

Оценка уровня miR-21-5p, miR-451a и miR-144-3p в моче при дифференциальной диагностике локализованного рака предстательной железы

Д.Р. Долотказин^{1,2}, Д.А. Аверинская³, Е.Н. Князев³, М.П. Райгородская^{1,3}, О.Е. Колодеева³, О.Е. Колодеева³, М.Ю. Шкурников^{1,3}, Б.Я. Алексеев^{1,2}

¹Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский пр-д, 3;

²кафедра онкологии Медицинского института непрерывного образования ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»; Россия, 125080 Москва, Волоколамское шоссе, 11;

³факультет биологии и биотехнологии ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»; Россия, 117418 Москва, ул. Профсоюзная, 33, корп. 4

Контакты: Данияр Рустамович Долотказин daniyar.dolotkazin@gmail.com

Введение. Ограниченная чувствительность и специфичность имеющихся методов диагностики рака предстательной железы (РПЖ) являются определяющими факторами для поиска новых маркеров. В ряде работ продемонстрирована потенциальная возможность определения экспрессии некоторых микроРНК в моче.

Цель исследования – оценка диагностического потенциала определения экспрессии микроРНК в моче при РПЖ.

Материалы и методы. Проанализирована коллекция из осадка образцов мочи 19 пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и 44 больных РПЖ. РНК выделяли с использованием набора miRNEasy Serum/Plasma Kit. Выделенную из каждого образца РНК (16 мкл) конвертировали в комплементарную ДНК, которая служила матрицей в полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для секвенирования библиотеки микроРНК были подготовлены с использованием MGIEasy Small RNA Library Prep Kit v.2.0. Сформированные наночастицы ДНК помещали в секвенатор MGI DNBSEQ-G400. Результаты секвенирования обрабатывали с помощью IsoMiRmap. Различия в представленности микроРНК анализировали с помощью DESeq2. Для микроРНК-21 данные высокопроизводительного секвенирования были подтверждены результатами количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Выявлено 1154 вида микроРНК, 11 из которых дифференциально представлены во всех группах сравнения. Наиболее значимые различия в клеточном осадке у пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и РПЖ были зафиксированы для miR-451a (площадь под кривой (AUC) 0,98). В группах сравнения значимо различался уровень представленности 2 изоформ микроРНК: hsa-miR-144-3p|-1 (AUC 0,96) и hsa-miR-21-5p|+4 (AUC 0,68).

Заключение. Результаты дополняют доказательства того, что измененная экспрессия микроРНК miR-21, miR-451a и miR-144-3p связана с РПЖ, выявляется в образцах мочи, а также может быть потенциальным неинвазивным диагностическим критерием данного заболевания.

Ключевые слова: рак предстательной железы, молекулярная диагностика, микроРНК

Для цитирования: Долотказин Д.Р., Аверинская Д.А., Князев Е.Н. и др. Оценка уровня miR-21-5p, miR-451a и miR-144-3p в моче при дифференциальной диагностике локализованного рака предстательной железы. Онкоурология 2024;20(1):36–43. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2024-20-1-36-43>

Assessment of miR-21-5p, miR-451a, and miR-144-3p level in urine in differential diagnosis of localized prostate cancer

D.R. Dolotkazin^{1,2}, D.A. Averinskaya³, E.N. Knyazev³, M.P. Raigorodskaya^{1,3}, O.E. Kolodееva³, O.E. Kolodееva³, M.Yu. Shkurnikov^{1,3}, B.Ya. Alekseev^{1,2}

¹P.A. Herten Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

²Department of Oncology, Medical Institute of Continuing Education, Russian Biotechnological University; 11 Volokolamskoe Shosse, Moscow 125080, Russia;

³Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University "Higher School of Economics"; Build. 4, 33 Profsoyuznaya St., Moscow 117418, Russia

Contacts: Daniyar Rustamovich Dolotkazin daniyar.dolotkazin@gmail.com

Background. Limited sensitivity and specificity of existing prostate cancer (PCa) diagnosis methods drive the search for new markers. A number of studies has demonstrated the potential for measuring expression of certain microRNAs in urine.

Aim. To evaluate the diagnostic potential of measuring microRNA expression in urine in PCa.

