

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-55-78>

Динамика экспрессии микроРНК в внеклеточных везикулах мочи больных раком предстательной железы после радикальной простатэктомии

Е.В. Шутко^{1,2}, О.Е. Брызгунова¹, И.А. Остальцев³, С.В. Пак³, С.Э. Красильников³, П.П. Лактионов^{1,3}, М.Ю. Коношенко¹

¹ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8;

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России; Россия, 630055 Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

Контакты: Екатерина Викторовна Шутко katshutko@gmail.com

Введение. Известно, что лечение онкологических заболеваний, в том числе рака предстательной железы (РПЖ), вызывает изменения экспрессии онкогенных и онкосупрессорных микроРНК. Анализ динамики их экспрессии может быть использован для прогнозирования течения заболевания и ответа на терапию. Тем не менее влияние лечения РПЖ на экспрессию внеклеточных микроРНК только начинает исследоваться.

Цель исследования – изучить динамику экспрессии 14 микроРНК (miR-19b, -22-3p, -30e, -31, -92a, -125b, -144, -200b, -205, -222, -375, -378a, -425, -660) внеклеточных везикул мочи больных РПЖ после радикальной простатэктомии и выявить прогностические пары микроРНК.

Материалы и методы. Исследованы образцы мочи 18 доноров и 18 больных РПЖ, полученные до радикальной простатэктомии, через 1 нед и спустя 3 мес после операции. Внеклеточные везикулы выделены методом агрегации–преципитации, их микроРНК – с использованием стекловолнистых сорбентов и октановой кислоты. С помощью обратной транскрипции – петлевой полимеразной цепной реакции (TaqMan) – получены данные о пороговых циклах детекции 14 микроРНК.

Результаты. Обнаружено, что радикальная простатэктомия вызывает достоверное изменение относительной экспрессии 44 пар микроРНК во внеклеточных везикулах мочи больных РПЖ. Можно выделить 4 группы пар микроРНК: 1) пары микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно различался между донорами и больными РПЖ до операции и достоверно изменялся у больных РПЖ через 3 мес после нее по направлению к уровню доноров (6 пар); 2) пары микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно не различался между донорами и больными РПЖ до операции, однако через 3 мес после нее достоверно отличался от исходного у больных РПЖ и доноров (5 пар); 3) пары микроРНК, на основании данных об относительной экспрессии которых больных РПЖ через 3 мес после радикальной простатэктомии можно разделить на 2 или 3 достоверно различающиеся подгруппы (19 пар); 4) пары микроРНК, достоверно не изменившие свою экспрессию после операции (30 пар).

Заключение. Радикальная простатэктомия вызывает значительное изменение уровня экспрессии микроРНК внеклеточных везикул мочи. На основании анализа динамики экспрессии микроРНК после этой операции выявлены 6 пар микроРНК, уровень относительной экспрессии которых после хирургического вмешательства достоверно изменялся в сторону ее уровня у здоровых доноров, и 19 пар микроРНК, по уровню относительной экспрессии которых больные РПЖ разделялись на 2 достоверно различные подгруппы через 3 мес после радикальной простатэктомии.

Ключевые слова: рак предстательной железы, микроРНК, внеклеточные везикулы мочи, радикальная простатэктомия, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, динамика микроРНК после лечения рака

Для цитирования: Шутко Е.В., Брызгунова О.Е., Остальцев И.А. и др. Динамика экспрессии микроРНК внеклеточных везикул мочи больных раком предстательной железы после радикальной простатэктомии. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):55–78. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-55-78>

Dynamics of miRNA expression in urine extracellular vesicles of prostate cancer patients after radical prostatectomy

E.V. Shutko^{1,2}, O.E. Bryzgunova¹, I.A. Ostal'cev³, S.V. Pak³, S.E. Krasi'nikov³, P.P. Laktionov^{1,3}, M.Yu. Konoshenko¹

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; 8 Academician Lavrentiev Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia;

²Novosibirsk State University; 1 Pirogov St., Novosibirsk 630090, Russia;

³E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of Russia; 15 Rechkunovskaya St., Novosibirsk 630055, Russia

Contacts: Ekaterina Viktorovna Shutko katshutko@gmail.com

Introduction. It is known that the treatment of oncological diseases including prostate cancer (PCa) causes changes in the expression of oncogenic and oncosuppressive miRNAs. The analysis of miRNA expression dynamics can be used to predict the course of the disease and its response to therapy. However, the effect of PCa therapy on the expression of extracellular miRNAs is just beginning to be investigated.

Aim. To study the expression dynamics of 14 miRNAs (miR-19b, -22-3p, -30e, -31, -92a, -125b, -144, -200b, -205, -222, -375, -378a, -425, -660) in urine extracellular vesicles of PCa patients after radical prostatectomy and to reveal prognostic miRNA ratios.

Materials and methods. Urine samples of 18 donors and 18 PCa patients, obtained before radical prostatectomy, 1 week and 3 months after surgery, were examined. Extracellular vesicles were isolated by aggregation-precipitation protocol; extracellular vesicles miRNAs were isolated using fiberglass sorbents and octane acid. Data on threshold detection cycles of 14 miRNAs were obtained using reverse transcription – loop polymerase chain reaction (TaqMan).

Results. It was found that prostatectomy causes a significant change in the relative expression of 44 miRNA ratios in the urine of PCa patients. Four groups of miRNA ratios can be distinguished: 1) miRNA ratios, which expression level significantly differed between donors and PCa patients before surgery and significantly changed in PCa patients 3 months after prostatectomy in the direction of the level of donors (6 pairs); 2) miRNA ratios, which expression did not significantly differ between donors and PCa patients before surgery, but significantly differed from the baseline in PCa patients and donors 3 months after prostatectomy (5 pairs); 3) miRNA ratios, based on expression ratios of which PCa patients can be divided into two or three significantly different subgroups 3 months after prostatectomy (19 pairs); 4) miRNA ratios that did not significantly change their expression after prostatectomy (30 pairs).

Conclusion. Prostatectomy causes a significant change in the level of expression of miRNA in urine. 6 pairs of miRNAs, the relative expression of which after surgery significantly changed towards that of healthy donors and 19 pairs of miRNAs, according to the level of relative expression of which patients with prostate cancer were divided into two significantly different subgroups 3 months after prostatectomy, were identified based on the analysis of the dynamics of miRNA expression after prostatectomy.

Keywords: prostate cancer, miRNA, extracellular vesicles of urine, radical prostatectomy, reverse transcription polymerase chain reaction, miRNA dynamics after cancer treatment

For citation: Shutko E.V, Bryzgunova O.E., Ostal'cev I.A. et al. Dynamics of miRNA expression in urine extracellular vesicles of prostate cancer patients after radical prostatectomy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):55–78. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-55-78>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время рак предстательной железы (РПЖ) занимает 1-е место по заболеваемости совместно с раком легких и 5-е место по смертности среди мужчин в России и в мире. Всего в 2020 г. зафиксированы 1 414 259 новых случаев РПЖ, что составляет 14,1 % от общего числа новых случаев злокачественных новообразований среди мужчин [1].

Радикальная простатэктомия (РПЭ) примерно в 40 % случаев является первым и обязательным шагом в лечении РПЖ [2]. Хирургическому вмешательству подвергаются пациенты с локализованной формой РПЖ и ожидаемой продолжительностью жизни более 10 лет. Радикальная простатэктомия представляет собой операцию, подразумевающую полное удаление предстательной железы в комплексе с семенными пузырьками и фрагментом мочеиспускательного канала

(уретры), который проходит через орган. Несмотря на значительное совершенствование хирургической техники, развитие рецидива после РПЭ остается актуальной проблемой. Так, у 30 % больных, перенесших оперативное вмешательство, в течение первых 10 лет после него наступает биохимический рецидив (БХР) [3].

Для прогноза течения заболевания и предсказания развития рецидива РПЖ после РПЭ в клинической практике используют такие показатели, как уровень и плотность сывороточного простатического специфического антигена (ПСА), патологоанатомическая стадия заболевания, оценка по шкале Глисона, характер хирургического края, объем опухоли, наличие/отсутствие лимфоваскулярной и периневральной инвазий [4]. Однако данные показатели характеризуются низкими чувствительностью и специфичностью [5, 6]. В настоящий момент в клинической практике отсутствуют

Таблица 1. Характеристика доноров и больных раком предстательной железы (РПЖ)
Table 1. Characteristics of donors and prostate cancer (PCa) patients

Показатель Parameter	Больные РПЖ (n = 18) PCa patients (n = 18)	Доноры Donors
Возраст, лет Age, years	61,0 ± 8,0	52,9 ± 5,2
ПСА, нг/мл: PSA, ng/ml: до РПЭ before RP через 3 мес после РПЭ 3 months after RP через 6 мес после РПЭ 6 months after RP через 9 мес после РПЭ 9 months after RP через 1 год после РПЭ 1 year after RP	8,39 ± 2,62 0,17 ± 0,24 0,30 ± 0,47 0,29 ± 0,56 0,35 ± 0,53	0,68 ± 0,47
Стадия по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM), %: The stage according to the classification of Tumor, Nodus and Metastasis (TNM), %: T1 T2 T3 N0 M0	50 39 11 100 100	—
Оценка по шкале Глисона, %: Gleason score, %: 6 7 8	83 6 11	—
Стадия, %: Stage, %: II III	89 11	—

Примечание. РПЭ — радикальная простатэктомия; ПСА — простатический специфический антиген.
Note. RP — radical prostatectomy; PSA — prostatic specific antigen.

надежные маркеры эффективности лечения и предсказания развития рецидива РПЖ. Анализ ПСА также не является надежным методом оценки эффективности выполненной операции, прогнозирования течения заболевания и стратификации рисков [7, 8]. Распространенность РПЖ и его рецидивов требует совершенствования методов диагностики и оценки эффективности терапии с целью увеличения продолжительности жизни пациентов и улучшения ее качества.

В настоящее время внимание российских и зарубежных исследователей привлекают внеклеточные нуклеиновые кислоты. Изучается их потенциал в качестве биомаркеров различных заболеваний [9]. Анализ циркулирующих нуклеиновых кислот может быть использован для разработки методов диагностики онкологических заболеваний и мониторинга эффективности лечения или развития лекарственной устойчивости, а также для выбора наиболее подходящей терапии [10]. Оценка эффективности лечения с помощью жидкост-

ной биопсии позволит скорректировать или при необходимости внести принципиальные изменения в курс лечения [11]. В качестве маркеров жидкостной биопсии могут быть использованы aberrантно экспрессированные внеклеточные микроРНК, представленные в составе комплексов с белками/липопротеинами/протеогликанами или упакованные во внеклеточные везикулы (ВВ). Из литературных [12] и полученных нами ранее [13] данных известно, что РПЭ вызывает разнонаправленные изменения уровней экспрессии микроРНК. Уже были получены свидетельства того, что наибольшим потенциалом в качестве диагностических маркеров РПЖ обладают микроРНК ВВ мочи [14, 15]. Тем не менее влияние РПЭ на экспрессию внеклеточных микроРНК биологических жидкостей, так же как и возможность их использования в качестве маркеров эффективности РПЭ, остаются малоизученными [16]. Очевидно, что для поиска маркеров эффективности РПЭ необходимо исследовать динамику экспрессии микроРНК после

хирургического вмешательства в краткосрочной и длительной перспективах.

В представленной работе проанализирована динамика относительной экспрессии 14 микроРНК (hsa-miR-19b, -22-3p, -30e, -31, -92a, -125b, -144, -200b, -205, -222, -375, -378a, -425, -660), которые согласно результатам наших исследований, проведенных ранее [13, 16], а также анализу данных литературы [17–19] ассоциированы с развитием РПЖ в целом и вовлечены в механизмы развития рецидива в частности. Выполнен сравнительный анализ полученных данных с уровнем относительной экспрессии доноров, а также корреляционный анализ клинических характеристик больных до РПЭ, через 3 мес и 1 год после нее.

