

Лехнов Евгений Анатольевич

**МикроРНК мочи как маркеры неинвазивной диагностики рака
предстательной железы**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск– 2019

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

Научный руководитель:

кандидат биологических наук **Лактионов Павел Петрович**

Официальные оппоненты:

Повещенко Александр Федорович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Малек Анастасия Валерьевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».

Защита состоится « » июня 2019 г. в 10⁰⁰

на заседании диссертационного совета Д 001.048.04 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» <http://ficftm.ru>.

Автореферат разослан « » мая 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
к.б.н.

Русских Г.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. К середине 90-х годов в связи с увеличением средней продолжительности жизни и снижением смертности населения от других конкурирующих причин, рак предстательной железы (РПЖ) во многих странах мира стал выходить в лидеры по встречаемости злокачественных новообразований у мужчин. Причинами поздней диагностики РПЖ являются длительное бессимптомное течение заболевания, несовершенство методов первичной диагностики РПЖ, в том числе бессимптомных микроскопических очагов, сложность дифференциальной диагностики очагов РПЖ и очагов доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ), несвоевременное оказание медицинской помощи (в том числе и по причине недостаточного уровня образованности населения или по экономическим причинам), недостаточное техническое оснащение медицинских учреждений, а также несовершенство клинико-инструментальной базы. Несмотря на то, что на сегодняшний день разработаны различные тесты для диагностики и прогноза РПЖ, широкое их внедрение в клиническую практику ограничено в виду недостаточности их предикторной способности, инвазивности процедуры или вследствие дороговизны теста. Кроме того, такие клинические параметры, как простатспецифический антиген (ПСА), методы визуальной (лучевой) диагностики и гистопатологический индекс Глисона определяют риски РПЖ, но не позволяют оценить прогноз на индивидуальном уровне у конкретного пациента, что в дальнейшем отражается на качестве лечения. Таким образом, в онкоурологии существует острая необходимость в эффективных маркерах РПЖ для решения различных клинических задач, включая эффективную диагностику ранних стадий РПЖ, оптимизацию терапии и мониторинг процесса. То есть требуются маркеры, которые позволили бы надежно и однозначно детектировать опухолевый процесс на доклинических стадиях (при отсутствии клинических проявлений), достоверно дифференцировать очаги РПЖ от других объемных образований предстательной железы (ПЖ), а также контролировать эффективность процесса лечения. Так называемая “жидкая биопсия” является новым подходом, основанным на исследовании внеклеточных нуклеиновых кислот, включая ДНК и РНК, в биологических жидкостях человека, таких, как кровь или моча. В этих жидкостях обнаружены ассоциированные с опухолями микроРНК, которые являются в них наиболее представленным классом внеклеточных РНК. Эти молекулы отличаются высокой стабильностью во внеклеточных средах, которая обеспечивается их способностью формировать комплексы с белками, липопротеинами или упаковываться во внеклеточные везикулы. МикроРНК, ассоциированные с разными гистотипами опухолей или стадиями заболевания, могут выступать в роли молекулярных биомаркеров и могут быть использованы для диагностики и прогноза течения заболевания, а также являться потенциальными терапевтическими мишенями. В связи с этим

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

Цель настоящей работы заключалась в изучении представленности и концентрации внеклеточных микроРНК в моче здоровых доноров (ЗД), пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и больных раком предстательной железы для выявления микроРНК, ассоциированных с развитием рака предстательной железы и разработки диагностических систем.

В ходе исследования необходимо было решить ряд **задач**.

1. Разработать простой и эффективный метод выделения микроРНК из мочи.
2. Разработать простой метод для выделения внеклеточных везикул (ВВ) мочи, пригодный для последующего исследования микроРНК, находящихся в составе внеклеточных везикул мочи.
3. Провести сравнительное исследование профиля экспрессии микроРНК во фракциях внеклеточных везикул и бесклеточного супернатанта мочи здоровых доноров, пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и больных раком предстательной железы.
4. Провести поиск микроРНК-предикторов рака предстательной железы при помощи биоинформатического анализа данных массового исследования экспрессии микроРНК в исследуемых группах здоровых доноров, пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и больных раком предстательной железы.
5. Предложить вариант алгоритма анализа данных, позволяющий осуществлять рациональный отбор микроРНК-маркеров, оценивать диагностические диапазоны их относительных концентраций и формировать панели маркеров для эффективной диагностики рака предстательной железы.

Научная новизна работы. Разработан и оптимизирован оригинальный протокол выделения микроРНК из мочи и плазмы ЗД – аналог miRCURY™ RNA Isolation Kit фирмы Exiqon A/S, Denmark. Протокол отличается простотой, скоростью исполнения, высокой эффективностью выделения микроРНК из различных биологических жидкостей организма (кровь, моча) и отсутствием опасных реагентов по сравнению с традиционными методами выделения и коммерческим аналогом. Разработан и оптимизирован протокол выделения ВВ

из мочи, не уступающий по эффективности выделения ВВ золотому стандарту – ультрацентрифугированию, но не требующий применения дорогостоящего оборудования и превосходящий его по простоте и скорости выделения. Во внеклеточных везикулах и бесклеточной фракции мочи исследуемых групп пациентов одновременно оценены концентрации 84 микроРНК. Предложены и охарактеризованы по нескольким критериям наилучшие комбинации микроРНК обеих фракций мочи, позволяющие отличить группы ЗД, больных ДГПЖ и больных РПЖ между собой, а также определена диагностическая ценность таких пар микроРНК. Предложен вариант алгоритма анализа данных, позволяющий осуществлять рациональный отбор микроРНК-маркеров, оценивать диагностические диапазоны их относительных концентраций и формировать панели маркеров для эффективной диагностики РПЖ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны высокоэффективные протоколы выделения микроРНК и ВВ из мочи и охарактеризованы микроРНК различных фракций мочи у ЗД, пациентов с ДГПЖ и РПЖ. С помощью биоинформатического анализа обнаружены ассоциированные с развитием РПЖ микроРНК различных фракций мочи, что позволяет расширить знания о молекулярных основах развития РПЖ. Предложена диагностическая система, основанная на измерении концентраций 24 микроРНК и позволяющая идентифицировать пациентов с РПЖ, ДГПЖ и ЗД с чувствительностью не менее 90% и специфичностью 100%, которая может быть использована в практической медицине для улучшения диагностики РПЖ.