Materials and methods. A collection of urine sediment samples from 19 patients with benign prostatic hyperplasia and 44 patients with PCa was analyzed. RNA was isolated using the miRNEasy Serum/Plasma Kit. 16 µL of RNA isolated from each sample were converted into cDNA, which served as a template for real-time polymerase chain reaction. For sequencing, microRNA libraries were prepared using MGIEasy Small RNA Library Prep Kit v.2.0. The formed DNA nanoballs were placed into an MGI DNBSEQ-G400 sequencer. Sequencing results were processed using IsoMiRmap. Differences in microRNA abundance were analyzed using DESeq2. For miRNA-21, high-throughput sequencing data were corroborated by the results of quantitative real-time polymerase chain reaction.

Results. 1154 types of microRNA were identified, 11 were differentially represented in all comparison groups. The most significant differences in cell sediment between benign prostatic hyperplasia and PCa patients were recorded for miR-451a (area under the curve (AUC) 0.98). Additionally, the abundance levels of two microRNA isoforms were significantly different: hsa-miR-144-3p|-1 (AUC 0.96) and hsa-miR-21-5p|+4 (AUC 0.68).

Conclusion. This study confirms that altered expression of microRNAs miR-21, miR-451a and miR-144-3p is associated with PCa, can be detected in urine samples, and can also be a potential non-invasive diagnostic criterion.

Keywords: prostate cancer, molecular diagnostics, microRNA

For citation: Dolotkazin D.R., Averinskaya D.A., Knyazev E.N. et al. Assessment of miR-21-5p, miR-451a, and miR-144-3p level in urine in differential diagnosis of localized prostate cancer. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2024;20(1):36–43. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2024-20-1-36-43>

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) является 2-м наиболее часто диагностируемым злокачественным новообразованием у мужчин в мире, уступая лишь раку легкого [1–3]. В 2020 г. заболеваемость РПЖ составила более 1,4 млн случаев, кроме того, РПЖ является 5-й причиной смертности, поэтому очевидна необходимость разработки современных малоинвазивных подходов к его диагностике.

Длительное время оценка концентрации простатического специфического антигена (ПСА) в плазме крови является предпочтительным методом диагностики РПЖ и мониторинга его прогрессирования и рецидивов. Скрининг ПСА у бессимптомных пациентов привел к уменьшению числа мужчин с метастатической формой заболевания, но в то же время — к значительной гипердиагностике и чрезмерному лечению пациентов с вялотекущей формой РПЖ [4–6]. Оценка уровня ПСА не дает возможности осуществлять дифференциальную диагностику РПЖ с другими заболеваниями, такими как доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ), травма и простатит [4–6].

В настоящее время в клинической практике получило распространение использование таких лабораторных показателей, как индекс здоровья предстательной железы (Prostate Health Index, РНИ) и специфический антиген РПЖ 3 (prostate cancer antigen 3, ПСА3).

Определение РНИ в крови представляет собой оценку уровней свободного ПСА, общего ПСА и [–2]ргоПСА. Метаанализ 16 исследований, посвященных определению РНИ для выявления РПЖ высокой степени злокачественности (сумма баллов по шкале Глисона ≥ 7), показал чувствительность данного метода 0,90 при специфичности 0,17 (площадь под кривой (AUC) 0,67) [7].

Специфический антиген РПЖ 3 представляет собой длинную некодирующую РНК, которая является специфичной для предстательной железы. Повышенная экспрессия ПСА3 характерна для РПЖ. Экспрессия ПСА3 определяется в осадке мочи после пальцевого ректального массажа, при котором происходит слушивание клеток предстательной железы в уретру [8–11]. В одном из крупнейших исследований по оценке диагностического потенциала ПСА3 были объединены данные 46 исследований с участием 12 295 мужчин, обследованных на наличие РПЖ. Совокупная чувствительность, специфичность и AUC для РПЖ составили 0,65; 0,73 и 0,75 соответственно [12].

Ограниченные чувствительность и специфичность существующих методов молекулярной диагностики РПЖ являются определяющими факторами для поиска новых маркеров данного заболевания. Один из перспективных методов молекулярно-генетической диагностики — определение экспрессии микроРНК.

МикроРНК – малые некодирующие РНК длиной около 22 нуклеотидов, принимающие участие в пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов [13]. На сегодняшний день известно более 2500 микроРНК, определяемых у людей. МикроРНК стабильны и детектируются не только в тканях, но в плазме крови, спинномозговой жидкости, лимфе и других жидких средах организма.

В ряде работ продемонстрирована потенциальная возможность определения экспрессии некоторых микроРНК в моче в качестве маркеров РПЖ. При этом отмечается как самостоятельная значимость этих микроРНК, так и перспектива их применения в качестве дополнительного анализа к определению уровня ПСА [14–17].

