

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Лактионов П.П.

Новосибирск - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список принятых сокращений.....	5
Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1. Основы молекулярной биологии микроРНК - особенности строения, биогенеза и функции в клетках человека.....	11
1.1.1. Происхождение и созревание микроРНК.....	11
1.1.2. Механизмы действия и регуляторные функции микроРНК.....	15
1.1.3. Регуляция созревания и активности микроРНК.....	17
1.2. Циркулирующие микроРНК крови человека.....	19
1.2.1. Происхождение и факторы, обеспечивающие стабильность циркулирующих микроРНК крови.....	19
1.2.1.1. Белки-переносчики микроРНК.....	20
1.2.1.2. Липопротеиновые комплексы крови.....	21
1.2.1.3. Внеклеточные везикулы.....	23
1.2.2. Кинетика циркуляции и выведения микроРНК из крови.....	27
1.2.3. Недостатки современных знаний и подходов к изучению внеклеточных микроРНК крови.....	28
1.3. Роль микроРНК в развитии онкологических заболеваний.....	29
1.3.1. Механизмы и следствия нарушения экспрессии микроРНК при раке.....	30
1.4. МикроРНК в патогенезе и диагностике онкологических заболеваний легкого.....	35
1.4.1. Особенности современных подходов к диагностике РЛ.....	35
1.4.2. Характеристики экспрессии микроРНК в тканях опухолей больных НМКЛ.....	38
1.4.3. Циркулирующие микроРНК крови как диагностические маркеры РЛ.....	42
1.4.3.1. Циркулирующие микроРНК как маркеры для диагностики РЛ.....	42
1.4.3.2. Циркулирующие микроРНК как маркеры для прогноза течения РЛ.....	46
1.4.3.3. Циркулирующие микроРНК как маркеры эффективности терапии РЛ.....	48
1.4.4. Современное состояние области диагностического применения циркулирующих микроРНК.....	50
1.5. Методы выделения, детекции и анализа циркулирующих микроРНК крови.....	50
1.5.1. Методики выделения микроРНК из крови.....	51
1.5.2. Методы определения концентрации микроРНК.....	54
1.5.3. Анализ данных.....	57

Глава 2. Материалы и методы.....	60
2.1. Материалы.....	60
2.1.1. Реактивы и препараты.....	60
2.1.2. Оборудование.....	60
2.1.3. Олигонуклеотиды, использованные в работе.....	61
2.1.4. Клинические характеристики доноров.....	62
2.2. Методы.....	63
2.2.1. Забор образцов крови и получение плазмы.....	63
2.2.2. Получение препаратов микроРНК из плазмы крови при помощи однофазного метода.....	64
2.2.3. Получение препаратов микроРНК из плазмы крови при помощи экстракции кислым фенол-хлороформом.....	64
2.2.4. Переосаждение РНК изопропанолом.....	65
2.2.5. Получение и работа с ³² P-мечеными рибоолигонуклеотидами.....	65
2.2.6. Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени.....	66
2.2.7. Определение профиля экспрессии микроРНК плазмы крови.....	67
2.2.8. Статистика и методы анализа данных.....	68
2.2.9. Статистический анализ данных профилей циркулирующих микроРНК плазмы крови на платформе Exiqon.....	69
2.2.10. Построение моделей при помощи LASSO-пенализованной логистической регрессии.....	70
2.2.11. Получение и работа с данными проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA).....	70
Глава 3. Результаты и их обсуждение.....	72
3.1. Разработка метода получения препаратов микроРНК из плазмы крови.....	72
3.2. Исследование экспрессии опухолеспецифических микроРНК в крови.....	77
3.2.1. Выбор панели микроРНК.....	77
3.2.2. Нормализация данных ОТ-ПЦР.....	79
3.2.3. Зависимость экспрессии микроРНК от пола и возраста доноров.....	80
3.2.4. Зависимость экспрессии микроРНК от клинико-патологических характеристик больных РЛ.....	80
3.2.5. Диагностическая ценность экспрессии микроРНК.....	82
3.2.6. МикроРНК как маркеры мониторинга эффективности противоопухолевой терапии.....	84
3.2.7. МикроРНК как маркеры прогноза выживаемости больных РЛ.....	87

3.3. Поиск биомаркеров РЛ при помощи анализа профиля экспрессии циркулирующих микроРНК плазмы крови.....	92
3.3.1. Стратегия исследования.....	92
3.3.2. Профилирование циркулирующих микроРНК плазмы крови.....	93
3.3.2.1. Подготовка и контроль качества образцов.....	93
3.3.2.2. Обзорный анализ экспрессии микроРНК в плазме крови.....	95
3.3.2.3. Сравнение экспрессии микроРНК в плазме с данными TCGA.....	98
3.3.2.4. Анализ экспрессии микроРНК при помощи парной нормализации.....	99
3.3.3. Верификация экспрессии микроРНК.....	105
3.3.3.1. Подготовка образцов, получение и анализ данных об экспрессии микроРНК...	105
3.3.3.2. Ассоциация экспрессии микроРНК с демографическими и клиническими параметрами больных РЛ.....	108
3.3.3.3. Определение диагностической значимости микроРНК и формирование диагностической панели.....	112
Заключение.....	119
Выводы.....	122
Список литературы.....	123
Приложение 1. Список пар микроРНК с достоверно значимыми изменениями экспрессии между группами доноров.....	166
Приложение 2. Список пар микроРНК, экспрессия которых достоверно связана с клинико-патологическими характеристиками больных РЛ.....	169

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

РНК – рибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная РНК

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

RISC – РНК-индуцируемый комплекс выключения гена, RNA-Induced Silencing Complex

3' НТО – 3' нетранслируемая область гена или его мРНК

5' НТО – 5' нетранслируемая область гена или его мРНК

при-микроРНК (pri-miRNA) - первичный транскрипт микроРНК, primary miRNA

пре-микроРНК (pre-miRNA) – шпилька-предшественник микроРНК, precursor miRNA

изомир — изомерные микроРНК (isomiRs)

ОТ – обратная транскрипция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции

МЦФ - малодозовая цифровая флюорография

Cq – значение порогового цикла ПЦР реакции

dCq – значение разницы пороговых циклов ПЦР реакций

ddCq – разница значений dCq между группами или парными образцами

ЗД – здоровый донор

РЛ – рак легкого

МКРЛ – мелкоклеточный рак легкого

НМКЛ – немелкоклеточный рак легкого

ПКРЛ – плоскоклеточный рак легкого

АКЛ – аденокарцинома легкого

ЭБ – больной эндобронхитом

ГИТЦ – гуанидин изотиоцианат

ЭДТА – этилендиамидтетрауксусная кислота

ДТТ - дитиотреитол

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Рак легкого 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 [1]. Несмотря на успехи в изучении патогенеза рака легкого 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 рака легкого [2]. 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. [3]. Впервые микроРНК были обнаружены в 1993 году [4], однако их активное исследование началось только с начала 2000-ых гг. после того как была найдена микроРНК let-7 и установлена связь между увеличением экспрессии микроРНК и злокачественной трансформацией клеток [5]. Предполагают, что микроРНК могут контролировать экспрессию до 50% генов человека [3]. Показано, что микроРНК посттранскрипционно подавляют экспрессию генов за счет деградации или обратимой инактивации мРНК-мишеней [6,7]. Однако есть данные, что микроРНК могут действовать и по другим механизмам, не связанным с подавлением трансляции [7].

Будучи вовлеченными в регуляцию большого количества мишеней и регуляцию жизнедеятельности клеток, микроРНК являются одними из ключевых участников патогенеза онкологических заболеваний [8]. Изменения профиля экспрессии микроРНК обнаружены при развитии большинства злокачественных опухолей, причем микроРНК могут выступать в роли онкогенов, опухолевых супрессоров и являться драйверами злокачественной трансформации [8,9].

Более того, изменения профиля экспрессии микроРНК, отражающие изменения в клетках опухоли, обнаружены в биологических жидкостях, в том числе в крови онкологических больных [10]. 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 рака легкого. 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 унификации технических и аналитических подходов к анализу микроРНК-онкомаркеров, так и с методологией поиска диагностически-значимых микроРНК, а также с оценкой роли индивидуальных циркулирующих микроРНК в патогенез и клиническую диагностику рака легкого [11].

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 неoadьювантной 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основы молекулярной биологии микроРНК - особенности строения, биогенеза и функции в клетках человека

В 1993 году Lee с сотрудниками нашли у *Caenorhabditis elegans* короткую РНК, продукт гена *lin-4*, обладавшую антисмысловую комплементарность к РНК гена *lin-14* [4]. Спустя почти десять лет, в 2000 году Reinhart с коллегами не обнаружили некодирующую РНК *let-7*, которая обладает комплементарностью участку в 3' нетранслируемой области (3'-НТО) продукта гена *lin-41* и регулирует ход поздних стадий развития *C. elegans* [12]. Эта находка послужила отправной точкой интереса научного сообщества к этим коротким РНК, названным микроРНК, и вскоре было обнаружено большое многообразие молекул со сходными свойствами, которые сейчас выделяют в отдельный класс малых РНК [13–15]. Представители микроРНК обнаружены у большинства животных и растений – последняя редакция базы аннотированных микроРНК miRBase (<http://www.mirbase.org>) содержит информацию о более чем 28 000 потенциальных микроРНК у почти 100 биологических видов, в том числе 2400 микроРНК человека, из которых около 1000 определено с высоким уровнем доверия (high confidence) [16–18]. Изучены особенности структуры микроРНК и их генов, механизмы их экспрессии и созревания, определены основные функции микроРНК в клетке и спектр ассоциированных с ними белковых факторов. В настоящей главе кратко описаны основные стадии «жизненного цикла» молекул микроРНК у высших животных, в первую очередь млекопитающих и человека.

1.1.1 Происхождение и созревание микроРНК

От других классов коротких регуляторных РНК, таких как малые ядрышковые РНК (snoRNA) [19], piwi-взаимодействующие РНК (piRNA) [20,21], эндогенные малые интерферирующие РНК (endo-siRNA) [21,22], короткие шпилечные РНК (shRNA, short hairpin RNA) [23], tiRNA (transcription initiation RNA) [24], микроРНК отличает совокупность особых структурных характеристик зрелой молекулы и ее предшественников, характер процесса созревания и присущие им характерные функции [25]. Исторически первые обнаруженные микроРНК являлись продуктами процессинга транскриптов микроРНК-кодирующих генов [4,12,14]. Fromm с соавторами с высокой степенью достоверности определили у человека 519 канонических генов микроРНК, которые находятся на всех аутосомах и X хромосоме человека и часто сгруппированы в кластеры [26–28]. Гены в пределах одного кластера обычно кодируют гомологичные микроРНК со схожим набором регулируемых мишеней, образуя семейства микроРНК. Однако, микроРНК-кодирующие гены являются не единственным источником

микроРНК – до 50% микроРНК млекопитающих происходит из РНК-транскриптов других генов [29,30]. Основным источником «внутригенных» микроРНК являются интроны, но гены микроРНК также бионформатически предсказаны в экзонах и регуляторных областях генов, таких как 3' и 5' нетранслируемые области (НТО) [29,31,40,41,32–39]. Кроме того, источником микроРНК могут служить другие РНК, например, малые ядрышковые РНК (мяРНК) и транспортные РНК (тРНК), мобильные элементы генома и продукты процессированных псевдогенов [42–47].

Многие микроРНК являются высоко консервативными, и их гомологи встречаются у видов, филогенетически далеко отстоящих друг от друга. Так, сравнительный анализ спектра малых РНК метазоа показал, что miR-100, встречается у всех билатеральных животных, а также у кишечноротового *Nematostella vectensis* [48]. Эволюционно наиболее жестко закреплена именно последовательность функциональных участков микроРНК и консервативность последовательности микроРНК снижается в ряду: 5'-концевой участок узнавания мишени; 3' участок, содержащий нуклеотиды, участвующие в компенсаторном спаривании; центральная часть основной цепи микроРНК; остальные части микроРНК дуплекса [48–51]. Регуляторные участки мРНК, содержащие сайты связывания микроРНК, также находятся под эволюционным давлением [52–54]. Наличие у большинства животных явных гомологов основных белков, участвующих в созревании и функционировании микроРНК позволяет предполагать общее филогенетическое происхождение микроРНК-опосредованной регуляции у животных [48].

Созревание микроРНК представляет собой серию последовательных расщеплений незрелых молекул-предшественников [55]. В современной научной литературе принято деление процессинга микроРНК на канонический путь и ряд исключений, формирующих гетерогенную группу неканонических путей созревания микроРНК.

Процесс созревания начинается в клеточном ядре с транскрипции гена микроРНК РНК-полимеразой II (Pol II) с образованием *при-микроРНК* (pri-miRNA или primary miRNA), часто достигающей нескольких тысяч нуклеотидов в длину и подвергающейся 5'-кэпированию и (не обязательно) 3'-полиаденилированию [56–58]. Исключение составляют гены, прилегающие к Alu-повторам, которые транскрибирует РНК-полимераза III (Pol III) [59]. Кластеры микроРНК часто транскрибируются с образованием длинных, вплоть до нескольких тысяч нуклеотидов, полицистронных молекул, которые служат источником предшественников нескольких разных микроРНК [60,61]. При-микроРНК обладает сложной вторичной структурой со множеством шпилек, и иногда также образуют сложную трехмерную структуру, параметры которой определяют эффективность ее процессинга [62,63].

После транскрипции при-микроРНК подвергается в ядре гидролизу *микропроцессорным комплексом (Microprocessor complex)*, состоящим из РНКазы III класса Drosha и белка DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene) [64–66]. Микропроцессор обладает сродством к двуцепочечной РНК и узнает в при-микроРНК шпильки характерной структуры, несущие определенные нуклеотидные мотивы [67–72]. В результате гидролиза высвобождаются шпильчатые молекулы РНК длиной ~70 нуклеотидов, называемые *предшественниками микроРНК* или *пре-микроРНК* (precursor miRNA - pre-miRNA) и состоящие из петлевого одноцепочечного участка и двуцепочечного стебля, имеющего выступающий 3'-конец длиной в 2 нуклеотида [65] [73]. Эти элементы структуры узнает экспортин-5 (exportin-5 или karyopherin-5), который при участии ГТФазы RanGTP переносит пре-микроРНК в цитоплазму [74–76].

В цитоплазме пре-микроРНК принимает комплекс белков, включающий РНКазу III Dicer, TRBP (transactivation response RNA-binding protein), PACT (protein kinase R activating protein), и один из белков семейства Argonaute (AGO1-4) [77]. Dicer узнает структуру пре-микроРНК (5' и 3' концы, и одноцепочечный участок [78–81]) и вырезает из нее петлевой участок с образованием ассиметричных двуцепочечных молекул РНК – *незрелых микроРНК* (immature miRNA) длиной 19-24 п.н. с выступающими 3' концами длиной в два нуклеотида [82,83]. Гидролиз происходит на фиксированном расстоянии в ~22 п.н. от конца дуплекса, который определяются взаимным пространственным расположением доменов белка, вследствие специфичность Dicer РНК часто сравнивают с молекулярной «линейкой» [80,84].

Завершающим этапом канонического пути созревания микроРНК является «загрузка» одной из цепей незрелой микроРНК на белок AGO образованием *РНК-индуцируемого комплекса выключения гена (RNA-Induced Silencing Complex)* – белкового комплекса, обеспечивающего регуляторные эффекты микроРНК [85,86]. Структура AGO высоко консервативна и состоит из четырех доменов N – концевой, PAZ (PIWI–Argonaute–Zwille), MID (middle) и PIWI, объединенных в субъединицы N–PAZ и MID–PIWI, которые соединены подвижным шарнирным участком [87,88]. MID и PAZ домены содержат сайты связывания 5'- и 3'-концов микроРНК, соответственно [89,90]. У человека найдено четыре паралога AGO (AGO1-4), не имеющих заметных функциональных и структурных отличий, за исключением наличия у AGO2 эндонуклеазной активности [91]. Различия в наборах микроРНК, связанных с разными AGO также невелики, но относительная избирательность все же присутствует [92,93].

Для обеспечения конформационных перестроек в загрузке микроРНК участвует комплекс Hsc70/Hsp90 и другие шапероны [94–96]. В процессе загрузки микроРНК в RISC происходит перенос и связывание микроРНК белком AGO, выбор ведущей цепи, расплетение дуплекса и удаление второй цепи.

Незрелая микроРНК передается AGO сразу после гидролиза Dicer. МикроРНК связывает MID домен AGO, причем связывание происходит ассиметрично и предпочтение отдается 5'-концу цепи, образуя менее термодинамически стабильный дуплекс – так определяется «ведущая цепь» микроРНК [97–99]. После успешного связывания конформационные изменения в AGO (происходящие при помощи комплекса шаперонов) погружают микроРНК внутрь белковой глобулы, где происходит связывание 3'-конца ведущей цепи, а молекула микроРНК изгибается и укладывается в специальный канал, разделяющий две доли белка [87,88,100,101]. Изгибание дуплекса приводит к его расплетению, а N-концевой домен AGO «вклинивается» и разделяет цепи микроРНК, в результате чего «пассажирская цепь», не имеющая связей с белком, выталкивается из комплекса [87,88,100,102]. В случае загрузки на AGO2 в пассажирскую цепь также вносится одноцепочечный разрыв, что дополнительно облегчает ее освобождение из RISC. Ведущая цепь микроРНК остается прочно закрепленной внутри AGO (через 3'-конец и сахарно-фосфатный остов ведущей цепи) и исполнит роль «стержня», стабилизируя его конформацию.

Ранее предполагалось, что ведущая и пассажирская цепи микроРНК четко определены, однако сейчас известно, что выбор цепи может зависеть от ткани, фазы клеточного цикла, возраста и стадии развития организма, факторов внешней среды, а также изменяться в результате мутагенеза в условиях эволюционного давления [103–105]. В некоторых случаях в клетке наблюдается паритет включения обеих цепей микроРНК в RISC [106–108].

Несмотря на то, что большинство известных микроРНК процессируются по описанному принципу, на данный момент обнаружены пути созревания микроРНК, которые проходят без участия ряда белков канонического пути. Такие альтернативные пути принято делить на Drosha- и Dicer-независимые. Известно несколько Drosha-независимых путей созревания микроРНК, в большинстве из которых предшественники микроРНК являются побочными продуктами процессинга других РНК (например, мяРНК и тРНК) и не требуют гидролиза при помощи микропроцессорного комплекса [109]. Так процессируются и предшественники части интронных микроРНК (миртронов – mirtrons). Линеаризованные интроны могут формировать шпилечные структуры, которые затем процессируются при помощи Dicer [110–112].

Ярким примером Dicer-независимого процессинга является процесс созревания miR-451 – консервативной микроРНК, принимающей активное участие в дифференцировке клеток эритропоэтического ряда у позвоночных [113]. При miR-451 процессируется микропроцессорным комплексом, но получающийся в результате шпилечный предшественник имеет слишком короткий стебель для узнавания Dicer (17 п.н.), и напрямую погружается на AGO2, который надрезает одну из цепей, а затем полученный промежуточный продукт

укорачивается при помощи поли-(А)-специфичной рибонуклеазы (PARN) до получения зрелой молекулы длиной 23 нт [114–116].

Вне зависимости от пути процессинга его результатом является образование активного RISC комплекса, содержащего ведущую цепь микроРНК, и способного регулировать экспрессию мРНК мишеней, имеющих соответствующие *цис*-регуляторные элементы [6].

1.1.2 Механизмы действия и регуляторные функции микроРНК

Основной функцией микроРНК считается подавление экспрессии генов на пост-транскрипционном уровне посредством связывания с участками в нетранслируемых областях мРНК, приводящего к деградации или обратимой инактивации последних. Предполагают, что микроРНК могут контролировать экспрессию от 30 до 50% генов человека [3] и, таким образом, играют важную роль в регуляции важнейших биологических процессов, в том числе клеточного цикла, роста и дифференцировки клеток, миграции, апоптоза и реакции на стресс [117,118]. Клеточные микроРНК выступают микро-регуляторами экспрессии [119] или «скульпторами транскриптома» [120], образуя своеобразную «страховочную сеть», препятствующую бесконтрольному изменению (в основном увеличению) экспрессии белков. Такая аналогия связана с тем, что в большинстве случаев результатом влияния микроРНК является только частичное изменение экспрессии гена-мишени [121–123] - не более чем в два раза на уровне белкового продукта [121,124,125]. В некоторых случаях микроРНК могут полностью ингибировать экспрессию гена-мишени (*lin-4* и *let-7* у *C. Elegans* [4,12,126]), однако это скорее исключение из правила. При этом, несмотря на столь «скромный» эффект большинства индивидуальных микроРНК, суммарный вклад микроРНК в регуляцию экспрессии клеточных белков нельзя недооценивать – активность микроРНК из большинства консервативных семейств необходима для нормального развития и функционирования организма (подробно описано в [120]).

Действие RISC можно разделить на два этапа – распознавание мишени и осуществление регуляторного эффекта. За узнавание и связывание мишени отвечает комплементарное связывание *участка узнавания* (seed) в микроРНК и *узнаваемого участка* (seed-match или miRNA response element - MRE) в мРНК [127]. Канонические участки узнавания включают нуклеотиды 2-7 или 2-8 с 5' конца микроРНК, связывание которых может дополнительно подкрепляться неканоническим спариванием первого нуклеотида с 5'-конца микроРНК с аденозином в мРНК мишени [77,128–132]. Взаимодействие с мишенью может дополнительно стабилизироваться за счет «компенсаторного» спаривания одного или нескольких оснований на 3'-конце микроРНК [133]. Описан также ряд неканонических сайтов узнавания, в том числе

центрированные (centered) сайты узнавания, которые образуют 4-15 нуклеотиды с 5' конца микроРНК [51,134], и виды взаимодействия с мишенью в которых участвуют различные комбинации нуклеотидов, разнесенных по последовательности микроРНК [135,136]. В комплексах, образованных участком узнавания и мишенью часто присутствуют ошибочно спаренные и «вывернутые» основания, причем предполагается, что это может играть важную функциональную роль в механизме узнавания мишени [134,137–139]. В силу особенностей узнавания мишеней, большинство микроРНК не обладает строгой специфичностью, и способны регулировать до 200-500 мРНК-мишеней [26,77,129]. Молекулы мРНК могут содержать множественные сайты узнавания микроРНК, которые являются синергистами или антагонистами [140,141]. Антагонистами могут выступать и сайты связывания, находящиеся на разных мРНК [142]. Гибкость и конкурентность узнавания и связывания мишени приводят к формированию сложных регуляторных сетей, вовлекающих большее число экспрессируемых мРНК [142–144]. Стоит отметить, что в редких случаях AGO также может принимать участие в узнавании мишени [145].

Основные регуляторные функции микроРНК осуществляет посредством рибонуклеопротеидного комплекса RISC. После узнавания мишени с AGO связывается белок GW182 (TNRC6A,B,C у человека), который обеспечивает взаимодействие RISC с белками трансляционного аппарата и привлекает комплексы, такие как CCR4-NOT, PAN2-PAN3, DCP1-DCP2, DDX6 [146–152]. Наиболее каноническим действием микроРНК является подавление трансляции, для которого предложено несколько разных механизмов [6,7,153,154]. Широкий набор регуляторных механизмов позволяет микроРНК как препятствовать началу трансляции мишени, так и остановить процесс синтеза пептида в процессе элонгации и предотвратить реинициацию за счет деградации мРНК или ограничения ее доступности для рибосом. Согласно современным взглядам, многие из этих механизмов звеньями одного и того же регуляторного пути, связанными между собой конкурентными взаимодействиями. Так, если изначально полагалось, что дестабилизация и деградация мРНК является основным механизмом регуляции, то более свежие данные показывают, что подавление трансляции может играть гораздо более важную роль [155]. На основании этих данных была предложена последовательная модель регуляции, обобщающая основные механизмы действия микроРНК [7,156,157]. Согласно этой модели предотвращение и подавление трансляции является первым, наиболее быстрым и часто основным механизмом действия микроРНК, однако эффект этого механизма относительно невелик [7,157–159]. Деаденилирование под действием CCR4-NOT и PAN2-PAN3, декепирование при помощи DDX6 и последующий гидролиз нуклеазами не являются необходимыми для репрессии мРНК, но выступают в качестве вспомогательных механизмов,

способных вызывать значительные изменения экспрессии белка [6,126,157,158,160–162]. Исключение составляют микроРНК в комплексе с AGO2, который при высокой степени комплементарности последовательностей ведущей цепи и мишени катализирует эндонуклеазный гидролиз последней.

Обнаружены также механизмы действия микроРНК, не связанные напрямую с подавлением транскрипции. Так, микроРНК могут стабилизировать мРНК и усиливать их трансляцию, выполнять функцию «приманки» (decoy activity), препятствуя взаимодействию белковых факторов с их РНК мишенями, а также участвовать в процессе созревания других микроРНК [163–165]. В последнее время было показано, что зрелые микроРНК и компоненты RISC обнаружены в клеточном ядре, где они могут принимать участие в регуляции транскрипции и поддержании структуры хроматина [166].

1.1.3 Регуляция созревания и активности микроРНК

Созревание и активность микроРНК находятся под контролем как белковых факторов, так и других регуляторных РНК. Картирование промоторов генов микроРНК человека показало, что они обладают схожими характеристиками с промоторами белок-кодирующих генов, и часто регулируются классическими транскрипционными факторами, например с-мус, p53, ZEB1/2, MYOD1 и др. [167]. Экспрессия генов микроРНК часто регулируется эпигенетически, причем многие основные компоненты систем отвечающих за метилирование и ацетилирование гистонов являются мишенями микроРНК [167,168].

Клеточная популяция микроРНК микрогетерогенна – в один и тот же момент в клетке могут присутствовать разные изоформы микроРНК (или изомиры – isomiRs), отличающиеся последовательностью, преимущественно 5'- и 3'-концов, зрелой молекулы [169–171]. Одной из причин этого является химическая модификация микроРНК и их предшественников – уридилирование, метилирование, превращения аденозина в инозин под действием РНК-зависимой аденозиндезаминазы ADAR [168,170,172–175]. Кроме того, разнообразные регуляторные белки могут связываться с созревающей микроРНК или белками Dicer и Drosha, и влиять на характер и эффективность катализируемых ими превращений [168].

Доступность AGO является одним из основных лимитирующим фактором действия микроРНК [176]. Стабильность AGO регулируется стандартными клеточными механизмами через фосфорилирование, гидроксигирование, поли(АДФ-рибозил)-ирование и убиквитинирование, и стабилизируются загрузкой микроРНК [168]. Недавно было обнаружено, что с AGO также могут быть связаны интронные РНК длиной около 100 нуклеотидов,

названные аготронами (agotrons), основной функцией которых может быть регуляция доступности или стабильности AGO в отсутствие микроРНК [177–179] [180,181].

Известно, что ряд белков могут влиять на эффективность действия микроРНК кооперативно (PUM1 и PUM2) или конкурентно (DND1, CRD-BP, HNRNP E2 и HuR) [182]. Недавно также был обнаружен новый вариант регулирования активности микроРНК - феномен *конкурентных эндогенных РНК* (competing endogenous RNA – ceRNA). Конкурентные РНК представляют собой РНК, которые несут в себе множественные сайты связывания микроРНК, вследствие чего они могут связывать микроРНК и снижать эффективность их действия на целевые мишени [183]. Из-за такой способности «впитывать» микроРНК их также часто называют «микроРНК-губками» (miRNA sponges). Среди известных конкурентных РНК есть длинные некодирующие РНК (днРНК, lncRNA или lincRNA), кольцевые РНК (circular RNAs - circRNA), являющиеся продуктами бэксплайсинга кодирующих генов, а также некоторые белок-кодирующие транскрипты [144,183–186].

Стабильность микроРНК также может регулироваться за счет механизмов их направленной деградации. Gantier с соавторами показали, что среднее время полужизни микроРНК в клетке в отсутствие Dicer составляет 119 часов, однако этот параметр варьирует более чем в два раза для разных микроРНК [187]. Примерами быстрой направленной деградации микроРНК являются нейроны, в которых блокирование транскрипции при-микроРНК приводит к быстрому спаду уровней зрелых микроРНК, и изменения наблюдаемые в процессе развития организма [188–191]. Кроме того, регуляция микроРНК может быть напрямую связана с выполнением ими своей основной функции. Так, у *C. elegans* существует механизм *мишень-опосредованной защиты микроРНК* (target-mediated miRNA protection) - в отсутствие мишени микроРНК освобождается из AGO и деградирует [192]. У человека и *D. melanogaster* обнаружен механизм, работающий по иному принципу - высокая комплементарность микроРНК и мишени приводит к дестабилизации и деградации микроРНК [193,194].

Сейчас известны еще не все детали сложной системы микроРНК-опосредованной регуляции, однако очевидно, что микроРНК и связанные с ними белковые факторы участвуют в гораздо более широком спектре регуляторных событий в клетке, чем просто регуляция трансляции мРНК. К сожалению, современные данные в области исследования механизмов действия микроРНК и их активных комплексов разрознены и зачастую противоречивы, во многом из-за разнообразия используемых экспериментальных подходов и отсутствия четкого понимания многих основных механизмов действия микроРНК.

1.2. Циркулирующие микроРНК крови человека

Почти 40 лет назад Stroun с соавторами впервые показали присутствие недеградированной РНК за пределами клеток в культуре [195]. Через два десятилетия циркулирующие РНК были обнаружены в крови [196], и с тех пор было показано, что представители всех классов клеточных РНК могут быть найдены во внеклеточной среде [197]. Обнаружение молекул микроРНК в сыворотке больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой, а затем и во всех основных биологических жидкостях [198], сыграло большую роль в привлечении научного сообщества к исследованию как микроРНК, так и циркулирующих РНК в целом [199]. В связи с обнаружением циркулирующих микроРНК крови, некоторые исследователи даже предположили, что циркулирующие микроРНК могут являться некими прото-гормонами – своеобразным «пережитком» мира РНК – и способны обеспечивать координацию между отдаленными группами клеток в организме, в том числе посредством специальных микроРНК-рецепторов (miRceptors), одним из которых может являться TLR8 [200,201]. При всей привлекательности этой смелой идеи, данные о концентрации и разнообразии микроРНК в крови, а также сложности и эффективности микроРНК регуляции вызывают у ряда ученых научно-обоснованные критические возражения [202–204].

В настоящей главе будут рассмотрены вопросы, касающиеся появления микроРНК в крови, кинетики их циркуляции и факторов обеспечивающих стабильность циркулирующих микроРНК. Помимо фундаментальных знаний о биологии циркулирующих микроРНК, понимание механизмов генерации, циркуляции и выведения циркулирующих микроРНК важно для разработки методов их выделения и анализа, и абсолютно необходимо для точной оценки их диагностического потенциала.

1.2.1. Происхождение и факторы, обеспечивающие стабильность циркулирующих микроРНК крови

Сама по себе молекула РНК быстро деградирует во внеклеточной среде, как из-за высокой активности рибонуклеаз и фосфодиэстераз биологических жидкостей [205–210], так и за счет естественной лабильности химической структуры РНК. Время полужизни свободной РНК в крови составляет 15 секунд [211], но эндогенная РНК может оставаться в кровотоке гораздо более длительное время – от нескольких минут до нескольких часов [212]. Очевидно, что существуют механизмы, защищающие микроРНК в крови. В настоящее время известно, что микроРНК во внеклеточной среде стабилизированы благодаря формированию комплексов с белками, липопротеинами высокой и низкой плотности (ЛПВП и ЛПНП, соответственно) и

упаковке во внеклеточные везикулы (экзосомы, микровезикулы, онкосомы, апоптические тельца и др.).

1.2.1.1. Белки-переносчики микроРНК

Поскольку микроРНК это относительно небольшие молекулы, то белковые комплексы могут эффективно экранировать их и защищать от внешних воздействий и служить медиаторами их действия. Очевидными кандидатами в переносчики микроРНК являются белки, участвующие в созревании и осуществлении функций микроРНК. Действительно, Turchinovich с соавторами показали, что в плазме крови присутствуют комплексы микроРНК с AGO2, как в плазме, так и в культуре клеток MCF-7, а с белковой фракцией связана основная часть внеклеточных микроРНК [213]. Arroyo с соавторами показали, что такие микроРНК, как miR-16 and miR-92a, в подавляющем большинстве (до 95%) соосаждаются вместе с белками плазмы крови [214]. В другой работе Turchinovich с коллегами продемонстрировали высокие концентрации комплексов микроРНК с AGO1 и AGO2 в плазме крови [215]. Интересно отметить, что наборы микроРНК, связанных с одним или другим белком в циркуляции и в клетках крови отличаются, т.е. клетки крови не являются единственным источником циркулирующих микроРНК. Было обнаружено, что с AGO2 в крови предпочтительно связаны микроРНК, получающиеся из 5'-участка пре-микроРНК молекулы, а с AGO1 – молекулы из 3'-фрагмента пре-микроРНК.

Martino с соавторами показали, что часть циркулирующих микроРНК во время гемодиализа проходят через диализные мембраны, что предполагает, что они находятся в комплексах размером не более 30-40 кДа, что превышает размер AGO [216]. Действительно, есть свидетельства, что микроРНК в крови может быть связана и с другими белками. Одним из кандидатов является нуклеофосмин NPM1, однако эти результаты можно поставить под сомнение, поскольку они получены с использованием синтетических микроРНК рибоолигонуклеотидов и очищенных препаратов белков, и могут не отражать реального положения вещей *in vivo* [217]. Кроме того, они плохо соотносятся с другими данными, например, в работе Turchinovich с соавторами NPM1 и микроРНК после ультрафильтрации обнаруживались в разных фракциях [213]. Недавно было показано, что количество зрелых микроРНК в клетках человека существенно превышает количество AGO белков (~ в 14 раз), и, таким образом, существенная часть зрелых микроРНК может не быть связана с RISC [218–220]. В поддержании концентрации и обеспечении стабильности таких микроРНК участвует ряд белков с классическими РНК связывающими мотивами, такие, как HuR, AUF1 и др. [221]. Необходимость поддержания пула «избыточных» молекул микроРНК в клетке остаётся

неясной, однако идентифицированные белки, потенциально могут участвовать в переносе микроРНК в крови.

Рибонуклеопротеиновые комплексы могут являться основной формой циркуляции микроРНК, поскольку в клетках микроРНК существуют в виде прочных рибонуклеопротеиновых комплексов. Такие комплексы могут присутствовать внеклеточной среде как сами по себе, так и в составе везикул или не покрытых мембранами частиц. В частности, Li с соавторами показали, что большая часть miR-16 и miR-223, обнаруживаемых в экзосомах, также находятся в комплексах с AGO2 [222].

В настоящее время точно не известно, могут ли рибонуклеопротеиновые комплексы непосредственно (не в составе более крупных образований, таких как мембранные частицы) попадать во внеклеточную среду с помощью активной секреции, однако известно, что их источником могут служить клетки, поврежденные в результате действия токсических агентов, а также некроза или апоптоза [202]. Такой вариант является простым объяснением присутствия опухолевой микроРНК в циркуляции. Данные о специфическом связывании или захвате таких комплексов отсутствуют, однако известно, что некоторые РНК-связывающие белки имеют повышенное сродство к мембранам, в том числе плазматической мембране клеток [223,224].

1.2.1.2. Липопротеиновые комплексы крови

Липопротеины крови представляют собой субмикронные мицеллярные частицы размером от 5 до 1000 нм, содержащие аполипопротеины А-Е и переносящие в организме липиды, триглицериды и холестерин [225,226]. В недавних работах показано, что они способны связывать и переносить в крови нуклеиновые кислоты, в том числе микроРНК. Сначала Vickers с соавторами показали, что липопротеины высокой плотности (ЛПВП) могут являться переносчиками микроРНК в крови [227]. Wagner с соавторами также подтвердили наличие ряда микроРНК (miR-223, miR-92a, miR-126, miR-150, miR-146a, miR-30c, miR-378, miR-145) во фракции ЛПВП, а также показали наличие микроРНК во фракции липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), правда в существенно меньшем количестве [228]. В работе Niculescu с соавторами также обнаружили 6 микроРНК (miR-486-5p, miR-92a-3p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-146a-5p, miR-33a-5p) во фракциях ЛПВП и ЛПНП сыворотки крови [229]. Необходимо отметить, что спектры микроРНК, связанных с ЛПВП и ЛПНП, отличаются. В целом, концентрация микроРНК во фракции ЛПВП выше, так в ЛПВП примерно на порядок больше miR-223, чем в ЛПНП. Однако, некоторые микроРНК, например miR-155, в основном ассоциированы с ЛПНП [227,228]. При этом, несмотря на высокую концентрацию ЛПВП и ЛПНП в крови, количество микроРНК, связанных с липопротеинами, предположительно

составляет не более 10% от общего количества микроРНК плазмы (наиболее распространенная в ЛПВП микроРНК miR-223 составляет около 8% от общего пула микроРНК крови) [228].

Происхождение липопротеиновой фракции микроРНК крови пока не выяснено. Вполне вероятно, что ЛПВП и ЛПНП могут транспортировать внутриклеточные микроРНК в процессе секреции клетками печени. По данным ряда авторов уровень miR-122 (обнаруженной Niculescu с соавторами в комплексах с липопротеиновыми) в крови является маркером повреждения печени, однако форма ее циркуляции в крови в этих работах не была исследована [230,231]. Макрофаги J774 способны экспортировать ЛПВП-miR-223 *in vitro* по механизму, который блокируется действием нейтральной сфингомиелиназы 2 (nSMase2) [227]. В связи с этим предполагается, что источниками ЛПВП- и ЛПНП-связанных микроРНК могут являться клетки, ответственные за воспаление, например, моноциты и нейтрофилы, особенно с учетом того, что многие микроРНК, выявленные в этих фракциях, регулируют воспалительный ответ и метаболизм липидов [232,233]. Кроме того, реконструированные ЛПВП частицы способны связывать свободные молекулы микроРНК *in vitro* [227,234]. Такой механизм включения микроРНК в липопротеиновые частицы предполагает наличие пула свободных от белков микроРНК, который в теории может генерироваться в результате диссоциации известных нуклеопротеиновых комплексов, однако таких данных пока не представлено.

Транспорт циркулирующих микроРНК в клетки с участием рецепторов, специфичных для липопротеиновых частиц, может служить способом проникновения микроРНК в реципиентные клетки, где они могут регулировать экспрессию мРНК или активировать внутриклеточные сигнальные пути. Такие рецепторы экспонированы на клетках разных типов, в том числе клетках эндотелия сосудов. *In vitro* несущие микроРНК ЛПВП могут захватываться клетками гепатомы человека Huh7 и фибробластами почек хомячка ВНК посредством рецептора SR-B1 (scavenger receptor B1) и ингибировать экспрессию репортерных конструкций с геном люциферазы [227]. Показано, что при инкубации нативных ЛПВП человека с эндотелиальными клетками в них повышается уровень miR-223 и ингибируется экспрессия ее мишеней из числа противовоспалительных факторов, включая ICAM1 (Intercellular adhesion molecule-1) и Csf2 (colony-stimulating factor 2) [235]. Этот эффект отменяется обработкой препаратов ЛПВП РНКазой А [235].

Пока не ясно, является ли существование ЛПВП- и ЛПНП-связанных микроРНК комплексов важным биологическим феноменом, результатом связывания микроРНК или циркулирующих рибонуклеопротеиновых комплексов с липопротеиновыми частицами, или артефактом используемых методов выделения липопротеин-ассоциированных микроРНК. Некоторые данные, полученные нами в процессе разработки методов выделения

циркулирующих микроРНК, указывают на то, что гидрофобные взаимодействия играют важную роль в связывании микроРНК с белками крови [236,237]. Это позволяет предположить, что липопротеины действительно принимают участие в связывании микроРНК.

1.2.1.3. Внеклеточные везикулы

Внеклеточные везикулы представляют собой гетерогенную популяцию окруженных (двойной) мембраной везикулярных частиц, обнаруживаемых во внеклеточной среде. В настоящее время по номенклатуре Международного сообщества внеклеточных везикул (ISEV) принято выделять несколько классов мембранных частиц везикулярного типа. Наиболее изученными и актуальными типами везикул в контексте переноса внеклеточных микроРНК являются экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца. Везикулы каждой группы имеют характерные размеры, биофизические свойства и структуру, механизм возникновения, набор поверхностных маркеров и молекулярный состав, в том числе набор переносимых РНК [238,239].

Экзосомы

Впервые экзосомы были обнаружены и охарактеризованы в конце 1980-ых годов [240], однако известность они приобрели в основном в последние годы и теперь являются наиболее изученным классом внеклеточных везикул. В первую очередь этому способствовали данные о том, что они секретируются многими клетками организма в физиологических условиях, а также клетками опухолей, и присутствуют в большинстве биологических жидкостей включая кровь, мочу, спинномозговую жидкость, слюну и др. [241–244]. Более того, экзосомы переносят ряд сигнальных молекул и могут участвовать в межклеточной коммуникации, вследствие чего они являются потенциальным источником материала для диагностики заболеваний или основой для разработки терапевтических препаратов [245].

Экзосомы представляют собой небольшие (по разным данным от 30-50 до 100-150 нм) частицы, окруженные двойной липидной мембраной, обладающие на электронных микрофотографиях характерной формой [246]. Экзосомы образуются преимущественно из позднего эндосомального компартмента. Интралюминальные везикулы – будущие экзосомы – образуются в качестве инвагинаций стенок поздних эндосом с образованием *мультивезикулярного тела* (multivesicular body (MVB)), слияние которого с клеточной мембраной приводит к секреции экзосом во внеклеточную среду [247].

Экзосомы переносят разнообразные липиды, такие как фосфатидилсерин, холестерин, церамид и сфинголипиды [247,248]. Для экзосом также характерно наличие ряда характерных

белковых маркеров, в первую очередь трансмембранных белков тетраспанинов (CD9, CD63, CD82 и др), а также ГТФазы Rab, аннексинов, белков ESCRT (endosomal sorting complex required for transport), flotilin-1, белков теплового шока HSP90/70 [249–252]. Экзосомы могут содержать и такие белки как клеточные рецепторы, молекулы адгезии, специфичные для родительских клеток белки, в том числе опухолевые антигены, прионы и β -амилоиды, и белки патогенов [253–256]. Кроме того, в экзосомах обнаруживаются разнообразные РНК, в том числе тРНК, мРНК, длинные некодирующие РНК и различные малые РНК, но отсутствуют рибосомные РНК [257]. Данные о содержимом экзосом собраны в базах данных, в том числе EVpedia (http://student4.postech.ac.kr/evpedia2_xe/xe/), Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org/>) и ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>) [258–260].

Присутствие микроРНК в экзосомах, секретируемых клетками в культуре, было показано Valadi с соавторами [261]. Позднее наличие микроРНК в экзосомах крови было подтверждено Mitchell с соавторами [262], а в работе Gallo с соавторами представлены свидетельства того, что экзосомы могут являться основным переносчиком микроРНК в сыворотке крови и слюне [263]. В настоящее время исследованию экзосомальных микроРНК в различных контекстах посвящено огромное количество публикаций. Предполагается, что они участвуют в ряде физиологических процессов, среди которых регенерация тканей и ангиогенез, регуляция иммунного ответа и передача нейтральных сигналов в синаптической щели [264].

Показана селективность упаковки микроРНК в экзосомы. Набор микроРНК в экзосомах и родительских клетках часто не совпадает [265], а по некоторым данным разительно отличаются [266–268]. При этом существует набор микроРНК, общих для экзосом, секретируемых разными типами клеток [265]. Хотя эти данные подразумевают существование некоего универсального процесса селекции микроРНК для упаковки в экзосомы, он пока не выявлен, но известен ряд факторов, которые достоверно влияют на состав экзосомальных микроРНК [269].

Биогенез экзосомальных частиц, сортировка белковых молекул и секреция экзосом, регулируются комплексом ESCRT (endosomal sorting complex required for transport), в том числе белками Alix и TSG101. Однако показано, что существует и ESCRT-независимый путь транспорта молекул в экзосомы [247]. Ключевым этапом упаковки биомолекул в экзосому является связывание с липидным рафт-подобным доменом на внешней мембране мультивезикулярного тела, в котором локализуются основные факторы, отвечающие за образование экзосомы. Вопросом остается то, какие механизмы участвуют в локализации микроРНК в эти участки.

Было показано, что образование GW-телец связано с последующей секрецией их содержимого (микроРНК и репрессируемых мРНК) в составе экзосом [270]. Причем предполагается, что этот процесс может зависеть от наличия мРНК-мишеней для данной микроРНК [271]. Кроме того, наличие определенных нуклеотидных мотивов в микроРНК (и других РНК), а также пост-транскрипционные модификации (3' уридилирование) могут определять транспорт микроРНК в экзосомы [272]. Интересно, что по некоторым данным, в экзосомах почти не встречается белок AGO2 [269], а это значит что транспорт микроРНК в экзосомы могут опосредовать другие РНК связывающие белки, например HuR [273], hnRNPA2B1 [274] и SYNCRIP [275,276]. Это косвенно подтверждается тем, что в экзосомах сердечных фибробластов, культивируемых *in vitro*, гиперпредставлены пассажирские цепи микроРНК, которые не включаются в RISC [277].

Существуют данные, что экзосомальные микроРНК активно вовлечены в онкогенез, метастазирование и взаимодействие опухоли с микроокружением [278–280]. Кроме того экзосомальные микроРНК по данным большого количества работ представляют собой удобный источник биомаркеров онкологических и сердечнососудистых заболеваний [281,282]. Кроме того, наличие поверхностных белковых маркеров и молекул адгезии позволяет экзосомам связываться с клетками, (в том числе раковыми), которые экспонируют соответствующие рецепторы, при помощи эндоцитоза или макропиноцитоза транспортироваться в эти клетки [261,283–285]. Таким образом, переносимые экзосомами микроРНК могут попадать в реципиентные клетки и регулировать экспрессию их генов [284,286]. Неизвестно, насколько эффективным является такой метод регуляции, так как по данным Chevillet с соавторами на одну экзосому приходится в среднем 0,00825 молекулы микроРНК, а по данным Li с соавторами – одна молекула РНК любого типа [204,287]. Этот факт может отражать внутреннюю гетерогенность популяции экзосом и требует дальнейшего исследования [288]. Однако, поскольку в мл крови циркулирует по разным данным приблизительно 10^8 - 10^{12} экзосом в мл, их влияние на дистантно локализованные клетки не может быть велико [287,289]. Если рассматривать в качестве эффекторного компонента экзосомальные микроРНК, то это еще более очевидно, так как для минимально заметного регуляторного эффекта необходимо не менее 100 молекул микроРНК на клетку [290,291]. При этом, стоит отметить, что участие экзосом в коммуникации между близко расположенными клетками кажется вполне вероятным.

Микровезикулы

Микровезикулы также представляют собой субмикронные мембранные частицы (50-1000 нм). В отличие от экзосом, они образуются путем отшнуровывания пузырьков от

плазматической мембраны клеток (экзоцитоза) [247]. Для секреции таких частиц необходима кальций-зависимая перестройка участка клеточной мембраны, с вовлечением актин-миозиновых элементов цитоскелета, регулируемым ГТФазой RHO.

Микровезикулы не только существенно более гетерогенны по размеру, чем экзосомы, но и переносят более разнообразное содержимое [239]. Отличительным признаком микровезикул является состав мембран. На их мембране экспонирован фосфатидилсерин, а также присутствуют лизфосфатидилхолины, сфингмиелин и ацилкарнитины [239,292,293]. Содержимое микровезикул изучено в меньшей степени, по сравнению с экзосомами, и среди ассоциируемых с ними молекул обычно называют селектины, flotillin-2, ARF6 и CD40 [239], однако характеристических маркеров, присущих микровезикулам пока не выявлено.

С микровезикулами связаны характерные наборы РНК [294], однако точный механизм их упаковки в микровезикулы не известен. Предполагается, что в упаковке мРНК могут участвовать консервативные мотивы (zipcode) в 3'НТО [247]. В ряде работ было показано, что в микровезикулах, секретлируемых клетками крови и клетками ряда опухолей, может содержаться значительное количество микроРНК [295,296].

Как и в случае экзосом, сигнальные молекулы на поверхности микровезикул опосредуют их захват, и доставку микроРНК в реципиентные клетки [266].

Апоптические тельца

Апоптические тельца представляют собой гетерогенные везикулы большего размера (0,03–5 мкм), отпочковывающиеся от клеток в процессе клеточной смерти путем апоптоза [247,297]. В отличие от микровезикул и экзосом, несущих характерные популяции биополимеров, молекулярный состав апоптических телец во многом повторяет состав исходных клеток. Апоптические тельца несут в себе фрагментированную геномную ДНК и набор различных (частично деградированных) РНК [297]. При этом, в работе Halicka с соавторами утверждается, что ДНК и РНК сортируются отдельно друг от друга в разные апоптические тельца [298], в то время как Jiang с соавторами наоборот показали, что и ДНК и РНК присутствуют в одних и тех же везикулах [299]. В первую очередь в апоптических тельцах находятся рибосомные РНК, обычно отсутствующие в препаратах других везикул, а также транспортные РНК и различные малые РНК, в том числе микроРНК [294]. Апоптические тельца несут на своей поверхности сигнальные молекулы, характерные для апоптических клеток, такие как, фосфатидилсерин, аннексин I (annexin I), модифицированные ICAM-3 и CD31, являющиеся сигналами к фагоцитозу [300].

В силу своих размеров апоптические тельца при обработке образцов крови преимущественно сосаждаются с клеточной фракцией, что усложняет получение чистых препаратов апоптических телец. Во многом благодаря этому, этот класс везикул обычно игнорируют в большинстве современных работ, посвященных циркулирующим микроРНК. Тем не менее, отдельные работы демонстрируют, что профиль микроРНК в апоптических тельцах отражает профиль их экспрессии в родительских клетках [301].

1.2.2. Кинетика циркуляции и выведения микроРНК из крови

Кинетика циркуляции микроРНК в кровотоке является чрезвычайно важным вопросом в понимании их значения и функции, однако до сих пор остается исследованной лишь очень поверхностно. Современное представление об этом вопросе во многом основывается на данных о циркуляции других РНК, а также биологии тех комплексов, которые переносят микроРНК. Стабильность РНК в кровотоке зависит как от активности гидролаз крови, так и от скорости клиренса РНК-содержащих комплексов. Эффективность ферментативного гидролиза РНК после ее диссоциации из комплексов определяется балансом активности рибонуклеаз (в первую очередь РНКазы А) и фосфодиэстераз крови [205–210], и их ингибиторов, экспрессия которых может нарушаться, например, при онкологических заболеваниях [302–304]. Скорость клиренса различных циркулирующих комплексов зависит от их биологической природы и определяется разными механизмами. Апоптические тельца фагоцитируются и перерабатываются макрофагами [305]. Исследование распределения экзосом в крови показывает, что они быстро поглощаются многими органами, но в основном печенью и селезенкой, а в время их полужизни в крови составляет около 2 мин [306,307]. При этом точный механизм их захвата и элиминации пока не известен. Для липопротеинов характерна сложная кинетика, определяемая широким набором физиологических факторов, в том числе связыванием, при помощи специфичных и неспецифичных рецепторов [308,309]. Время полужизни ЛПВП в крови составляет по разным оценкам 12-20 часов [310,311]. Судьба белковых комплексов может определяться рядом факторов, таких как скорость протеолиза, почечная и печеночная фильтрация, и механизмы рецептор-опосредованного эндоцитоза. Кроме того, существенный вклад может вносить и их связывание с другими белками, липопротеиновыми комплексами, везикулами или клеточными элементами крови. В итоге, время жизни различных белков в крови значительно различается и составляет от нескольких минут (короткие сигнальные пептиды), до нескольких дней (сывороточный альбумин, антитела) и даже недель (отдельные антитела) [312]. С помощью инъекции препаратов плазмы мышей, экспрессирующих miR-155, в кровотоки мышей нокаутных по гену этой микроРНК было показано, что время ее полужизни в кровотоке составляло 30 мин,

через час после введения концентрация miR-155 достигала уровня, характерного для мышей дикого типа, а по прошествии 4 часов эта микроРНК полностью элиминировалась из кровотока [313].