Методология и методы исследования. В работе применялись современные методы исследований (капиллярный электрофорез (Agilent 2100 Bioanalyzer), ОТ-ПЦР, трансмиссионная электронная микроскопия, профилирование микроРНК методом микрочипового анализа на платформе Exiqon (miRCURY LNA miRNA qPCR Panels Urine), статистические методы анализа данных.

Положения, выносимые на защиту.

1. Выявлены пары микроРНК во фракциях супернатанта мочи после центрифугирования при 17 тыс. g и ВВ мочи здоровых доноров, пациентов с ДГПЖ и РПЖ, позволяющие отличить три группы доноров между собой с чувствительностью не менее 90% и специфичностью 100%.
2. Наибольшей диагностической информативностью обладают пары miR-107-miR-26b-5p, miR-375-3p-miR-26b-5p в группе сравнения ЗД-больные РПЖ во фракции супернатанта мочи, а также miR-31-5p-miR-16-5p, miR-31-5p-miR-200b, miR-31-5p-miR-30e-3p и miR-31-5p-miR-660-5p в группе ЗД-пациенты с ДГПЖ во фракции ВВ мочи.

Степень достоверности и апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 6 статей, 2 патента и 14 тезисов. Результаты работы представлены на 9 международных и российских конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Работа изложена на 118 страницах машинописного текста (12 шрифт, интервал 1.5), содержит 9 рисунков и 17 таблиц. Библиография включает 171 литературный источник.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе были разработаны более простые и эффективные методы выделения микроРНК и внеклеточных везикул из мочи по сравнению с аналогами. Разработанные методы позволяют получать большее количество материала и могут быть использованы для анализа онкомаркеров в клинических лабораториях. Биостатистический анализ полученных данных позволил выявить онкоспецифические диагностически значимые микроРНК. Предложен алгоритм анализа данных, который позволяет повысить диагностическую точность маркеров при диагностике рака предстательной железы.

1. Клинические характеристики ЗД, больных ДГПЖ и больных РПЖ. Материалом для изучения микроРНК послужила моча ЗД, больных ДГПЖ и больных РПЖ. Клинико-патологическая и демографическая характеристики доноров, принимавших участие в исследовании, представлены в **таблице 1**. Образцы крови и мочи ЗД, больных РПЖ и ДГПЖ были получены из Федерального сибирского биомедицинского исследовательского центра им. Е.Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия) и Центра новых медицинских технологий ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия) после одобрения исследования этическими комитетами обеих организаций. Группы пациентов с ДГПЖ и РПЖ формировали на основании жалоб пациентов, уровню ПСА крови, гистологическому заключению биопсийного или послеоперационного материала. Критериями вхождения для больных РПЖ являлись: стадия T2-3N0M0 и уровень ПСА крови выше 10 нг/мл. Критериями вхождения для больных ДГПЖ было клиническое подтверждение диагноза и отсутствие иных онкологических заболеваний предстательной железы или других локализаций в анамнезе. Группу ЗД формировали по уровню ПСА крови (не выше 2,8 нг/мл плазмы), отсутствию жалоб со стороны мочеполовой системы, отсутствию любых заболеваний мочеполовой системы и любых онкологических заболеваний всех систем организма.

Таблица 1. Клинико-патологическая и демографическая характеристики ЗД, пациентов с ДГПЖ и больных РПЖ. Приведены данные по каждому донору.

Здоровые			ДГПЖ			РПЖ				
№ донора	Возраст, лет	Общий ПСА нг/мл	№ донора	Возраст, лет	Общий ПСА нг/мл	№ донора	Возраст, лет	Общий ПСА нг/мл	Стадия по TNM	Индекс Глисона
1	61	0,33	1	60	1,97	1	60	14,2	T2bNxMx	7
2	66	0,81	2	79	5,45	2	66	15	T3bNxMx	7
3	48	1,01	3	81	33	3	64	476	T2cNxMx	6
4	64	1,54	4	53	4,7	4	76	23,7	T3aNxMx	6
5	51	0,39	5	78	41,5	5	56	10,3	T2bNxMx	6
6	62	0,42	6	65	10,9	6	73	30	T3bNxMx	7
7	53	0,13	7	78	17,2	7	82	13,88	T3bNxMx	6
8	51	1,39	8	66	9,4	8	78	9,24	T2bNxMx	6
9	53	1	9	58	8,48	9	75	23	T2bNxMx	7
10	66	1,15	10	62	5	10	75	26,4	T3aNxMx	7

2. Разработка метода выделения внеклеточных везикул из мочи.

Одной из задач этой работы являлась разработка простого и эффективного метода выделения ВВ из биологических жидкостей, подходящего для научных и клинических исследований содержимого ВВ, а именно, переносимых ими микроРНК. В качестве контрольного метода выделения был выбран метод ультрацентрифугирования, как наиболее распространенный и изученный, своеобразный “золотой стандарт” среди различных способов выделения ВВ. Для разработки и оценки эффективности нового метода были использованы образцы крови и мочи ЗД и больных РПЖ. Для того чтобы получить чистые препараты микроРНК из везикул, которые не содержали бы примесей ингибиторов ферментативных реакций, нами был разработан метод выделения ВВ из мочи. Метод основан на использовании осаждающего реагента – полиэтиленгликоля (ПЭГ (20 кДа)) в присутствии дополнительного мембранотропного реагента, позволяющего дополнительно агрегировать ВВ – голубого декстрана (Dextran Blue (2000 кДа)). Нами были оптимизированы концентрации всех реагентов. Было обнаружено, что наиболее оптимально удаление ингибиторов ПЦР и выделение ВВ из мочи происходит при следующем составе осаждающего раствора: 0,154М NaCl, 50 мМ Tris/HCl, 4мкг/мл Dextran Blue, 1,5% ПЭГ и 0,3 М NaCl, 50 мМ Tris/HCl, 8 мкг/мл Dextran Blue, 5,0% ПЭГ, **таблица 2.** Предлагаемый способ позволяет выделять ВВ из мочи с большей эффективностью по сравнению с прототипом (выделение ВВ с помощью 10% ПЭГ(6000) и ультрацентрифугированием, а также позволяет сократить время выделения ВВ на 17% по сравнению с прототипом и на 65% по сравнению с ультрацентрифугированием. Поскольку время выделения ВВ после пробоподготовки, включающей осаждение клеток и клеточного дебриса, составляет 50 минут, этот метод может быть использован для серийного выделения ВВ из клинических образцов.