Цель исследования — изучить динамику экспрессии 14 микроРНК (miR-19b, -22-3p, -30e, -31, -92a, -125b, -144, -200b, -205, -222, -375, -378a, -425, -660) ВВ мочи больных РПЖ после радикальной простатэктомии и поиск прогностических пар микроРНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы мочи доноров получены из отделения переливания крови, больных РПЖ — из радиологического отделения Национального медицинского исследовательского центра им. акад. Е.Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия) (табл. 1). Образцы мочи пациентов с РПЖ были взяты до РПЭ и повторно через 1 нед и 3 мес после операции для оценки динамики относительной экспрессии микроРНК. Дополнительную терапию до и после РПЭ больные не получали.

Образцы мочи больных РПЖ и доноров центрифугировали в течение 20 мин при 400g и при комнатной температуре (центрифуга MLW K70D) для осаждения клеток. Отбирали супернатант и центрифугировали в течение 20 мин при 17 000g и 24 °C для осаждения клеточного дебриса (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Внеклеточные везикулы выделены из образцов мочи методом, разработанным ранее и основанным на агрегации—преципитации с использованием полиэтиленгликоля (Sigma-Aldrich, США) и декстрана синего (Ferak Berlin GmbH, Германия) [20]. Из полученной фракции ВВ с применением β-меркаптоэтанола (PanReac AppliChem, Германия), гуанидин тиоцианата (Sigma-Aldrich, США) и октановой кислоты (Sigma Life Science, США) выделены микроРНК методом, описанным ранее [21]. С помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени получены данные о пороговых циклах детекции каждой микроРНК в образцах доноров. Праймеры и флуоресцентно-меченные зонды, используемые для постановки реакций, синтезированы в лаборатории биомедицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск, Россия). Относительную экспрессию микроРНК анализировали в 2 постановках (сетах): в 1-й постановке

анализировали экспрессию miRNA-19b, -30e, -31, -92a, -125b, -200b, -205, -375, -660, во 2-й — miRNA-19b, -22-3p, -30e, -125b, -144, -222, -378a, -425. Для эффективной оценки всех возможных комбинаций любых двух микроРНК внутри одного сета выполнена попарная нормализация, так как результаты анализа экспрессии каждой отдельно взятой микроРНК могут быть искажены из-за влияния множества внешних и внутренних факторов [22, 23]. Поскольку экспрессия микроРНК оценивалась в двух разных наборах микроРНК, нормализация проводилась только внутри каждого сета. Таким образом, были сформированы 60 соотношений микроРНК. Для дальнейшего анализа рассчитаны значения dCt (разница пороговых циклов) каждой пары микроРНК внутри сета.

Далее проанализировано распределение значений dCt с помощью теста Шапиро—Уилка. Достоверность межгрупповых различий оценена с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Данные об изменении относительной экспрессии микроРНК после РПЭ проанализированы с помощью дисперсионного анализа ANOVA для повторных измерений. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (программа MedCalc Statistical Software).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящей работе проанализирована динамика относительной экспрессии 14 микроРНК (в составе 60 пар), вовлеченных в регуляцию РПЖ [13, 24–26], до и после РПЭ. Источником микроРНК служили ВВ, которые выделяли из образцов мочи больных РПЖ, полученных до и после операции (через 1 нед, 3, 6, 9 и 12 мес после РПЭ) и доноров в качестве контрольной группы.

Выявлены 19 пар микроРНК, дифференциально экспрессированных у первичных больных РПЖ до РПЭ по сравнению с донорами (рис. 1, а–г). При этом miRNA-30e, -92a, -200b, -375 и -660 входили в состав наибольшего количества дифференциально экспрессированных пар микроРНК: при участии miRNA-660 сформированы 6 таких пар, miRNA-19b, -30e, -200b, -375 — 5 пар, miRNA-92a — 4 пары.

Показано, что 44 пары микроРНК ВВ, формируемые 14 микроРНК мочи больных РПЖ, статистически значимо изменяли экспрессию микроРНК после РПЭ (табл. 2). Кроме того, сравнение уровней относительной экспрессии микроРНК до и после РПЭ больных РПЖ и доноров позволило получить данные об изменении экспрессии микроРНК после операции относительно нормы (см. табл. 2).

На основании анализа динамики относительной экспрессии пар микроРНК до и после РПЭ они были разделены на 4 группы:

- 1) пары микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно различался у доноров и больных РПЖ до операции, достоверно изменялся у больных РПЖ через 3 мес после РПЭ по направлению к уровню

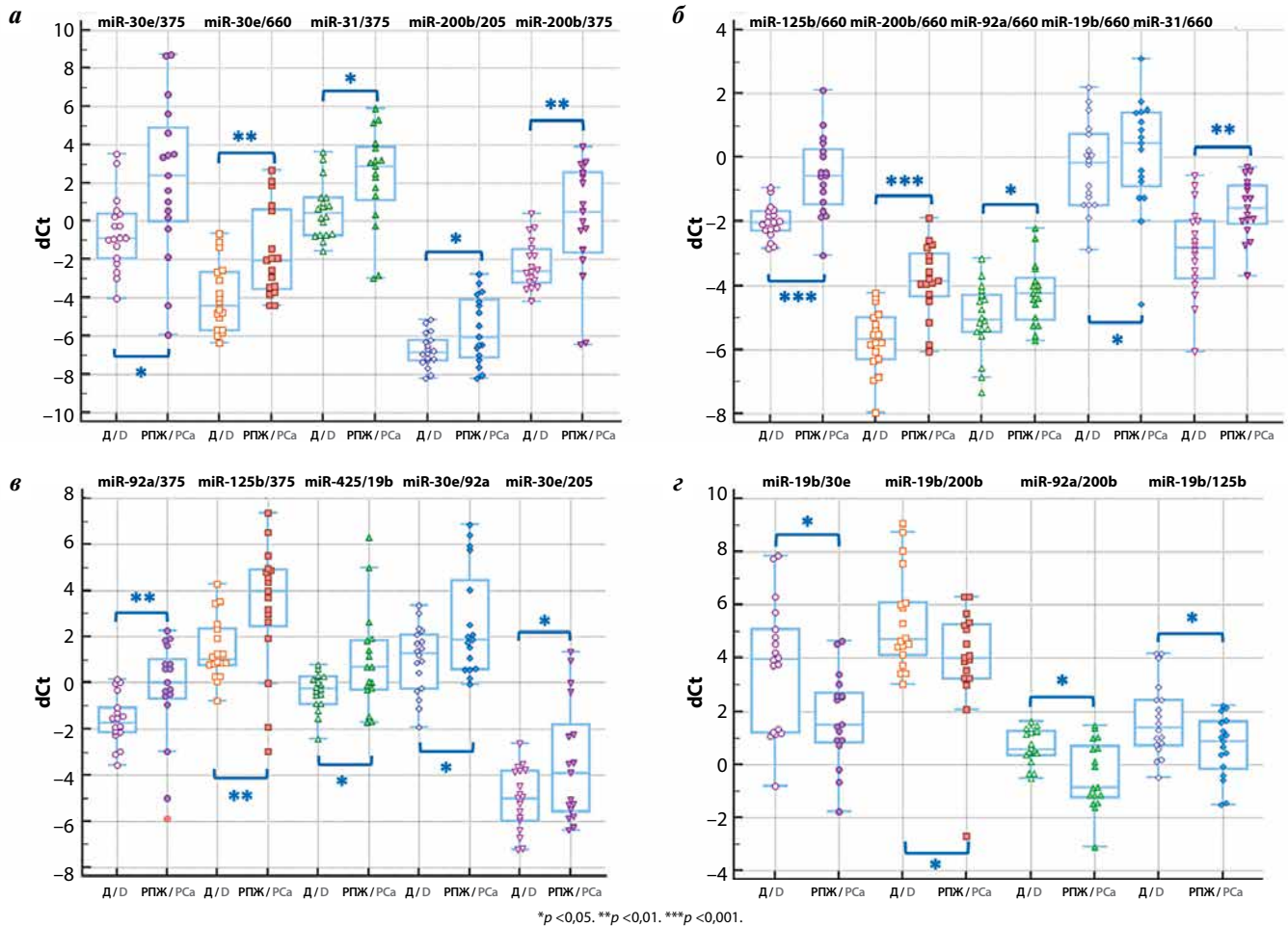


Рис. 1. Пары микроРНК, относительная экспрессия которых достоверно различалась у больных раком предстательной железы (РПЖ) и доноров (Д): а – miR-30e/375, -30e/660, -31/375, -200b/205, -200b/375; б – miR-125b/660, -200b/660, -92a/660, -19b/660, -31/660; в – miR-92a/375, -125b/375, -425/19b, -30e/92a, -30e/205; г – miR-19b/30e, -19b/200b, -92a/200b, -19b/125b

Fig. 1. miRNA ratios, the relative expression of which significantly differs in prostate cancer (PCa) patients and donors (D): а – miR-30e/375, -30e/660, -31/375, -200b/205, -200b/375; б – miR-125b/660, -200b/660, -92a/660, -19b/660, -31/660; в – miR-92a/375, -125b/375, -425/19b, -30e/92a, -30e/205; г – miR-19b/30e, -19b/200b, -92a/200b, -19b/125b

- доноров (miRNA-92a/375, -125b/375, -205/375) или достигал такого (miRNA-19b/200b, -30e/205, -30e/660) (6 пар; рис. 2, а);
- пары микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно не различался у доноров и больных РПЖ до РПЭ, достоверно отличался от исходного у пациентов с РПЖ и доноров через 3 мес после операции (miRNA-19b/222, -19b/375, -30e/222, -92a/205, -375/660) (5 пар; рис. 2, б);
- пары микроРНК, на основании данных об относительной экспрессии которых через 3 мес после РПЭ больных РПЖ можно разделить на 2 или 3 достоверно различающиеся по данному показателю подгруппы ($p < 0,001$), условно обозначенные как А, Б, В в порядке убывания значений dCt (19 пар; табл. 3; рис. 2, в);
- пары микроРНК, достоверно не изменявшие свою экспрессию через 3 мес после РПЭ согласно кри-

териям, описанным выше, или не имевшие определенного паттерна изменения экспрессии: 17 пар микроРНК, достоверно изменявших свою относительную экспрессию после РПЭ по результатам дисперсионного анализа для повторных измерений, но не принадлежавших ни к одной из вышеперечисленных групп (не имевших четкого паттерна динамики экспрессии; miRNA-19b/22-3p, -19b/92a, -19b/144, -22-3p-30e, -22-3p-222, -22-3p/425, -30e/92a, -30e/200b, -30e/378a, -30e/425, -31/92a, -31/205, -92a/125b, -92a/200b, -125b/200b (рис. 2, г), -125b/205, -378a/425); 13 пар микроРНК, достоверно не изменявших свою относительную экспрессию по результатам дисперсионного анализа для повторных измерений (miRNA-19b/30e, -19b/31, -30e/375, -31/375, -200b/375, -144/222, -144/425, -144/125b, -222/378a, -222/425, -222/125b, -378a/125b, -425/125b).

