РЛ. Большинство микроРНК, входящие в диагностическую панель, ранее уже были описаны в контексте патогенеза РЛ (Kuo et al., 2016; Li et al., 2017; Lv et al., 2017; Cinegaglia et al., 2016 и др.) и полученные в работе данные хорошо согласуются с данными уже опубликованных исследований, в первую очередь с перспективными диагностическими панелями для РЛ, предложенными Bianchi с соавторами и Boeri с соавторами (Boeri et al., 2011; Bianchi et al., 2011). В то же время результаты обнажают проблемы, связанные с дизайном исследований, достоверностью и воспроизводимостью данных об экспрессии циркулирующих микроРНК (Rapisuwon et al., 2016; Sozzi et al., 2014), что подтверждает необходимость совершенствования методов этих областей для повышения успешности работ по поиску и оценке диагностической пригодности микроРНК-маркеров.

ВЫВОДЫ

- 1) Разработан, оптимизирован и охарактеризован однофазный метод выделения циркулирующих микроРНК плазмы крови человека, который позволяет получать препараты микроРНК, свободные от примесей и ингибиторов обратной транскриптазы и термостабильной полимеразы. Разработанный подход не уступает по эффективности и превосходит по воспроизводимости метод экстракции фенол-хлороформом, не использует фенола, отличается простотой, скоростью и меньшей трудоемкостью.
- 2) Оценена экспрессия 7-ми потенциальных микроРНК-маркеров рака легкого, выбранных из литературных данных. Уровни экспрессии miR-19b и miR-183 представляют наибольшую диагностическую ценность и позволяют отличать больных раком легкого от здоровых доноров с чувствительностью 94,74% и специфичностью 95,24%, а отношение концентраций miR-125b и miR-19b изменяется в ходе неоадьювантной химиотерапии и коррелирует с эффективностью лечения и выживаемостью пациентов.
- 3) С использованием ПЦР-микрочипов miRCURY LNA miRNA qPCR исследована экспрессия 179-ти микроРНК в плазме крови больных раком легкого и здоровых доноров и выявлена дифференциальная экспрессия 18-ти микроРНК в плазме крови больных плоскоклеточным раком легкого. Изменение экспрессии потенциальных микроРНК-маркеров плоскоклеточного рака легкого согласуется с данными проекта The Cancer Genome Atlas об экспрессии микроРНК в опухолевых клетках.
- 4) При помощи парной нормализации выявлена 241 пара микроРНК, экспрессия которых достоверно отличается в плазме крови больных раком легкого и здоровых доноров. С применением LASSO-пенализованных логистических регрессионных моделей определены микроРНК, являющиеся наиболее информативными маркерами рака легкого, и сформирована панель из 19-ти микроРНК для верификации. Верификация на независимой выборке, дополнительно включающей группу больных эндобронхитом, показала, что экспрессия микроРНК достоверно зависит от анатомической стадии РЛ, размера опухоли и степени распространения опухолевых клеток в лимфатические узлы. Подтверждена стабильность и диагностическая эффективность экспрессии 35-ти пар микроРНК, из которых 15 позволяют разделять больных плоскоклеточным раком и аденокарциномой легкого от здоровых доноров и больных эндобронхитом со значением площади под ROC-кривой не менее 0,7.
- 5) При помощи bootstrap-оптимизированной LASSO-пенализованной логистической регрессии сформирована панель из 10 пар микроРНК, одновременный анализ экспрессии которых позволяет отличать больных раком легкого от доноров контрольных групп с чувствительностью 94,8% и специфичностью 90% (AUC=0,979).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **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 // Analytical Biochemistry. 2015. Vol. 479. P. 43–47.
2. Ponomaryova A.A., Morozkin E.S., **Zaporozhchenko I.A.**, Skvortsova T.E., Cherdyntseva N.V., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Tuzikov S.A., Polovnikov E.S., Rykova E.Y., Laktionov P.P. Dynamic changes in circulating microRNA levels in response to antitumor therapy of lung cancer // Experimental Lung Research. 2016. Vol. 42, № 2. P. 95-102.
3. **Zaporozhchenko I.A.**, Morozkin E.S., Skvortsova T.E., Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Polovnikov E.S., Pashkovskaya O.A., Pokushalov E.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Plasma miR-19b and miR-183 as potential biomarkers of lung cancer // PLOS One. 2016. Vol. 11, № 10. P. e0165261.
4. **Zaporozhchenko I.A.**, Morozkin E.S., Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Zheravin A.A., Pashkovskaya O.A., Pokushalov E.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Profiling of 179 miRNA Expression in Blood Plasma of Lung Cancer Patients and Cancer-Free Individuals // Scientific Reports. 2018. Vol. 8. P. 1-13.
5. **Zaporozhchenko I.A.**, Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Laktionov P.P. The potential of circulating cell-free RNA as a cancer biomarker: challenges and opportunities // Expert Rev. Mol. Diagn. 2018. Vol. 18, № 2. P. 133-145.
6. Власов В.В., Рыкова Е.Ю., Пономарева А.А., **Запорожченко И.А.**, Морозкин Е.С., Чердынцева Н.В., Лактионов П.П. Циркулирующие микроРНК крови при раке легкого: перспективы использования для диагностики, прогноза и оценки эффективности терапии. // Молекулярная биология. 2015. Vol. 49, № 1. P. 48-57.
7. **Запорожченко И.А.**, Скворцова Т.Э., Лактионов П.П., Брызгунова О.Е., Власов В.В., Морозкин Е.С. Способ выделения коротких РНК из биологических жидкостей. Патент на изобретение № 2558292, зарегистрирован 1 июля 2015 г.

Подписано в печать
Формат бумаги 60х84, 1/16 печ.л.
Заказ №

Тираж 100 экз