Цель исследования – оценка диагностического потенциала определения экспрессии микроРНК в моче при РПЖ в сравнении с таковой в образцах мочи пациентов с ДГПЖ.

Материалы и методы

Биологические образцы. Образцы мочи были взяты у пациентов, получавших лечение в МНИОИ им. П.А. Герцена и НИИ урологии им. Н.А. Лопаткина – филиалах

НМИЦ радиологии. Во всех случаях диагнозы РПЖ и ДГПЖ были гистологически верифицированы. Клинические характеристики пациентов представлены в табл. 1.

Сбор мочи с секретом предстательной железы пациенты проводили самостоятельно в стационаре после пальцевого ректального исследования. Не позднее чем через 120 мин образец мочи переносили в пробирку Falcon 15 мл. Пробирки центрифугировали при 2000g в течение 20 мин. Нижнюю фракцию (1,5–2 мл) с помощью пипетки переносили в пробирки объемом 2 мл, после чего образцы помещали на хранение при температуре не выше –20 °С.

Выделение тотальной РНК. РНК выделяли из 200 мкл осадочной жидкости с использованием набора miRNEasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, США) с предварительным добавлением $5,6 \times 10^8$ копий синтетической микроРНК cel-miR-39 (Qiagen, США) после инкубации плазмы с фенольной смесью Qiazol. Cel-miR-39 использовали в качестве внутреннего контроля эффективности выделения РНК, синтеза комплементарной ДНК (кДНК) и количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов

Table 1. Clinical characteristics of the patients

Характеристика Characteristic	Доброкачественная гиперплазия предстательной железы (n = 19) Benign prostatic hyperplasia (n = 19)	Рак предстательной железы (n = 44) Prostate cancer (n = 44)
Средний возраст, лет Mean age, years	65,7 ± 5,1	67,2 ± 7,0
Объем предстательной железы, см ³ Prostatic volume, cm ³	86,3 ± 37,8	42,3 ± 17,9
Стадия T, n (%): T stage, n (%):		
T2	–	37 (84)
T3	–	6 (14)
T4	–	1 (2)
Стадия N, n (%): N stage, n (%):		
N0	–	42 (96)
N1	–	2 (4)
Стадия M, n (%): M stage, n (%):		
M0	–	42 (96)
M1	–	2 (4)
Сумма баллов по шкале Глисона, n (%): Gleason score, n (%):		
3 + 3	–	22 (50)
3 + 4	–	15 (34)
3 + 5	–	–
4 + 3	–	6 (14)
4 + 4	–	–
4 + 5	–	1 (2)
5 + 3	–	–

Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени. Выделенную из каждого образца РНК (16 мкл) конвертировали в кДНК в реакционной смеси (20 мкл), содержащей буфер (10x E. coli Poly(A) Polymerase Reaction Buffer), аденозинтрифосфат и поли(А)-полимеразу из набора E. coli Poly(A) Polymerase Kit (NEB, Германия), а также смесь нуклеотидов и обратную транскриптазу из набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия) и универсальный праймер (CAGGTCCAGT(14)VN), путем инкубации при 37 °С в течение 60 мин с последующей инкубацией при 85 °С в течение 5 мин. Синтезированная кДНК (1 мкл) служила в качестве матрицы в ПЦР в реальном времени с использованием специфической пары праймеров для каждой исследуемой микроРНК и готовой ПЦР-смеси 5x SYBR Green PCR Kit (Qiagen, США). Условия ПЦР: 15 мин при 95 °С; 40 циклов: 20 с при 95 °С, 10 с при 60 °С и 15 с при 72 °С в амплификаторе ДТ-прайм (ДНК-технология, Россия). Сравнение уровней экспрессии микроРНК в образцах проводили по методу 2-ΔΔСТ с использованием cel-miR-39 в качестве референса и расчетом по формулам:

$$Ct_i^{norm} = Ct_i - Ct_i^{cel-miR-39},$$

$$FC_j = Ct_j^{norm} - med_{\{i \in N\}}(Ct_i^{norm})$$

где i – номер образца в группе; j – номер образца в сравниваемой группе; N – множество образцов группы контроль (или норма).

При проведении ПЦР были использованы следующие последовательности праймеров: cel-miR-39 (прямой: GTCACCGGGTGTAAATCAG; обратный: GGTCCAGTTTTTTTTTTTCAAG), miR-21-5p (прямой: GCGCAGTAGCTTATCAGAC; обратный: CCAGTTTTTTTTTTTCAACATCA). Эффективность пар праймеров составляла 2,09 и 2,04 соответственно.