1.2.3. Недостатки современных знаний и подходов к изучению внеклеточных микроРНК крови

Таким образом, популяция внеклеточных микроРНК изначально гетерогенна по своему происхождению и форме циркуляции, но их роднит тот факт, что все описанные комплексы позволяют микроРНК свободно циркулировать в кровотоке и транспортироваться в клетки эндотелия, клеточные элементы крови и дистантно локализованные клетки различных органов и тканей. На сегодняшний день нет единого мнения о том, какой именно принцип упаковки микроРНК является основным, и в современной литературе представлены противоречивые и зачастую конфликтующие данные относительно упаковки внеклеточной микроРНК.

Часть исследователей утверждает, что основная часть внеклеточных микроРНК транспортируется экзосомами [263]. Vickers с соавторами показали, что существенная часть микроРНК плазмы ассоциирована с липопротеиновыми частицами [227]. В ходе созревания и осуществления регуляторных функций микроРНК тесно связаны с белками и нет достоверных свидетельств присутствия свободных молекул микроРНК как внутри клеток, так и во внеклеточной среде [314]. Поэтому можно предполагать, что основную часть циркулирующих микроРНК связана с теми или иными белковыми молекулами. При этом они могут появляться в циркуляции, как в виде рибонуклеопротеиновых комплексов, так и упакованными в везикулы или липопротеиновые частицы. Недавние публикации подтверждают факт упаковки микроРНК преимущественно в покрытые мембранами частицы, в то время как результаты других демонстрируют что подавляющая часть микроРНК в крови циркулирует в составе белковых комплексов [213,214].

Для однозначного принятия той или иной точки зрения пока собрано недостаточно фактов, но можно выделить несколько причин такого расхождения мнений. Во-первых, в большинстве исследований не проводилось сравнительного анализа разных фракций внеклеточных микроРНК, и таким образом авторы игнорировали существование других способов упаковки. Кроме того, методы получения препаратов соответствующих фракций зачастую содержат смеси различно упакованных микроРНК. Проблема кроется в природе самих комплексов, в которых находятся микроРНК. Везикулярные фракции сильно перекрываются по размеру и биофизическим свойствам, а также несут схожие наборы сигнальных молекул, при этом их функциональная гетерогенность пока мало изучена [238,315]. РНК связывающие белки

могут обладать высоким сродством к мембранам и со-осаждаться с везикулярными фракциями [223,224]. Из-за этого используемые на практике методы получения этих фракций, особенно основанные на осаждении, не совсем подходят для получения чистых препаратов циркулирующих микроРНК-содержащих комплексов [296,316]. Кроме того, реагенты, используемые в исследованиях тоже могут вносить свой вклад в изменение спектра внеклеточных микроРНК, например, в эмбриональной бычьей сыворотке (FBS) могут содержаться внеклеточные везикулы, несущие микроРНК, многие из которых гомологичны человеческим [317]. В силу вышеперечисленных фактов, длительного отсутствия однозначной классификации внеклеточных везикул, и отсутствия стандартизации методик выделения, ранние исследования циркулирующих микроРНК скорее всего использовали препараты, в которых присутствовали смешанные популяции везикул и частиц.

Для того, чтобы разработать и эффективно использовать диагностику рака на основании циркулирующих микроРНК крови необходимо изучить закономерности формирования профиля циркулирующих опухолеспецифичных микроРНК в крови, то есть детально исследовать механизмы, приводящие к появлению микроРНК в кровотоке и ее элиминации. На текущее время представление о многих таких механизмах остается поверхностным, и только масштабное сравнительное исследование всех форм упаковки микроРНК с учетом современных знаний об их циркуляции может дать однозначный ответ на то, каким образом на микроРНК «путешествуют» в крови на самом деле [318].

1.3. Роль микроРНК в развитии онкологических заболеваний

Известно, что экспрессия генов микроРНК регулируется посредством большего набора эпигенетических сигналов и белковых факторов. Биогенез и регуляторные эффекты микроРНК также находятся под контролем разнообразных механизмов, включая петли обратной связи, регуляцию под действием неклассических механизмов, белков и некодирующих РНК. Очевидным итогом многообразия механизмов и мишеней микроРНК, в том числе онкогенов и генов опухолевой супрессии, является их связь с развитием онкологических заболеваний. К настоящему времени накоплено большое количество данных демонстрирующих связь экспрессии микроРНК с онкологическими заболеваниями, причем микроРНК могут выступать как в качестве онкогенов, в том числе драйверов рака, так и опухолевых супрессоров.

В настоящей главе основное внимание будет уделено особенностям экспрессии микроРНК при онкологических заболеваниях, включая их место в уже устоявшейся системе онкогенных сигнальных путей, а также механизмам их дерегуляции. Несмотря на то, что связь микроРНК с онкологическими заболеваниями была установлена лишь сравнительно недавно,

на сегодняшний день опубликовано огромное количество исследований на эту тему. Вследствие этого в первую очередь будут рассмотрены основные тенденции, а примеры будут выбираться на основе их актуальности в контексте данного исследования.

1.3.1. Механизмы и следствия нарушения экспрессии микроРНК при раке

Очевидным индикатором связи микроРНК с раком является то, что многие гены микроРНК локализуются в геномных районах, перестройки в которых часто связаны с развитием онкологических заболеваний. Так, изучив геномную локализацию генов 186 микроРНК Calin с соавторами показали, что более половины из них расположены в так называемых «хрупких» районах хромосом, являющихся горячими точками мутагенеза и реорганизации генетического материала [319], а Zhang с соавторами выявили высокую частоту изменения копийности генов микроРНК при раке груди, яичников и меланоме [320].

В 2002 году Calin с соавторами показали, что при В-клеточной хронической лимфоцитарной лейкемии повышенная экспрессия BCL-2 вызвана нарушением экспрессии miR-15a и miR-16-1, в основном за счет делеции района 13q14 [5]. Эти данные впервые продемонстрировали, что микроРНК могут являться не только перmissive факторами онкологической трансформации, но и играть драйверную роль в развитии рака. В последствии онкогенность ряда микроРНК, включая miR-21, miR-155 и кластера miR-17-92, была подтверждена в животных моделях лимфопролиферативных заболеваний, причем повышения экспрессии miR-155 в отсутствие других перmissive мутаций было достаточно для формирования злокачественного фенотипа лимфоидных клеток [321–324].

К настоящему времени собрано много свидетельств значительных изменений профиля экспрессии микроРНК в клетках опухолей [325–328]. Показано, что микроРНК управляют экспрессией генов регуляторных путей, играющих ключевую роль в развитии рака, контролирующих апоптоз и пролиферацию опухолевых клеток (p53 [329], HER2/ErbB [330,331], PTEN [332,333], компоненты Hippo [334,335], mTOR [336] и TGF- β [337] путей и др.), рост опухоли ответ на повреждение и репарацию ДНК [338,339], ангиогенез и реакцию на гипоксию [340,341], взаимодействие опухолевых клеток с микроокружением [342].

Клетки опухолей различных локализаций обладают разными профилями экспрессии микроРНК [343,344]. В работе Rosenfeld с соавторами показано, что классификатор из 48 микроРНК позволял предсказать ткань происхождения образца опухолевой ткани в выборке из 336 первичных и метастатических опухолей с точностью 86 и 77% соответственно [345]. Cheerla с соавторами разработали классификатор для 21 вида онкологических заболеваний на основе клинических данных и данных об экспрессии микроРНК проекта по исследованию

генома опухолей The Cancer Genome Atlas (TCGA), который диагностировал рак с точностью не менее 97% и 80% в тренировочной и валидационной выборках соответственно [346]. Биогенез микроРНК также изменяется при раке, а спектры изоформ микроРНК могут достоверно отличаться при раке различной локализации [347]. Кроме того, профили экспрессии микроРНК различаются и между гистологически различными подтипами опухолей, например базальным и люминальным раком молочной железы [348,349], гистологическими типами рака легкого [350–352], колоректального рака [353], рака желудка [354,355] и др. Изменение экспрессии отдельных микроРНК обычно происходит на фоне глобального снижения экспрессии микроРНК в клетках опухолей [343,356]. Снятие ограничений, накладываемых «страховочной сеткой» микроРНК, позволяет раковым клеткам экспрессировать транскрипты, необходимые для поддержания высокой степени пролиферации, так же как и в делящихся здоровых клетках, однако такой профиль экспрессии генов достигается при помощи иных механизмов.

Выявлен ряд отдельных микроРНК, нарушение экспрессии которых наиболее часто связано с онкологическими заболеваниями. Для обозначения онкогенных микроРНК часто используют термин онко-микроРНК или онкомиР (oncomiR). Примером таких микроРНК служит кластер miR-17-92 (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a и miR-92a) также известный как онкомиР-1, который является одним из наиболее известных онкогенных семейств микроРНК [357]. В норме miR-17-92 играет важную роль в развитии организма, в том числе формировании легких, а его отсутствие у мышей является летальным [358,359]. В мышинных моделях показано, что экспрессия miR-17-92 в В-клетках приводит к развитию лимфом и лейкемии, через ингибирование PTEN и активацию сигнального пути mTOR [360,361]. У человека амплификация локуса 13q31–q32, содержащего ген miR-17-92, часто встречается при разных типах рака крови [362]. Кроме того, повышенная экспрессия этого кластера часто наблюдается в клетках разных опухолей [357], в том числе при раке легкого, груди, кишечника, поджелудочной, щитовидной и предстательной желез [344,357,363–365]. Считается, что основным онкогенным компонентом этого семейства является miR-19a/b [366,367], мишенями которой являются гены опухолевой супрессии TP53 [368], PTEN [366], Prkaa-1 [369], а также ряд репрессоров NF-κB [370]. Другие компоненты кластера ингибируют про-апоптотические транскрипционные факторы E2F, а также CDKN1A/p21 и BIM [371]. Онкогенная микроРНК miR-21, контролирует экспрессию опухолевых супрессоров PTEN и PDCD4 (programmed cell death 4) [372–374], а онкомиР miR-10b подавляет экспрессию анти-пролиферативного фактора HOXD1, стимулируя образование метастазов [375].

Не все микроРНК являются потенциальными онкогенами, многие из них наоборот проявляют сильные онкосупрессионные и про-апоптотические свойства. Так, уже упомянутые

miR-15a и miR-16-1 являются регуляторами BCL-2 [376]. Семейство микроРНК let-7 известно своими онкосупрессорными и анти-митогенными свойствами за счет подавления экспрессии RAS, HMGA2 и MYC [377–380]. Онкосупрессорные свойства семейства miR-34 тесно связаны с p53 зависимой активацией апоптоза [381]. Экспрессия генов miR-34a и miR-34b/c напрямую активируется p53, и эти микроРНК в свою очередь регулируют такие мишени, как циклин E2 (CCNE2), циклин-зависимые киназы CDK4 и CDK6, а также BCL2, c-MYC и MET [382–385].

В зависимости от контекста некоторые микроРНК могут проявлять себя и как онкоген и как онкосупрессор. Так, например, кластер miR-17-92 может выступать в качестве опухолевого супрессора при раке груди, проявляя анти-пролиферативные свойства и ингибируя онкогены AIB1 и циклин D1 [371]. Мишени miR-125a/b включают в себя про- и анти-апоптотические гены, например члены семейства BCL-2, P53 и TP53INP1, ростовые факторы VEGF-A, IGF-II, матриксные металлопротеазы MMP11 и MMP13, и многие другие регуляторные факторы (STAT3, LIN28A, HuR, c-Jun, и т.д.) [386]. В силу этого в одних контекстах (рак груди, рак печени, рак щитовидной железы, плоскоклеточный рак глотки) она может выступать как онкосупрессор, подавляя рост опухоли, а в других (нейробластома, рак эндометрия, рак поджелудочной и предстательной железы, и ряд раков кроветворной системы) наоборот является онкогеном [386–389].

Ряд исследователей выделяют наборы микроРНК непосредственно связанных с отдельными процессами в опухоли, или стадиями развития онкологических заболеваний. Многие микроРНК являются участниками ключевых сигнальных путей, связанных с регуляцией клеточного цикла и апоптоза. К числу таких микроРНК, называемых апоптомирами (apoptomiRs), относится большинство описанных выше микроРНК.

Выделяют также отдельную группу микроРНК, связанных с метастатической активностью опухолей – метастамиры (metastamiRs) [390,391]. При этом среди таких микроРНК некоторые способствуют (miR-9, miR-10b, miR-21, miR-373, miR-520c, miR-320 и др.) метастазированию опухоли, а другие (miR-34a, семейство miR-200, miR-205, miR-126, miR-335 и др.) наоборот его подавляют [326,327,390].

Ангиогенез является важным этапом в развитии первичной опухоли, так и в метастазировании рака. На сегодняшний момент выявлен ряд микроРНК (miR-126, miR-17-92, miR-378, miR-296, miR-210, miR-27a/b, miR-29b, miR-16, miR-15, miR-221/222, miR-20a/b, miR-320), высоко экспрессированных в клетках эндотелия сосудов и/или активируемых в условиях гипоксии [327,341,392,393]. Среди таких микроРНК стоит отметить miR-126, которая специфично экспрессируется в эндотелии и является ключевым регулятором целостности сосудистой стенки и ангиогенеза при онкологических заболеваниях.

В настоящее время идет активный поиск наборов микроРНК, участвующих в других важных процессах связанных с онкогенезом (и не только), например, поддержании и регуляции стволовости и дифференцировки, мезенхимально-эпителиального перехода, регулирования иммунного ответа, взаимосвязи опухоли с микроокружением т.д [327,394–396]. Однако, можно отметить, что наборы микроРНК в этих группах часто сильно пересекаются, и поэтому, несмотря на удобство такого подхода, он может оказаться лишь ограниченно эффективным, ввиду особенностей действия микроРНК.

В случаях, когда экспрессия микроРНК меняется за счет генетических механизмов - мутагенеза и изменения копийности их генов, такие события выступают классическими драйверами злокачественной трансформации. В большинстве случаев микроРНК выступают эпигенетическими или «эпи-драйверами» рака, то есть дают опухолевым клеткам возможность к неконтролируемому делению за счет aberrантной экспрессии [397]. В большинстве опухолей за нарушение экспрессии микроРНК отвечает регуляция одного из этапов их биогенеза.

Экспрессия генов микроРНК эпигенетически регулируется метилированием их промоторов (или промоторов генов-хозяев) и редактированием паттернов модификации гистонов. В последнее время все больше работ исследуют эпигенетические причины дерегуляции микроРНК [398]. Гиперметилование генов семейства miR-124, приводящее к снижению их экспрессии, наблюдается при раке прямой кишки, печени, почек, поджелудочной железы и ряде раков кроветворной системы. Промоторные области онкосупрессорных микроРНК семейства miR-34 часто метилированы при раке глотки, пищевода, желудка, прямой кишки, легких, груди, почки и др. Другими семействами микроРНК, экспрессия которых ингибируется метилированием являются miR-9 и miR-200. В ряде онкологических заболеваний наблюдается гипометилирование промоторов генов микроРНК, причем в некоторых случаях, например при хронической лимфоцитарной лейкемии, до 60% от всех дерегулированных микроРНК могут быть aberrантно экспрессированы за счет гипометилирования [398]. Примерами такой регуляции может служить гиперэкспрессия miR-200a/b при раке поджелудочной железы, гиперэкспрессия miR-519d при гепатоцеллюлярной карциноме и miR-196 в ряде опухолей [398].

Повышенная активность гистондеацетилаз (HDAC) приводит к снижению экспрессии miR-15a, miR-16, miR-29b и ряда других микроРНК при ряде онкологических заболеваний [398]. В то же время экспрессия miR-224 активируется под действием гистон ацетилазы EP300 при гепатоцеллюлярной карциноме [399]. Мутантный белок BRCA1 привлекает HDAC2 к промотору гена miR-155, вызывая активацию его экспрессии [400].

Интересно то, что ферментативные системы, отвечающие за эпигенетическую регуляцию экспрессии, часто находятся под контролем микроРНК, что создает интересную динамическую связь между этими двумя регуляторными системами [398]. Так, семейство miR-29 среди своих мишеней имеет метилтрансферазы DNMT3A/B [401]. DNMT3A также является мишенью miR-143. Поддерживающая метилтрансфераза DNMT1 регулируется набором микроРНК, включая miR-148a, miR-152, miR-342 и miR-185 [398]. Ферменты, модифицирующие гистоны, также регулируются микроРНК, так, например ряд EZH2- компонент поликомб репрессивного комплекса 2 (PRC2) является мишенью ряда микроРНК [398], miR-589 регулирует HDAC5 [402].

Причиной изменения экспрессии микроРНК может служить нарушение экспрессии белков, участвующих в созревании микроРНК. В животных модельных системах показано, что потеря или недостаточная экспрессия Drosha, Dicer и его партнера TRBP может приводить к развитию опухолевого процесса [403–405]. Несколькими группами было показано нарушение экспрессии Drosha и Dicer, при раке легкого, раке яичников и нейробластоме, причем в последних двух случаях оно коррелировало с развитием заболевания и плохим прогнозом выживаемости [406–408]. Снижение экспрессии этих белков может быть опосредовано мутациями или эпигенетической инактивацией их генов [327,409]. Кроме того, мутации в Dicer могут приводить к нарушению узнавания предшественников микроРНК и изменению баланса цепей [403]. Белки AGO и GW182, выступающие непосредственными партнерами микроРНК часто подвержены соматическим мутациям при раке желудка и прямой кишки которые сопровождаются высоким уровнем нестабильности микросателлитной ДНК [410]. Нарушение транспорта пре-микроРНК в цитоплазму также может служить причиной снижения их экспрессии [411]. Мутация в гене экспортина-5, приводящая к синтезу укороченного белка, неспособного узнавать пре-микроРНК, служит причиной снижения уровня зрелых микроРНК в ряде опухолей [412].

Ряд онкогенных белков могут напрямую вмешиваться в биогенез микроРНК при раке. Так дикие и мутантные формы p53 принимают участие в биогенезе ряда микроРНК, в первую очередь семейства miR-34 и miR-15a/16 [413]. Известно, что мутантные формы p53 могут ингибировать активность Drosha и препятствовать образованию пре-микроРНК [414,415]. TGF- β влияет на процессинг микроРНК через связывание эффекторных белков с микропроцессорным комплексом и пре-микроРНК [409]. Белок YAP1, один из компонентов пути Hippo, регулирует активность микропроцессорного комплекса в зависимости от плотности клеток в культуре [334]. Онкосупрессорный белок BRCA1 также стимулирует активность микропроцессорного комплекса [416]. В условиях гипоксии активированный EGFR может

фосфорилировать AGO2, ингибируя его взаимодействие с Dicer и снижая уровень активности микроРНК-эффektorных систем [409]. Кроме того, взаимодействие p53 с AGO2 приводит к изменению спектра связанных с ним микроРНК, приводя к образованию комплексов, несущих онкосупрессорные микроРНК, например let-7 [417].

Таким образом, микроРНК являются одним из ключевых факторов развития онкологических заболеваний, и как драйверы злокачественной трансформации, и как жертвы вызванной ей дерегуляции клеточных регуляторных систем. Тесная связь микроРНК с раком привела к тому, что в настоящий момент они активно изучаются при многих онкологических заболеваниях, в том числе при раке легкого, в том числе с целью создания диагностических подходов и терапевтических систем призванных повысить эффективность лечения этих заболеваний.

1.4. МикроРНК в патогенезе и диагностике онкологических заболеваний легкого

Рак легкого (РЛ) является одним из наиболее распространенных (более 50 случаев на 100 тыс. человек, 1,8 млн новых случаев в год) и смертоносных раков в мире, при 87% смертности (mortality to incidence ratio) [1]. 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.

В настоящей главе будут рассмотрены основные особенности изменения экспрессии микроРНК опухолевых клеток в контексте известных данных об эпидемиологии и молекулярных механизмах онкогенеза РЛ. Отдельное внимание будет уделено проблемам классификации и диагностики РЛ, будут описаны предлагаемые подходы к решению этих проблем при помощи данных об экспрессии микроРНК в опухолевой ткани и крови онкологических больных.

1.4.1. Особенности современных подходов к диагностике РЛ

Под термином рак легкого обычно понимают разнородную группу онкологических заболеваний легкого, классификация (а также диагностика и терапия) которых строится преимущественно на основании гистологических характеристик опухолевых клеток. Выделяют два основных типа РЛ – немелкоклеточный рак легкого (НМКЛ) и мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ), в каждом из которых выделяют несколько подтипов. Встречаемость заболеваний из этих категорий сильно отличается, так НМКЛ составляет около 85% всех случаев РЛ, в то время как на долю МКРЛ приходится оставшиеся 15% [418]. В настоящем исследовании мы

сосредоточились на двух основных гистологических типах НМКЛ – плоскоклеточном раке легкого (ПКРЛ) и аденокарциноме легкого (АКЛ). По данным Национального института рака (National Cancer Institute) в США на долю ПКРЛ и АКЛ приходится 25% и 40% случаев РЛ, соответственно, в то время как во многих европейских странах и в России (по данным РОНЦ) заболеваемость ПКРЛ среди мужчин находится на сравнимом уровне с АКЛ или выше [419–421]. Несмотря на то, что ПКРЛ и АКЛ относятся к одной гистологической категории, эти заболевания существенно различаются происхождением (эпидермис и железистый эпителий), этиологией и расположением опухоли (развитие ПКРЛ часто коррелирует с курением, и опухоль располагается в центральной части легких, в то время как АКЛ не так сильно связан с курением и располагается на периферии легких), спектром мутаций (АКЛ часто ассоциирован с мутациями в EGFR, особенно у более молодых пациентов и женщин) [418,422].

Современные инструментальные подходы к диагностике рака легкого включают в себя рентгенографические методы (флюорография и компьютерная томография), томографические и ультразвуковые исследования, гистопатологические исследования фрагментов опухоли, полученных при помощи трансторакальной пункции или оперативного вмешательства, и образцов мокроты, забранных при помощи бронхоскопии [423]. Тем не менее, существующих подходов часто бывает недостаточно, для того, чтобы выявить опухоль на ранних стадиях, своевременно диагностировать тип заболевания и определить оптимальный курс терапии. Лишь в малой части случаев (15%), диагноз РЛ ставится на ранней стадии, а более половины пациентов (56%) на момент диагноза имеют отдаленные метастазы и прогноз их выживаемости существенно хуже (5-летняя выживаемость 4% против 54% на ранней стадии) (National Cancer Institute Data, <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>, данные на 19.05.2015). Рентгенографические методы недостаточно эффективны в качестве первой ступени диагностики РЛ. Флюорографическое исследование позволяет детектировать образования диаметром более 0,5-1 см, соответствующие поздним стадиям развития заболевания, и несет потенциальный риск здоровью пациента [424]. Малодозовая цифровая флюорография (МЦФ) (компьютерная томография, low dose computed tomography – LDCT) показала себя более перспективным методом скрининга, позволив снизить смертность от РЛ на 20% по сравнению с флюорографией в определенных группах риска (55-74 лет, курение более 30 пачек в год) [425,426]. Однако в других исследованиях значительной выгоды использования МЦФ найдено не было [427]. Кроме, последствия использования этого метода для здоровья пациентов остаются сомнительными, так de Koning с соавторами оценили, что на каждые 22 смертельных исхода, предотвращенных МЦФ скринингом, приходится как минимум один случай РЛ вызванный непосредственно рентгеновским облучением во время исследования [428]. Другие

методы диагностики обычно используются уже при подозрении на РЛ для уточнения диагноза и поиска метастазов и предполагают использование инвазивных процедур (забор биоптата) или дорогостоящего оборудования (томография). Даже в лучшем случае выявление и диагностику заболевания дополнительно осложняет позднее проявление заболевания, сходство симптоматических рядов с другими заболеваниями легкого, высокая внутренняя гетерогенность опухолей и сложная система гистологической классификации РЛ. Вкупе с высокой агрессивностью РЛ это может приводить к тому, что первичный выбор терапевтической стратегии оказывается малоэффективным (так, например НМКЛ плохо отвечает на классическую химиотерапию и требует оперативного вмешательства [429]), и у пациента не остается времени на поиск альтернативных подходов [430].

Одним из решений этой проблемы является молекулярная диагностика РЛ. По статистике на каждую опухоль легкого приходится не менее 300 не синонимичных мутаций, однако лишь небольшая часть из них являются драйверами РЛ [431,432]. В настоящее время известно, что к злокачественной трансформации клеток легкого обычно приводят два типа нарушений – инактивация основных опухолевых супрессоров p53 или RB, или активация таких онкогенов как MYC, RAS и TERT [433–437]. Для опухолей легкого (и других локализаций) характерно «привыкание» определенным онкогенным сигнальным путям, таким образом, что их конститутивная активность в клетках опухоли является не только достаточным, но и необходимым условием образования опухоли и поддержания характерного злокачественного фенотипа опухолевых клеток, который часто исчезает при ингибировании драйверного сигнального пути [438]. Интересные данные о мутациях, встречающихся в этих подтипах РЛ были получены в процессе выполнения масштабного проекта по исследованию молекулярного ландшафта онкологических заболеваний The Cancer Genome Atlas (TCGA) [2]. Было обнаружено, что несмотря на то, что мутационные спектры ПКРЛ и АКЛ в целом достоверно отличаются (для ПКРЛ характерны мутации в CpG-островках регуляторных областей генов и мутации в p53; при АКЛ мутации лежат в основном в кодирующих частях генов и наиболее часто встречаются активирующие мутации RTK/RAS/RAF), многие мутации встречаются в обоих подтипах. В случае мутаций, которые являются известными терапевтическими мишенями, этот факт может сильно осложнять выбор успешной индивидуальной стратегии терапии заболевания [439–441].

В настоящее время достоверно известен ряд мишеней для терапии, которые также служат важными молекулярными маркерами РЛ [442]. Таргетная терапия, блокирующая мутантные формы EGFR и гибридных ALK белков, показала себя особенно эффективной при АКЛ и этот успех привел к тому, что молекулярное генотипирование опухолей все больше

входит в клиническую практику [443–445]. Молекулярная классификация опухолей легкого начинает выходить на первый план, и в последнее время активно разрабатываются терапевтические мишени и диагностические маркеры для других подтипов РЛ, в том числе ПКРЛ [442].

Несмотря на эти успехи, проблемы раннего выявления рака легкого, оценки эффективности терапии и мониторинга рецидивов до сих пор актуальны. Одобренные для использования в клинической медицине методы молекулярной диагностики РЛ концентрируются на нескольких терапевтически-важных мутациях (cobas EGFR Mutation Test v2 – диагностический тест на основе циркулирующей ДНК крови для определения мутаций в 19 и 21 экзонах EGFR [446]) или используют инвазивный материал (бронхиальный лаваж или опухолевую ткань). Таким образом, существует явная потребность в поиске новых маркеров для молекулярной диагностики РЛ.

1.4.2. Характеристики экспрессии микроРНК в тканях опухолей больных НМКЛ

Достоверно известно, что, как и в опухолях других локализаций, при раке легкого часто наблюдаются значительные изменения экспрессии микроРНК. В случае НМКЛ одной из причин этого служит снижение экспрессии Dicer, коррелирующее с неблагоприятным прогнозом [406]. Кроме того показано, что в мышинных моделях KRAS-индуцированного рака легкого делеция Dicer приводит к ускоренному росту опухоли [447].

Получены данные относительно характера изменения экспрессии микроРНК при НМКЛ. Полногеномное секвенирование образцов опухолей НМКЛ (ПКРЛ и АКЛ) и парных образцов здоровой ткани легкого в работе Ма с соавторами показали, что экспрессия 40 и 28 микроРНК достоверно отличается в опухолевых клетках на I стадии ПКРЛ и АКЛ соответственно [350]. При этом изменения экспрессии 14 микроРНК были подтверждены методом ПЦР после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). При помощи биоинформатических подходов Li с соавторами вывели характерный профиль экспрессии 17 микроРНК при НМКЛ на основе доступных данных относительно экспрессии микроРНК, полученных путем секвенирования и микрочипового анализа [448]. Экспрессия 7 микроРНК (miR-21-5p, miR-210, miR-183-5p, miR-182-5p, miR-205-5p, miR-31-5p, miR-96-5p) была повышена, а десяти – понижена (miR-126-3p, miR-30a-5p, miR-486-5p, miR-451a, miR-145-5p, miR-30d-5p, miR-143-3p, miR-139-5p, miR-126-5p, miR-338-3p) в ткани опухоли. Экспрессия 10-ти микроРНК была подтверждена на независимой выборке образцов ткани опухоли и прилежащей здоровой ткани легкого. Из верифицированных таким образом микроРНК, miR-145-5p, miR-451a, miR-21-5p являлись

индикаторами метастазирования, а miR-21-5p, miR-30d-5p, miR-143-3p коррелировали с выживаемостью пациентов.

Экспрессия микроРНК в клетках опухоли может служить для классификации опухолей легкого. Изменения в экспрессии микроРНК наблюдаются уже в пред-раковых очагах новообразований бронхиального эпителия [449]. Более того, Huang с соавторами показали, что экспрессия miR-29a и miR-375 достоверно отличается между клетками НМКЛ и МКРЛ [450]. Кроме того, экспрессия miR-205 и miR-34a также отличалась между образцами ПКРЛ и АКЛ. Было показано, что экспрессия miR-205, miR-99b, miR-203, miR-202, miR-102, а также pre-miR-204 значительно отличается между подтипами НМКЛ [451]. В работе Zhang с соавторами повышенная экспрессия miR-93, miR-205 и miR-221 служила маркером ПКРЛ, но не АКЛ [351]. Классификатор для ПКРЛ и АКЛ в работе Hamamoto с соавторами состоял из miR-196b, miR-205 и miR-375 [352]. По данным Ma с соавторами различия в экспрессии miR-944, miR-205-3p, miR-135a-5p и miR-577 позволяют отличить ПКРЛ от АКЛ с 95% точностью [350]. Следует отметить, что наиболее часто встречаемая в этом контексте miR-205 проявила себя как наиболее точный маркер для классификации подтипов НМКЛ [450].

МикроРНК также можно использовать для уточнения клинико-патологических характеристик заболевания. Ma с соавторами наблюдали высокий уровень экспрессии miR-577, miR-183-3p и miR-944 у пациентов на поздних стадиях ПКРЛ [350]. Tafsiiri с соавторами выявили, что экспрессия miR-210 коррелирует со стадией заболевания по классификации TNM, а Li с соавторами показали, что экспрессия miR-10b и miR-145 достоверно отличает метастазирующие и неметастазирующие формы НМКЛ [452,453]. Результаты Skrzypski с соавторами показали, что miR-662, miR-192 miR-192* могут являться маркерами рецидива НМКЛ после оперативного вмешательства и прогностическими маркерами для ПКРЛ [454]. Sathipati с соавторами при помощи модели основанной на регрессии опорных векторов выявили панель из 18 микроРНК, экспрессия которых может быть использована для оценки выживаемости пациентов с АКЛ [455].

К настоящему времени на основе анализа полученных данных определены наборы микроРНК, онкогенных и онкосупрессионных, которые тесно связаны со злокачественной трансформацией, поддержанием фенотипа опухолевых клеток и развитием РЛ [456–461]. Наиболее яркие примеры таких микроРНК представлены в таблице 1.

Таблица 1. Роль микроРНК в онкогенезе рака легкого

МикроРНК	Мишени	Механизм	Источник
Онкогенные микроРНК			
miR-21	PTEN, PDCD4, TPM1, SPRY1, SPRY2, BTG2	Экспрессия повышена при НМКЛ. Активируется сигнальными путями EGFR и RAS, и ингибирует регуляторов RAS/МЕК/ERK и про-апоптотические факторы. Коррелирует с прогнозом и выживаемостью пациентов	[451,460,461]
miR-31	LATS2, PPP2R2A	Экспрессия повышена при ПКРЛ. Подавляет экспрессию опухолевых супрессоров и стимулирует пролиферацию	[460,461]
miR-221/222	PTEN, TIMP3	Экспрессия повышена при НМКЛ. Активируются С-JUN, подавляют экспрессию опухолевых супрессоров, что приводит к TRAIL-устойчивости, и стимулируют миграцию клеток через АКТ. Коррелирует с выживаемостью пациентов	[451,460]
miR-191	TIMP3	Экспрессия повышена при НМКЛ. Способствует эпителиально-мезенхимальному переходу.	[460]
Кластер miR-17-92	PTEN, TP53, Prkaa-1, CDKN1A/p21, PDCD4	Экспрессия повышена при НМКЛ. Способствует онкогенезу и метастазированию опухолей легкого.	[451]
miR-155	гексокиназа 2, APAf-1, TCF4	Экспрессия повышена при РЛ. Способствует поддержанию эпителиального фенотипа опухолевых клеток, регулирует метаболизм глюкозы, модулирует апоптоз и ответ на повреждение ДНК. Коррелирует с выживаемостью пациентов.	[459,461]
miR-182/183	EGR1, Ezrin, FOXF2	Онкогенные микроРНК. Регулируют сигнальные пути, контролирующие миграцию, инвазию и метаболизм клеток опухоли.	[462–465]
Онкосупрессорные микроРНК			
Семейство let-7	KRAS, NRAS, CDC25A, CDK6, циклин D, LIN28, MYC, HMG2A, FUS1, HOXA9, TGFBR1, BCL-XL, MAP4K3	Экспрессия снижена при РЛ. Проявляет анти-пролиферативные свойства и регулирует клеточный цикл.	[451,459,461]
miR-153	ADAM19, АКТ	Ингибирует инвазию, миграцию и пролиферацию опухолевых клеток, активирует апоптоз	[459]
miR-101	COX-2, Lin28B, EZH2, MCL-1	Ингибирует пролиферацию, воспаление, регулирует клеточный цикл.	[459,460]
miR-218	Slug/ZEB2, tumor protein D52, PXN	Снижение экспрессии при РЛ коррелирует с курением. Ингибирует пролиферацию, миграцию, инвазию и эпителиально-мезенхимальный переход клеток опухоли. Коррелирует с выживаемостью пациентов	[459,461]
miR-478b	SUZ12, BMI1, WNT5A,	Подавляет пролиферацию и инвазию	[459]

	MYC, KRAS	клеток РЛ	
miR-128b	EGFR	Экспрессия снижена при НМКЛ	[460]
miR-130a	MET, SOX4	Экспрессия снижена при НМКЛ	[460]
Семейство miR-200	Ft1/VEGFR1 ZEB, E-кадгерин, виментин, GATA4, GATA6	Экспрессия снижена при НМКЛ, но повышена при МКРЛ. Подавляет метастазирование и эпителиально-мезенхимальный переход клеток АКЛ.	[459,460,466,467]
miR-146a	EGFR, NF-κB, CCND1/2	Подавляет рост и миграцию опухолевых клеток, способствует активации апоптоза. Коррелирует с выживаемостью пациентов	[451,468,469]
miR-126	VEGF-A, CYP2A3	Регулирует ангиогенез	[451,470]
miR-141	TGFb-2	Регулирует миграцию и инвазию клеток опухоли	[451]
Семейство miR-34	CDK4/6, Bcl-2, CCNE2, E2F3	Экспрессия снижена при НМКЛ. Индуцирует ответ на стресс. Коррелирует с выживаемостью и вероятностью рецидива.	[461]
miR-145	ОСТ4, EGFR, NUDT1, c-Мyc	Экспрессия снижена при РЛ. Подавляет пролиферацию и инвазию клеток опухоли, снижает количество CD133-позитивных инициаторных клеток и рост опухоли.	[461]
miR-15/16	циклины D1, D2	Экспрессия снижена при РЛ. Регулирует клеточный цикл.	[460,461]
МикроРНК со смешанными функциями			
miR-494	IGF2BP1	Стимулирует ангиогенез и подавляет пролиферацию.	[459]
miR-135b	IL-1R1	Модулятор воспалительного ответа.	[459]
miR-205	PTEN, PHLPP, ERBB3, SMAD4	Регулирует рост и дифференцировку клеток легочного эпителия, за счет чего может проявлять как онкогенные, так и онкосупрессорные функции при РЛ.	[471–473]
miR-149	E-кадгерин, FOXM1	Экспрессия повышена в клеточных линиях НМКЛ и МКРЛ. Однако в ряде опухолей она служит опухолевым супрессором и подавляет рост и метастазирование опухоли.	[460,474]
miR-486	PTEN, CDK4	Выполняет как онкогенные, так и онкосупрессорные функции.	[475,476]
miR-125	EGFR, NEDD9	Выполняет как онкогенные, так и онкосупрессорные функции. Регулирует пролиферацию, регулирует миграцию и инвазию клеток опухоли.	[451,477]

Из таблицы 1 видно, что в онкогенезе легкого участвуют многие уже упомянутые онкогенные микроРНК, такие как miR-17-92 и miR-21, а также онкосупрессорные микроРНК, например miR-34 и let-7. Их мишенями являются многие гены, связанные со злокачественной трансформацией клеток легкого, включая компоненты путей p53, RAS, MYC и других ключевых сигнальных путей РЛ. Среди мишеней таких микроРНК также часто встречается

PTEN, экспрессия которого часто подавляется в опухолях легкого, а также EGFR – ключевой участник онкогенеза РЛ и важная терапевтическая мишень при АКЛ.

При этом экспрессия ряда микроРНК коррелирует со специфическими особенностями онкогенеза РЛ. Так, ряд микроРНК ассоциированы с механизмами онкогенеза, вызываемого табачным дымом. Экспрессия miR-101, miR-126, miR-199, miR-34 и miR-124 подавляется под действием известного канцерогена табачного дыма 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанона (NNK) [470,478]. Причем, одна из мишеней miR-126 цитохром P450 2A3 (CYP2A3), является основным активатором онкогенности канцерогена NNK.

1.4.3. Циркулирующие микроРНК крови как диагностические маркеры РЛ

Частота и стабильность нарушений экспрессии микроРНК в клетках опухолей легкого позволяют предположить, что они могут приводить к изменению представленности микроРНК в циркулирующей крови онкологических больных, и такие опухоль-специфичные микроРНК могут послужить источником биомаркеров, необходимых для устранения пробелов в диагностике РЛ. Далее будет показано, какие результаты достигнуты на данный момент в разработке систем для диагностики РЛ на основе циркулирующих микроРНК, и выполнен анализ соответствия полученных результатов необходимым требованиям, предъявляемым к биомаркерам, а также их соответствие потребностям клинической медицины. Несмотря на то, что тема мишеней или агентов для терапии РЛ не будет раскрыта в этом обзоре, стоит отметить, что в ряде случаев микроРНК могут, по-видимому, быть использованы и в таком качестве [479,480].

Первые попытки использовать микроРНК крови в качестве диагностических маркеров были предприняты в 2008-ом году в работах Lawrie с соавторами и Mitchell с соавторами [199,262]. На сегодняшний день опубликовано значительное количество работ, исследующих потенциал микроРНК как маркеров онкологических (и не только) заболеваний, в том числе РЛ. Перспективные маркерные микроРНК и другие некодирующие РНК можно найти в базе данных miRandola (<http://mirandola.iit.cnr.it/>) [481]. В рамках данного обзора будут представлены наиболее перспективные исследования, в которых была предпринята попытка поиска микроРНК-онкомаркеров для диагностики РЛ, прогноза течения заболевания и эффективности противоопухолевой терапии.

1.4.3.1. Циркулирующие микроРНК как маркеры для диагностики РЛ

Для разработки диагностических систем микроРНК-маркеров используют два подхода. Первый из подходов заключается в исследовании мишеней, выявленных при сравнительном

анализе экспрессии микроРНК опухолевой ткани, в сыворотке или плазме крови. На основе данных, полученных в работе Ma с соавторами [350], Leng с соавторами провели валидацию экспрессии 54-х микроРНК в плазме 92-ух больных НМКЛ и 88-ми здоровых курильщиков [482]. Экспрессия 30-ти микроРНК достоверно отличалась между группами сравнения, а панель из четырех микроРНК miRs-126, miR-145, miR-210, и miR-205-5p позволяла выявить РЛ с чувствительностью 91,5% и специфичностью 96,2%. Shen с соавторами выявили различия экспрессии 12-ти микроРНК между опухолью и прилежащей здоровой тканью легких у больных НМКЛ, а затем исследовали экспрессию этих микроРНК в парных образцах ткани и плазмы крови [483]. Только для 5-ти из 12-ти микроРНК изменение уровня экспрессии в ткани коррелировало с изменением концентрации этих микроРНК в крови. Модель, основанная на экспрессии 4-х из 5-ти микроРНК (miR-21, 126, 210, and 486-5p), позволяла отличать образцы плазмы крови больных НМКЛ от образцов здоровых доноров со специфичностью 96,55% и чувствительностью 86,22% (73,33% для I стадии НМКЛ). Zheng с соавторами выбрали 15 мишеней на основе известных данных микрочипового анализа об экспрессии микроРНК в опухолевой ткани легкого и определили концентрацию этих микроРНК в образцах плазмы крови больных НМКЛ и МКРЛ [484]. Уровень 3-х микроРНК - miR-155, miR-197 и miR-182 - достоверно увеличивался у больных РЛ по сравнению со здоровыми донорами (81,33% чувствительность, 86,76% специфичность).

Согласно этим результатам, только часть микроРНК опухолевых клеток детектируются в кровотоке, а их представленность может определяться не только опухолевой тканью, но другими тканями, в первую очередь клетками крови [485]. Однако, очевидным недостатком такого подхода является игнорирование информации о профилях экспрессии микроРНК в других клональных линиях опухоли и клетках микроокружения, которые тоже могут являться ценными диагностическими индикаторами развития заболевания.

Альтернативным подходом для выявления потенциальных микроРНК-маркеров является масштабный анализ микроРНК, циркулирующих в крови с использованием высокопроизводительных технологий, таких как секвенирование и микрочиповый анализ, или панелей на основе ОТ-ПЦР.

Впервые масштабный анализ микроРНК в сыворотке крови больных НМРЛ был проведен Chen с соавторами при помощи секвенирования на платформе Solexa [486]. В исследование было включено 11-ти пациентов с НМКЛ, 11-ти здоровых мужчин и 10 женщин. В сыворотке крови больных НМКЛ были выявлены 63 микроРНК, включая miR-128b, miR-152, miR-125b, miR-205, miR-27a, miR-146a, miR-222, miR-23a, miR-24, miR-150 и др., которые не обнаруживались у здоровых доноров, в то время как 28 микроРНК наоборот отсутствовали в

сыворотке онкологических больных. Кроме того, 76 микроРНК, присутствующих в сыворотке крови больных НМКЛ, не были обнаружены в клетках крови этих же пациентов, а следовательно, источником этих микроРНК могут быть клетки опухоли или ее микроокружения. Валидации экспрессии 2-х онкоспецифических микроРНК miR-25 и miR-223 с помощью ОТ-ПЦР на независимой выборке из 152-ух больных НМКЛ и 75-ти здоровых доноров показал, что их концентрация в сыворотке крови больных РЛ достоверно повышена по сравнению со здоровыми донорами. Впоследствии Chen с соавторами выбрали на основе полногеномных данных панель из 91 микроРНК для двуступенчатой верификации их экспрессии на образцах сыворотки крови от 400 больных НМКЛ и 220 здоровых доноров [487]. Результатом верификации стала диагностическая модель, включающая 10 микроРНК-маркеров (miR-20a, miR-24, miR-145, miR-152, miR-199a-5p, miR-221, miR-222, miR-223, miR-320), которая позволяет дифференцировать больных РЛ от здоровых лиц с чувствительностью 92,5% и специфичностью 90%. Экспрессия выбранных микроРНК коррелировала со стадией заболевания, и при определении их концентрации в 7-ми образцах сыворотки крови доноров до постановки диагноза РЛ (7-33 дня) и она позволила выявить пациентов с РЛ в 6 из 7 случаев.

При помощи TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, США) Roth с соавторами обнаружили, что низкий уровень miR-361-3p и miR-625* в сыворотке отличает больных РЛ от пациентов с доброкачественными заболеваниями легких и здоровых доноров [488]. Уровень обеих микроРНК достоверно увеличивался в сыворотке больных после операции по резекции опухоли. В работе Sanfiorenzo с соавторами набор из 6-ти микроРНК в плазме крови достоверно отличал больных НМКЛ от больных хронической обструктивной болезнью легких [489].

Nadal с соавторами изучили экспрессию микроРНК в сыворотке больных НМКЛ (n=70) и здоровых доноров (n=22) при помощи TaqMan OpenArray Human Panel (Applied Biosystems, США) и показали, что экспрессия 60-ти микроРНК была повышена и 31-ой микроРНК – понижена в образцах больных РЛ [490]. Валидация экспрессии этих микроРНК в независимой выборке (НМКЛ, n=84; здоровые доноры, n=23) показала, что четыре микроРНК miR-193b, miR-301, miR-141 и miR-200b являются наиболее диагностически информативными и позволяют выявлять НМКЛ с точностью 99,3%.

Wang с соавторами сначала изучили профиль экспрессии микроРНК в плазме больных АКЛ и здоровых доноров и показали, что уровни экспрессии более 300 микроРНК были различны [491]. Далее уровни 20-ти микроРНК были верифицированы при помощи ОТ-ПЦР и затем 4 микроРНК, экспрессия которых достоверно отличалась в тренировочной выборке, были верифицированы на еще одной независимой выборке из 38-ми больных АКЛ и 46-ти здоровых

доноров. Логистическая регрессия 4-ех микроРНК miR-339-3p, miR-425-3p, miR-532 и miR-628-3p позволила отличить больных АКЛ с чувствительностью 90,2% и специфичностью 98,9%.

Zhu с соавторами верифицировали экспрессию четырех микроРНК miR-182, miR-183, miR-210, miR-126, выбранных на основе литературных данных об их экспрессии в крови, в сыворотке крови больных НМКЛ, больных раком желудка, больных пневмонией, здоровых курильщиков и некурящих волонтеров [492]. Повышение экспрессии miR-182, miR-183, miR-210 и понижение экспрессии miR-126 служило диагностическим критерием РЛ, их использование в комбинации с карциноэмбриональным антигеном позволяло выявлять больных НМКЛ I стадии с чувствительностью 81,3% при абсолютной специфичности.

Проведя мета-исследование опубликованных данных об экспрессии микроРНК в крови, Moretti с соавторами выявили две группы микроРНК (высокая чувствительность: miR-223, miR-20a, miR-448, miR-145; высокая специфичность: miR-628-3p, miR-29c, miR-210, miR-1244) в качестве потенциальных маркеров НМКЛ [493]. Оценки авторов предполагают 91,6% чувствительность и 93,4% специфичность двуступенчатой диагностики с использованием сначала высокочувствительных микроРНК, а затем высокспецифичных микроРНК, однако данных о независимой валидации этой системы диагностики РЛ еще не представлено.

Одним из современных трендов в изучении циркулирующих микроРНК при РЛ является исследование экзосом крови. Известно, что экзосомы, секретлируемые опухолевыми клетками РЛ несут маркеры, специфичные для этого заболевания, в том числе онкоспецифические микроРНК [494]. Rabinowits с соавторами показали повышение уровня экспрессии 12-ти микроРНК в экзосомах плазмы крови больных АКЛ по сравнению со здоровыми донорами [495]. Тем не менее, очень немногие научные группы ведут исследование экзосомальных микроРНК при РЛ и представленные результаты не демонстрируют преимуществ этого подхода по сравнению с анализом тотальной микроРНК сыворотки/плазмы крови [494].

Следует специально выделить два перспективных исследования микроРНК крови в качестве маркеров РЛ. В первом исследовании Воегі с соавторами [496] определили концентрацию 100 микроРНК с применением микрочипа Megaplex Pools Human Pool A (Applied Biosystems, США) и количественной ОТ-ПЦР в плазме крови, взятой у пациентов с подозрением на РЛ перед проведением компьютерной томографии (n=41). Для нормализации данных был использован метод парных отношений - значение экспрессии каждой микроРНК сравнивали со значениями экспрессии каждой из оставшихся микроРНК. Полученные 4950 отношений в дальнейшем использовали для выявления различий между классами образцов, имеющих клиническую значимость. В результате обработки полученных данных были определены четыре панели отношений микроРНК, коррелирующие с риском развития РЛ (16

отношений), диагнозом РЛ (16 отношений), риском развития (10 отношений) и наличия агрессивного РЛ (10 отношений). Использование сигнатуры риска позволяет дифференцировать пациентов на доклинической стадии с чувствительностью 80% и специфичностью 90%, а уровень микроРНК в сигнатуре диагноза выявляет больных РЛ с чувствительностью 75% и специфичностью 100%. Диагностическая панель MSC (miRNA Signature Classifier), основанная на результатах этих исследований была успешно использована в масштабных клинических исследованиях MILD [497] и BioMILD [498] в качестве сопутствующего теста для снижения ложноположительных диагнозов МЦФ скрининга, и в настоящий момент продолжает находиться в стадии клинических испытаний.

В другой работе, проведенной в рамках масштабного исследования COSMOS, Bianchi и соавторы [499] предложили панель из 34-х микроРНК в сыворотке, позволяющую выявлять НМКЛ на доклинической стадии с точностью 80%. Для нормализации данных в этом исследовании использовали пул микроРНК, которые относительно стабильно выявляются в сыворотке крови. В последующем исследовании панель была дополнительно снижена до 13-ти наиболее информативных микроРНК, при этом точность классификации в валидационной выборке оставалась высокой (74,9%) [500].

Интересно, что при условии различия в источнике микроРНК – плазма или сыворотка, диагностические панели в этих двух исследованиях перекрываются по 5-ти микроРНК (miR-92a-3p, miR-30c-5p, miR-30b-5p, miR-148a-3p, miR-140-5p), что позволяет предполагать особую ценность этих микроРНК как маркеров РЛ.

1.4.3.2. Циркулирующие микроРНК как маркеры для прогноза течения РЛ

Показано, что микроРНК могут быть вовлечены в регуляцию биологических процессов, которые определяют агрессивность злокачественной опухоли и ее чувствительность к химиопрепаратам. Такими процессами являются дифференцировка и пролиферация, инвазия и миграция, эпителиально-мезенхимальный переход, репарация ДНК и апоптоз [501–504]. Анализ биопсийного и операционного материала не позволяет в полной мере оценить клональные молекулярные изменения, происходящие при развитии и метастазировании опухоли, в связи с гетерогенностью опухоли и потенциальным отличием клонов расположенных в разных участках первичной опухоли и метастаз. Поэтому исследования в формате жидкой биопсии, в частности, исследование профиля циркулирующих микроРНК, представляют особый интерес для поиска маркеров прогноза течения заболевания, предсказания ответа на терапию, мониторинга и оценки эффективности проводимого лечения [505].

Для выявления прогностических маркеров *Hu* с соавторами выявили 4-е микроРНК (*miR-486*, *miR-30d*, *miR-1*, *miR-499*), уровень которых достоверно отличался в сыворотке крови больных НМКЛ с высокими и низкими показателями выживаемости (по 30 человек) при помощи секвенирования на платформе Solexa [506]. Затем результаты были валидированы на образцах сыворотки крови от 243-х пациентов с НМКЛ I-IIIА стадии. В группе больных НМКЛ с высоким уровнем смертности наблюдалось увеличение уровня экспрессии *miR-486*, *miR-30d* и снижение уровня экспрессии *miR-1* и *miR-499*.

В исследовании Воегі с соавторами [496] сигнатура риска агрессивного РЛ состоящая из 10 пар (8 микроРНК) позволяла оценить прогноз больных РЛ с чувствительность 80% и специфичностью 100% до постановки диагноза. Сигнатура наличия агрессивного заболевания (10 пар, 11 микроРНК), предложенная в той же работе, позволяла выявить пациентов с неблагоприятным прогнозом с чувствительностью 88% и специфичностью 100% на момент постановки диагноза.