Таблица 2. Сравнительный анализ эффективности выделения микроРНК из фракции ВВ мочи, разработанным протоколом ПЭГ+Dextran Blue, способом-прототипом (10% ПЭГ(6000)), а также с различными растворами для осаждения ВВ.

Метод выделения	$\Delta Ct = Ct \text{ (метода выделения)} - Ct \text{ ультрацентрифугирования}$								Среднее ΔCt	SD
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*		
10% ПЭГ(6000)	4,43	4	3,73	3,9	4,26	3,96	3,66	4,81	4,09	0,39
5% ПЭГ (20000)	2,2	2,24	2,7	2,01	2,28	2,55	2,63	2,31	2,37	0,24
1,5% ПЭГ (20000)	2,29	2,95	2,77	1,69	1,92	2,22	2,47	1,89	2,28	0,44
4мкг/мл Dextran Blue (2000 кДа), 1,5%ПЭГ (20000)	1,78	1,7	1,3	1,84	2,12	1,52	0,93	1,55	1,59	0,36
50mM TrisHCl, 4мкг/мл Dextran Blue(2000 кДа), 1,5%ПЭГ (20000)	0,61	1,2	0,79	0,96	0,66	0,61	1,3	0,77	0,86	0,27
0,154 M NaCl, 50mM TrisHCl, 4мкг/мл Dextran Blue (2000 кДа), 1%ПЭГ (20000)	-0,8	-0,23	-0,63	-0,6	-0,4	-0,5	-0,8	-0,69	-0,57	0,20
0,3M NaCl, 50 mM TrisHCl, 8 мкг/мл Dextran Blue (2000 кДа), 5% ПЭГ (20000)	-0,7	-0,34	-0,67	-0,7	-0,5	-0,5	-0,8	-0,44	-0,58	0,15

Ct – значение порогового цикла, ΔCt –разница значений пороговых циклов, SD – стандартное отклонение, * - номер донора. Чем меньше разница значений пороговых циклов, тем больше микроРНК содержится в образце и соответственно выше выход. Данные представлены по miR-19b.

Наличие ВВ в препаратах, полученных протоколом ПЭГ+Dextran Blue, подтверждается результатами ТЭМ при сравнении со стандартным ультрацентрифугированием, **рисунок 1 А, Б**. Анализ ВВ выполнен в Институте цитологии и генетики СО РАН (ИЦиГ СО РАН, сектор структурной биологии клетки) под руководством Киселевой Елены Владимировны. На полученных изображениях видно, что оба препарата содержат ВВ. В образцах мочи, полученных при помощи протокола ПЭГ+Dextran Blue отмечается формирование агрегатов ВВ, **рисунок 1 А**.

Таким образом, разработанный протокол ПЭГ+Dextran Blue не уступает ультрацентрифугированию по эффективности выделения ВВ и уменьшает в 4 раза время выделения ВВ из биологических жидкостей. Этот метод может быть использован для серийного выделения ВВ из клинических образцов. Однако в виду необходимости проведения дополнительных сравнительных исследований препаратов ВВ (полученных при помощи протокола ПЭГ+Dextran Blue) на большей выборке доноров, в последующей работе все препараты ВВ выделяли методом ультрацентрифугирования.

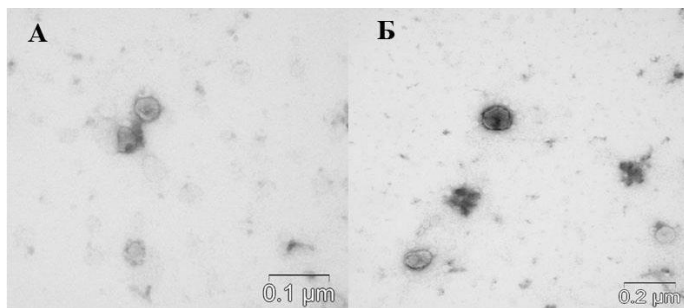


Рисунок 1: Трансмиссионная электронная микроскопия препаратов внеклеточных везикул мочи, полученных при помощи **А.** протокола ПЭГ+Dextran Blue; **Б.** ультрацентрифугирования.

3. Описание внеклеточных везикул мочи здоровых доноров и больных раком предстательной железы. Анализ ВВ был выполнен в Группе микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН (под руководством Рябчиковой Е.И.). По данным ТЭМ образцы мочи здоровых доноров и больных пациентов содержат многочисленные микровезикулы, размер основной части которых варьирует от 20 до 230 нм (рисунок 2). Среди этих частиц были идентифицированы экзосомы, имеющие вид сферических пузырьков, либо «чашек». Доля экзосомо-подобных частиц размером 30-100 нм в моче составляла около 95% у здоровых доноров и 90% у больных РПЖ, а крупных частиц (100-230 нм) – 5 и 10% от всех микрочастиц, соответственно. Подсчет проводили с препаратов микрочастиц, полученных от 3-х здоровых доноров и 3-х больных РПЖ. На каждого пациента делалось не менее 6 фотографий различных полей, в каждом поле было от 5 до 72 частиц различного размера. Подсчет частиц проводили вручную, объединяли их в группы с шагом в 10 нм. По критерию Манна-Уитни эти отличия не достоверны. По данным ТЭМ, антитела к CD63, CD9 и CD24 связывались с поверхностью экзосом, выделенных из мочи здоровых доноров и больных РПЖ, частицы коллоидного золота (конъюгат золота с белком А) наблюдались на поверхности экзосом. Эти результаты демонстрируют, что (1) в моче здоровых доноров и больных РПЖ присутствуют микрочастицы размером преимущественно 20-200 нм; (2) не менее, чем 90% этих частиц имеет размер 30-100 нм и экспрессируют рецепторы CD63, CD24 и CD9 и, поэтому, по-видимому, являются экзосомами.

