Биомедицинская химия, 2018 том 64, вып. 1, с. 38-45.

©Коллектив авторов

АНАЛИЗ ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ микроРНК В МИКРОВЕЗИКУЛАХ МОЧИ И БЕСКЛЕТОЧНОЙ МОЧЕ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

И.А. Запорожченко[1,2]*, О.Е. Брызгунова[1,2], Е.А. Лехнов[1,2], И.Д. Осипов[3], М.М. Зарипов[4], Ю.Б. Юрченко[1], С.В. Ярмощук[2], О.А. Пашковская[2], Е.Ю. Рыкова[1,2], А.А. Жеравин[2], П.П. Лактионов[1,2]

[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева, 8; эл. почта: ivanzap@niboch.nsc.ru
[2]Федеральный сибирский биомедицинский исследовательский центр имени Е.Н. Мешалкина, Новосибирск
[3]Новосибирский государственный университет, Новосибирск
[4]Сибирский окружной медицинский центр, Новосибирск

При раке предстательной железы в моче обнаруживаются опухолевоспецифичные биополимеры, в том числе связанные в комплексы с белками и погруженные во внеклеточные везикулы миРНК, которые могут быть использованы в качестве биомаркеров онкологических заболеваний. Ранее нами были охарактеризованы везикулы мочи и показана диагностическая перспективность содержащихся в них миРНК. В настоящем исследовании был проведён сравнительный анализ 84 миРНК в парных образцах микровезикул и супернатанта мочи здоровых доноров, пациентов с доброкачественной гиперплазией и раком предстательной железы на платформе miRCURY LNA miRNA qPCR Panels. Во всех группах доноров найдены наборы миРНК, уровень которых достоверно различался между фракциями. Выделены 2 группы миРНК, исследованы спектры их мишеней и показано их участие в ряде сигнальных путей, в том числе связанных с патогенезом РПЖ.

Ключевые слова: микроРНК, экзосомы, микровезикулы, моча, рак предстательной железы

DOI: 10.18097/PBMC20186401038

ВВЕДЕНИЕ

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний у мужчин. За последние 10 лет прирост заболеваемости РПЖ в России составил 155% [1, 2]. Уникальная особенность предстательной железы заключается в том, что, в силу её анатомического расположения, опухолеспецифичные биополимеры могут попадать не только в кровь, но и мочу, которая является привлекательным источником биомаркеров. Большое количество мочи может быть собрано абсолютно неинвазивно при минимальном вмешательстве медицинского персонала. Кроме того, урогенитальная система является однонаправленной и, по большей части, изолированной от циркуляторного русла, в силу чего биохимический и молекулярный состав мочи преимущественно определяется клетками органов мочеполовой системы, что существенно увеличивает специфичность детекции в ней молекулярных маркеров заболеваний этих органов.

Одними из потенциальных биомаркеров РПЖ, присутствующих в моче, являются микроРНК (миРНК) – короткие одноцепочечные РНК длиной 19-24 оснований, которые осуществляют посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов [3]. За счёт широкой специфичности опознавания мишеней миРНК служат своеобразной “страховочной сетью” экспрессии генов в клетке, контролируя уровень экспрессии от 30% до 50% всех генов человека, в том числе многих онкогенов и генов опухолевой супрессии, включая p53, PTEN и т.д. [4, 5]. Экспрессия миРНК часто нарушена в опухолевых клетках, в том числе предстательной железы [5]. Кроме того, миРНК обнаружены во всех основных биологических жидкостях организма, в том числе и в моче [6]. Их стабильность во внеклеточной среде определяется рядом факторов, включая экранирование белковыми комплексами [7], “погрузку” во внеклеточные везикулы [8] или мицеллярные липопротеиновые комплексы [9]. Вследствие такой гетерогенности форм циркуляции миРНК-маркеров в работах последних лет применялись разные способы пробоподготовки мочи. В недавних работах для поиска маркерных миРНК использовали образцы цельной мочи [10, 11], осаждённую фракцию клеточных элементов [12, 13] или супернатант после их осаждения [14-17]. Кроме того, в ряде работ исследователи концентрировались на изучении внеклеточных везикул мочи [18, 19]. Так, Koppers-Lalic с соавт. сообщили об увеличении экспрессии miR-204 и уменьшении экспрессии miR-21 и -375 во внеклеточных везикулах мочи больных РПЖ по сравнению со здоровыми донорами [20]. Samsonov с соавт. показали повышение экспрессии miR-21, а также miR-141 и -574 в экзосомах, выделенных из мочи больных РПЖ [21]. Ранее нами были охарактеризованы фракции экзосомоподобных частиц и микровезикул мочи и показана диагностическая перспективность содержащихся в них таких миРНК, как miR-19b и -125b [22].

Таким образом, внеклеточные везикулы мочи представляют собой невероятно перспективный источник биоматериала для поиска новых миРНК-маркеров РПЖ. Однако острой проблемой в этой области является отсутствие исчерпывающих данных о распределении миРНК между разными фракциями мочи и точных сведений

* - адресат для переписки

о составе и представленности внеклеточных миРНК мочи в целом. В настоящем исследовании мы проанализировали данные об уровне 84 миРНК в парных образцах бесклеточной мочи и суммарных внеклеточных везикул мочи с целью изучения распределения миРНК между этими фракциями, выявили миРНК, экспрессия которых отличалась между фракциями, и изучили их мишени и функции при помощи современных баз данных.