Le с соавторами методом количественной ОТ-ПЦР определен уровень 4-х микроРНК (*miR-21*, *miR-205*, *miR-30d*, *miR-24*) в сыворотке крови 82-х больных НМКЛ до лечения и 50-ти здоровых доноров [507]. Показано, что экспрессия этих микроРНК достоверно увеличивается у больных РЛ уже на ранних стадиях по сравнению со здоровыми донорами, а высокий уровень экспрессии *miR-21* и *miR-30d* ассоциирован с низкой общей выживаемостью.

Wang с соавторами анализировали профиль микроРНК у больного НМКЛ на поздних стадиях [508]. Сначала профиль экспрессия 754 микроРНК в 8-ми образцах сыворотки крови больных НМКЛ был определен с использованием «*TaqMan Human MicroRNA Microarray Card Set v3.0*» (Life Technologies, США). Далее экспрессию 35-ти выбранных микроРНК валидировали на двух выборках образцов пациентов с НМКЛ (192 и 191 образец) методом количественной ОТ-ПЦР. Показано, что изменения в экспрессии панели из 17 микроРНК сыворотки крови ассоциированы с показателем 2-х летней выживаемости больных НМКЛ.

Sanfiorenzo с соавторами [489] идентифицировали 2 различных набора микроРНК в плазме крови, ассоциированные с гистологическим типом РЛ, которые позволяют предсказывать прогрессию и прогрессирование злокачественного процесса с высокой чувствительностью. Изменения концентрации 3-х микроРНК (*miR-155-5p*, *miR-223-3p*, *miR-126-3p*) были ассоциированы с высоким риском рецидива у больных аденокарциномой легких, тогда как изменение концентрации *miR-152-3p*, *miR-199a-5p* и *miR-20a-5p* являлось прогностическим маркером выживаемости больных ПКРЛ.

Kaduthanam с соавторами исследовали микроРНК в плазме 204 больных АКЛ до операции при помощи TaqMan Array v.2.0 и выявили, что уровень miR-142-3p был связан с риском рецидива в течение 24 месяцев [509].

МикроРНК могут служить индикатором метастазирования РЛ. Wu с соавторами показали, что концентрация miR-422a в плазме крови больных РЛ может быть использована в качестве маркера метастазов в лимфатических узлах [510]. В уже рассмотренной работе Zheng с соавторами уровни miR-155 и miR-197 в плазме были достоверно выше в плазме пациентов с метастазирующим РЛ [484]. Lin с соавторами предложили miR-183 и miR-126 в качестве маркеров метастатического НМКЛ [511].

Прогностическая ценность микроРНК переносимых экзосомами для диагностики РЛ была показана в нескольких работах. Deјima с соавторами показали, что уровни miR21 и miR-4257 в экзосомах крови коррелируют со стадией РЛ и выживаемостью пациентов [512]. В другой работе этих же авторов показано, что присутствие miR-451a в экзосомах крови коррелирует с ее экспрессией в опухолевой ткани легкого, а ее высокий уровень является индикатором плохой выживаемости пациентов с НМКЛ [513]. Liu с соавторами показали, что miR-23b-3p, miR-10b-5p и miR-21-5p являются прогностическими индикаторами развития НМКЛ [514]. Другая группа авторов показала, что уровни miR-21, а также miR-155, повышены при рецидиве опухолевого процесса в мышечной модели РЛ [515].

1.4.3.3. Циркулирующие микроРНК как маркеры эффективности терапии РЛ

Циркулирующие в крови микроРНК также представляют интерес как индикаторы эффективности противоопухолевой терапии.

Chen с соавторами на основании исследования профиля экспрессии микроРНК в устойчивых и чувствительных к облучению клеточных линиях РЛ выбрали 19 микроРНК, которые были валидированы в выборке образцов плазмы крови больных НМКЛ IIIa-IV стадии, прошедших 2-4 курса химиотерапии и курс радиотерапии [516]. Экспрессия miR-98-5p, miR-302e, miR-495-3p и miR-613 была выше у больных с частичной регрессией заболевания. Aushev с соавторами [517] определили уровень микроРНК в плазме крови с использованием коммерчески доступной платформы, основанной на ОТ-ПЦР (miRCURY LNA miRNA PCR, Exiqon, Дания). Авторы показали, что уровень miR-205, miR-19a, miR-19b, miR-30b, miR-20a, существенно снижается у пациентов после оперативного вмешательства. В ранее описанной работе Le с соавторами провели сравнительный анализ профиля микроРНК в сыворотке крови больных РЛ до и на 10-ые сутки после проведенного комбинированного лечения, включающего

химиотерапию и операцию [507]. По их результатам в послеоперационный период наблюдалось снижение экспрессии miR-21 и miR-24.

В последнее время возрастает количество исследований, результаты которых подтверждают связь между профилем экспрессии микроРНК в крови с чувствительностью или резистентностью опухоли к лекарственным препаратам. В работе Wei с соавторами уровень miR-21 понижался в плазме крови больных НМКЛ при частичной регрессии опухоли после химиотерапии, но не у больных со стабилизацией или прогрессированием заболевания [518]. Franchina с соавторами установили, что уровень miR-22 в плазме коррелирует с эффектом терапии препаратом платинового ряда пеметрексетом [519]. У больных РЛ с прогрессированием после проведенной химиотерапии наблюдалось увеличение экспрессии miR-22 в плазме крови. Zheng с соавторами показали, что уровень miR-197 и miR-155 достоверно понижается в ответ на химиотерапию [484].

Недавно несколько групп установили связь между экспрессией микроРНК в крови и статусом терапевтических мишеней для таргетной терапии НМКЛ. Было показано, что уровни циркулирующих микроРНК крови коррелируют со статусом и специфическими активирующими мутациями в EGFR опухолевых клеток, и ассоциированы с чувствительностью к терапии ингибиторами тирозинкиназ. Ito с соавторами проанализировали экспрессию микроРНК в парных образцах ткани и опухолевой ткани пациентов с АКЛ с мутациями и без мутаций в EGFR при помощи микрочипового анализа Toray 3D-Gene miRNA oligo chip v.21 (Toray) [520]. Верификация результатов с помощью ОТ-ПЦР показала, что уровень miR-23a-3p был выше у пациентов с диким типом EGFR. Ma с соавторами выявили отличия экспрессии микроРНК в плазме крови больных НМКЛ с делецией в 19 экзоне (del19) и заменой L858R в 21 экзоне EGFR [521]. Наиболее явными индикаторами отличий служили уровни miR-19b и miR-874. Qu с соавторами после профилирования микроРНК плазмы крови больных АКЛ с мутациями в EGFR, пациентов без мутаций и здоровых доноров показали, что экспрессия miR-107 повышена в группе пациентов с мутантным EGFR, miR-122 повышена только у пациентов с мутацией L858R, а понижение miR-195 коррелирует с наличием del19 [522]. В работе Zhang с соавторами уровень miR-122 отличался у больных АКЛ с мутациями в EGFR по сравнению с больными без мутаций, а больных на поздних стадиях (III-IV) отличия наблюдались уже в уровне 5-ти микроРНК (miR-16, miR-20b, miR-195, miR-122, miR-486-3p) [523]. Wang с соавторами показали, что экспрессия miR-21, miR-27a, и miR-218 в плазме крови связана с чувствительностью к терапии ингибиторами тирозинкиназ у пациентов НМКЛ с del19 [524]. Zhao с соавторами после анализа клеточный линии РЛ, образцов ткани и плазмы больных НМКЛ установили, что концентрация miR-195, miR-122, miR-125, miR-21 и miR-25 связана с

устойчивостью к гефитинибу (gefitinib) [525]. Shen с соавторами показали, что уровни miR-21 и miR-10b были повышены в плазме больных НМКЛ с мутациями в EGFR, а уровень miR-21 кроме того служил индикатором чувствительности к гефитинибу [526].

Кроме того, в недавнем исследовании Li с соавторами показали, что уровни 3-х микроРНК miR-28-5p, miR-362-5p и miR-660-5p в плазме отличают больных ALK-позитивных от ALK-негативных больных НМКЛ, при этом уровень экспрессии miR-660-5p после курса лечения коррелировал с ответом на терапию кризотинибом (crizotinib) – ингибитором ALK, а уровень miR-362-5p до лечения – с выживаемостью больных [527].

1.4.4. Современное состояние области диагностического применения циркулирующих микроРНК

Результаты представленных исследований говорят о том, что изменения экспрессии микроРНК тесно связаны с онкогенезом НМКЛ и такие опухолевые микроРНК могут попадать в кровоток задолго до клинического проявления РЛ. Тем не менее, несмотря на большое количество исследований, посвященных изучению циркулирующих микроРНК, в настоящее время лишь диагностические панели микроРНК, предложенные группами под руководством Sozzi [497] и Bianchi [500] находятся на стадии клинических испытаний. Причиной этому служит ряд особенностей экспрессии микроРНК и аспектов ее циркуляции в крови и вытекающих из этого технических сложностей их исследования. Ряд иных факторов также могут вносить вклад в эффективность диагностических систем. К числу таких факторов относятся: точность детекции микроРНК, отсутствие универсальных методов выделения и анализа микроРНК, разные подходы к формированию экспериментальных и референтных групп пациентов, включая контроль демографических и клинических характеристик пациентов. Несмотря на это, из приведенных данных видно, что изменения экспрессии многих микроРНК воспроизводятся в исследованиях разных авторов, что позволяет надеяться на то, что поиск циркулирующих микроРНК-окомаркеров крови и разработка на их основе диагностических систем является реализуемой задачей.

1.5. Методы выделения, детекции и анализа циркулирующих микроРНК крови

Накопленные знания об экспрессии микроРНК в крови свидетельствуют о том, что, как правило, среднegrupповые значения уровней циркулирующих микроРНК, дифференциально экспрессированных в крови онкологических больных и здоровых доноров, отличаются не более чем в полтора-два раза, и лишь в редких случаях отличаются более чем вдвое. Очевидно, что для успешного поиска и детекции в составе диагностических систем необходимо преодолеть

ряд трудностей, связанных, в первую очередь, с их биологическими свойствами (особенности генерации, упаковки, циркуляции микроРНК) и вытекающими из них техническими особенностями их выделения из биологических жидкостей, подходами к определению их концентраций и методам обработки полученных данных. Необходимо отметить, что важной проблемой является нормализация данных, поскольку абсолютные концентрации микроРНК-маркеров не имеют значения, а проблема нормализации связана как с генерацией пула циркулирующих микроРНК, так и с их гомологами и родительскими клетками (например, клетками крови). Методологические проблемы анализа циркулирующих микроРНК крови являются в настоящее время одним из наиболее серьезных препятствий на пути их использования в качестве диагностических маркеров.

Настоящая глава посвящена описанию и анализу методологических аспектов исследования циркулирующих микроРНК крови. Оценку уровня экспрессии циркулирующих микроРНК можно условно разделить на три основные фазы: пробоподготовка, получение данных об экспрессии и их анализ. На каждом из этапов эффективность определяется биологическими свойствами циркулирующих микроРНК и техническими характеристиками используемых подходов, обеспечивая итоговую точность и надежность детекции микроРНК. Достоинства и недостатки современных методов выделения, детекции и анализа экспрессии циркулирующих микроРНК крови будут описаны ниже.

1.5.1. Методики выделения микроРНК из крови

Получение качественных препаратов микроРНК несомненно является ключевым этапом в их анализе. В описанных исследованиях циркулирующих микроРНК крови источниками биологического материала являлись плазма или сыворотка крови. Neegaard с соавторами сравнили профили микроРНК в парных образцах плазмы и сыворотки крови и показали, что профили микроРНК, полученных из плазмы и сыворотки крови, слабо коррелируют [528]. По данным авторов концентрация большинства микроРНК в плазме выше, однако, в то же время, экспрессия отдельных микроРНК более вариабельна в плазме по сравнению с сывороткой.

Отдельной проблемой является контаминация препаратов циркулирующих микроРНК крови, микроРНК, источником которых являются клеточные элементы крови. Известно, что форменные элементы крови, включая тромбоциты, имеют характерные профили экспрессии микроРНК [529]. Pritchard с соавторами изучили экспрессию многих потенциальных маркерных микроРНК и показали, что более половины из них (58%) высоко экспрессированы хотя бы в одном типе клеток крови [485]. В результате неправильного хранения и обработки образцов крови, а также физиологические причин (физическая нагрузка, заболевания сердечно-

сосудистой системы, прием определенных лекарственных средств, фондовый лизис форменных элементов из за контакта с чужеродной поверхностью) клеточные микроРНК могут попадать в образцы плазмы, изменяя в них профиль микроРНК. Действительно, сравнение микроРНК крови из больных раком и здоровых доноров, показало, что уровни ассоциированных с гемолизом микроРНК коррелируют с уровнем гемоглобина и количеством форменных элементов крови сильнее, чем со статусом донора [485]. Результаты других исследований также подтверждают влияние гемолиза на уровень циркулирующих микроРНК [530,531]. Для контроля гемолиза в образцах плазмы и сыворотки Blondal с соавторами предложили использовать отношение концентраций miR-23a и miR-451a, первая из которых относительно стабильно экспрессирована в плазме на низком уровне, а вторая высоко экспрессирована в клетках эритропоэтического ряда, в том числе присутствует в зрелых эритроцитах [532].

Стабильность экспрессии маркерных молекул во времени, т.е отсутствие колебания их уровня в крови в зависимости от физиологических факторов является одним из основных требований, предъявляемых к маркерам заболеваний. Однако, известно, что демографические характеристики, а также физические нагрузки, образ жизни, диета, прием лекарственных препаратов влияют на концентрацию и профиль экспрессии микроРНК в крови [533,534]. Keller с соавторами [535] исследовали профиль 904-х микроРНК в образцах сыворотки крови, собранных в течение нескольких лет с разным промежутком времени (от 2-х до 32-х суток) у больных РЛ (до и после постановки диагноза) и здоровых доноров. Авторы показали, что профиль микроРНК стабилен в течение нескольких лет, и существенные изменения в экспрессии выявляются ближе к моменту постановки диагноза. В более недавнем исследовании тех же авторов было показано, что из 529-ти исследованных микроРНК сыворотки крови, концентрация 168-ми микроРНК изменялась во времени, уровни 56-ти микроРНК были подвержены межиндивидуальным вариациям, а 169 микроРНК – вариациям связанным с различиями процедуры забора или обработки образцов крови. Только оставшиеся 135 микроРНК были экспрессированы в сыворотке более-менее стабильно [536].

На этапе пробоподготовки основным стратегическим решением является выбор метода выделения микроРНК из образцов крови. Метод выделения микроРНК из биологических жидкостей должен эффективно решать три основные проблемы, препятствующие получению пригодных для анализа препаратов микроРНК:

1. Обеспечить полное разрушение комплексов, защищающих микроРНК от деградации в крови
2. Защитить микроРНК от РНК-гидролизующих ферментов, присутствующих в плазме крови, в процессе выделения

3. Предотвратить зарязнение препарата микроРНК примесями, ингибирующими обратную транскрипцию или полимеразную цепную реакцию, к которым могут относиться белки, липиды, липопротеины, протеогликианы, полисахариды, низкомолекулярные вещества и т.д.

Из числа используемых и популярных в настоящее время методов выделения микроРНК из крови подавляющее большинство основано на использовании кислой фенол-гуанидиновой экстракции, предложенной Chomczynski с соавторами в 1987 году [537,538]. Этот способ позволяет эффективно фракционировать РНК, ДНК и белковую фракцию и его принято считать "золотым стандартом качества" выделения РНК. Коммерчески доступные наборы для выделения микроРНК из крови включают TRIzol LS (Life Technologies, США), miRVANA (Life Technologies, США) и другие. Для очистки и обогащения препаратов короткими РНК после экстракции используют дополнительный шаг очистки на колонках с твердофазными сорбентами [539]. Несмотря на то, что этот метод эффективен и широко используется, на практике он имеет ряд недостатков таких, как длительность и трудоемкость протокола выделения (проведение экстракции требует много времени от 40 до 60 минут), высокого качества реагентов (в первую очередь, фенола), сложность в выполнении процедуры и зависимость эффективности от квалификации исследователя. Помимо этого, использование фенола требует дополнительного оборудования, рабочих мест и системы утилизации токсичных отходов, что снижает пригодность метода для рутинного выделения микроРНК в клинической практике. Наиболее серьезным недостатком метода является то, что по данным Kim с соавторами при его использовании происходит частичная потеря РНК с низким содержанием гуанина и цитозина [540]. Кроме того, сравнение эффективности выделения микроРНК с другими методами выделения часто оказываются не в пользу фенол-хлороформной экстракции [541].

Предложены альтернативные подходы к выделению циркулирующих микроРНК [542]. Например, в наборе miRCURY (Exiqon, Дания) вместо трудоемкой процедуры органической экстракции из обработанного денатурирующим агентом образца осаждают белки и липопротеины при помощи запатентованных реагентов, а затем микроРНК очищают на колонках. Такая процедура существенно уменьшает время выделения (до 30 минут) и не использует высокотоксичных химических агентов. Более того, в нескольких исследованиях авторы показали, что такой подход как минимум не уступает по эффективности фенол-хлороформной экстракции, однако есть данные, что для использования полученных препаратов для анализа микроРНК секвенированием может требоваться дополнительная стадия фосфорилирования [539,542]. Тем не менее, у этого метода также могут быть недостатки, так

часть микроРНК может быть потеряна при неполной денатурации комплексов и/или в результате со-осаждения микроРНК с биополимерами.

Недавно нашей лабораторией были предложены два метода выделения микроРНК из биологических жидкостей, в первую очередь плазмы крови. Первый метод, разработанный в ходе данной работы, основан на использовании оригинальной водно-органической композиции для исчерпывающей денатурации белков и липопротеинов плазмы крови [543]. Второй метод реализует подход, основанный на осаждении биополимеров из плазмы крови, в манере сходной в описанными выше продуктами компании Exiqon [237]. Оба метода реализуют принципиально различные подходы к решению проблемы выделения циркулирующих микроРНК и позволяют эффективно получать высококачественные препараты микроРНК крови. Это демонстрирует, что на современном уровне развития области не существует однозначно наилучшего метода выделения циркулирующих микроРНК, и выбор методологии часто обусловлен характеристиками получаемых наборов микроРНК и удобством использования в контексте каждого конкретного исследования. Это соответствует данным Консорциума по внеклеточной РНК-коммуникации (NIH Extracellular RNA Communication Consortium), что несмотря на существенное развитие методологии, по данным на сегодняшний день не существует оптимального метода выделения микроРНК из крови, и работы по разработке и оптимизации новых подходов к решению этой проблемы необходимо продолжить [542].

1.5.2. Методы определения концентрации микроРНК

Для количественного определения экспрессии отдельных микроРНК в образцах используют секвенирование малых РНК, методы гибридизационного микрочипового анализа и подходы, основанные на количественной ОТ-ПЦР. Каждая из этих категорий представлена несколькими вариантами протоколов, однако в большинстве случаев они объединены общими достоинствами и недостатками. В настоящий момент нельзя точно назвать наиболее эффективный способ, так как представленные методы занимают отдельные ниши в плане применимости к исследованию циркулирующих микроРНК. Стоит также отметить, что по данным Mestdagh с коллегами, при сравнении параметров 12 основных коммерческих платформ для анализа микроРНК, показано, что дифференциальная экспрессия микроРНК между каждой парой подходов совпадает не более чем в 55% случаев [544]. Таким образом, для точного измерения экспрессии микроРНК всегда необходимы дополнительные валидационные эксперименты.

Секвенирование

Секвенирование РНК является масштабным и эффективным методом изучения циркулирующих микроРНК. Принципиальным отличием от других методов является возможность одновременно изучить экспрессию всех микроРНК (в том числе ранее не выявленных), их предшественников и других РНК, что позволяет оценить весь спектр РНК в образце. В то же время, этот метод имеет и ряд очевидных недостатков.

Для секвенирования требуется большее стартовое количество РНК, что не всегда доступно при работе с биологическими жидкостями. Подготовка библиотек для секвенирования занимает относительно длительное время, и стоимость оборудования и расходных материалов довольно высока. Этапы лигирования и преамплификации в ходе приготовления библиотек для секвенирования могут вносить систематические ошибки в представленность отдельных микроРНК образца и даже приводить к потере редких последовательностей и изоформ [542,545,546]. Turchinovich с соавторами предложили методику CATS (Capture and Amplification by Tailing and Switching) для введения в последовательность микроРНК адаптеров при помощи полиаденилирования и последующего синтеза цепи при помощи обратной транскриптазы вируса лейкоза мышей (MMLV-RT) за счет присущей этому ферменту способности к смене матрицы [547]. Langevin с коллегами предложили метод приготовления библиотек для секвенирования РНК Peregrine основанный на схожем принципе [548].

Получаемые в результате секвенирования данные требуют специальной обработки, исход которой часто зависит от выбранного в каждом конкретном случае биоинформатического подхода, и в силу малой длины микроРНК при выравнивании и аннотации прочтений может возникать отдельный набор проблем [549,550]. В силу этих причин результаты секвенирования часто сильно различаются между исследованиями и всегда требуют независимой верификации, например при помощи ОТ-ПЦР [542,546].

Микрочиповый анализ

Для исследования экспрессии микроРНК также может быть использован микрочиповый гибридационный анализ. В отличие от секвенирования, микрочиповый анализ позволяет исследовать экспрессию определенного ограниченного набора микроРНК, однако позволяет параллельно детектировать сотни микроРНК. Так же как и в случае секвенирования, для анализа на микрочипах требуется большее стартовое количество РНК (от 100 до 1000 нг РНК), и, как правило, преамплификация, которая может вносить ошибки в данные [546]. Такой анализ обладает меньшей специфичностью, чем другие методы, но и меньшей стоимостью, что

позволяет сравнивать профили экспрессии микроРНК больших групп пациентов. При этом, в этом случае требуется верификация результатов микрочипового анализа при помощи ОТ-ПЦР.

На сегодняшний день предложено несколько модификаций этого подхода. Так, система Nanostring nCounter позволяет проводить мультиплексный анализ микроРНК за счет использования пар специфичных флуоресцентно меченых зондов [551]. Для устранения ошибок, возникающих за счет различий в температуре плавления микроРНК, могут использоваться зонды на основе LNA [552].

В целом, микрочиповый анализ является простой и недорогой альтернативой секвенированию в тех случаях, когда примерный спектр микроРНК в образце известен.

ОТ-ПЦР

Для оценки экспрессии известных микроРНК применяется технология количественной ОТ-ПЦР. Этот метод является наиболее доступным, обладает высокой специфичностью и чувствительностью, что позволяет работать с малыми количествами материала [544]. Количественной ОТ-ПЦР регулярно используется в качестве метода «последней инстанции» для подтверждения результатов, полученных другими методами.

ОТ-ПЦР микроРНК проводят при помощи двух основных подходов, отличие между которыми состоит как в подходе к проведению шага обратной транскрипции (использование петлевых праймеров или олиготимидинового праймера), так и в способе количественной детекции продукта – флуоресцентно меченные гидролизующиеся зонды (TaqMan ПЦР) или интеркалирующие флуоресцентные красители (SYBR Green) [546]. В рамках этих методов предложены многочисленные модификации протоколов, в том числе использование TaqMan-зондов с малобороздочными лигандами для повышения специфичности детекции изоформ и LNA-праймеров для выравнивания температур плавления систем для разных микроРНК [546,553–557].

Для проведения одновременного анализа большого количества микроРНК при помощи ОТ-ПЦР разработаны предформированные *ПЦР-микрочипы*, каждая точка которых представляет из себя отдельную ПЦР-реакцию. Такой анализ микроРНК объединяет достоинства сразу двух методов и подходит как для решения исследовательских задач, так и для внедрения в клиническую практику. Примерами такого подхода являются микрофлюидная система TaqMan Array (Applied Biosystems, США) и система miRCURY LNA miRNA qPCR (Exiqon, Дания, теперь QIAGEN). Последняя основана на использовании LNA праймеров и позволяет детектировать микроРНК с высокой чувствительностью (до 5 копий микроРНК в пробе) и специфичностью [558].

1.5.3. Анализ данных

Этап анализа данных об экспрессии микроРНК можно условно разделить на два блока – подготовка данных и собственно статистический анализ результатов.

Одним из ключевых этапов подготовки данных является выбор соответствующей стратегии нормализации экспрессии микроРНК, которая зависит от объема данных. Для обработки данных микрочиповых исследований часто используется нормализация на среднее значение порогового цикла всех микроРНК в образце [559]. Схожий подход используется для данных секвенирования в виде встречаемости на миллион прочтений (RPM). Такая нормализация позволяет выявлять основные тенденции в данных, однако, точность таких нормировок базируется на большем количестве мишеней и их невозможно точно воспроизвести при использовании небольших панелей или отдельных микроРНК.

Для нормализации данных ОТ-ПЦР применяется метод $2^{-\Delta\Delta CT}$, позволяющий оценить уровень экспрессии микроРНК относительно стандарта [560]. В качестве таких стандартов были предложены ядерные микроРНК (snRNU6, snRNU48), однако их основным недостатком является тот факт, что они значительно длиннее (> 100 п.н.), чем микроРНК, что приводит к различиям в эффективности выделения и ОТ-ПЦР [546]. В ряде ранних работ в качестве нормализатора использовали miR-16, однако потом было показано, что она высоко экспрессирована в клетках крови, а ее уровни сильно зависят от условий хранения и обработки образцов [214,561]. Использование одиночных нормализаторов позволяет оценивать диагностический потенциал микроРНК-маркеров, однако, поскольку уровень таких нормализаторов варьирует от донора к донору и зависит от физиологических факторов, такая нормировка не может считаться надежной.

К сожалению, для нормализации экспрессии микроРНК в образцах крови аналога конститутивно экспрессирующихся генов домашнего хозяйства найдено не было, в связи с чем были предложены иные варианты стандартизации данных. Например, нормировка с использованием синтетических олигонуклеотидов по последовательностям экзогенных микроРНК (обычно нематоды *C. elegans*), добавленных в образец на стадии выделения получила широкое распространение, однако ценность такого подхода состоит в основном в контроле качества обработки образца [505,542]. В некоторых исследованиях нормировка проводится относительно объема исследуемого образца или общего количества РНК, однако это больше характерно для ранних работ в области циркулирующих микроРНК крови [546].

Более перспективным является формирование панелей микроРНК, для имитации стабильных нормировок, которые используются при секвенировании и микрочиповом анализе.

Несмотря на то, что такой подход позволяет создавать стабильные нормализаторы, как показывают исследования Bianchi с соавторами [499,500], для стабильности панели необходимо использование не менее 20-ти нормировочных микроРНК, что существенно повышает стоимость диагностики. Другим перспективным подходом является построение пар микроРНК, отношение экспрессий которых является диагностически значимым показателем для выявления рака легкого. Такой подход, позволяет подобрать «противовес» для каждой маркерной микроРНК в виде стабильной микроРНК или другой маркерной микроРНК, был ранее успешно использован в ряде работ для анализа экспрессии микроРНК и построения диагностических панелей для РЛ [496,530]. Кроме очевидной пользы в виде способности формировать относительно компактные панели диагностических пар, поведение пар микроРНК может пролить свет на биологические особенности таких микроРНК, как показано в исследовании Landoni с соавторами для представленности микроРНК в парах и подверженность их уровня в крови изменениям при гемолизе [530].

Помимо нормализации отдельно стоит вопрос выбора оптимальных диагностических панелей микроРНК. В силу отсутствия полной ткане- и опухолеспецифичности экспрессии большинства микроРНК [562], формирование панелей и более сложных классификаторов является единственным путем раскрытия диагностического потенциала микроРНК-маркеров. Панели диагностических микроРНК более устойчивы к индивидуальным и техническим вариациям чем отдельные микроРНК [497,500,563]. В большинстве современных работ для формирования панелей используется только данные об экспрессии микроРНК, без учета их биологической значимости и характеристик пациентов, однако в ряде работ уже были предложены прототипы классификаторов для диагностики онкологических заболеваний на основе древ решений и методов машинного обучения [496,530,564–566]. Тем не менее примеров использования современных методов биоинформатического анализа для исследования диагностических свойств микроРНК на данный момент представлено не так много.

Таким образом, методологическая составляющая изучения микроРНК также как и особенности их биологии находится в состоянии активного развития; на многие вопросы не существует однозначных ответов [567]. Недавно с целью улучшения состояния дел было создано несколько консорциумов, состоящих из представителей научного сообщества, а также ряда коммерческих фармацевтических предприятий и государственных регуляторных органов, целью которых является гармонизация и стандартизация соответствующих областей исследования циркулирующих нуклеиновых кислот и в частности микроРНК, в числе которых BloodPAC (Blood Profiling Atlas in Cancer) и Консорциум Национального Института Здоровья

по Внеклеточной Коммуникации (NIH Extracellular RNA Communication Consortium) [568,569]. Однако, результаты их деятельности пока не отразились на состоянии дел в области диагностического применения микроРНК. До тех пор, пока детальные стандартизованные протоколы для анализа микроРНК не будут выработаны можно смело утверждать, что современные подходы к анализу микроРНК являются лишь ограниченно надежными, а значит работа над повышением точности аналитических систем, эффективности и воспроизводимости стадий пробоподготовки, отработка методик нормализации данных и создание новых дизайнов диагностических систем, включающих алгоритмы вынесения диагноза и необходимые стадии контроля качества являются приоритетным этапом на пути создания эффективных и точных диагностикумов РЛ и других заболеваний на основе циркулирующих микроРНК.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы и препараты

В работе были использованы следующие **материалы**: $MgCl_2$, $NaCl$, KCl , $(NH_4)_2SO_4$, $LiClO_4$, $CaCl_2$, ацетат натрия, 2-меркаптоэтанол, диэтилпирокарбонат, N-лауроилсаркозин (Sarkosyl), полиакриламид, N-N'-метилен-бисакриламид, мочеви́на, дитиотреитол (ДТТ), спермидин, трис, глицин, ГИТЦ, ЭДТА, Tween 20 (Sigma-Aldrich); нуклеотид трифосфаты (dNTP), буфер для ПЦР, для обратной транскрипции (BiolabMix, Россия); гликоген, ингибитор рибонуклеаз RiboLock (Fermentas, Литва); раствор для элюции РНК (Биосилика, Россия); и **ферменты**: T4 полинуклеотид киназа, термостабильная (Taq) ДНК полимераз (BiolabMix, Россия), обратная транскриптаза вируса лейкоза мышей была любезно предоставлена д.б.н. Ходыревой С.Н. (Лаборатория биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия).

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ с удельной активностью 3×10^3 мКи был синтезирован и любезно предоставлен к.б.н. Семеновым Д.В. (Лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия).

Реактивы без указания страны производства были отечественного производства с квалификацией *осч* или *хч*.

Для приготовления всех растворов использовали деионизованную апиrogenную воду, полученную на установке Arium 611 VF. Для предотвращения потенциальной контаминации рибонуклеазами воду инкубировали с диэтилпирокарбонатом (0,1%) в течение не менее 4 ч и затем автоклавировали для инактивации реагента.

2.1.2. Оборудование

В работе было использовано следующее оборудование: установка для очистки воды Arium 611 VF (Sartorius stedim biotech, Германия); pH-метр Sartorius PB-11 (Sartorius stedim biotech, Германия); центрифуга Heraeus Pico 17 (Thermo Scientific, Германия); центрифуга с охлаждением Eppendorf 5810R (Eppendorf, Германия); центрифуга J21 (Beckman, Великобритания); шейкер Vortex-genie 2 (Scientific Industries, США); спектрофотометр Genesys UV Genesys 10uv (Thermo Scientific, США); ПЦР амплификаторы iCycler iQ5 (BioRad, США) и LightCycler480 II (Roche, Швейцария); термоциклер TProfessional Basic Thermocycler (Biometra, Гётинген, Германия); сцинтилляционный счетчик β -частиц Tri-Carb 2800 TR (PerkinElmer, США).

Микроколони со стекловолнистыми фильтрами для сорбции нуклеиновых кислот (ООО БиоСилика, Россия).

2.1.3. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Синтетический рибоолигонуклеотид по последовательности hsa-miR-21-5p (5'-rUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3') был синтезирован в Лаборатории химии рибонуклеиновых кислот (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия).

Праймеры и зонды для обратной транскрипции и количественной TaqMan ПЦР (таблица 2) были синтезированы в Лаборатории медицинской химии (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия) и НПК Синтол (Москва, Россия).

Таблица 2. Последовательности праймеров и зондов для обратной транскрипции и количественной TaqMan-ПЦР в реальном времени.

hsa-miR-16-5p (miR-16)	OT: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGCCAA-3' ПП: 5'-GCCCGTAGCAGCACGTAATAT-3' 3: 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACCGCCAA-(FQ)-3'
hsa-miR-21-5p (miR-21)	OT: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCAACA-3' ПП: 5'-GCCCGTAGCTTATCAGACTGAT-3' 3: 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACTCAACA-(FQ)-3'
hsa-miR-19b-3p (miR-19b)	OT: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCAGTT-3' ПП: 5'-CGCTGTGCAAATCCATGCAA-3' 3: 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACTCAGTT-(FQ)-3'
hsa-miR-205-5p (miR-205)	OT: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCAGACT-3' ПП: 5'-CCTCCTTCATTCCACCGGA-3' 3: 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACCAGACT-(FQ)-3'
hsa-miR-126-3p (miR-126)	OT: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGCATTA-3' ПП: 5'-CCGCTCGTACCGTGAGTAAT-3' 3: 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACGCATTA-(FQ)-3'
hsa-miR-25-3p (miR-25)	OT: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCAGAC-3' ПП: 5'-CCGCCATTGCACTTGTCTCG-3' 3: 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACTCAGAC-(FQ)-3'
hsa-miR-125b-5p (miR-125b)	OT: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCACAA-3' ПП: 5'-CGTCCCTGAGACCCTAACTT-3' 3: 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACTCACAA-(FQ)-3'
hsa-miR-183-5p (miR-183)	OT: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGTGAA-3' ПП: 5'-CGCTATGGCACTGGTAGAA-3' 3: 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACAGTGAA-(FQ)-3'
hsa-miR-23a (miR-23a)	OT: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGAAAT-3' ПП: 5'-CTATCACATTGCCAGGGA-3' 3: 5'-(FAM)-TCGCACTGGATACGACGGAAAT-(FQ)-3'
hsa-miR-451a (miR-451a)	OT: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAАACTCA-3' ПП: 5'-CTGCAAACCGTTACCATTACT-3' 3: 5'-(FAM)-TCGCACTGGATACGACAАACTCA-(FQ)-3'
Все микроРНК	УП: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

OT-петлевой праймер для обратной транскрипции

ПП-специфический прямой праймер для ПЦР в реальном времени

УП-универсальный обратный праймер для ПЦР в реальном времени

3-зонд для ПЦР в реальном времени

2.1.4. Клинические характеристики доноров

Работа проводилась в соответствии с принципами добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288). Все работы с образцами крови одобрены этическим комитетом ИХБФМ СО РАН. Клинико-патологические и демографические характеристики групп доноров, образцы плазмы крови которых были использованы в исследовании, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Демографические и клинико-патологические характеристики доноров крови

	Иррациональный поиск микроРНК маркеров			Рациональный поиск микроРНК маркеров				
	Первичные больные РЛ (n=75)	Больные из группы мониторинга терапии РЛ (n=23)	ЗД (n=50)	Профилирование		Верификация маркеров		
				Больные РЛ (n=20)	ЗД (n=10)	Больные РЛ (n=30)	ЗД (n=20)	Больные ЭБ (n=10)
Возраст								
Среднее±SD	65,0±9,0	59,8±4,5	51,2±8,8	65,0±7,8	51,8±10,0	62,2±5,5	54,3±8,6	61,0±5,4
Размах	31-79	57-68	35-64	41-79	31-66	55-78	42-67	57-71
Пол								
муж.	67	22	42	20	10	28	18	10
жен.	8	1	8	0	0	2	2	
Некурящие	7	1	8	3	2	2	3	
Стадия РЛ								
I	0	0		1		2		
II (A, B)	24	0		10		14		
III (A, B)	47	23		9		14		
IV	4	0		0				
Гистотип								
НМКЛ	71	23		20		30		
ПКРЛ	53	15		14		28		
АКЛ	18	8		6		2		
МКРЛ	4	0		0		0		

Группа здоровых доноров.

Образцы крови здоровых доноров без жалоб на заболевания дыхательных путей и онкологических заболеваний в анамнезе были предоставлены ЦНМТ ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия) и НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия).

Группа первичных больных раком легкого

Образцы крови первичных больных РЛ (n=75) были предоставлены НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия) и НИИ Онкологии РАМН (Томск, Россия). Стадирование опухолей проводили согласно системе TNM (ВОЗ, 1990) по результатам клинического, морфологического, эндоскопического, рентгенологического обследований и по результатам оперативного вмешательства. Образцы крови больных раком легкого были собраны при первичной постановке диагноза до начала лечения в период с января 2013 по март 2014 г.

Группа больных раком легкого в период противоопухолевой терапии

Образцы крови первичных больных РЛ без онкологических заболеваний в анамнезе (n=23) были предоставлены НИИ онкологии РАМН (Томск, Россия). Стадирование опухолей проводили согласно системе TNM (ВОЗ, 1990) по результатам клинического, морфологического, эндоскопического, рентгенологического обследований и по результатам оперативного вмешательства. Все пациенты получали 2-3 цикла неoadьювантной химиотерапии пакситакселем (175 мг/м^2 поверхности тела в течение 1 дня) и карбоплатином (AUC 6 в течение 1 дня) с интервалом в 21 день. По завершении курса химиотерапии проводили оперативное удаление опухоли и интраоперативную радиотерапию. Образцы крови больных раком легкого были собраны при первичной постановке диагноза, через 15-30 дней после завершения курса химиотерапии (37-52 дня после начала химиотерапии) и в послеоперационный период (10-15 суток после оперативного вмешательства). Эффективность химиотерапии определяли при помощи критерия RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) [570] на 14-ый день после завершения курса. Пациентов с частичным ответом (partial response) классифицировали как отвечающих на терапию. Пациентов со стабилизацией (disease stabilization) или прогрессией заболевания (disease progression) относили к группе не отвечающих/резистентных. Кроме того при формировании групп учитывали рецидивы и выявление отдаленных метастазов в течение 5 лет после окончания лечения. Образцы крови были собраны в период с января 2014 по март 2016 г.

Группы здоровых доноров и больных раком легкого для профилирования на платформе Exiqon

Для профилирования циркулирующих микроРНК плазмы было выбрано 10 образцов из группы здоровых доноров и 20 образцов первичных больных раком легкого II-III стадии в возрастной группе 30-80 лет.

Для верификации экспрессии циркулирующих микроРНК плазмы было выбрано 20 образцов из группы здоровых доноров и 30 образцов первичных больных раком легкого II-III стадии в возрастной группе 30-80 лет. Кроме того, в исследование были включены 10 образцов пациентов с гипер- и метапластическим эндобронхитом, предоставленные НИИ Онкологии РАМН (Томск, Россия).

2.2. Методы

2.2.1. Забор образцов крови и получение плазмы

Образцы крови получали путем венепункции иглой №G18½ в вакутейнеры (BD Biosciences, Нью-Джерси, США), содержащие $\text{K}_2\text{ЭДТА}$ (18 мг) до объема 10 мл. После взятия

пробирки перемешивали переворачиванием в течение 10 сек и хранили до обработки не более 4 часов при 4°C. Для получения плазмы кровь центрифугировали при 400×g в течение 20 минут для отделения клеточной фракции. Бесклеточную фракцию переносили в новую пробирку и центрифугировали при 1200×g в течение 20 мин, супернатант отбирали и хранили в аликвотах при –80°C. После размораживания образцы центрифугировали при 3000×g в течение 5 мин, чтобы избавиться от криопреципитата.

2.2.2. Получение препаратов микроРНК из плазмы крови при помощи однофазного метода

К образцу плазмы объемом 150 мкл в 2мл пробирке прибавляли 4,5 мкл 2-меркаптоэтанола и 300 мкл денатурирующего буфера (6 М ГИТЦ, 15 mM трис-ацетат, pH 6,5), перемешивали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. К полученному раствору прибавляли 1,35 мл раствора этанол-хлороформ 2:1, тщательно перемешивали, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и центрифугировали на настольной центрифуге Heraeus Pico 17 при 17000g в течение 5 мин. Супернатант наносили на колонку со стекловолокнистым фильтром при помощи вакуумного насоса, проскок удаляли. Колонку дважды промывали буфером (1 М ГИТЦ, 2,5 mM трис-ацетат, 50% этанол, 25% хлороформ, 1% 2-меркаптоэтанол) на настольной центрифуге Heraeus Pico 17 при 400g, 1 мин. После второй смены отмывки колонку центрифугировали при 17000 g, 1 мин. Затем колонку дважды промывали буфером (10 mM трис-HCl, pH 7,5, 0,1 М NaCl, 75% этанол) при 400g, 1 мин. После второй смены отмывки колонку центрифугировали при 17000g, 1 мин. Для элюции РНК колонку инкубировали с 120 мкл раствора для элюции РНК в течение 10-15 мин при комнатной температуре. Элюат собирали последовательным центрифугированием при 400g, 1 мин и при 10000g, 1 мин и хранили на льду или при –20°C.

2.2.3. Получение препаратов микроРНК из плазмы крови при помощи экстракции кислым фенол-хлороформом

Препараты РНК плазмы крови получали при помощи модифицированного протокола, описанного Chomczynski и Sacchi [538]. К 300 мкл плазмы последовательно прибавляли 435 мкл денатурирующего буфера (6,75М ГИТЦ, 15 mM Трис-ацетат, pH 6,5, 0,75% (w/v) Sarkosyl, 1,5% 2-меркаптоэтанол) и 73 мкл 2М ацетата натрия, pH 4,0, перемешивая на Vortex. К полученной смеси добавляли 735 мкл насыщенного водой фенола и перемешивали инверсией пробирки. Для разделения водной и органической фаз прибавляли 150 мкл смеси хлороформ : изоамиловый спирт (49:1), перемешивали встряхиванием в течение 10 сек и инкубировали на

льду в течение 15 мин. Для завершения разделения фаз полученную смесь центрифугировали с ускорением 10000g в течение 20 мин при 4°C.

Верхнюю водную фазу отбирали и переносили в новую пробирку. Объем получаемой водной фазы приблизительно равнялся суммарному объему плазмы и денатурирующего буфера (в данном случае 735 мкл). К водной фазе прибавляли равный объем этанола и наносили на колонку со стекловолкнистым фильтром (ООО БиоСилика, Новосибирск, Россия) при помощи вакуумного насоса. Проскок удаляли. Колонку дважды промывали буфером (4 М ГИТЦ, 10 мМ трис-ацетат, 50% этанол, 1% 2-меркаптоэтанол) на настольной центрифуге Heraeus Pico 17 при 400g, 1 мин. После второй смены отмывки колонку центрифугировали при 17000g, 1 мин. Затем колонку дважды промывали буфером (10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 0,1 М NaCl, 75% этанол) при 400g, 1 мин. После второй смены отмывки колонку центрифугировали при 17000g, 1 мин. Для элюции рибонуклеиновых кислот колонку инкубировали 120 мкл раствора для элюции РНК (ООО БиоСилика) в течение 10-15 мин при комнатной температуре. Элюат собирали последовательным центрифугированием при 400g, 1 мин и при 10000g, 1 мин.

2.2.4. Переосаждение РНК изопропанолом

К препарату РНК объемом 120 мкл прибавляли 2 мкл гликогена (20 мг/мл), 12 мкл 3 М ацетата натрия, pH 7,5 и перемешивали на Vortex. К полученному раствору прибавляли 132 мкл изопропанола, тщательно перемешивали, инкубировали в течение 30 мин при -20°C и центрифугировали при 12000g, 10 мин при 4°C. Супернатант удаляли декантацией. Осадок последовательно промывали 75% и 96% этанолом на 7500g, 5 min при 4°C, супернатант удаляли. После второй отмывки осадок сушили на воздухе и растворяли в воде.

2.2.5. Получение и работа с ³²P-мечеными рибоолигонуклеотидами

Радиоактивный изотоп фосфора вводили в синтетический рибоолигонуклеотид по последовательности hsa-miR-21-5p при помощи T4 полинуклеотид киназы в реакции обменного кинирования как описано ранее [571]. Для этого 0,2 о.е. рибоолигонуклеотида инкубировали с 5 ед. T4 полинуклеотид киназы в буфере 50 мМ трис-HCl (pH 7,6 при 25°C), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ ДТТ, 0,1 мМ спермидин, 0,1 мМ ЭДТА в присутствии 14 мБк [γ -³²P]-АТФ. После инкубации реакционной смеси в течение 1 часа при 37°C добавляли 5 ед. T4 полинуклеотид киназы и инкубировали реакционную смесь при -20°C в течение 10-12 часов.

Радиоактивно-меченый рибоолигонуклеотид очищали при помощи гель-электрофореза в 16%-ном полиакриламидном геле (30:1, акриламид:бисакриламид) с 8М мочевиной. Положение продукта реакции в геле определяли при помощи радиоавтографии. Радиоактивно меченые

рибоолигонуклеотиды переносили из геля на ДЕАЕ-целлюлозу методом электроэлюции (200 В, 1 час), элюировали пятью сменами по 20 мкл 3М перхлората лития в воде, осаждали 10-кратным избытком 2%-ного раствора перхлората лития в ацетоне (5 мин, 14000 г). Полученный осадок промывали дважды ацетоном и высушивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Меченый рибоолигонуклеотид растворяли в 30 мкл воды. Концентрацию определяли при помощи спектрофотометра.

В экспериментах использовали смесь радиоактивно меченого и немеченого рибоолигонуклеотида в соотношении 1:9. После приготовления смесь хранили на льду и добавляли в образцы для выделения после внесения 2-меркаптоэтанола и денатурирующего агента в количестве 100 нмоль на 100 мкл образца.

Радиоактивность препаратов измеряли при помощи счета по Черенкову на счетчике β -частиц Tri-Carb 2800 TR против контрольных образцов содержащих равное количество рибоолигонуклеотида, разбавленное в равном объеме соответствующего раствора (буфер для отмывки, буфер для элюции, вода).

2.2.6. Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени.

Концентрацию микроРНК в препаратах определяли при помощи количественной TaqMan-ПЦР после обратной транскрипции с использованием петлевых праймеров, как описано в работе Chen с соавторами [553]. Нуклеотидные последовательности праймеров для обратной транскрипции представлены в таблице 2.

Каждая реакция обратной транскрипции объемом 20 мкл содержала 7 мкл препарата РНК, 50 нМ каждого специфичного ОТ-праймера, 1 ед. акт. ингибитора рибонуклеаз RiboLock, 100 ед. акт. обратной транскриптазы вируса лейкоза мышей M-MLV-RT, 4 мкл 5-ти кратного буфера (250 мМ трис-НСl, рН 8,3 при 25°C, 250 мМ КСl, 20 мМ MgCl₂, 50 мМ ДТТ), 0,25 мМ каждого нуклеотид трифосфата. Реакцию проводили в термоциклере TProfessional в следующих условиях: 16°C – 30 мин, 42°C – 30 мин, 70°C – 10 мин. Полученные препараты кДНК хранили при 4°C не более 1 ч.

Количественную TaqMan-ПЦР в реальном времени проводили в общем объеме 30 мкл, содержащем 2,5 мкл кДНК, 1,25 ед. акт. Таq ДНК полимеразы, 3 мкл 10х ПЦР буфера (750 мМ трис-НСl, рН 8.8 при 25°C, 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) Tween 20), 4 мМ MgCl₂, 0,25 мМ каждого нуклеотид трифосфата, 600 нМ микроРНК-специфичного прямого праймера, 800 нМ универсального обратного праймера и 300 нМ специфического TaqMan-зонда. После прогревания реакционной смеси 95°C, 3 мин, проводили 50 циклов: 95°C - 15 сек; 60°C - 60 сек. Реакции проводили в амплификаторах iCycler iQ5 и LightCycler 480 II. Значения

порогового цикла (C_q) вычисляли при помощи программного обеспечения производителя прибора как точку пересечения кривой амплификации с уровнем фона.

2.2.7. Определение профиля экспрессии микроРНК плазмы крови

Препараты микроРНК получали из 600 мкл плазмы крови при помощи однофазного протокола, переосаждали изопропанолом, сушили полученные осадки на воздухе и хранили при -20°C. Наличие микроРНК во всех образцах проверяли при помощи количественной ОТ-ПЦР (miR-16 и miR-126 для профилирования; miR-23a и miR-451a для верификации). Образцы отправляли для анализа в Qiagen Services (Ведбаек, Дания) на сухом льду.

Экспрессию микроРНК в образцах определяли при помощи miRCURY LNA miRNA qPCR (Qiagen, Ведбаек, Дания). Непосредственно перед анализом осадки растворяли в 60 мкл воды. Из полученного раствора 7 мкл использовали в качестве матрицы в реакции обратной транскрипции (V=35 мкл) при помощи miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit (Qiagen, Ведбаек, Дания). Препараты кДНК разбавляли водой в 50 раз и определяли концентрацию при помощи количественной ПЦР с помощью заранее подготовленных наборов праймеров (microRNA Ready-to-Use PCR, Serum/Plasma Focus Panel для 179-ти микроРНК или специально разработанная панель праймеров для 19-ти микроРНК, таблица 4) и ExiLENT SYBR® Green master mix (Qiagen, США). В качестве отрицательного контроля обратную транскрипцию проводили в отсутствие РНК-матрицы. Количественную ПЦР в реальном времени проводили на системе LightCycler 480. Данные, полученные в результате профилирования доступны в открытом репозитории ArrayExpress (accession E-MTAB-6304).

Таблица 4. Состав панелей для определения экспрессии микроРНК

Панель для профилирования (179 микроРНК)					
hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-92a-3p	hsa-let-7b-5p	hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-339-5p
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-16-2-3p	hsa-miR-423-3p	hsa-miR-425-3p	hsa-miR-584-5p
hsa-miR-16-5p	hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-629-5p	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-204-5p
hsa-miR-25-3p	hsa-miR-378a-3p	hsa-miR-590-5p	hsa-let-7d-3p	hsa-miR-421	hsa-miR-182-5p
hsa-miR-93-5p	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-33a-5p	hsa-miR-154-5p
hsa-miR-451a	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-652-3p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-1
hsa-miR-192-5p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-374b-5p	hsa-miR-22-5p	hsa-miR-551b-3p
hsa-miR-194-5p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-152	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-93-3p	hsa-miR-501-3p
hsa-miR-32-5p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-497-5p	hsa-let-7b-3p	hsa-miR-382-5p
hsa-miR-185-5p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-197-3p	hsa-miR-29a-5p	hsa-miR-326
hsa-miR-24-3p	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-210	hsa-miR-10a-5p
hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-320b	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-200a-3p
hsa-miR-424-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-99a-5p	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-502-3p	hsa-let-7i-3p

hsa-miR-29a-3p	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-128	hsa-miR-361-3p
hsa-let-7i-5p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-328	hsa-miR-409-3p
hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-150-5p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-99b-5p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-190a
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-144-5p	hsa-let-7d-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-127-3p
hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-425-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-301a-3p	hsa-miR-365a-3p	hsa-miR-543
hsa-miR-148b-3p	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-18a-3p	hsa-miR-766-3p
hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-122-5p	hsa-let-7c	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-133a	hsa-miR-331-3p
hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-215	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-136-5p	hsa-miR-223-5p	hsa-miR-29b-2-5p
hsa-miR-223-3p	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-130b-3p	hsa-miR-376a-3p	hsa-miR-500a-5p
hsa-miR-320a	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-532-5p	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-375	hsa-miR-296-5p
hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-363-3p	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-485-3p
hsa-miR-107	hsa-miR-186-5p	hsa-miR-205-5p	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-95	hsa-miR-605
hsa-miR-101-3p	hsa-miR-15b-3p	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-495-3p
hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-20a-3p	hsa-miR-92b-3p
hsa-miR-144-3p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-151a-3p	hsa-let-7e-5p	hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-346
hsa-miR-142-5p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-133b	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-2110	hsa-miR-208a
hsa-let-7g-5p	hsa-miR-660-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-505-3p	hsa-miR-106b-3p	
Панель для верификации (19 микроРНК)					
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-363-3p	hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-107	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-210-3p
hsa-miR-25-3p	hsa-miR-150-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-22-5p	hsa-miR-215-5p
hsa-miR-144-5p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-133a-3p	hsa-miR-133b
hsa-miR-338-3p					

2.2.8. Статистика и методы анализа данных

Для анализа данных использовали программное обеспечение MedCalc (Ostend, Бельгия) и язык программирования R (v3.2.3-3.4.2) в оболочке Rstudio (<https://www.rstudio.com/>).