4. Выбор оптимальных условий выделения микроРНК из плазмы крови и мочи здоровых доноров. Так как хаотропные эффекты только одного гуанидина изотиоцианата (Gu) неспособны в полной мере разрушить комплексы микроРНК с белками и другими биополимерами, необходимы реагенты, нарушающие гидрофобные взаимодействия микроРНК с биополимерами и

способствующие их высвобождению из таких комплексов. Из-за сродства октановой кислоты (ОсА) к гидрофобным остаткам (способность образовывать/разрушать гидрофобные взаимодействия) она способна эффективно связывать/разрушать биологические мембраны и комплексы липопротеинов. Таким образом, мы предположили, что комбинация двух денатурирующих / осаждающих агентов - Gu и ОсА позволит разрушить комплексы микроРНК с биополимерами биологических жидкостей и частично осадить белки. Поскольку осаждение белков или разрушение циркулирующих комплексов микроРНК, в том числе и микроРНК в составе микрочастиц, покрытых оболочкой, в присутствии ОсА и Gu трудно прогнозировать, исходя из доступных литературных данных, нами был протестирован широкий диапазон условий, который позволил подобрать оптимальные концентрации реагентов и условия их инкубации с мочой и плазмой крови. Чтобы оценить эффективность протокола, различные концентрации Gu и ОсА добавляли к 200 мкл плазмы крови или 400 мкл мочи, полученных от ЗД. Остаточное количество белка в супернатанте определяли с использованием спектрофотометра Genesys 10 UV (Thermo Scientific, США) на 260 и 280 нм. Перед проведением измерений на спектрофотометре образцы разбавляли в 10 раз 0,02 М Tris/HCl и 0,15 М NaCl, pH 7,5 (TBS). Испытывалась зависимость эффективности осаждения белка от pH ОсА и пропорций обоих химических агентов, а также выход микроРНК при разных значениях pH и концентрациях Gu и ОсА. Концентрации miR-16 и miR-126 в супернатантах измеряли с помощью количественной RT-PCR. Значения Ct микроРНК и значения поглощения учитывались для оптимальных условиях выделения микроРНК из плазмы крови и мочи.

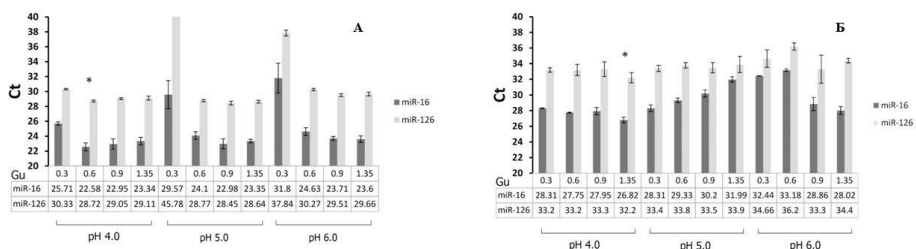


Рисунок 2. Зависимость выхода микроРНК от концентрации Gu и pH. Образцы плазмы крови (А) и мочи (Б) 10 ЗД объединяли и использовали для всех выделений. На графиках показано среднее Ct и стандартное отклонение (Ct SD) для конечной концентрации ОсА на 0,5% (А) и при использовании 1,5% ОсА (Б). Звездочка (*) указывает на оптимальные условия выделения микроРНК.

Данные, представленные на **рисунке 2А**, ясно показывают, что выделение микроРНК из плазмы крови наиболее эффективно при pH 4,0 и в присутствии 0,6 М Gu и 0,5% ОсА. Оптимальные условия выделения из мочи были определены как 1,35 М Gu и 1,5% ОсА при pH 4,0 (**рисунок 2Б**).

4.1. Сравнение эффективности выделения микроРНК из биологических жидкостей при помощи протокола с октановой кислотой, фенол-хлороформной экстракции и miRCURY Biofluids kit (Exiqon). МикроРНК была выделена 10 образцов плазмы крови и 10 образцов мочи, полученных от разных ЗД. Все манипуляции с miRCURY™ RNA Isolation Kit Biofluids проводились в соответствии с рекомендациями производителя. В каждом случае выделенные микроРНК пересаживали в присутствие гликогена. Для оценки эффективности протоколов были измерены уровни экспрессии двух микроРНК (miR-16 и miR-126) в качестве микроРНК, наиболее распространенных в плазме крови.

Таблица 3. Сравнение эффективности выделения микроРНК из плазмы крови и мочи различными протоколами.

		Gu/ОсА		miRCURY Biofluids Kit		Экстракция кистым фенол-хлороформом	
		Ct	Ct SD	Ct	Ct SD	Ct	Ct SD
Плазма крови	miR- 16	21.92	1.66	22.64	1.48	22.77	1.53
	miR- 126	30.66	0.64	32.17	1.43	31.18	0.27
Моча	miR- 16	29.8	1.93	36.95	1.03	31	1.03
	miR- 126	34.16	1.94	ND ¹	ND	34.72	1.14

¹ Не детектировано.

Значения порогового цикла (Ct) miR-16 и miR-126 сравнивали в образцах, выделенных различными протоколами из биологических жидкостей, полученных от одних и тех же доноров. Было показано, что протокол Gu / ОсА превосходит все другие методы выделения микроРНК из плазмы крови. Протокол Gu / ОсА оказался в 7,2 раза более эффективным, чем экстракция фенол-хлороформом, и в 1,65 раза эффективнее, чем miRCURY Biofluids при выделении miR-16. Эффективность выделения miR-126 методом Gu / ОсА также превосходила экстракцию фенол-хлороформом и miRCURY Biofluids (в 1,43- и 2,85 раз соответственно), (**таблица 3**).

Протокол Gu / ОсА также превосходил другие методы выделения микроРНК из образцов мочи. Он оказался в 2,29 раз более эффективным, чем экстракция фенол-хлороформом по miR-16 и в 147 раз по miR-126. Протокол Gu / ОсА также значительно превзошел miRCURY Biofluids kit при выделении микроРНК из мочи. Выход miR-16 при выделении Gu / ОсА был в 142 раза выше, чем miRCURY Biofluids kit, тогда как miR-126 в моче не была обнаружена (**таблица 3**). Таким образом, наши результаты показывают, что протокол

выделения микроРНК с использованием Gu / OcA превосходит другие методы выделения и обеспечивает высокий выход микроРНК из плазмы крови и мочи (таблица 3).

4.2. Анализ белкового состава супернатантов плазмы крови после добавления реагентов Gu / OcA и miRCURY Biofluids kit методом SDS-PAGE. Оба протокола Gu / OcA и miRCURY Biofluids kit используют реагенты для осаждения биополимеров (преимущественно белковой природы) крови. Чтобы сравнить эффективность удаления белка с помощью двух исследуемых методов, мы измерили значения поглощения полученных супернатантов при 260 и 280 нм, и исследовали оставшиеся белки с помощью SDS PAGE.

