

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-20-32



Уровень экспрессии miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367, miR-371, miR-372, miR-373, miR-10b, miR-21 и miR-93 клетками различных гистотипов герминогенных опухолей яичка

М.С. Князева, В.А. Загоруйко, А.В. Хохлова, И.В. Назарова, А.В. Шалаев, Е.И. Сидина, Л.М. Забегина, А.С. Артемьева, А.К. Носов, С.А. Проценко, А.В. Малек

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

Контакты: Анастасия Валерьевна Малек anastasia@malek.com

Введение. Герминогенные опухоли яичка являются относительно редким заболеванием. Высокая социальная значимость данной патологии обусловлена тем, что она встречается у больных молодого возраста. Современные схемы полихимиотерапии определяют потенциальную возможность излечения большинства пациентов даже при распространенном опухолевом процессе. Эффективность терапии оценивается путем мониторинга ряда маркеров (альфа-фетопротеина, хорионического гонадотропина человека и лактатдегидрогеназы), но низкая диагностическая специфичность этих молекул обуславливает необходимость разработки новых методов. В течение последних лет проводятся исследования возможности использования в качестве маркера герминогенных опухолей яичка циркулирующих микроРНК. Для создания и внедрения в практику технологий их анализа необходимо понять особенности экспрессионных изменений потенциально маркерных молекул в клетках различных гистологических вариантов герминогенных новообразований яичка.

Цель исследования – проанализировать экспрессию молекул микроРНК (miR-302/miR-367, miR-371/miR-373) в образцах герминогенных опухолей яичка различных гистологических типов.

Материалы и методы. В исследование были включены образцы герминогенных опухолей яичка ($n = 61$), в том числе семином, эмбриональных карцином, тератом постпубертатного типа, опухолей желточного мешка, хорионкарцином, и образцы нормальной ткани ($n = 61$). Анализ проведен с помощью методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

Результаты. Описаны изменения экспрессии молекул кластера miR-302/miR-367, характерные для семином, эмбриональных карцином и опухолей желточного мешочка, а также изменения экспрессии кластера miR-371/miR-373, универсальные для всех гистотипов, кроме хорионкарцином. Показано угнетение экспрессионной активности miR-10b и miR-145 в семиномах, эмбриональных карциномах и тератомах постпубертатного типа.

Заключение. Повышение уровней экспрессии miR-302b, miR-302d, miR-371a и снижение уровней экспрессии miR-10b, miR-145 характерны для наиболее часто встречающихся вариантов герминогенных опухолей яичка. Обнаруженные изменения существенны и могут привести к изменениям профиля циркулирующих микроРНК.

Ключевые слова: микроРНК, герминогенные опухоли яичка, обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция

Для цитирования: Князева М.С., Загоруйко В.А., Хохлова А.В. и др. Уровень экспрессии miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367, miR-371, miR-372, miR-373, miR-10b, miR-21 и miR-93 клетками различных гистотипов герминогенных опухолей яичка. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(1):20–32. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-20-32.

Expression of miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367, miR-371, miR-372, miR-373, miR-10b, miR-21 and miR-93 in cells of different histotypes of testicular germ cell tumors

M.S. Knyazeva, V.A. Zagoruiko, A.V. Khokhlova, I.V. Nazarova, A.V. Shalaev, E.I. Sidina, L.M. Zabegina, A.S. Artemyeva, A.K. Nosov, S.A. Protsenko, A.V. Malek

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochny Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia

Contacts: Anastasia Valeryevna Malek anastasia@malek.com

Introduction. Testicular germ cell tumor is a relatively rare disease. Its high social significance is due to the fact that this pathology occurs in young patients. The standard schemes of polychemotherapy determine the potential possibility of effective treatment for most of the patients even with an advanced disease. Several circulating markers (alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotropin and lactate dehydrogenase) are being used for therapy monitoring, but the low diagnostic specificity of these molecules determines the need to develop new approaches. Over the past years, circulating microRNA, for instance miR-371a-3p, appeared to be promising marker for testicular germ cell tumor monitoring. However, to develop and to implement in practice the microRNA-based diagnostic technologies, it's necessarily to understand the features of the microRNA expression alterations specific for different histological types of testicular germ cell tumor.

The study objective – to evaluate changes in the expression of several potential marker microRNA molecules (miR-302/miR-367, miR-371/miR-373) in testicular germ cell tumor samples of various histological types.

Materials and methods. Testicular germ cell tumor samples ($n = 61$), including seminomas, embryonic carcinomas, post-pubertal teratomas, yolk sac tumors, chorioncarcinomas, and corresponding normal tissue samples ($n = 61$) were included in the study. The analysis of selected miRNA expression was performed by reverse transcription and polymerase chain reaction.

Results. We identified the changes in the expression profile of the miR-302/miR-367 cluster typical for seminomas, embryonic carcinomas, post-pubertal teratomas, yolk sac tumors and chorioncarcinomas, as well as changes in the expression profile of the miR-371/miR-373 cluster, universal for all histotypes except chorioncarcinomas. Inhibition of miR-10b and miR-145 expression in seminomas, embryonic carcinomas, and post-pubertal teratomas was demonstrated.

Conclusion. Activation of miR-302b, miR-302d, miR-371a expression and inhibition of miR-10b, miR-145 expression in the tissue of the most common variants of testicular germ cell tumor is a characteristic feature of these tumors. The detected changes are significant and can lead to corresponding changes in the profile of circulating microRNAs.

Key words: microRNA, testicular germ cell tumors, reverse transcription, polymerase chain reaction

For citation: Knyazeva M.S., Zagoruiko V.A., Khokhlova A.V. et al. Expression of miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-367, miR-371, miR-372, miR-373, miR-10b, miR-21 and miR-93 in cells of different histotypes of testicular germ cell tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1):20–32. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-20-32.

ВВЕДЕНИЕ

Роль микроРНК в развитии герминогенных опухолей яичка (ГОЯ), диагностический потенциал этих молекул и возможности терапевтической модификации их экспрессии являются предметом многочисленных фундаментальных исследований [1]. Значение анализа miR-371a-3p для диагностики, контроля эффекта химиотерапии, качества лимфодиссекции и оценки риска рецидива является предметом клинических исследований (NCT04435756, NCT04914026). Анализ научной литературы по данному вопросу выявил ряд противоречий, которые, возможно, являются причиной медленного (на протяжении почти 10 лет) внедрения методов анализа микроРНК в клиническую практику [2].

Герминогенные опухоли яичка представляют собой относительно редкую патологию, социальная значимость которой определяется возрастом пациентов. Максимальный показатель относительной заболеваемости наблюдается в возрастной группе 25–29 лет [3]. Принято считать, что ГОЯ возникают в результате нарушения многоэтапного процесса нормального созревания половых клеток. За 5 десятилетий, прошедших со времени 1-й публикации, посвященной гистогенезу тестикулярных опухолей [4], эта теория развилась, но не претерпела принципиальных изменений. Она объясняет факт гистологического разнообразия ГОЯ [5]. Герминогенные опухоли яичка разделяют на 2 большие

группы: семиномы (СЕМ) и несеминомы (НЕСЕМ). Последняя группа включает низкодифференцированные эмбриональные карциномы и относительно высокодифференцированные опухоли: тератомы (ТЕ), хорионкарциномы (ХК) и опухоли желточного мешка (ОЖМ) [5]. Перечисленные варианты ГОЯ имеют четкие морфологические различия (рис. 1).

Сравнительное исследование молекулярно-генетических характеристик различных гистотипов ГОЯ также выявляет существенные различия профиля точечных мутаций и участков амплификаций ДНК, характера метилирования генома и экспрессионных изменений опухолевых клеток [5]. Можно предположить, что это разнообразие приводит к различиям в клинических характеристиках гистологических вариантов ГОЯ. Однако в клинических рекомендациях, как отечественных [6], так и международных [7], говорится о незначительных различиях алгоритмов диагностики и лечения пациентов лишь 2 групп: с СЕМ и НЕСЕМ.