В случае если не указан иной метод нормализации, данные ОТ-ПЦР нормализовали на уровень экспрессии miR-16 путем вычитания значений порогового цикла по формуле $dCq(X) = Cq(X) - Cq(miR-16)$, где X – анализируемая микроРНК.

Сравнения между группами проводили при помощи Т-теста (Стьюдента или Уэлча) или однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA). Для сравнения парных образцов использовали тест Манна-Уитни-Вилкоксона. Для сравнения более двух групп использовали одно- или двухфакторный дисперсионный анализ (One-way или Two-way ANOVA). Для оценки изменения концентрации микроРНК во времени использовали дисперсионный анализ с повторными измерениями (repeated measures ANOVA). Диагностические характеристики определяли при помощи ROC-кривых (Receiver Operating Characteristic). Оптимальное пороговое значение критерия (cut-off) вычисляли через индекс Йюдена (J-statistic, Youden's index). Анализ выживаемости проводили при помощи метода Каплана-Мейера и логарифмического рангового критерия (Logrank). Для поправки на множественность

измерений использовали метод Бенджамини-Хочберга. Тесты считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

2.2.9. Статистический анализ данных профилей циркулирующих микроРНК плазмы крови на платформе Exiqon

Первичную обработку данных профилирования микроРНК проводили в Exiqon Services по разработанному производителем протоколу (Exiqon, Дания). Полученные кривые амплификации и плавления анализировали при помощи программного обеспечения Roche LC (Roche, Швейцария). Значения порогового цикла (C_q) вычисляли по методу вторых производных [572]. Для определения эффективности амплификации использовался алгоритм, созданный по образцу метода, используемого в программном обеспечении LinRegPCR [573,574]. Для подтверждения специфичности амплификации форму кривых плавления и температуру плавления продуктов реакции сверяли со стандартными для метода величинами, определенными ранее. Все образцы со значениями $C_q > 37$, и точки, в которых разница C_q между специфичным продуктом и отрицательным контролем не превышала 5 циклов, исключали из анализа.

Стабильность экспрессии микроРНК в образцах определяли при помощи алгоритма NormFinder [575]. Для полученного набора данных наиболее подходящим нормализатором является усредненный уровень экспрессии всех микроРНК в образцах (глобальное среднее) (таблица 5) [576]. Таким образом, относительная экспрессия каждой микроРНК в образце вычисляется согласно формуле: $dCq(X) = Cq(X) - Cq(\text{глобальное среднее})$, где X – анализируемая микроРНК.

Таблица 5. Оценка стабильности экспрессии микроРНК в плазме крови при помощи алгоритма Normfinder

МикроРНК	Показатель стабильности
Глобальное среднее	0,00300
hsa-miR-107	0,00867
hsa-miR-92a-3p	0,00976
hsa-miR-142-5p	0,01004
hsa-miR-101-3p	0,01061
hsa-let-7g-5p	0,01098
hsa-miR-320a	0,01131
hsa-miR-106a-5p	0,01161
hsa-miR-103a-3p	0,01199
hsa-miR-424-5p	0,01211

Для построения парных отношений микроРНК вычисляли разность значений порогового цикла каждой микроРНК с каждой из остальных микроРНК в образце без повторений по формуле: $dCq(Xij) = Cq(Xi) - Cq(Xj)$, где Xi и Xj – микроРНК с порядковыми номерами i и j , причем $1 \leq i \neq j \leq 139$.

Для всех микроРНК экспрессированных хотя бы в трех образцах в каждой группе были выполнены Т-тесты или тесты Вилкоксона (в зависимости от нормальности распределения данных по критерию Шапиро-Вилка) и χ^2 -тесты. Для установления общих тенденций группировки образцов по профилю экспрессии внеклеточных микроРНК для 47-ти микроРНК с наибольшими значениями стандартного отклонения проводили неконтролируемый кластерный анализ и анализ методом главных компонент.

2.2.10. Построение моделей при помощи LASSO-пенализованной логистической регрессии.

Для выбора минимальных наборов микроРНК и построения предсказательных моделей использовали LASSO-пенализованную логистическую регрессию [577]. Операции проводили при помощи языка программирования R (v3.2.3-3.4.2) в оболочке Rstudio (<https://www.rstudio.com/>). Коэффициент регуляризации L1 (лямбда 1) определяли при помощи k-мерной кросс-валидации (перекрестной проверки). Для предотвращения переобучения модели проводили оптимизацию L1 при помощи генерации 2000 повторных выборок методом bootstrap. В каждой выборке данные были случайно разделены на *обучающую* и *тестовую группы* в соотношении 2:1. Эффективность модели построенной на основе *обучающей группы* оценивали на данных *тестовой группы* и записывали площадь под ROC-кривой и показатель Бриера (среднеквадратичную ошибку). Оптимальным считали значение L1, соответствующее наименьшему значению показателя Бриера. Важность переменных (ВП) для каждой переменной определяли путем подсчета доли bootstrap моделей, в которых эта переменная имела ненулевой коэффициент. Финальную модель строили на основе всех данных используя оптимальное значение L1.

2.2.11. Получение и работа с данными проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA).

Для сравнительного анализа экспрессии данных экспрессии микроРНК в опухолях легкого использовали данные исследования по изучению молекулярного профиля ПКРЛ в рамках The Cancer Genome Atlas (TCGA-LUSC) . Данные секвенирования микроРНК в 44 парных образцах опухолевой ткани и прилежащей здоровой ткани легкого пациентов с ПКРЛ были получены из хранилища данных Genomic Data Commons Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) при помощи R v.3.4.2 (пакет функций TCGABiolinks) в оболочке

Rstudio [578]. Данные об экспрессии 1881 пре-микроРНК и 2027 зрелых микроРНК (разные изоформы объединяли) были аннотированы согласно miRBase v21 и UCSC и представлены в виде прочтений на миллион картированных прочтений микроРНК (RPM, reads per million mapped miRNA reads) как описано ранее [579].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Разработка метода получения препаратов микроРНК из плазмы крови

Получение высококачественных препаратов микроРНК из биологических жидкостей является одним из ключевых этапов пробоподготовки при разработке диагностических систем. Известно, что циркулирующие в крови микроРНК заключены в мембранные частицы или находятся в комплексах с белками и липопротеинами [214,227,263]. Такие комплексы не только защищают микроРНК от гидролиза, но и препятствуют ее связыванию с сорбентом. В предварительных экспериментах было показано, что использование такого сильного хаотропного агента как гуанидин изотиоцианат для разрушения таких комплексов не приводит к их диссоциации даже в присутствии восстановителя дисульфидных связей 1% 2-меркаптоэтанола. Основную роль в поддержании стабильности липо- или гликопротеиновых комплексов, содержащих микроРНК, по-видимому, играют гидрофобные взаимодействия. Помимо этого, выделение микроРНК из крови также осложняется высокой активностью РНК-гидролизующих ферментов, высокой концентрацией несвязанных с микроРНК биополимеров, в том числе белковой природы, а также наличием молекул, способных ингибировать ферменты, используемые для количественного анализа нуклеиновых кислот. Таким образом, для получения препаратов циркулирующих микроРНК крови необходимо разрушить их комплексы с другими биополимерами или надмолекулярными комплексами, при этом обеспечить сохранность микроРНК в свободной форме, а затем количественно выделить микроРНК из раствора и максимально очистить препарат от примесей других биополимеров и ингибиторов ферментов.

Для решения этой проблемы был предложен протокол для выделения микроРНК из плазмы крови и других биологических жидкостей без применения фенол-хлороформной экстракции (далее *однофазный метод*). Метод основан на использовании систем растворителей, схожих ранее использованными в классической работе Folch с соавторами для экстракции и фракционирования липидов [580]. Сначала белковые и липопротеиновые комплексы в образце разрушают при помощи высокой концентрации гуанидин изотиоцианата (ГИТЦ) в присутствии ингибитора РНКазной активности (2-меркаптоэтанол). Оставшие комплексы микроРНК, сформированные за счет гидрофобных взаимодействий разрушают в системе растворителей этанол:хлороформ:вода (2:1:1). Полученный раствор наносят на микроколону с силикатным носителем в условиях, оптимальных для связывания коротких РНК – 1М гуанидин изотиоцианат, 50% этанол [581]. После серии отмывок с колонки элюируют препарат микроРНК.

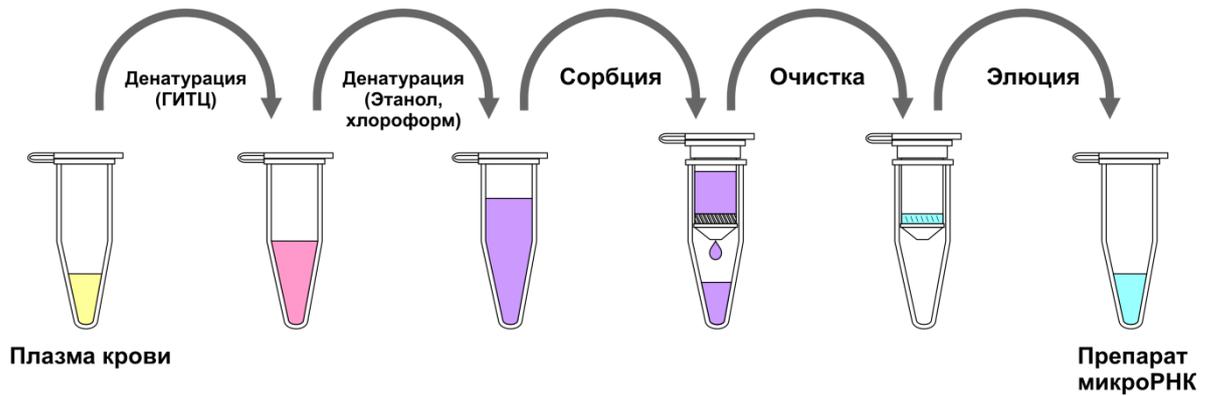


Рис 1. Схема однофазного протокола для выделения микроРНК из крови.

Сначала была определена оптимальная для денатурации комплексов и связывания микроРНК с сорбентом концентрация ГИТЦ. Для этого радиоактивно меченый синтетический рибоолигонуклеотид последовательности miR-21 добавляли в образцы плазмы (100 мкл) крови здоровых доноров ($n=10$) в количестве 100 нмоль, а затем выделяли микроРНК при помощи однофазного метода с использованием разных концентраций гуанидин изотиоцианата (таблица 6). Для сравнения параллельно проводили выделение того же количества рибоолигонуклеотида при помощи экстракции кислым фенол-хлороформом, а в качестве контроля использовали препарат РНК полученный при выделении рибоолигонуклеотида из водного раствора. Остаточную радиоактивность определяли в формируемых на промежуточных стадиях выделения микроРНК осадках (однофазный метод), органической фазе (фенол-хлороформная экстракция), проскоке, на поверхности сорбента в колонке и в элюате (готовый препарат микроРНК) против контрольного раствора радиоактивно-меченого рибоолигонуклеотида.

Таблица 6. Остаточная радиоактивность фракций на разных стадиях выделения микроРНК

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

*Данные представлены как среднее±SD по результатам 10 независимых повторов. Образцы плазмы были от разных здоровых доноров.

**Остаточная радиоактивность микроколонки

***В отсутствие плазмы осадок не формировался

Наибольшая эффективность выделения микроРНК достигалась при использовании на первой стадии диссоциации РНК-содержащих комплексов 4М ГИТЦ. При более низкой

концентрации ГИТЦ в водно-органическом растворе формировался обширный полупрозрачный гелеобразный осадок, в котором задерживалась значительная (>60%) часть рибоолигонуклеотида. Выход микроРНК при использовании однофазного метода составил 72,5% и 54,9% при выделении из водного раствора и плазмы крови, соответственно. Для сравнения при экстракции кислым фенол-хлороформом эффективность выделения составляла 56,4% и 40,9%, что позволяет утверждать, что однофазный метод более эффективен.

Измерение радиоактивно-меченого рибоолигонуклеотида по Черенкову является точным методом, позволяющим напрямую оценивать количество микроРНК во всех получаемых фракциях, однако не позволяет оценить стабильность микроРНК в процессе выделения, т.е. эффективность ингибирования РНКаз в используемых растворах. Сохранность молекул микроРНК оценивали при помощи ОТ-ПЦР препаратов РНК после выделения из образцов плазмы здоровых доноров (n=5) с добавленным рибоолигонуклеотидом. Предварительные исследования показали, что концентрация эндогенной miR-21 в плазме крови составляет не более 0,1% внесимого количества и не вносит существенной погрешности в результат измерения. Результаты представлены на рисунке 2А. Полученные данные подтверждают высокую эффективность однофазного протокола выделения микроРНК и косвенно указывают на отсутствие в образцах ингибиторов ферментов, используемых в обратной транскрипции и ПЦР.

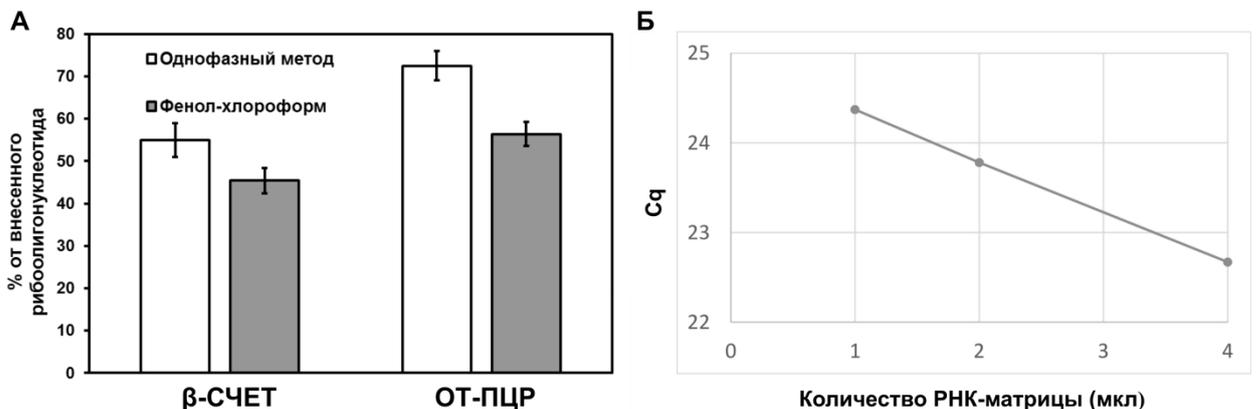


Рис 2. (А) Эффективность выделения рибоолигонуклеотида из плазмы крови при помощи однофазного метода и экстракции фенол-хлороформом. Данные от 5 биологических повторов представлены в виде % от внесенного рибоолигонуклеотида. (Б) Пример кривой разбавления стартового количества на стадии ОТ. По вертикальной оси отложены значения порогового цикла ОТ-ПЦР на miR-16. Стандартное отклонение не превышало 0,2 цикла по сумме 10 независимых экспериментов.

Для прямого подтверждения отсутствия ингибиторов ферментативных реакций был использован стандартный подход – определение количества микроРНК в образцах, полученных серийным разведением выделенного из плазмы крови препарата циркулирующей микроРНК. Было выполнено сравнение результатов ОТ-ПЦР препаратов эндогенной РНК, полученной после выделения однофазным методом из плазмы крови и при помощи экстракции фенол-хлороформом, разведенных в 2 и 4 раза. Линейный характер кривой разведения свидетельствует об отсутствии ингибиторов в образцах РНК (рисунок 2Б). Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что разработанный метод позволяет получать образцы микроРНК пригодные для последующего анализа с эффективностью, не уступающей существующим методам.

Для того чтобы сравнить эффективность методов выделения эндогенных микроРНК, микроРНК выделяли из парных образцов плазмы крови здоровых доноров ($n=10$, $V=300$ мкл) при помощи однофазного протокола и экстракции фенол-хлороформом. Концентрацию трех микроРНК (miR-16, miR-21, miR-126) в полученных образцах определяли при помощи ОТ-ПЦР. Результаты, представленные в таблице 7, демонстрируют сходство значений порогового цикла (C_q) для обоих методов. Статистические различия между методами отсутствовали ($p>0,05$).

Таблица 7. Значения порогового цикла (C_q) для эндогенных микроРНК при выделении разными методами.

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

*Данные представлены как среднее \pm SD по результатам 10 независимых повторов.

Поскольку микроРНК могут циркулировать в крови в различной форме, необходимо подтвердить, что разработанный метод способен эффективно освободить микроРНК из всех видов циркулирующих комплексов и частиц, и позволяет выделять полный набор циркулирующих микроРНК. Для этого препараты РНК выделяли из плазмы крови здоровых доноров ($n=50$, $V=300$ мкл) и проводили ОТ-ПЦР на 7 микроРНК, часть из которых встречается не только в циркулирующих нуклеопротеиновых комплексах, но и в экзосомах крови (таблица 8) [263,287,582].

Таблица 8. Значения порогового цикла (Cq) для эндогенных микроРНК, выделенных из плазмы крови.

Значение	miR-16*	miR-19b	miR-25	miR-205	miR-125b	miR-21	miR-126
Среднее Cq	21,11	24,53	26,87	33,80	32,70	28,60	25,52
Cq SD	2,20	2,79	1,21	0,51	1,83	1,80	2,04

*Данные представлены как среднее±SD по результатам 50 независимых повторов.

Как видно из таблицы 8 значения порогового цикла для всех микроРНК лежат в пределах от 18 до 35, что обычно считается уровнем уверенной детекции (образцы с Cq>35-37 исключаются из дальнейшего анализа). Все образцы, полученные при помощи однофазного протокола, соответствовали этому критерию и пригодны для анализа при помощи ОТ-ПЦР. Кроме того, полученные значения согласуются с литературными данными. Так, Ну с соавторами приводят значение Cq 22 для miR-16 после выделения из плазмы здоровых доноров [583]. В работе Shen с соавторами значения Cq для miR-16 и miR-126 составляли ~20 и 28, соответственно [483]. В обеих работах РНК выделяли при помощи набора miRVana (Life Technologies, Карлсбад, USA). Значения Cq для miR-126 и miR-25 в работе Sanfiorenzo с соавторами составляли 24-24,5; для выделения использовался набор miRNeasy (QIAGEN, США) [489]. Liu и другие получили значение 32 Cq для miR-205 [584]. Markou с соавторами приводят среднее значение dCq miR-21 к miR-16 равное 5 [585]. С учетом различий в эффективности выделения РНК и ОТ-ПЦР, а также разбавлений образца в ходе анализа литературные данные хорошо согласуются с полученными нами результатами.

Таблица 8. Сравнительные характеристики однофазного метода и фенол-хлороформной экстракции.

Этап	Фенол-хлороформ	Время, мин	Однофазный метод	Время, мин
Денатурация	+	15	+	5
Экстракция	+	20	-	-
Фракционирование	+	1	-	-
Нанесение на сорбент	+	3	+	3
Отмывка	+	5	+	5
Элюция	+	5	+	5
Общее время выделения (без переосаждения)		99 (49)		68 (18)

Приведенные данные и данные таблицы 8, позволяют утверждать, что разработанный однофазный метод эффективно выделять микроРНК из всех комплексов, содержащих микроРНК в крови, со сравнимой эффективностью и большей скоростью, чем метод экстракции кислым фенол-хлороформом. Полученные данные демонстрируют, что однофазный метод может быть использован для получения препаратов эндогенных микроРНК из плазмы крови,

причем получаемые препараты микроРНК пригодны для анализа при помощи высокоточных методов, таких как ОТ-ПЦР и микрочиповый анализ и массовое параллельное секвенирование. Все препараты микроРНК плазмы крови использованные в работе далее были получены при помощи разработанного метода.

3.2. Исследование экспрессии опухолеспецифических микроРНК в крови

3.2.1. Выбор панели микроРНК

Из литературных данных известно, что в крови больных РЛ присутствуют онкоспецифичные микроРНК, отражающие фенотип клеток опухоли, наличие которых коррелирует с развитием заболевания. Такие микроРНК могут быть использованы для разработки диагностических систем на РЛ, а поиск микроРНК–онкомаркеров может быть выполнен как при помощи массовых методов анализа экспрессии циркулирующих микроРНК больных и здоровых доноров (рациональный подход), так и при помощи анализа существующих литературных данных (иррациональный подход). В связи с гетерогенностью опухолей и природой микроРНК неоправданно надеяться на то, что один маркер будет экспрессирован у всех больных РЛ, поэтому в современных диагностических системах обычно используют панели маркеров, наиболее часто обнаруживаемые у больных исследуемой группы. На первом этапе настоящего исследования на основе литературных данных была выбрана панель из 7-ми перспективных микроРНК маркеров (таблица 9) для их верификации с использованием разработанного метода выделения микроРНК из крови.

Таблица 9. Мишени и функции выбранных микроРНК.

МикроРНК	Известные мишени и функции*	Сведения об экспрессии в крови
miR-21	Онкомир, регулирует гены, вовлеченные в апоптоз и ангиогенез (PTEN, PDCD4, TPM1, SPRY1, SPRY2, BTG2)	[483,585–588]
miR-19b	Онкомир, активирует пролиферацию и ангиогенез (TP53, BCL2, PTEN, Prkaa-1, CDKN1A/p21, PDCD4)	[496,517,589]
miR-25	Онкомир, подавляет экспрессию регуляторов апоптоза и клеточного цикла (BCL2L11, CDKN1C)	[487,489]
miR-183	Онкомир, регулирует сигнальные пути и гены, способствующие миграции и инвазии опухолевых клеток (EGR1, PTEN, Ezrin)	[465,588,590]
miR-125b	Онкомир или онкосупрессор, регулирует клеточный цикл и апоптоз (p53, BAK и erbB2-3)	[591,592]
miR-126	Онкосупрессор, регулирует экспрессию ряда протоонкогенов (KRAS, p38, VEGF-A, DNMT1).	[483,489,585,588]
miR-205	Регулирует ряд генов, отвечающих за рост и дифференцировку клеток эпителия (PTEN, PHLPP, ERBB3, SMAD4)	[483,587,588]

*Согласно miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)

Включенные в панель микроРНК регулируют ключевых участников как минимум одного из основных онкогенных сигнальных путей, вовлеченных в онкогенез РЛ, изменение их концентрации в опухолевой ткани и крови при РЛ может быть достоверно определено при помощи количественной ОТ-ПЦР, и существует возможность их применения в качестве маркеров для ранней диагностики, прогнозирования течения заболевания, мониторинга лечения, а также маркеров для мониторинга статуса опухолевого процесса на стадии ремиссии с целью раннего выявления рецидивов. Следует отметить, что процедура выделения микроРНК является принципиальным компонентом диагностической системы (наряду с аналитической системой и алгоритмом анализа данных), поскольку этот этап пробоподготовки образца для анализа определяет представленность и концентрацию микроРНК в образце, которые зависят от состава крови, особенностей циркуляции исследуемых микроРНК, индивидуальных особенностей донора и т.д. Таким образом, дополнительной целью этого этапа исследования являлась проверка пригодности разработанного однофазного метода выделения микроРНК для анализа диагностических маркеров.

Для определения уровня экспрессии выбранных микроРНК были разработаны системы для количественной ОТ-ПЦР с TaqMan-зондами. Разработанные системы обладали чувствительностью от 10 до 100 копий микроРНК и динамическим диапазоном от 10^2 до 10^8 копий в пересчете на кДНК. Относительная погрешность ПЦР анализа составляла не более $\pm 9,4\%$. Концентрация микроРНК была определена в препаратах РНК, полученных при помощи однофазного метода из образцов плазмы крови здоровых доноров, первичных больных РЛ, а

также образцов больных РЛ на разных стадиях комбинированной неоадьювантной терапии и после оперативного вмешательства.

3.2.2. Нормализация данных ОТ-ПЦР

Для нормализации данных ОТ-ПЦР использовали уровень экспрессии miR-16. Несмотря на данные о том, что ее уровень может изменяться при ряде патологических состояний и является чувствительным к гемолизу [485], эта микроРНК является одним из часто используемых нормализаторов при исследовании циркулирующих микроРНК в крови в том числе и в части исследований, указанных в таблице 9. Кроме того при отсутствии надежных стратегий нормализации экспрессии циркулирующих микроРНК, наиболее оптимальный способ нормализации данных может быть выбран только в процессе исследования, когда доступна информация о стабильности большего количества микроРНК. Для того, что уменьшить потенциальный эффект ненадежного нормализатора на результаты исследования были проведены предварительные тесты стабильности экспрессии miR-16, которые показали, что рамках данного исследования уровень ее экспрессии достоверно не отличался между исследуемыми группами и оставался относительно стабильным внутри групп (таблицы 10 и 11). Статистически достоверных различий экспрессии miR-16 как между группами больных РЛ и здоровых доноров ($P=0,2910$), так и между группами пациентов с диагнозами АКЛ и ПКРЛ ($P=0,8775$) выявлено не было. В группе мониторинга терапии экспрессия miR-16 оставалась стабильной на протяжении комбинированной противоопухолевой терапии.

Таблица 10. Экспрессия miR-16 в образцах плазмы крови разных групп пациентов

Пара сравнения	1 группа Медиана \pm SD (Разброс)	2 группа Медиана \pm SD (Разброс)	P (тест Манна-Уитни)
ЗД (n=50) РЛ (n=75)	21,1 \pm 2,56(16,4-24,7)	20,8 \pm 2,03(17,6-25,8)	0,2910
ПКРЛ (n=53) АКЛ (n=18)	20,85 \pm 2,00(17,7-25,5)	20,78 \pm 2,08(19,1-24,9)	0,8775

Таблица 11. Экспрессия miR-16 в образцах плазмы крови больных РЛ до и после лечения

Пара сравнения	Среднее разницы пороговых циклов	SD	P (тест Манна-Уитни)
Перв-Хим	-0,758	0,549	0,5779
Хим-Опер	-0,267	0,541	1
Перв-Опер	-1,025	0,477	0,158

Перв - первичный, Хим – после химиотерапии, Опер - после операции

3.2.3. Зависимость экспрессии микроРНК от пола и возраста доноров

Известно, что концентрация микроРНК в крови может зависеть от физиологических факторов не связанных с какими-либо патологиями. В процессе исследования был выполнен анализ зависимости экспрессии микроРНК от известных демографических характеристик доноров. Достоверной корреляции с полом или возрастом больных РЛ не было выявлено ни для одной из микроРНК. Тем не менее, при формировании трех возрастных групп: младше 60 лет; 60-70 лет; старше 70 лет, было обнаружено, что уровни экспрессии miR-19b и miR-126 достоверно отличаются в этих группах (рисунок 3).

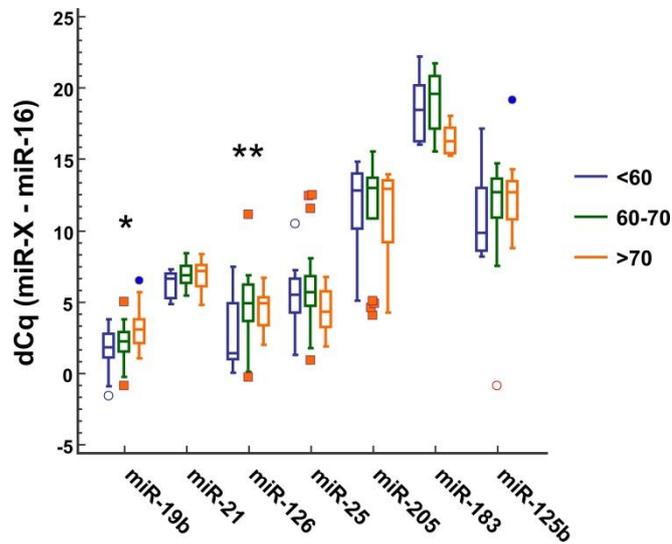


Рис 3. Экспрессия микроРНК в возрастных группах больных РЛ (<60 лет, 60-70 лет, >70 лет). Данные нормализованы на уровень экспрессии miR-16. *P=0.004; **P=0.007 (однофакторный дисперсионный анализ).

Средняя концентрация miR-19b была повышена в более возрастных группах, в то время как концентрация miR-126 изменялась колоколообразно, однако ее экспрессия в группах 60-70 лет и старше 70 лет отличалась незначительно.

3.2.4. Зависимость экспрессии микроРНК от клинико-патологических характеристик больных РЛ

Для того чтобы выявить связь уровней маркерных микроРНК в плазме крови с течением РЛ, зависимость между экспрессией микроРНК с объемом опухоли, локализацией (центральная или периферическая), гистологическим типом (ПКРЛ или АКЛ) и клинической стадией (в выборке были достоверно представлены II и III стадия) РЛ исследовали при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (Two-way ANOVA) (рисунок 4).

Связь экспрессии микроРНК с объемом и локализацией опухоли не была выявлена. Однако, существовало достоверное отличие уровня экспрессии miR-205 в плазме крови больных АКЛ и ПКРЛ ($P=0,022$), что коррелирует с ранее опубликованными данными о том, что уровень экспрессии miR-205 отличается при ПКРЛ и АКЛ [351,352,593]. В соответствие с полученными нами данными, характер различий в экспрессии этой микроРНК не предполагает высокой эффективности этой микроРНК как маркера для дифференциальной диагностики основных гистологических типов НМКЛ, что соответствует данным Vescovo с соавторами о том, что экспрессия этой микроРНК в ткани опухоли также не всегда является надежным маркером гистологического типа НМКЛ [594].

Кроме того, была выявлена слабая взаимосвязь между уровнем экспрессии miR-19b и гистологического типа НМКЛ и уровнем экспрессии miR-126 со стадией РЛ, однако эти данные не были статистически достоверны ($P=0,069$ и $P=0,083$, соответственно).

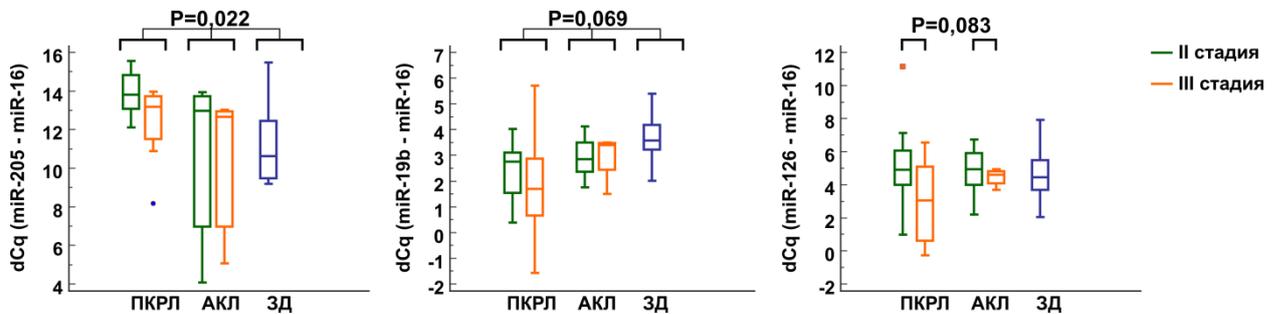


Рис 4. Зависимость экспрессии микроРНК от гистологического типа и стадии РЛ. Данные нормализованы на уровень экспрессии miR-16.

Следует отметить, что зависимость экспрессии микроРНК от стадии и возраста не является показательной и может частично объясняться неравномерной представленностью больных разных стадий в выделенных возрастных группах (рисунок 5).

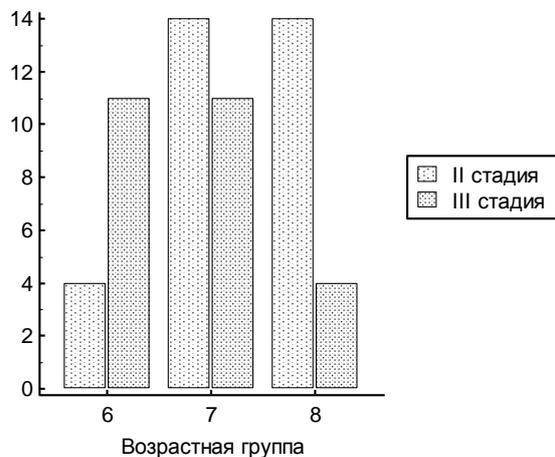


Рис 5. Частота встречаемости стадий РЛ в выборке.

Для того, чтобы точно установить такие взаимосвязи необходимы репрезентативные группы больных РЛ разных стадий, выровненные по возрасту, и соответствующие контрольные группы здоровых доноров.

3.2.5. Диагностическая ценность экспрессии микроРНК

Сравнение уровней экспрессии микроРНК между здоровыми донорами и больными раком легкого показало наличие четырех достоверно отличающихся по уровню экспрессии микроРНК (miR-19b, miR-21, miR-25, miR-183, $P < 0,05$) (рисунок 6). У больных РЛ была повышена концентрация miR-19b и miR-21, а концентрация miR-25 и miR-183 – наоборот понижена.

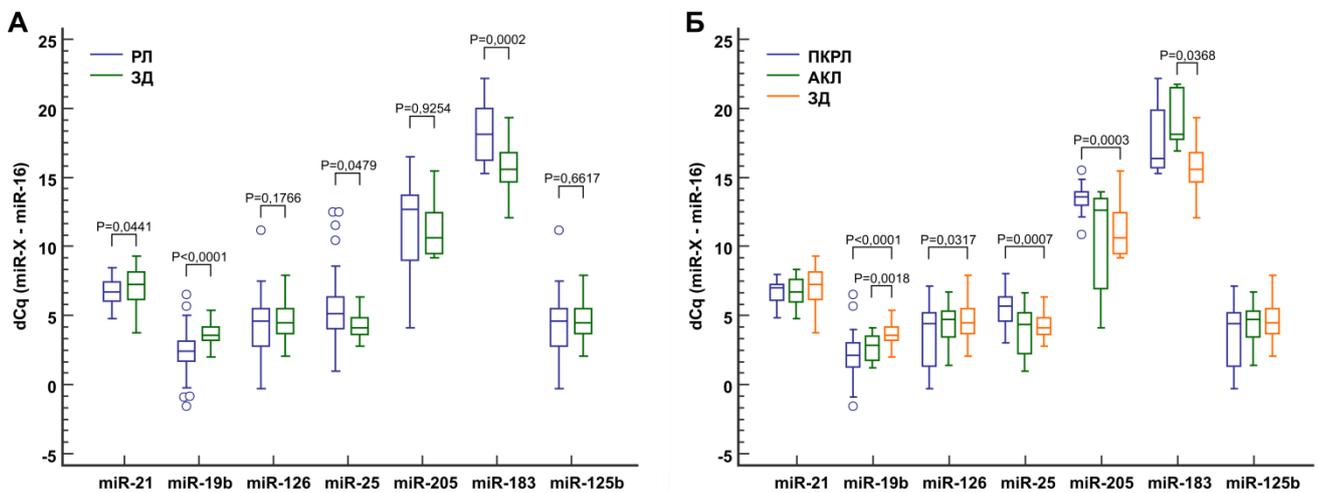


Рис 6. Экспрессия микроРНК в плазме крови больных НМКЛ и здоровых доноров. Данные нормализованы на уровень экспрессии miR-16. (А) Сравнение групп НМКЛ и ЗД.; (Б) Сравнение групп ПКРЛ, АКЛ и ЗД.

При этом амплитуда различий была существенна только для трех микроРНК – miR-19b (1,25), miR-25 (-1,09) and miR-183 (-2,49) (таблица 12). Профиль изменения уровней экспрессии микроРНК при АКЛ и ПКРЛ также отличался. Так по сравнению со здоровыми донорами при ПКРЛ была достоверно изменена экспрессия четырех микроРНК (miR-19b, miR-126, miR-25, miR-205), а при АКЛ – только двух (miR-19b, miR-183). Таким образом, среди исследованных микроРНК только концентрация miR-19b в плазме может служить универсальным маркером обоих исследуемых гистотипов НМКЛ.

Таблица 12. Разница экспрессии микроРНК между группами.

	ПКРЛ / ЗД			АКЛ / ЗД			РЛ / ЗД		
	ddCq	Разница*	P**	ddCq	Разница	P	ddCq	Разница	P
miR-21	0,36	1,29	0,2085	0,49	1,41	0,137	0,45	1,36	0,0441
miR-19b	1,45	2,72	<0,0001	0,87	1,82	0,0018	1,25	2,38	<0,0001
miR-126	0,97	1,95	0,0317	0,29	1,22	0,4936	0,50	1,41	0,1766
miR-25	-1,49	2,80	0,0007	-1,48	2,79	0,0839	-1,09	2,13	0,0479
miR-205	-2,23	4,69	0,0003	0,77	1,70	0,4224	0,07	1,05	0,9254
miR-183	-1,42	2,67	0,1253	-2,94	7,69	0,0368	-2,49	5,61	0,0002
miR-125b	0,83	1,77	0,1021	0,11	1,08	0,8357	0,20	1,15	0,6617

*Разница экспрессии микроРНК между фракциями вычисленная по формуле 2^{-ddCq}

**Т-тест Стьюдента или Уэлча.

Для того, чтобы определить диагностическую значимость различий в уровнях экспрессии микроРНК был проведен ROC-анализ (рисунок 7). Из всех микроРНК miR-19b обладает наибольшей предсказательной способностью для выявления больных с ПКРЛ (чувствительность 75%, специфичность 90,7%), и больных РЛ в целом (чувствительность 69%, специфичность 93%). Для выявления больных с АКЛ наиболее эффективным маркером оказалась miR-183 (чувствительность 100% при специфичности 81%).

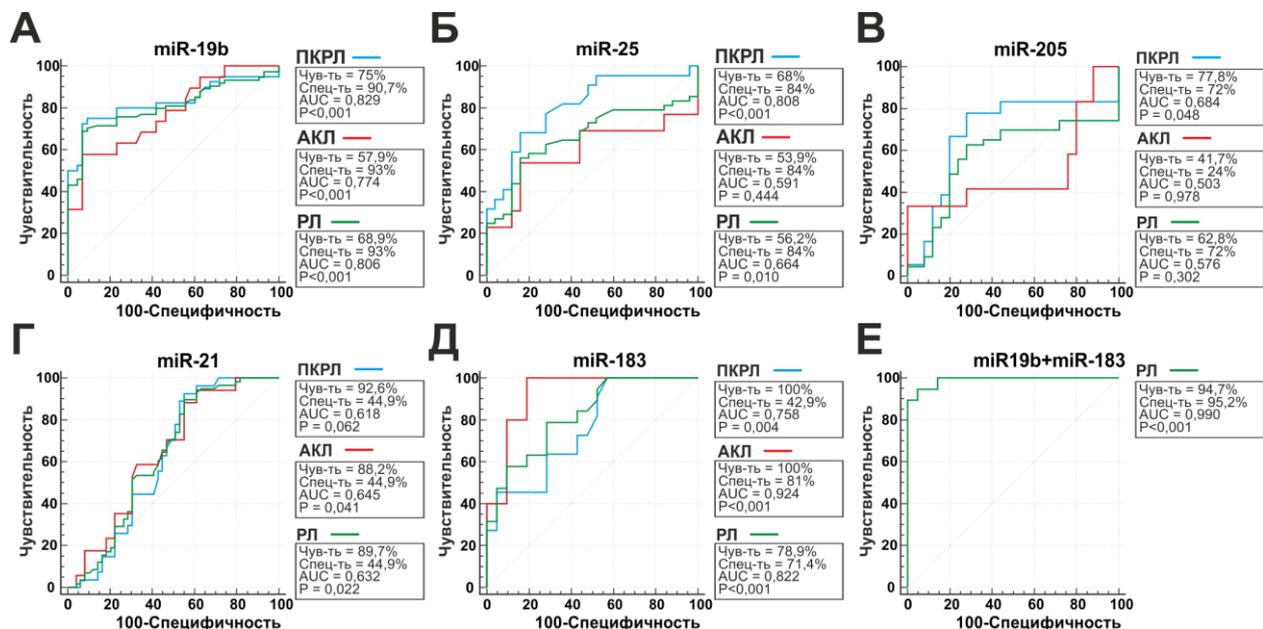


Рис 7. ROC-кривые диагностической значимости микроРНК. (А) – (Д) Отдельные микроРНК; (Е) Классификатор на основе бинарной логистической регрессии miR-19b и miR-183. На ROC-кривых представлены результаты разделения групп больных ПКРЛ, АКЛ или объединенной группы больных НМКЛ от группы здоровых доноров.

Комбинация маркеров, специфичных к разным особенностям РЛ является более эффективным диагностическим критерием. С помощью бинарной логистической регрессии и

последующего ROC-анализа было показано, что комбинация miR-19b и miR-183 является более сильным диагностическим критерием рака легкого в общей выборке больных РЛ и здоровых доноров. Полученный критерий позволил выявлять больных РЛ с чувствительностью 94,74% и специфичностью 95,24% (AUC: 0,990). Несмотря на высокую чувствительность и специфичность предложенной системы, необходимо отметить, что эти данные требуют верификации. Полученные данные позволяют оценить объем выборки при заданных условиях мощности статистических критериев и только масштабное исследование в четко определенных когортах доноров позволит установить реальную диагностическую ценность выявленных маркеров. Однако, неразумно рассчитывать, что система, состоящая из двух микроРНК-маркеров и нормализатора, уровень которого может колебаться в зависимости от ряда причин, может оказаться достаточно устойчивой для внедрения в клиническую практику.

3.2.6. МикроРНК как маркеры мониторинга эффективности противоопухолевой терапии

В результате противоопухолевой терапии происходит активное разрушение опухолевых клеток и клеток микроокружения, изменение клонального состава опухоли и изменение фенотипа клеток опухоли, сопровождающиеся изменением экспрессии микроРНК в клетках опухоли и крови больных РЛ [595–597]. Такие изменения могут служить индикатором эффективности терапии и могут быть использованы для мониторинга возможного рецидива заболевания, однако на данный момент эта область остается мало исследованной. На сегодняшний день, опубликовано относительно немного исследований, в которых авторы изучали изменение уровней циркулирующих микроРНК в ответ на противоопухолевую терапию РЛ [507,517–519].

Для исследования динамики изменения уровня экспрессии микроРНК в плазме больных раком легкого в ходе комбинированной противоопухолевой терапии была исследована экспрессия 5-ти микроРНК (miR-19b, miR-25, miR-205, miR-125b, miR-126) при помощи ОТ-ПЦР (рисунок 8). Наиболее выраженные тенденции изменения экспрессии были обнаружены для miR-19b и miR-125b, так уменьшение концентрации miR-19b и увеличение концентрации miR-125b в плазме было достоверно связано с ответом на химиотерапию ($P=0,035$ и $P=0,029$ соответственно) (таблица 13).

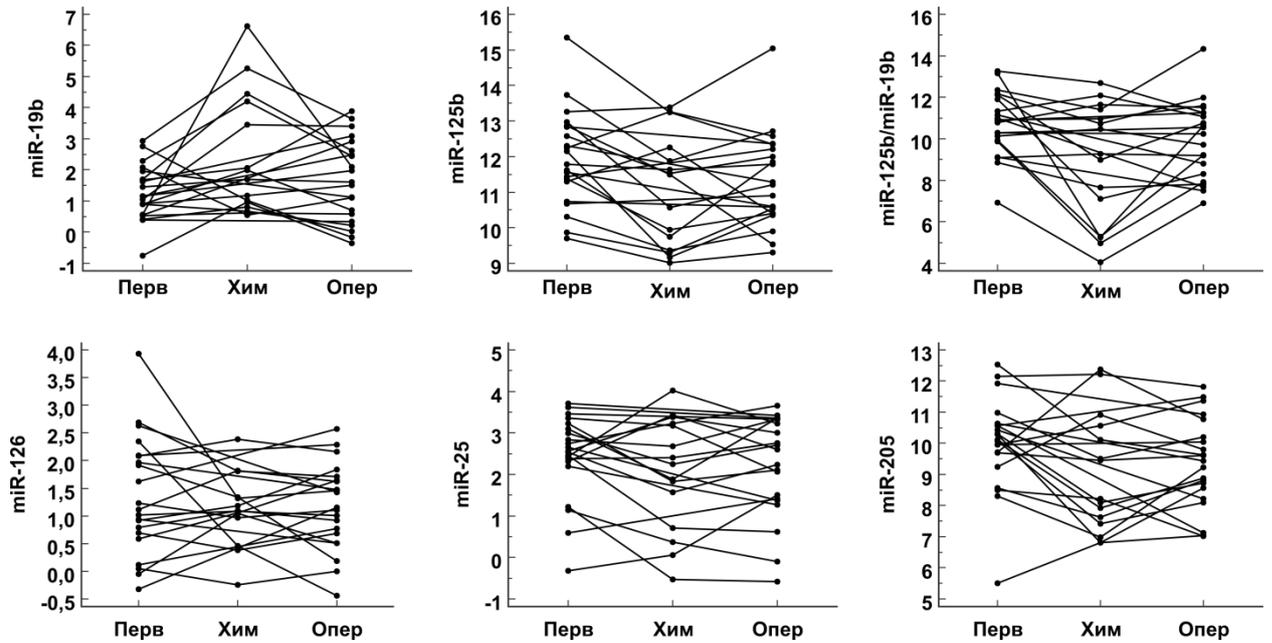


Рис 8. Экспрессия miR-19b, miR-25, miR-205, miR-125b, miR-126 и пары miR-125b/miR-19b в плазме больных РЛ до терапии (Перв), после химиотерапии (Хим) и после оперативного удаления опухоли (Опер). Линии соединяют данные от одного пациента. Данные нормализованы на уровень экспрессии miR-16.

Таблица 13. Сравнение уровней экспрессии циркулирующих микроРНК плазмы крови на разных стадиях противопухолевой терапии РЛ.

микроРНК	Пара сравнения	Характеристика	
		ddCq	P
miR-19b	Перв / Хим	0,94	0.035
	Перв / Опер	0,68	0.173
	Хим / Опер	-0,26	0.035
miR-126	Перв / Хим	-0,24	0.770
	Перв / Опер	0,16	0.890
	Хим / Опер	-0,08	0.508
miR-25	Перв / Хим	-0,35	0.294
	Перв / Опер	-0,39	0.681
	Хим / Опер	-0,04	0.092
miR-205	Перв / Хим	-0,70	0.474
	Перв / Опер	-0,12	0.267
	Хим / Опер	-0,82	0.767
miR-125b	Перв / Хим	-0,82	0.029
	Перв / Опер	-0,52	0.218
	Хим / Опер	0,30	0.308
miR-125b/miR-19b	Перв / Хим	-1,76	0.011
	Перв / Опер	-1,20	0.029
	Хим / Опер	0,56	0.033

Уровень экспрессии miR-19b и miR-125b существенно отличался до и после оперативного вмешательства. При помощи дисперсионного анализа с повторными измерениями

показано, что изменение концентрации miR-19b на протяжении лечения характеризуется достоверным квадратичным трендом ($P=0,03$), а в случае miR-125b изменение линейно ($P=0,03$). Интересно, что отношение концентраций miR-19b и miR-125b также достоверно изменялось в ответ на терапию опухоли, причем изменение было линейным ($P=0,04$). Такой подход к анализу данных экспрессии микроРНК снимает необходимость в дополнительной нормализации экспрессии и может оказаться более удобным и перспективным подходом к анализу циркулирующих микроРНК.

При этом описанные тенденции присутствовали не у всех пациентов. В данном контексте причиной такой гетерогенности результатов может быть разная эффективность терапии в каждом отдельном случае. Для того, чтобы проверить эту гипотезу пациенты были разделены на группы в зависимости от успешности лечения. Пациентов с частичным ответом на противоопухолевую терапию классифицировали как отвечающих на терапию (ОТ, $n=13$), пациентов со стабилизацией или прогрессией заболевания относили к группе неответающих/резистентных (РТ, $n=10$). В этих группах был проведен анализ динамики экспрессии микроРНК (рисунок 9).

В группе ОТ наблюдалась тенденция к линейному уменьшению концентрации miR-125b ($P=0,07$), тогда как у РТ изменение концентрации было скорее колоколообразным ($P=0,09$). В случае miR-19b колоколообразное изменение концентрации было достоверно у больных из группы РТ ($P=0,04$), и менее выражено в группе ОТ ($P=0,55$). У больных из обеих групп уровень miR-19b в плазме снижается в результате химиотерапии, однако, у пациентов, отвечающих на лечение, концентрация продолжала уменьшаться и после оперативного вмешательства, а у больных без ответа на терапию после операции уровень экспрессии возвращался к уровням, детектируемым до лечения.

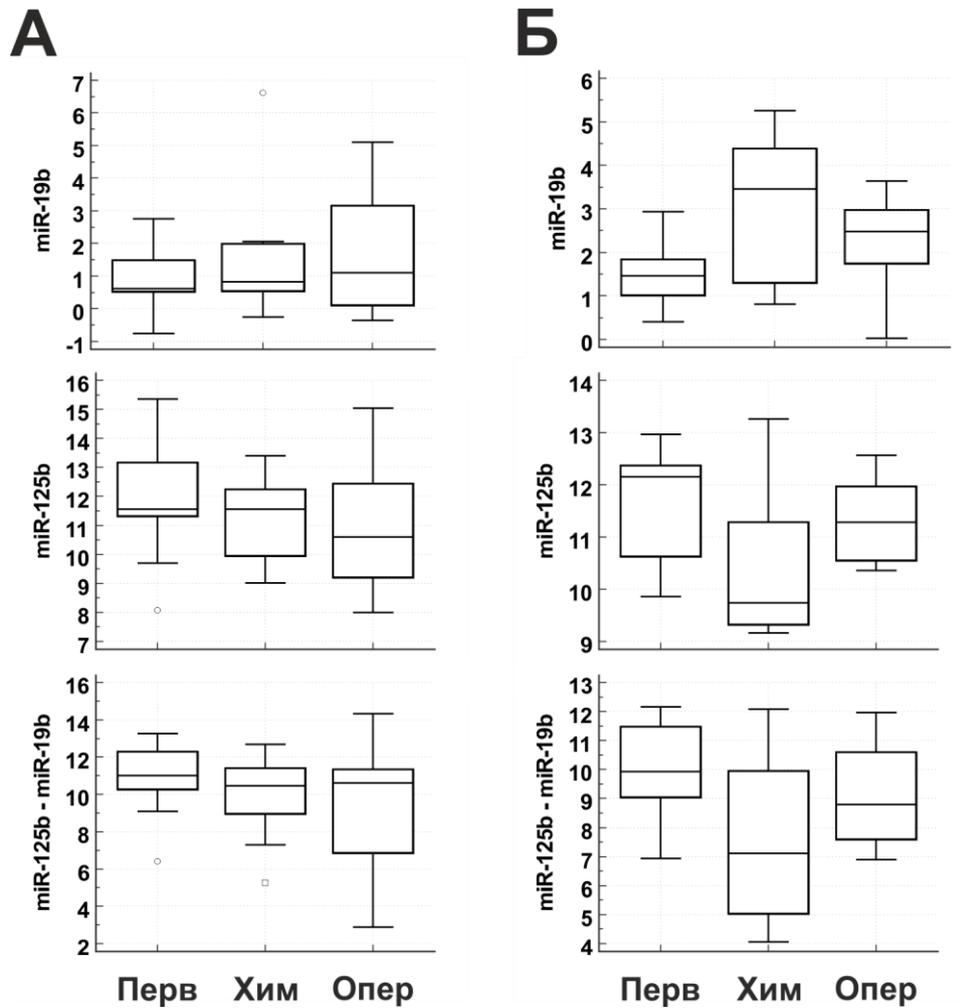


Рис 9. Экспрессия miR-19b, miR-125b и пары miR125b/miR19b на разных стадиях противоопухолевой терапии РЛ в группах (А) ОТ (Б) РТ. Перв - до начала терапии, Хим – после химиотерапии, Опер – после оперативного удаления опухоли.