Химические вещества, используемые в miRCURY Biofluids kit, удаляют белки из крови с более высокой эффективностью, чем протокол Gu / OcA (A260 / A280 0,45 / 0,16 против 0,54 / 0,27). Напротив, Gu / OcA более эффективен в удалении биополимеров мочи (A260 / A280 для Gu / OcA составляет 0,88 / 0,73 против 1,12 / 0,88). SDS PAGE в супернатанте плазмы крови, обработанной miRCURY Biofluids kit выявил минорный белок 52 кДа, (предположительно антитромбин III, каталитическая цепь карбоксипептидазы N или предшественник изоформы 1 витамина D-связывающего белка) и не менее 10 белков, включая альбумин и IgG в супернатантах после осаждения Gu / OcA. Эти данные показывают, что более полное осаждение белков miRCURY Biofluids

kit может привести к соосаждению микроРНК, рисунок 3.

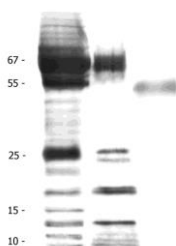


Рисунок 3. SDS-PAGE супернатанта плазмы крови, после осаждения miRCURY Biofluids kit и Gu / OcA. 1 – плазма крови; 2 – супернатант плазмы крови, обработанный Gu / OcA; 3-супернатант плазмы крови, обработанный miRCURY biofluids kit.

5. Сравнительный анализ профиля экспрессии микроРНК во фракции супернатанта мочи и фракции внеклеточных везикул мочи ЗД, пациентов с ДГПЖ и больных РПЖ. Для изучения распределения и представленности микроРНК в микровезикулах мочи при заболеваниях предстательной железы был проведен сравнительный анализ экспрессии 84 микроРНК в парных образцах микровезикул и бесклеточного супернатанта мочи у здоровых доноров, пациентов с ДГПЖ и больных РПЖ с использованием платформы miRCURY LNA miRNA qPCR Panels Urine (Exiqon Ltd, Дания).

Всего в анализ было включено 84 микроРНК-потенциальных онкомаркеров. Панель была сформирована на основе анализа доступной литературы и баз данных и включала микроРНК, представленные в моче, в том числе и онкоспецифические. 68 микроРНК в составе miRCURY LNA PCR Exosome Focus Panel совпали с результатами нашего поиска, а 16 микроРНК были добавлены дополнительно, **таблица 4**. В среднем в каждом исследуемом образце было обнаружено не менее 70 из 84 отдельных микроРНК, при этом 72 микроРНК были экспрессированы более чем в 70% образцов. Для подавляющего числа микроРНК различие их представленности во фракции ВВ и свободном от микрочастиц виде было качественным, однако часть микроРНК были представлены преимущественно в одной из фракций. Наиболее яркими примерами являются miR-143-3p и miR-451a, которые присутствуют в бесклеточном супернатанте мочи, но отсутствуют почти во всех образцах ВВ.

Таблица 4. Состав панели для определения экспрессии микроРНК мочи.

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

6. Анализ представленности микроРНК различных фракций мочи больных раком предстательной железы. В процессе обработки данных были получены нормализованные значения (dCt) микроРНК при помощи метода парных отношений, в котором экспрессия одной микроРНК нормируется на каждую из оставшихся микроРНК. Затем выбираются характеристические пары микроРНК. Сравнения проводили между группами: ЗД – больные РПЖ (ЗД-РПЖ), ЗД – пациенты с ДГПЖ (ЗД-ДГПЖ) и пациенты с ДГПЖ - больные РПЖ (ДГПЖ-РПЖ) во фракции супернатанта мочи после центрифугирования при 17000g, а также между названными группами внутри фракции ВВ. Далее при помощи Random Forests with Boruta были получены данные относительно встречаемости отдельных значимых пар микроРНК относительно общего числа

сравнений (запусков), разности медиан, доверительного интервала и значимости (p). Были обнаружены лучшие комбинации микроРНК, отобранные по следующим критериям: 3 пары с наибольшей встречаемостью, 3 пары с наибольшим расстоянием между медианами ΔC_t между группами доноров (Cutoff для разницы ΔC_t был принят за 1), 3 пары с наибольшей удаленностью 95% доверительного интервала (CI) для разности медиан от 0 (но не менее 0,1) и 3 пары с наименьшим значением p_{adj} . Пары с наименьшим значением p_{adj} были отобраны, как наиболее отличающиеся с точки зрения статистического критерия. В целом, так как эти критерии направлены на разделение групп, то пары достаточно часто пересекались. Если какая-либо пара была лучшей по нескольким критериям, то в итоговую выборку она включалась однократно. Для каждой отобранной пары микроРНК был проведен ROC анализ и определена площадь под кривой (AUC).

7. Определение диагностически значимых пар микроРНК фракций мочи, позволяющих отличить группы здоровых доноров, пациентов с ДГПЖ и больных РПЖ. Для лучших комбинаций пар микроРНК был выполнен сравнительный анализ чувствительности и специфичности, который показал, что наибольшей диагностической эффективностью обладают пары miR-107- miR-26b-5p (AUC=0,93, 80% чувствительность и 100% специфичность), miR-375-3p-miR-26b-5p (AUC=0,83, 70% чувствительность и 100% специфичность) в группе сравнения ЗД-РПЖ фракции бесклеточного супернатанта мочи после центрифугирования при 17 тыс. g (**рисунок 4А**), а также miR-31-5p-miR-16-5p (AUC=0,89, 80% чувствительность и 100% специфичность), miR-31-5p-miR-200b (AUC=0,88, 70% чувствительность и 100% специфичность), miR-31-5p-miR-30e-3p (AUC=0,88, 80% чувствительность и 100% специфичность) и miR-31-5p-miR-660-5p (AUC=0,84, 70% чувствительность и 100% специфичность) в группе ЗД-ДГПЖ во фракции ВВ мочи (**рисунок 4Б**).