Таблица 2. Динамика относительной экспрессии микроРНК внеклеточных везикул мочи больных раком предстательной железы (РПЖ). Средняя разница уровней экспрессии (mean ddCt), среднее ± стандартное отклонение

Table 2. Dynamics of relative miRNA expression of extracellular vesicles in the urine of prostate cancer (PCa) patients. Mean difference in expression levels (mean ddCt), mean ± standard deviation

микроРНК miRNA	Сравнение пациентов с РПЖ до РПЭ, через 1 нед и через 3 мес после операции с донорами Comparison PCa patients before RP, 1 week and 3 months after RP with donors				Сравнение пациентов с РПЖ через 1 нед и через 3 мес после РПЭ с пациентами с РПЖ до РПЭ Comparison PCa patients 1 week and 3 months after RP with PCa patients before RP		Сравнение пациентов с РПЖ через 1 нед и пациентов с РПЖ через 3 мес после РПЭ Comparison PCa patients 1 week and PCa patients 3 months after RP
	До РПЭ Before RP	Через 1 нед после РПЭ 1 week after RP	Через 3 мес после РПЭ 3 months after RP	4	Через 1 нед после РПЭ 1 week after RP	Через 3 мес после РПЭ 3 months after RP	
1	2	3	4	5	6	7	
1-я группа пар микроРНК Group 1 of miRNA ratios							
miRNA-92a/375	1,25 ± 2,50*	-5,69 ± 2,67***	-5,10 ± 1,87***	-6,95 ± 3,83***	-6,35 ± 2,34***	H/p N/d	
miRNA-125b/375	1,89 ± 2,72*	-5,06 ± 2,36***	-4,26 ± 2,33***	-6,94 ± 3,64***	-6,15 ± 2,96***	H/p N/d	
miRNA-205/375	0,91 ± 3,21*	-7,37 ± 2,91***	-3,74 ± 2,26***	-8,60 ± 3,92***	-4,9 ± 2,69***	3,63 ± 3,20***	
miRNA-19b/200	-1,48 ± 2,63*	-1,83 ± 2,21**	H/p N/d	H/p N/d	1,94 ± 1,60**	2,29 ± 1,92***	
miRNA-30e/205	1,57 ± 3,20*	2,16 ± 2,36***	H/p N/d	H/p N/d	-2,06 ± 3,23*	-2,65 ± 2,76***	
miRNA-30e/660	2,35 ± 3,39***	1,13 ± 2,35*	-1,37 ± 1,63*	H/p N/d	-3,72 ± 3,69***	-2,50 ± 2,74***	
2-я группа пар микроРНК Group 2 of miRNA ratios							
miRNA-19b/222	H/p N/d	H/p N/d	2,08 ± 2,21***	H/p N/d	3,04 ± 2,60**	2,50 ± 2,49**	
miRNA-19b/375	H/p N/d	-6,99 ± 3,82***	-4,11 ± 2,47***	-7,83 ± 4,67***	-4,95 ± 2,66***	2,87 ± 3,02**	
miRNA-30e/222	H/p N/d	1,42 ± 3,10*	2,72 ± 3,13***	H/p N/d	2,50 ± 3,73*	H/p N/d	
miRNA-92a/205	H/p N/d	1,68 ± 2,06***	-1,36 ± 1,87**	1,65 ± 1,67**	-1,39 ± 2,05*	-3,04 ± 2,33***	
miRNA-375/660	H/p N/d	6,34 ± 2,81***	2,86 ± 2,89**	6,79 ± 4,24***	3,31 ± 2,44**	-3,48 ± 3,84***	

Продолжение табл. 2
Continuation of table 2

1	2	3	4	5	6	7
3-я группа пар микроРНК Group 3 of miRNA ratios						
miRNA-19b/205	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-19b/125b	-0,55 ± 1,55*	-1,29 ± 1,53***	H/p N/d	-0,69 ± 2,09*	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-425/19	1,31 ± 2,10*	0,06 ± 2,04**	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-22-3p/378a	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-22-3p/125b	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-22-3p/144	H/p N/d	H/p N/d	-1,85 ± 4,04*	H/p N/d	H/p N/d	-2,58 ± 4,03*
miRNA-30e/144	H/p N/d	1,31 ± 2,69*	-1,72 ± 3,27*	H/p N/d	H/p N/d	-3,03 ± 2,12***
miRNA-30e/125b	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-31/200b	H/p N/d	-1,81 ± 0,94***	H/p N/d	-1,22 ± 0,96**	H/p N/d	1,89 ± 1,41***
miRNA-31/125b	H/p N/d	-1,91 ± 1,60***	H/p N/d	-1,75 ± 1,66***	H/p N/d	1,68 ± 1,39**
miRNA-31/660	1,28 ± 1,62**	H/p N/d	H/p N/d	-1,91 ± 1,53***	-2,92 ± 3,34**	H/p N/d
miRNA-125b/660	1,44 ± 1,30***	1,29 ± 1,42***	-1,40 ± 2,11*	H/p N/d	-2,84 ± 2,72***	-2,69 ± 2,97***
miRNA-92a/660	0,81 ± 1,48*	H/p N/d	-2,34 ± 1,77***	H/p N/d	-3,05 ± 2,38***	-2,89 ± 3,26***
miRNA-200b/205	1,09 ± 2,09*	2,21 ± 1,55***	H/p N/d	1,12 ± 1,91*	-1,93 ± 2,29**	-3,05 ± 1,98***
miRNA-200b/660	1,87 ± 1,66***	1,18 ± 1,40**	-1,72 ± 1,67**	H/p N/d	-3,59 ± 2,75***	-2,90 ± 2,61***
miRNA-205/660	H/p N/d	-1,03 ± 1,86*	H/p N/d	-1,81 ± 1,76***	-1,66 ± 1,34**	H/p N/d

Окончание табл. 2
End of table 2

1	2	3	4	5	6	7
4-я группа пар микроРНК Group 4 of miRNA ratios						
miRNA-19b/22-3p	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-19b/92a	H/p N/d	-1,29 ± 2,56*	H/p N/d	H/p N/d	1,39 ± 1,37**	2,28 ± 1,61***
miRNA-19b/144	H/p N/d	H/p N/d	-2,36 ± 2,52**	H/p N/d	H/p N/d	-1,83 ± 2,02*
miRNA-22-3p/30e	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-22-3p/222	H/p N/d	H/p N/d	2,59 ± 2,67***	H/p N/d	2,66 ± 3,32**	1,75 ± 4,04*
miRNA-22-3p/425	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-30e/92a	1,54 ± 2,49*	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-30e/200b	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-30e/378a	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-30e/425	H/p N/d	1,25 ± 2,89*	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-31/92a	H/p N/d	-1,28 ± 1,74**	H/p N/d	-1,75 ± 2,03***	H/p N/d	1,87 ± 1,29***
miRNA-31/205	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-92a/125	H/p N/d	H/p N/d	-0,84 ± 1,13**	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-92a/200b	-1,09 ± 1,27**	H/p N/d	-0,50 ± 0,82*	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-125b/200b	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-125/205	H/p N/d	2,32 ± 1,93***	H/p N/d	1,65 ± 1,45**	-1,19 ± 2,37*	-2,84 ± 2,47***
miRNA-378a/425	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d

p* < 0,05. *p* < 0,01. ****p* < 0,001.
Примечание. H/p – нет достоверных различий; РПЭ – радикальная простатэктомия.
Note. N/d – no significant differences; RP – radical prostatectomy.

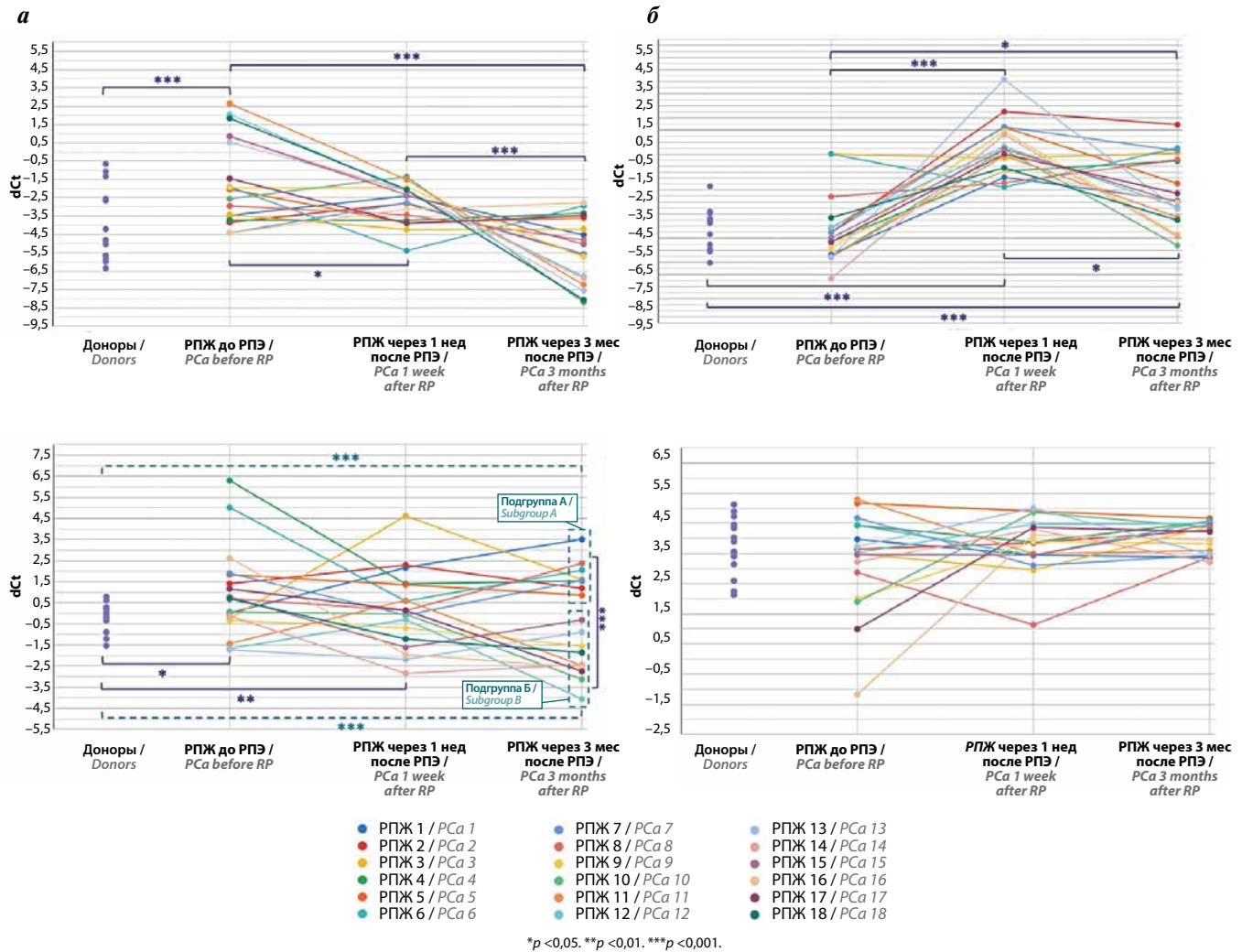


Рис. 2. Динамика относительной экспрессии (dCt) микроРНК в микровезикулах мочи больных раком предстательной железы (РПЖ): а — miRNA-30e/660 (пример 1-й группы пар микроРНК); б — miRNA-375/660 (пример 2-й группы пар микроРНК); в — miRNA-425/19b (пример 3-й группы пар микроРНК); г — miRNA-125b/200b (пример 4-й группы пар микроРНК). РПЭ — радикальная простатэктомия

Fig. 2. Dynamics of relative expression (dCt) of miRNAs in urine microvesicles of prostate cancer (PCa) patients: а — miRNA-30e/660 (an example of the Group 1 of miRNA ratios); б — miRNA-375/660 (an example of the Group 2 of miRNA ratios); в — miRNA-425/19b, an example of the Group 3 of miRNA ratios; г — miRNA-125b/200b, an example of the Group 4 of miRNA ratios. RP — radical prostatectomy

На основании данных об относительной экспрессии 19 пар микроРНК (3-я группа) через 3 мес после РПЭ ($p < 0,001$) больных можно разделить на 2 (miRNA-19b/205, -425/19b (рис. 2, в), -22-3p/378a, -22-3p/125b, -22-3p/144, -30e/125b, -30e/144, -31/125b, -31/200b, -92a/660, -200b/205, -200b/660, -205/660, -19b/125b, -144/378a, -30e/31) или 3 (miRNA-19b/378a, -31/660, -125b/660) подгруппы, условно обозначенные как А, Б и В. Следует отметить, что в подгруппы больных РПЖ вошли одни и те же пациенты с единичными исключениями, т. е. подгруппы мало различались по составу при анализе экспрессии разных пар микроРНК. При этом экспрессия некоторых пар микроРНК 3-й группы через 3 мес после РПЭ достоверно отличалась от таковой у доноров и больных РПЖ до хирургического вмешательства, а некоторых — нет (табл. 3). К 3-й группе относятся и 3 пары микроРНК (miRNA-144/378a, -19b/378a, -30e/31), для которых

методом дисперсионного анализа для повторных измерений не выявлены достоверные изменения экспрессии после РПЭ. Тем не менее значимые различия уровней экспрессии этих пар микроРНК через 3 мес после РПЭ позволили разделить пациентов на достоверно различающиеся подгруппы ($p < 0,001$) и отнести такие пары микроРНК к 3-й анализируемой группе, а не ко 2-й. Отсутствие достоверности при статистическом анализе можно объяснить широким диапазоном dCt у пациентов из разных подгрупп (А и Б или А, Б и В) через 3 мес после РПЭ, из-за чего при анализе этой временной точки в качестве единой группы (по алгоритму Repeated measures analysis of variance (ANOVA)) различия нивелируются.