Уровень экспрессии miR-25 и miR-205 не выявил значимых тенденций изменения их концентрации в общей группе больных РЛ. При этом наблюдались, строго говоря, не значимые намеки на линейное снижение их концентраций в группе ОТ ($P=0,15$ и $P=0,06$), но не у РТ ($P=0,55$ и $P=0,40$). Для miR-126 не было выявлено каких либо значимых тенденций и ее концентрация не коррелировала с уровнем экспрессии других исследованных микроРНК.

3.2.7. МикроРНК как маркеры прогноза выживаемости больных РЛ

Ранее было неоднократно показано, что микроРНК могут быть использованы в качестве прогностических маркеров рака легкого, поэтому была проанализирована связь экспрессии микроРНК с выживаемостью пациентов (п. 1.4.3.3). Для первичных больных РЛ период наблюдения составлял 25 месяцев с момента взятия образца крови. Случаи с неполными данными и смертностью от не связанных с РЛ причин были исключены из анализа. Данные анализа выживаемости (кривые Каплана-Мейера) представлены на рисунке 10. Пациентов

относили к группе с высокой или низкой экспрессией конкретной микроРНК на основании сравнения уровня ее экспрессии в образце с пороговым значением медианы уровня экспрессии этой микроРНК по всей группе больных РЛ.

Как видно, выживаемость пациентов с высокой экспрессией miR-19b была выше, чем у больных с низким уровнем экспрессии этой микроРНК в плазме крови, причем этот факт был менее выраженным в старших возрастных группах (рисунок 10Б). Низкая экспрессия miR-21 была связана с большими шансами выживания после 10 месяцев, что согласуется с ранее опубликованными данными [598]. При этом низкая экспрессия miR-205 и miR-25 была связана с повышенным выживанием в первые 10 месяцев, однако существенно не отражалась на общей выживаемости пациентов. В свете неполноты данных о состоянии пациентов РЛ (полные данные о выживаемости были получены только для 56 из 75 больных) различия в выживаемости между группами больных с высокой и низкой экспрессией не являлись значимыми согласно логарифмическому ранговому критерию (Log-rank test), и для их подтверждения или опровержения необходимо дополнительное исследование в четко оформленных репрезентативных когортах больных РЛ.

Для пациентов из группы мониторинга терапии были доступны данные выживаемости в течение 5 лет после первого забора крови. Как видно из рисунка (рисунок 11) выживаемость была выше у пациентов с высокими значениями отношения miR-125b/miR-19b, в то время как для пациентов с низким отношением этих микроРНК был характерен ранний рецидив заболевания (Log-rank test, $P=0,1$). Экспрессия miR-25, miR-126 и miR-205 не связана с прогнозом выживаемости больных РЛ.

Таким образом, на втором этапе работы были определены уровни экспрессии микроРНК плазмы крови у первичных больных РЛ и их изменение в ответ на терапевтическое и оперативное лечение РЛ. В целом, результаты хорошо согласуются с ранее опубликованными данными.

Известно, что miR-19b является частью онкогенного кластера miR-17-92, связанного с развитием ряда онкологических заболеваний человека, а также вовлеченного в нормальное развитие сердца и легкого, регуляцию дифференцировки стволовых клеток и формирование иммунной системы [599,600]. При РЛ обычно наблюдается повышенная экспрессия этой микроРНК в клетках опухоли и повышение ее уровня в крови [517,589,601]. Нарушение экспрессии miR-19b в клетках приводит к ингибированию апоптоза и злокачественной трансформации клеток через регуляцию PTEN, TP53, BCL-2, Prkaa-1 и др (таблица 1, п.1.4.2) [367,368,602]. Ранее во многих работах miR-19b была предложена в качестве маркера НМКЛ и в особенности ПКРЛ [517]. Так, например, в работе Voeri с соавторами эта микроРНК

присутствует в панелях для оценки риска развития и установления диагноза РЛ [497]. Wu с соавторами показали, что экспрессия этой микроРНК в опухоли коррелирует со стадией заболевания по классификации TNM, метастазированием региональные лимфоузлы и выживанием пациентов, а повышение ее концентрации в сыворотке крови являлось показателем неблагоприятного прогноза развития заболевания [589]. В данном исследовании miR-19b показала себя хорошим маркером РЛ, в особенности ПКРЛ, и ее уровень достоверно изменялся в ответ на химиотерапию, особенно у пациентов, не отвечающих на терапию.

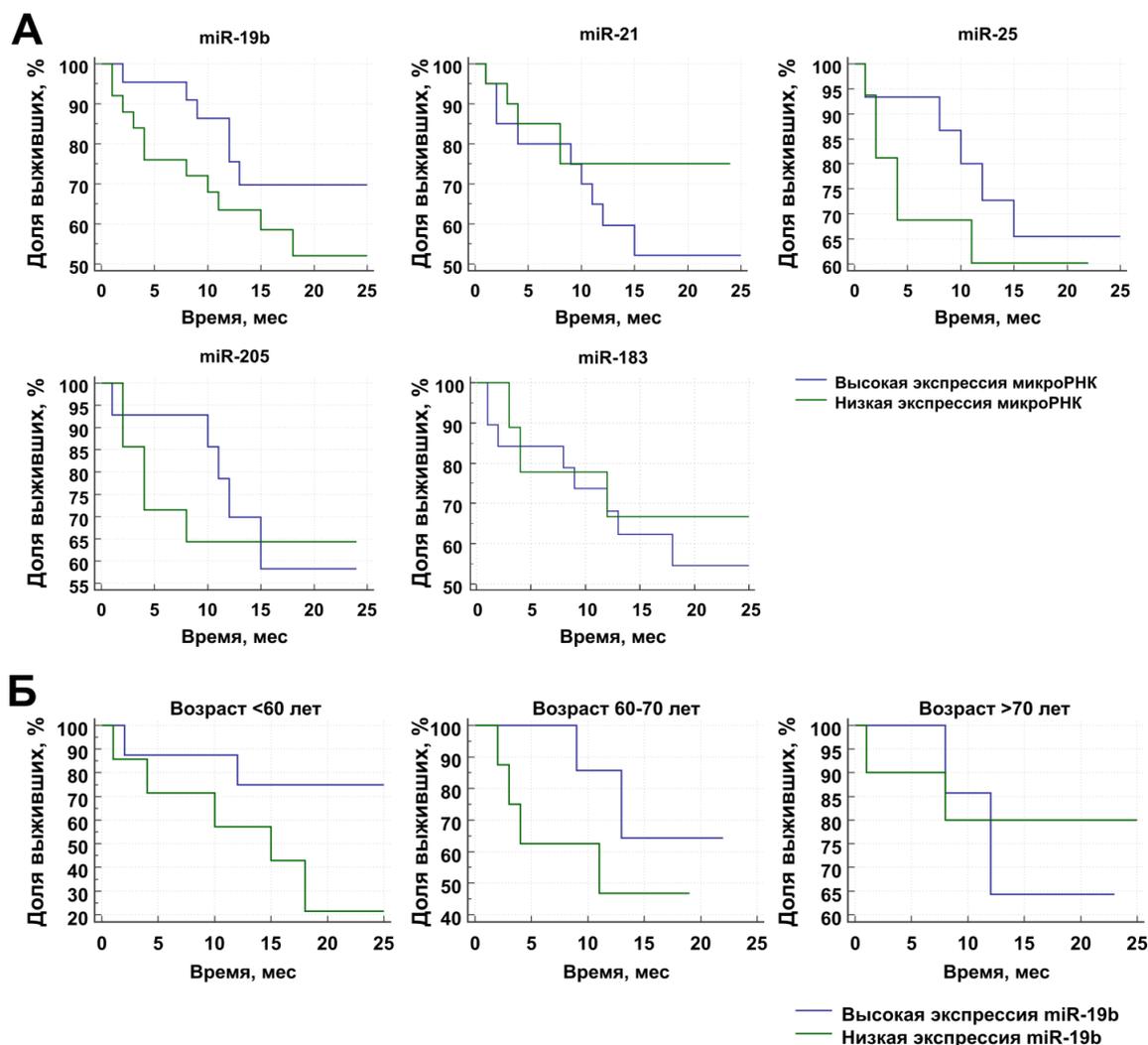


Рис 10. Кривые выживаемости Каплана-Мейера первичных больных РЛ в зависимости от экспрессии микроРНК. (А) Зависимость выживаемости первичных больных РЛ от экспрессии микроРНК miR-19b, miR-21, miR-25, miR-205, miR-183; (Б) Зависимость выживаемости пациентов разных возрастных групп от экспрессии miR-19b.

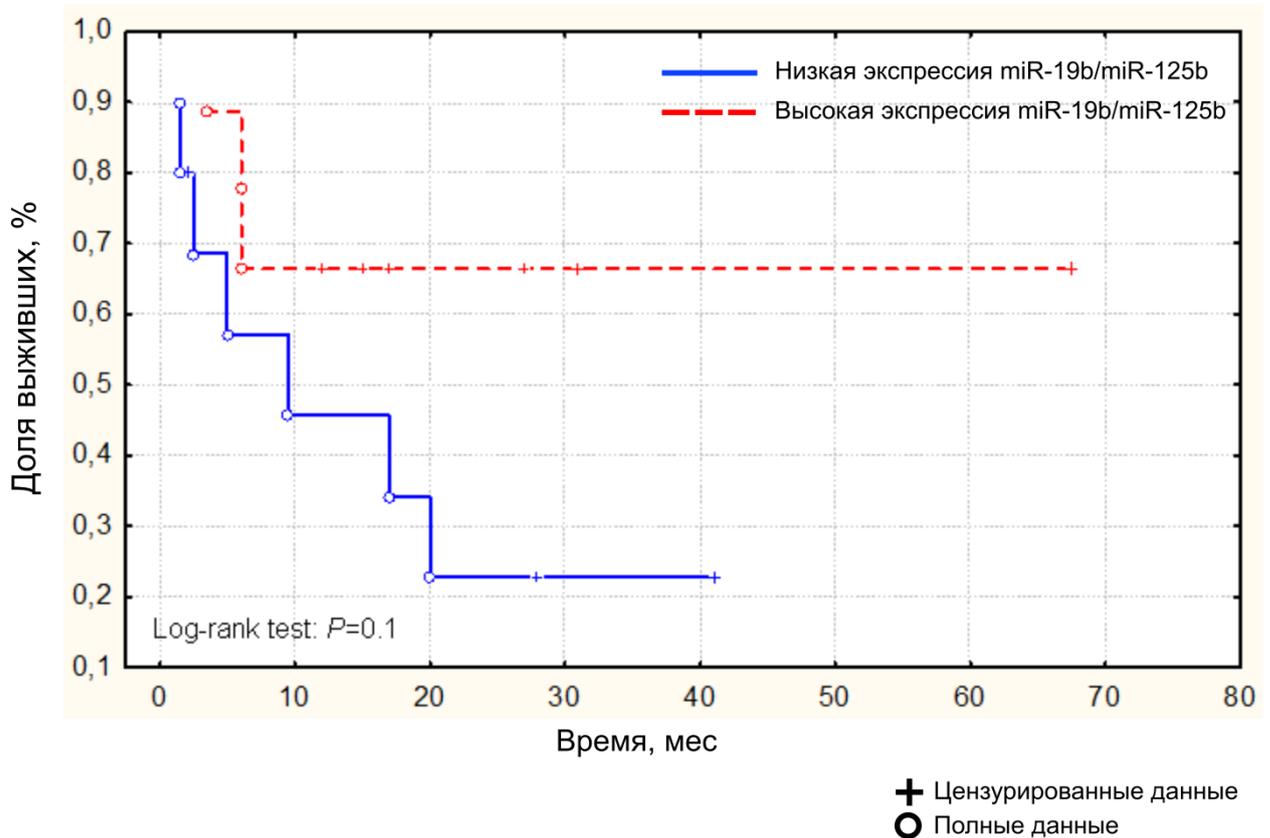


Рис 11. Кривые выживаемости Каплана-Мейера для пациентов после комбинированной противоопухолевой терапии в зависимости от экспрессии miR-19b/miR-125b.

Стоит отметить, что возвращение уровня этой (и других микроРНК) к исходным значениям после операции может объясняться системными эффектами перенесенной травмы, подтверждением чему служат данные о дальнейшей динамике экспрессии микроРНК, доступные для некоторых пациентов. Так, данные о динамике изменения уровня экспрессии miR-19b в течение года после оперативного вмешательства демонстрируют, что послеоперационное повышение уровня этой микроРНК в плазме является временным и становится менее выраженным или совсем не наблюдается по прошествии 2-3 месяцев после завершения курса терапии (рисунок 12).

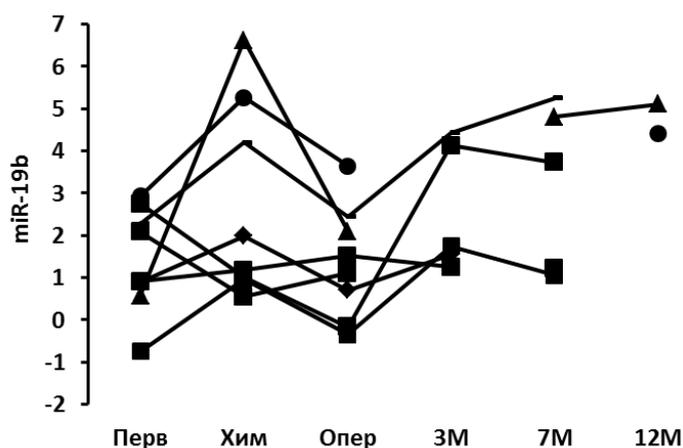


Рис 12. Долговременная динамика изменения экспрессии miR-19b у 8-ми пациентов с НМКЛ после противоопухолевой терапии. Перв - до начала терапии; Хим – после химиотерапии; Опер – после оперативного удаления опухоли, 3М – через 2-3 месяца после операции, 7М – через 6-7 месяцев после операции, 12М – через 12-15 месяцев после операции.

МикроРНК miR-183 была ранее исследована в контексте развития рака легкого, груди, предстательной железы, прямой кишки и др [457,465]. Ее роль в регуляции миграции и инвазии опухолевых клеток предположительно обусловлена контролем экспрессии Ezrin, PTEN and EGR1. Кроме того, ее экспрессия в крови достоверно отличалась у больных с плоскоклеточным раком легкого и аденокарциномой легкого [462,464]. При этом следует отметить, что в этих исследованиях концентрация этой микроРНК была повышена при РЛ, в противоречие полученным нами данным. Тем не менее, в большинстве исследований авторы либо определяли концентрацию ведущей цепи miR-183 (miR-183-3p) или не указывали исследуемую цепь этой микроРНК. В то же время в нашем исследовании, и других работах, где определялась концентрация miR-183-5p (miR-183*) была показано снижение ее концентрации при РЛ [511]. На основании данных об экспрессии обеих цепей этой микроРНК можно предположить, что при РЛ происходит нарушение экспрессии или процессинга miR-183, приводящее к изменению баланса концентрации ее цепей в опухолевых клетках.

Выбор miR-25 и особенно miR-205 для исследования был обоснован в первую очередь возможностью использовать уровень их экспрессии для дифференциальной диагностики ПКРЛ и АКЛ [351,352,593]. По полученным нами данным, экспрессия miR-205 в крови достоверно отличалась между больными с АКЛ и ПКРЛ, а уровень экспрессии обеих микроРНК позволяет отличать больных ПКРЛ, но не АКЛ, от здоровых доноров. Тем не менее, характер и амплитуда распределения значений в группах не позволяют говорить об эффективности какой либо из двух микроРНК в качестве маркера для дифференциальной диагностики РЛ. В качестве маркеров для мониторинга эффективности противоопухолевой терапии для экспрессии miR-25 и

miR-205 была характерна одинаковая тенденция к линейному росту в ходе лечения, а их уровни в плазме больных РЛ коррелировали ($R=0,751$, $P<0,0001$). Ранее опубликованные исследования противоречивы - одни показывают, что концентрация miR-205 в сыворотке снижается после операции у пациентов с ПКРЛ [517], но в работах других авторов концентрация miR-205 остается повышенной [507].

Онкосупрессорная микроРНК miR-125b является регулятором клеточного цикла и апоптоза через контроль экспрессии p53, BAK и EGFR [386,603–605]. Несмотря на низкую ценность этой микроРНК в качестве маркера для выявления РЛ, было показано, что ее уровень в плазме крови достоверно повышается в ответ на химиотерапию. Ранее было показано, что ее экспрессия часто понижена в крови больных РЛ и повышается после оперативного вмешательства [507,517], однако подтверждений этому в данной работе найдено не было.

Только три из выбранных микроРНК (miR-19b, miR-183, miR-125b) показали себя эффективными маркерами РЛ по данным представленного исследования. Результаты этого этапа исследования согласуются со многими известными литературными данными, а наблюдаемые различия могут быть результатом использования отличной методологии, в первую очередь способа получения препаратов микроРНК. Использование miR-16 в качестве нормализатора также могло внести свой вклад полученный результат, несмотря на продемонстрированную стабильность ее экспрессии. Стоит отметить, что отношение двух маркерных микроРНК - miR-19b/miR-125b являлось значимым индикатором эффективности терапии, без необходимости в использовании дополнительных стандартов. Это является важным результатом, который демонстрирует, что подход, основанный на парной нормализации экспрессии микроРНК может быть перспективен для поиска микроРНК-маркеров РЛ.

3.3. Поиск биомаркеров РЛ при помощи анализа профиля экспрессии циркулирующих микроРНК плазмы крови

3.3.1. Стратегия исследования

Несмотря на положительный результат предыдущего этапа работы, наблюдаемые различия в экспрессии исследуемых микроРНК были недостаточно выраженными и стабильными для их потенциального использования в клинической практике, а условия оценки их экспрессии в крови, например, метод нормализации, не были оптимальными. Действительно, для уверенной диагностики экспрессия микроРНК-маркера в группах должна отличаться не менее, чем в 2 раза ($dCt = 1$), а диагностическая система должна отличаться устойчивостью, и в идеальном случае диагностические контуры должны дублироваться

разными компонентами системы. Для масштабного поиска маркеров РЛ среди циркулирующих микроРНК плазмы крови была использована стратегия, изображенная на рисунке 13. Исследование состояло из трех основных этапов. На первом этапе были получены и проанализированы данные об экспрессии микроРНК в плазме крови больных РЛ и здоровых доноров. Затем экспрессия выбранных кандидатов была верифицирована с использованием независимой выборки пациентов, включающей группу больных с незлокачественными заболеваниями легких (эндобронхит с гипер- и метаплазией эпителия). На последней стадии из наиболее перспективных микроРНК была выбрана панель из 14 микроРНК, которая позволяла эффективно выявлять больных РЛ в объединенной выборке доноров.

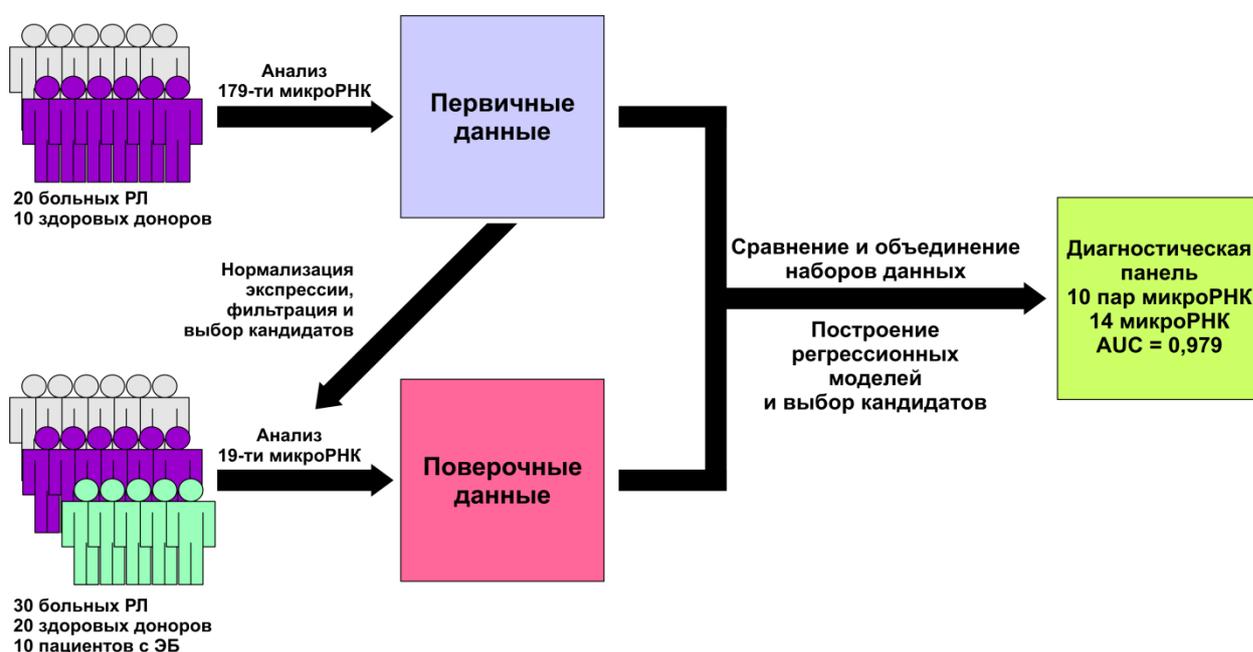


Рис 13. Схема проведенного исследования по поиску микроРНК-маркеров НМКЛ в плазме крови.

3.3.2. Профилирование циркулирующих микроРНК плазмы крови

3.3.2.1. Подготовка и контроль качества образцов

Для проведения масштабного анализа профиля циркулирующих микроРНК в крови была выбрана платформа miRCURY LNA miRNA qPCR Panels Serum/Plasma (Exiqon, Дания). Такой выбор обусловлен возможностью проанализировать экспрессию 179-ти микроРНК используя на старте небольшое количество микроРНК (от 100 нг), что особенно важно при исследовании циркулирующих микроРНК плазмы крови. Состав панели основан на полученных данных о представленности известных микроРНК человека в плазме крови. Ранее было показано, что такой подход обеспечивает высокую чувствительность измерения микроРНК в образцах с низким содержанием РНК [558].

Для профилирования экспрессии микроРНК из коллекции образцов были выбраны образцы плазмы крови больных ПКРЛ (n=14), АКЛ (n=6) и здоровых доноров (ЗД, n=10) (таблица 3). Препараты микроРНК полученные из плазмы крови при помощи однофазного протокола переслали в Qiagen Services (Ведбаек, Дания) на сухом льду после предварительной проверки наличия микроРНК во всех образцах при помощи количественной ОТ-ПЦР на miR-16 и miR-126. По прибытии в сервисный центр тестирование качества образцов проводили при помощи определения эндогенных микроРНК и внесенных в образец внешних контролей в виде синтетических рибо- и дезоксирибонуклеотидов. Было показано, что в образцах отсутствуют ингибиторы ОТ-ПЦР и нет гемолиза, т.е. нет примесей, которые могут влиять на качество данных. Данные этого независимого тестирования еще раз подтверждают эффективность однофазного метода выделения микроРНК (рисунок 14). Наличие гемолиза оценивали анализируя отношения концентрации микроРНК плазмы крови (miR-23a) к концентрации микроРНК, экспрессированной в норме внутри клеток крови (miR-451) [532]. Только в одном образце от здорового донора (H2) значением miR-451a/miR-23a превышало 8, что может говорить о наличии гемолиза.

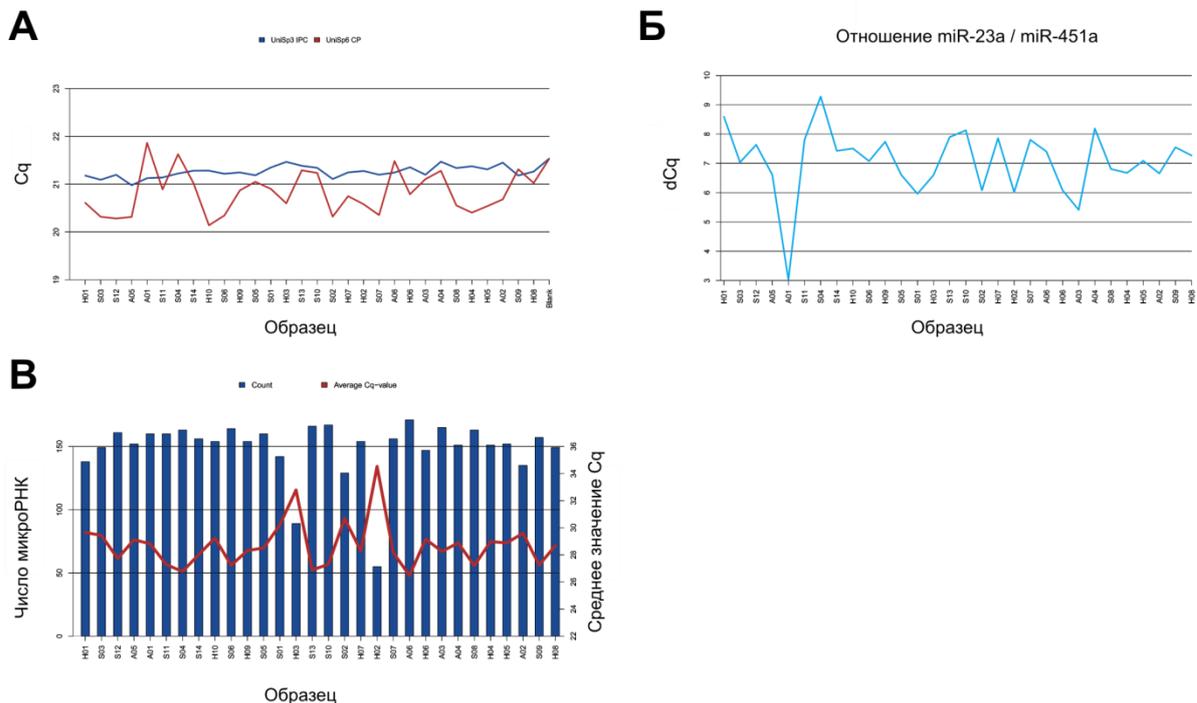


Рис 14. Контроль качества образцов, использованных для профилирования микроРНК. (А) Контроль эффективности обратной транскрипции (красная линия) и количественной ПЦР (синяя линия) при помощи внесенных стандартов UniSp3 и UniSp6, соответственно; (Б) Оценка гемолиза в образцах при помощи измерения разницы пороговых циклов miR-23a и miR-451; (В) Содержание микроРНК в образцах. Синие столбы - количество микроРНК детектируемых в образце. Красная линия – среднее значение порогового цикла (Cq) по образцу.

3.3.2.2. Обзорный анализ экспрессии микроРНК в плазме крови

По результатам профилирования на платформе miRCURY LNA miRNA qPCR Panels Serum/Plasma в среднем в каждом образце достоверно обнаруживалось 149 из 179-ти микроРНК. Минимальное число микроРНК было детектировано в образце Н02, что может быть связано с процессированием образца в компании Qiagen, поскольку он успешно прошел предварительную проверку в лаборатории этой же компании при помощи ОТ-ПЦР. Для поиска нормализатора стабильность экспрессии микроРНК в образцах определяли при помощи алгоритма NormFinder [575]. В анализ были включены только микроРНК, которые детектировались во всех образцах. Показано, что для полученного набора данных наиболее подходящим нормализатором является усредненный уровень экспрессии всех микроРНК в образцах (глобальное среднее) (таблица 5) [576]. Для обзорного анализа экспрессия всех микроРНК была нормализована на глобальное среднее.

Для исследования основных тенденций экспрессии микроРНК в образцах была проведена статистическая обработка данных при помощи гипотезо-независимых подходов. Анализ методом главных компонент (РСА) не выявил формирования групп по статусу донора (больной РЛ, здоровый донор) или гистологическому типу РЛ. Выявлена слабая тенденция к кластеризации образцов здоровых доноров и больных ПКРЛ, в то время как в распределении образцов больных аденокарциномой отсутствовали какие либо закономерности.

Неконтролируемый кластерный анализ концентрации 47-ми наиболее вариабельных микроРНК показал средние тенденции к кластеризации образцов больных РЛ и здоровых доноров и выявил существование групп дифференциально экспрессированных микроРНК (рисунок 15А). Пять образцов в левой части диаграммы (2 образца АКЛ, 2 образца ПКРЛ и один образец ЗД), образовывали гетерогенную группу, экспрессия микроРНК в которой отличалась как от больных РЛ, так и от здоровых доноров.

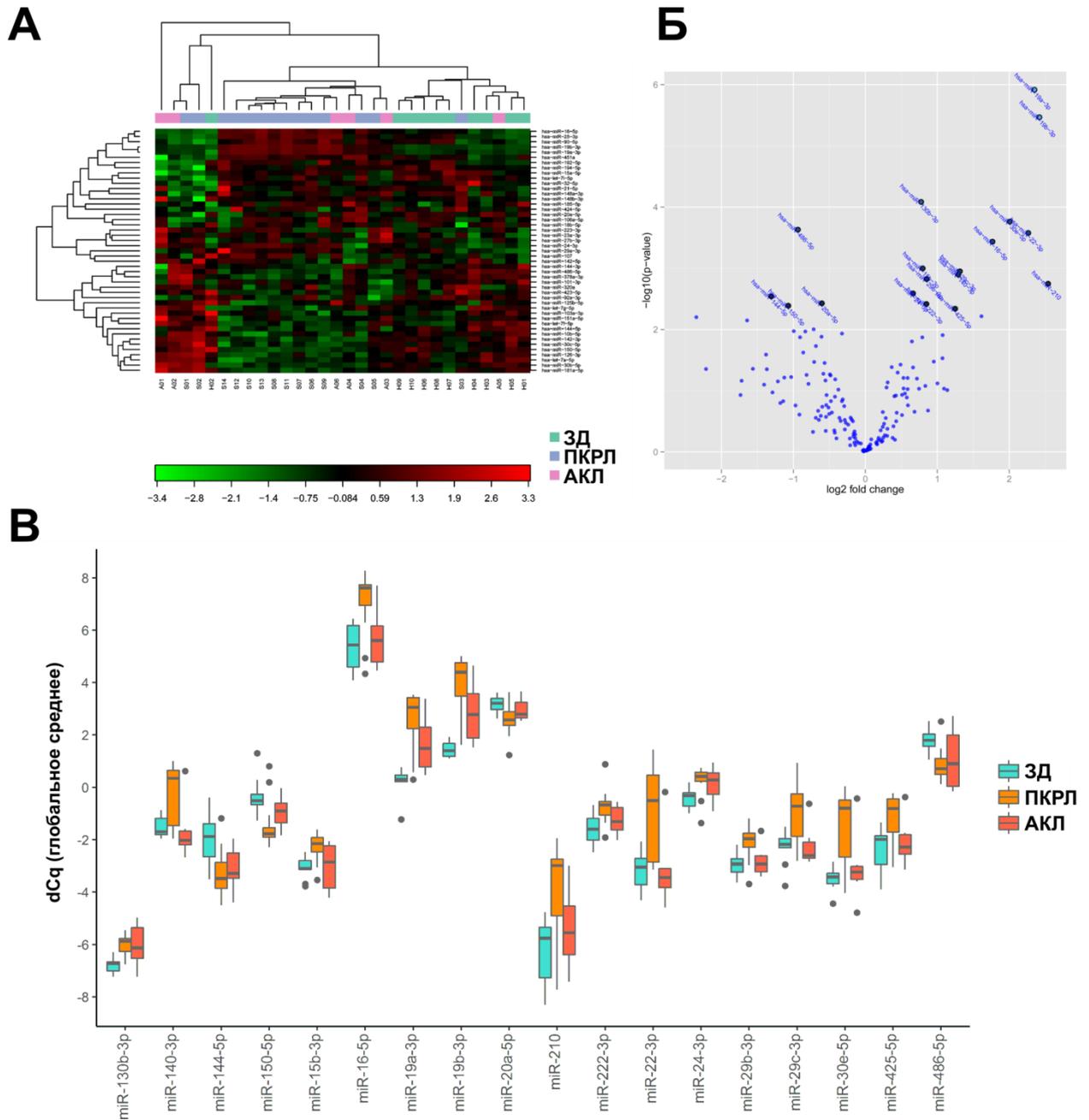


Рис 15. Профили экспрессии микроРНК в образцах. (А) Тепловая карта и неконтролируемая иерархическая кластеризация для 47 наиболее дифференциально экспрессированных микроРНК; (Б) Volcano-plot уровня значимости и амплитуды различий в экспрессии микроРНК; (В) Распределение значений экспрессии микроРНК, дифференциально экспрессированных между группами ЗД и ПКРЛ. Значения dScq нормализованы на глобальное среднее.

При помощи критерия χ^2 показано отсутствие микроРНК достоверно экспрессированных только в одной из групп доноров. При помощи Т-теста и рангового критерия Манна-Уитни-Уилкоксона были определена статистическая достоверность различий в экспрессии микроРНК попарно между группами ПКРЛ, АКЛ и ЗД. Концентрация 18 из 179 циркулирующих в крови микроРНК достоверно ($p < 0,05$ после поправки Бенджамини-Хочберга) отличалась между группами ЗД и больных ПКРЛ (рисунок 15Б и В, таблица 14). При этом, достоверных различий

в концентрациях циркулирующих микроРНК между группами больных АКЛ и ЗД, а также между пациентами с АКЛ и ПКРЛ найдено не было. Причиной этому может быть небольшое, в сравнении с количеством исследуемых микроРНК, число больных АКЛ (n=6), вследствие чего оказалось трудно достичь требуемой мощности статистических критериев с учетом использованной поправки на множественность измерений.

Таблица 14. МикроРНК, экспрессия которых достоверно отличалась между больных плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ) и здоровыми донорами (ЗД) по данным профилирования.

микроРНК	Среднее dCq		SD		Кратность изменения	P	P (корр)*
	ПКРЛ	ЗД	ПКРЛ	ЗД			
hsa-miR-19a-3p	2.6	0.24	1.1	0.56	5.1	0.0000012	0.00020
hsa-miR-19b-3p	3.9	1.4	1.2	0.30	5.3	0.0000034	0.00029
hsa-miR-130b-3p	-6.0	-6.8	0.43	0.30	1.7	0.000082	0.0046
hsa-miR-30e-5p	-1.5	-3.5	1.5	0.46	4.0	0.00017	0.0072
hsa-miR-486-5p	0.85	1.8	0.62	0.43	-1.9	0.00023	0.0074
hsa-miR-22-3p	-0.93	-3.2	1.7	0.79	4.8	0.00026	0.0074
hsa-miR-16-5p	7.1	5.4	1.2	0.89	3.4	0.00037	0.0088
hsa-miR-15b-3p	-2.3	-3.1	0.52	0.45	1.7	0.0010	0.021
hsa-miR-29c-3p	-0.96	-2.3	1.1	0.66	2.5	0.0011	0.021
hsa-miR-140-3p	-0.19	-1.5	1.2	0.41	2.4	0.0013	0.021
hsa-miR-29b-3p	-2.1	-2.9	0.69	0.47	1.8	0.0015	0.023
hsa-miR-210	-3.8	-6.3	1.6	1.3	5.8	0.0018	0.025
hsa-miR-24-3p	0.26	-0.41	0.57	0.39	1.6	0.0026	0.033
hsa-miR-144-5p	-3.2	-1.9	0.89	0.94	-2.5	0.0029	0.034
hsa-miR-20a-5p	2.6	3.2	0.59	0.30	-1.5	0.0037	0.040
hsa-miR-222-3p	-0.72	-1.6	0.64	0.57	1.8	0.0038	0.040
hsa-miR-150-5p	-1.5	-0.38	0.88	0.74	-2.1	0.0041	0.040
hsa-miR-425-5p	-1.2	-2.4	0.95	0.87	2.4	0.0046	0.043
hsa-miR-324-5p	-5.5	-7.1	0.84	0.94	3.1	0.0061	0.053
hsa-miR-133a	-8.2	-5.8	1.3	2.0	-5.1	0.0063	0.053

*после поправки Бенджамини-Хочберга

Для выявления микроРНК, являющихся потенциальными кандидатами в биомаркеры плоскоклеточного рака легкого был построен Volcano-plot, показывающий зависимость между значимостью и амплитудой различий в концентрации микроРНК между ЗД и больными ПКРЛ (рисунок 12Б). Наиболее перспективными микроРНК по данным обзорного анализа были miR-19a/b, которые уже хорошо зарекомендовали себя на предыдущем этапе исследования. Помимо них, анализ выявил еще ряд потенциальных микроРНК, некоторые из которых уже были предложены в качестве маркеров РЛ в ряде исследований (п 1.4.3).

3.3.2.3. Сравнение экспрессии микроРНК в плазме с данными TCGA

В настоящее время накоплено большое количество данных об экспрессии микроРНК в клетках опухолей, в том числе при ПКРЛ и АКЛ. 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, мы обратились к данным проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA), доступным на портале Genomic Data Commons. Эта база данных содержит информацию о мутациях и метилировании ДНК, транскриптом и экспрессии микроРНК в образцах тканей (опухоль, здоровая ткань, клетки крови) более 14531 больных 38-ю видами онкологических заболеваний, в том числе 504 пациентов с диагнозом ПКРЛ (LUSC, Lung Squamous Cell Carcinoma). Для анализа нами были выбраны пациенты с ПКРЛ (n=45), для которых были доступны данные экспрессии микроРНК в образцах опухоли и прилежащей здоровой ткани легкого, охарактеризованных при помощи стандартных гистологических методов.

В результате исследования экспрессии зрелых микроРНК и пре-микроРНК при помощи парного теста Вилкоксона было обнаружено, что микроРНК, экспрессия которых в плазме крови больных РЛ отличается от таковой у ЗД, также deregulированы в опухолевой ткани ($P < 0,05$ после поправки Бенджамини-Хочберга) (рисунок 16).

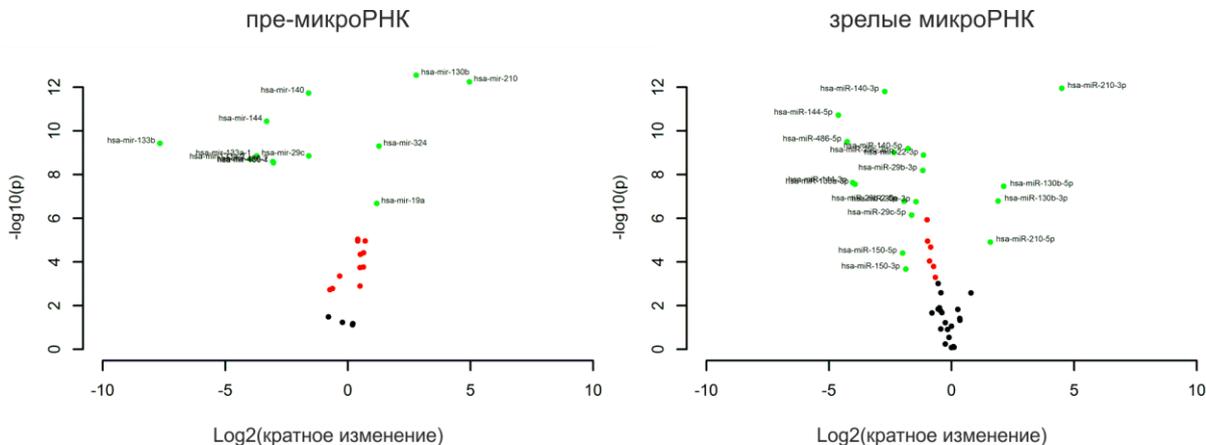


Рис 16. Volcano-plot экспрессии микроРНК (зрелых форм и шпилечных предшественников) в парных образцах опухолей и здоровой ткани легкого больных ПКРЛ по данным TCGA. По горизонтальной оси отложено значение медианы логарифма кратного изменения в экспрессии между тканью опухоли и здоровой тканью легкого.

Так, например, экспрессия зрелых miR-210 и miR-130b и их предшественников достоверно повышена, в то время как для miR-19a, miR-19b, miR-15b и miR-324 изменения экспрессии были выявлены в клетках опухолей только на уровне предшественников. В то же время, экспрессия как зрелых miR-144, miR-150, miR-29b, miR-29c, miR-486, miR-22, так и их предшественников, была наоборот понижена в опухолевой ткани, 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. Следует отметить, что даже значительное нарушение экспрессии микроРНК в ткани опухоли не всегда сопровождается увеличением ее уровня в крови. Важным фактором, определяющим попадание и стабильность опухолевых микроРНК в крови скорее всего является их транспорт из клеток и предпочтительная форма циркуляции. Состав уже присутствующих в крови микроРНК также влияет на оценку уровня экспрессии микроРНК попадающей в кровь из опухолевой ткани. Так, например, снижение экспрессии определенной микроРНК в опухоли скорее всего не отразится на ее уровне в крови в том случае, если ткань опухоли не является ее основным источником (или одним из основных). В результате эпителиально-мезенхимального перехода клетки опухолей могут полностью или частично терять специфический профиль экспрессии генов и экспрессировать гены не характерные для родительской ткани. Нарушение экспрессии тканеспецифических микроРНК не всегда может быть использовано в диагностических целях как раз в силу «маскировки» добавочных микроРНК, генерируемых клетками опухолей. Действительно, эффекты повышения концентрации микроРНК могут маскироваться в крови молекулами происходящими из других источников, особенно клеток крови [485,606]. Таким образом, детальный анализ современных данных относительно экспрессии микроРНК в клетках опухолей, их функций и представленности в разных тканях могут существенно улучшить поиск маркерных микроРНК, обнаруженных в пуле циркулирующих РНК [607].

3.3.2.4. Анализ экспрессии микроРНК при помощи парной нормализации

Поскольку эффективность использования глобального среднего в качестве нормализатора напрямую зависит от размера анализируемой панели микроРНК, для верификации экспрессии потенциальных биомаркерных микроРНК и построения диагностических панелей необходим иной метод нормализации. Ранее в работах Voeri с соавторами и Landoni с соавторами для нормализации экспрессии микроРНК был использован метод построения попарных отношений экспрессии микроРНК, таким образом, что экспрессия каждой микроРНК является стандартом для экспрессии всех остальных микроРНК [496,530]. Такой подход позволил авторам успешно выявить пары микроРНК с дифференциальной экспрессией, однако недостатком такого подхода является сильный рост числа анализируемых переменных, что усложняет статистический анализ результатов и повышает вероятность

получения ложноположительных результатов. Для того, чтобы решить эту проблему, выбор панели маркеров проводили в две стадии.

Сначала была выполнена подготовка данных. Образец от здорового донора (H02), для которого ранее было показано низкое число экспрессируемых микроРНК и потенциальное наличие гемолиза, был исключен из анализа. Поскольку обзорный анализ не показал достоверных отличий в экспрессии микроРНК между ПКРЛ и АКЛ, далее в исследовании образцы всех онкологических больных были объединены в группу больных РЛ. Такой шаг позволил увеличить выборку больных РЛ и приблизить ее разнообразие к свойствам общей популяции больных РЛ, что позволяет выявлять более универсальные диагностические маркеры.

На первом этапе анализа были выбраны 140 микроРНК, экспрессия которых определялась в более чем 80% образцов, причем не менее чем в 50% образцов каждой группы доноров (РЛ и ЗД). Экспрессия микроРНК была нормализована при помощи построения 9729 парных отношений, для каждого из которых были вычислены значения разницы (dCq) пороговых циклов. При помощи однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA) была выявлена 241 пара микроРНК (98 индивидуальных микроРНК), экспрессия которых достоверно отличается между группами здоровых доноров и больных РЛ ($P < 0,05$, после поправки Бенджамини-Хочберга). Данные представлены на рисунке 17. Среди микроРНК составляющих такие пары присутствуют многие из микроРНК, экспрессия которых достоверно отличала больных ПКРЛ от здоровых доноров в обзорном анализе, включая miR-19a, miR-19b, miR-144, miR-150, miR-22-3p и miR-16. Несмотря на малую значимость отличий экспрессии miR-324 по отношению к глобальному, эта микроРНК также присутствовала во многих парах микроРНК. Помимо этого некоторые микроРНК, например, miR-133b, let-7b и let-7i, ранее не встречавшиеся в анализе, также были широко представлены. Стоит отметить, что в отличие от нормализации против известного стандарта, в составе пары часто сложно однозначно выделить маркерную и стабильную микроРНК, более того, пара может состоять из двух маркерных и двух стабильных микроРНК.

Таблица 15. *Наборы микроРНК с высокой и средней уверенностью связанные с гемолизом*

Высокая уверенность	Средняя уверенность
hsa-miR-16-5p	hsa-miR-16-5p
hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-92a-3p
hsa-miR-425-5p	hsa-miR-425-5p
hsa-miR-532-5p	hsa-miR-532-5p
hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-106a-5p
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-21-5p
hsa-miR-486-5p	hsa-miR-486-5p
hsa-miR-17-5p	hsa-miR-17-5p
hsa-miR-210	hsa-miR-210
hsa-miR-324-3p	hsa-miR-324-3p
hsa-miR-451a	hsa-miR-451a
hsa-miR-652-3p	hsa-miR-652-3p
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-126-3p
hsa-miR-320b	hsa-miR-320b
	hsa-miR-22-3p
	hsa-miR-194-5p
	hsa-let-7b-3p
	hsa-miR-140-3p
	hsa-miR-15a-5p
	hsa-miR-15b-3p
	hsa-miR-20a-5p
	hsa-miR-22-5p

Регрессионные модели были построены для исходного и двух сокращенных наборов пар микроРНК (рисунок 18). Из пар микроРНК, общих для всех трех регрессионных моделях были выбраны 8 микроРНК, являющиеся наиболее вероятными индикаторами РЛ, с учетом того, что для достоверного определения отличий при помощи количественной ОТ-ПЦР их экспрессия должна была отличаться между группами не меньше, чем на 1 С_q.

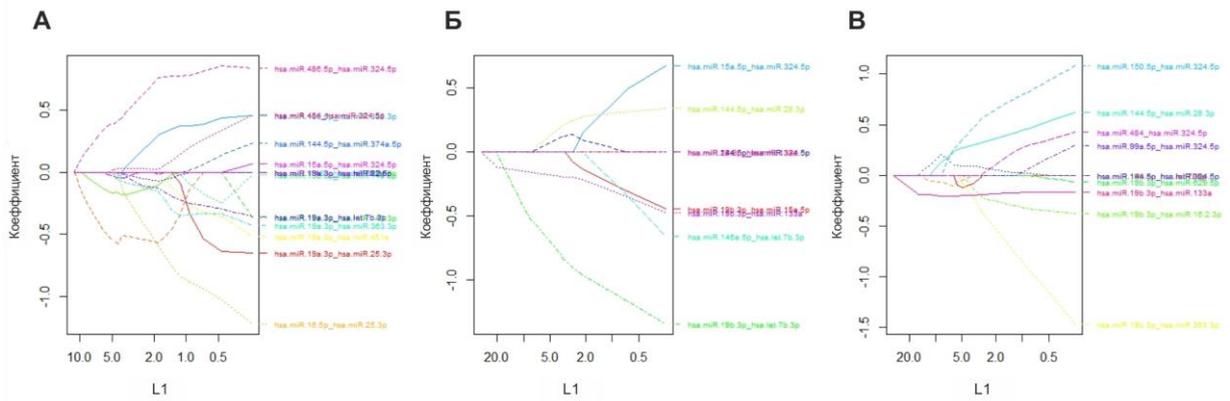


Рис 18. LASSO-пенализованные регрессионные модели, построенные на основе наборов пар микроРНК до и после фильтрации гемолиз-ассоциированных микроРНК. (А) Исходный набор пар микроРНК; (Б) Набор пар микроРНК после фильтрации с помощью панели со средней уверенностью; (В) Набор пар микроРНК после фильтрации с помощью панели с высокой уверенностью.

Кроме 8-ми выявленных микроРНК в диагностическую панель были включены 5 микроРНК, выявленные в обзорном анализе данных, одна микроРНК, которая была наиболее часто представлена в парах микроРНК с достоверно отличной экспрессией между ЗД и РЛ, и группа из 5-ти потенциально стабильно экспрессированных (по данным алгоритма NormFinder) микроРНК, уровень которых в крови которых не зависит от гемолиза. Стабильные микроРНК нужны для того, чтобы оценить качество и эффективность выделения РНК, а также общий уровень микроРНК в крови донора, и сформулировать критерии включения каждого индивидуального образца циркулирующих микроРНК в анализ. В результате была сформирована панель из 19-ти микроРНК, позволяющая оценить экспрессию 43-х пар микроРНК (рисунок 19, таблица 16).

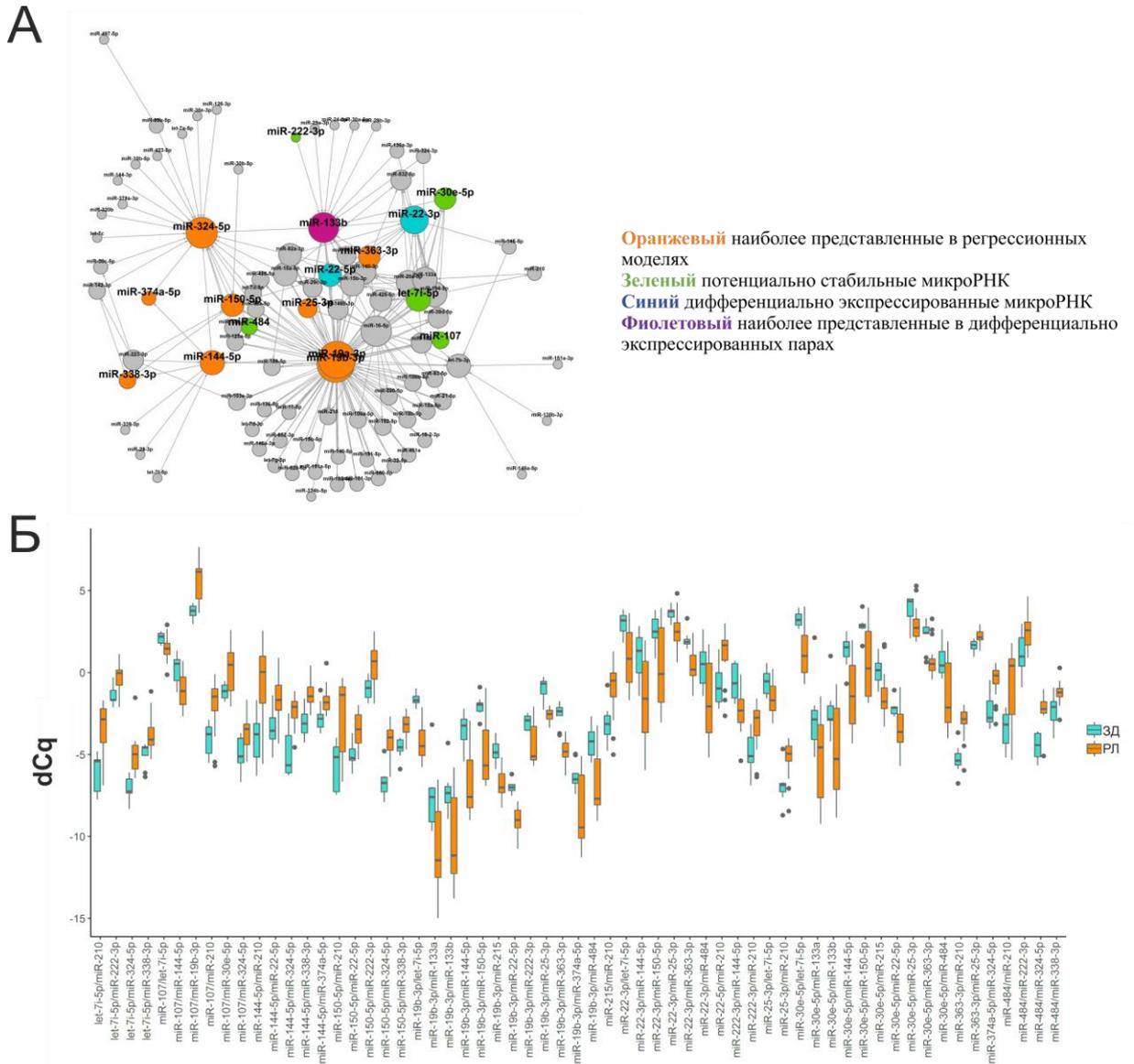


Рис 19. Выбор микроРНК для верификации. (А) Сетевая карта встречаемости микроРНК в парах с достоверно отличной экспрессией между группами доноров (алгоритм Kamada-Kawai); (Б) Экспрессия пар, содержащих 19 выбранных микроРНК в группах ЗД и больных РЛ.