8. Биоинформатический анализ профиля экспрессии микроРНК обеих фракций мочи больных РПЖ при помощи баз данных OncomiRDB и DIANA-TarBase. С целью оценки возможного участия микроРНК в патогенезе РПЖ, при помощи баз данных OncomiRDB и DIANA-TarBase, содержащих экспериментально верифицированные онкогенные и онкосупрессорные микроРНК, были проанализированы микроРНК из всех комбинаций. Большинство этих микроРНК были идентифицированы обеими базами данных. Согласно OncomiRDB и DIANA-TarBase, 52,8% и 65% из этих микроРНК являются простатспецифическими и принимают участие в процессах развития РПЖ. Таким образом, большинство наиболее часто встречающихся микроРНК в каждой группе сравнения также могут быть связаны с развитием, что может

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

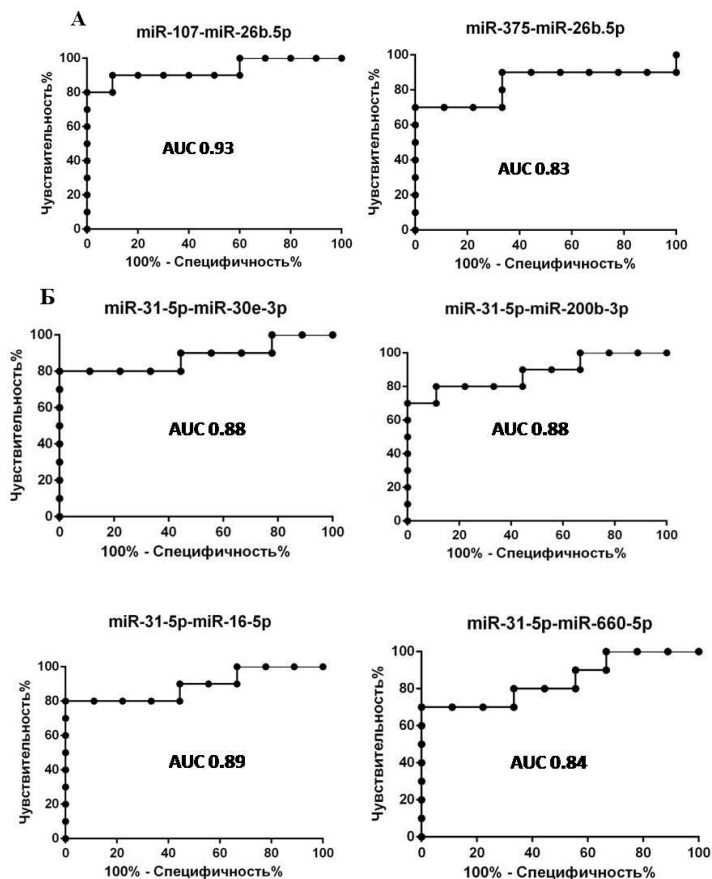


Рисунок 4. ROC-анализ диагностически значимых пар микроРНК фракции бесклеточного супернатанта мочи после центрифугирования при 17 тыс. g ЗД-РПЖ (А) и фракции внеклеточных везикул мочи ЗД-ДГПЖ (Б).

9. Алгоритм анализа данных для разработки диагностических систем. Для того, чтобы выбрать пары микроРНК, которые должны войти в

состав диагностической системы мы предложили алгоритм анализа данных, состоящий из четырёх блоков. Отбор пар микроРНК осуществляется исходя из диагностической эффективности маркеров (наивысшие показатели чувствительности при 100% специфичности) и учитывает диагностический диапазон измеряемых маркеров. Для того, чтобы скомпоновать такую диагностическую систему необходимо выполнить последовательность нижеперечисленных действий (**рисунок 4**, на примере блока для постановки диагноза «точно РПЖ»):

1. Проанализировать данные отношений экспрессии выбранных пар микроРНК в любой из исследуемых фракций мочи у составной группы доноров «ЗД+ДГПЖ» (используется в качестве контрольной группы), если распределение является нормальным, то рассчитать среднее и стандартное отклонение (SD), если распределение не является нормальным, то рассчитать медиану (med), квартили (Q) (5%, 95%) и SD, т.е. определить диапазон, в котором значения dCt соответствуют пациентам группы «ЗД+ДГПЖ», а вне этого диапазона – пациентам с РПЖ. В нашей работе, в связи с нормальностью распределения полученных значений, рассчитывались средние и стандартные отклонения.

2. Проанализировать данные по экспрессии микроРНК в образцах больных РПЖ. Все пациенты этой группы, у которых значения dCt/ddCt конкретной пары микроРНК в этой же фракции исследуемой биологической жидкости, лежат за пределами cut off ($\text{mean} + 2SD$ или $\text{mean} - 2SD$), полученные из анализа экспрессии микроРНК у группы доноров «ЗД+ДГПЖ») считаются больными РПЖ. Если в эксперименте основная часть значений dCt/ddCt у больных пациентов была меньше, чем у ЗД, то используется « $-2SD$ », в противном случае используется « $+2SD$ » (**рисунок 5**).

3. У оставшихся пациентов из группы больных анализируют экспрессию либо этой же пары микроРНК в другой фракции мочи, либо следующую пару микроРНК в этой же/другой фракции мочи. Как и на предыдущем шаге, идентификация онкологического больного производится путем сравнения полученных dCt/ddCt значений экспрессий микроРНК со значениями $\text{mean} \pm 2SD$ (полученными из анализа экспрессий этих же микроРНК в этой же фракции биологической жидкости у группы доноров «ЗД+ДГПЖ»). То есть, если полученные значения dCt/ddCt выходят за пределы $\text{mean} + 2SD$ или $\text{mean} - 2SD$, то пациент считается больным РПЖ.

4. С образцами пациентов, не попавших за предыдущие шаги в группу «больных РПЖ», проделывают те же действия, что и раньше, но с использованием следующих пар микроРНК, анализируя их экспрессию или распределение в различных фракциях мочи.

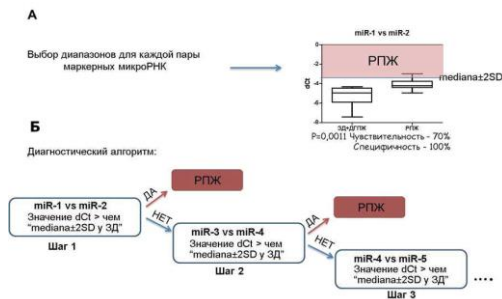


Рисунок 5. Схема анализа данных для выявления и мониторинга больных РПЖ. **(А)** Выбор диапазонов для каждой пары маркерных микроРНК; **(Б)** Общая схема алгоритма анализа данных для постановки диагноза «точно РПЖ».