В 3-й группе пар микроРНК особый интерес с точки зрения поиска маркеров рецидива представляют те пары, относительная экспрессия которых у части пациентов через 3 мес достоверно отличалась от таковой

Таблица 3. Сравнение уровней относительной экспрессии пар микроРНК, относящихся к 3-й группе (с разделением пациентов на подгруппы), у пациентов с раком предстательной железы (РПЖ) через 3 мес после радикальной простатэктомии (РПЭ) с уровнями до операции и через 1 нед после нее. Средняя разница уровней экспрессии (mean ddCt), среднее ± стандартное отклонение

Table 3. Comparison of the relative expression levels of microRNA pairs belonging to group 3 (with the division of patients into subgroups) in patients with prostate cancer (prostate cancer) 3 months after radical prostatectomy (RP) with the levels before surgery and 1 week after it. The mean difference in expression levels (mean ddCt), mean ± standard deviation

Пары микроРНК microRNA pairs		Сравнение с донорами Compared with donors	Сравнение с пациентами с РПЖ до РПЭ Comparison with PCa patients before RP	Сравнение с пациентами с РПЖ через 1 нед после РПЭ Comparison with PCa patients 1 week after RP
miRNA-19b/205	Подгруппа А Subgroup A	H/p N/d	H/p N/d	0,32 ± 1,15***
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	H/p N/d	−1,97 ± 1,17***
miRNA-425/19b	Подгруппа А Subgroup A	2,06 ± 1,06***	H/p N/d	2,07 ± 1,84**
	Подгруппа Б Subgroup B	−2,19 ± 1,07***	−3,37 ± 2,12***	−2,18 ± 1,93**
miRNA-22-3p/378a	Подгруппа А Subgroup A	5,51 ± 2,24***	4,84 ± 2,72***	4,60 ± 3,04**
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-22-3p/125b	Подгруппа А Subgroup A	4,14 ± 1,67***	3,61 ± 2,62**	4,17 ± 2,14**
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-22-3p/144	Подгруппа А Subgroup A	H/p N/d	1,30 ± 1,89*	H/p N/d
	Подгруппа Б Subgroup B	−4,32 ± 1,45***	−3,95 ± 1,70***	−5,05 ± 2,80***
miRNA-30e/125b	Подгруппа А Subgroup A	3,44 ± 1,96***	2,63 ± 1,82**	2,90 ± 1,00***
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	−1,77 ± 1,99*	−1,50 ± 0,89***
miRNA-30e/144	Подгруппа А Subgroup A	H/p N/d	H/p N/d	−1,75 ± 2,11**
	Подгруппа Б Subgroup B	−4,80 ± 1,77***	−4,72 ± 3,19**	−6,11 ± 1,93***
miRNA-31/125b	Подгруппа А Subgroup A	1,01 ± 1,25*	1,17 ± 1,05**	2,93 ± 1,42***
	Подгруппа Б Subgroup B	−1,34 ± 1,22**	−1,18 ± 1,11**	H/p N/d
miRNA-31/200b	Подгруппа А Subgroup A	1,24 ± 0,83***	1,83 ± 0,99***	3,05 ± 0,98***
	Подгруппа Б Subgroup B	−1,23 ± 0,71***	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-31/660	Подгруппа А Subgroup A	2,92 ± 1,39***	1,64 ± 0,98**	3,59 ± 1,34***
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	−1,53 ± 1,07**	H/p N/d
	Подгруппа В Subgroup C	−4,55 ± 1,58***	−5,82 ± 1,06***	−3,88 ± 1,36***

Окончание табл. 3
End of table 3

Пары микроРНК microRNA pairs		Сравнение с донорами Compared with donors	Сравнение с пациентами с РПЖ до РПЭ Comparison with PCa patients before RP	Сравнение с пациентами с РПЖ через 1 нед после РПЭ Comparison with PCa patients 1 week after RP
miRNA-125b/660	Подгруппа А Subgroup A	1,72 ± 0,48***	H/p N/d	H/p N/d
	Подгруппа Б Subgroup B	−0,69 ± 0,43**	−2,18 ± 1,14***	−1,99 ± 1,38***
	Подгруппа В Subgroup C	−3,82 ± 0,51***	−5,31 ± 1,14***	−5,12 ± 1,45***
miRNA-92a/660	Подгруппа А Subgroup A	H/o N/a	−0,96 ± 1,14*	H/p N/d
	Подгруппа Б Subgroup B	−4,09 ± 1,39***	−4,90 ± 1,03***	−4,74 ± 1,76***
miRNA-200b/205	Подгруппа А Subgroup A	H/p N/d	H/p N/d	−2,03 ± 1,37***
	Подгруппа Б Subgroup B	−2,72 ± 0,97***	−3,81 ± 1,79***	−4,93 ± 1,38***
miRNA-200b/660	Подгруппа А Subgroup A	H/p N/d	−1,97 ± 1,29***	−1,28 ± 1,76*
	Подгруппа Б Subgroup B	−4,03 ± 1,05***	−5,90 ± 1,22***	−5,22 ± 1,62***
miRNA-205/660	Подгруппа А Subgroup A	H/p N/d	H/p N/d	1,13 ± 1,69*
	Подгруппа Б Subgroup B	−3,24 ± 1,28***	−4,01 ± 1,17***	−2,21 ± 1,72*
miRNA-19b/125b	Подгруппа А Subgroup A	2,24 ± 1,31***	2,60 ± 1,45***	3,53 ± 2,02***
	Подгруппа Б Subgroup B	−2,05 ± 0,83***	−1,69 ± 1,04***	H/p N/d
miRNA-144/378a	Подгруппа А Subgroup A	1,23 ± 2,13***	2,31 ± 2,93***	4,73 ± 3,50***
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
miRNA-30e/31	Подгруппа А Subgroup A	2,10 ± 1,43***	H/p N/d	H/p N/d
	Подгруппа Б Subgroup B	−1,84 ± 1,37***	−3,05 ± 2,04***	−3,67 ± 1,70***
miRNA-19b/378a	Подгруппа А Subgroup A	3,86 ± 1,39***	4,03 ± 2,89***	4,09 ± 2,60***
	Подгруппа Б Subgroup B	H/p N/d	H/p N/d	H/p N/d
	Подгруппа В Subgroup C	−3,73 ± 1,34***	−3,56 ± 2,62*	−3,50 ± 2,54*

p* < 0,05. *p* < 0,01. ****p* < 0,001.
Примечание. В подгруппу А включены больные РПЖ, у которых уровень относительной экспрессии пары микроРНК через 3 мес после РПЭ достоверно превышал таковой у больных подгруппы Б. В подгруппу Б вошли пациенты с РПЖ, у которых относительная экспрессия пары микроРНК через 3 мес после РПЭ достоверно превышала таковую у пациентов подгруппы В. H/p — нет достоверных различий.
Note. Subgroup A includes PCa patients, whose relative expression 3 months after RP significantly exceeds that in patients of Subgroup B. Subgroup B includes PCa patients, whose relative expression 3 months after RP significantly exceeds that in patients of subgroup C. N/d — no significant differences.

у доноров, при этом направленность различий соответствовала различиям между донорами и больными до РПЭ. К таким микроРНК относятся пары miRNA-425/19b, -31/200b, -31/125b, -31/660, -92a/660, -22-3p/125b, -22-3p/378a, -200b/205, -200b/660, -205/660.

Через 1 год после РПЭ у 2 больных РПЖ уровень ПСА плазмы крови превышал 1,25 нг/мл, что свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. Более того, у 1 из этих пациентов через 1 год после операции были обнаружены вторичные изменения в тазовых лимфатических узлах. По значениям уровней относительной экспрессии пар miRNA-22-3p/378a, -22-3p/125b, -22-3p/144, -30e/125b, -30e/144, -31/660, -92a/660, -200b/205, -200b/660, -205/660, -144/378a, -19b/378a эти больные вошли в подгруппу пациентов, уровни относительной экспрессии микроРНК ВВ мочи которых достоверно отличались от данного показателя у доноров (табл. 3). В другую подгруппу, в которой относительная экспрессия вышеупомянутых пар микроРНК не отличалась от их экспрессии у доноров, вошли пациенты, у которых спустя 1 год после операции не были выявлены признаки рецидива и уровень ПСА не превышал 0,2 нг/мл (за исключением 2 больных, у которых данный показатель оказался равным 0,3 и 0,5 нг/мл). Относительная экспрессия этих пар микроРНК у доноров и пациента с изначально неблагоприятным прогнозом в связи с положительным хирургическим краем после операции, но без признаков рецидива через 1 год после операции не различалась.

В 4-ю группу пар микроРНК, относительная экспрессия которых не изменялась после РПЭ или не имела определенного паттерна ее изменения, вошли 30 пар микроРНК. Из них уровень экспрессии 11 пар микроРНК у пациентов ни до, ни после хирургического вмешательства не отличался от такового у доноров (см. табл. 2). В связи с этим можно полагать, что данные микроРНК не играют значительной роли в биологических процессах в ответ на РПЭ и малопригодны в качестве маркеров эффективности такого вида лечения РПЖ. Также в эту группу вошли 6 пар микроРНК, относительная экспрессия которых достоверно различалась у доноров и больных РПЖ до РПЭ (miRNA-30e/92a, -92a/200b ($p < 0,05$)) или через 1 нед после нее (miRNA-19b/92a, -30e/425 ($p < 0,05$)), -31/92a ($p < 0,01$), -125b/205 ($p < 0,001$). Однако устойчивых изменений относительной экспрессии через 3 мес после РПЭ не наблюдалось, поэтому данные пары микроРНК нельзя отнести к 1-й и 2-й группам.