Таблица 16. Панель из 19 микроРНК для верификации

hsa-miR-19b-3p*	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-107	hsa-miR-133a-3p
hsa-miR-25-3p	hsa-miR-363-3p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-210-3p
hsa-miR-144-5p	hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-215-5p
hsa-miR-150-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-133b
hsa-miR-324-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-22-5p	

*Цвет соответствует обозначениям, указанным на рисунке 19.

Таким образом, использование парной нормализации позволило выявить большое количество кандидатных отношений микроРНК, причем многие из них содержали микроРНК не выявленные в обзорном анализе (например, miR-374a, miR-363, miR-338). Необходимо отметить, что для работы с массивами данных необходимы нестандартные аналитические

подходы. Для работы с такими данными ранее привлекались различные статистические подходы, включая классификаторы на основе деревьев решений и методы машинного обучения, однако многие из них характеризуются склонностью к переобучению, созданию трудно интерпретируемых моделей и потере важных диагностических данных [530,565,609]. В нашем исследовании мы использовали более простой метода для выбора предикторов – LASSO-пенализованную логистическую регрессию. Схожий статистический подход ранее был успешно реализован для выбора микроРНК-маркеров в работе Wozniak с соавторами [610], однако в отличие от этого исследования, в настоящей работе были дополнительно проведены этапы предварительного отбора переменных, а также фильтрация гемолиз-ассоциированных микроРНК. Поскольку даже при использовании этих дополнительных этапов и необходимых статистических поправок набор значимых пар микроРНК оказался большим и полученные данные было бы трудно верифицировать с экономической точки зрения, для оценки взаимоотношений между микроРНК было использовано сетевое представление (рисунок 19). Интерпретация такой схемы не совсем неоднозначна - микроРНК с большим количеством связей могут являться как хорошими маркерами РЛ, а микроРНК имеющие множественные связи могут являться эффективными маркерами или стабильными «противовесами» для маркерных микроРНК. Тем не менее, случае высокая встречаемость микроРНК в парах является индикатором ее ценности при создании диагностической модели, поэтому при выборе набора микроРНК для верификации предпочтение отдавалось микроРНК с большим количеством связей на сетевой карте. При этом не исключено, что можно предложить и более эффективные и рациональные подходы для анализа и визуализации данных после парной нормализации микроРНК.

3.3.3. Верификация экспрессии микроРНК

3.3.3.1. Подготовка образцов, получение и анализ данных об экспрессии микроРНК

Известно, что экспрессия микроРНК может варьировать в зависимости от многих патологических и физиологических факторов, включая клинические и демографические параметры доноров. Изменения в методиках забора, хранения и обработки образцов крови также могут приводить к изменениям представленности и концентрации микроРНК плазмы крови, например выброса дополнительных микроРНК в результате гемолиза или, наоборот, деградации части микроРНК. Методы измерения концентрации микроРНК в образцах также подвержены межэкспериментальным вариациям, а кроме того, изменение числа и набора праймеров при проведении мультиплексной реакции обратной транскрипции может влиять на соотношение уровней экспрессии измеряемых микроРНК в получаемых данных.

Для того, чтобы проверить, насколько различия в экспрессии выбранных мишеней воспроизводятся экспериментально, экспрессия 19-ти микроРНК была верифицирована на независимой выборке больных раком легкого (n=30), больных эндобронхитом (n=10) и здоровых доноров (n=20) с использованием той же платформы, что и была использована для поиска маркерных микроРНК (miRCURY LNA miRNA qPCR). Образцы были оттестированы на гемолиз при помощи ОТ-ПЦР на miR-23a и miR-451a, все образцы, включенные в исследование, имели значения $dCq(miR-23a/miR-451a) < 7,5$. Циркулирующие микроРНК уверенно детектировались во всех образцах, среднее число микроРНК с сигналом выше уровня фона в каждом образце составило 18 (рисунок 20). Два образца (больной РЛ и больной эндобронхитом) были исключены из анализа на основе представленности микроРНК в образце и высоких значений пороговых циклов.

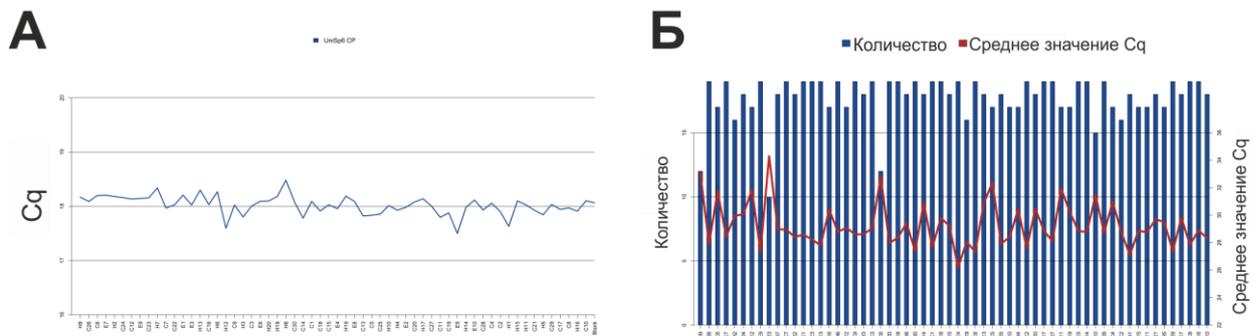


Рис 20. Контроль качества образцов, использованных для верификации экспрессии микроРНК. (А) Контроль эффективности количественной ПЦР при помощи внесенного стандарта UniSp6; (Б) Содержание микроРНК в образцах. Синие столбы - количество микроРНК детектируемых в образце. Красная линия – среднее значение порогового цикла по образцу (Cq).

К данным была применена парная нормализация и выполнено сравнение экспрессии между группами доноров. Экспрессия 26-ти пар микроРНК достоверно отличалась между больными РЛ и здоровыми донорами, в то время как больных эндобронхитом от больных РЛ и здоровых доноров отличали 56 и 29 пар, соответственно (ANOVA, $P < 0,05$ после поправки Бенджамини-Хочберга, приложение 1). Экспрессия 20-ти пар микроРНК достоверно отличала больных РЛ и обе контрольные группы (ANOVA, $P < 0,05$ после поправки Бенджамини-Хочберга) (таблица 17).

Таблица 17. Пары микроРНК, дифференциально экспрессированные между больными РЛ и донорами контрольных групп.

Пара микроРНК	P	P (корт)*	Разница пороговых циклов (ddCq)
miR-150-5p / let-7i-5p	2,27E-05	0,003888	-1,02401
miR-150-5p / miR-144-5p	0,000218	0,009329	-0,87207
miR-484 / miR-222-3p	0,000111	0,009329	1,094977
miR-484 / miR-324-5p	0,00019	0,009329	1,079881
miR-22-3p / miR-222-3p	0,000531	0,009413	1,254322
miR-30e-5p / miR-222-3p	0,000373	0,009413	0,728391
miR-363-3p / miR-150-5p	0,000309	0,009413	1,142667
miR-25-3p / miR-150-5p	0,000588	0,009413	1,176
miR-25-3p / miR-215	0,000606	0,009413	0,801954
miR-484 / miR-374a-5p	0,000518	0,009413	1,189276
miR-374a-5p / miR-133b	0,00057	0,009413	-1,3027
miR-22-3p / miR-324-5p	0,000844	0,012032	1,233095
miR-484 / miR-338-3p	0,001091	0,014354	1,051429
miR-363-3p / miR-215	0,001563	0,019091	0,788609
miR-150-5p / miR-484	0,002034	0,023183	-1,42567
miR-30e-5p / miR-324-5p	0,002371	0,025336	0,768519
miR-22-3p / miR-338-3p	0,00282	0,028369	1,146786
miR-22-3p / miR-374a-5p	0,004404	0,041843	1,305524
miR-484 / miR-22-5p	0,004784	0,043059	0,582635
miR-363-3p / miR-222-3p	0,005289	0,045222	0,821805

*после поправки Бенджамини-Хочберга

При этом сравнение двух экспериментов показало, что только часть данных относительно экспрессии микроРНК хорошо воспроизводится даже при использовании одной и той же платформы, что совпадает с данными, представленными ранее другими группами [544,546]. В дальнейшее исследование были выбраны пары микроРНК, экспрессия которых достоверно отличалась между больными РЛ и здоровыми донорами в обоих экспериментах (рисунок 21). Следует отметить, что в результате этого сравнения была переоценена диагностическая эффективность многих перспективных маркеров, выявленных в ходе анализа данных первого эксперимента. Так, miR-19a/b присутствует лишь в одной из 25 пар, в силу того, что ее экспрессия подвержена сильным межэкспериментальным вариациям. Сложно сказать является ли это результатом использованной методологии (выбор платформы для определения концентрации микроРНК), следствием каких-то особенностей биологии этой микроРНК или эффектом неравнозначности выборок доноров, их индивидуальными отличиями.

На основании результатов сравнения и при отсутствии значимых различий между распределением значений в полученных наборах данных согласно тесту Колмогорова-

Смирнова, данные об экспрессии 35-ти выбранных пар микроРНК в обоих экспериментах были объединены в одну выборку, включающую 50 больных РЛ, 9 больных эндобронхитом и 28 здоровых доноров (рисунок 21Б).

3.3.3.2. Ассоциация экспрессии микроРНК с демографическими и клиническими параметрами больных РЛ

Помимо способности выявить онкологическое заболевание ценным свойством для диагностического маркера является его пригодность для дифференциальной диагностики опухолей и способность предсказывать развитие заболевания. Несмотря на то, что в рамках данного исследования достоверных различий в профилях экспрессии больных ПКРЛ и АКЛ найдено не было, зависимость экспрессии микроРНК в плазме крови от клинико-патологических характеристик пациентов представляет собой ценную диагностическую информацию.

В объединенной выборке больных НМКЛ была исследована связь экспрессии микроРНК с клинико-патологическими показателями пациентов (приложение 2). Было обнаружено, что экспрессия 14-ти пар микроРНК достоверно зависит от анатомической стадии заболевания, экспрессия 39-ти и 18-ти пар микроРНК связана с размером опухоли (Т) и степенью распространения в лимфатические узлы (N) по классификации TNM (рисунок 22). Экспрессия пары *let-7i-5p/miR-222-3p* возрастала пропорционально размеру опухоли, в то время как экспрессия *miR-484/miR-374a-5p* достоверно отличала больных НМКЛ с T_{2a/2b} от здоровых доноров и пациентов более поздних стадий. Были найдены значимые отличия в экспрессии 18 пар микроРНК (рисунок 22Б), между больными, у которых диагностировано распространение РЛ в лимфатические узлы (N₁₋₂), и больными, у которых опухолевых клеток в лимфатической системе не найдено (N₀), причем для последних характерно существенное различие уровня экспрессии большинства пар микроРНК и по сравнению с группой здоровых доноров.

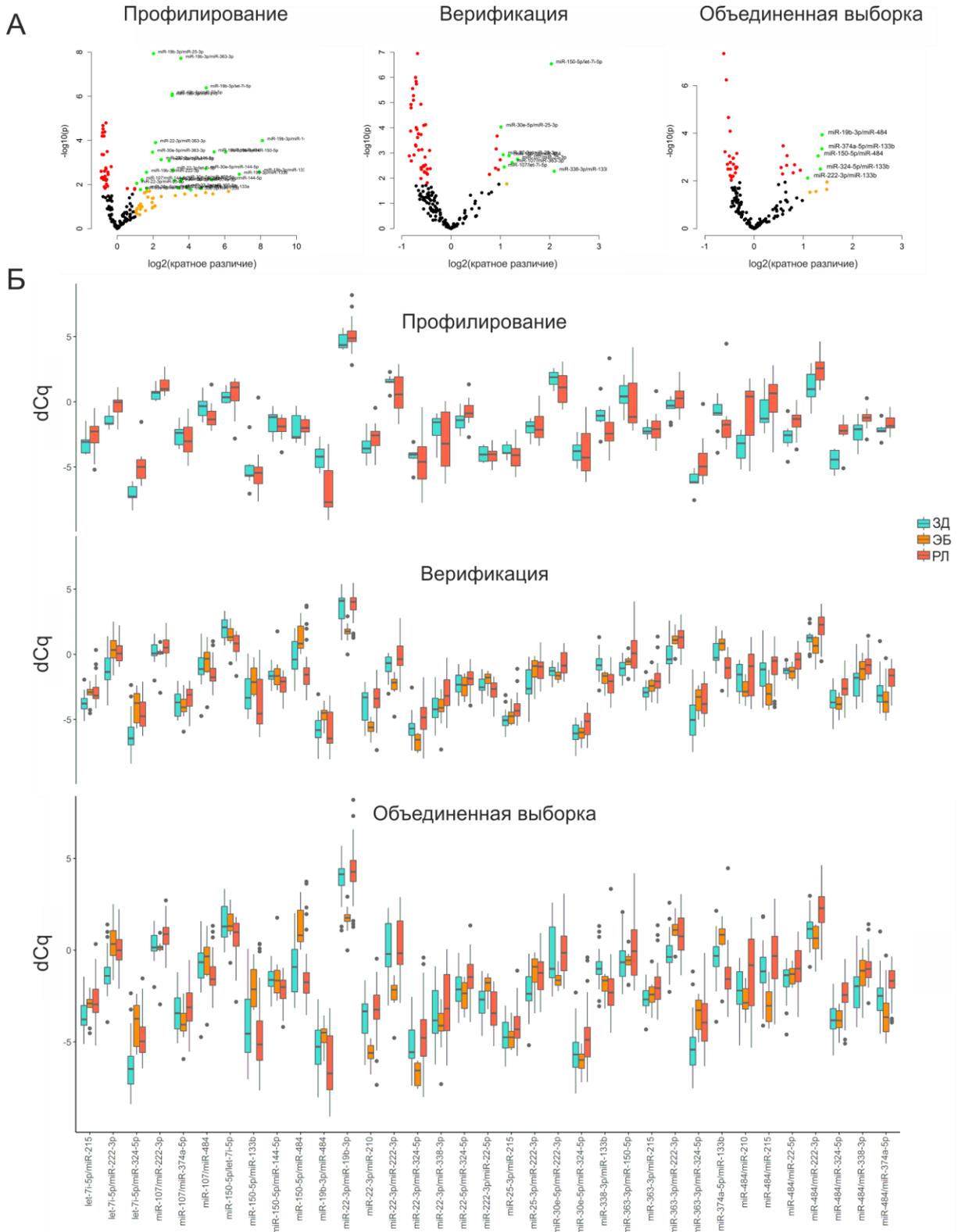


Рис 21. Экспрессия пар, составленных из 19-ти верифицированных микроРНК по данным двух экспериментов. (А) Volcano plot сравнительной экспрессии микроРНК между больными НМКЛ и ЗД в двух экспериментах и объединенной выборке; (Б) Экспрессия пар микроРНК в выборках образцов при профилировании и верификации, и в объединенной выборке.

При рассмотрении зависимости экспрессии пар микроРНК от анатомической стадии НМКЛ (рисунок 22В) показано, что miR-107/miR-484 достоверно отличает больных I стадии от ЗД; miR-484/miR-324-5p отличает все стадии от ЗД, однако куполообразная зависимость экспрессии этой пары микроРНК от стадии заболевания осложняет ее использование для прогнозирования течения заболевания; miR-374a/miR-133b- отличает II-III стадии НМКЛ от I стадии и здоровых доноров. Кроме того уровень экспрессии ряда пар микроРНК отличал больных НМКЛ III стадии от больных на более ранних стадиях. Три пары микроРНК miR-22-3p/miR-338-3p, miR-107/miR-374a, miR-30e/338-3p были достоверно связаны и с анатомической стадией НМКЛ и с показателями TNM, при этом их экспрессия не зависела от возраста пациентов. В целом различия в уровне экспрессии микроРНК были более показательны для классификации TNM, чем анатомического стадирования РЛ, что может быть связано с особенностями критеризации этих систем классификации опухолей. Интересно, что изменение отношения экспрессии двух цепей miR-22 было достоверно связано со стадией с размером опухоли и степенью распространения в лимфатические узлы, что может указывать на ее потенциальную роль в онкогенезе НМКЛ.

Следует отметить, экспрессия 17-ти пар микроРНК зависела от возраста пациента (приложение 2), что представляется негативным качеством для диагностического маркера. Особенно выражена связь с возрастом для пар микроРНК, содержащих miR-215. Однако поскольку в выборке может присутствовать взаимосвязь между стадией развития заболевания и возрастом пациентов, этот параметр требует дополнительной проверки на более представительных выборках пациентов.

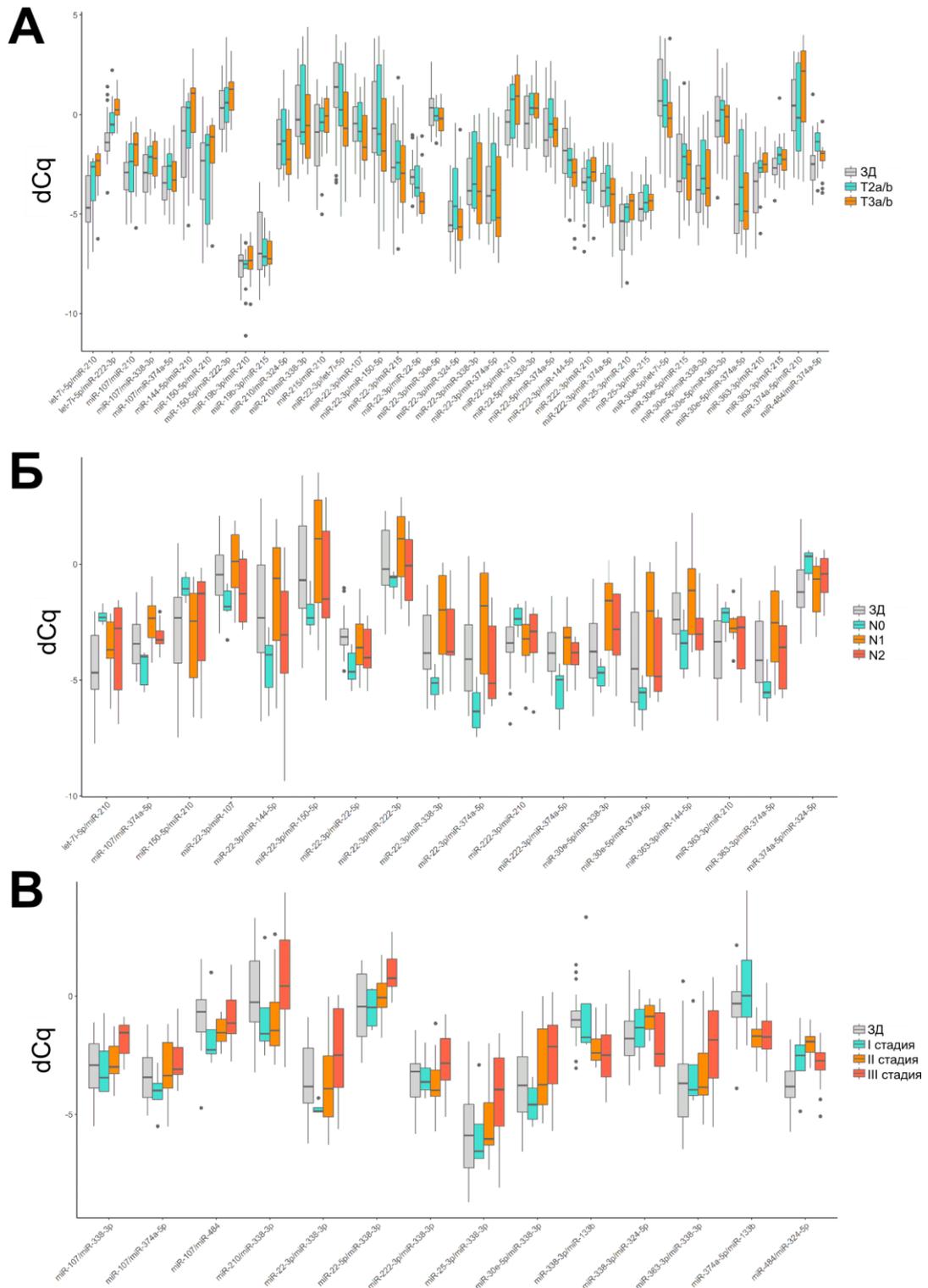


Рис 22. Зависимость экспрессии пар микроРНК от клинико-патологических показателей пациентов. (А) Размер опухоли по классификации TNM; (Б) Степень распространения в региональные лимфоузлы по классификации TNM; (В) Анатомическая стадия НМКЛ; Показаны пары со статистически значимыми отличиями экспрессии между как минимум двумя группами.

3.3.3.3. Определение диагностической значимости микроРНК и формирование диагностической панели

Формирование итоговой панели диагностических маркеров НМКЛ производили на основе 35-ти пар микроРНК, экспрессия которых достоверно и стабильно отличалась между больными раком легкого донорами и контрольными группами. Первоначально для определения диагностической значимости выбранных пар был проведен анализ их способности классифицировать доноров на группу онкологических больных (ПКРЛ и АКЛ) или контрольную группу (ЗД и ЭБ) при помощи ROC-кривых. Полученные ROC-кривые со значением площади под кривой (AUC) не менее 0,7 представлены на рисунке 23. Только для пар miR-484/miR-222-3p и miR-484/miR-324-5p значение AUC превышало 0,8. Интересно, что присутствие контрольной группы больных эндобронхитом (прерывистая линия) не имело ярко выраженного эффекта на способность большинства пар микроРНК выявлять больных РЛ, несмотря на то, что экспрессия микроРНК в этой группе достоверно отличалась как от здоровых доноров, так и от больных РЛ.

Поскольку в расширенной выборке ни одна из пар микроРНК не обладала достаточной чувствительностью и специфичностью для полного разделения групп доноров, была предложена панель микроРНК, при помощи которой достигалась максимальная точность классификации доноров. Для получения наиболее компактной и надежной диагностической модели использовали LASSO-пенализованную логистическую регрессию, оптимизированную при помощи множественных перевыборочных (bootstrap) наборов данных с использованием данных обоих экспериментов (рисунок 24). Регрессионные модели формировали из 15-ти пар микроРНК с высоким значением площади под кривой. Выбранные модели позволяли правильно классифицировать образцы с точностью соответствующей среднему значению AUC 0,9312 (95% CI 0,9305-0,9320) по сумме 2000 перевыборочных значений.

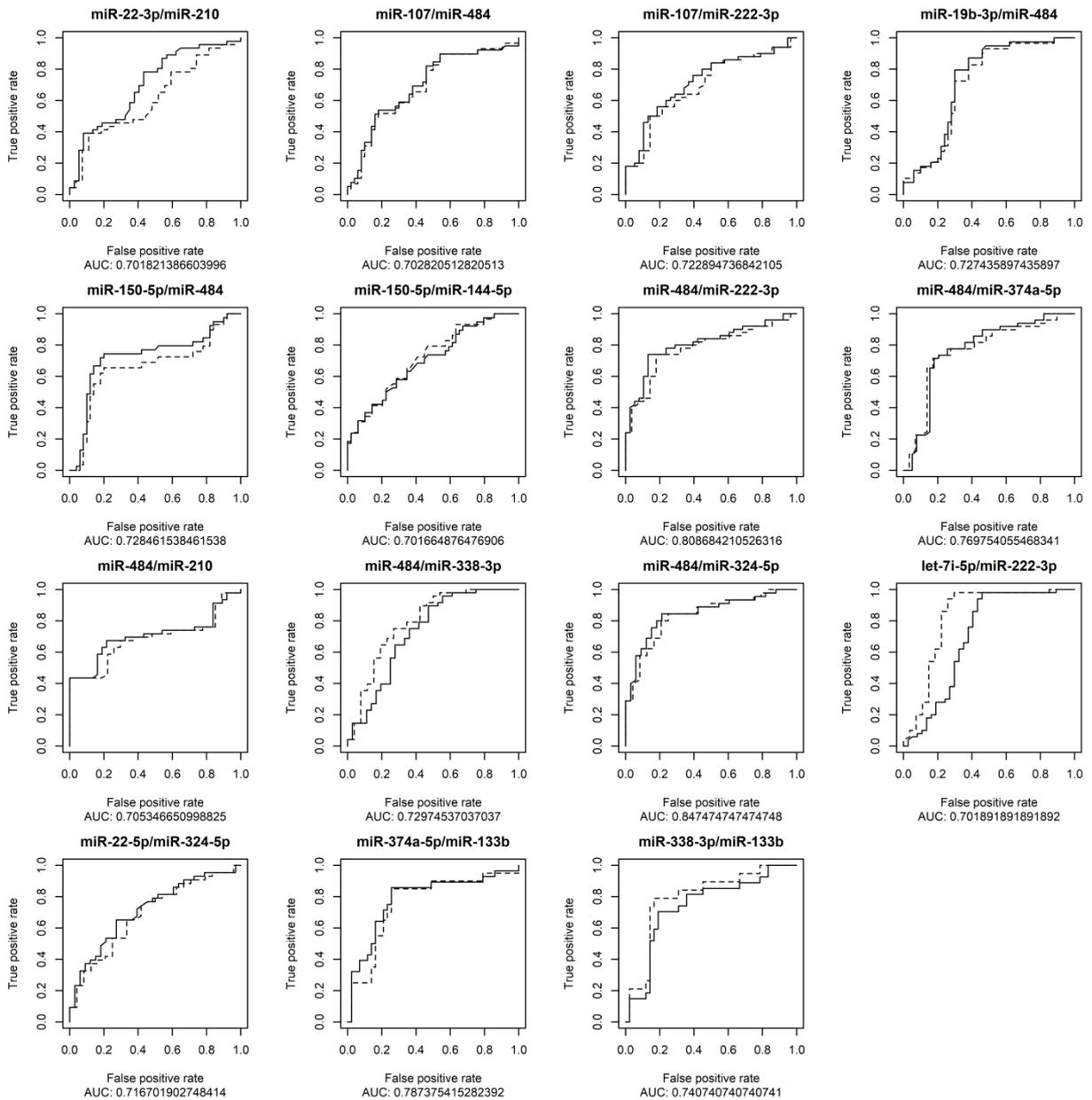


Рис 23. ROC-кривые классификации групп ПКРЛ+АКЛ и ЗД+ЭБ (сплошная линия) или ПКРЛ+АКЛ и ЗД (прерывистая линия) на основании экспрессии пар микроРНК. Представлены ROC-кривые со значением площади по кривой (AUC) не менее 0,7.

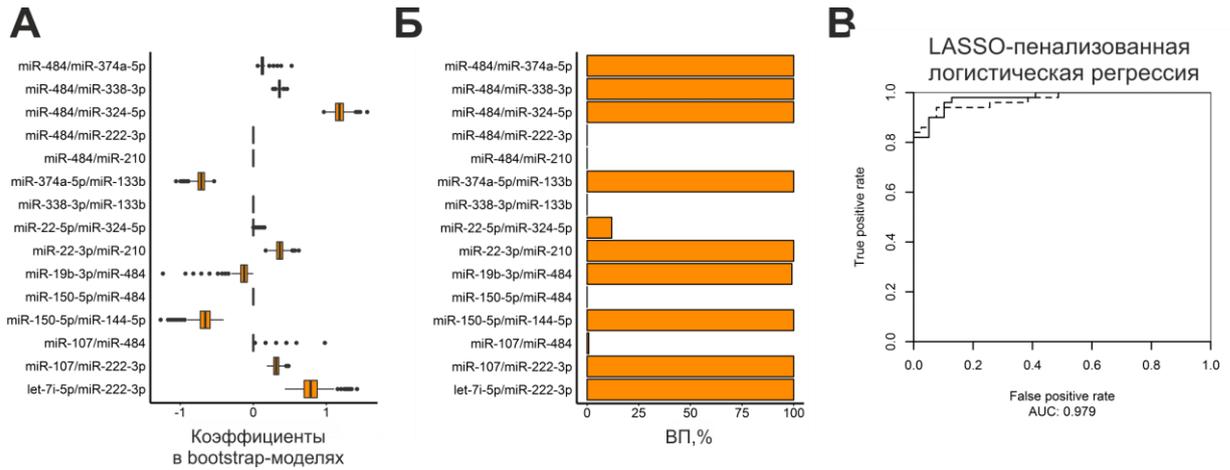


Рис 24. Оптимизация LASSO-пенализованной модели для логистической регрессии экспрессии микроРНК в плазме крови. (А) Распределение коэффициентов для членов регрессии в перевыборочных наборах данных; (Б) Важность переменных (ВП) в перевыборочных моделях; (В) ROC-кривые для классификации образцов из объединенной выборки при помощи оптимизированной модели (непрерывная линия) и не-оптимизированной модели (прерывистая линия).

Высокая представленность выбранных пар микроРНК в bootstrap моделях (важность переменных, рисунок 24Б) указывает как на устойчивость классификатора к изменению состава выборки (низкий эффект популяции), так и на успешность примененных методов отбора пар микроРНК на этапах, предшествовавших выбору модели. По результатам построения перевыборочных bootstrap моделей 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 (рисунок 24В). Информативность такой панели может быть более широкой, чем просто выявление РЛ. Из вошедших в диагностическую панель пар микроРНК 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. Кроме того включенные в панель микроРНК позволяют составить дополнительные пары, которые могут помочь оценить стадию развития заболевания у пациентов с НМКЛ.

Таким образом, в работе была исследована экспрессия циркулирующих микроРНК плазмы крови и по результатам исследования предложена панель из 14-ти микроРНК в качестве диагностического инструмента для выявления РЛ. Большинство микроРНК, входящие в диагностическую панель, ранее уже были описаны в контексте патогенеза РЛ. Так, связь повышенной экспрессии miR-19b в крови с РЛ уже была описана в данной работе и других источниках [589,601,611]. Другая микроРНК - miR-324-5p является опухолевым супрессором при раке груди, кишечника и гепатоцеллюлярной карциноме [612,613]. При этом увеличение ее экспрессии в клетках опухоли и плазме крови больных НМКЛ, свидетельствует о ее онкогенной роли [601] и соответствует данным обзорного анализа проведенного в этой работе. Недавнее исследование, основанное на анализе данных 32-х работ по профилированию экспрессии микроРНК в ткани опухолей, показало, что экспрессия miR-210 повышена в клетках опухоли при НМКЛ [614]. Кроме того, повышение ее экспрессии наблюдалось также в плазме и сыворотке больных РЛ, что хорошо согласуется с полученными нами данными [601,614,615]. Роль miR-222-3p в развитии рака легкого пока точно не выяснена. В одной работе ее относят к онкогенным микроРНК [616], в то время как другие авторы показали, что она напротив ингибирует рост опухолевых клеток РЛ [617]. По данным другого исследования повышение ее концентрации в крови связано с поздними стадиями НМКЛ, и в особенности с диагнозом АКЛ [511,618]. В данной работе связи экспрессии miR-222-3p с каким либо из двух основных подтипов РЛ выявлено не было, однако, экспрессия пар, включающих эту микроРНК, коррелировала с размером опухоли. Повышение экспрессии miR-150 при РЛ приводит к пролиферации и метастазированию клеток опухоли и было связано с плохой выживаемостью пациентов [619–622], а ее экспрессия в плазме крови пациентов коррелировала с эффективностью радиотерапии [623]. По полученным в данной работе данным экспрессия этой микроРНК была наоборот достоверно понижена в плазме крови больных РЛ. Другой микроРНК, контролирующей инвазию и пролиферацию клеток РЛ является miR-15b, экспрессия которой также часто deregulирована в ткани опухоли [601,624]. Ранее она уже предлагалась в качестве маркера НМКЛ на основе исследования ее уровня в плазме и

сыворотке крови [625,626]. Экспрессия miR-30e понижена в опухолевой ткани РЛ и ранее она была предложена в качестве маркера НМКЛ в сыворотке крови [625–627]. Среди онкосупрессорных микроРНК можно отметить miR-140 и miR-144 [628–633]. Причем, если miR-140 уже ранее предлагалась для использования в диагностике РЛ [601,634], то miR-144 впервые идентифицирована в таком качестве в данной работе. Интересна ситуация с miR-22, 3p и 5p цепи которой обе присутствуют в финальной панели, а отношение из экспрессии связано со стадией РЛ. Известно, что основная цепь miR-22-3p является опухолевым супрессором и ингибирует рост и метастазирование опухолевых клеток [635,636]. Точная роль второй цепи miR-22-5p в развитии РЛ неизвестна, однако ранее было показано, что ее концентрация повышена в сыворотке больных НМКЛ, что может указывать на ее связь с манифестацией опухолевого процесса. Изменение баланса экспрессии двух цепей этой микроРНК может являться последствием злокачественной трансформации клеток РЛ. МикроРНК miR-484, входящая в 4-е пары, скорее всего, является относительно стабильной микроРНК, так как данных о ее вовлеченности в патогенез РЛ не было представлено в современной литературе. При этом ряд микроРНК, которые ранее были предложены в качестве маркеров РЛ и были deregulированы в плазме больных РЛ по данным данного исследования, не вошли в финальную панель. Примером, такой микроРНК может служить miR-486, которая вовлечена в p53-зависимую регуляцию апоптоза [637] и ранее уже рассматривалась в контексте диагностики РЛ [601]. Отсутствие ее в финальной панели является результатом того, что она активно экспрессируется клетками эритропоэтического пути [638] и по данным нескольких групп ее экспрессия сильно зависима от сохранности клеточных элементов крови [530,561]. Поскольку, ее концентрация понижается в опухолевой ткани, такие изменения могут легко маскироваться суммарным эффектом пробоподготовки и физиологического состояния пациента (например, прием определенных препаратов и физическая нагрузка могут вызывать гемолиз). Таким образом, за исключением некоторых различий, полученные в работе данные хорошо согласуются с данными уже опубликованных исследований.

В процессе выполнения работы было выявлено несколько проблем, связанных с дизайном исследований, достоверностью и воспроизводимостью данных об экспрессии циркулирующих микроРНК, некоторые из которых уже привлекали внимание исследователей [11,550,639].

Методология исследования и анализа данных оказывает огромное влияние на результаты. Так, известно, что использование различных методов получения препаратов РНК и подходов к определению их концентрации могут сильно влиять на результат измерения [541,544,640]. Исследование разных фракций крови – сыворотки или плазмы, и

преимущественное выделение определенных фракций циркулирующих микроРНК – например, экзосомальной или связанной с белками – приводит к получению различных спектров циркулирующих микроРНК [215,582,641]. Изменение угла наклона (выполаживание) калибровочного графика в области низких концентраций может приводить к искусственному завышению разницы между исследуемой и контрольной группами, поэтому условия измерения концентрации микроРНК должны быть оптимизированы для конкретного набора мишеней и стартового количества РНК. Специфичность в разделении изоформ и родственных микроРНК (часто различающихся не более чем 1-2 нуклеотидами) также играет большую роль, особенно если концентрации таких микроРНК сравнимы или выше, чем концентрации маркерных микроРНК. Не менее важным фактором является и недостаток знаний об особенностях экспрессии циркулирующих микроРНК. Концентрация разных микроРНК в крови в разной степени чувствительна к различиям в методологии анализа и подвержена физиологическим изменениям в организме. Причем, если первое можно относительно легко оценить экспериментально, то факторы, определяющие вариабельность уровней микроРНК в крови, например особенности появления и клиренса микроРНК-содержащих комплексов, пока остаются мало изученными (например, механическое воздействие на опухоль при физической активности может влиять на эффективность кровотока). Это существенно затрудняет понимание того, какие изменения ассоциированы с болезнью, а какие – процессами, интегрированными в нормальную жизнедеятельность организма. Часто публикуемые различия в экспрессии между группами относительно невысоки (в пределах 0,5-1,5 Cq, что примерно соответствует 1,5 – 3-кратному изменению концентрации) при высокой вариации значений внутри групп, что исключает их применимость в качестве надежного диагностического критерия. Для того, чтобы избежать этих проблем необходима разработка четких критериев контроля качества образцов и оптимизация аналитических систем детекции микроРНК.

Формирование групп доноров является одним из важнейших этапов исследования. Причем, помимо численной репрезентативности выборок следует учитывать гетерогенность исследуемого онкологического заболевания и существующие доброкачественные опухолевые заболевания и предраковые состояния, а также потенциально воспалительные и инфекционные заболевания исследуемого органа. Так, объединение ПКРЛ и АКЛ в группу больных РЛ с одной стороны сокращает вероятность использования найденных маркеров для дифференциальной диагностики этих подтипов РЛ, однако, в контексте выявления РЛ в целом такой дизайн исследования более точно передает реальную ситуацию в клинической диагностике РЛ. Схожим образом, включение образцов больных эндобронхитом в контрольную группу позволяет отсеять кандидатов в биомаркеры, изменения в экспрессии которых возникают в

результате системных эффектов болезней легкого, а не именно злокачественной трансформации и развития РЛ. При помощи рационального использования смешанных выборок в формате слепого исследования можно более точно оптимизировать составляющие и параметры диагностических систем на стадии доклинического тестирования разработок. При этом такой подход является более сложным с точки зрения логистики исследования и формирования выборок пациентов и на сегодня почти не используется в практике. В целом проблема оптимального составления выборок в области исследования и разработки диагностических маркеров рака, в том числе на основе микроРНК, остается во многом не решенной [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование «жидкой биопсии» для диагностики онкологических заболеваний предполагает необходимость разработки стабильно функционирующих компонентов диагностической системы, в состав которых входят: протокол пробоподготовки, набор эффективных диагностических маркеров и аналитическая система для надежного определения их концентраций в диагностическом диапазоне [642]. В данной работе представлены данные о полном цикле предварительных исследований, направленных на создание такой системы. Предложен, разработан и охарактеризован метод выделения микроРНК из плазмы крови, не уступающий по эффективности существующему стандарту, и может быть использован в диагностических лабораториях. Получены данные об экспрессии микроРНК-маркеров выбранных исходя из литературных данных, исследована их диагностическая эффективность и возможность использования в практической онкодиагностике. В связи с тем, что использование этих маркеров и определяемого набором маркеров дизайна аналитических систем не позволяет осуществлять надежную диагностику РЛ, на следующем этапе работы был выполнен рациональный поиск маркеров РЛ при помощи масштабного анализа экспрессии микроРНК в плазме крови с последующей биоинформатической обработкой полученных данных. Предложен подход к оптимизации диагностической системы, и построению аналитических систем. Предложена диагностическая панель из 10-ти пар микроРНК (14 микроРНК) для выявления РЛ, в состав которой входят и некоторые микроРНК, выбранные из литературных данных и исследованные на втором этапе работы.

Полученные данные соответствуют современному состоянию знаний в области создания методов «жидкой биопсии» и находятся в согласии с мировыми тенденциями в области исследования циркулирующих микроРНК крови, что подтверждено публикациями в рейтинговых журналах. Так, полученные данные подкрепляют необходимость совершенствования и стандартизации процесса пробоподготовки, а также разработки более эффективного дизайна исследования, для повышения успешности работ по поиску и оценке диагностической пригодности микроРНК-маркеров [11].

Для разработки диагностической системы в работе были применены два подхода - иррациональный и рациональный. Явным преимуществом иррационального подхода представляется отсутствие необходимости проводить поиск биомаркеров в биологических образцах, и панель диагностических маркеров может быть собрана на основе мета-анализа доступных данных. Однако, в применении к циркулирующим микроРНК такой подход оказался не слишком успешным. Несмотря на очевидную значимость некоторых выбранных маркеров, например miR-19b и miR-183, результаты этого этапа работы показали, что использование

данных, полученных в результате разных исследований и с применением различных методик, не позволяет напрямую подбирать условия нормализации экспрессии микроРНК и эффективно формировать диагностические панели. Таким образом, возникает необходимость верифицировать заранее избыточные масштабные наборы микроРНК в одинаковых условиях, что возвращает исследование в русло рационального подхода. Такой подход позволяет в рамках одних и тех же условий оценить концентрацию значительного числа потенциальных биомаркеров, а также подобрать стратегию нормализации результатов и оптимизировать условия анализа данных, за счет чего становится возможным разработать более надежные и гибкие диагностические системы. Однако этот подход также является более время затратным и трудоемким, и для успеха такой работы требуется наличие отработанных методов пробоподготовки и анализа данных. В контексте данной работы стоит отметить частичное соответствие данных, полученных при помощи рационального и иррационального подходов. Так, miR-19b показала себя перспективным маркером РЛ в качестве одного из литературных маркеров, а позже была независимо выявлена в качестве маркера при анализе данных профилирования и вошла в финальную диагностическую панель. Другая микроРНК - miR-25 была несколько менее успешным маркером ПКРЛ в рамках иррационального подхода, а по результатам профилирования была включена в панель для верификации, однако в финальную модель не попала. Такие параллели между данными указывают на возможную состоятельность гибридных подходов к выбору онкомаркеров, сочетающих черты рационального и иррационального подходов.

Также можно отметить, что при пересечении ряда маркеров с перспективными диагностическими панелями для РЛ, предложенными Bianchi с соавторами и Voeri с соавторами [500,601,643]. В исследованиях Bianchi с соавторами фигурируют miR-22, miR-484, miR-374a, miR-133b, а miR-19b присутствует в нескольких панелях определенных Voeri с соавторами. Кроме того ряд микроРНК, выявленных в обзорном анализе данных об экспрессии микроРНК, например miR-486, miR-15b, а также различные микроРНК из семейств let-7, miR-30 и miR-29 встречаются в обоих исследованиях. В то же время, ряд маркеров присутствующих в финальной панели ранее не встречался в научной литературе в контексте диагностики РЛ. Такое положение дел является индикатором того, что потенциал микроРНК в качестве диагностических маркеров заболеваний человека далек от исчерпания, и при помощи интенсивных и экспансивных исследований их концентраций в биологических жидкостях можно выявить новые информативные молекулы или придать дополнительную значимость уже известным микроРНК. Очевидно, что для достижения этой цели необходимы более глубокие и интегральные методы анализа данных и разработки диагностических систем, которые могут

увеличить способность к дискриминации онкологических больных по сравнению с отдельными микроРНК. Кроме того, стоит уделять внимание изучению биологии и диагностической значимости уже выявленных микроРНК, в том числе с целью предоставления более точных данных для будущих мета-исследований. Применительно к данной работе, следующим этапом будет являться верификация отобранной диагностической панели на выборке, состоящей из клинически охарактеризованных больных НМКЛ, здоровых доноров, сравнимых по объему групп больных с предраковыми состояниями и инфекционными заболеваниями легкого, а также больных онкологическими заболеваниями других локализаций.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferlay J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 // *Int. J. Cancer*. 2015. Vol. 136, № 5. P. E359–E386.
2. Chang K. et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project // *Nat. Genet.* 2013. Vol. 45, № 10. P. 1113–1120.
3. Almeida M.I., Reis R.M., Calin G.A. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2011. Vol. 717, № 1–2. P. 1–8.
4. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. // *Cell*. 1993. Vol. 75, № 5. P. 843–854.
5. Calin G.A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99, № 24. P. 15524–15529.
6. Fabian M.R., Sonenberg N., Filipowicz W. Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs // *Annu. Rev. Biochem. Annual Reviews* , 2010. Vol. 79, № 1. P. 351–379.
7. Wilczynska A., Bushell M. The complexity of miRNA-mediated repression // *Cell Death Differ.* 2015. Vol. 22, № 1. P. 22–33.
8. Croce C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. // *Nature reviews. Genetics.* 2009. Vol. 10, № 10. P. 704–714.
9. Farazi T.A. et al. MicroRNAs in human cancer. // *Adv. Exp. Med. Biol. NIH Public Access*, 2013. Vol. 774. P. 1–20.
10. Montani F., Bianchi F. Circulating Cancer Biomarkers: The Macro-revolution of the Micro-RNA. 2016.
11. Sozzi G., Boeri M. Potential biomarkers for lung cancer screening. // *Transl. lung cancer Res.* 2014. Vol. 3, № 3. P. 139–148.
12. Reinhart B.J. et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. // *Nature*. 2000. Vol. 403, № 6772. P. 901–906.
13. Lee R.C. et al. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. // *Science. American Association for the Advancement of Science*, 2001. Vol. 294, № 5543. P. 862–864.
14. Lagos-Quintana M. et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. // *Science. American Association for the Advancement of Science*, 2001. Vol. 294, № 5543. P. 853–858.
15. Lau N.C. et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. // *Science. American Association for the Advancement of Science*,

2001. Vol. 294, № 5543. P. 858–862.
16. Axtell M.J., Westholm J.O., Lai E.C. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. // *Genome Biol. BioMed Central*, 2011. Vol. 12, № 4. P. 221.
 17. Griffiths-Jones S. et al. miRBase: tools for microRNA genomics. // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36, № Database issue. P. D154-8.
 18. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42, № Database issue. P. D68-73.
 19. Ying H. et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. // *Cell.* 2012. Vol. 149, № 3. P. 656–670.
 20. Han B.W. et al. Noncoding RNA. piRNA-guided transposon cleavage initiates Zucchini-dependent, phased piRNA production. // *Science. NIH Public Access*, 2015. Vol. 348, № 6236. P. 817–821.
 21. Hyun S. Small RNA Pathways That Protect the Somatic Genome. // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 2017. Vol. 18, № 5.
 22. Herrmann A. et al. CTLA4 aptamer delivers STAT3 siRNA to tumor-associated and malignant T cells. // *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation*, 2014. Vol. 124, № 7. P. 2977–2987.
 23. Kang S. et al. Silencing Daxx increases the anti-tumor activity of a TRAIL/shRNA Bcl-xL-expressing oncolytic adenovirus through enhanced viral replication and cellular arrest // *Cell. Signal.* 2015. Vol. 27, № 6. P. 1214–1224.
 24. Taft R.J. et al. The relationship between transcription initiation RNAs and CCCTC-binding factor (CTCF) localization. // *Epigenetics Chromatin. BioMed Central*, 2011. Vol. 4. P. 13.
 25. Ambros V. et al. A uniform system for microRNA annotation. // *RNA.* 2003. Vol. 9, № 3. P. 277–279.
 26. Griffiths-Jones S. et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. // *Nucleic Acids Res. Oxford University Press*, 2006. Vol. 34, № Database issue. P. D140-4.
 27. Umu S.U. et al. A comprehensive profile of circulating RNAs in human serum // *RNA Biol.* 2017. P. 1–9.
 28. Fromm B. et al. A Uniform System For The Annotation Of Human microRNA Genes And The Evolution Of The Human microRNAome HHS Public Access // *Annu Rev Genet Novemb.* 2015. Vol. 23, № 49. P. 213–242.
 29. Rodriguez A. et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. // *Genome Res.* 2004. Vol. 14, № 10A. P. 1902–1910.

30. Saini H.K., Enright A.J., Griffiths-Jones S. Annotation of mammalian primary microRNAs. // *BMC genomics*. 2008. Vol. 9. P. 564.
31. Campo-Paysaa F. et al. microRNA complements in deuterostomes: origin and evolution of microRNAs // *Evol. Dev.* Blackwell Publishing Inc, 2011. Vol. 13, № 1. P. 15–27.
32. Colaiacovo M. et al. On the complexity of miRNA-mediated regulation in plants: novel insights into the genomic organization of plant miRNAs. // *Biol. Direct*. 2012. Vol. 7. P. 15.
33. Saini H.K., Griffiths-Jones S., Enright A.J. Genomic analysis of human microRNA transcripts. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2007. Vol. 104, № 45. P. 17719–17724.
34. Fujita S., Iba H. Putative promoter regions of miRNA genes involved in evolutionarily conserved regulatory systems among vertebrates // *Bioinformatics*. 2008. Vol. 24, № 3. P. 303–308.
35. Marson A. et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. // *Cell*. NIH Public Access, 2008. Vol. 134, № 3. P. 521–533.
36. Oszolak F. et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. // *Genes Dev.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008. Vol. 22, № 22. P. 3172–3183.
37. Corcoran D.L. et al. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data // *PLoS One*. Public Library of Science, 2009. Vol. 4, № 4. P. e5279.
38. Wang D. et al. Cepred: Predicting the Co-Expression Patterns of the Human Intronic microRNAs with Their Host Genes // *PLoS One*. Public Library of Science, 2009. Vol. 4, № 2.
39. Monteys A.M. et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. // *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010. Vol. 16, № 3. P. 495–505.
40. Chien C.-H. et al. Identifying transcriptional start sites of human microRNAs based on high-throughput sequencing data. // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2011. Vol. 39, № 21. P. 9345–9356.
41. Ramalingam P. et al. Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. // *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014. Vol. 20, № 1. P. 76–87.
42. Yuan Z. et al. MicroRNA genes derived from repetitive elements and expanded by segmental duplication events in mammalian genomes. // *PLoS One*. Public Library of Science, 2011. Vol. 6, № 3. P. e17666.
43. Friedländer M.R. et al. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2012.

- Vol. 40, № 1. P. 37–52.
44. Ender C. et al. A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions.
 45. Pederson T. Regulatory RNAs derived from transfer RNA? // RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010. Vol. 16, № 10. P. 1865–1869.
 46. Ono M. et al. Identification of human miRNA precursors that resemble box C/D snoRNAs. // Nucleic Acids Res. Oxford University Press, 2011. Vol. 39, № 9. P. 3879–3891.
 47. Devor E.J. Primate MicroRNAs miR-220 and miR-492 Lie within Processed Pseudogenes // J. Hered. Oxford University Press, 2006. Vol. 97, № 2. P. 186–190.
 48. Grimson A. et al. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. // Nature. NIH Public Access, 2008. Vol. 455, № 7217. P. 1193–1197.
 49. Lewis B.P. et al. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets that they could have many more regulatory functions than those uncovered to date (Lagos-Quintana et al // Cell. 2003. Vol. 115. P. 787–798.
 50. Lim L.P. et al. Vertebrate microRNA genes // Science. 2003. Vol. 299, № 5612. P. 1540.
 51. Shin C. et al. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. // Mol. Cell. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 38, № 6. P. 789–802.
 52. Farh K.K.-H. The Widespread Impact of Mammalian MicroRNAs on mRNA Repression and Evolution // Science (80-.). 2005. Vol. 310, № 5755. P. 1817–1821.
 53. Stark A. et al. Animal MicroRNAs Confer Robustness to Gene Expression and Have a Significant Impact on 3 UTR Evolution.
 54. Sood P. et al. Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 2006. Vol. 103, № 8. P. 2746–2751.
 55. Dugaard I., Hansen T.B. Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs // Trends Genet. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 33, № 3. P. 208–219.
 56. Lee Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. // EMBO J. European Molecular Biology Organization, 2004. Vol. 23, № 20. P. 4051–4060.
 57. Cai X., Hagedorn C.H., Cullen B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. // RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. Vol. 10, № 12. P. 1957–1966.
 58. Ballarino M. et al. Coupled RNA Processing and Transcription of Intergenic Primary MicroRNAs // Mol. Cell. Biol. 2009. Vol. 29, № 20. P. 5632–5638.
 59. Borchert G.M., Lanier W., Davidson B.L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs // Nat. Struct. Mol. Biol. Nature Publishing Group, 2006. Vol. 13, № 12. P. 1097–1101.
 60. Baskerville S., Bartel D.P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression

- with neighboring miRNAs and host genes. // *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005. Vol. 11, № 3. P. 241–247.
61. Liang Y. et al. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. // *BMC Genomics*. BioMed Central, 2007. Vol. 8. P. 166.
 62. Chaulk S.G. et al. Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis // *RNA Biol*. 2011. Vol. 8, № 6. P. 1105–1114.
 63. Chakraborty S. et al. Pri-miR-17-92a transcript folds into a tertiary structure and autoregulates its processing. // *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. Vol. 18, № 5. P. 1014–1028.
 64. Denli A.M. et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex // *Nature*. 2004. Vol. 432, № 7014. P. 231–235.
 65. Lee Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.
 66. Roth B.M., Ishimaru D., Hennig M. The core microprocessor component DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8) is a nonspecific RNA-binding protein. // *J. Biol. Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2013. Vol. 288, № 37. P. 26785–26799.
 67. Han J. et al. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex.
 68. Maa H. et al. Lower and upper stem–single-stranded RNA junctions together determine the Drosha cleavage site // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110, № 51. P. 20687–20692.
 69. Castilla-Llorente V., Nicastro G., Ramos A. Terminal loop-mediated regulation of miRNA biogenesis: selectivity and mechanisms. // *Biochem. Soc. Trans.* Portland Press Ltd, 2013. Vol. 41, № 4. P. 861–865.
 70. Chen C.-Z. et al. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation // *Science* (80-). 2004. Vol. 303, № 5654. P. 83–86.
 71. Fang W., Bartel D.P. The Menu of Features that Define Primary MicroRNAs and Enable De Novo Design of MicroRNA Genes // *Mol. Cell*. 2015. Vol. 60. P. 131–145.
 72. Auyeung V.C. et al. Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. // *Cell*. NIH Public Access, 2013. Vol. 152, № 4. P. 844–858.
 73. Nicholson A.W. Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. Wiley-Blackwell, 2014. Vol. 5, № 1. P. 31–48.
 74. Zeng Y., Cullen B.R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, № 16. P. 4776–4785.
 75. Lund E. et al. Nuclear Export of MicroRNA Precursors // *Science* (80-). 2004. Vol. 303, № 5654. P. 95–98.