Исследование 3 традиционных маркеров — хорионического гонадотропина (ХГЧ), альфа-фетопroteина (АФП) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) — рекомендовано при всех вариантах ГОЯ. Применение аналогичных лечебных подходов оказывается оправданным, поскольку у пациентов с различными гистологическими вариантами ГОЯ наблюдается незначительная разница в показателях выживаемости [8] или отмечается ее

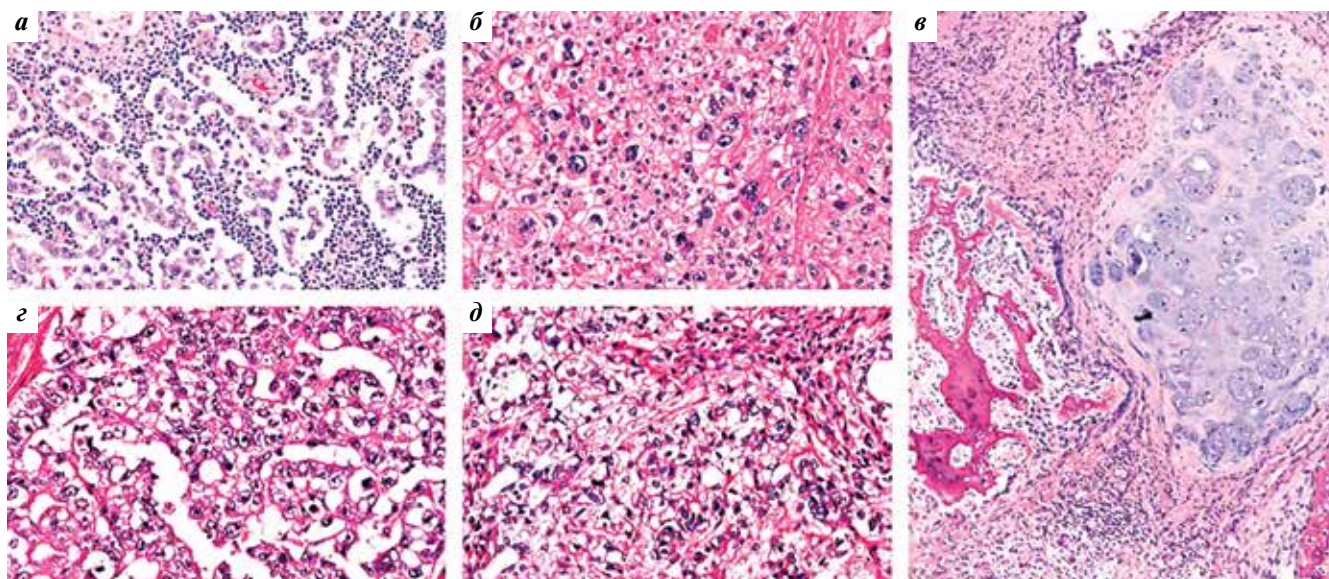


Рис. 1. Гистологические варианты герминогенных опухолей яичка: а – семинома; б – эмбриональная карцинома; в – хорионкарцинома; г – опухоль желточного мешка; д – зрелая тератома. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 1. Histological variants of testicular germ cell tumor: а – seminoma; б – embryonic carcinoma; в – chorioncarcinoma; г – yolk sac tumor; д – mature teratoma. Hematoxylin and eosin staining. $\times 200$

отсутствие [9]. Так, несмотря на существенные различия биологии гистологических вариантов ГОЯ их клинические характеристики во многом схожи.

Существование различных гистологических вариантов ГОЯ имеет значение при разработке новых диагностических подходов. Так, авторы современных обзоров методов лабораторной диагностики данной патологии дифференцируют потенциальные маркеры различных гистотипов заболевания [10, 11]. Многочисленные исследования изменений экспрессии микроРНК в клетках ГОЯ и концентрации этих молекул в плазме также показывают различия между гистологическими вариантами. Однако результаты этих исследований пока плохо сопоставимы. Например, в одной работе повышение уровня экспрессии кластера miR-302/miR-367 было описано как характерная особенность ОЖМ [12], а в другом – ЭК [13].

В совокупности анализ научной литературы позволяет сформировать представление о существенных и разнообразных изменениях уровней экспрессии микроРНК при развитии ГОЯ, но отчетливая картина пока не сложилась. М. Regouc и соавт. [1] проанализировали результаты многочисленных исследований микроРНК при ГОЯ. Обобщенно полученные данные представлены на рис. 2 и 3 [14].

«Мозаичный» характер доступных научных данных и отсутствие результатов прямого сравнения уровней экспрессии потенциально маркерных микроРНК в клетках различных гистотипов ГОЯ определили необходимость данного исследования. Так, в рамках этой работы были проанализированы уровни экспрессии нескольких молекул микроРНК (кластеры miR-302/miR-367, miR-371/miR-373, а также miR-371/miR-373,

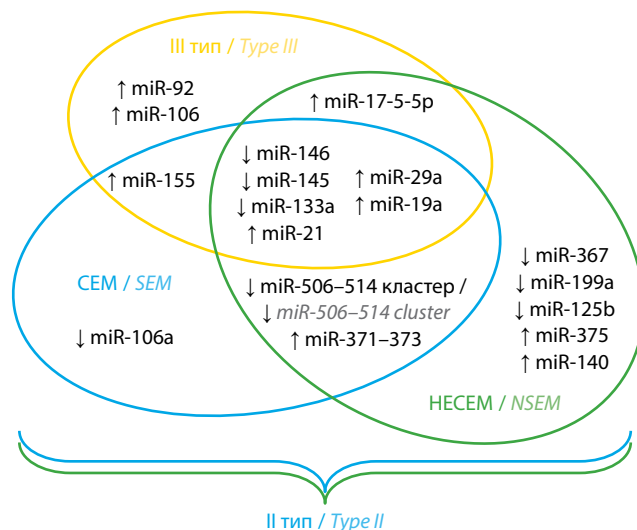


Рис. 2. Схема характерных изменений (активации – \uparrow или угнетения – \downarrow) экспрессии микроРНК в клетках различных гистотипов герминогенных опухолей яичка по сравнению с нормальной тканью. Голубой и синей линиями обведены изменения, характерные для опухолей II типа, объединяющих семиномы (голубая линия) и несеминомы (синяя линия). Желтой линией обведены изменения, характерные для опухолей III типа – сперматогонных семином (адаптировано из [14]). SEM – семинома; HECEM – несеминома

Fig. 2. The scheme of miRNA expression changes (over-expression – \uparrow or down-expression – \downarrow) typical for the cells of different testicular germ cell tumors compared to normal testicular tissue. Expression changes characteristic for type II testicular germ cell tumors, consisting of seminoma and non-seminoma, are circled by blue and green lines. Expression changes characteristic for type III testicular germ cell tumors (or spermatocytic tumors) are circled by yellow line (adapted from [14]). SEM – seminoma; NSEM – non-seminoma

miR-21 и miR-145) в образцах СЕМ, ЭК, ТЕ, ОЖМ, ХК и нормальных тканей яичка и описаны характерные для каждого гистотипа экспрессионные изменения.

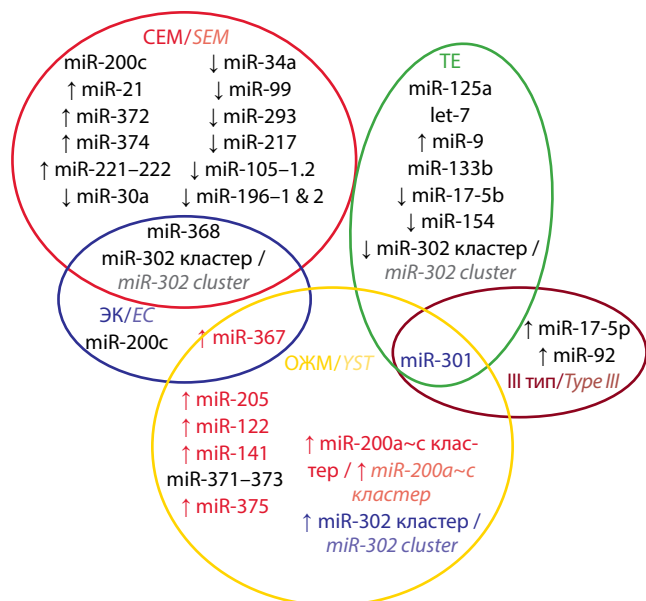


Рис. 3. Схема относительных изменений (активации — ↑ или угнетения — ↓) экспрессии микроРНК при сравнении различных типов герминогенных опухолей яичка. Линиями различных цветов объединены молекулы, имеющие сходный экспрессионный профиль в клетках семинома (красная линия), эмбриональных карцином (зеленая линия), тератом (синяя линия), опухолей желточного мешка (желтая линия) и опухолей III типа, или сперматогонных семинома (бордовая линия) (адаптировано из [14]). СЕМ — семиномы; ЭК — эмбриональные карциномы; ТЕ — тератомы; ОЖМ — опухоли желточного мешка

Fig. 3. The scheme of comparative expression changes in different types of testicular germ cell tumors. Typical changes are circled by different color lines: seminomas (red line), embryonic carcinomas (green line), teratomas (blue line), yolk sack tumors (yellow line) and tumors of III types, or spermatocytic tumors (burgundy line) (adapted from [14]). SEM — seminoma; EC — embryonic carcinoma; YST — yolk sack tumor; TE — teratoma

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследовании, одобренном на заседании 1 от 28.01.2021 (выписка № 27/27) комитета по этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, использован архивный материал (FFPE), полученный от пациентов, проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова за период с 2015 по 2021 г. В исследование были включены образцы ГОЯ и близлежащей здоровой ткани яичка, полученные после операции (односторонней орхофуникулэктомии). По данным гистологического исследования, в каждом случае опухоль была представлена 1 типом ГОЯ (как минимум на 90 %). До операции пациенты не получали химиотерапию. Характеристика образцов, включенных в исследование, представлена в табл. 1.