С помощью критерия Спирмена была оценена корреляция уровней относительной экспрессии исследуемых микроРНК с клинико-патологическими характеристиками больных РПЖ: возрастом, уровнем ПСА, оценкой по шкале Глисона. Корреляция хотя бы с одним из клинических параметров выявлена для 20 пар микроРНК. При этом для пары miRNA-31/125b корреляция наибольшей силы наблюдалась с возра-

стом доноров ($k = -0,67$; $p = 0,004$), для пары miRNA-30e/660 – с уровнем ПСА ($k = -0,63$, $p = 0,007$) и для пары miRNA-22-3p/30e – с оценкой опухоли по шкале Глисона ($k = 0,65$; $p = 0,004$). Обнаруженная в большинстве остальных случаев корреляционная связь с возрастом пациентов была слабой или умеренной и не обладала высоким уровнем достоверности. Таким образом, относительная экспрессия выбранных для исследования микроРНК в малой степени зависит от возраста, что повышает привлекательность маркера для диагностики и прогноза эффективности терапии РПЖ. Выявлены корреляционные связи, p -уровни их значимости и коэффициенты корреляции Спирмена (табл. 4). Кроме того, выполнена оценка корреляционной связи между уровнем ПСА крови пациентов через 1 год после РПЭ и уровнями относительной экспрессии микроРНК до и после операции (табл. 5). Для 12 пар микроРНК обнаружена статистически значимая связь (как положительная, так и отрицательная) между уровнями ПСА через 1 год после операции и экспрессией микроРНК в одной из исследуемых временных точек.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение уровня экспрессии каждой микроРНК в процессе лечения онкологических заболеваний и после хирургического вмешательства или курса противоопухолевой терапии зависит от того, как микроРНК вовлечена в канцерогенез и физиологические процессы. В многочисленных исследованиях показано, что экспрессия внеклеточных микроРНК при РПЖ значительно отличается от таковой у доноров, и измерение концентраций данных микроРНК в биологических жидкостях имеет диагностическую ценность [24–27]. Это согласуется с полученными в настоящей работе данными: выявлены 19 пар микроРНК, дифференциально экспрессированных у доноров и больных РПЖ до лечения. Проанализирован уровень относительной экспрессии микроРНК до РПЭ и через 1 нед и 3 мес после операции. Таким образом, выбраны точки изменения экспрессии микроРНК сразу после РПЭ (через 1 нед, в момент выписки) и через 3 мес, в момент первичной после хирургического вмешательства оценки клинических показателей пациента (таких как ПСА), что позволяет оценить раннюю предиктивную способность микроРНК и определить влияние побочных эффектов РПЭ (таких как воспаление) на изменение экспрессии микроРНК.

Известно, что РПЭ оказывает значительное влияние на экспрессию микроРНК и вызывает разнонаправленные изменения уровней их относительной экспрессии [12–13, 16]. Как следует из представленных результатов, наибольший интерес представляет 1-я группа микроРНК, уровень относительной экспрессии которых изменялся по направлению к таковому у здоровых доноров (miRNA-92a/375, -125b/375, -205/375, -19b/200b, -30e/205, -30e/660).

Таблица 4. Корреляционные связи уровней относительной экспрессии микроРНК с клинико-патологическими характеристиками пациентов до радикальной простатэктомии
Table 4. Correlation between relative microRNA expression and patient clinical and pathological characteristics prior to radical prostatectomy

Пара микроРНК microRNA pair	Возраст Age	Связь Correlation	p	Уровень простатического специфического антигена Prostate-specific antigen level	Связь Correlation	p	Оценка по шкале Глисона Gleason score	Связь Correlation	p
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-19/30e	0,123	Слабая Weak	0,637	0,394	Умеренная Moderate	0,117	0,03	Нет связи No correlation	0,908
miRNA-19/31	0,357	Умеренная Moderate	0,16	−0,3	Слабая Weak	0,242	0,011	Нет связи No correlation	0,966
miRNA-19b/92a	0,021	Нет связи No correlation	0,938	−0,404	Умеренная Moderate	0,107	−0,161	Слабая Weak	0,538
miRNA-19b/125b	−0,136	Слабая Weak	0,604	−0,36	Умеренная Moderate	0,156	−0,238	Слабая Weak	0,358
miRNA-19b/200b	0,04	Нет связи No correlation	0,877	−0,311	Умеренная Moderate	0,224	0,072	Нет связи No correlation	0,784
miRNA-19b/205	0,149	Слабая Weak	0,568	−0,492	Умеренная Moderate	0,045*	−0,094	Нет связи No correlation	0,719
miRNA-19b/375	0,037	Нет связи No correlation	0,888	−0,209	Слабая Weak	0,421	−0,044	Нет связи No correlation	0,866
miRNA-19b/660	0,095	Нет связи No correlation	0,718	−0,589	Заметная Significant	0,013*	−0,105	Слабая Weak	0,688
miRNA-30e/31	0,178	Слабая Weak	0,493	−0,341	Умеренная Moderate	0,181	0,111	Слабая Weak	0,672
miRNA-30e/92a	−0,098	Нет связи No correlation	0,708	−0,449	Умеренная Moderate	0,071	−0,066	Нет связи No correlation	0,8
miRNA-30e/125b	−0,207	Слабая Weak	0,425	−0,486	Умеренная Moderate	0,048*	−0,1	Нет связи No correlation	0,703
miRNA-30e/200b	0,117	Слабая Weak	0,655	−0,337	Умеренная Moderate	0,186	0,188	Слабая Weak	0,469
miRNA-30e/205	−0,162	Слабая Weak	0,535	−0,492	Умеренная Moderate	0,045*	−0,039	Нет связи No correlation	0,883
miRNA-30e/375	−0,025	Нет связи No correlation	0,925	−0,316	Умеренная Moderate	0,217	0,022	Нет связи No correlation	0,933
miRNA-30e/660	−0,151	Слабая Weak	0,563	−0,627	Заметная Significant	0,007**	−0,1	Нет связи No correlation	0,703

Продолжение табл. 4
Continuation of table 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-31/92a	-0,591	Заметная Significant	0,012*	-0,31	Умеренная Moderate	0,226	-0,432	Умеренная Moderate	0,083
miRNA-31/125b	-0,666	Заметная Significant	0,004**	-0,074	Нет связи No correlation	0,778	-0,343	Умеренная Moderate	0,177
miRNA-31/200b	-0,107	Слабая Weak	0,683	-0,012	Нет связи No correlation	0,963	0,083	Нет связи No correlation	0,751
miRNA-31/205	-0,25	Слабая Weak	0,334	-0,262	Слабая Weak	0,31	-0,304	Умеренная Moderate	0,235
miRNA-31/375	-0,186	Слабая Weak	0,474	-0,143	Слабая Weak	0,585	-0,177	Слабая Weak	0,496
miRNA-31/660	-0,455	Умеренная Moderate	0,067	-0,525	Заметная Significant	0,031*	-0,299	Слабая Weak	0,244
miRNA-92a/125b	-0,171	Слабая Weak	0,512	0,173	Слабая Weak	0,506	-0,127	Слабая Weak	0,626
miRNA-92a/200b	0,342	Умеренная Moderate	0,179	0,286	Слабая Weak	0,265	0,387	Умеренная Moderate	0,124
miRNA-92a/205	0,179	Слабая Weak	0,493	-0,25	Слабая Weak	0,334	0,011	Нет связи No correlation	0,966
miRNA-92a/375	-0,235	Слабая Weak	0,363	-0,149	Слабая Weak	0,569	0,044	Нет связи No correlation	0,866
miRNA-92a/660	0,14	Слабая Weak	0,593	-0,272	Слабая Weak	0,291	0,055	Нет связи No correlation	0,833
miRNA-125b/200b	0,464	Умеренная Moderate	0,061	0,082	Нет связи No correlation	0,753	0,393	Умеренная Moderate	0,119
miRNA-125b/205	0,308	Умеренная Moderate	0,229	-0,272	Слабая Weak	0,292	-0,017	Нет связи No correlation	0,95
miRNA-125b/375	0,098	Нет связи No correlation	0,709	-0,167	Слабая Weak	0,521	0,077	Нет связи No correlation	0,768
miRNA-125b/660	0,263	Слабая Weak	0,308	-0,412	Умеренная Moderate	0,101	-0,022	Нет связи No correlation	0,933
miRNA-200b/205	-0,108	Слабая Weak	0,679	-0,202	Слабая Weak	0,438	-0,221	Слабая Weak	0,393
miRNA-200b/375	-0,114	Слабая Weak	0,663	-0,16	Слабая Weak	0,54	-0,183	Слабая Weak	0,483

Продолжение табл. 4
Continuation of table 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-200b/660	-0,267	Слабая Weak	0,301	-0,35	Умеренная Moderate	0,168	-0,271	Слабая Weak	0,292
miRNA-205/375	-0,064	Нет связи No correlation	0,808	0,113	Слабая Weak	0,666	0,094	Нет связи No correlation	0,719
miRNA-205/660	-0,099	Нет связи No correlation	0,705	0,086	Нет связи No correlation	0,743	0,194	Слабая Weak	0,456
miRNA-375/660	0,252	Слабая Weak	0,33	-0,011	Нет связи No correlation	0,966	0,089	Нет связи No correlation	0,735
miRNA-19b/22-3p	0,077	Нет связи No correlation	0,769	0,052	Нет связи No correlation	0,844	-0,387	Умеренная Moderate	0,124
miRNA-19b/30e	0,389	Умеренная Moderate	0,122	-0,031	Нет связи No correlation	0,907	0,471	Умеренная Moderate	0,056
miRNA-19b/144	-0,2	Слабая Weak	0,442	-0,039	Нет связи No correlation	0,881	-0,426	Умеренная Moderate	0,088
miRNA-19b/222	-0,199	Слабая Weak	0,445	-0,397	Умеренная Moderate	0,115	-0,365	Умеренная Moderate	0,149
miRNA-19b/378a	-0,368	Умеренная Moderate	0,146	-0,29	Слабая Weak	0,259	-0,332	Умеренная Moderate	0,193
miRNA-19b/425	-0,108	Слабая Weak	0,681	-0,304	Умеренная Moderate	0,236	-0,017	Нет связи No correlation	0,95
miRNA-19b/125b	0,036	Нет связи No correlation	0,89	0,018	Нет связи No correlation	0,946	0,127	Слабая Weak	0,626
miRNA-22-3p/30e	0,252	Слабая Weak	0,33	-0,012	Нет связи No correlation	0,963	0,653	Заметная Significant	0,004**
miRNA-22-3p/144	-0,488	Умеренная Moderate	0,047*	-0,22	Слабая Weak	0,396	-0,304	Умеренная Moderate	0,235
miRNA-22-3p/222	-0,325	Умеренная Moderate	0,204	-0,514	Заметная Significant	0,035*	-0,127	Слабая Weak	0,626
miRNA-22-3p/378a	-0,49	Умеренная Moderate	0,046*	-0,493	Умеренная Moderate	0,045*	-0,15	Слабая Weak	0,567
miRNA-22-3p/425	0,015	Нет связи No correlation	0,955	-0,114	Слабая Weak	0,662	0,52	Заметная Significant	0,032*

Окончание табл. 4
End of table 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-22-3p/125b	-0,045	Нет связи No correlation	0,864	0,059	Нет связи No correlation	0,822	0,487	Умеренная Moderate	0,047*
miRNA-30c/144	-0,406	Умеренная Moderate	0,106	-0,049	Нет связи No correlation	0,851	-0,559	Заметная Significant	0,020*
miRNA-30c/222	-0,399	Умеренная Moderate	0,112	-0,247	Слабая Weak	0,339	-0,559	Заметная Significant	0,020*
miRNA-30c/378a	-0,552	Заметная Significant	0,021*	-0,209	Слабая Weak	0,421	-0,465	Умеренная Moderate	0,06
miRNA-30c/425	-0,489	Умеренная Moderate	0,046*	-0,145	Слабая Weak	0,579	-0,57	Заметная Significant	0,017*
miRNA-30c/125b	-0,356	Умеренная Moderate	0,161	0,135	Слабая Weak	0,605	-0,238	Слабая Weak	0,358
miRNA-144/222	-0,045	Нет связи No correlation	0,865	-0,323	Умеренная Moderate	0,206	0,028	Нет связи No correlation	0,916
miRNA- miRNA-144/378a	0,063	Нет связи No correlation	0,812	-0,215	Слабая Weak	0,407	0,094	Нет связи No correlation	0,719
miRNA-144/425	0,11	Слабая Weak	0,675	0,058	Нет связи No correlation	0,826	0,559	Заметная Significant	0,020*
miRNA-144/125b	0,199	Слабая Weak	0,443	0,101	Слабая Weak	0,7	0,459	Умеренная Moderate	0,064
miRNA-222/378a	-0,131	Слабая Weak	0,616	0,119	Слабая Weak	0,649	0,1	Нет связи No correlation	0,704
miRNA-222/425	0,143	Слабая Weak	0,583	0,188	Слабая Weak	0,47	0,393	Умеренная Moderate	0,119
miRNA-222/125b	-0,102	Слабая Weak	0,696	0,199	Слабая Weak	0,443	0,233	Слабая Weak	0,369
miRNA-378a/425	0,508	Заметная Significant	0,037*	0,253	Слабая Weak	0,327	0,459	Умеренная Moderate	0,064
miRNA-378a/125b	0,388	Умеренная Moderate	0,124	0,391	Умеренная Moderate	0,121	0,266	Слабая Weak	0,303
miRNA-425/125b	0,139	Слабая Weak	0,595	0,199	Слабая Weak	0,444	0,061	Нет связи No correlation	0,816

*p < 0,05. **p < 0,01. ***p < 0,001.
Примечание. Здесь и в табл. 5: цветом выделены достоверные различия.
Note. Here and in Table 5: color shows significant differences.