76. Yi R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. // *Genes Dev.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. Vol. 17, № 24. P. 3011–3016.
77. Bartel D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. // *Cell.* NIH Public Access, 2009. Vol. 136, № 2. P. 215–233.
78. Park J.-E. et al. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. // *Nature.* NIH Public Access, 2011. Vol. 475, № 7355. P. 201–205.
79. Gu S. et al. The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo. // *Cell.* NIH Public Access, 2012. Vol. 151, № 4. P. 900–911.
80. MacRae I. et al. Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer // *Science* (80-). 2006. Vol. 311, № 5758. P. 195–198.
81. Macrae I.J., Zhou K., Doudna J.A. Structural determinants of RNA recognition and cleavage.
82. Provost P. et al. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. // *EMBO J.* European Molecular Biology Organization, 2002. Vol. 21, № 21. P. 5864–5874.
83. Hammond S.M. Dicing and slicing // *FEBS Lett.* 2005. Vol. 579, № 26. P. 5822–5829.
84. Zhang H. et al. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. // *EMBO J.* European Molecular Biology Organization, 2002. Vol. 21, № 21. P. 5875–5885.
85. Kawamata T., Tomari Y. Making RISC // *Trends Biochem. Sci.* 2010. Vol. 35, № 7.
86. Nakanishi K. Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* John Wiley & Sons, Inc., 2016. Vol. 7, № 5. P. 637–660.
87. Schirle N.T., MacRae I.J. The crystal structure of human Argonaute2. // *Science.* NIH Public Access, 2012. Vol. 336, № 6084. P. 1037–1040.
88. Elkayam E. et al. The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. // *Cell.* Howard Hughes Medical Institute, 2012. Vol. 150, № 1. P. 100–110.
89. Jiang H. et al. Markov State Models Reveal a Two-Step Mechanism of miRNA Loading into the Human Argonaute Protein: Selective Binding followed by Structural Re-arrangement.
90. Jinek M., Doudna J.A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference // *Nature.* 2009. Vol. 457.
91. Swarts D.C. et al. The evolutionary journey of Argonaute proteins. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* NIH Public Access, 2014. Vol. 21, № 9. P. 743–753.
92. Faehnle C.R. et al. The Making of a Slicer: Activation of Human Argonaute-1.
93. Dueck A. et al. MicroRNAs associated with the different human Argonaute proteins // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, № 19. P. 9850–9862.

94. Iwasaki S. et al. Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes. 2010.
95. Iwasaki S. et al. Defining fundamental steps in the assembly of the *Drosophila* RNAi enzyme complex.
96. Miyoshi T. et al. A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*.
97. Khvorova A. et al. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. // *Cell*. Elsevier, 2003. Vol. 115, № 2. P. 209–216.
98. Schwarz D.S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex // *Cell*. 2003. Vol. 115, № 2. P. 199–208.
99. Suzuki H.I. et al. Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015. Vol. 22, № 7. P. 512–521.
100. Faehnle C.R. et al. The making of a slicer: activation of human Argonaute-1. // *Cell Rep.* Howard Hughes Medical Institute, 2013. Vol. 3, № 6. P. 1901–1909.
101. Nakanishi K. et al. Structure of yeast Argonaute with guide RNA // *Nature*. 2012. Vol. 486, № 7403. P. 368–374.
102. Kwak P.B., Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. Vol. 19, № 2.
103. Kato M. et al. Age-associated changes in expression of small, noncoding RNAs, including microRNAs, in *C. elegans*.
104. Potla R. et al. Shifts in temperature within the physiologic range modify strand-specific expression of select human microRNAs.
105. Guo L., Lu Z. The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: Implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? // *PLoS ONE*. 2010. Vol. 5, № 6.
106. Yang J.-S. et al. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. // *RNA (New York, N.Y.)*. 2011. Vol. 17, № 2. P. 312–326.
107. Almeida M.I. et al. Strand-Specific miR-28-5p and miR-28-3p Have Distinct Effects in Colorectal Cancer Cells.
108. Yang X. et al. Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion.
109. Yang J.-S., Lai E.C. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. // *Mol. Cell*. 2011. Vol. 43, № 6. P. 892–903.
110. Berezikov E. et al. Mammalian Mirtron Genes // *Mol. Cell*. 2007. Vol. 28, № 2. P. 328–336.
111. Ruby J.G., Jan C.H., Bartel D.P. Intronic microRNA precursors that bypass Droscha processing

- // Nature. 2007. Vol. 448, № 7149. P. 83–86.
112. Okamura K. et al. The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in *Drosophila* // Cell. 2007. Vol. 130, № 1. P. 89–100.
 113. Rasmussen K.D. et al. The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis // J. Exp. Med. 2010. Vol. 207, № 7. P. 1351–1358.
 114. Cheloufi S. et al. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis // Nature. 2010. Vol. 465, № 7298. P. 584–589.
 115. Cifuentes D. et al. A Novel miRNA Processing Pathway Independent of Dicer Requires Argonaute2 Catalytic Activity // Science (80-.). 2010. Vol. 328, № 5986. P. 1694–1698.
 116. Yoda M. et al. Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs. // Cell Rep. NIH Public Access, 2013. Vol. 5, № 3. P. 715–726.
 117. Ambros V. The functions of animal microRNAs // Nature. 2004. Vol. 431, № 7006. P. 350–355.
 118. Kloosterman W.P., Plasterk R.H.A. The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease // Dev. Cell. Elsevier Inc, 2006. Vol. 11, № 4. P. 441–450.
 119. Bartel D.P., Chen C.-Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs // Nat. Rev. Genet. 2004. Vol. 5, № 5. P. 396–400.
 120. Bartel D.P. Metazoan MicroRNAs // Cell. 2018. Vol. 173.
 121. Selbach M. et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. // Nature. 2008. Vol. 455, № 7209. P. 58–63.
 122. Baek D. et al. The impact of microRNAs on protein output // Nature. 2008. Vol. 455, № 7209. P. 64–71.
 123. Mukherji S. et al. MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression.
 124. Bartel D.P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions // Cell. 2009. Vol. 136, № 2. P. 215–233.
 125. Fang Z., Rajewsky N. The Impact of miRNA Target Sites in Coding Sequences and in 3'UTRs // PLoS One / ed. Deb S. 2011. Vol. 6, № 3. P. e18067.
 126. Bagga S. et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs Results in Target mRNA Degradation // Cell. 2005. Vol. 122. P. 553–563.
 127. Afonso-Grunz F., Müller S. Principles of miRNA–mRNA interactions: beyond sequence complementarity // Cell. Mol. Life Sci. 2015. Vol. 72, № 16. P. 3127–3141.
 128. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // Cell. 2005. Vol. 120, № 1. P. 15–20.
 129. Friedman R.C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. // Genome

- Res. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Vol. 19, № 1. P. 92–105.
130. Royo F. et al. Different EV enrichment methods suitable for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples. // *J. Extracell. vesicles*. 2016. Vol. 5. P. 29497.
 131. Garcia D.M. et al. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of *lscy-6* and other microRNAs. // *Nat. Struct. Mol. Biol. NIH Public Access*, 2011. Vol. 18, № 10. P. 1139–1146.
 132. Grimson A. A targeted approach to miRNA target identification // *Nat. Publ. Gr.* 2010. Vol. 7, № 411. P. 621–628.
 133. Bartel D.P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions // *Cell. NIH Public Access*, 2009. Vol. 136, № 2. P. 215–233.
 134. Chi S.W., Hannon G.J., Darnell R.B. An alternative mode of microRNA target recognition. // *Nat. Struct. Mol. Biol. NIH Public Access*, 2012. Vol. 19, № 3. P. 321–327.
 135. Helwak A. et al. Mapping the Human miRNA Interactome by CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding // *Cell. Elsevier*, 2013. Vol. 153, № 3. P. 654–665.
 136. Moore M.J. et al. miRNA-target chimeras reveal miRNA 3'-end pairing as a major determinant of Argonaute target specificity. // *Nat. Commun. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 6. P. 8864.
 137. Loeb G.B. et al. Transcriptome-wide miR-155 binding map reveals widespread noncanonical microRNA targeting. // *Mol. Cell*. 2012. Vol. 48, № 5. P. 760–770.
 138. Hafner M. et al. Genome-wide identification of miRNA targets by PAR-CLIP. // *Methods. NIH Public Access*, 2012. Vol. 58, № 2. P. 94–105.
 139. Martin H.C. et al. Imperfect centered miRNA binding sites are common and can mediate repression of target mRNAs. // *Genome Biol. BioMed Central*, 2014. Vol. 15, № 3. P. R51.
 140. Fang Z., Rajewsky N. The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. // *PLoS One. Public Library of Science*, 2011. Vol. 6, № 3. P. e18067.
 141. Gam J.J., Babb J., Weiss R. A mixed antagonistic/synergistic miRNA repression model enables accurate predictions of multi-input miRNA sensor activity // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 2430.
 142. Jens M., Rajewsky N. Competition between target sites of regulators shapes post-transcriptional gene regulation // *Nat. Publ. Gr.* 2014. Vol. 16.
 143. Guo L. et al. Integrative Analysis of miRNA-mRNA and miRNA-miRNA Interactions. *Hindawi Publishing Corporation*, 2014. Vol. 2014.
 144. Rong D. et al. An emerging function of circRNA-miRNAs-mRNA axis in human diseases //

- Oncotarget. 2017.
145. Leoni G., Tramontano A. A structural view of microRNA-target recognition. // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2016. Vol. 44, № 9. P. e82.
 146. Eulalio A., Triteschler F., Izaurralde E. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. // *RNA.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Vol. 15, № 8. P. 1433–1442.
 147. Yao B., Li S., Chan E.K.L. Function of GW182 and GW Bodies in siRNA and miRNA Pathways // *Ten Years Prog. GW/P Body Res. Adv. Exp. Med. Biol.* 2013. Vol. 768. P. 71–96.
 148. Huntzinger E. et al. The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41, № 2. P. 978–994.
 149. Collart M.A., Panasenko O.O. The Ccr4-Not complex // *Gene.* 2012. Vol. 492, № 1. P. 42–53.
 150. Wolf J., Passmore L.A. mRNA deadenylation by Pan2–Pan3: Figure 1 // *Biochem. Soc. Trans.* 2014. Vol. 42, № 1. P. 184–187.
 151. Presnyak V., Collier J. The DHH1/RCKp54 family of helicases: An ancient family of proteins that promote translational silencing // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 2013. Vol. 1829, № 8. P. 817–823.
 152. Collier J., Parker R. General Translational Repression by Activators of mRNA Decapping // *Cell.* 2005. Vol. 122, № 6. P. 875–886.
 153. Morozova N. et al. Kinetic signatures of microRNA modes of action // *RNA.* Cold Spring Harbor Lab, 2012. Vol. 18, № 9. P. 1635–1655.
 154. Fukaya T., Tomari Y. MicroRNAs Mediate Gene Silencing via Multiple Different Pathways in *Drosophila* // *Mol. Cell.* 2012. Vol. 48. P. 825–836.
 155. Larsson O., Nadon R. Re-analysis of genome wide data on mammalian microRNA-mediated suppression of gene expression // *Translation.* 2013. Vol. 1, № 1. P. e24557.
 156. Fabian M.R. et al. Mammalian miRNA RISC Recruits CAF1 and PABP to Affect PABP-Dependent Deadenylation // *Mol. Cell.* 2009. Vol. 35, № 6. P. 868–880.
 157. Djuranovic S., Nahvi A., Green R. miRNA-Mediated Gene Silencing by Translational Repression Followed by mRNA Deadenylation and Decay // *Science (80-.).* 2012. Vol. 336, № 6078. P. 237–240.
 158. Eichhorn S.W. et al. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues // *Mol Cell.* 2014. Vol. 56, № 1. P. 104–115.
 159. Meijer H.A. et al. Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. // *Science.* American Association for the Advancement of Science,

2013. Vol. 340, № 6128. P. 82–85.
160. Rehwinkel J. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing // *RNA*. 2005. Vol. 11, № 11. P. 1640–1647.
161. Valencia-Sanchez M.A. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs // *Genes Dev*. 2006. Vol. 20, № 5. P. 515–524.
162. Fukaya T., Tomari Y. PABP is not essential for microRNA-mediated translational repression and deadenylation in vitro // *EMBO J*. 2011. Vol. 30426. P. 4998–5009.
163. Yang Z., Wang L. Regulation of microRNA expression and function by nuclear receptor signaling. // *Cell & bioscience*. 2011. Vol. 1, № 1. P. 31.
164. Finnegan E.F., Pasquinelli A.E. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* NIH Public Access, 2013. Vol. 48, № 1. P. 51–68.
165. Eiring A.M. et al. miR-328 Functions as an RNA Decoy to Modulate hnRNP E2 Regulation of mRNA Translation in Leukemic Blasts // *Cell*. 2010. Vol. 140, № 5. P. 652–665.
166. Pitchiaya S. et al. Resolving Subcellular miRNA Trafficking and Turnover at Single-Molecule Resolution // *Cell Rep*. 2017. Vol. 19, № 3. P. 630–642.
167. Davis-Dusenbery B.N., Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. // *J. Biochem.* Oxford University Press, 2010. Vol. 148, № 4. P. 381–392.
168. Ha M., Kim V.N. Regulation of microRNA biogenesis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 15, № 8. P. 509–524.
169. Guo L., Chen F. A challenge for miRNA: Multiple isomiRs in miRNAomics // *Gene*. Elsevier B.V., 2014. Vol. 544, № 1. P. 1–7.
170. Chiang H.R. et al. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes // *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010. Vol. 24, № 10. P. 992–1009.
171. Kim B., Jeong K., Kim V.N. Genome-wide Mapping of DROSHA Cleavage Sites on Primary MicroRNAs and Noncanonical Substrates // *Mol. Cell*. Elsevier Inc., 2017. Vol. 66, № 2. P. 258–269.e5.
172. Liu X. et al. A MicroRNA Precursor Surveillance System in Quality Control of MicroRNA Synthesis // *Mol. Cell*. 2014. Vol. 55. P. 868–879.
173. Heale B.S.E., Keegan L.P., O’Connell M.A. The effect of RNA editing and ADARs on miRNA biogenesis and function // *Adv. Exp. Med. Biol*. 2010. Vol. 700. P. 76–84.
174. Morin R.D. et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. // *Genome Res*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008. Vol. 18, № 4. P. 610–621.

175. Lee L.W. et al. Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing. // *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010. Vol. 16, № 11. P. 2170–2180.
176. Grimm D. et al. Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver // *J. Clin. Invest.* 2010. Vol. 120, № 9. P. 3106–3119.
177. Hansen T.B. et al. Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 7. P. 11538.
178. Stagsted L.V.W., Daugaard I., Hansen T.B. The agoTRons: Gene regulators or Argonaute protectors? // *BioEssays*. 2017. Vol. 39, № 4. P. 1600239.
179. Rodova M. et al. Remarkable sequence conservation of the last intron in the PKD1 gene. // *Mol. Biol. Evol.* 2003. Vol. 20, № 10. P. 1669–1674.
180. Smibert P. et al. Homeostatic control of Argonaute stability by microRNA availability. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* Nature Publishing Group, 2013. Vol. 20, № 7. P. 789–795.
181. Martinez N.J., Gregory R.I. Argonaute2 expression is post-transcriptionally coupled to microRNA abundance. // *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013. Vol. 19, № 5. P. 605–612.
182. Ciafrè S.A., Galardi S. microRNAs and RNA-binding proteins: a complex network of interactions and reciprocal regulations in cancer. // *RNA Biol.* 2013. Vol. 10, № 6. P. 935–942.
183. Kartha R. V., Subramanian S. Competing endogenous RNAs (ceRNAs): New entrants to the intricacies of gene regulation // *Front. Genet.* 2014. Vol. 5, № JAN. P. 1–9.
184. Memczak S. et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency // *Nature*. Nature Publishing Group, 2013. Vol. 495, № 7441. P. 333–338.
185. Denzler R. et al. Assessing the ceRNA Hypothesis with Quantitative Measurements of miRNA and Target Abundance // *Mol. Cell.* 2014. Vol. 54, № 5. P. 766–776.
186. Thomson D.W., Dinger M.E. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy // *Nat. Rev. Genet.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 17, № 5. P. 272–283.
187. Gantier M.P. et al. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39, № 13. P. 5692–5703.
188. Krol J. et al. Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. // *Cell*. 2010. Vol. 141, № 4. P. 618–631.
189. Okamura K. et al. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008. Vol. 15, № 4. P. 354–363.
190. Avril-Sassen S. et al. Characterisation of microRNA expression in post-natal mouse mammary gland development // *BMC Genomics*. 2009. Vol. 10, № 1. P. 548.
191. Kato M. et al. Dynamic expression of small non-coding RNAs, including novel microRNAs and

- piRNAs/21U-RNAs, during *Caenorhabditis elegans* development // *Genome Biol.* 2009. Vol. 10, № 5. P. R54.
192. Chatterjee S. et al. Target-Mediated Protection of Endogenous MicroRNAs in *C. elegans* // *Dev. Cell.* 2011. Vol. 20, № 3. P. 388–396.
193. Bitetti A. et al. MicroRNA degradation by a conserved target RNA regulates animal behavior // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018.
194. Ameres S.L. et al. Target RNA-Directed Trimming and Tailing of Small Silencing RNAs // *Science* (80-.). 2010. Vol. 328, № 5985. P. 1534–1539.
195. Stroun M. et al. Presence of RNA in the Nucleoprotein Complex Spontaneously Released by Human Lymphocytes and Frog Auricles in Culture // *Cancer Res.* 1978. Vol. 38, № 10. P. 3546–3554.
196. Lo K.W. et al. Analysis of cell-free Epstein-Barr virus-associated RNA in the plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma // *Clin. Chem.* 1999. Vol. 45, № 8 I. P. 1292–1294.
197. Zaporozhchenko I.A. et al. The potential of circulating cell-free RNA as a cancer biomarker: challenges and opportunities // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2018. Vol. 18, № 2.
198. Weber J.A. et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids // *Clin. Chem.* 2010. Vol. 56, № 11. P. 1733–1741.
199. Lawrie C.H. et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma // *Br. J. Haematol.* Blackwell Publishing Ltd, 2008. Vol. 141, № 5. P. 672–675.
200. Cortez M.A. et al. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011. Vol. 8, № 8. P. 467–477.
201. Fabbri M. MicroRNAs and miRceptors: a new mechanism of action for intercellular communication // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2018. Vol. 373, № 1737. P. 20160486.
202. Turchinovich A. et al. Check and mate to exosomal extracellular miRNA: new lesson from a new approach. // *Front. Mol. Biosci.* Frontiers Media SA, 2015. Vol. 2. P. 11.
203. Turchinovich A., Weiz L., Burwinkel B. Extracellular miRNAs: The mystery of their origin and function // *Trends in Biochemical Sciences.* 2012. Vol. 37, № 11. P. 460–465.
204. Chevillet J.R. et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Vol. 111, № 41. P. 14888–14893.
205. Houck J.C., Berman L.B. Serum Ribonuclease Activity // *J Appl Physiol.* 1958. Vol. 12, № 3. P. 473–476.
206. Reddi K.K., Holland J.F. Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 1976. Vol. 73, № 7. P. 2308–

- 2310.
207. Koczera P. et al. The ribonuclease a superfamily in humans: Canonical RNases as the buttress of innate immunity // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 2016. Vol. 17, № 8.
208. Hynle I., Meuffels M., Poznanski W.J. Determination of Phosphodiesterase I Activity in Human Blood Serum // *Clin. Chem.* 1975. Vol. 2110, № 10. P. 1383–1387.
209. Lüthje J., Ogilvie A. 5'-Nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in human serum: quantitative measurement and some biochemical properties. // *Clin. Chim. Acta.* 1987. Vol. 164, № 3. P. 275–284.
210. Bryzgunova O.E., Laktionov P.P. Extracellular Nucleic Acids in Urine: Sources, Structure, Diagnostic Potential // *Acta Naturae. Park Media*, 2015. Vol. 7, № 3. P. 48–54.
211. Tsui N.B.Y., Ng E.K.O., Lo Y.M.M.D. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma // *Clin. Chem. Clinical Chemistry*, 2002. Vol. 48, № 10. P. 1647–1653.
212. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-A survey // *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer. Elsevier*, 2007. Vol. 1775, № 1. P. 181–232.
213. Turchinovich A. et al. Characterization of extracellular circulating microRNA // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39, № 16. P. 7223–7233.
214. Arroyo J.D. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108, № 12. P. 5003–5008.
215. Turchinovich A., Burwinkel B. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. // *RNA Biol.* 2012. Vol. 9, № 8. P. 1066–1075.
216. Martino F. et al. Circulating microRNAs are not eliminated by hemodialysis // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 6.
217. Wang K. et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells // *Nucleic Acids Res.* 2010. Vol. 38, № 20. P. 7248–7259.
218. Janas M.M. et al. Alternative RISC assembly: binding and repression of microRNA-mRNA duplexes by human Ago proteins. // *RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2012. Vol. 18, № 11. P. 2041–2055.
219. Stalder L. et al. The rough endoplasmic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing. // *EMBO J. European Molecular Biology Organization*, 2013. Vol. 32, № 8. P. 1115–1127.
220. Flores O. et al. Differential RISC association of endogenous human microRNAs predicts their

- inhibitory potential // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42, № 7.
221. Zealy R.W. et al. microRNA-binding proteins: specificity and function // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2017. Vol. 8, № 5. P. 1–8.
222. Li L. et al. Argonaute 2 Complexes Selectively Protect the Circulating MicroRNAs in Cell-Secreted Microvesicles // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 10. P. 1–9.
223. Agapov I.I. et al. The role of structural domains in RIP II toxin model membrane binding // *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies*, 1997. Vol. 402, № 1. P. 91–93.
224. Pohl P. et al. Membrane fusion mediated by ricin and viscumin // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1998. Vol. 1371, № 1. P. 11–16.
225. Skipski V.P. et al. Lipid Composition of Human Serum Lipoproteins // *Biochem. J.* 1967. Vol. 104.
226. Kontush A. et al. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2015. Vol. 224. P. 3–51.
227. Vickers K.C. et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins // *Nat. Cell Biol.* 2011. Vol. 13, № 4. P. 423–433.
228. Wagner J. et al. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013. Vol. 33, № 6. P. 1392–1400.
229. Niculescu L.S. et al. MiR-486 and miR-92a identified in circulating HDL discriminate between stable and vulnerable coronary artery disease patients // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 10.
230. Tan Y. et al. Serum MiRNA panel as potential biomarkers for chronic hepatitis B with persistently normal alanine aminotransferase // *Clin. Chim. Acta.* 2015. Vol. 451. P. 232–239.
231. Zhang Y. et al. Plasma MicroRNA-122 as a Biomarker for Viral-, Alcohol-, and Chemical-Related Hepatic Diseases // *Clin. Chem.* 2010. Vol. 56, № 12. P. 1830–1838.
232. Boon R. a., Vickers K.C. Intercellular transport of MicroRNAs // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013. Vol. 33. P. 186–192.
233. Michell D.L., Vickers K.C. Lipoprotein carriers of microRNAs // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 2016. Vol. 1861, № 12. P. 2069–2074.
234. Lee H. et al. Hepatic siRNA delivery using recombinant human apolipoprotein A-I in mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. Vol. 378. P. 192–196.
235. Tabet F. et al. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. // *Nat. Commun.* 2014. Vol. 5. P. 3292.
236. Zaporozhchenko I.A. et al. A phenol-free method for isolation of microRNA from biological fluids // *Anal. Biochem.* 2015. Vol. 479. P. 43–47.
237. Lekchnov E.A. et al. Protocol for miRNA isolation from biofluids // *Anal. Biochem.* 2016. Vol.

499. P. 78–84.
238. Crescitelli R. et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes // *J. Extracell. Vesicles*. 2013. Vol. 2, № 1.
239. Sedgwick A.E., D'Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles // *Traffic*. 2018. № November 2017. P. 319–327.
240. Johnstone R.M. et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). // *J. Biol. Chem*. 1987. Vol. 262, № 19. P. 9412–9420.
241. Yu S. et al. Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6, № 35.
242. Caby M.-P. et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma // *Int. Immunol*. 2005. Vol. 17, № 7. P. 879–887.
243. Vella L. et al. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing // *J. Pathol*. 2007. Vol. 211, № 5. P. 582–590.
244. Pisitkun T., Shen R.-F., Knepper M.A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2004. Vol. 101, № 36. P. 13368–13373.
245. Kohlhapp F.J. et al. MicroRNAs as mediators and communicators between cancer cells and the tumor microenvironment. // *Oncogene*. 2015. Vol. 34, № 48. P. 5857–5868.
246. Yáñez-Mó M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions // *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015. Vol. 4, № 2015.
247. Van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2018. Vol. 19, № 4. P. 213–228.
248. Record M. et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiological processes // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 2014. Vol. 1841, № 1. P. 108–120.
249. Théry C., Zitvogel L., Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function // *Nat. Rev. Immunol*. 2002. Vol. 2, № 8. P. 569–579.
250. Théry C., Ostrowski M., Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses // *Nat. Rev. Immunol*. 2009. Vol. 9, № 8. P. 581–593.
251. Simpson R.J. et al. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential // *Expert Rev. Proteomics*. 2009. Vol. 6, № 3. P. 267–283.
252. Théry C. et al. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. // *J. Cell Biol*. Rockefeller University Press, 1999. Vol. 147, № 3. P. 599–610.

253. Wolfers J. et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming // *Nat. Med.* Nature Publishing Group, 2001. Vol. 7, № 3. P. 297–303.
254. Schorey J.S., Bhatnagar S. Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology // *Traffic*. Wiley/Blackwell (10.1111), 2008. Vol. 9, № 6. P. 871–881.
255. Fevrier B. et al. Cells release prions in association with exosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Academy of Sciences*, 2004. Vol. 101, № 26. P. 9683–9688.
256. Rajendran L. et al. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2006. Vol. 103, № 30. P. 11172–11177.
257. Zaporozhchenko I.A. et al. The potential of circulating cell-free RNA as a cancer biomarker: challenges and opportunities // *Expert Rev. Mol. Diagn.* Taylor & Francis, 2018. Vol. 0, № 0. P. 14737159.2018.1425143.
258. Kalra H. et al. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation // *PLoS Biol.* 2012. Vol. 10, № 12.
259. Kim D.-K. et al. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research // *Bioinformatics*. 2015. Vol. 31, № 6. P. 933–939.
260. Keerthikumar S. et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo // *J. Mol. Biol.* 2016. Vol. 428, № 4. P. 688–692.
261. Valadi H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // *Nat. Cell Biol.* 2007. Vol. 9, № 6. P. 654–659.
262. Mitchell P.S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105, № 30. P. 10513–10518.
263. Gallo A. et al. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 3. P. e30679.
264. Arenaccio C., Federico M. The Multifaceted Functions of Exosomes in Health and Disease: An Overview // *Exosomes in Cardiovascular Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology* / ed. Xiao J., Cretoiu S. Springer, Singapore, 2017. P. 3–19.
265. Guduric-Fuchs J. et al. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types // *BMC Genomics*. 2012. Vol. 13, № 1. P. 1.
266. Waldenström A. et al. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 4. P. e34653.
267. D'Souza-Schorey C., Clancy J.W. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers // *Genes Dev.* 2012. Vol. 26,

- № 12. P. 1287–1299.
268. Yuan A. et al. Transfer of MicroRNAs by Embryonic Stem Cell Microvesicles // *PLoS One* / ed. Lewin A. 2009. Vol. 4, № 3. P. e4722.
269. Janas T. et al. Mechanisms of RNA loading into exosomes // *FEBS Lett.* 2015. Vol. 589, № 13. P. 1391–1398.
270. Gibbings D.J. et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity // *Nat. Cell Biol.* 2009. Vol. 11, № 9. P. 1143–1149.
271. Squadrito M.L. et al. Endogenous RNAs Modulate MicroRNA Sorting to Exosomes and Transfer to Acceptor Cells // *Cell Rep.* 2014. Vol. 8, № 5. P. 1432–1446.
272. Koppers-Lalic D. et al. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes // *Cell Rep.* 2014. Vol. 8, № 6.
273. Mukherjee K. et al. Reversible HuR-microRNA binding controls extracellular export of miR-122 and augments stress response // *EMBO Rep.* 2016. Vol. 17. P. 1184–1203.
274. Villarroya-Beltri C. et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs // *Nat. Commun.* 2013. Vol. 4.
275. Hobor F. et al. A cryptic RNA-binding domain mediates Syncrip recognition and exosomal partitioning of miRNA targets // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9, № 1.
276. Santangelo L. et al. The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting // *CellReports.* 2016. Vol. 17. P. 799–808.
277. Bang C. et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy // *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation*, 2014. Vol. 124, № 5. P. 2136–2146.
278. Becker A. et al. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis // *Cancer Cell.* 2016. Vol. 30, № 6. P. 836–848.
279. Xu R. et al. Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2018.
280. Graner M.W., Schnell S., Olin M.R. Tumor-derived exosomes, microRNAs, and cancer immune suppression // *Semin. Immunopathol.* 2018.
281. Bei Y. et al. Exosomes-based biomarkers for the prognosis of cardiovascular diseases // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer, Singapore, 2017. Vol. 998. P. 71–88.
282. Schwarzenbach H. et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 11, № 3. P. 145–156.
283. Skog J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour

- growth and provide diagnostic biomarkers // *Nat. Cell Biol.* 2008. Vol. 10, № 12. P. 1470–1476.
284. Chiba M., Kimura M., Asari S. Exosomes secreted from human colorectal cancer cell lines contain mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs, that can transfer into the human hepatoma HepG2 and lung cancer A549 cell lines // *Oncol. Rep.* Spandidos Publications, 2012. Vol. 28, № 5. P. 1551–1558.
285. Yang M. et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells // *Mol. Cancer.* 2011. Vol. 10, № 1. P. 117.
286. Melo S.A. et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. // *Cancer Cell.* 2014. Vol. 26, № 5. P. 707–721.
287. Li M. et al. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2014. Vol. 369, № 1652. P. 20130502–20130502.
288. Willms E. et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6.
289. Fernando M.R. et al. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes // *PLoS One* / ed. Camussi G. 2017. Vol. 12, № 8. P. e0183915.
290. Sarasin-Filipowicz M. et al. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy // *Nat. Med.* 2009. Vol. 15, № 1. P. 31–33.
291. Brown B.D. et al. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state // *Nat. Biotechnol.* 2007. Vol. 25, № 12. P. 1457–1467.
292. Frey B., Gaipf U.S. The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles // *Semin. Immunopathol.* Springer-Verlag, 2011. Vol. 33, № 5. P. 497–516.
293. Kastelowitz N., Yin H. Exosomes and Microvesicles: Identification and Targeting By Particle Size and Lipid Chemical Probes // *ChemBioChem.* 2014. Vol. 15, № 7. P. 923–928.
294. Crescitelli R. et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes // *J. Extracell. Vesicles.* Taylor & Francis, 2013. Vol. 2. P. 1–10.
295. Hunter M.P. et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles // *PLoS One.* 2008. Vol. 3, № 11.
296. Colombo M., Raposo G., Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Annual Reviews, 2014. Vol. 30, № 1. P. 255–289.
297. Muhsin-Sharafaldine M.-R., McLellan A.D. Tumor-Derived Apoptotic Vesicles: With Death

- They Do Part // *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9, № 9.
298. Halicka H.D., Bedner E., Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. // *Exp. Cell Res.* 2000. Vol. 260, № 2. P. 248–256.
299. Jiang L. et al. Determining the contents and cell origins of apoptotic bodies by flow cytometry.
300. Grimsley C. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals // *Trends Cell Biol.* 2003. Vol. 13, № 12. P. 648–656.
301. Zernecke A. et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. // *Sci. Signal.* 2009. Vol. 2, № 100. P. ra81.
302. Huang W. et al. Site-specific RNase A activity was dramatically reduced in serum from multiple types of cancer patients // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 5.
303. Spencer J.D. et al. An endogenous ribonuclease inhibitor regulates the antimicrobial activity of ribonuclease 7 in the human urinary tract // *Kidney Int.* 2014. Vol. 85, № 5. P. 1179–1191.
304. Ohashi A. et al. Analysis of the expression and localization of RNase and RNase inhibitor in blood cells and vascular endothelial cells involved in homeostasis in the vascular system // *J. Thromb. Haemost.* 2015. Vol. 13. P. 575.
305. Poon I.K.H. et al. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. Vol. 14, № 3. P. 166–180.
306. Smyth T. et al. Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes // *J. Control. Release.* 2015. Vol. 199, № 199. P. 145–155.
307. Takahashi Y. et al. Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection // *J. Biotechnol.* 2013. Vol. 165, № 2. P. 77–84.
308. Marsh J.B., Welty F.K., Schaefer E.J. Stable isotope turnover of apolipoproteins of high-density lipoproteins in humans // *Curr. Opin. Lipidol.* 2000. Vol. 11, № 3. P. 261–266.
309. Watts G.F., Moroz P., Barrett P.H.R. Kinetics of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in normolipidemic subjects: Pooled analysis of stable-isotope studies // *Metabolism.* W.B. Saunders, 2000. Vol. 49, № 9. P. 1204–1210.
310. Kuai R. et al. High-Density Lipoproteins: Nature's Multifunctional Nanoparticles // *ACS Nano.* 2016. Vol. 10, № 3. P. 3015–3041.
311. Eisenberg S., Windmueller H.G., Levy R.I. Metabolic fate of rat and human lipoprotein apoproteins in the rat. // *J. Lipid Res.* 1973. Vol. 14, № 4. P. 446–458.
312. Tang L. et al. Pharmacokinetic aspects of biotechnology products // *J. Pharm. Sci.* 2004. Vol. 93, № 9. P. 2184–2204.

313. Bala S. et al. Biodistribution and function of extracellular miRNA-155 in mice // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 10721.
314. Turchinovich A. et al. Circulating miRNAs: Cell-cell communication function? // *Frontiers in Genetics.* 2013. Vol. 4, № JUN.
315. Tkach M., Kowal J., Théry C. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2018. Vol. 373, № 1737. P. 20160479.
316. Lötvall J. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles // *J. Extracell. Vesicles.* 2014. Vol. 3, № 1. P. 26913.
317. Tosar J.P. et al. Ribonucleic artefacts: are some extracellular RNA discoveries driven by cell culture medium components? // *J. Extracell. Vesicles.* 2017. Vol. 6, № 1.
318. Mateescu B., Kowal E.J.K. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA – an ISEV position paper // *J. Extracell. Vesicles.* 2017. Vol. 6, № 1.
319. Calin G.A. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. Vol. 101, № 9. P. 2999–3004.
320. Zhang L. et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer.
321. Costinean S. et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E -miR155 transgenic mice // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. Vol. 103, № 18. P. 7024–7029.
322. Mu P. et al. Genetic dissection of the miR-17 92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas // *Genes Dev.* 2009. Vol. 23, № 24. P. 2806–2811.
323. Garzon R. et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia // *Blood. American Society of Hematology,* 2008. Vol. 111, № 6. P. 3183–3189.
324. Xiao C. et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes // *Nat. Immunol.* 2008. Vol. 9, № 4. P. 405–414.
325. Croce C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer // *Nat. Rev. Genet.* 2009. Vol. 10, № 10. P. 704–714.
326. Iorio M. V., Croce C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review // *EMBO Mol. Med.* 2012. Vol. 4, № 3. P. 143–159.
327. Iorio M. V., Croce C.M. microRNA involvement in human cancer // *Carcinogenesis.* 2012. Vol. 33, № 6. P. 1126–1133.
328. Kumar Palanichamy J. et al. miRNA dysregulation in cancer: towards a mechanistic

- understanding // *Front. Genet.* 2014. Vol. 5. P. 1–10.
329. Fletcher Jones M., Lal A. MicroRNAs, wild-type and mutant p53 More questions than answers // *RNA Biol.* 2012. Vol. 96. P. 781–791.
330. Wang S.E., Lin R.-J. MicroRNA and HER2-overexpressing Cancer.
331. Leivonen S.-K. et al. High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth. 2013.
332. Liu B. et al. MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease.* 2012. Vol. 1822, № 11. P. 1692–1704.
333. Tian L. et al. Four MicroRNAs Promote Prostate Cell Proliferation with Regulation of PTEN and Its Downstream Signals In Vitro // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 9. P. e75885.
334. Mori M. Hippo Signaling Regulates Microprocessor and Links Cell-Density-Dependent miRNA Biogenesis to Cancer // *Cell.* 2014. Vol. 156.
335. Li N., Xie C., Lu N. Crosstalk between Hippo signalling and miRNAs in tumour progression // *FEBS J.* 2017. Vol. 284, № 7. P. 1045–1055.
336. Zhang Y. et al. Emerging Role of MicroRNAs in mTOR Signaling // *Cell. Mol. Life Sci.* Springer International Publishing, 2017. P. 1–13.
337. Jacobsen A. et al. Analysis of microRNA-target interactions across diverse cancer types // *Nat. Publ. Gr.* 2013. Vol. 20.
338. He M. et al. MicroRNAs, DNA Damage Response, and Cancer Treatment // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17, № 12. P. 2087.
339. Bottai G. et al. Targeting the microRNA-regulating DNA damage/repair pathways in cancer // *Expert Opin. Biol. Ther.* Taylor & Francis, 2014. Vol. 14, № 11. P. 1667–1683.
340. Wang W., Zhang E., Lin C. MicroRNAs in tumor angiogenesis // *Life Sci.* Elsevier Inc., 2015. Vol. 136. P. 28–35.
341. Li Y. et al. MiRNA-29b suppresses tumor growth through simultaneously inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by targeting Akt3 // *Cancer Lett.* Elsevier Ltd, 2017. Vol. 397. P. 111–119.
342. Berindan-Neagoe I., Calin G.A. Molecular Pathways: microRNAs, Cancer Cells, and Microenvironment // *Clin. Cancer Res.* 2014. Vol. 20, № 24. P. 6247–6253.
343. Lu J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers // *Nature.* 2005. Vol. 435, № 7043. P. 834–838.
344. Volinia S. et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. Vol. 103, № 7. P. 2257–2261.

345. Rosenfeld N. et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin // *Nat. Biotechnol.* 2008. Vol. 26, № 4. P. 462–469.
346. Cheerla N., Gevaert O. MicroRNA based Pan-Cancer Diagnosis and Treatment Recommendation. // *BMC Bioinformatics*. BioMed Central, 2017. Vol. 18, № 1. P. 32.
347. Telonis A.G. et al. Knowledge about the presence or absence of miRNA isoforms (isomiRs) can successfully discriminate amongst 32 TCGA cancer types // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 10. P. 2973–2985.
348. Blenkiron C. et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype // *Genome Biol.* 2007. Vol. 8, № 10. P. R214.
349. Sempere L.F. et al. Altered MicroRNA Expression Confined to Specific Epithelial Cell Subpopulations in Breast Cancer // *Cancer Res.* American Association for Cancer Research, 2007. Vol. 67, № 24. P. 11612–11620.
350. Ma J. et al. Characterization of microRNA transcriptome in lung cancer by next-generation deep sequencing // *Mol. Oncol.* 2014. Vol. 8. P. 1208–1219.
351. Zhang Y.-K. et al. miRNAs expression profiling to distinguish lung squamous-cell carcinoma from adenocarcinoma subtypes // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2012. Vol. 138, № 10. P. 1641–1650.
352. Hamamoto J. et al. Identification of microRNAs differentially expressed between lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma // *Mol. Med. Rep.* 2013. Vol. 8, № 2. P. 456–462.
353. Yan T.T. et al. miR-508 defines the stem-like/mesenchymal subtype in colorectal cancer // *Cancer Res.* 2018. Vol. 78, № 7. P. 1751–1765.
354. Alessandrini L. et al. Proposed Molecular and miRNA Classification of Gastric Cancer // *Int. J. Mol. Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2018. Vol. 19, № 6. P. 1683.
355. Li Y., Bai W., Zhang X. Identifying heterogeneous subtypes of gastric cancer and subtype-specific subpaths of microRNA-target pathways // *Mol. Med. Rep.* 2017. Vol. 17. P. 3583–3590.
356. Thomson J.M. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer // *Genes Dev.* 2006. Vol. 20, № 16. P. 2202–2207.
357. He L. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene.
358. Lu Y. et al. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells // *Dev. Biol.* 2007. Vol. 310, № 2. P. 442–453.
359. Ventura A. et al. Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the miR-

- 17w92 Family of miRNA Clusters // *Cell*. 2008. P. 875–886.
360. Jin H.Y. et al. MicroRNA-17~92 plays a causative role in lymphomagenesis by coordinating multiple oncogenic pathways // *EMBO J*. 2013. Vol. 32, № 17. P. 2377–2391.
361. Sandhu S.K. et al. B-cell malignancies in microRNA E μ -miR-17~92 transgenic mice.
362. Ota A. et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. // *Cancer Res. American Association for Cancer Research*, 2004. Vol. 64, № 9. P. 3087–3095.
363. Takakura S. et al. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells // *Cancer Sci*. 2008. Vol. 99, № 6. P. 1147–1154.
364. Hayashita Y. et al. A Polycistronic MicroRNA Cluster, miR-17-92, Is Overexpressed in Human Lung Cancers and Enhances Cell Proliferation // *Cancer Res. American Association for Cancer Research*, 2005. Vol. 65, № 21. P. 9628–9632.
365. Tsuchida A. et al. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer // *Cancer Sci. Wiley/Blackwell* (10.1111), 2011. Vol. 102, № 12. P. 2264–2271.
366. Olive V. et al. A component of the mir-17-92 polycistronic oncomir promotes oncogene-dependent apoptosis. // *Elife*. 2013. Vol. 2. P. e00822.
367. Olive V. et al. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92 // *Genes Dev*. 2009. Vol. 23, № 24. P. 2839–2849.
368. Fan Y. et al. miR-19b promotes tumor growth and metastasis via targeting TP53. // *Rna*. 2014. Vol. 20, № 6. P. 765–772.
369. Mavrakis K.J. et al. Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia // *Nat. Cell Biol*. 2010. Vol. 12, № 4. P. 372–379.
370. Gantier M.P. et al. A miR-19 regulon that controls NF- κ B signaling. // *Nucleic Acids Res*. 2012. Vol. 40, № 16. P. 8048–8058.
371. Xiang J., Wu J. Feud or Friend? The Role of the miR-17-92 Cluster in Tumorigenesis // *Curr. Genomics*. 2010. Vol. 11, № 2. P. 129–135.
372. Frankel L.B. et al. Programmed Cell Death 4 (PDCD4) Is an Important Functional Target of the MicroRNA miR-21 in Breast Cancer Cells // *J. Biol. Chem*. 2008. Vol. 283, № 2. P. 1026–1033.
373. Meng F. et al. MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer // *Gastroenterology*. 2007. Vol. 133, № 2. P. 647–658.
374. Zhu S. et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis // *Cell Res*. 2008. Vol. 18, № 3. P. 350–359.
375. Ma L., Teruya-Feldstein J., Weinberg R.A. Tumour invasion and metastasis initiated by

- microRNA-10b in breast cancer // *Nature*. 2007. Vol. 449, № 7163. P. 682–688.
376. Cimmino A. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. Vol. 102, № 39. P. 13944–13949.
377. Peter M.E. Let-7 and miR-200 microRNAs: Guardians against pluripotency and cancer progression // *Cell Cycle*. 2009. Vol. 8, № 6. P. 843–852.
378. Johnson S.M. et al. RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family // *Cell*. 2005. Vol. 120, № 5. P. 635–647.
379. Büssing I., Slack F.J., Grosshans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. // *Trends Mol. Med.* 2008. Vol. 14, № 9. P. 400–409.
380. Lee Y.S., Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene // *Genes Dev.* 2007. Vol. 21, № 9. P. 1025–1030.
381. He L. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network.
382. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis // *Cell Death Differ.* 2009. Vol. 17. P. 193–199.
383. Bommer G.T. et al. p53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes // *Curr. Biol.* 2007. Vol. 17, № 15. P. 1298–1307.
384. Chang T.C. et al. Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis // *Mol. Cell*. 2010. Vol. 26, № 5. P. 1–8.
385. Tazawa H. et al. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. Vol. 104, № 39. P. 15472–15477.
386. Sun Y.M., Lin K.Y., Chen Y.Q. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts // *J. Hematol. Oncol.* 2013. Vol. 6, № 1. P. 1–8.
387. Visone R. et al. Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas // *Oncogene*. 2007. Vol. 26, № 54. P. 7590–7595.
388. Nam E.J. et al. MicroRNA Expression Profiles in Serous Ovarian Carcinoma // *Clin. Cancer Res.* 2008. Vol. 14, № 9. P. 2690–2695.
389. Ozen M. et al. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer // *Oncogene*. 2008. Vol. 27, № 12. P. 1788–1793.
390. Lopez-Camarillo C. et al. MetastamiRs: Non-Coding MicroRNAs Driving Cancer Invasion and Metastasis // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13. P. 1347–1379.
391. Hurst D.R., Edmonds M.D., Welch D.R. Metastamir: The Field of Metastasis-Regulatory microRNA Is Spreading // *Cancer Res.* 2009. Vol. 69, № 19. P. 7495–7498.
392. Urbich C. et al. MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by

- targeting semaphorin 6A // *Blood*. 2012. Vol. 119, № 6. P. 1607–1618.
393. Wang S., Olson E.N. AngiomiRs—Key Regulators of Angiogenesis // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2009. Vol. 19, № 3. P. 205–211.
394. Legras A. et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition and MicroRNAs in Lung Cancer.
395. Neviani P., Fabbri M. Exosomal microRNAs in the Tumor Microenvironment. // *Front. Med.* 2015. Vol. 2. P. 47.
396. Fanini F., Fabbri M. Cancer-derived exosomal microRNAs shape the immune system within the tumor microenvironment: State of the art // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2017. Vol. 67.
397. Pon J.R., Marra M.A. Driver and Passenger Mutations in Cancer // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2015. Vol. 10. P. 25–50.
398. Suzuki H. et al. Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. // *Front. Genet.* 2013. Vol. 4. P. 258.
399. Wang Y. et al. MicroRNA-224 is up-regulated in hepatocellular carcinoma through epigenetic mechanisms // *FASEB J. The Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2012. Vol. 26, № 7. P. 3032–3041.
400. Chang S. et al. Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155 // *Nat. Med.* 2011. Vol. 17, № 10. P. 1275–1282.
401. Fabbri M. et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. Vol. 104, № 40. P. 15805–15810.
402. Liu C. et al. Hypermethylation of miRNA-589 promoter leads to upregulation of HDAC5 which promotes malignancy in non-small cell lung cancer // *Int. J. Oncol.* 2017. Vol. 50, № 6. P. 2079–2090.
403. Anglesio M. et al. Cancer-associated somatic DICER1 hotspot mutations cause defective miRNA processing and reverse-strand expression bias to predominantly mature 3p strands through loss of 5p strand cleavage // *J. Pathol.* 2013. Vol. 229, № 3. P. 400–409.
404. Muralidhar B. et al. Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels // *J. Pathol.* 2007. Vol. 212, № 4. P. 368–377.
405. Melo S.A. et al. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function // *Nat. Genet. NIH Public Access*, 2009. Vol. 41, № 3. P. 365–370.
406. Karube Y. et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients // *Cancer Sci.* 2005. Vol. 96, № 2. P. 111–115.
407. Merritt W.M. et al. Dicer, Drosha, and Outcomes in Patients with Ovarian Cancer // *N. Engl. J. Med.* 2008. Vol. 359, № 25. P. 2641–2650.

408. Lin R.-J. et al. microRNA Signature and Expression of Dicer and Drosha Can Predict Prognosis and Delineate Risk Groups in Neuroblastoma // *Cancer Res.* 2010. Vol. 70, № 20. P. 7841–7850.
409. Lin S., Gregory R.I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer // *Nat. Rev. Cancer.* Nature Publishing Group, 2015. Vol. 15, № 6. P. 321–333.
410. Kim M.S. et al. Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers // *J. Pathol.* 2010. Vol. 221, № 2. P. 139–146.
411. Melo S.A., Esteller M. Disruption of microRNA nuclear transport in human cancer // *Semin. Cancer Biol.* 2014. Vol. 27. P. 46–51.
412. Melo S.A. et al. A Genetic Defect in Exportin-5 Traps Precursor MicroRNAs in the Nucleus of Cancer Cells // *Cancer Cell.* 2010. Vol. 18, № 4. P. 303–315.
413. Krell J. et al. The p53 miRNA interactome and its potential role in the cancer clinic. // *Epigenomics.* 2013. Vol. 5, № 4. P. 417–428.
414. Garibaldi F. et al. Mutant p53 inhibits miRNA biogenesis by interfering with the microprocessor complex // *Oncogene.* 2016. Vol. 35, № 10. P. 3760–3770.
415. Gurtner A. et al. Dysregulation of microRNA biogenesis in cancer: the impact of mutant p53 on Drosha complex activity. // *J. Exp. Clin. Cancer Res. BioMed Central,* 2016. Vol. 35. P. 45.
416. Kawai S., Amano A. BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex // *J. Cell Biol.* 2012. Vol. 197, № 2. P. 201–208.
417. Krell J. et al. TP53 regulates miRNA association with AGO2 to remodel the miRNA-mRNA interaction network // *Genome Res.* 2016. Vol. 26, № 3. P. 331–341.
418. Organization. W.H. et al. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus, and heart / ed. Travis W.D. IARC Press, 2004. 344 p.
419. Lortet-Tieulent J. et al. International trends in lung cancer incidence by histological subtype: Adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women // *Lung Cancer.* Elsevier Ireland Ltd, 2014. Vol. 84, № 1. P. 13–22.
420. Статистика Злокачественных Новообразований В России И Странах Снг В 2012 Г. // *Известия Тинро* / ed. Давыдов М.Д., Аксель Е.М. Москва: Издательская группа РОНЦ, 2014. Vol. 226. 1-226 p.
421. Морозова О.А. et al. Факторы риска развития и естественное течение рака легкого у лиц в возрасте до 50 лет // *Медицина в Кузбассе.* 2014. Vol. 13, № 2. P. 27–31.
422. Chang J.T.-H., Lee Y.M., Huang R.S. The impact of the Cancer Genome Atlas on lung cancer // *Transl. Res.* 2015. Vol. 166, № 6. P. 568–585.