МЕТОДИКА

Формирование выборки пациентов для исследования

В исследование были включены 10 первично обратившихся больных раком предстательной железы в возрасте 56-82 лет (средний возраст 70,7 лет), 10 мужчин с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) в возрасте 52-80 лет (средний возраст 68,1 лет) и 10 условно здоровых мужчин (ЗД) в возрасте 48-65 лет (средний возраст 57,4 лет). Группы для исследования формировали после подтверждения диагноза на основании клинического, морфологического, рентгенологического обследования и по результатам оперативного вмешательства. Критериями включения для больных РПЖ служили: стадия $T_{2\text{-}3}N_0M_0$, уровень ПСА крови выше 10 нг/мл, отсутствие онкологических заболеваний предстательной железы или других локализаций в анамнезе. Критериями вхождения для больных ДГПЖ было клиническое подтверждение диагноза и отсутствие онкологических заболеваний предстательной железы или других локализаций в анамнезе. В группу ЗД вошли мужчины с уровнем общего ПСА ниже порогового критерия клинической нормы (2,8 нг/мл плазмы), отсутствием клинической истории онкологических заболеваний и жалоб со стороны мочеполовой системы.

Обработка и фракционирование образцов мочи

Образцы мочи хранили при комнатной температуре не более 3 ч со времени забора образца. Препараты бесклеточной фракции мочи (супернатант после центрифугирования при 17000 *g*) и фракцию микровезикул мочи получали и охарактеризовали по ранее описанной методике [22].

Выделение миРНК из супернатанта мочи

Для выделения миРНК из супернатанта мочи использовали модифицированный протокол фенол-хлороформной экстракции [22]. К 2 мл мочи последовательно добавляли 2 мл денатурирующего раствора (1% 2-меркаптоэтанол, 3 М гуанидин изотиоцианат) и 75 мкл 2 М ацетата натрия pH 4,0. К полученному раствору последовательно добавляли 4 мл фенола и 700 мкл хлороформа, каждый раз интенсивно перемешивая. Смесь центрифугировали при 9000 *g* при 4°C в течение 20 мин, водную фазу отбирали и повторно проводили экстракцию фенолом. К водной фазе, полученной после второй экстракции, добавляли равный объём 2 М ацетата натрия pH 4,0, двукратный объём 96% этанола и наносили на микроколонку BioSilica (“BioSilica Ltd”, Россия). Колонку промывали буферным раствором, содержащим 0,3 М гуанидин изотиоцианат, 10 мМ Трис-ацетат pH 6,5, 50% этанол, 1% 2-меркаптоэтанол, а затем буферным раствором, содержащим 10 мМ Трис-HCl pH 7,5, 0,1 М NaCl, 75% этанол. Элюцию с сорбента проводили раствором для элюции РНК (“BioSilica Ltd”).

Выделение миРНК из микрочастиц мочи

Для выделения миРНК из микровезикул мочи использовали метод, описанный ранее [23]. К 200 мкл микрочастиц мочи последовательно добавляли 100 мкл денатурирующего раствора (0,3 М гуанидин изотиоцианат, 1% 2-меркаптоэтанол, 20 мМ Трис-ацетат, pH 4,0) и 200 мкл буфера для осаждения (12 мМ октановая кислота, 0,8 М ацетат натрия, pH 4,0). Смесь перемешивали, инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 16200 *g*. К супернатанту добавляли равный объем 96% этанола, наносили на микроколонку BioSilica (“BioSilica Ltd”) и выделяли миРНК как описано выше.

Переосаждение миРНК изопропанолом

Для осаждения миРНК к 120 мкл элюата добавляли 1,5 мкл гликогена (20 мг/мл) и 12 мкл 3 М ацетата натрия (pH 7,4), затем перемешивали и добавляли 140 мкл изопропанола. Полученную смесь перемешивали, инкубировали при -20°C в течение 30 мин и центрифугировали при 13000 *g* при 4°C в течение 15 мин. Супернатант удаляли декантацией, осадок последовательно промывали 500 мкл 75% этанола и 500 мкл 96% этанола. Осадок сушили на воздухе и растворяли в 15 мкл воды. Полученные образцы миРНК хранили при -80°C.

Определение экспрессии миРНК

Сравнительный анализ профиля экспрессии миРНК во фракциях мочи проводили с использованием платформы miRCURY LNA miRNA qPCR (“Exiqon Ltd”, Дания). Панель миРНК была создана на основе стандартной панели Urine Exosomes Focus Panel (“Exiqon Ltd”) для анализа миРНК экзосом мочи, и была дополнительно модифицирована и дополнена, исходя из последних литературных данных об экспрессии миРНК в тканях предстательной железы и моче при онкологических заболеваниях (табл. 1).