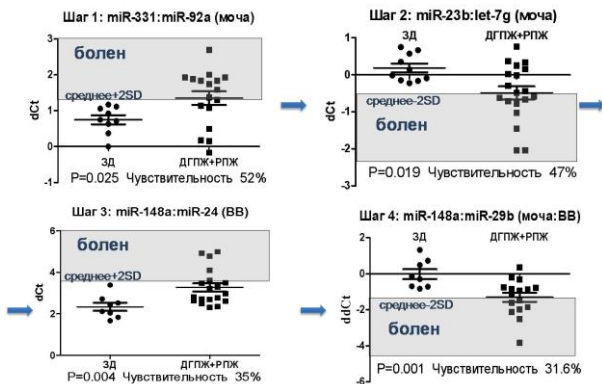
Предложенный алгоритм действий по постановке диагноза позволяет: 1) на основании данных об экспрессии 7-ми микроРНК в моче пациентов, полученных с использованием 4 аналитических систем, выявлять пациентов с диагностическим статусом «точно болен» с чувствительностью и специфичностью 100% (**рисунок 6А**); 2) на основании данных об экспрессии 9-ти микроРНК в моче пациентов, полученных с использованием 5 аналитических систем, выявлять пациентов с диагнозом РПЖ со специфичностью 100% и чувствительностью 90% (**рисунок 6Б**); 3) на основании данных об экспрессии 9-ти микроРНК в моче пациентов, полученных с использованием 5 аналитических систем, выявлять пациентов с диагностическим статусом «точно не РПЖ» со специфичностью и чувствительностью 100% (**рисунок 6В**); 4) на основании данных об экспрессии 5-ти микроРНК в моче пациентов, полученных с использованием 3 аналитических систем, выявлять пациентов с диагностическим статусом «точно здоров» со специфичностью и чувствительностью 100% (**рисунок 6Г**).

К сожалению, нам не удалось поставить диагноз («РПЖ») только одному пациенту, но нам удалось отнести его к группе пациентов с диагностическим статусом «точно болен».

Диагностическая система на основе этого алгоритма позволяет: 1) выявлять пациентов с диагностическим статусом «заболевание ПЖ» за 4 аналитических шага с использованием данных об экспрессии 7 микроРНК мочи с абсолютной чувствительностью и специфичностью, 2) выявлять пациентов больных РПЖ (в группе больных ДГПЖ и здоровых) за 5 аналитических шагов с использованием данных об экспрессии 9 микроРНК мочи с чувствительностью 90% и специфичностью 100%, 3) используя 5 аналитических шагов с использованием данных об экспрессии 9 микроРНК, выявлять пациентов с диагностическим статусом «не болен РПЖ» с абсолютной чувствительностью и специфичностью, 4) выявлять пациентов с диагностическим статусом «здоров» за 3 аналитических шага с использованием данных об экспрессии 5 микроРНК мочи с абсолютной чувствительностью и специфичностью.

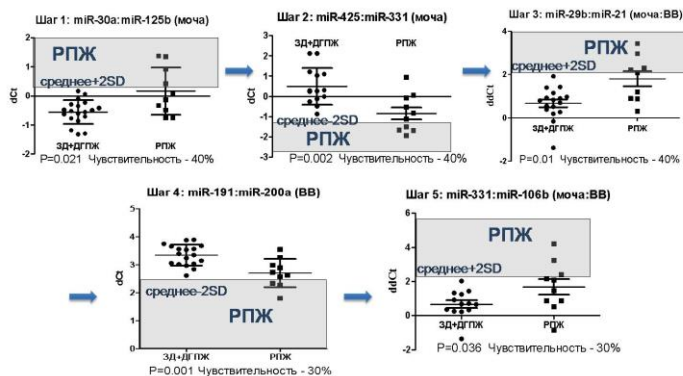
А. «Точно болен»

ЗД (контрольная группа) и ДГПЖ+РПЖ



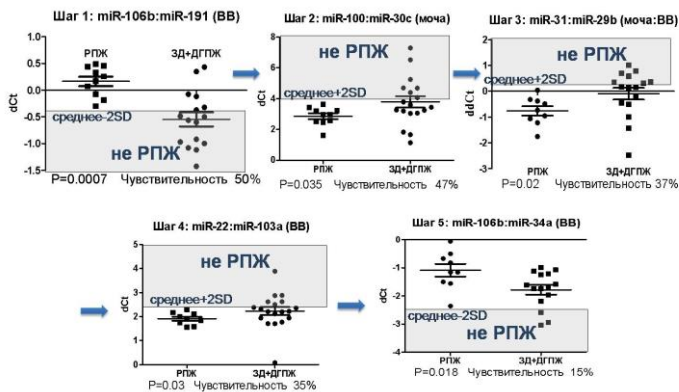
Б. «Точно РПЖ»

ЗД+ДГПЖ (как контрольная группа) и РПЖ



В. «Точно не РПЖ»

РПЖ (как контрольная группа) и ЗД+ДГПЖ



Г. «Точно здоров»

ДГПЖ+РПЖ (как контрольная группа) и ЗД

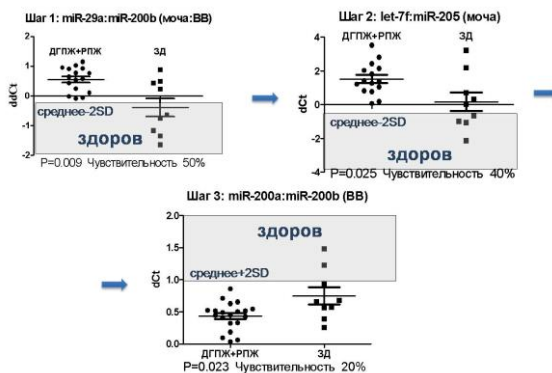


Рисунок 6. Схема алгоритма анализа данных с указанием значений Р и чувствительности для каждой аналитической системы (А) для выявления больных пациентов (ДГПЖ или РПЖ) (ЗД (как контрольная группа) и ДГПЖ+РПЖ); (Б) для выявления больных РПЖ (ЗД+ДГПЖ (как контрольная группа) и РПЖ); (В) для выявления пациентов с диагнозом «точно не РПЖ» (РПЖ (как контрольная группа) и ЗД+ДГПЖ); (Г) для выявления ЗД (ДГПЖ+РПЖ (как контрольная группа) и ЗД).