423. Vansteenkiste J. et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // *Ann. Oncol.* 2013. Vol. 24, № suppl 6. P. vi89-vi98.
424. Prosch H. Implementation of lung cancer screening: promises and hurdles. // *Transl. lung cancer Res.* 2014. Vol. 3, № 5. P. 286–290.
425. The National Lung Screening Trial Research Team. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening // *N. Engl. J. Med.* 2011. Vol. 365, № 5. P. 395–409.
426. The National Lung Screening Trial Research Team. Results of Initial Low-Dose Computed Tomographic Screening for Lung Cancer // *N. Engl. J. Med.* 2013. Vol. 368, № 21. P. 1980–1991.
427. van der Aalst C.M., ten Haaf K., de Koning H.J. Lung cancer screening: latest developments and unanswered questions // *Lancet Respir. Med.* Elsevier Ltd, 2016. Vol. 4, № 9. P. 749–761.
428. de Koning H.J. et al. Benefits and harms of CT lung cancer screening strategies. A comparative modeling study for the U.S. Preventive Services Task Force NIH Public Access // *Ann Intern Med.* 2014. Vol. 160, № 5. P. 311–320.
429. Stewart D.J. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2010. Vol. 75, № 3. P. 173–234.
430. Thomas A. et al. Refining the treatment of NSCLC according to histological and molecular subtypes // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* Nature Publishing Group, 2015. Vol. 12, № 9. P. 511–526.
431. Vogelstein B. et al. Cancer Genome Landscapes // *Science (80-.).* 2013. Vol. 339, № 6127. P. 1546–1558.
432. Thiagalingam S. et al. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers // *Nat. Genet.* Nature Publishing Group, 1996. Vol. 13, № 3. P. 343–346.
433. Lundberg A.S. et al. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer // *Oncogene.* 2002. Vol. 21, № 29. P. 4577–4586.
434. Tomasetti C. et al. Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015. Vol. 112, № 1. P. 118–123.
435. Kendall S.D. et al. A Network of Genetic Events Sufficient to Convert Normal Human Cells to a Tumorigenic State // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65, № 21. P. 9824–9828.
436. Ramirez R.D. et al. Immortalization of Human Bronchial Epithelial Cells in the Absence of Viral Oncoproteins // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64, № 24. P. 9027–9034.
437. Sato M. et al. Multiple Oncogenic Changes (K-RAS V12 , p53 Knockdown, Mutant EGFRs, p16 Bypass, Telomerase) Are Not Sufficient to Confer a Full Malignant Phenotype on Human Bronchial Epithelial Cells // *Cancer Res.* 2006. Vol. 66, № 4. P. 2116–2128.

438. Weinstein I.B., Joe A., Felsher D. Oncogene Addiction // *Cancer Res.* 2008. Vol. 68, № 9. P. 3077–3080.
439. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers // *Nature.* 2012. Vol. 489, № 7417. P. 519–525.
440. Jordan E.J. et al. Prospective Comprehensive Molecular Characterization of Lung Adenocarcinomas for Efficient Patient Matching to Approved and Emerging Therapies // *Cancer Discov.* 2017. Vol. 7, № 6. P. 596–609.
441. The Cancer Genome Atlas Research network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma // *Nature.* 2014. Vol. 511, № 7511. P. 543–550.
442. Gallant J.-N., Lovly C.M. Established, emerging and elusive molecular targets in the treatment of lung cancer // *J. Pathol.* 2018. № February. P. 565–577.
443. Paez J.G. et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy // *Science.* 2004. Vol. 304, № 5676. P. 1497–1500.
444. Solomon B.J. et al. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK -Positive Lung Cancer // *N. Engl. J. Med.* 2014. Vol. 371, № 23. P. 2167–2177.
445. Antonicelli A. et al. EGFR-Targeted Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on EGFR Oncogenic Mutation // *Int. J. Med. Sci.* 2013. Vol. 10.
446. Angulo B., Lopez-Rios F., Gonzalez D. A new generation of companion diagnostics: cobas *BRAF*, *KRAS* and *EGFR* mutation detection tests // *Expert Rev. Mol. Diagn.* Taylor & Francis, 2014. Vol. 14, № 5. P. 517–524.
447. Kumar M.S. et al. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis // *Nat. Genet.* 2007. Vol. 39, № 5. P. 673–677.
448. Li C. et al. Non-small cell lung cancer associated microRNA expression signature: integrated bioinformatics analysis, validation and clinical significance // *Oncotarget. Impact Journals, LLC*, 2017. Vol. 8, № 15. P. 24564–24578.
449. Mascaux C. et al. Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis // *Eur. Respir. J.* 2008. Vol. 33, № 2. P. 352–359.
450. Huang W. et al. Two microRNA panels to discriminate three subtypes of lung carcinoma in bronchial brushing specimens // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012. Vol. 186, № 11. P. 1160–1167.
451. Zhang Y., Yang Q., Wang S. MicroRNAs: a new key in lung cancer // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2014. Vol. 74, № 6. P. 1105–1111.
452. Li Y. et al. Expression levels of microRNA-145 and microRNA-10b are associated with metastasis in non-small cell lung cancer // *Cancer Biol. Ther.* 2016. Vol. 17, № 3. P. 272–279.

453. Tafhiri E. et al. Expression of miRNAs in non-small-cell lung carcinomas and their association with clinicopathological features // *Tumor Biol.* 2015. Vol. 36, № 3. P. 1603–1612.
454. Skrzypski M. et al. Prognostic value of microRNA expression in operable non-small cell lung cancer patients // *Br. J. Cancer.* 2014. Vol. 110, № 4. P. 991–1000.
455. Yerukala Sathipati S., Ho S.-Y. Identifying the miRNA signature associated with survival time in patients with lung adenocarcinoma using miRNA expression profiles // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 7507.
456. Guan P. et al. Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. // *J. Exp. Clin. Cancer Res. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2012. Vol. 31, № 1. P. 54.
457. Võsa U. et al. Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer // *Int. J. Cancer.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2013. Vol. 132, № 12. P. 2884–2893.
458. Zhang Y. et al. Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of lung cancer // *Oncol. Rep.* 2017. Vol. 37, № 6. P. 3543–3553.
459. Castro D. et al. MicroRNAs in lung cancer // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 46. P. 81679–81685.
460. Uddin A., Chakraborty S. Role of miRNAs in lung cancer // *J. Cell. Physiol.* 2018. Vol. 12, № 12. P. 1312–1315.
461. Gao W., Xu J., Shu Y.Q. miRNA expression and its clinical implications for the prevention and diagnosis of non-small-cell lung cancer // *Expert Rev Respir Med.* 2011. Vol. 5, № 5. P. 699–709.
462. Wang G., Mao W., Zheng S. MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells // *FEBS Lett.* Federation of European Biochemical Societies, 2008. Vol. 582, № 25–26. P. 3663–3668.
463. Kundu S.T. et al. The miR-200 family and the miR-183~96~182 cluster target Foxf2 to inhibit invasion and metastasis in lung cancers // *Oncogene.* Nature Publishing Group, 2015. № February. P. 1–14.
464. Sarver A.L., Li H., Subramanian S. MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration // *Cancer Res.* 2010. Vol. 70, № 23. P. 9570–9580.
465. Zhang Q.-H. et al. Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues. // *Gene.* Elsevier B.V., 2013. Vol. 527, № 1. P. 26–32.
466. Roybal J.D. et al. miR-200 Inhibits Lung Adenocarcinoma Cell Invasion and Metastasis by Targeting Flt1/VEGFR1 // *Mol. Cancer Res.* 2011. Vol. 9, № 1. P. 25–35.

467. Kim J.S., Kurie J.M., Ahn Y.-H. BMP4 depletion by miR-200 inhibits tumorigenesis and metastasis of lung adenocarcinoma cells // *Mol. Cancer*. 2015. Vol. 14, № 1. P. 173.
468. Chen G. et al. miR-146a Inhibits Cell Growth, Cell Migration and Induces Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells // *Inhib. Cell Growth Cell Migr. Induces Apoptosis Non-Small Cell Lung Cancer Cells*. PLoS ONE. 2013. Vol. 8, № 3. P. 146–60317.
469. Li Y.-L. et al. MiR-146a-5p inhibits cell proliferation and cell cycle progression in NSCLC cell lines by targeting CCND1 and CCND2 // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 37.
470. Kalscheuer S. et al. Differential expression of microRNAs in early-stage neoplastic transformation in the lungs of F344 rats chronically treated with the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone // *Carcinogenesis*. 2008. Vol. 29, № 12. P. 2394–2399.
471. Zeng Y. et al. MicroRNA-205 targets SMAD4 in non-small cell lung cancer and promotes lung cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 19. P. 30817–30829.
472. Gong R. et al. MiR-205 is implicated in migration and invasion of non-small cell lung cancer H460 cells through targeting vimentin // *Int J Clin Exp Pathol*. 2017. Vol. 10, № 4. P. 4283–4292.
473. Tellez C.S. et al. EMT and Stem Cell-Like Properties Associated with miR-205 and miR-200 Epigenetic Silencing Are Early Manifestations during Carcinogen-Induced Transformation of Human Lung Epithelial Cells // *Cancer Res*. 2011. Vol. 71, № 8. P. 3087–3097.
474. Zhao L. et al. miR-149 suppresses human non-small cell lung cancer growth and metastasis by inhibiting the FOXM1/cyclinD1/MMP2 axis // *Oncol. Rep*. 2017. Vol. 38, № 6. P. 3522–3530.
475. Gao Z. et al. miR-486-5p functions as an oncogene by targeting PTEN in non-small cell lung cancer // *Pathol. - Res. Pract*. 2018.
476. Shao Y. et al. Direct repression of the oncogene CDK4 by the tumor suppressor miR-486-5p in non-small cell lung cancer // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 23.
477. Zheng H. et al. miR-125a-5p upregulation suppresses the proliferation and induces the cell apoptosis of lung adenocarcinoma by targeting NEDD9 // *Oncol. Rep*. 2017. Vol. 38, № 3. P. 1790–1796.
478. Jin H. et al. miR-124 Inhibits Lung Tumorigenesis Induced by K-ras Mutation and NNK // *Mol. Ther. - Nucleic Acids*. 2017. Vol. 9. P. 145–154.
479. Barger J.F., Nana-Sinkam S.P. MicroRNA as tools and therapeutics in lung cancer // *Respir. Med*. 2015. Vol. 109, № 7. P. 803–812.
480. Seto A.G. The road toward microRNA therapeutics // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2010. Vol. 42.

- P. 1298–1305.
481. Russo F. et al. miRandola 2017: a curated knowledge base of non-invasive biomarkers // *Nucleic Acids Res.* 2017.
 482. Leng Q. et al. A plasma miRNA signature for lung cancer early detection // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 67.
 483. Shen J. et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer // *Lab. Investig.* Nature Publishing Group, 2011. Vol. 91, № 4. P. 579–587.
 484. Zheng D. et al. Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2011. Vol. 4, № 6. P. 575–586.
 485. Pritchard C.C. et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. // *Cancer Prev. Res. (Phila).* 2012. Vol. 5, № 3. P. 492–497.
 486. Chen X. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases // *Cell Res.* 2008. Vol. 18, № 10. P. 997–1006.
 487. Chen X. et al. Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive biomarkers for nonsmall cell lung cancer diagnosis // *Int. J. Cancer.* 2012. Vol. 130, № 7. P. 1620–1628.
 488. Roth C. et al. Low Levels of Cell-Free Circulating miR-361-3p and miR-625* as Blood-Based Markers for Discriminating Malignant from Benign Lung Tumors // *PLoS One* / ed. Lau K.M. 2012. Vol. 7, № 6. P. e38248.
 489. Sanfiorenzo C. et al. Two Panels of Plasma MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Prediction of Recurrence in Resectable NSCLC // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 1. P. e54596.
 490. Nadal E. et al. A Novel Serum 4-microRNA Signature for Lung Cancer Detection // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 12464.
 491. Wang Y. et al. Identification of a three-miRNA signature as a blood-borne diagnostic marker for early diagnosis of lung adenocarcinoma // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, № 18. P. 26070–26086.
 492. Zhu W.Y. et al. Diagnostic Value of Serum miR-182, miR-183, miR-210, and miR-126 levels in patients with early-stage non-small cell lung cancer // *PLoS One* / ed. Zheng S.G. 2016. Vol. 11, № 4. P. e0153046.
 493. Moretti F. et al. Systematic review and critique of circulating miRNAs as biomarkers of stage I-II non-small cell lung cancer // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 55.
 494. Zhou L. et al. The biology, function and clinical implications of exosomes in lung cancer // *Cancer Lett.* 2017. Vol. 407. P. 84–92.
 495. Rabinowits G. et al. Exosomal MicroRNA: A Diagnostic Marker for Lung Cancer // *Clin. Lung Cancer.* 2009. Vol. 10, № 1. P. 42–46.

496. Boeri M. et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011. Vol. 108, № 9. P. 3713–3718.
497. Sozzi G. et al. Clinical Utility of a Plasma-Based miRNA Signature Classifier Within Computed Tomography Lung Cancer Screening: A Correlative MILD Trial Study // *J. Clin. Oncol.* 2014. Vol. 32, № 8. P. 768–773.
498. Boeri M. et al. Recent advances of microRNA-based molecular diagnostics to reduce false-positive lung cancer imaging. 2015. P. 801–813.
499. Bianchi F. et al. A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer // *EMBO Mol. Med.* 2011. Vol. 3, № 8. P. 495–503.
500. Montani F. et al. miR-Test: A Blood Test for Lung Cancer Early Detection. // *J. Natl. Cancer Inst. Oxford University Press*, 2015. Vol. 107, № 6. P. djv063-.
501. Ceppi P. et al. Loss of miR-200c Expression Induces an Aggressive, Invasive, and Chemoresistant Phenotype in Non-Small Cell Lung Cancer // *Mol. Cancer Res.* 2010. Vol. 8, № 9. P. 1207–1216.
502. Galluzzi L. et al. miR-181a and miR-630 Regulate Cisplatin-Induced Cancer Cell Death // *Cancer Res.* 2010. Vol. 70, № 5. P. 1793–1803.
503. Martello G. et al. A MicroRNA Targeting Dicer for Metastasis Control // *Cell.* 2010. Vol. 141, № 7. P. 1195–1207.
504. Fareh M. et al. The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network // *Cell Death Differ.* 2012. Vol. 19, № 2. P. 232–244.
505. Zandberga E. et al. Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer // *Genes, Chromosom. Cancer.* 2013. Vol. 52, № 4. P. 356–369.
506. Hu Z. et al. Serum MicroRNA Signatures Identified in a Genome-Wide Serum MicroRNA Expression Profiling Predict Survival of Non-Small-Cell Lung Cancer // *J. Clin. Oncol.* 2010. Vol. 28, № 10. P. 1721–1726.
507. Le H.-B. et al. Evaluation of dynamic change of serum miR-21 and miR-24 in pre- and post-operative lung carcinoma patients // *Med. Oncol.* 2012. Vol. 29, № 5. P. 3190–3197.
508. Wang Y. et al. Pathway-based serum microRNA profiling and survival in patients with advanced stage non-small cell lung cancer // *Cancer Res.* 2013. Vol. 73, № 15. P. 4801–4809.
509. Kaduthanam S. et al. Serum miR-142-3p is associated with early relapse in operable lung adenocarcinoma patients // *Lung Cancer.* 2013. Vol. 80. P. 223–227.
510. Wu L. et al. Circulating microRNA-422a is associated with lymphatic metastasis in lung cancer

- // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 26.
511. Lin Q. et al. A cluster of specified microRNAs in peripheral blood as biomarkers for metastatic non-small-cell lung cancer by stem-loop RT-PCR // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* Springer, 2012. Vol. 138, № 1. P. 85–93.
 512. Dejima H. et al. Exosomal microRNA in plasma as a non-invasive biomarker for the recurrence of non-small cell lung cancer // *Oncol. Lett.* 2017. Vol. 13, № 3. P. 1256–1263.
 513. Kanaoka R. et al. Usefulness of Plasma Exosomal MicroRNA-451a as a Noninvasive Biomarker for Early Prediction of Recurrence and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer // *Oncology*. 2018. Vol. 94, № 5. P. 311–323.
 514. Liu Q. et al. Circulating exosomal microRNAs as prognostic biomarkers for non-small-cell lung cancer // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 8. P. 13048–13058.
 515. Munagala R., Aqil F., Gupta R.C. Exosomal miRNAs as biomarkers of recurrent lung cancer // *Tumor Biol.* Springer Netherlands, 2016. Vol. 37, № 8. P. 10703–10714.
 516. Chen X. et al. Plasma miRNAs in predicting radiosensitivity in non-small cell lung cancer // *Tumor Biol.* 2016. Vol. 37, № 9. P. 11927–11936.
 517. Aushev V.N. et al. Comparisons of microRNA Patterns in Plasma before and after Tumor Removal Reveal New Biomarkers of Lung Squamous Cell Carcinoma // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 10. P. 1–10.
 518. Wei J. et al. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. // *Chin. J. Cancer*. 2011. Vol. 30, № 6. P. 407–414.
 519. Franchina T. et al. Circulating miR-22, miR-24 and miR-34a as novel predictive biomarkers to pemetrexed-based chemotherapy in advanced non small cell lung cancer // *J. Cell. Physiol.* 2013. Vol. 229, № 1. P. n/a-n/a.
 520. Ito S. et al. Unique circulating microRNAs in relation to EGFR mutation status in Japanese smoker male with lung adenocarcinoma // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 70. P. 114685–114697.
 521. Ma Y. et al. Plasma MiRNA alterations between NSCLC patients harboring Del19 and L858R EGFR mutations // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 34. P. 54965–54972.
 522. Qu L. et al. Circulating plasma microRNAs as potential markers to identify EGFR mutation status and to monitor epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 28. P. 45807–45824.
 523. Zhao Q. et al. Circulating miRNAs is a potential marker for gefitinib sensitivity and correlation with EGFR mutational status in human lung cancers // *Am. J. Cancer Res.* 2015. Vol. 5, № 5. P.

- 1692–1705.
524. Wang S. et al. Identification of plasma microRNA profiles for primary resistance to EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with EGFR activating mutation // *J. Hematol. Oncol.* 2015. Vol. 8, № 1. P. 127.
525. Zhao Q. et al. Circulating miRNAs is a potential marker for gefitinib sensitivity and correlation with EGFR mutational status in human lung cancers // *Am J Cancer Res.* 2015. Vol. 5, № 5. P. 1692–1705.
526. Shen Y. et al. microRNA expression profiles associated with survival, disease progression, and response to gefitinib in completely resected non-small-cell lung cancer with EGFR mutation // *Med. Oncol.* Springer US, 2013. Vol. 30, № 4. P. 750.
527. Li L.-L. et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers of ALK-positive nonsmall cell lung cancer and predictors of response to crizotinib therapy // *Oncotarget.* 2017.
528. Heegaard N.H.H. et al. Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer. // *Int. J. Cancer.* 2012. Vol. 130, № 6. P. 1378–1386.
529. Duttagupta R. et al. Impact of Cellular miRNAs on Circulating miRNA Biomarker Signatures // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, № 6.
530. Landoni E. et al. Proposal of supervised data analysis strategy of plasma miRNAs from hybridisation array data with an application to assess hemolysis-related deregulation // *BMC Bioinformatics.* BMC Bioinformatics, 2015. Vol. 16, № 1. P. 388.
531. Kirschner M.B. et al. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers // *Front. Genet.* 2013. Vol. 4, № MAY. P. 1–13.
532. Blondal T. et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids // *Methods.* Elsevier Inc., 2013. Vol. 59, № 1. P. S1–S6.
533. Max K.E.A. et al. Human plasma and serum extracellular small RNA reference profiles and their clinical utility // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018. Vol. 115, № 23. P. E5334–E5343.
534. Witwer K.W. XenomiRs and miRNA homeostasis in health and disease: evidence that diet and dietary miRNAs directly and indirectly influence circulating miRNA profiles. // *RNA biology.* 2012. Vol. 9, № 9. P. 1147–1154.
535. Keller A. et al. Stable serum miRNA profiles as potential tool for non-invasive lung cancer diagnosis // *RNA Biol.* 2011. Vol. 8, № 3. P. 506–516.
536. Keller A. et al. Sources to variability in circulating human miRNA signatures // *RNA Biol.* 2017. Vol. 14, № 12. P. 1791–1798.
537. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. // *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 162, № 1. P. 156–159.

538. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction : twenty-something years on // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1, № 2. P. 581–585.
539. McAlexander M.A., Phillips M.J., Witwer K.W. Comparison of Methods for miRNA Extraction from Plasma and Quantitative Recovery of RNA from Cerebrospinal Fluid // *Front. Genet.* 2013. Vol. 4, № May. P. 1–8.
540. Kim Y.-K.K. et al. Short Structured RNAs with Low GC Content Are Selectively Lost during Extraction from a Small Number of Cells // *Mol. Cell.* 2012. Vol. 46, № 6. P. 893–895.
541. El-Khoury V. et al. Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material // *Sci. Rep.* / ed. Carter D.R.F. 2016. Vol. 6, № 1. P. 19529.
542. Laurent L.C. et al. Meeting report: Discussions and preliminary findings on extracellular RNA measurement methods from laboratories in the NIH Extracellular RNA Communication Consortium // *J. Extracell. Vesicles.* 2015. Vol. 4, № 1.
543. Zaporozhchenko I. a. et al. A Phenol-Free Method for Isolation of miRNA from Biological Fluids // *Anal. Biochem.* Elsevier Inc., 2015. Vol. 479. P. 43–47.
544. Mestdagh P. et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. 2014. № june.
545. Buschmann D. et al. Toward reliable biomarker signatures in the age of liquid biopsies -how to standardize the small RNA-Seq workflow // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № 10. P. 5995–6018.
546. Pritchard C.C., Cheng H.H., Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. // *Nat. Rev. Genet.* 2012. Vol. 13, № 5. P. 358–369.
547. Turchinovich A. et al. Capture and Amplification by Tailing and Switching (CATS). An ultrasensitive ligation-independent method for generation of DNA libraries for deep sequencing from picogram amounts of DNA and RNA. // *RNA Biol.* 2014. Vol. 11, № 7. P. 817–828.
548. Langevin S.A. et al. Peregrine: a rapid and unbiased method to produce strand-specific RNA-Seq libraries from small quantities of starting material // *RNA Biol.* 2013. Vol. 10, № 4. P. 502–515.
549. Berezikov E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals // *Nat. Rev. Genet.* Nature Publishing Group, 2011. Vol. 12, № 12. P. 846–860.
550. Byron S.A. et al. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges // *Nat. Rev. Genet.* 2016. Vol. 17, № 5. P. 257–271.
551. Geiss G.K. et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe

- pairs // *Nat. Biotechnol.* 2008. Vol. 26, № 3. P. 317–325.
552. Castoldi M. et al. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). // *RNA*. 2006. Vol. 12, № 5. P. 913–920.
553. Chen C. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № 20. P. e179.
554. Kutuyavin I. V et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 2. P. 655–661.
555. Yao Y., Nellaer C., Karlsson H. Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification // *Mol. Cell. Probes*. 2006. Vol. 20. P. 311–316.
556. Lao K. et al. Real time PCR profiling of 330 human micro-RNAs // *Biotechnol. J.* 2007. Vol. 2, № 1. P. 33–35.
557. Dellett M., Simpson D.A. Considerations for optimization of microRNA PCR assays for molecular diagnosis // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2016. Vol. 16, № 4. P. 407–414.
558. Jensen S.G. et al. Evaluation of two commercial global miRNA expression profiling platforms for detection of less abundant miRNAs // *BMC Genomics*. BioMed Central Ltd, 2011. Vol. 12, № 1. P. 435.
559. D'haene B. et al. miRNA Expression Profiling: From Reference Genes to Global Mean Normalization. Humana Press, 2012. P. 261–272.
560. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method // *Methods*. 2001. Vol. 25, № 4. P. 402–408.
561. Pritchard C.C. et al. Blood Cell Origin of Circulating MicroRNAs: A Cautionary Note for Cancer Biomarker Studies // *Cancer Prev. Res.* 2012. Vol. 5, № 3. P. 492–497.
562. He Y. et al. Current State of Circulating MicroRNAs as Cancer Biomarkers // *Clin. Chem.* 2015. Vol. 61, № 9. P. 1138–1155.
563. Allegra A. et al. Circulating microRNAs: New biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (Review) // *Int. J. Oncol.* Spandidos Publications, 2012. Vol. 41, № 6. P. 1897–1912.
564. Fridman E. et al. Accurate Molecular Classification of Renal Tumors Using MicroRNA Expression // *J. Mol. Diagnostics*. 2010. Vol. 12. P. 687–696.
565. Youssef Y.M. et al. Accurate Molecular Classification of Kidney Cancer Subtypes Using MicroRNA Signature // *Eur. Urol.* 2011. Vol. 59, № 5. P. 721–730.
566. Lin Y. et al. A classifier integrating plasma biomarkers and radiological characteristics for distinguishing malignant from benign pulmonary nodules // *Int. J. Cancer*. 2017. Vol. 141, № 6. P. 1240–1248.

567. Montani F., Bianchi F. Circulating Cancer Biomarkers: The Macro-revolution of the Micro-RNA. 2016.
568. Ainsztein A.M. et al. The NIH Extracellular RNA Communication Consortium // *J. Extracell. Vesicles*. 2015. Vol. 4, № 1.
569. Grossman R.L. et al. Collaborating to Compete: Blood Profiling Atlas in Cancer (BloodPAC) Consortium // *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2017. Vol. 101, № 5. P. 589–592.
570. Therasse P. et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2000. Vol. 92, № 3. P. 205–216.
571. *Molecular Cloning*. 4th ed / ed. Green M.R., Sambrook J. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
572. Paquet N., Calvo E., Cumps J. Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. 2005. Vol. 38, № 2. P. 287–293.
573. Ramakers C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data // *Neurosci. Lett. Elsevier*, 2003. Vol. 339, № 1. P. 62–66.
574. Ruijter J.M. et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37, № 6. P. e45–e45.
575. Andersen C.L. et al. Normalization of Real-Time quantitative reverse transcription- PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64. P. 5245–5250.
576. Mestdagh P. et al. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36, № 21.
577. Tibshirani R. Regression Shrinkage and Selection via the Lasso // *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. WileyRoyal Statistical Society, 1996. Vol. 58. P. 267–288.
578. Colaprico A. et al. TCGAAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № 8.
579. Chu A. et al. Large-scale profiling of microRNAs for The Cancer Genome Atlas // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2016. Vol. 44, № 1. P. e3–e3.
580. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J Biol Chem.* 1957. Vol. 226, № 1. P. 497–509.
581. Грибанов О.Г. et al. Простой метод выделения и очистки РНК // *Биоорганическая Химия*.

1997. Vol. 23, № 9. P. 763–765.
582. Lunavat T.R. et al. Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells – Evidence of unique microRNA cargos // *RNA Biol.* 2015. Vol. 12, № 8. P. 810–823.
583. Hu J. et al. Human miR-1228 as a stable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs in cancer patients // *Int. J. Cancer.* 2014. Vol. 135, № 5. P. 1187–1194.
584. Liu J. et al. Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients. // *Chin. J. Cancer Res.* 2013. Vol. 25, № 1. P. 46–54.
585. Markou A. et al. Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer // *Lung Cancer.* Elsevier Ireland Ltd, 2013. Vol. 81, № 3. P. 388–396.
586. Liu X.-G. et al. High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer // *Med. Oncol.* 2012. Vol. 29, № 2. P. 618–626.
587. Markou A. et al. Prognostic Value of Mature MicroRNA-21 and MicroRNA-205 Overexpression in Non-Small Cell Lung Cancer by Quantitative Real-Time RT-PCR // *Clin. Chem.* 2008. Vol. 54, № 10. P. 1696–1704.
588. Võsa U. et al. Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer // *Int J Cancer.* 2012. Vol. 132, № 12. P. 2884–2893.
589. Wu C. et al. Serum levels of miR-19b and miR-146a as prognostic biomarkers for non-small cell lung cancer. // *Tohoku J. Exp. Med.* 2014. Vol. 232, № 2. P. 85–95.
590. Xu F. et al. Up-regulation of microRNA-183-3p is a potent prognostic marker for lung adenocarcinoma of female non-smokers. // *Clin. Transl. Oncol.* 2014. Vol. 16, № 11. P. 980–985.
591. Yuxia M., Zhennan T., Wei Z. Circulating miR-125b is a novel biomarker for screening non-small-cell lung cancer and predicts poor prognosis // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2012. Vol. 138, № 12. P. 2045–2050.
592. Cui E. et al. Serum microRNA 125b as a diagnostic or prognostic biomarker for advanced NSCLC patients receiving cisplatin-based chemotherapy // *Acta Pharmacol. Sin.* Nature Publishing Group, 2013. Vol. 34, № 2. P. 309–313.
593. Dacic S. et al. miRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: correlation with mutational status // *Mod. Pathol.* 2010. Vol. 23, № 12. P. 1577–1582.
594. Vescovo V. Del et al. miR-205 Expression Levels in Nonsmall Cell Lung Cancer Do Not Always Distinguish Adenocarcinomas From Squamous Cell Carcinomas // *Am. J. Surg. Pathol.* 2011. Vol. 35, № 2. P. 268–275.
595. Price C., Chen J. MicroRNAs in cancer biology and therapy: Current status and perspectives //

- Genes Dis. 2014. Vol. 1, № 1. P. 53–63.
596. McGranahan N., Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future // *Cell*. 2017. Vol. 168, № 4. P. 613–628.
597. Calderwood S.K. Tumor heterogeneity, clonal evolution, and therapy resistance: an opportunity for multitargeting therapy. // *Discov. Med.* 2013. Vol. 15, № 82. P. 188–194.
598. Wang Y. et al. The Prognostic Value of miR-21 and miR-155 in Non-small-cell Lung Cancer: A Meta-analysis // *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2013. Vol. 43, № 8. P. 813–820.
599. Mendell J.T. miRiad Roles for the miR-17-92 Cluster in Development and Disease // *Cell*. 2008. Vol. 133, № 2. P. 217–222.
600. Fuziwara C.S., Kimura E.T. Insights into Regulation of the miR-17-92 Cluster of miRNAs in Cancer. // *Front. Med.* 2015. Vol. 2. P. 64.
601. Boeri M. et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2011. Vol. 108, № 9. P. 3713–3718.
602. Mavrakis K.J. et al. A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL) // *Nat. Genet.* 2011. Vol. 43, № 7. P. 673–678.
603. Scott G.K. et al. Coordinate Suppression of ERBB2 and ERBB3 by Enforced Expression of Micro-RNA miR-125a or miR-125b // *J. Biol. Chem. JBC Papers in Press*, 2007. Vol. 282, № 2. P. 1479–1486.
604. He J. et al. Roles and Mechanism of miR-199a and miR-125b in Tumor Angiogenesis // *PLoS One* / ed. Cheng J.Q. 2013. Vol. 8, № 2. P. e56647.
605. Wu N. et al. MiR-125b acts as an oncogene in glioblastoma cells and inhibits cell apoptosis through p53 and p38MAPK-independent pathways // *Br. J. Cancer.* 2013. Vol. 109, № 11. P. 2853–2863.
606. Cheng H.H. et al. Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 6. P. e64795.
607. Bryzgunova O.E., Konoshenko M.Y., Laktionov P.P. MicroRNA-guided gene expression in prostate cancer: Literature and database overview. // *J. Gene Med.* 2018. Vol. 20, № 5. P. e3016.
608. Guo P. et al. Improved Variable Selection Algorithm Using a LASSO-Type Penalty, with an Application to Assessing Hepatitis B Infection Relevant Factors in Community Residents // *PLoS One* / ed. Emmert-Streib F. 2015. Vol. 10, № 7. P. e0134151.
609. Chen X. et al. EGBMMDA: Extreme Gradient Boosting Machine for MiRNA-Disease Association prediction // *Cell Death Dis.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 3.

610. Wozniak M.B. et al. Circulating MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Early Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer // *PLoS One* / ed. Hoheisel J.D. 2015. Vol. 10, № 5. P. e0125026.
611. Zhou X. et al. A six-microRNA panel in plasma was identified as a potential biomarker for lung adenocarcinoma diagnosis // *Oncotarget*. 2016. Vol. 8, № 4. P. 6513–6525.
612. KUO W.-T. et al. MicroRNA-324 in Human Cancer: miR-324-5p and miR-324-3p Have Distinct Biological Functions in Human Cancer // *Anticancer Res. International Institute of Anticancer Research*, 2016. Vol. 36, № 10. P. 5189–5196.
613. Cao L. et al. MIR-324-5p suppresses hepatocellular carcinoma cell invasion by counteracting ECM degradation through post-transcriptionally downregulating ETS1 and SP1 // *PLoS One* / ed. Cao J. Public Library of Science, 2015. Vol. 10, № 7. P. e0133074.
614. Li C. et al. Non-small cell lung cancer associated microRNA expression signature: integrated bioinformatics analysis, validation and clinical significance // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 15. P. 24564–24578.
615. Li Z.-H. et al. Prognostic significance of serum microRNA-210 levels in nonsmall-cell lung cancer. // *J Int Med Res*. 2013. Vol. 41, № 5. P. 1437–1444.
616. Zhang Y. et al. High-mobility group A1 proteins enhance the expression of the oncogenic miR-222 in lung cancer cells // *Mol. Cell. Biochem*. 2011. Vol. 357, № 1–2. P. 363–371.
617. Yamashita R. et al. Growth inhibitory effects of miR-221 and miR-222 in non-small cell lung cancer cells // *Cancer Med. Wiley-Blackwell*, 2015. Vol. 4, № 4. P. 551–564.
618. Lv S. et al. Identification of a panel of serum microRNAs as biomarkers for early detection of lung adenocarcinoma // *J. Cancer. Ivyspring International Publisher*, 2017. Vol. 8, № 1. P. 48–56.
619. Yin Q.-W. et al. Increased expression of microRNA-150 is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2015. Vol. 8, № 1. P. 842–846.
620. Li H. et al. MiR-150 promotes cellular metastasis in non-small cell lung cancer by targeting FOXO4 // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2016. Vol. 6. P. 39001.
621. Cao M. et al. MiR-150 promotes the proliferation and migration of lung cancer cells by targeting SRC kinase signalling inhibitor 1 // *Eur. J. Cancer*. 2014. Vol. 50, № 5. P. 1013–1024.
622. Bi N. et al. A MicroRNA signature predicts survival in early stage small-cell lung cancer treated with surgery and adjuvant chemotherapy // *PLoS One. Public Library of Science*, 2014. Vol. 9, № 3. P. e91388.
623. Dinh T.-K.T. et al. Circulating miR-29a and miR-150 correlate with delivered dose during thoracic radiation therapy for non-small cell lung cancer // *Radiat. Oncol*. 2016. Vol. 11, № 1. P.

- 61.
624. Wang H. et al. MicroRNA-15b promotes proliferation and invasion of non-small cell lung carcinoma cells by directly targeting TIMP2 // *Oncol. Rep.* 2017. Vol. 37, № 6. P. 3305–3312.
625. Cinegaglia N.C. et al. Integrative transcriptome analysis identifies deregulated microRNA-transcription factor networks in lung adenocarcinoma. // *Oncotarget. Impact Journals, LLC*, 2016. Vol. 7, № 20. P. 28920–28934.
626. Hennessey P.T. et al. Serum microRNA biomarkers for detection of non-small cell lung cancer. // *PLoS One. Public Library of Science*, 2012. Vol. 7, № 2. P. e32307.
627. Crawford M. et al. microRNA 133B targets prosurvival molecules MCL-1 and BCL2L2 in lung cancer // *Biochem Biophys Res Commun. Biochem Biophys Res Commun.* Oct. 2009. Vol. 23, № 3883. P. 483–489.
628. Dong W. et al. MiR-140-3p suppressed cell growth and invasion by downregulating the expression of ATP8A1 in non-small cell lung cancer // *Tumor Biol.* 2016. Vol. 37, № 3. P. 2973–2985.
629. Kong X.-M. et al. MicroRNA-140-3p inhibits proliferation, migration and invasion of lung cancer cells by targeting ATP6AP2 // *Int J Clin Exp Pathol.* 2015. Vol. 8, № 10. P. 12845–12852.
630. Yuan Y. et al. miR-140 Suppresses Tumor Growth and Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor // *PLoS One* / ed. Filleur S. 2013. Vol. 8, № 9. P. e73604.
631. Liu M. et al. Downregulating microRNA-144 mediates a metabolic shift in lung cancer cells by regulating GLUT1 expression // *Oncol. Lett.* 2016. Vol. 11, № 6. P. 3772–3776.
632. Pan H.L. et al. Down-regulation of microRNA-144 in air pollution-related lung cancer // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5.
633. Zhang G., An H., Fang X. MicroRNA-144 regulates proliferation, invasion, and apoptosis of cells in malignant solitary pulmonary nodule via zinc finger E-box-binding homeobox 1 // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. Vol. 8, № 5. P. 5960–5967.
634. Tan X. et al. A 5-MicroRNA Signature for Lung Squamous Cell Carcinoma Diagnosis and hsa-miR-31 for Prognosis // *Clin. Cancer Res.* 2011. Vol. 17, № 21. P. 6802–6811.
635. Ling B. et al. Tumor suppressor miR-22 suppresses lung cancer cell progression through post-transcriptional regulation of ErbB3 // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2012. Vol. 138, № 8. P. 1355–1361.
636. Xin M. et al. miR-22 inhibits tumor growth and metastasis by targeting ATP citrate lyase: evidence in osteosarcoma, prostate cancer, cervical cancer and lung cancer // *Oncotarget.* 2014.

- Vol. 7, № 28. P. 44252–44265.
637. Borzi C. et al. mir-660-p53-mir-486 network: A new key regulatory pathway in lung tumorigenesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18, № 1. P. 222.
638. Wang L.-S. et al. MicroRNA-486 regulates normal erythropoiesis and enhances growth and modulates drug response in CML progenitors. // *Blood*. American Society of Hematology, 2015. Vol. 125, № 8. P. 1302–1313.
639. Rapisuwon S., Vietsch E.E., Wellstein A. Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2016. Vol. 14. P. 211–222.
640. Sourvinou I.S., Markou A., Lianidou E.S. Quantification of circulating miRNAs in plasma: Effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability // *J. Mol. Diagnostics*. 2013. Vol. 15, № 6. P. 827–834.
641. Huang X. et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. // *BMC Genomics*. 2013. Vol. 14. P. 319.
642. Zaporozhchenko I.A. et al. The potential of circulating cell-free RNA as a cancer biomarker: challenges and opportunities // *Expert Rev. Mol. Diagn.* Taylor & Francis, 2018. Vol. 18, № 2. P. 133–145.
643. Bianchi F. et al. A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. // *EMBO Mol. Med.* Wiley-Blackwell, 2011. Vol. 3, № 8. P. 495–503.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1. СПИСОК ПАР МИКРОРНК С ДОСТОВЕРНО ЗНАЧИМЫМИ
ИЗМЕНЕНИЯМИ ЭКСПРЕССИИ МЕЖДУ ГРУППАМИ ДОНОРОВ**

Пара микроРНК	Р (ANOVA)	Р (Бенджамини-Хочберг)
	Сравнение ЗД и НМКЛ	
miR-150-5p/let-7i-5p	0,000004	0,000699
miR-363-3p/miR-222-3p	0,000241	0,009527
miR-150-5p/miR-144-5p	0,000279	0,009527
miR-484/miR-338-3p	0,000245	0,009527
let-7i-5p/miR-222-3p	0,000172	0,009527
miR-25-3p/miR-222-3p	0,000538	0,015334
miR-363-3p/miR-150-5p	0,000724	0,017686
miR-363-3p/miR-215	0,000999	0,018975
miR-363-3p/miR-338-3p	0,000910	0,018975
miR-25-3p/miR-150-5p	0,001506	0,020068
miR-25-3p/miR-215	0,001228	0,020068
miR-25-3p/miR-338-3p	0,001618	0,020068
let-7i-5p/miR-324-5p	0,001460	0,020068
miR-338-3p/miR-133b	0,001643	0,020068
miR-363-3p/miR-324-5p	0,002230	0,023692
let-7i-5p/miR-215	0,002355	0,023692
let-7i-5p/miR-338-3p	0,002269	0,023692
miR-484/miR-324-5p	0,003124	0,029675
let-7i-5p/miR-374a-5p	0,003450	0,031054
miR-363-3p/miR-374a-5p	0,004454	0,035470
miR-25-3p/miR-324-5p	0,004493	0,035470
miR-484/miR-374a-5p	0,004563	0,035470
miR-374a-5p/miR-133b	0,005128	0,038124
miR-30e-5p/miR-338-3p	0,005681	0,039847
miR-484/miR-222-3p	0,005826	0,039847
miR-30e-5p/miR-222-3p	0,006842	0,044998
	Сравнение НМКЛ и ЭБ	
miR-22-3p/miR-19b-3p	0,000002	0,000297
miR-22-3p/miR-30e-5p	0,000024	0,001656
miR-22-3p/miR-210	0,000029	0,001656
miR-22-3p/miR-25-3p	0,000061	0,001734
miR-22-3p/miR-222-3p	0,000050	0,001734
miR-22-3p/miR-215	0,000059	0,001734
miR-22-3p/miR-363-3p	0,000157	0,003825
miR-484/miR-215	0,000256	0,005471
miR-22-3p/let-7i-5p	0,000501	0,007791
miR-22-3p/miR-324-5p	0,000437	0,007791
miR-484/miR-222-3p	0,000466	0,007791
miR-22-3p/miR-150-5p	0,000595	0,007832
miR-150-5p/miR-484	0,000575	0,007832
miR-484/miR-374a-5p	0,001096	0,013389

miR-22-3p/miR-374a-5p	0,001627	0,018552
miR-19b-3p/miR-30e-5p	0,002315	0,020831
miR-30e-5p/miR-215	0,002149	0,020831
miR-484/miR-324-5p	0,002310	0,020831
miR-215/miR-22-5p	0,002090	0,020831
miR-484/let-7i-5p	0,002814	0,024056
miR-22-3p/miR-107	0,003237	0,026359
miR-107/miR-150-5p	0,003844	0,028601
miR-150-5p/miR-338-3p	0,004014	0,028601
miR-374a-5p/miR-133b	0,003908	0,028601
miR-30e-5p/miR-222-3p	0,005344	0,035150
miR-363-3p/miR-484	0,005159	0,035150
miR-30e-5p/miR-150-5p	0,006150	0,038952
miR-19b-3p/miR-484	0,007313	0,044661
miR-22-3p/miR-22-5p	0,008132	0,047953
Сравнение НМКЛ и группы ЗД+ЭБ		
miR-150-5p/let-7i-5p	0,000023	0,003888
miR-150-5p/miR-144-5p	0,000218	0,009329
miR-484/miR-222-3p	0,000111	0,009329
miR-484/miR-324-5p	0,000190	0,009329
miR-22-3p/miR-222-3p	0,000531	0,009413
miR-30e-5p/miR-222-3p	0,000373	0,009413
miR-363-3p/miR-150-5p	0,000309	0,009413
miR-25-3p/miR-150-5p	0,000588	0,009413
miR-25-3p/miR-215	0,000606	0,009413
miR-484/miR-374a-5p	0,000518	0,009413
miR-374a-5p/miR-133b	0,000570	0,009413
miR-22-3p/miR-324-5p	0,000844	0,012032
miR-484/miR-338-3p	0,001091	0,014354
miR-363-3p/miR-215	0,001563	0,019091
miR-150-5p/miR-484	0,002034	0,023183
miR-30e-5p/miR-324-5p	0,002371	0,025336
miR-22-3p/miR-338-3p	0,002820	0,028369
miR-22-3p/miR-374a-5p	0,004404	0,041843
miR-484/miR-22-5p	0,004784	0,043059
miR-363-3p/miR-222-3p	0,005289	0,045222
Сравнение ЗД и ЭБ		
miR-22-3p/miR-19b-3p	0,000076	0,008316
miR-22-3p/miR-363-3p	0,000273	0,008316
miR-22-3p/let-7i-5p	0,000161	0,008316
miR-22-3p/miR-222-3p	0,000239	0,008316
miR-22-3p/miR-210	0,000292	0,008316
miR-150-5p/miR-338-3p	0,000235	0,008316
miR-22-3p/miR-30e-5p	0,001003	0,013400
miR-22-3p/miR-25-3p	0,000775	0,013400
miR-22-3p/miR-150-5p	0,000680	0,013400
miR-30e-5p/miR-363-3p	0,000966	0,013400

miR-30e-5p/let-7i-5p	0,000568	0,013400
miR-363-3p/miR-338-3p	0,000794	0,013400
miR-484/let-7i-5p	0,001048	0,013400
let-7i-5p/miR-338-3p	0,001097	0,013400
miR-363-3p/miR-484	0,001462	0,016662
miR-22-3p/miR-215	0,002072	0,022144
miR-22-3p/miR-484	0,002826	0,023851
miR-22-3p/miR-22-5p	0,003130	0,023851
miR-19b-3p/miR-338-3p	0,003183	0,023851
miR-25-3p/miR-338-3p	0,003208	0,023851
let-7i-5p/miR-22-5p	0,003058	0,023851
miR-144-5p/miR-338-3p	0,003137	0,023851
miR-215/miR-338-3p	0,003089	0,023851
miR-30e-5p/miR-150-5p	0,003516	0,024080
miR-222-3p/miR-338-3p	0,003520	0,024080
miR-107/let-7i-5p	0,003669	0,024130
miR-25-3p/miR-484	0,003922	0,024568
miR-374a-5p/miR-338-3p	0,004023	0,024568
miR-338-3p/miR-324-5p	0,005318	0,031360
let-7i-5p/miR-324-5p	0,005771	0,032893
let-7i-5p/miR-222-3p	0,006179	0,034084
miR-363-3p/miR-222-3p	0,006854	0,036628
miR-30e-5p/miR-25-3p	0,007449	0,037486
miR-150-5p/miR-484	0,007453	0,037486
miR-30e-5p/miR-338-3p	0,009396	0,045905
miR-363-3p/miR-22-5p	0,010336	0,047771
miR-25-3p/miR-22-5p	0,010245	0,047771

**ПРИЛОЖЕНИЕ 2. СПИСОК ПАР МИКРОРНК, ЭКСПРЕССИЯ КОТОРЫХ
ДОСТОВЕРНО СВЯЗАНА С КЛИНИКО-ПАТОЛОГИЧЕСКИМИ
ХАРАКТЕРИСТИКАМИ БОЛЬНЫХ РЛ**

Пара микроРНК	P (ANOVA)			
	Анатомическая стадия	T	N	Возраст
miR-22-3p/miR-107	0,774369	0,028416	0,012438	0,928810
miR-22-3p/miR-30e-5p	0,163121	0,013980	0,314553	0,466880
miR-22-3p/miR-150-5p	0,724254	0,044593	0,043161	0,338075
miR-22-3p/let-7i-5p	0,814288	0,019724	0,101127	0,442618
miR-22-3p/miR-222-3p	0,424055	0,150611	0,046047	0,414484
miR-22-3p/miR-144-5p	0,820781	0,052318	0,045299	0,114282
miR-22-3p/miR-215	0,795476	0,020980	0,192632	0,179843
miR-22-3p/miR-22-5p	0,690459	0,002942	0,037815	0,017987
miR-22-3p/miR-374a-5p	0,179461	0,010380	0,007976	0,456231
miR-22-3p/miR-338-3p	0,020160	0,004316	0,007243	0,710308
miR-22-3p/miR-324-5p	0,556771	0,026806	0,224325	0,502398
miR-107/miR-484	0,020956	0,805264	0,712127	0,218646
miR-107/miR-144-5p	0,894013	0,274681	0,413445	0,018557
miR-107/miR-374a-5p	0,019184	0,018671	0,039649	0,104350
miR-107/miR-210	0,298454	0,047873	0,182483	0,318504
miR-107/miR-338-3p	0,000279	0,022806	0,429552	0,369176
miR-19b-3p/miR-144-5p	0,708867	0,220698	0,086614	0,012780
miR-19b-3p/miR-215	0,551433	0,041234	0,356917	0,019265
miR-19b-3p/miR-210	0,461420	0,039852	0,479655	0,145319
miR-30e-5p/miR-363-3p	0,413386	0,032213	0,296368	0,356218
miR-30e-5p/let-7i-5p	0,463535	0,022814	0,217883	0,284815
miR-30e-5p/miR-215	0,393175	0,017475	0,382745	0,248532
miR-30e-5p/miR-374a-5p	0,117576	0,030223	0,012558	0,351214
miR-30e-5p/miR-338-3p	0,016062	0,015392	0,014596	0,553970
miR-363-3p/miR-144-5p	0,714374	0,170472	0,047334	0,064594
miR-363-3p/miR-215	0,793162	0,027289	0,410336	0,000148
miR-363-3p/miR-374a-5p	0,139549	0,071663	0,028256	0,749949
miR-363-3p/miR-210	0,276777	0,003790	0,008020	0,790058
miR-363-3p/miR-338-3p	0,049601	0,152148	0,180783	0,825151
miR-25-3p/miR-144-5p	0,522880	0,172027	0,074508	0,017490
miR-25-3p/miR-215	0,209925	0,023718	0,580987	0,001539
miR-25-3p/miR-210	0,575265	0,032392	0,205868	0,310304
miR-25-3p/miR-338-3p	0,038986	0,220347	0,350300	0,739705
miR-150-5p/miR-222-3p	0,821959	0,020326	0,097838	0,325268
miR-150-5p/miR-144-5p	0,841801	0,839039	0,526070	0,036851
miR-150-5p/miR-215	0,653877	0,667712	0,204764	0,005908
miR-150-5p/miR-210	0,277171	0,012625	0,037857	0,795099
miR-484/miR-374a-5p	0,665424	0,030493	0,055080	0,573529
miR-484/miR-324-5p	0,041898	0,883281	0,716915	0,465021

let-7i-5p/miR-222-3p	0,542157	0,004896	0,978885	0,812232
let-7i-5p/miR-144-5p	0,916324	0,570302	0,207127	0,022391
let-7i-5p/miR-215	0,935526	0,700423	0,809117	0,002644
let-7i-5p/miR-210	0,129575	0,000654	0,014383	0,799587
miR-222-3p/miR-144-5p	0,841284	0,043691	0,151022	0,032505
miR-222-3p/miR-215	0,631024	0,106297	0,868810	0,003204
miR-222-3p/miR-374a-5p	0,197807	0,015373	0,024196	0,718291
miR-222-3p/miR-210	0,061855	0,042582	0,031650	0,750955
miR-222-3p/miR-338-3p	0,021386	0,103601	0,268782	0,646927
miR-144-5p/miR-215	0,581091	0,488847	0,072999	0,000157
miR-144-5p/miR-210	0,356892	0,014972	0,067016	0,166906
miR-215/miR-374a-5p	0,140516	0,274052	0,085366	0,032257
miR-215/miR-210	0,370163	0,002450	0,149028	0,009270
miR-22-5p/miR-374a-5p	0,184039	0,030490	0,081813	0,416612
miR-22-5p/miR-210	0,190406	0,041896	0,386047	0,034263
miR-22-5p/miR-338-3p	0,001320	0,025617	0,108238	0,217419
miR-374a-5p/miR-210	0,050340	0,011556	0,079537	0,940034
miR-374a-5p/miR-324-5p	0,106213	0,155105	0,022688	0,274420
miR-374a-5p/miR-133b	0,040874	0,465337	0,598591	0,856105
miR-210/miR-338-3p	0,013115	0,022882	0,208264	0,681909
miR-210/miR-324-5p	0,329193	0,029563	0,734688	0,504618
miR-338-3p/miR-324-5p	0,023762	0,675479	0,293031	0,957500
miR-338-3p/miR-133b	0,046979	0,412744	0,607164	0,747709