Секвенирование микроРНК. Библиотеки микроРНК были подготовлены с использованием MGIEasy Small RNA Library Prep Kit v.2.0 (BGI-940-000196-00; MGI, КНР) согласно протоколу производителя. Исходное количество тотальной РНК, взятое в реакцию, – 10 нг для каждого образца. Отбор по длине фрагментов осуществляли на магнитных частицах AMPure XP SPRI Reagent (Cat. No. A6388; Beckman Coulter, США). Количество библиотек двухцепочечных ДНК (дцДНК) оценивали с применением набора для высокочувствительного анализа дцДНК Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (Cat. No. Q33230; Thermo Fisher Scientific, США) и флуориметра Qubit® (Thermo Fisher Scientific, США). Длину фрагментов библиотек дцДНК оценивали с помощью капиллярного электрофореза Agilent® 2100 с использованием набора Agilent® DNA High Sensitive Kit (Cat. No. 5067-4626; Agilent, США).

Образцы с концентрациями выше 1,5 нг/мкл и длиной 105–113 пар нуклеотидов были денатурированы при 95 °С в течение 3 мин и преобразованы в кольцевые библиотеки одноцепочечных ДНК (оцДНК) с применением набора MGIEasy Circularization Kit User Manual (Cat. No. 1000005259; MGI, КНР). Концентрацию оцДНК оценивали с использованием набора для анализа оцДНК (Qubit™ ssDNA Assay Kit Cat. No. Q10212; Thermo Fisher Scientific, США) и флуориметра Qubit®. Затем библиотеки пулировали по 24 образца в 1 пул (всего 4 пула) в равных количествах до 60 фмоль на 1 пул. Формирование наношариков ДНК (ДНБ (DNA Nano Ball, DNB)) из пулов библиотек оцДНК осуществляли с помощью набора для высокопроизводительного секвенирования MGI DNBSEQ-G400RS (BGI, КНР). Концентрацию ДНБ оценивали с использованием набора Qubit™ ssDNA Assay Kit (Cat. No. Q10212; Thermo Fisher Scientific, США) и флуориметра Qubit®. Образцы ДНБ с концентрациями не менее 8 нг/мкл загружали на 4 дорожки проточной ячейки FCL с помощью портативного загрузчика DNB MGIDL-200H (BGI, КНР). Проточную ячейку помещали в секвенатор MGI DNBSEQ-G400 (BGI, КНР) для дальнейшего секвенирования в режиме SE50.

Анализ данных секвенирования. Качество FASTQ оценивали с использованием FastQC v.0.11.9. Удаление адаптеров осуществляли с помощью cutadapt v.2.10. После удаления 3'-адаптерной последовательности результаты секвенирования обрабатывали с помощью IsoMiRmap [18]. Различия в представленности микроРНК анализировали с применением DESeq2 [19].

Статистическая обработка данных. Анализ значимости различий уровней экспрессии исследуемых микроРНК в группах сравнения выполняли с использованием двустороннего теста Вилкоксона–Манна–Уитни. МикроРНК считали дифференциально экспрессирующейся при кратности изменений (fold change) в уровнях экспрессии между сравниваемыми группами более чем в 2 раза. Порогом статистической значимости считали $p < 0,05$.

Анализ выполняли в среде R версии 4.2.2 с использованием пакета ggplot2 для визуализации данных.

Результаты

В результате секвенирования микроРНК из образцов осадка мочи после пальцевого ректального массажа выявлено 1154 вида микроРНК. Обнаружено 11 микроРНК, дифференциально представленных во всех группах сравнения относительно группы ДГПЖ (табл. 2).

Наиболее значимые различия в уровне представленности в клеточном осадке секрета предстательной железы у пациентов с ДГПЖ и РПЖ были зафиксированы для miR-451a (AUC 0,98). У пациентов с ДГПЖ ее уровень был повышен более чем в 32 раза по сравнению с таковым у пациентов с РПЖ. Кроме этого,

Таблица 2. Экспрессия и значимость различий в представленности микроРНК в клеточном осадке секрета предстательной железы. Данные о представленности микроРНК приведены в $\log_2(\text{cpm})$

Table 2. Expression and significance of differences in microRNA abundance in prostate secretion sediment. Data on microRNA abundance are presented as $\log_2(\text{cpm})$