Таблица 5. Корреляционные связи внеклеточных везикул мочи пациентов с раком предстательной железы с уровнями относительной экспрессии микроРНК до и после радикальной простатэктомии (РПЭ)
Table 5. Correlations between urinary extracellular vesicles in patients with prostate cancer and relative microRNA expression levels before and after radical prostatectomy (RP)

Пара микроРНК MicroRNA pair	До РПЭ Before RP	Связь correlation	p	После РПЭ After RP	Связь Correlation	p	Через 3 мес после РПЭ 3 months after RP	Связь Correlation	p
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-19/30e	-0,305	Умеренная Moderate	0,219	-0,266	Слабая Weak	0,302	0,356	Умеренная Moderate	0,192
miRNA-19/31	0,151	Слабая Weak	0,55	0,275	Слабая Weak	0,286	0,548	Заметная Significant	0,034*
miRNA-19b/92a	0,341	Умеренная Moderate	0,166	-0,075	Нет связи No correlation	0,775	0,535	Заметная Significant	0,040*
miRNA-19b/125b	0,236	Слабая Weak	0,347	0,168	Слабая Weak	0,519	0,422	Умеренная Moderate	0,117
miRNA-19b/200b	0,11	Слабая Weak	0,664	0,193	Слабая Weak	0,459	0,572	Заметная Significant	0,026*
miRNA-19b/205	0,352	Умеренная Moderate	0,151	0,224	Слабая Weak	0,387	-0,213	Слабая Weak	0,446
miRNA-19b/375	0,458	Умеренная Moderate	0,056	0,221	Слабая Weak	0,395	0,494	Умеренная Moderate	0,061
miRNA-19b/660	0,153	Слабая Weak	0,545	0,183	Слабая Weak	0,483	-0,252	Слабая Weak	0,364
miRNA-30e/31	0,396	Умеренная Moderate	0,104	0,369	Умеренная Moderate	0,145	0,379	Умеренная Moderate	0,163
miRNA-30e/92a	0,366	Умеренная Moderate	0,136	-0,018	Нет связи No correlation	0,944	0,193	Слабая Weak	0,49
miRNA-30e/125b	0,518	Заметная Significant	0,028*	0,436	Умеренная Moderate	0,081	0,222	Слабая Weak	0,426
miRNA-30e/200b	0,385	Умеренная Moderate	0,114	0,386	Умеренная Moderate	0,126	0,191	Слабая Weak	0,494
miRNA-30e/205	0,446	Умеренная Moderate	0,063	0,196	Слабая Weak	0,45	-0,608	Заметная Significant	0,016*
miRNA-30e/375	0,438	Умеренная Moderate	0,069	0,405	Умеренная Moderate	0,107	0,206	Слабая Weak	0,462
miRNA-30e/660	0,255	Слабая Weak	0,308	0,319	Умеренная Moderate	0,212	-0,49	Умеренная Moderate	0,064

Продолжение табл. 5
Continuation of table 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-31/92a	0,109	Слабая Weak	0,668	-0,425	Умеренная Moderate	0,089	-0,394	Умеренная Moderate	0,146
miRNA-31/125b	0,047	Нет связи No correlation	0,855	0,004	Нет связи No correlation	0,989	-0,322	Умеренная Moderate	0,242
miRNA-31/200b	-0,182	Слабая Weak	0,47	0,161	Слабая Weak	0,538	-0,474	Умеренная Moderate	0,074
miRNA-31/205	0,278	Слабая Weak	0,264	-0,07	Нет связи No correlation	0,79	-0,463	Умеренная Moderate	0,082
miRNA-31/375	0,416	Умеренная Moderate	0,086	0,166	Слабая Weak	0,525	-0,025	Нет связи No correlation	0,929
miRNA-31/660	-0,025	Нет связи No correlation	0,922	-0,109	Слабая Weak	0,677	-0,522	Заметная Significant	0,046*
miRNA-92a/125b	-0,197	Слабая Weak	0,433	0,361	Умеренная Moderate	0,155	0,107	Слабая Weak	0,703
miRNA-92a/200b	-0,316	Умеренная Moderate	0,201	0,473	Умеренная Moderate	0,055	0,131	Слабая Weak	0,642
miRNA-92a/205	0,219	Слабая Weak	0,383	0,277	Слабая Weak	0,282	-0,547	Заметная Significant	0,035*
miRNA-92a/375	0,398	Умеренная Moderate	0,102	0,456	Умеренная Moderate	0,066	0,168	Слабая Weak	0,549
miRNA-92a/660	-0,172	Слабая Weak	0,496	0,32	Умеренная Moderate	0,21	-0,422	Умеренная Moderate	0,117
miRNA-125b/200b	-0,321	Умеренная Moderate	0,194	0,071	Нет связи No correlation	0,786	-0,116	Слабая Weak	0,68
miRNA-125b/205	0,332	Умеренная Moderate	0,179	-0,007	Нет связи No correlation	0,978	-0,581	Заметная Significant	0,023*
miRNA-125b/375	0,365	Умеренная Moderate	0,137	0,229	Слабая Weak	0,376	0,089	Нет связи No correlation	0,751
miRNA-125b/660	-0,099	Нет связи No correlation	0,695	0,039	Нет связи No correlation	0,881	-0,497	Умеренная Moderate	0,06
miRNA-200b/205	0,347	Умеренная Moderate	0,158	-0,06	Нет связи No correlation	0,819	-0,615	Заметная Significant	0,015*
miRNA-200b/375	0,384	Умеренная Moderate	0,115	0,183	Слабая Weak	0,483	0,073	Нет связи No correlation	0,795

Продолжение табл. 5
Continuation of table 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-200b/660	0,267	Слабая Weak	0,285	0,01	Нет связи No correlation	0,97	-0,476	Умеренная Moderate	0,073
miRNA-205/375	0,245	Слабая Weak	0,327	0,202	Слабая Weak	0,436	0,53	Заметная Significant	0,042*
miRNA-205/660	-0,217	Слабая Weak	0,387	0,01	Нет связи No correlation	0,97	-0,084	Нет связи No correlation	0,766
miRNA-375/660	-0,368	Умеренная Moderate	0,133	-0,175	Слабая Weak	0,501	-0,42	Умеренная Moderate	0,119
miRNA-19b/22-3p	0,228	Слабая Weak	0,362	0,266	Слабая Weak	0,302	-0,077	Нет связи No correlation	0,785
miRNA-19b/30e	0,389	Умеренная Moderate	0,111	0,058	Нет связи No correlation	0,826	0,233	Слабая Weak	0,404
miRNA-19b/144	0,13	Слабая Weak	0,607	-0,4	Умеренная Moderate	0,112	0,134	Слабая Weak	0,634
miRNA-19b/222	0,094	Нет связи No correlation	0,711	0,048	Нет связи No correlation	0,855	0,222	Слабая Weak	0,427
miRNA-19b/378a	0,312	Умеренная Moderate	0,208	0,235	Слабая Weak	0,363	0,261	Слабая Weak	0,347
miRNA-19b/425	0,475	Умеренная Moderate	0,046*	0,078	Нет связи No correlation	0,765	0,159	Слабая Weak	0,571
miRNA-19b/125b	0,057	Нет связи No correlation	0,823	0,116	Слабая Weak	0,656	0,252	Слабая Weak	0,364
miRNA-22-3p/30e	0,1	Слабая Weak	0,692	-0,284	Слабая Weak	0,268	0,068	Нет связи No correlation	0,81
miRNA-22-3p/144	0,155	Слабая Weak	0,539	-0,416	Умеренная Moderate	0,097	0,068	Нет связи No correlation	0,81
miRNA-22-3p/222	-0,182	Слабая Weak	0,47	-0,298	Слабая Weak	0,245	0,098	Нет связи No correlation	0,727
miRNA-22-3p/378a	0,116	Слабая Weak	0,648	-0,242	Слабая Weak	0,35	0,463	Умеренная Moderate	0,082
miRNA-22-3p/425	0,365	Умеренная Moderate	0,137	-0,332	Умеренная Moderate	0,193	0,2	Слабая Weak	0,474
miRNA-22-3p/125b	-0,147	Слабая Weak	0,561	-0,33	Умеренная Moderate	0,196	0,234	Слабая Weak	0,401

Окончание табл. 5

End of table 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
miRNA-30e/144	0,034	Нет связи No correlation	0,893	−0,362	Умеренная Moderate	0,154	0,009	Нет связи No correlation	0,975
miRNA-30e/222	−0,181	Слабая Weak	0,473	0,025	Нет связи No correlation	0,926	0,174	Слабая Weak	0,536
miRNA-30e/378a	0,077	Нет связи No correlation	0,76	0,091	Нет связи No correlation	0,729	0,327	Умеренная Moderate	0,234
miRNA-30e/425	0,262	Слабая Weak	0,293	0,061	Нет связи No correlation	0,815	0,131	Слабая Weak	0,643
miRNA-30e/125b	−0,361	Умеренная Moderate	0,142	0,079	Нет связи No correlation	0,764	0,204	Слабая Weak	0,466
miRNA-144/222	−0,273	Слабая Weak	0,274	0,291	Слабая Weak	0,258	0,213	Слабая Weak	0,446
miRNA-144/378a	−0,204	Слабая Weak	0,418	0,321	Умеренная Moderate	0,209	0,404	Умеренная Moderate	0,136
miRNA-144/425	0,311	Умеренная Moderate	0,209	0,346	Умеренная Moderate	0,174	0,379	Умеренная Moderate	0,164
miRNA-144/125b	−0,208	Слабая Weak	0,408	0,374	Умеренная Moderate	0,139	0,057	Нет связи No correlation	0,839
miRNA-222/378a	0,338	Умеренная Moderate	0,17	0,291	Слабая Weak	0,258	0,51	Заметная Significant	0,052
miRNA-222/425	0,342	Умеренная Moderate	0,165	−0,114	Слабая Weak	0,663	0,029	Нет связи No correlation	0,919
miRNA-222/125b	−0,216	Слабая Weak	0,389	0,09	Нет связи No correlation	0,733	0,156	Слабая Weak	0,58
miRNA-378a/425	0,22	Слабая Weak	0,38	−0,207	Слабая Weak	0,425	−0,306	Умеренная Moderate	0,268
miRNA-378a/125b	−0,319	Умеренная Moderate	0,197	−0,256	Слабая Weak	0,321	−0,404	Умеренная Moderate	0,135
miRNA-425/125b	−0,615	Заметная Significant	0,007**	0,021	Нет связи No correlation	0,937	0,054	Нет связи No correlation	0,849