Выделение РНК. После гистологической верификации образцы ткани были разделены на тонкие срезы (10 мкм толщиной). Тотальная РНК выделялась из 3–4 срезов. Для депарафинизации к срезам добавляли минеральное масло (1000 мкл) (MP Biomedicals, США). Инкубацию проводили при 65 °С в течение 15 мин, масло и парафин удаляли путем отмывки

96 % этанолом. К образцу добавляли 100 мкл раствора (2 мг/мл, активность — 30 ед. акт/мг, «Альгимед-Техно», Беларусь). Протеолиз проводили при 60 °С в течение 1 ч.

Таблица 1. Характеристика образцов, включенных в исследование (n = 61)
 Table 1. Characteristic of tissue samples included in the study (n = 61)

Гистологический тип Histological type	Гистологический подтип Histological subtype	Количество парных образцов ткани Number of paired tissue samples
Семинома Seminoma	—	25
Несеминома Non-seminoma	Эмбриональная карцинома Embryonic carcinoma	14
	Тератома Teratoma	10
	Хорионкарцинома Chorioncarcinoma	8
	Опухоль желточного мешка Yolk sac tumor	4

Оставшуюся после протеолиза ткань осаждали путем центрифугирования (10 000 × g, 4 °С — 10 мин), супернатант (~100 мкл) переносили в чистую пробирку, добавляли 200 мкл буфера на основе октановой кислоты (октановая кислота 0,5 %; 0,8М ацетат натрия; pH 4,0) и 100 мкл гуанидина изотиоцианата (3М) и перемешивали, а затем инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Образец переносили на спин-колонку, заполненную сорбентом (BioSilica, Россия), промывали дважды буфером для промывки (500 мкл; 0,5М гуанидин изотиоцианат; 10мМ трис-ацетат; pH 6,5; 50 % этанол; 1 % 2-меркаптоэтанол). Образец элюировали с помощью 50 мкл буфера, содержащего 10 мМ NaHCO₃, 10 мМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты).

Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). Концентрация выделенной РНК определялась в диапазоне 30–350 нг/мкл.

Обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция и анализ результатов. Анализ концентрации выбранных молекул микроРНК, включая miR-93, проводили с помощью соответствующих наборов производства компании «Альгимед-Техно» (Беларусь) в соответствии с протоколом. В рамках исследования были использованы системы для анализа следующих молекул: hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-371-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-93-5p.

Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили в объеме 20 мкл, включая 2 мкл раствора тотальной РНК. Реакционную смесь тщательно перемешивали и инкубировали 45 мин при 25 °С с последующим нагревом при 85 °С в течение 5 мин для инактивации обратной транскриптазы (0,4 мкл ArtMMLV (200 ед. акт/мкл) ООО «АртБиоТех», Беларусь). Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) выполняли в объеме 20 мкл, включая 4 мкл реакционной смеси, в которой проводилась ОТ. Условия для ПЦР были следующими: 95 °С в течение 10 мин, 45 циклов; 95 °С — 5 с, 65 °С — 15 с. Детекцию сигнала амплификации проводили по каналу FAM. Реакции ОТ-ПЦР для каждого образца повторяли дважды. Для последующих расчетов использовали среднее арифметическое значение. Все реакции ОТ и ПЦР проводили на CFX96 Touch™ (BioRad, США). Анализ данных ПЦР осуществляли с помощью программ CFX Manager Software, Excel 10.0, Sigma Plot 11.0 GraphPad Prizm 12.0.

Вариабельность уровней экспрессии анализируемых молекул оценивали с помощью алгоритма NormFinder [15]. Расчет изменений экспрессии отдельных молекул микроРНК выполняли методом ΔC_t (delta Cycle threshold) ($\Delta C_t = 2^{(C_t \text{ miR-X/ГОЯ} - C_t \text{ miR-93/ГОЯ})}$) или $\Delta\Delta C_t$ (delta delta Cycle threshold) ($\Delta\Delta C_t = 2^{((C_t \text{ miR-X/ГОЯ} - C_t \text{ miR-93/ГОЯ}) - (C_t \text{ miR-X/Норм} - C_t \text{ miR-93/Норм}))}$) [16].

Для оценки экспрессионных изменений молекул микроРНК в рамках отдельных групп образцов проводили расчет средних арифметических значений нормализованных показателей и среднеквадратичного отклонения по формуле:

$$STD = \sqrt{(\sum(x - x_{\text{average}})^2)/n}.$$

Статистическую значимость разницы исследуемых параметров между группами оценивали с помощью методов непараметрического анализа путем вычисления критерия Краскела—Уоллиса при сравнении нескольких групп или критерия Манна—Уитни при сравнении 2 групп. Оба критерия могут быть использованы в случае, если количество образцов в сравниваемых группах >3 [17, 18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор потенциально маркерных молекул. Выбор молекул микроРНК для включения в исследование был проведен на основе анализа данных научной литературы, посвященной изучению участия этих молекул в развитии ГОЯ и перспектив их последующего использования в качестве диагностических маркеров. Кластер miR-302/miR-367 объединяет 5 молекул (miR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d и miR-367), которые кодируются участками ДНК в составе гена *LARP7*. Эти молекулы регулируют различные биологические процессы, включая пролиферацию и дифференциацию клеток [19]. Патологические изменения уровня их экспрессии ассоциированы с нарушениями

процессов контроля активности стволовых клеток и развитием ряда онкологических заболеваний. Механизм онкогенной активности этих молекул в контексте ГОЯ связан с влиянием на экспрессию ряда сигнальных молекул (SPRY4, MAPK/ERK [13]). Диагностический и терапевтический потенциал кластера miR-302/miR-367 был показан в ряде исследований [20].

Кластер miR-371/miR-373 включает 3 молекулы (miR-371a, miR-372 и miR-373), повышение уровней экспрессии которых также характерно для клеток ГОЯ. Однако этот феномен описан не для всех гистотипов. Например, в ряде исследований показано, что в клетках тератомы miR-371a-3p не экспрессируется [21], в клетках СЕМ уровень ее экспрессии повышен умеренно, а в клетках ЭК — существенно [22]. Поскольку циркулирующие в плазме молекулы этого кластера, в частности miR-371a-3p, считаются перспективными маркерами ГОЯ, предварительная оценка изменений уровней их экспрессии в ткани опухоли по сравнению с уровнем экспрессии в неизменной тестикулярной ткани представляется важным этапом разработки новых подходов к жидкостной биопсии.

Дополнительно в исследование были включены miR-21 как неспецифический маркер многих онкологических заболеваний [23], а также miR-10b и miR-145, экспрессия которых была выявлена в нормальной тестикулярной ткани [24] и которые участвуют в регуляции ответа клеток ГОЯ на цитостатическую терапию [25].

Оценка аналитических систем и валидация нормализатора. Перед началом исследования были оценены аналитические характеристики метода анализа микроРНК путем определения эффективности ПЦР для линейки разведений синтетических аналогов (или мимиков) тестируемых микроРНК. Все 12 систем показали широкий диапазон прямой зависимости значений пороговых циклов (C_t) от концентрации аналита. Пример результатов оценки эффективности системы для анализа miR-93 представлен на рис. 4.

Результаты анализа материала биологических образцов во всех случаях детектировались в этом диапазоне, что позволило использовать выбранную технологию для решения поставленных задач. Затем оценка экспрессии 12 выбранных молекул была проведена в каждом из 122 образцов (61 — ГОЯ и 61 — нормальной ткани). Все реакции выполнены в 2 повторах, разница результатов не превышала 0,5 цикла. В последующих расчетах использовали среднее арифметическое значение пороговых циклов (C_t) для 2 технических повторов.