МикроРНК MicroRNA	ДГПЖ BPH	РПЖ PCa			Значимость различий между ДГПЖ и РПЖ Significance of differences between BPH and PCa		
		Индекс Глисона 3+3 Gleason score 3+3	Индекс Глисона 3+4 Gleason score 3+4	Индекс Глисона 4+3 Gleason score 4+3	Индекс Глисона 3+3 Gleason score 3+3	Индекс Глисона 3+4 Gleason score 3+4	Индекс Глисона 4+3 Gleason score 4+3
hsa-miR-451a 0	14,8 (14,2; 15,7)	8,7 (6,9; 9,7)	9,4 (8,5; 11,4)	9,4 (8,1; 10,6)	$5,97 \times 10^{-21}$	$8,58 \times 10^{-10}$	$4,36 \times 10^{-6}$
hsa-miR-144-3p -1	10,6 (10,3; 11,8)	2 (0; 5)	0,4 (0; 8)	1,8 (0; 7,1)	$9,35 \times 10^{-12}$	$4,44 \times 10^{-6}$	$4,89 \times 10^{-3}$
hsa-miR-423-5p 0	14 (9,5; 15)	10,6 (10; 11,1)	9,2 (8,9; 10,1)	9,7 (9,3; 10,1)	$1,58 \times 10^{-5}$	$7,47 \times 10^{-6}$	$8,27 \times 10^{-10}$
hsa-miR-15a-5p 0	14 (12,1; 15)	11,5 (10,7; 12,3)	12,4 (12,1; 12,8)	11,5 (11; 12,4)	$2,41 \times 10^{-5}$	$1,71 \times 10^{-3}$	$1,15 \times 10^{-5}$
hsa-miR-146b-5p 0	7,3 (6,6; 7,6)	8,9 (7,9; 10,6)	8,9 (5,3; 10,7)	8,8 (7,9; 9,7)	$1,60 \times 10^{-4}$	$1,94 \times 10^{-5}$	$1,22 \times 10^{-3}$
hsa-miR-130a-3p 0	11,5 (11,4; 11,6)	9,6 (9,4; 10,4)	9,5 (8,6; 10,7)	10,8 (10,6; 11,1)	$1,91 \times 10^{-4}$	$5,05 \times 10^{-4}$	$1,14 \times 10^{-3}$
hsa-miR-92a-3p 0	12,8 (10,4; 14)	10,9 (10,4; 11,1)	10 (9,5; 10,9)	10,8 (10,3; 11,1)	$2,18 \times 10^{-4}$	$7,80 \times 10^{-5}$	$3,03 \times 10^{-5}$
hsa-miR-25-3p 0	11,5 (10; 12,6)	9,2 (8,7; 10)	9,6 (9; 10,3)	9,2 (9; 9,6)	$1,31 \times 10^{-3}$	$6,13 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-6}$
hsa-miR-96-5p 0	9,8 (7; 10,5)	3 (0; 7,5)	0 (0; 0,8)	6,3 (4,2; 6,6)	$1,31 \times 10^{-3}$	$1,00 \times 10^{-5}$	$6,36 \times 10^{-7}$
hsa-miR-15b-5p 0	12,2 (11; 13,3)	10,2 (9,1; 11)	9,9 (8,5; 10,5)	9,8 (9,2; 10,2)	$1,85 \times 10^{-3}$	$1,13 \times 10^{-3}$	$2,08 \times 10^{-6}$
hsa-miR-21-5p +4	5,3 (4,2; 6,2)	7,6 (0; 8,8)	3,7 (0; 7,8)	7,2 (7,1; 7,5)	$5,30 \times 10^{-3}$	$1,48 \times 10^{-3}$	$1,41 \times 10^{-3}$

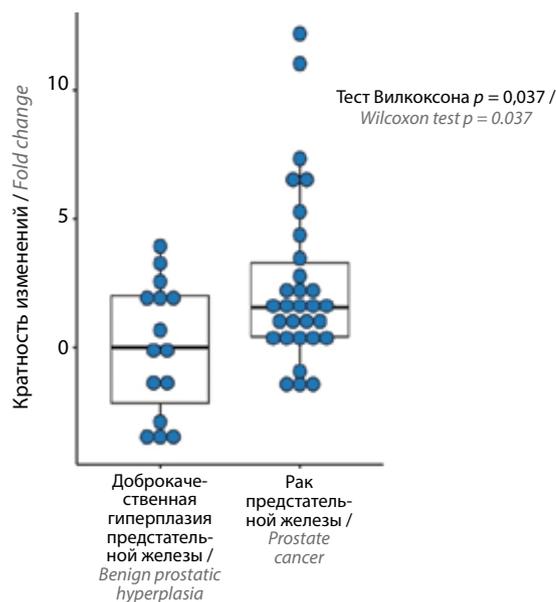
Примечание. ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия предстательной железы; РПЖ – рак предстательной железы; индекс Глисона – сумма баллов по шкале Глисона.