Статистический анализ данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи языка R (версия 3.3.1) в оболочке Rstudio (версия 1.0.136). Для сравнения групп использовали пакет Stats (v.3.3.1). Для нормализации данных из значений порогового цикла для каждой миРНК (Ct) вычитали усреднённое значение порогового цикла всех миРНК в образце (global mean), получая значение разницы пороговых циклов (dCt). При определении разницы между медианными значениями различных групп получали значения разницы разниц пороговых циклов (ddCt). Согласно алгоритму NormFinder (v.5), такая

Таблица 1. Состав панели для определения экспрессии миРНК

hsa-let-7a-5p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-346
hsa-let-7b-5p	hsa-miR-1285-3p	hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-25-3p	hsa-miR-34a-5p
hsa-let-7c-5p	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-375
hsa-let-7d-3p	hsa-miR-133a-3p	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-378a-3p
hsa-let-7d-5p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-423-5p
hsa-let-7e-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-425-5p
hsa-let-7f-5p	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-429
hsa-let-7g-5p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-205-5p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-451a
hsa-let-7i-5p	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-483-5p
hsa-miR-100-5p	hsa-miR-149-5p	hsa-miR-210-3p	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-484
hsa-miR-101-3p	hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-214-3p	hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-574-3p
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-582-5p
hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-660-5p
hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-31-3p	hsa-miR-92a-3p
hsa-miR-107	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-31-5p	hsa-miR-93-5p
hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-22-5p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-99b-5p
hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-187-3p	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-33a-5p	cel-miR-39-3p

нормализация полученных данных была наиболее стабильна во всех группах образцов и была выбрана для сравнения экспрессии миРНК между фракциями. Парные сравнения экспрессии миРНК проводили при помощи критерия Уилкоксона. Достоверными считали различия между группами при $p<0,05$.

Для биоинформатического анализа регуляторных сетей миРНК в работе использовали публично доступные базы данных. Мишени миРНК определяли при помощи DIANA TOOLS (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php), инструмент miRPath v3.0. Анализ проводили в рамках классификаций KEGG и GO, в качестве референтной базы мишеней использовали Tarbase v7.0, для определения общих мишеней использовали функцию пересечения экспрессии генов (genes intersection) с пороговым значением в 50% миРНК (округленным в большую сторону) и уровнем значимости $p<0,05$ после поправки на множественность измерений (FDR). Для определения экзосомальной принадлежности белков использовали базу данных Exocarta (http://www.exocarta.org/), содержащую экспериментальные данные о составе экзосом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения распределения и представленности миРНК в микровезикулах мочи при заболеваниях предстательной железы был проведен сравнительный анализ уровня 84 миРНК в парных образцах микровезикул и супернатанта мочи здоровых доноров, пациентов с ДГПЖ и больных РПЖ с использованием платформы miRCURY LNA miRNA qPCR Panels (“Exiqon Ltd”). В среднем в каждом образце было выявлено 70 из 84 отдельных миРНК, при этом 72 миРНК были выявлены в более чем 70% образцов. По результатам парных сравнений в трёх группах доноров были выявлены различия в экспрессии разных наборов миРНК между исследуемыми фракциями мочи. Для подавляющего числа миРНК различие в представленности было количественным, однако для ряда миРНК присутствовала тенденция с экспрессии только в одной из фракций. Наиболее яркими примерами являются miR-143-3p и miR-451a, которые определялись в супернатанте мочи, но отсутствовали почти во всех образцах микровезикул. Присутствие miR-451a может объясняться её фильтрацией в виде белковых и/или липопротеиновых комплексов из крови, где она высоко экспрессирована, в то время как процесс получения препаратов везикул позволяет от них избавиться [24, 25].

При помощи критерия Уилкоксона были оценены различия в уровне миРНК между супернатантом и микровезикулами мочи в каждой из групп доноров (табл. 2). Наибольшее количество достоверных различий между экспрессией миРНК отмечено в группе больных РПЖ (38 миРНК), наименьшее – в группе здоровых доноров (15 миРНК).

На основе данных, представленных в таблице 2, для дальнейшего анализа были выбраны две группы миРНК. При формировании этих групп во внимание принимали не только значимость различий, но и их амплитуду и характер различий. В первую группу вошли 9 миРНК (miR-30c-5p, let-7i-5p, miR-22-3p, miR-23b-3p, miR-30b-5p, miR-331-3p, miR-429, miR-92a-3p, miR-93-5p), для которых были выявлены значимые и значительные различия в супернатанте и суммарных микровезикулах мочи во всех трёх группах доноров – эти миРНК, предположительно, ассоциированы с одной из фракций, вне зависимости от клинического состояния донора. Во вторую группу были включены миРНК, уровень которых существенно отличался между фракциями только в группе больных РПЖ или здоровых доноров (let-7d-3p, miR-107, miR-26b-5p, miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-30e-5p, miR-375, miR-582-5p, let-7a-5p), или не отличался только

Таблица 2, Сравнительные характеристики миРНК, экспрессия которых отличается между супернатантом (СМ) и микровезикулами мочи (МВ),