Вариабельность полученных результатов оценивали с помощью алгоритма NormFinder (рис. 5). Наиболее стабильный уровень экспрессии (stability value → 1) был показан для miR-93 в группе образцов нормальной ткани яичка (1,31). [15]. Несколько хуже этот показатель был в группе образцов ГОЯ (1,56). Полученные результаты продемонстрировали допустимость

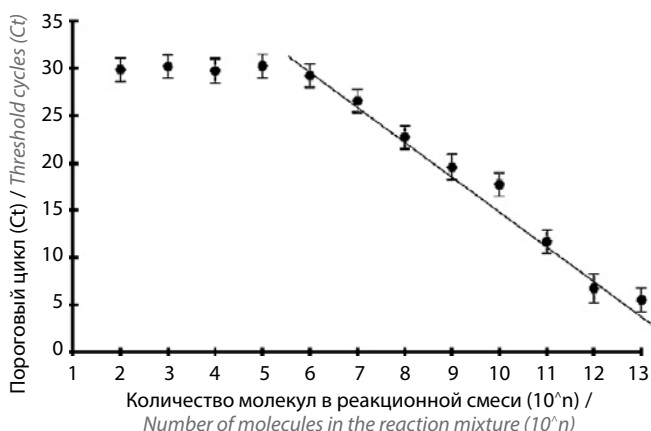


Рис. 4. График зависимости порогового цикла полимеразной цепной реакции от концентрации анализируемой молекулы микроРНК на примере miR-93. Исследование проведено методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с использованием серии разведений синтетического аналога анализируемой молекулы. По оси абсцисс указаны значения степени 10 (10^n) количества молекул в реакционной смеси. Представленные результаты демонстрируют линейную зависимость значения порогового цикла (Ct) от концентрации аналита в диапазоне значений Ct от 7 до 29 и в диапазоне концентраций микроРНК 10^6 – 10^{12} молекул/реакции

Fig. 4. Dependence of the polymerase chain reaction threshold cycle on the concentration of the analyzed miRNA, representative example of microRNA-93 is shown. Assay was performed out by reverse transcription polymerase chain reaction with serial dilution of miRNA synthetic mimic. Concentration on miRNA in reaction mixture is shown on abscissa as an exponent in base 10 (10^n) miRNA molecules per reaction. Presented results indicate linear dependency of threshold cycles (Ct) value from analyte concentration within the diapason of Ct value from 7 to 29 cycles and diapason of miRNA concentration from 10^6 to 10^{12} molecules per reaction

использования miR-93 в качестве нормализатора при анализе данных ПЦР после проведения ОТ.

Анализ уровней экспрессии микроРНК. Для оценки относительного уровня экспрессии молекул микроРНК вычисленные ранее средние арифметические значения результатов технических повторов для каждой молекулы были нормализованы относительно miR-93. Для оценки степени изменения уровня экспрессии конкретной молекулы в каждом случае был проведен расчет параметра ddCt по формуле:

$$ddCt = 2^{((Ct \text{ miR-X/ГОЯ} - Ct \text{ miR-93/ГОЯ}) - (Ct \text{ miR-X/Норм} - Ct \text{ miR-93/Норм}))}$$

В табл. 2 представлены усредненные для каждой клинической группы нормализованные (относительно «нормы») значения уровней экспрессии 11 молекул (параметр ddCt) и статистическая значимость разницы значений уровней экспрессии этих молекул в образцах ГОЯ и нормальной ткани (dCt).

Более наглядно результаты оценки изменений уровней экспрессии молекул кластера miR-302/miR-367 представлены на рис. 6.

При всех гистотипах, кроме ТЕ и ХК, наблюдалось существенное повышение активности экспрессии молекул miR-302a, miR-302b, miR-302c и miR-302d. Изменения уровней экспрессии miR-302b и miR-302d

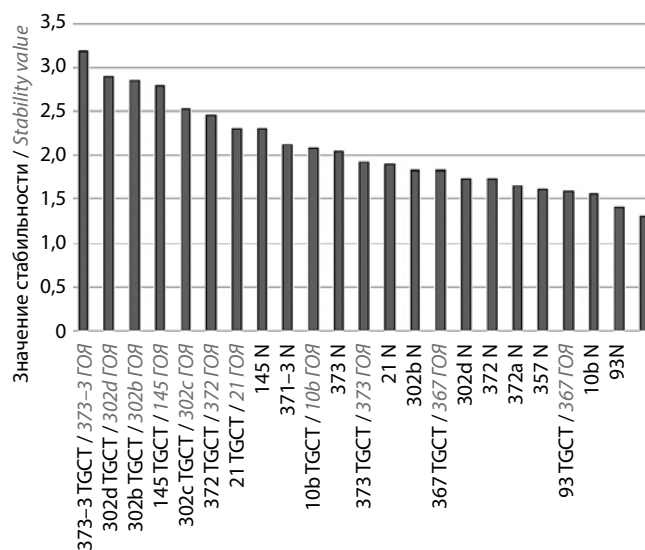


Рис. 5. Оценка вариабельности результатов полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией всех молекул микроРНК, включенных в исследование, с помощью алгоритма NormFinder. Расчет для каждой молекулы проведен отдельно для группы образцов ткани ГОЯ ($n = 61$) и для группы образцов неизменной ткани яичка ($n = 61$). ГОЯ – герминогенные опухоли яичка; N – норма

Fig. 5. Assessment of the variability of reverse transcription polymerase chain reaction assessment of all miRNAs included in the study using the NormFinder algorithm. Stability values were defined for each molecule in group of testicular germ cell tumors samples ($n = 61$) and in group of normal testicular tissue samples ($n = 61$). TGCT – germ cell tumor; N – norma

были всегда существенно более значимы, чем изменения уровней экспрессии miR-302a и miR-302c. На этом фоне изменения уровня экспрессии miR-367 представляются незначительными. В клетках ТЕ и ХК уровень экспрессии 5 микроРНК кластера miR-302/miR-367 оказался более низким по сравнению с нормальной тканью яичка. При этом в случае ТЕ наблюдалось угнетение экспрессии всех 5 анализируемых молекул микроРНК, а в группе ХК было выявлено формирование характерного профиля экспрессионных изменений молекул кластера miR-302/miR-367: miR-367 > miR-302b > miR-302c > miR-302d > miR-302a.

Экспрессионные изменения кластера miR-371/miR-373, наблюдаемые в различных гистотипах ГОЯ, представлены на рис. 7. Ожидаемое повышение экспрессии miR-371a-3p наблюдалось во всех гистотипах, кроме ХК, хотя амплитуда этих изменений была различной. Так, наиболее значимые изменения выявлены в группах СЕМ, ЭК и ОЖМ. В группе ТЕ также наблюдалось повышение уровня экспрессии miR-371a-3p. Амплитуда экспрессионных изменений была менее существенной, но статистически значимой. По сравнению с miR-371a-3p изменения уровней экспрессии 2 других молекул в этих группах были незначимы. Интересно заметить формирование специфического для СЕМ, ЭК и ОЖМ профиля сочетанных изменений экспрессии 3 молекул: miR-371a-3p > miR-373 > miR-372. В группе ТЕ соотношения экспрессионных изменений выглядели иначе: miR-371a-3p > miR-372 > miR-373.

Таблица 2. Результаты сравнительного анализа уровней 11 молекул микроРНК в образцах герминогенных опухолей яичка разных гистологических типов, выполненного методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией

Table 2. The results of comparative analysis of expression levels of eleven miRNA molecules in samples of testicular germ cell tumors of different histological types performed by reverse transcription followed by polymerase chain reaction

Гистологический тип герминогенных опухолей яичка Histological type of germinogenic testicular tumors	ddCt; p										
	miR-302a	miR-302b	miR-302c	miR-302d	miR-367	miR-371a	miR-372	miR-373	miR-21	miR-10b	miR-145
Семинома Seminoma	300,7; ***	567,9; ****	125,1; ***	676,4; ****	13,5; *	2400,2; ****	36,9; **	592,1; ****	1,3; ns	0,1; **	0,1; **
Эмбриональная карцинома Embryonic carcinoma	440,0; ****	847,0; ****	518,6; ****	924,5; ****	50,6; **	1371,7; ****	14,1; *	164,4; **	0,6; ns	0,1; ***	0,1; ***
Тератома Teratoma	0,4; **	0,4; ns	0,3; **	0,5; *	0,4; **	4,0; **	1,2; ns	0,5; ns	1,3; ns	0,1; ***	0,4; **
Опухоль желточного мешка Yolk sac tumor	2783,5; ***	6052,5; ****	2664,1; ****	4127,2; ****	148,2; **	973,5; ****	20,8; ns	106,3; *	0,2; *	0,0; ns	0,0; ns
Хорионкарцинома Choriocarcinoma	0,2; **	0,3; *	0,4; **	0,2; *	0,4; *	0,6; **	0,7; ***	0,2; *	1,6; ns	1,3; ns	0,1; ***

* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,00005$.

Примечание. Параметр ddCt был вычислен для каждой пары образцов (ГОЯ и нормальной ткани), затем были определены средние для группы значения. P — результат оценки статистической достоверности разницы нормализованных значений (dCt) экспрессии каждой молекулы между образцами герминогенных опухолей яичка и нормальной ткани яичка с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни; ns — незначимо.

Note. Values of ddCt were calculated for each samples pair (testicular germ cell tumors and normal testicular tissue) and averaged for the groups. Values of dCt were grouped for testicular germ cell tumors and normal tissue, statistical significance of difference observed between such a paired groups was evaluated with non-parametric Mann–Withney test; ns — non significant.