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

На основании данных об относительной экспрессии 19 пар микроРНК (3-я группа; см. рис. 2, в) через 3 мес после РПЭ больных можно разделить на подгруппы. Особый интерес с точки зрения поиска маркеров возможного развития рецидива представляют те пары микроРНК, относительная экспрессия которых у одной подгруппы пациентов через 3 мес достоверно отличается от данного показателя у доноров, при этом направленность различий соответствует различиям между донорами и больными до РПЭ. К таким парам микроРНК относятся пары miRNA-425/19b, -31/200b, -31/125b, -31/660, -92a/660, -22-3p/125b, -22-3p/378a, -200b/205, -200b/660 и -205/660. Значимость выбранных пар микроРНК подтверждает тот факт, что пациенты с БХР и метастазами попадают в подгруппу микроРНК, экспрессия которых достоверно отличается от таковой у доноров. Анализ динамики уровня ПСА в течение 1 года после РПЭ показал, что у больных с БХР его повышение наблюдается позднее (через 6 или 9 мес после РПЭ), чем изменения в экспрессии микроРНК (через 3 мес после РПЭ). Это позволяет предположить большой потенциал микроРНК в качестве ранних маркеров развития рецидива. В подгруппу БХР попадали также 6 пациентов (в зависимости от анализируемой пары микроРНК), у которых не был выявлен рецидив через 1 год после операции. Тем не менее 1-летний срок наблюдения не является окончательным, и для того чтобы понять, разовьется ли рецидив или наступит длительная ремиссия, необходимо дальнейшее наблюдение в течение 2–5 лет.

В то же время, хотя 1-я и 3-я группы пар микроРНК обладают более высоким потенциалом в качестве диагностических маркеров, 5 пар микроРНК, относительная экспрессия которых изменилась после РПЭ не по направлению к значениям здоровых доноров (2-я группа), также представляют интерес. В отличие от остальных групп пар микроРНК, во 2-ю группу согласно выбранным критериям не вошли диагностически перспективные микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно различался у доноров и больных РПЖ до РПЭ. Эти пары микроРНК также могут быть потенциальными прогностическими маркерами, хотя они и не обладают значимостью в качестве диагностических маркеров. Точно так же больные РПЖ после РПЭ, даже находящиеся в длительной ремиссии, не тождественны здоровым донорам, и, естественно, это накладывает отпечаток на профиль экспрессии микроРНК. В качестве примера можно привести miR-320a, -320b, -320c, уровень экспрессии которых в плазме крови больных после РПЭ увеличивался у пациентов без рецидива заболевания и не изменялся у пациентов с БХР, в то время как у доноров он ниже по сравнению с больными РПЖ до РПЭ [28].

Что касается 4-й группы, включающей в себя 30 пар микроРНК, анализ экспрессии которых не выявил устойчивых изменений после РПЭ, то, по-видимому,

они малопригодны для оценки эффективности хирургического лечения РПЖ.

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Например, ранее была показана онкосупрессорная роль ряда исследованных микроРНК. В частности, продемонстрировано, что экспрессия miRNA-205 в клетках опухоли предстательной железы снижена по сравнению со здоровыми тканями, что ассоциировано с активным ростом и делением клеток, а также метастазированием опухоли [29]. Для miRNA-19b и miRNA-92a, входящих в один кластер miR-17-92a [30], miRNA-30e [31], miRNA-200b [26], также показана онкосупрессорная роль. Так, известно, что miRNA-200b является ингибитором процессов клеточного роста, метастазирования и эпителиально-мезенхимального перехода. Кроме того, низкая экспрессия miRNA-200b ассоциирована с возникновением БХР [26]. В настоящем исследовании относительная экспрессия miRNA-30e была снижена у больных РПЖ по сравнению с донорами во всех анализируемых парах, а экспрессия miR-200b, 205 и -92a – в большинстве случаев. Обнаружено, что после РПЭ повышается уровень экспрессии miRNA-205 (в составе всех анализируемых пар) и miRNA-30e (в большинстве случаев), в то время как уровень относительной экспрессии miRNA-200b снижается сразу после РПЭ, но повышается до уровня у здоровых доноров через 3 мес после операции. Таким образом, полученные в настоящей работе данные подтверждают онкосупрессорную роль данных микроРНК.

Что касается miRNA-92a и miRNA-19b, то невозможно выявить доминирующее направление изменения их экспрессии после РПЭ. Вероятно, уровень относительной экспрессии этих микроРНК в меньшей степени, чем других, зависит от операции, и динамика изменения экспрессии пар микроРНК, в состав которых входят miRNA-92a и miRNA-19b, определяется второй микроРНК в каждой паре. Тем не менее спустя 3 мес после РПЭ относительная экспрессия miRNA-19b, -30e, -92a, -200b и -205 в составе формируемых ими пар соответствует таковой у доноров, а уровни относительной экспрессии пар, в состав которых входит miRNA-375, демонстрируют тенденцию к приближению к значениям доноров. Это свидетельствует о значительном потенциале пар, в которые входят эти микроРНК, в качестве прогностических маркеров.

Напротив, miRNA-375, по-видимому, является онкогенной микроРНК, поскольку ее повышенная экспрессия положительно коррелирует с большим риском развития БХР. Действительно, обнаружено, что высокий уровень экспрессии данной микроРНК ассоциирован с метастатическим РПЖ и более агрессивной формой рака [32]. В настоящем исследовании также обнаружен повышенный уровень экспрессии miRNA-375 у больных РПЖ во всех анализируемых парах. Кроме того, пары, в состав которых входит эта микроРНК, демонстрировали достоверное снижение экспрессии

после выполнения РПЭ (см. табл. 2). По-видимому, miRNA-375 играет большую роль в развитии РПЖ, и поэтому ее экспрессия значительно снижается через 1 нед после РПЭ. Более того, уровень относительной экспрессии всех пар микроРНК, сформированных при участии miRNA-375, у больных РПЖ через 3 мес после РПЭ не совпадает с уровнем экспрессии доноров, наблюдается лишь тенденция к такому соответствию, которое, вероятно, наступает позднее, т. е. уровень относительной экспрессии miRNA-375 остается aberrантным в течение более длительного времени.

Показано, что miRNA-144 способствует подавлению роста опухоли, а также препятствует метастазированию, т. е. играет онкосупрессорную роль [33]. Сверхэкспрессию miRNA-425, напротив, связывают с метастазированием РПЖ и неблагоприятным прогнозом [34]. В настоящем исследовании наблюдалась пониженная относительная экспрессия обеих этих микроРНК (miRNA-144 и miRNA-425) у больных РПЖ по сравнению с донорами, которая повышалась после РПЭ. В отношении miRNA-378a и miRNA-125b в литературе представлены противоречивые сведения: в различных исследованиях показаны как онкосупрессорные функции данных микроРНК [35, 36], так и онкогенные [37, 38]. В настоящей работе уровень экспрессии этих микроРНК у больных РПЖ был выше, чем у доноров, а после РПЭ он мог как снижаться, так и немного повышаться, в зависимости от второй микроРНК в паре, т. е. решающее влияние оказывала вторая микроРНК (не miRNA-378a или miRNA-125b) в соотношении.

Исследования, посвященные изучению функций miRNA-22-3p, miRNA-31 и miRNA-660 в канцерогенезе, выполнялись в основном в отношении видов онкологических заболеваний, в частности рака молочной железы и легких. Тем не менее показано, что miRNA-22-3p подавляет рост опухоли при раке молочной железы [39], низкая экспрессия miRNA-31 ассоциирована с развитием рака молочной железы [40], а повышенная экспрессия miRNA-660 способствует росту опухоли при раке легких и метастазированию в кости *in vivo* [41]. Экстраполяция данных литературы и их сравнение с результатами нашей работы позволяют сделать вывод, что эти микроРНК оказывают аналогичное действие на канцерогенез предстательной железы, поскольку в настоящем исследовании относительная экспрессия miRNA-660 оказалась повышенной у больных РПЖ по сравнению с донорами, а miRNA-22-3p и miRNA-31, напротив, в большинстве случаев — пониженной. После РПЭ уровни относительной экспрессии miRNA-22-3p и miRNA-660 уменьшались, а экспрессия miRNA-31 усиливалась, т. е. наблюдаемое изменение относительной экспрессии miRNA-22-3p противоречит ожидаемому. Тем не менее это, скорее, связано с послеоперационными процессами, поскольку не выявлена достоверная разница относительной экспрессии большинства пар микроРНК, в состав которых входит miRNA-22-3p,

у пациентов с РПЖ спустя 3 мес после РПЭ и у доноров, т. е. эти пары микроРНК через 3 мес после операции экспрессируются также, как у здоровых доноров.

Корреляционный анализ показал, что относительная экспрессия исследованных микроРНК, возраст, уровень ПСА и стадия опухолевого процесса характеризуются либо отсутствием, либо слабой корреляционной зависимостью. Это свидетельствует о возможности использования сочетанного анализа ПСА и экспрессии микроРНК для оценки эффективности терапии. Наибольшее количество пар микроРНК, уровень относительной экспрессии которых коррелировал с уровнем ПСА через 1 год после РПЭ, обнаружено через 3 мес после операции (9 пар). Устойчивой (сохраняющейся при анализе двух временных точек) корреляции между уровнем относительной экспрессии исследованных микроРНК и уровнем ПСА не выявлено, что, по-видимому, связано с тем, что на уровень экспрессии микроРНК через 1 нед после операции в значительной мере оказывают влияние процедура хирургического вмешательства и сопровождающие ее побочные эффекты, в том числе воспаление. В связи с этим анализ относительной экспрессии микроРНК через 3 мес после РПЭ представляется более информативным с точки зрения предсказания развития БХР и/или клинического рецидива. Кроме того, исследованная группа больных РПЖ была довольно однородной по уровню ПСА плазмы крови через 1 год после РПЭ, что затрудняет поиск возможных корреляций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ динамики экспрессии 60 пар микроРНК (14 различных микроРНК) в составе ВВ мочи больных РПЖ после РПЭ (до, через 1 нед и 3 мес после операции) показал, что уровень относительной экспрессии после хирургического вмешательства достоверно изменялся у 44 из исследованных пар. Выявлены пары микроРНК, дальнейший анализ относительной экспрессии которых наиболее перспективен с точки зрения оценки эффективности РПЭ. К ним относятся 2 группы пар микроРНК: 1) пары микроРНК, относительная экспрессия которых после операции достоверно изменялась в сторону таковой у здоровых доноров и соответствовала ей через 3 мес после лечения (miRNA-19b/miRNA-200b, -30e/205, -30e/660) или демонстрировала тенденцию к такому соответствию (miRNA-92a/miRNA-375, -125b/375, -205/375); 2) пары микроРНК, по уровню относительной экспрессии которых больные РПЖ разделялись на 2 (miRNA-19b/205, -425/19b, -22-3p/378a, -22-3p/125b, -22-3p/144, -30e/125b, -30e/144, -31/125b, -31/200b, -92a/660, -200b/205, -200b/660, -205/660, -19b/125b, -144/378a, -30e/31) или 3 (miRNA-19b/378a, -31/660, -125b/660) достоверно различающиеся подгруппы через 3 мес после РПЭ. Таким образом, анализ динамики относительной экспрессии микроРНК является перспективным подходом для разработки панелей для