Заключение

В результате выполненной работы разработан метод выделения микроРНК из крови и мочи. Показано, что метод существенно лучше аналогов подходит для выделения микроРНК мочи. Разработан эффективный, быстрый и простой метод выделения ВВ из биологических жидкостей, который в комбинации с методом выделения микроРНК позволяет получать микроРНК из фракции микровезикул, свободные от ингибиторов ОТ-ПЦР. С использованием платформы miRCURY LNA miRNA qPCR Panels Urine (Exiqon, Дания) получены данные о концентрации 84 микроРНК во фракциях бесклеточного супернатанта мочи и во фракциях ВВ мочи ЗД, пациентов с ДГПЖ и больных РПЖ. Выполнен анализ данных об экспрессии 84 микроРНК с целью поиска потенциальных маркеров РПЖ. Для анализа микрочиповых данных микроРНК трех различных групп доноров применен алгоритм Boruta на базе метода классификации RandomForest с последующей корректировкой данных методом Бенджамина-Хохберга. Пары микроРНК охарактеризованы по нескольким критериям, выбраны наилучшие комбинации пар микроРНК и определен их диагностический потенциал. Предложен алгоритм анализа данных, который позволяет подбирать диагностические пары микроРНК, определять диагностические диапазоны их концентраций и формировать панели микроРНК для создания диагностических систем. Предложен вариант диагностической системы, основанной на анализе 24 микроРНК и позволяющей не только выявлять больных раком предстательной железы с чувствительностью не менее 90% и специфичностью 100%, но и классифицировать ЗД и больных ДГПЖ.

ВЫВОДЫ

1. Разработан протокол выделения микроРНК из мочи, основанный на использовании гуанидина изотиоцианата и октановой кислоты. Подобраны оптимальные концентрации реагентов для разрушения нуклеопротеиновых комплексов и осаждения балластных биополимеров. Показано, что предложенный метод превосходит аналоги по эффективности выделения микроРНК, скорости и простоте выполнения процедуры.
2. Разработан быстрый, простой и эффективный метод выделения внеклеточных везикул из мочи, основанный на использовании агрегации и осаждения внеклеточных везикул, не уступающий ультрацентрифугированию.
3. Выполнен анализ экспрессии 84 микроРНК в бесклеточной фракции и фракции ВВ мочи ЗД, больных ДГПЖ и РПЖ. Выполнен статистический и биоинформатический анализ этих данных при помощи баз данных OncomiRDB и DIANA-TarBase. Обнаружено, что только 52,8% микроРНК согласно OncomiRDB и 65% микроРНК согласно DIANA-TarBase во фракциях ВВ и бесклеточного супернатанта мочи ассоциированы, по нашим данным, с развитием РПЖ, являются простатспецифическими и принимают участие в процессах развития РПЖ.
4. В результате проведенного исследования и статистического анализа данных установлено 6 пар микроРНК, обладающих наибольшей диагностической эффективностью: miR-107-miR-26b-5p (AUC 0,93, 80% чувствительность и 100% специфичность), miR-375-3p-miR-26b-5p (AUC 0,83, 70% чувствительность и 100% специфичность) в группе сравнения здоровые - больные РПЖ во фракции супернатанта мочи, а так же miR-31-5p-miR-16-5p (AUC 0,89, 80% чувствительность и 100% специфичность), miR-31-5p-miR-200b (AUC 0,88, 70% чувствительность и 100% специфичность), miR-31-5p-miR-30e-3p (AUC 0,88, 80% чувствительность и 100% специфичность) и miR-31-5p-miR-660-5p (AUC 0,84, 70% чувствительность и 100% специфичность) в группе ЗД – пациенты с ДГПЖ во фракции внеклеточных везикул мочи.
5. Разработан вариант алгоритма анализа данных, позволяющий выбирать пары микроРНК для построения диагностической системы максимально классифицирующей пациентов, уровни cut-off, учитывающие разброс данных и систематические ошибки. На основании полученных данных выбрана панель из 24 диагностически значимых микроРНК и разработана диагностическая система, которая на основании данных об экспрессии микроРНК в моче, полученных с использованием 17 аналитических систем, позволяет выявлять ЗД, пациентов с ДГПЖ и больных РПЖ с специфичностью 100% и чувствительностью не менее 90%.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

Статьи:

1. Bryzgunova O.E. Comparative Study of Extracellular Vesicles from the Urine of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients / Bryzgunova O.E., Zaripov M.M., Skvortsova T.E., Lekchnov E.A., Grigor'eva A.E., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Ryabchikova E.I., Yurchenko Y.B., Voitsitskiy V.E., Laktionov P.P. // PLOS ONE – 2016. – Т. 11 – № 6 – С.e0157566.
2. Lekchnov E.A. Protocol for miRNA isolation from biofluids / Lekchnov E.A., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Bryzgunova O.E., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // Analytical Biochemistry – 2016. – Т. 499 – С.78–84.
3. Bryzgunova O.E. Bioinformatics analysis for evaluation of the diagnostic potentialities of miR-19b, -125b and -205 as liquid biopsy markers of prostate cancer Tomsk, Russia, 2017. – 020009c.
4. Konoshenko M.Y. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends / Konoshenko M.Y., Lekchnov E.A., Vlassov A.V., Laktionov P.P. // BioMed Research International – 2018. – Т. 2018 – С.1–27.
5. Lekchnov E. Searching for the Novel Specific Predictors of Prostate Cancer in Urine: The Analysis of 84 miRNA Expression / Lekchnov E., Amelina E., Bryzgunova O., Zaporozhchenko I., Konoshenko M., Yarmoschuk S., Murashov I., Pashkovskaya O., Gorizkii A., Zheravin A., Laktionov P. // International Journal of Molecular Sciences – 2018. – Т. 19 – № 12 – С.4088.
6. Bryzgunova O.E. Data analysis algorithm for the development of extracellular miRNA-based diagnostic systems for prostate cancer / Bryzgunova O.E., Zaporozhchenko I.A., Lekchnov E.A., Amelina E.V., Konoshenko M.Y., Yarmoschuk S.V., Pashkovskaya O.A., Zheravin A.A., Pak S.V., Rykova E.Y., Laktionov P.P. // PLOS ONE – 2019. – Т. 14 – № 4 – С.e0215003.

Патенты:

1. Метод выделения микроРНК из биологических жидкостей. Лехнов Е.А., Морозкин Е.С., Запорожченко И.А., Власов В.В., Лактионов П.П. Патент № 2585232. Опубликовано 27.05.2016.
2. Способ выделения внеклеточных везикул из биологических жидкостей. Коношенко М.Ю., Лехнов Е.А., Брызгунова О.Е., Лактионов П.П. Патент № 2678988. Опубликовано 05.02.2019.