	РПЖ		ДГПЖ		ЗД	
миРНК	**P-value**	**ddCt (МВ - СМ)**	**P-value**	**ddCt (МВ - СМ)**	**P-value**	**ddCt (МВ - СМ)**
let-7a-5p	0,6523	0,2596	0,5781	-0,3358	**0,0469**	-1,2472
let-7b-5p	0,0977	-1,9521	**0,0156**	-1,9732	**0,0391**	-2,8268
let-7c-5p	0,0781	-1,1113	**0,0313**	-0,8976	0,0547	-1,6267
let-7d-3p	**0,0078**	-1,1815	0,2188	-0,4889	0,0547	-0,5068
let-7i-5p	**0,0273**	-1,7690	**0,0156**	-1,9217	**0,0313**	-1,6297
miR-100-5p	**0,0195**	-0,9161	**0,0469**	-0,9736	0,0547	-1,1450
miR-101-3p	**0,0039**	0,9452	**0,0156**	1,0734	0,3828	0,2155
miR-106b-5p	0,5703	0,2037	**0,0313**	0,7032	0,2969	0,1872
miR-107	**0,0273**	0,4468	1,0000	0,0529	0,6406	0,1529
miR-141-3p	**0,0195**	0,8915	**0,0156**	1,3346	0,1953	0,3761
miR-146a-5p	**0,0313**	-1,1711	0,1250	-1,2522	0,1875	-0,8803
miR-15a-5p	**0,0039**	-0,8210	0,9375	0,1126	0,1484	-0,9342
miR-193b-3p	**0,0039**	-1,2846	**0,0313**	-1,2351	0,1563	-1,1112
miR-200a-3p	**0,0391**	0,3168	0,0781	0,4157	0,7422	-0,1160
miR-205-5p	**0,0195**	-1,0134	0,0781	-0,8749	0,1563	-1,0264
miR-210-3p	**0,0078**	-1,5356	0,8125	-0,2770	**0,0313**	-0,9959
miR-22-3p	**0,0039**	-1,8357	**0,0313**	-1,3648	**0,0156**	-1,7192
miR-221-3p	0,0547	-0,7723	**0,0313**	-0,9054	**0,0156**	-1,5029
miR-23b-3p	**0,0039**	1,0138	**0,0313**	0,6452	**0,0078**	0,7962
miR-25-3p	**0,0039**	-1,6459	**0,0156**	-1,5436	**0,0156**	-1,3614
miR-26b-5p	**0,0391**	1,2291	0,0781	0,6546	0,9453	-0,1485
miR-27b-3p	**0,0195**	0,7474	0,2969	0,2305	0,3125	-0,2335
miR-29a-3p	**0,0078**	0,7380	**0,0313**	0,8929	0,5469	-0,2138
miR-29b-3p	**0,0039**	1,4939	**0,0469**	1,0169	0,3828	0,1817
miR-29c-3p	**0,0078**	0,6175	**0,0313**	0,6002	0,7422	0,0017
miR-30a-5p	**0,0078**	0,9227	0,1563	0,3559	0,5469	0,1076
miR-30b-5p	**0,0039**	1,6768	**0,0156**	1,1478	**0,0391**	0,7509
miR-30c-5p	**0,0039**	2,1381	**0,0156**	1,1340	**0,0078**	1,1448
miR-30e-5p	**0,0391**	0,6934	0,2188	0,2621	0,6406	-0,3790
miR-31-3p	**0,0313**	1,3094	**0,0313**	0,8869	0,0547	1,1269
miR-31-5p	**0,0039**	0,7300	**0,0313**	1,0441	0,2500	0,2783
miR-331-3p	**0,0039**	1,9201	**0,0156**	1,2673	**0,0156**	1,1551
miR-34a-5p	**0,0117**	-1,0906	0,0781	-0,9627	**0,0313**	-1,4074
miR-375	**0,0078**	-2,3628	0,0625	-1,8577	0,1094	-0,7023
miR-378a-3p	**0,0039**	-2,0432	0,0781	-1,2028	**0,0234**	-1,3745
miR-423-5p	**0,0156**	-2,1558	**0,0156**	-2,5596	0,1250	-1,2498
miR-425-5p	**0,0078**	-1,1336	0,2188	-0,9404	1,0000	0,0648
miR-429	**0,0078**	1,1766	**0,0313**	0,7491	**0,0078**	0,5323
miR-574-3p	**0,0273**	1,1174	0,4375	0,0890	0,5469	0,5830
miR-582-5p	**0,0078**	1,7516	0,0625	1,1115	0,3125	0,5471
miR-660-5p	**0,0391**	0,4908	0,4688	0,1660	1,0000	-0,0315
miR-92a-3p	**0,0039**	1,0340	**0,0156**	0,8423	**0,0234**	1,0953

в группе ЗД (miR-101-3p, miR-141-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-29c-3p, miR-423-5p), но имели различия в двух других группах. Эти миРНК могут быть связаны с развитием РПЖ или патологий предстательной железы в целом.

При помощи алгоритма miRPath v3.0 (DIANA Tools) были выявлены общие мишени миРНК из обеих групп. Прямой взаимосвязи между мишенями миРНК из первой группы и функциями или механизмами секреции внеклеточных везикул в рамках классификаций KEGG обнаружено не было. Показано, что среди общих мишеней части миРНК присутствуют гены, вовлеченные в синтез жирных кислот (Fatty acid biosynthesis – FASN), а также ряд сигнальных путей: Pathways in cancer (22 гена); p53 signaling pathway (9 генов); Hippo signaling pathway (11 генов) (рис. 1). Интересно, что FASN также ранее был обнаружен в экзосомах [26]. Кроме того, поиск в рамках классификации GO показал, что этот набор миРНК регулирует экспрессию ряда РНК-связывающих белков (NUCKS1, RC3H2, AGO1, NUFIP2, HNRNPM, AHNAK), из которых, по данным Exocarta 5, были ранее экспериментально обнаружены в экзосомах, причём AHNAK, являющийся структурным нуклеопротеином, был найден в экзосомах, секретируемых клетками рака предстательной железы DU145 [27].