В группе ХК наблюдалось снижение уровней экспрессии всех 3 членов кластера miR-371/miR-373 по сравнению с образцами нормальной ткани.

Представленные результаты демонстрируют аналогичный характер изменений уровней экспрессии 2 кластеров микроРНК в клетках СЕМ, ЭК и ОЖМ, при этом схожесть касается как факта повышения уровней экспрессии этих молекул, так и профиля наблюдаемых изменений. Наиболее значимо повышалась активность miR-302b, miR-302d и miR-371a-3p. Эти молекулы представляются наиболее перспективными маркерами заболевания в случае преобладания в составе опухоли компонентов СЕМ, ЭК и ОЖМ.

Оценка экспрессионных изменений маркерных микроРНК. После определения молекул, уровень экспрессии которых наиболее значимо изменился в ходе развития СЕМ, ЭК и ОЖМ, мы провели оценку степени этих изменений в объединенной группе ГОЯ. Тератомы и ХК были исключены из групп сравнения. Анализ выполнен путем усреднения нормализованных относительно miR-93 ($dCt = 2^{Ct\ miR-X/ГОЯ - Ct\ miR-93/ГОЯ}$) значений в рамках групп ГОЯ и образцов нормальных тканей. Результаты представлены на рис. 8.

Так, существенное и статистически значимое повышение уровней экспрессии 3 молекул наблюдалось в группе образцов, в которую входили 3 гистотипа ГОЯ (СЕМ, ЭК и ОЖМ). Включение в анализ ТЕ и ХК снижало статистическую значимость наблюдаемых изменений, а самостоятельная оценка групп ТЕ и ХК не выявляла никаких значимых изменений характера экспрессии miR-302b, miR-302d и miR-371a. Полученные результаты указывают на возможность использования этих молекул в качестве диагностических маркеров. Однако такая диагностика не будет информативной в случае преобладания в ГОЯ компонентов ТЕ и/или ХК. С учетом значимого повышения концентрации 302b, miR-302d и особенно miR-371a в ткани опухоли можно ожидать «появления» этих молекул в циркуляции, что подтверждается рядом публикаций [25], хотя технологии анализа и алгоритмы интерпретации результатов оценки их концентрации в плазме пока являются предметом исследований и обсуждений [22].

Анализ уровня экспрессии miR-21 выявил незначительные и разнонаправленные изменения в группах ГОЯ. Эта молекула, вероятно, не играет значимой роли в патогенезе заболевания. Интересные результаты получены при оценке экспрессионных изменений

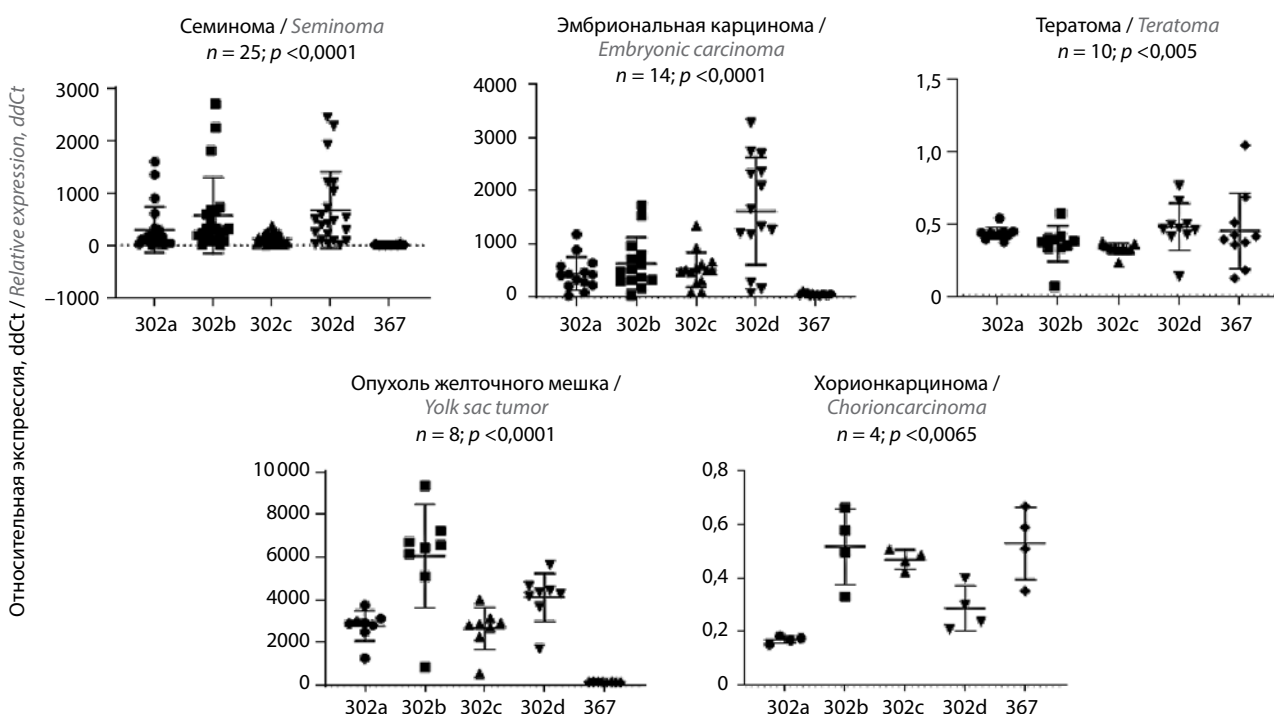


Рис. 6. Изменения экспрессии молекул кластера miR-302/miR-367 в различных гистотипах герминогенных опухолей яичка. Каждая точка на графиках отражает уровень экспрессии отдельной молекулы в конкретном образце ткани герминогенных опухолей яичка. Нормализация проводилась путем расчета параметра ddCt по формуле:

$$ddCt = 2^{((Ct \text{ miR-X/TOЯ} - Ct \text{ miR-93/TOЯ}) - (Ct \text{ miR-X/Норм} - Ct \text{ miR-93/Норм}))}$$

Для каждой группы значений показаны (горизонтальными линиями) среднее значение и среднеквадратичное отклонение, вычисленное по формуле:

$$STD = \sqrt{(\sum (x - x_{average})^2) / n}.$$

Оценка статистической значимости наблюдаемых различий экспрессионных изменений отдельных молекул выполнена с помощью непараметрического критерия Краскела—Уоллиса

Fig. 6. Expression changes in the miR-302/miR-367 cluster in various testicular germ cell tumor histotypes. Each dot reflects expression level of specific miRNA in certain sample of testicular germ cell tumors. Normalization was carried out by calculating the ddCt parameter using the formula:

$$ddCt = 2^{((Ct \text{ miR-X/TGCT} - Ct \text{ miR-93/TGCT}) - (Ct \text{ miR-X/Testis} - Ct \text{ miR-93/Testis}))}$$

Relative expression level of each miRNA was averaged within group of samples, standard deviations were calculated with formula:

$$STD = \sqrt{(\sum (x - x_{average})^2) / n}.$$

These parameters are shown by horizontal lines. The statistical significance of the observed differences in the expression changes of individual molecules was evaluated using the Kruskal—Wallis non-parametric criterion

miR-10b и miR-145. Так, экспрессия этих молекул не изменяется в ОЖМ. В клетках ХК уровень экспрессии miR-10b несколько повышается, а miR-145 — понижается. Активность обеих молекул существенно и статистически значимо подавлена в группе СЕМ, ЭК и ТЕ (рис. 9). В отличие от кластеров miR-302/miR-367 и miR-371/miR-373 «поведение» этих молекул в клетках тератомы аналогично таковому клеток СЕМ и ЭК.

В целом феномен разнонаправленных (реципрокных) изменений экспрессии молекул микроРНК (например, miR-371a/miR-145) при развитии ГОЯ является важным наблюдением, поскольку он может найти практическое применение в рамках разработки новых диагностических подходов. Методика оценки соотношения экспрессионной активности молекул микроРНК с противоположным характером изменений является вариантом решения проблемы нормали-

зации и повышения диагностического потенциала результатов ОТ-ПЦР анализа [26].