диагностики РПЖ и оценки эффективности РПЭ. Тем не менее необходимы дополнительные исследования экспрессии этих микроРНК через 6 мес и спустя 1 год

после РПЭ, а также их ассоциации с клинико-патологическими характеристиками и состоянием пациентов через 1, 2 года и 5 лет после операции.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview. *Int J Cancer* 2021. DOI: 10.1002/ijc.33588
2. Costello A.J. Considering the role of radical prostatectomy in 21st century prostate cancer care. *Nat Rev Urol* 2020;17(3):177–88. DOI: 10.1038/s41585-020-0287-y
3. D'Amico A.V., Chen M.H., Roehl K.A. et al. Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. *N Engl J Med* 2004;351(2):125–35. DOI: 10.1056/NEJMoa032975
4. Porcaro A.B., Corsi P., Inverardi D. et al. Prostate-specific antigen associates with extensive lymph node invasion in high-risk prostate cancer. *Tumori* 2018;104(4):307–11. DOI: 10.1177/0300891618765567
5. Karakiewicz P.I., Benayoun S., Kattan M.W. et al. Development and validation of a nomogram predicting the outcome of prostate biopsy based on patient age, digital rectal examination and serum prostate specific antigen. *J Urol* 2005;173(6):1930–4. DOI: 10.1097/01.ju.0000158039.94467.5d
6. Bai X., Jiang Y., Zhang X. et al. The value of prostate-specific antigen-related indexes and imaging screening in the diagnosis of prostate cancer. *Cancer Manag Res* 2020;12:6821–6. DOI: 10.2147/CMAR.S257769
7. Pashaei E., Pashaei E., Ahmady M. et al. Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. *PLoS One* 2017;12(6):e0179543. DOI: 10.1371/journal.pone.0179543
8. Zhao Z., Stephan C., Weickmann S. et al. Tissue-based microRNAs as predictors of biochemical recurrence after radical prostatectomy: what can we learn from past studies? *Int J Mol Sci* 2017;18(10):2023. DOI: 10.3390/ijms18102023
9. Szilágyi M., Pös O., Márton É. et al. Circulating cell-free nucleic acids: main characteristics and clinical application. *Int J Mol Sci* 2020;21(18):6827. DOI: 10.3390/ijms21186827
10. Chen M., Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics* 2019;13(1):34. DOI: 10.1186/s40246-019-0220-8
11. Wang J., Ni J., Beretov J. et al. Exosomal microRNAs as liquid biopsy biomarkers in prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2020;145:102860. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2019.102860
12. Zedan A.H., Hansen T.F., Assenholt J. et al. Circulating miRNAs in localized/locally advanced prostate cancer patients after radical prostatectomy and radiotherapy. *Prostate* 2019;79(4):425–32. DOI: 10.1002/pros.23748
13. Konoshenko M.Y., Bryzgunova O.E., Lekchnov E.A. et al. The influence of radical prostatectomy on the expression of cell-free MiRNA. *Diagnostics (Basel)* 2020;10(8):600. DOI: 10.3390/diagnostics10080600
14. Bryzgunova O.E., Zaripov M.M., Skvortsova T.E. et al. Comparative study of extracellular vesicles from the urine of healthy individuals and prostate cancer patients. *PLoS One* 2016;11(6):e0157566. DOI: 10.1371/journal.pone.0157566
15. Koppers-Lalic D., Hackenberg M., de Menezes R. et al. Non-invasive prostate cancer detection by measuring miRNA variants (isomiRs) in urine extracellular vesicles. *Oncotarget* 2016;7(16):22566–78. DOI: 10.18632/oncotarget.8124
16. Konoshenko M.Y., Laktionov P.P. MiRNAs and radical prostatectomy: Current data, bioinformatic analysis and utility as predictors of tumour relapse. *Andrology* 2021;9(4):1092–107. DOI: 10.1111/andr.12994
17. Abramovic I., Ulamec M., Katusic Bojanac A. et al. miRNA in prostate cancer: challenges toward translation. *Epigenomics* 2020;12(6):543–58. DOI: 10.2217/epi-2019-0275
18. Casanova-Salas I., Rubio-Briones J., Fernández-Serra A. et al. miRNAs as biomarkers in prostate cancer. *Clin Transl Oncol* 2012;14(11):803–11. DOI: 10.1007/s12094-012-0877-0
19. Filella X., Foj L. miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med* 2017;55(5):715–36. DOI: 10.1515/cclm-2015-1073
20. Konoshenko M.Y., Lekchnov E.A., Bryzgunova O.E. et al. Isolation of extracellular vesicles from biological fluids via the aggregation-precipitation approach for downstream mirnas detection. *Diagnostics (Basel)* 2021;11(3):384. DOI: 10.3390/diagnostics11030384
21. Lekchnov E.A., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S. et al. Protocol for miRNA isolation from biofluids. *Anal Biochem* 2016;499:78–84. DOI: 10.1016/j.ab.2016.01.025
22. Boeri M., Verri C., Conte D. et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(9):3713–8. DOI: 10.1073/pnas.1100048108
23. Landoni E., Miceli R., Callari M. et al. Proposal of supervised data analysis strategy of plasma miRNAs from hybridisation array data with an application to assess hemolysis-related deregulation. *BMC Bioinformatics* 2015;16:388. DOI: 10.1186/s12859-015-0820-9
24. Zheng H., Guo Z., Zheng X. et al. MicroRNA-144-3p inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in prostate cancer by targeting CEP55. *Am J Transl Res* 2018;10(8):2457–68.
25. Rana S., Valbuena G.N., Curry E. et al. MicroRNAs as biomarkers for prostate cancer prognosis: a systematic review and a systematic reanalysis of public data. *Br J Cancer* 2022;126(3):502–13. DOI: 10.1038/s41416-021-01677-3
26. Katz B., Reis S.T., Viana N.I. et al. Comprehensive study of gene and microRNA expression related to epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *PLoS One* 2014;9(11):e113700. DOI: 10.1371/journal.pone.0113700
27. Konoshenko M.Y., Lekchnov E.A., Bryzgunova O.E. et al. The panel of 12 cell-free microRNAs as potential biomarkers in prostate neoplasms. *Diagnostics (Basel)* 2020;10(1):38. DOI: 10.3390/diagnostics10010038
28. Lieb V., Weigelt K., Scheinost L. et al. Serum levels of miR-320 family members are associated with clinical parameters and diagnosis in prostate cancer patients. *Oncotarget* 2017;9(12):10402–16. DOI: 10.18632/oncotarget.23781
29. Guo Z., Lu X., Yang F. et al. The Expression of miR-205 in prostate carcinoma and the relationship with prognosis in patients. *Comput Math Methods Med* 2022;2022:1784791. DOI: 10.1155/2022/1784791
30. Ottman R., Levy J., Grizzle W.E. et al. The other face of miR-17-92a cluster, exhibiting tumor suppressor effects in prostate cancer. *Oncotarget* 2016;7(45):73739–53. DOI: 10.18632/oncotarget.12061
31. Zheng X.M., Zhang P., Liu M.H. et al. MicroRNA-30e inhibits adhesion, migration, invasion and cell cycle progression of prostate

- cancer cells via inhibition of the activation of the MAPK signaling pathway by downregulating CHRM3. *Int J Oncol* 2019;54(2):443–54. DOI: 10.3892/ijo.2018.4647
32. Nitusca D., Marcu A., Seclaman E. et al. Diagnostic value of microRNA-375 as future biomarker for prostate cancer detection: a meta-analysis. *Medicina (Kaunas)* 2022;58(4):529. DOI: 10.3390/medicina58040529
 33. Sun X.B., Chen Y.W., Yao Q.S. et al. MicroRNA-144 suppresses prostate cancer growth and metastasis by targeting EZH2. *Technol Cancer Res Treat* 2021;20:1533033821989817. DOI: 10.1177/1533033821989817
 34. Rode M.P., Silva A.H., Cislott J. et al. miR-425-5p as an exosomal biomarker for metastatic prostate cancer. *Cell Signal* 2021;87:110113. DOI: 10.1016/j.cellsig.2021.110113
 35. Chen Q.G., Zhou W., Han T. et al. MiR-378 suppresses prostate cancer cell growth through downregulation of MAPK1 in vitro and in vivo. *Tumour Biol* 2016;37(2):2095–103. DOI: 10.1007/s13277-015-3996-8
 36. Sun D., Lee Y.S., Malhotra A. et al. miR-99 family of microRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2011;71(4):1313–24. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1031
 37. Samami E., Pourali G., Arabpour M. et al. The potential diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in the assessment of patients with prostate cancer: rational and progress. *Front Oncol* 2022;11:716831. DOI: 10.3389/fonc.2021.716831
 38. Shi X.B., Xue L., Ma A.H. et al. miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes. *Prostate* 2011;71(5):538–49. DOI: 10.1002/pros.21270
 39. Gorur A., Bayraktar R., Ivan C. et al. ncRNA therapy with miRNA-22-3p suppresses the growth of triple-negative breast cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* 2021;23:930–43. DOI: 10.1016/j.omtn.2021.01.016
 40. Abbas M.A., El Sayed I.E.T., Kamel Abdu-Allah A.M. et al. Expression of MiRNA-29b and MiRNA-31 and their diagnostic and prognostic values in Egyptian females with breast cancer. *Noncoding RNA Res* 2022;7(4):248–57. DOI: 10.1016/j.ncrna.2022.09.003
 41. Ai C., Ma G., Deng Y. et al. Nm23-H1 inhibits lung cancer bone-specific metastasis by upregulating miR-660-5p targeted SMARCA5. *Thorac Cancer* 2020;11(3):640–50. DOI: 10.1111/1759-7714.13308

Вклад авторов

Е.В. Шутко: проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;
 М.Ю. Коношенко, О.Е. Брызгунова: разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;
 П.П. Лактионов: интерпретация данных, написание текста статьи;
 И.А. Остальцев, С.В. Пак, С.Э. Красильников: сбор биоматериала, подбор групп больных и доноров, предоставление, анализ и интерпретация клинических данных.

Authors' contribution

E.V. Shutko: experiment conduction part, data analysis and interpretation, article writing;
 M.Yu. Konoshenko, O.E. Bryzgunova: research design development, data analysis and interpretation, article writing;
 P.P. Laktionov: data interpretation, article writing;
 I.A. Ostal'cev, S.V. Pak, S.E. Krasil'nikov: collection of biomaterial, selection of groups of patients and donors, provision, analysis and interpretation of clinical data.

ORCID авторов / ORCID authors

Е.В. Шутко / E.V. Shutko: <https://orcid.org/0009-0004-3004-8969>
 О.Е. Брызгунова / O.E. Bryzgunova: <https://orcid.org/0000-0003-3433-7261>
 С.В. Пак / S.V. Pak: <https://orcid.org/0009-0009-6221-2758>;
 П.П. Лактионов / P.P. Laktionov: <https://orcid.org/0000-0002-0866-0252>
 М.Ю. Коношенко / M.Yu. Konoshenko: <https://orcid.org/0000-0003-2925-9350>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (грант № 23-25-10026; <https://rscf.ru/project/23-25-10026>) в рамках поддержанного Правительством Новосибирской области проекта 0000005406995998235120582 № р-45.

Funding. The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation (grant No. 23-25-10026; <https://rscf.ru/project/23-25-10026>) within the framework of the project 0000005406995998235120582 supported by the Government of the Novosibirsk Region No. r-45.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» (протокол № 10 от 22 декабря 2008).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences (protocol No. 10, December 22, 2008).

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 27.06.2023. **Принята к публикации:** 12.02.2024.

Article submitted: 27.06.2023. **Accepted for publication:** 12.02.2024.