Несмотря на разный характер распределения между фракциями, для мишеней второй группы миРНК во многом были характерны схожие термины KEGG (рис. 2). Так, здесь также встречаются ферменты синтеза жирных кислот (Fatty acid biosynthesis), в том числе и FASN. Кроме того, эти миРНК вовлечены в регуляцию ряда основных сигнальных путей: Cell cycle (13 генов), p53 signaling (8 генов), PI3K-Akt signaling (21 ген), Hippo signaling pathway (9 генов), в том числе связанных со злокачественной трансформацией: Pathways in cancer (18 генов), Transcriptional misregulation in cancer (11 генов), Proteoglycans in cancer (11).

Кроме того, экспрессия этого набора миРНК связана с рядом онкологических заболеваний, включая рак прямой кишки, мочевого пузыря, эндометрия, глиому, меланому, и хроническую миелоидную лейкемию. Наиболее интересной в рамках представленного исследования является связь выявленного набора миРНК с экспрессией 8 генов из категории Prostate cancer, вовлечённых в онкогенез РПЖ (GSK3B, NRAS, IGF1R, TP53, CCND1, CTNNB1, CDKN1A, MDM2). Из этих генов только циклин D1 (CCND1) напрямую связан с репродуктивной функцией по классификации PANTHER. Однако, как и предполагает классификация KEGG, перечисленные гены являются известными онкогенами при РПЖ [28-31].

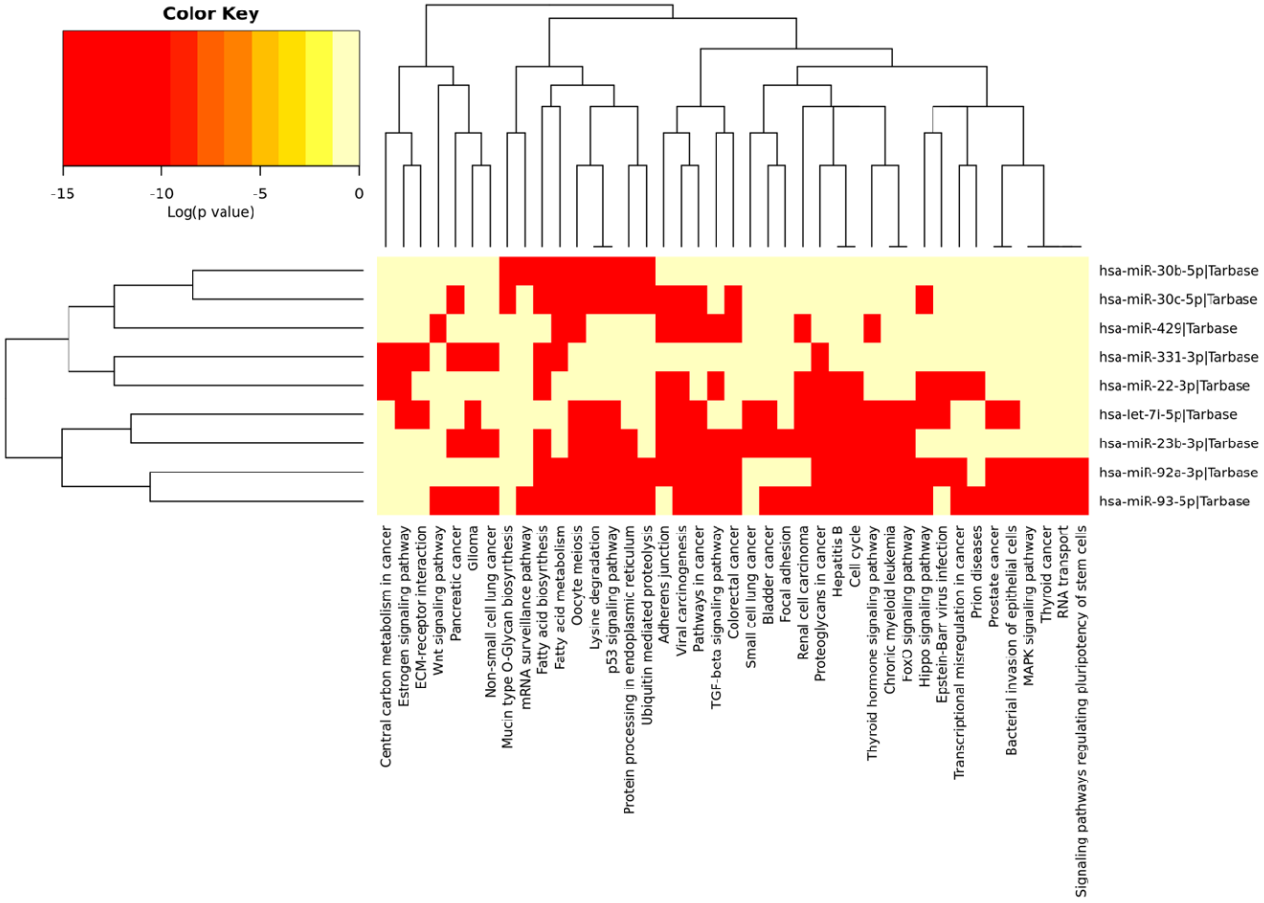

Рисунок 1, Тепловая карта и кластерный анализ общих мишеней миРНК, экспрессия которых отличается между фракциями мочи во всех группах доноров (Группа 1), в терминах классификации KEGG, По данным алгоритма miRPath v3,0 (DIANA Tools).