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование изменений экспрессии молекул микроРНК в процессе или в результате развития ГОЯ имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение, так как регресс опухолеассоциированных изменений может отражать эффект проводимой терапии. Если изменения уровней экспрессии отдельных микроРНК в клетках опухоли существенны, а объем ее ткани достаточно велик, могут произойти «сдвиги» нормального состава микроРНК циркулирующей плазмы. Такие предположения лежат в основе разработки новых методов анализа циркулирующих микроРНК с целью диагностики, оценки эффекта терапии и последующего наблюдения пациентов с ГОЯ [27]. Например, возможность анализа относительной

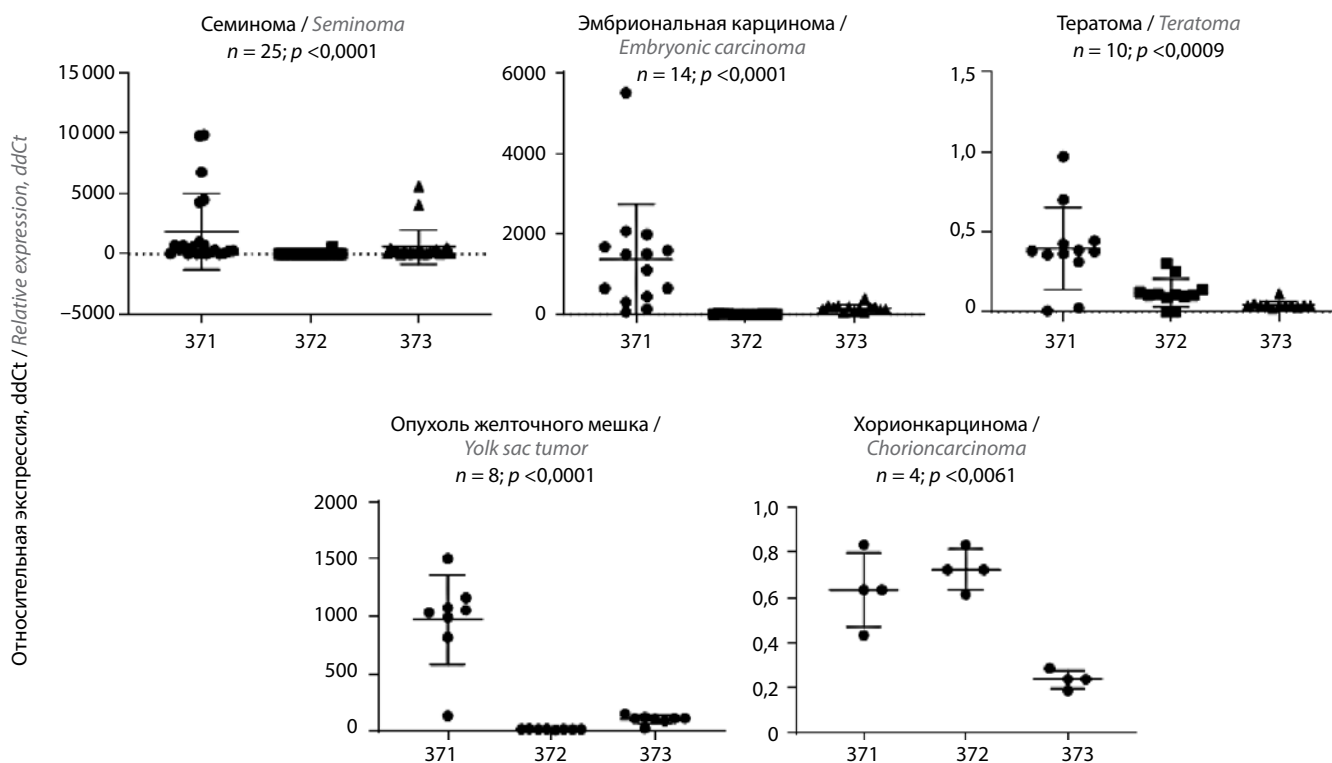


Рис. 7. Изменения экспрессии молекул кластера miR-371/miR-373 в различных гистотипах герминогенных опухолей яичка. Каждая точка на графиках отражает уровень экспрессии отдельной молекулы в конкретном образце ткани герминогенных опухолей яичка. Нормализация проводилась путем расчета параметра ddCt по формуле:

$$ddCt = 2^{((Ct \text{ miR-X/ТОЯ} - Ct \text{ miR-93/ТОЯ}) - (Ct \text{ miR-X/Норм} - Ct \text{ miR-93/Норм}))}$$

Для каждой группы значений показаны (горизонтальными линиями) среднее значение и среднеквадратичное отклонение, вычисленное по формуле:

$$STD = \sqrt{(\sum(x - x_{\text{average}})^2)/n}.$$

Оценка статистической значимости наблюдаемых различий экспрессионных изменений отдельных молекул выполнена с помощью непараметрического критерия Краскела—Уоллиса

Fig. 7. Expression changes in the miR-302/miR-367 cluster in various testicular germ cell tumor histotypes. Each dot reflects expression level of specific miRNA in certain sample of testicular germ cell tumors. Normalization was carried out by calculating the ddCt parameter using the formula:

$$ddCt = 2^{((Ct \text{ miR-X/TGCT} - Ct \text{ miR-93/TGCT}) - (Ct \text{ miR-X/Testis} - Ct \text{ miR-93/Testis}))}$$

Relative expression level of each miRNA was averaged within group of samples, standard deviations were calculated with formula:

$$STD = \sqrt{(\sum(x - x_{\text{average}})^2)/n}.$$

These parameters are shown by horizontal lines. The statistical significance of the observed differences in the expression changes of individual molecules was evaluated using the Kruskal—Wallis non-parametric criterion

концентрации miR-371a-3p у пациентов с ГОЯ показана в десятках экспериментальных работ, а его клиническая целесообразность является предметом клинических испытаний.

Успешная разработка и внедрение в клиническую практику новых методов мониторинга терапии пациентов с ГОЯ требуют решения ряда фундаментальных и технологических проблем, которые подробно представлены в недавнем обзоре С. Conduit и В. Tran [22]. В частности, недостаточно детально исследованы особенности изменений уровней экспрессии микроРНК в различных гистологических вариантах ГОЯ, что не позволяет предсказать изменения состава циркулирующих в плазме молекул. Важной проблемой также остается поиск адекватной методики анализа результатов ОТ-ПЦР. В большинстве исследований стандартный метод расчета экспрессионных изменений (ddCt) модифицирован таким образом, что последу-

ющий ROC-анализ позволяет вычислить оптимальное для данных условий значение порога отсечения (cut-off), получить близкие к 1 значения AUC (area under curve, площадь под кривой) и максимальные показатели чувствительности и специфичности.

Особенность такого подхода заключается в том, что вместо использования референсного образца для каждого клинического случая проводятся анализ группы референсных донорских образцов, нормализация значений концентрации маркерной молекулы в этих образцах (dCt) и вычисление среднего для референсной группы значения. Когда такое усредненное для всех нормальных образцов значение используется затем для вычисления диагностического параметра ddCt и ROC-анализа, значение этого параметра в группе референсных образцов неминуемо стремится к 1. Даже если отличие значений ddCt в группе пациентов с ГОЯ незначительное, оно всегда будет достаточным

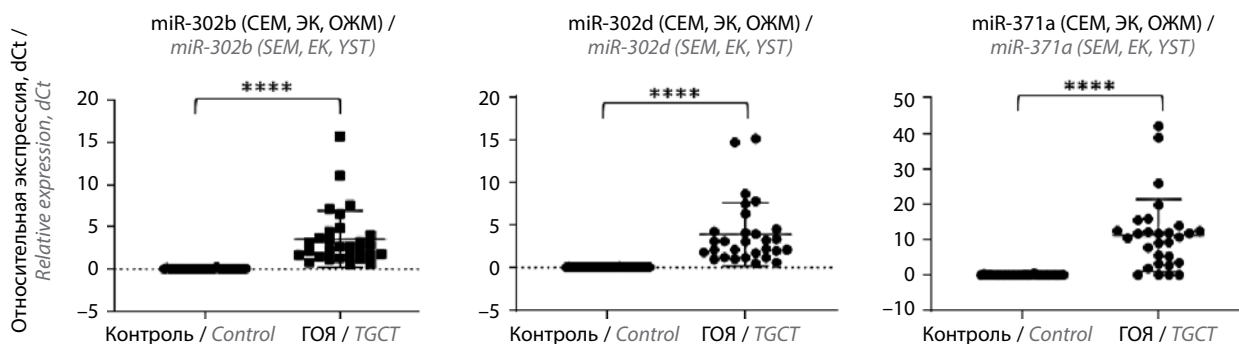


Рис. 8. Сравнение уровней экспрессии молекул miR-302b, miR-302d, miR-371a в образцах герминогенных опухолей яичка, включая семиному ($n = 25$), эмбриональную карциному ($n = 14$), опухоли желточного мешка ($n = 8$) в образцах неизменной ткани яичка. Каждая точка на графиках отражает уровень экспрессии отдельной молекулы в конкретном образце. Нормализация относительно референсной miR-93 проводилась путем расчета параметра dCt по формуле:

$$dCt = 2^{-(Ct\ miR-X/TGCT - Ct\ miR-93/TGCT)}.$$

Для каждой группы значений показаны (горизонтальными линиями) среднее значение и среднее квадратичное отклонение, вычисленное по формуле:

$$STD = \sqrt{(\sum (x - x_{average})^2) / n}.$$

Оценка статистической значимости наблюдаемых различий экспрессионных изменений отдельных молекул выполнена с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса. ГОЯ – герминогенные опухоли яичка; СЕМ – семиномы; ЭК – эмбриональные карциномы; ОМЖ – опухоль желточного мешка. **** $p < 0,00005$