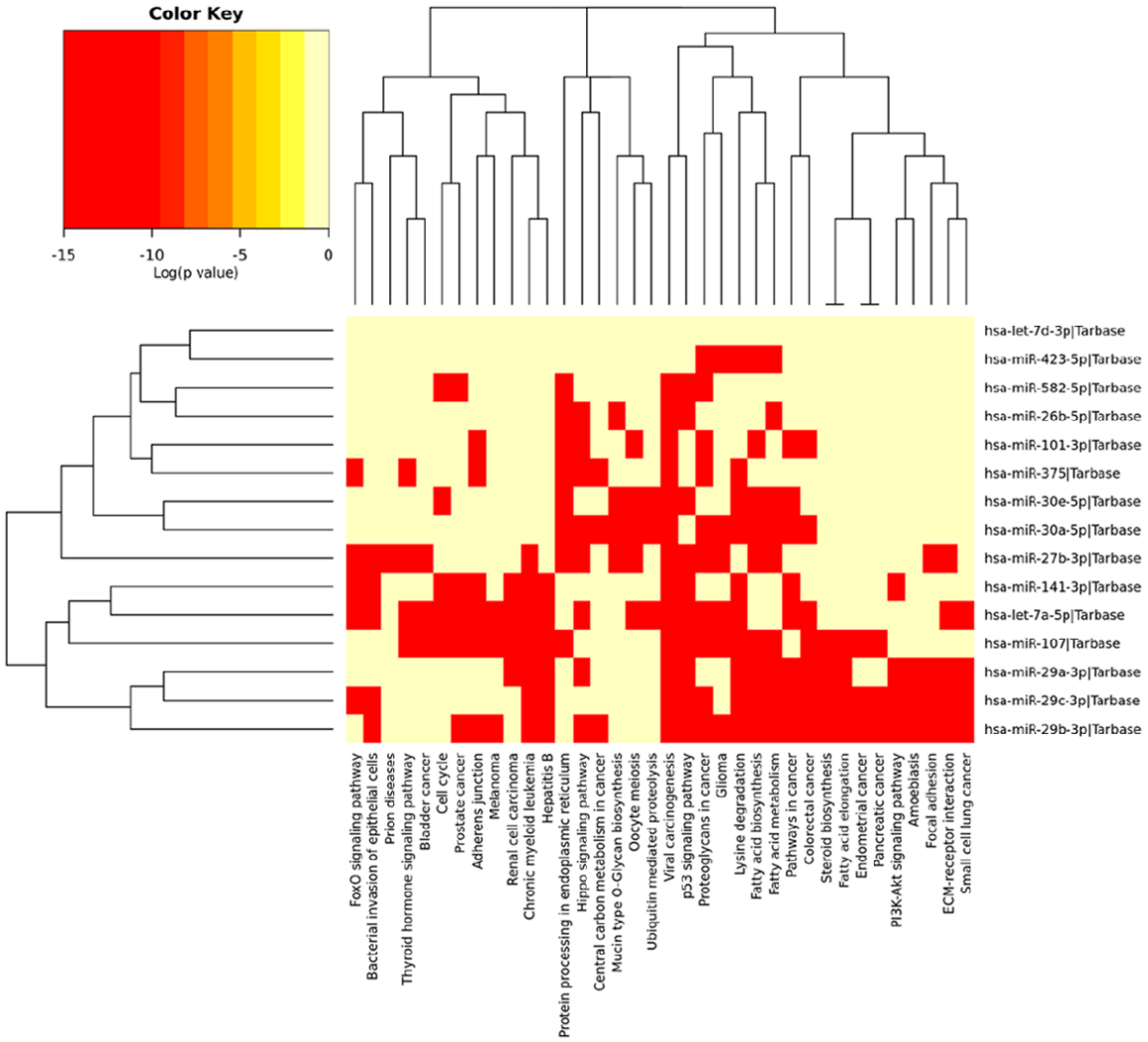

Рисунок 2. Тепловая карта и кластерный анализ общих мишеней миРНК, экспрессия которых отличается между фракциями мочи в зависимости от групповой принадлежности доноров (Группа 2), в терминах классификации KEGG. По данным алгоритма miRPath v3.0 (DIANA Tools).

Несмотря на то, что полученные результаты не позволили однозначно подтвердить или опровергнуть гипотезы о функциях выделенных наборов миРНК, из представленных данных можно сделать несколько важных выводов. Так, из таблицы 2 очевидно, что многие миРНК мочи предпочтительно находятся в связанной с везикулами или свободной форме, что подтверждается высокой разницей dCt между фракциями для этих миРНК (например, let-7b, miR-375 и -378a). Кроме того, для ряда миРНК (например, miR-375) характерно ступенчатое изменение значений ddCt в ряду ЗД-ДГПЖ-РПЖ, что может свидетельствовать о связи формы циркуляции с состоянием предстательной железы. Всё это подтверждает полученные нами ранее данные о перераспределении миРНК между фракциями мочи при РПЖ [22]. Тем не менее, анализ этих закономерностей осложнён рядом факторов. В частности, обширность и сложность регуляторных сетей миРНК склонны маскировать мишени, наиболее значимые в заданном контексте, и зачастую не позволяют напрямую выявлять регуляторные пути, участвующие в конкретном процессе. Кроме того, недостаток точных знаний о факторах, влияющих на селективность погрузки миРНК во внеклеточные везикулы, регуляцию секреции миРНК в целом и количественные аспекты их представленности в моче при физиологических условиях, также значительно осложняет анализ внеклеточных миРНК. В настоящем исследовании мы выделили две группы миРНК на основе особенностей их распределения между фракциями мочи. Тем не менее, из рисунков 1 и 2 видно, что в выявленных наборах миРНК на основании набора регулируемых мишеней прослеживаются характерные подгруппы, зачастую основанные на пересечении наборов мишеней родственных миРНК, таких как miR-29a/b/c и miR-30a/e. Это показывает, что для более адекватного анализа связи миРНК микровезикул мочи с онкологическими заболеваниями предстательной железы необходимо искать дополнительные способы стратификации выявленных наборов миРНК для того, чтобы уменьшить неоднородность выборки миРНК и провести глубокий анализ их регуляторных сетей.

Кроме того, необходимо независимо подтвердить факт перераспределения выявленных миРНК между различными фракциями мочи и определить значимость этих изменений в контексте развития заболеваний предстательной железы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Определены уровни 84 миРНК в образцах супернатанта и микровезикул мочи здоровых доноров, пациентов с ДГПЖ и РПЖ и при помощи сравнительного анализа представленности миРНК в обеих фракциях выявлено две группы миРНК. Определены спектры мишеней миРНК в обеих группах и показана их вовлеченность в регуляцию белков, обнаруживаемых во внеклеточных везикулах и участие в ряде сигнальных путей, в том числе связанных с патогенезом РПЖ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 16-15-00124).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Чойнзонов Е.Л., Писарева Л.Ф., Бояркина А.П., Одинцова И.Н., Тахауов Р.М.* (2004) Онкологическая заболеваемость населения Томской области, Изд-во Томского ун-та, Томск, 249 с.
2. *Чиссов В.И., Русаков И.Г.* (2011) Экспер. клин. урол., №2-№3, 6-7.
3. *Cortez M.A., Bueso-Ramos C., Ferdin J., Lorez-Berestein G., Sood A.K., Calin G.A.* (2011) Nat. Rev. Clin. Oncol., **8**, 467-477.
4. *Almeida M.I., Reis R.M., Calin G.A.* (2011) Mutat. Res., **717**, 1-8.
5. *Iorio M.V., Croce C.M.* (2012) EMBO Mol. Med., **4**, 143-159.
6. *Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S., Huang D.Y., Lee M.J., Galas D.J., Wang K.* (2010) Clin. Chem., **56**, 1733-1741.
7. *Arroyo J.D., Chevillet J.R., Kroh E.M., Ruf I.K., Pritchard C.C., Gibson D.F., Mitchell P.S., Bennett C.F., Pogosova-Agadjanyan E.L., Stirewalt D.L., Tait J.F., Tewari M.* (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **108**, 5003-5008.
8. *Gallo A., Tandon M., Alevizos I., Illei G.G.* (2012) PLoS ONE, **8**, e30679. DOI:10.1371/journal.pone.0030679
9. *Wagner J., Riwanto M., Besler C., Knau A., Fichtlscherer S., Röxe T., Zeiher A.M., Landmesser U., Dimmeler S.* (2013) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **33**, 1392-1400.
10. *Hanke M., Hoefig K., Merz H., Feller A.C., Kausch I., Jocham D., Warnecke J.M., Sczakiel G.* (2010) Urol. Oncol., **28**, 655-661.
11. *Sapre N., Hong M.K.H., Macintyre G, Lewis H., Kowalczyk A., Costello A.J., Corcoran N.M., Hovens C.M.* (2014) PLoS ONE, **9**, e91729. DOI:10.1371/journal.pone.0091729
12. *Miah S., Dudziec E., Drayton R.M., Zlotta A.R., Morgan S.L., Rosario D.J., Hamdy F.C., Catto J.W.* (2012) Br. J. Cancer., **107**, 123-128.
13. *Torres-Ferreira J., Ramalho-Carvalho J., Gomez A., Menezes F.D., Freitas R., Oliveira J., Antunes L., Bento M.J., Esteller M., Henrique R., Jeronimo C.* (2017) Mol. Cancer, **16**, 26.
14. *Yun S.J., Jeong P., Kim W.T., Kim T.H., Lee Y.S., Song P.H., Choi Y.H., Kim I.Y., Moon S.K., Kim W.J.* (2012) Int. J. Oncol., **41**, 1871-1878.
15. *Wang G., Chan E.S.Y., Kwan B.C.H., Li P.K., Yip S.K., Szeto C.C., Ng C.F.* (2012) Clin. Genitourin. Cancer., **10**, 106-113.
16. *Pospisilova S., Pazourkova E., Horinek A., Brisuda A., Svobodova I., Soukup V., Hrbacek J., Capoun O., Hanus T., Mares J., Korabecna M., Babjuk M.* (2016) Neoplasma, **63**, 799-808.
17. *Zhang D.Z., Lau K.M., Chan E.S., Wang G., Szeto C.C., Wong K., Choy R.K., Ng C.F.* (2014) PLoS ONE, **9**, e100793, DOI: 10.1371/journal.pone.0100793
18. *Lv L.L., Cao Y., Liu D., Xu M., Liu H., Tang R.N., Ma K.L., Liu B.C.* (2013) Int. J. Biol. Sci., **9**, 1021-1031.
19. *Barutta F., Tricarico M., Corbelli A., Annaratone L., Pinach S., Grimaldi S., Bruno G., Cimino D., Taverna D., Deregibus M.C., Rastaldi M.P., Perin P.C., Gruden G.* (2013) PLoS ONE, **8**, e73798. DOI: 10.1371/journal.pone.0073798
20. *Koppers-Lalic D., Hackenberg M., de Menezes R., Misovic B., Wachalska M., Geldof A., Zini N., de Reijke T., Wurdinger T., Vis A., van Moorselaar J., Pegtel M., Bijnsdorp I.* (2016) Oncotarget, **7**, 22566-22578.
21. *Samsonov R., Shtam T., Burdakov V., Glotov A., Tsyrlina E., Berstein L., Nosov A., Evtushenko V., Filatov M., Malek A.* (2016) Prostate, **76**, 68-79.
22. *Bryzgunova O.E., Zaripov M.M., Lekchnov E.A., Skvortsova T.E., Grigor'eva A.E., Morozkin E.S., Zaporozhchenko I.A., Ryabchikova E.I., Laktionov P.P.* (2016) PLoS ONE, **11**, e0157566. DOI: 10.1371/journal.pone.0157566
23. *Lekchnov E.A., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Bryzgunova O.E., Vlassov V.V., Laktionov P.P.* (2016) Anal. Biochem., **499**, 78-84.
24. *Kirschner M.B., Kao S.C., Edelman J.J., Armstrong N.J., Vallely M.P., van Zandwijk N., Reid G.* (2011) PLoS ONE, **6**, e24145. DOI: 10.1371/journal.pone.0024145
25. *Blondal T., Jensby Nielsen S., Baker A., Andreasen D., Mouritzen P., Wrang Teilum M., Dahlsveen I.K.* (2013) Methods, **59**, S1-S6.
26. *Duijvesz D., Burnum-Johnson K.E., Gritsenko M.A., Hoogland A.M., Vredenbregt-van den Berg M.S., Willemsen R., Luider T., Paša-Tolić L., Jenster G.* (2013) PLoS ONE, **8**, e82589. DOI: 10.1371/journal.pone.0082589
27. *Kharaziha P., Chioureas D., Rutishauser D., Baltatzis G., Lennartsson L., Fonseca P., Azimi A., Hultenby K., Zubarev R., Ullén A., Yachnin J., Nilsson S., Panaretakis T.* (2015) Oncotarget, **6**, 21740-21754.
28. *Fusté N.P., Castelblanco E., Felip I., Santacana M., Fernández-Hernández R., Gatius S., Pedraza N., Pallarés J., Cemeli T., Valls J., Tarres M., Ferrezuelo F., Dolcet X., Matias-Guiu X., Garí E.* (2016) Oncotarget, **7**, 26979-26991.
29. *Leite K.R., Franco M.F., Srougi M., Nesrallah L.J., Nesrallah A., Bevilacqua R.G., Darini E., Carvalho C.M., Meirelles M.I., Santana I., Camara-Lopes L.H.* (2001) Mod. Pathol., **14**, 428-436.
30. *Erdmann K., Kaulke K., Rieger C., Wirth M.P., Fuessel S.* (2017) J. Cancer. Res. Clin. Oncol., [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s00432-017-2484-5.
31. *Tian B., Huo N., Li M., Li Y., He Z.* (2015) Int. J. Mol. Med., **36**, 1409-1416.