Fig. 8. Comparison of the miR-302b, miR-302d and miR-371a expression level in testicular germ cell tumor including seminoma ($n = 25$), embryonal carcinoma ($n = 14$) and yolk sac tumor ($n = 8$), versus normal testicular tissue. Each dot reflects expression level of specific miRNA in certain sample of testicular germ cell tumors. Normalization relative to the reference miR-93 was carried out by calculating the dCt parameter using the formula:

$$dCt = 2^{-(Ct\ miR-X/TGCT - Ct\ miR-93/TGCT)}.$$

Relative expression level of each miRNA was averaged within group of samples, standard deviations were calculated with formula:

$$STD = \sqrt{(\sum (x - x_{average})^2) / n}.$$

These parameters are shown by horizontal lines. The statistical significance of the observed differences in the expression changes of individual molecules was evaluated using the Kruskal–Wallis non-parametric criterion. TGCT – testicular germ cell tumors; SE – seminomas; EK – embryonal carcinomas; YST – yolk sac tumor. **** $p < 0.00005$

для четкого разделения групп и получения высоких значений AUC, специфичности и чувствительности. Этот метод был реализован при оценке результатов масштабного исследования параметров диагностической значимости M371 Test [27]. К сожалению, такой подход скрывает проблему четкого разделения области нормальных и патологических значений относительной концентрации маркерных молекул микроРНК в плазме, и он неприменим в клинической практике, где нет референсного образца здоровой плазмы.

В представленной работе решалась задача поиска изменений экспрессии ряда маркерных молекул микроРНК, характерных для основных гистотипов ГОЯ. Полученные результаты позволяют утверждать, что существует характерная для СЕМ, ЭК и ОМЖ картина повышения уровней экспрессии молекул кластера miR-302/miR-367. Такие изменения не наблюдались в группах ТЕ и ХК. Экспрессия кластера miR-371/miR-373 изменяется сходным образом во всех, кроме ХК, вариантах ГОЯ. При этом характерные изменения имели высокую амплитуду в клетках СЕМ, ЭК и ОМЖ и относительно низкую – в клетках ТЕ. Полученные результаты указывают на целесообразность поиска изменений концентрации циркулирующих miR-302b, miR-302d, miR-371a в случаях ГОЯ с преобладанием в ткани опухоли компонентов СЕМ, ЭК и ОМЖ.

Описанный феномен снижения уровней экспрессии miR-10b и miR-145 является интересным научным наблюдением. Например, с учетом известных характеристик кластера miR-143/miR-145 (anti-oncomiR) [28] эти данные могут указывать на возможность разработки новых подходов к терапии ГОЯ путем восстановления уровня/функций отдельных молекул. Кроме того, существует вероятность выделения и анализа тканеспецифичных фракций циркулирующих нановезикул плазмы, состав микроРНК которых более точно отражает состав микроРНК определенной ткани [29]. Разработка такого подхода в случае ГОЯ позволит проводить анализ реципрокных изменений концентрации miR-302b, -302d, -371a, -10b и -145. Оценка таких сочетанных изменений, безусловно, должна иметь больший диагностический потенциал, чем оценка отдельных молекул в комплексном и еще малоизученном составе циркулирующих микроРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Характерные изменения уровней экспрессии микроРНК в составе кластера miR-302/miR-367 наблюдались в образцах следующих гистотипов ГОЯ: СЕМ, ЭК и ОМЖ. Специфический характер изменений включал повышение уровня экспрессии 4 родственных

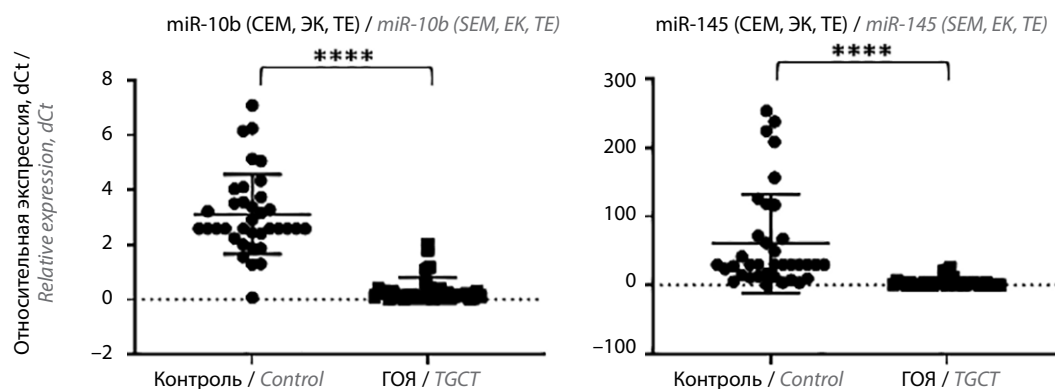


Рис. 9. Сравнение уровней экспрессии молекул miR-10b и miR-145 в образцах герминогенных опухолей яичка, включая семиному ($n = 25$), эмбриональную карциному ($n = 14$), опухоли желточного мешка ($n = 8$) в образцах неизменной ткани яичка. Каждая точка на графиках отражает уровень экспрессии отдельной молекулы в конкретном образце ткани герминогенных опухолей яичка. Нормализация относительно референсной miR-93 проводилась путем расчета параметра dCt по формуле:

$$dCt = 2^{(Ct\ miR-X/TOЯ - Ct\ miR-93/TOЯ)}.$$

Для каждой группы значений показаны (горизонтальными линиями) среднее значение и среднее квадратичное отклонение, вычисленное по формуле:

$$STD = \sqrt{(\sum (x - x_{average})^2) / n}.$$

Оценка статистической значимости наблюдаемых различий экспрессионных изменений отдельных молекул выполнена с помощью непараметрического критерия Краскела—Уоллиса. ГОЯ — герминогенные опухоли яичка; СЕМ — семиномы; ЭК — эмбриональные карциномы; ТЕ — тератома. **** $p < 0,00005$

Fig. 9. Comparison of the miR-10b and miR-145 expression levels in testicular germ cell tumor including seminomas ($n = 25$), embryonal carcinomas ($n = 14$) and yolk sack tumors ($n = 8$), versus normal testicular tissue. Each dot reflects expression level of specific miRNA in certain sample of testicular germ cell tumors. Normalization relative to the reference miR-93 was carried out by calculating dCt parameter using the formula:

$$dCt = 2^{(Ct\ miR-X/TOЯ - Ct\ miR-93/TOЯ)}.$$

Relative expression level of each miRNA was averaged within group of samples, standard deviations were calculated with formula:

$$STD = \sqrt{(\sum (x - x_{average})^2) / n}.$$

These parameters are shown by horizontal lines. The statistical significance of the observed differences in the expression changes of individual molecules was evaluated using the Kruskal—Wallis non-parametric criterion. TGCT — testicular germ cell tumors; SEM — seminomas; EK — embryonal carcinomas; TE — teratomas. **** $p < 0.00005$

молекул — miR-302a, -302b, -302c, -302d. При этом степень повышения уровней miR-302b и miR-302d была статистически значимо выше степени повышения уровней miR-302a и miR-302c. Изменений уровня экспрессии miR-367 не наблюдалось.

В клетках ТЕ и ХК наблюдалось снижение уровня экспрессии всех микроРНК кластера miR-302/miR-367. Характерные изменения уровня экспрессии микроРНК в составе кластера miR-371/miR-373 наблюдались в образцах следующих гистотипов ГОЯ: СЕМ, ЭК, ОЖМ, в меньшей степени — ТЕ. При этом наблюдалось схожее соотношение степени повышения молекул микроРНК: miR-371a > miR-373 > miR-372. В клетках ХК наблюдалось снижение уровня экспрессии всех микроРНК кластера miR-371/miR-373.

При объединении данных, полученных при анализе 3 гистологических групп ГОЯ (СЕМ, ЭК, ОЖМ),

существенное и статистически значимое повышение уровня экспрессии относительно образцов здоровых тканей яичка наблюдалось для 3 молекул: miR-371a, miR-302b и miR-302d. Описанные изменения могут приводить к диагностически значимым изменениям концентрации в плазме miR-371a, miR-302b и miR-302d.