Поступила: 17. 09. 2017.
Принята к печати: 17. 11. 2017.

REPRESENTATION ANALYSIS OF miRNA FROM CLARIFIED URINE AND URINE MICROVESICLES IN PROSTATE MALIGNANCIES AND NON-MALIGNANT NEOPLASMS

I.A. Zaporozhchenko[1], O.E. Bryzgunova[1,2], E.A. Lekchnov[1,2], I.D. Osipov[3], M.M. Zaripov[4], Yu.B. Yurchenko[1], S.V. Yarmoschuk[2], O.A. Pashkovskaya[2], E.Yu. Rykova[1,2], A.A. Zheravin[2], P.P. Laktionov[1,2]

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
8 Lavrentiev av., Novosibirsk, 630090 Russia; e-mail: ivanzap@niboch.nsc.ru
[2]Meshalkin Siberian Federal Biomedical Research Center, Novosibirsk, Russia
[3]Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[4]FSBIH SDMC of FMBA of Russia, Novosibirsk, Russia

Urine of prostate cancer patients contains tumor-specific biopolymers, including protein- and microvesicles-associated miRNAs that can potentially be used as oncomarkers. Previously we have characterized urine extracellular vesicles and demonstrated diagnostic potential of their miRNA cargo. In this study, we have performed a comparative analysis of the expression of 84 miRNA in paired samples of urine microvesicles and clarified urine from healthy men, patients with benign hyperplasia and cancer of the prostate using miRCURY LNA miRNA qPCR Panels. Subsets of miRNAs with differences in expression between the fractions of the urine were found in all three groups. Two groups of miRNA were identified based on the patterns of their differential expression. They regulate several key signaling pathways associated with prostate cancer development.

Key words: miRNA, exosomes, microvesicles, urine, prostate cancer