Статистически значимое снижение уровня экспрессии miR-10b и miR-145 наблюдалось в клетках СЕМ, ЭК и ТЕ. Эти молекулы могут быть использованы в качестве нормализаторов для повышения диагностической значимости результатов анализа miR-371a, miR-302b и miR-302d в образцах опухолевой ткани. Однако применение данного подхода в рамках анализа ГОЯ-специфических изменений концентрации микроРНК в плазме требует предварительного исследования «поведения» miR-10b и miR-145 в плазме здоровых доноров.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Regouc M., Belge G., Lorch A. et al. Non-coding microRNAs as novel potential tumor markers in testicular cancer. *Cancers (Basel)* 2020;12(3):749. DOI: 10.3390/cancers12030749. Available at: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/3/749>.
- Dieckmann K.-P., Spiekermann M., Balks T. et al. MicroRNAs miR-371-3 in serum as diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 2012;107(10):1754–60. DOI: 10.1038/bjc.2012.469.
- Носов А.К., Мамижев Э.М., Рева С.А. и др. Влияние задержки диагностики на догоспитальном этапе на результаты лечения больных с герминогенными опухолями яичка в Санкт-Петербурге. *Онкоурология* 2013;2:63–8. [Nosov A.K., Mamizhev E.M., Reva S.A. et al. The effect of delayed diagnosis at the prehospital stage on the results of treatment of patients with germinogenic testicular tumors in Saint-Petersburg. *Onkourologiya = Oncourology* 2013;2:63–8. (In Russ.)].
- Skakkebaek N. Possible carcinoma-*in-situ* of the testis. *Lancet* 1972;2(7776):516–7. DOI: 10.1016/s0140-6736(72)91909-5.
- Batool A., Karimi N., Wu X.-N. et al. Testicular germ cell tumor: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci* 2019;76(9):1713–27. DOI: 10.1007/s00018-019-03022-7.
- Трякин А.А., Гладков О.А., Матвеев В.Б. и др. Практические рекомендации по лечению герминогенных опухолей у мужчин. 2020. Злокачественные опухоли. Практические рекомендации RUSSCO #3s2 2020;10:34. [Tryakin A.A., Gladkov O.A., Matveev V.B. et al. Practical recommendations for the treatment of germinogenic tumors in men. 2020. Zlokachestvennye opuholi. Prakticheskie rekomendacii = Malignant tumors. Practical recommendations of RUSSCO #3s2 2020;10:34. (In Russ.)]. DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-34.
- Honecker F., Aparicio J., Berney D. et al. ESMO Consensus Conference on testicular germ cell cancer: diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018;29(8):1658–86. DOI: 10.1093/annonc/mdy217.
- Svetlovskaya D., Miskovskaya V., Cholujova D. et al. Plasma cytokines correlated with disease characteristics, progression-free survival, and overall survival in testicular germ-cell tumor patients. *Clin Genitourin Cancer* 2017;15(3):411–6.e2. DOI: 10.1016/j.clgc.2017.01.027.
- Zhang T., Ji L., Liu B. et al. Testicular germ cell tumors: a clinicopathological and immunohistochemical analysis of 145 cases. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11(9):4622–9.
- Chieffi P. An up-date on novel molecular targets in testicular germ cell tumors subtypes. *Intractable Rare Dis Res* 2019;8(2):161–4. DOI: 10.5582/irdr.2019.01055.
- Leão R., Ahmad A.E., Hamilton R.J. Testicular cancer biomarkers: A Role for precision medicine in testicular cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2019;17(1):e176–83.
- Murray M.J., Saini H.K., van Dongen S. et al. The two most common histological subtypes of malignant germ cell tumour are distinguished by global microRNA profiles, associated with differential transcription factor expression. *Mol Cancer* 2010;9:290. DOI: 10.1186/1476-4598-9-290.
- Das M.K., Evensen H.S.F., Furu K., Haugen T.B. miRNA-302s may act as oncogenes in human testicular germ cell tumours. *Sci Rep* 2019;9:9189. DOI: 10.1038/s41598-019-45573-6.
- Batool A., Liu X.-M., Zhang C.-L. et al. Recent advances in the regulation of testicular germ cell tumors by microRNAs. *Front Biosci* 2019;24:4749. DOI: 10.2741/4749.
- Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. 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;64(15):5245–50. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data Using real-time quantitative PCR and the 2(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Kruskal W.H., Wallis W.A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc* 1952;47(260):583. Available at: <https://www.jstor.org/stable/2280779?origin=crossref>.
- Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random Variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Stat* 1947;18(1):50–60. DOI: 10.1214/aoms/1177730491.
- Guo M., Gan L., Si J. et al. Role of miR-302/367 cluster in human physiology and pathophysiology. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2020;52(8):791–800. DOI: 10.1093/abbs/gmaa065.
- Liu J., Wang Y., Ji P., Jin X. Application of the microRNA-302/367 cluster in cancer therapy. *Cancer Sci* 2020;111(4):1065–75. DOI: 10.1111/cas.14317.
- Belge G., Hennig F., Dumlupinar C. et al. Graded expression of microRNA-371a-3p in tumor tissues, contralateral testes, and in serum of patients with testicular germ cell tumor. *Oncotarget* 2020;11(16):1462–73. DOI: 10.18632/oncotarget.27565.
- Conduit C., Tran B. Improving outcomes in germ cell cancers using miRNA. *Ther Adv Med Oncol* 2021;13:175883592110278. DOI: [org/10.1177/17588359211027826](https://doi.org/10.1177/17588359211027826).
- Jenike A.E., Halushka M.K. MiR-21: a non-specific biomarker of all maladies. *Biomark Res* 2021;9(1):18. DOI: 10.1186/s40364-021-00272-1.
- Ludwig N., Leidinger P., Becker K. et al. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res* 2016;44(8):3865–77. DOI: 10.1093/nar/gkw116.
- Port M., Glaesener S., Ruf C. et al. Micro-RNA expression in cisplatin resistant germ cell tumor cell lines. *Mol Cancer* 2011;10:52. DOI: 10.1186/1476-4598-10-52.
- Knyazeva M., Korobkina E., Karizky A. et al. Reciprocal dysregulation of miR-146b and miR-451 Contributes in malignant phenotype of follicular thyroid tumor. *Int J Mol Sci* 2020;21(17):5950. DOI: 10.3390/ijms21175950.
- Dieckmann K.-P., Radtke A., Geczi L. et al. Serum levels of microRNA-371a-3p (M371 Test) as a new biomarker of testicular germ cell tumors: results of a prospective multicentric study. *J Clin Oncol* 2019;37:1412–23. DOI: 10.1200/JCO.18.01480.
- Das A.V., Pillai R.M. Implications of miR cluster 143/145 as universal anti-oncomiRs and their dysregulation during tumorigenesis. *Cancer Cell Int* 2015;15:92. DOI: 10.1186/s12935-015-0247-4.
- Zabegina L., Nazarova I., Knyazeva M. et al. MiRNA let-7 from TPO(+) extracellular vesicles is a potential marker for a differential diagnosis of follicular thyroid nodules. *Cells* 2020;9(8):1917. DOI: 10.3390/cells9081917.

Вклад авторов

М.С. Князева: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

В.А. Загоруйко: сбор биоматериала;

А.В. Хохлова, А.С. Артемьева: проведение гистологических исследований собранного биоматериала, интерпретация полученных результатов;

А.В. Шалаев, И.В. Назарова, Е.И. Сидина: получение данных для анализа методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, анализ полученных результатов;

Л.М. Забегина: выделение РНК из полученного биоматериала;

А.К. Носов: анализ полученных результатов, научное редактирование;

С.А. Проценко: сбор биоматериала, научное редактирование;

А.В. Малек: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, научное редактирование, написание текста статьи.

Authors' contributions

M.S. Knyazeva: development of the research concept, obtaining data for analysis by reverse transcription and polymerase chain reaction methods, analysis of the obtained data, review of publications on the topic of the article, writing article;

V.A. Zagoruiko: collection of biomaterial;

A.V. Khokhlova, A.S. Artemyeva: conducting histological studies of the collected biomaterial, interpretation of the results obtained;

A.V. Shalaev, I.V. Nazarova, E.I. Sidina: obtaining data for analysis by reverse transcription and polymerase chain reaction methods, analysis of the results obtained; conducting histological studies of the collected biomaterial, interpretation of the results obtained;

L.M. Zabegina: isolation of RNA from the obtained biomaterial;

A.K. Nosov: analysis of the obtained results, scientific editing;

S.A. Protsenko: collection of biomaterial, scientific editing;

A.V. Malek: development of the research concept, analysis of the obtained data, review of publications on the topic of the article, scientific editing, writing article.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interests.

Финансирование. Исследование финансировалось из бюджета государственного задания ФГБУ «Национальный медицинский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по теме «Разработка и клиническая апробация методов диагностики и прогнозирования эффекта терапии онкологических заболеваний на основе анализа микроРНК в биопсийном материале».

Funding. The study was funded in the frame of state assignment to N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia to project "Development and clinical testing of methods for diagnostics and prediction of the cancer therapy effect on the base microRNA analysis in biopsy material".

Статья поступила: 17.08.2021. **Принята к публикации:** 11.01.2022.

Article submitted: 17.08.2021. **Accepted for publication:** 11.01.2022.