Note. BPH – benign prostatic hyperplasia; PCa – prostate cancer.

в группах сравнения значимо различался уровень представленности 2 изоформ микроРНК: hsa-miR-144-3p|-1 (AUC 0,96) и hsa-miR-21-5p|+4 (AUC 0,68). Изоформа miR-144-3p практически отсутствовала в образцах пациентов с РПЖ. В свою очередь, уровень изоформы miR-21-5p был более чем в 4 раза повышен у пациентов с РПЖ.

Для подтверждения результатов секвенирования была сформирована расширенная выборка из 45 пациентов с ДГПЖ (15 образцов) и локализованным РПЖ (30 образцов) и независимым методом количественной ПЦР в реальном времени оценена экспрессия miR-21-5p (см. рисунок). Представленность miR-21-5p в образцах группы пациентов с РПЖ была в 3 раза выше по сравнению с группой ДГПЖ ($p = 0,037$).

Были оценены диагностические чувствительность и специфичность уровня miR-21-5p в представленных образцах при дифференциальной диагностике ДГПЖ и РПЖ. AUC составила 69,3. В точке Юдена чувствительность составила 53,3, специфичность – 46,7 при пороговом уровне 30,4. В то же время при пороговом уровне 28,4 чувствительность равна 73,3 %, а специфичность – 26,6 %.



Различия в представленности miR-21-5p в образцах мочи после пальцевого ректального исследования
 Differences in miR-21-5p enrichment in urine samples after digital rectal examination

Обсуждение

В исследовании мы обнаружили повышенную представленность микроРНК miR-451a и miR-144-3p в образцах мочи пациентов с ДГПЖ по сравнению с пациентами с РПЖ. МикроРНК miR-451a и miR-144-3p расположены на хромосоме 17 в 17q11.2, на расстоянии всего 100 пар нуклеотидов друг от друга [20]. Данные микроРНК транскрибируются как одна при-микроРНК во время эритропоэза [21]. Экспрессия данного кластера микроРНК подавляется транскрипционным фактором RUNX1 и положительно регулируется GATA1 и TAL1 в гемопоэтических клетках [22]. По результатам секвенирования транскриптома зрелых эритроцитов около 60 % эритроцитарной микроРНК приходится на hsa-miR-451a [23]. Известно, что ДГПЖ с повышенной пролиферацией ацинарных и стромальных клеток стимулирует усиление васкуляризации предстательной железы. Вновь образованные капилляры легко разрушаются, создавая основу для гематурии. Гематурия различной степени выраженности наблюдается у 12–20 % пациентов с ДГПЖ [24]. В то же время наши данные свидетельствуют о повышенном уровне miR-451a и miR-144-3p у всех пациентов с ДГПЖ, при том что количество эритроцитов в моче не различалось в группах сравнения. По данным Cancer Cell Line Encyclopedia, miR-451a и miR-144-3p экспрессируются в клеточных линиях предстательной железы [25]. Показано, что экспрессия miR-451a ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию клеток РПЖ [26]. Можно предположить, что повышенная представленность miR-451a и miR-144-3p в клеточном осадке у пациентов с ДГПЖ связана не только с микрогематурией, но и с повышенной экспрессией этого кластера микроРНК в клетках предстательной железы.

О потенциальной значимости изучения miR-144 и miR-451 в тканях при диагностике РПЖ также сообщалось в ранее опубликованных работах. Было установлено, что miR-144 может ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз клеток РПЖ [27, 28]. В другом исследовании было продемонстрировано, что повышенная экспрессия miR-451 может значительно подавлять пролиферацию, миграцию и инвазию клеток РПЖ [29]. Кроме этого, изучение экспрессии miR-451a в тканях и сыворотке пациентов с РПЖ показало, что экспрессия miR-451a снижалась как в сыворотке, так и в тканях [30].

Также нами показана более высокая представленность микроРНК miR-21-5p в образцах мочи пациентов с РПЖ по сравнению с пациентами с ДГПЖ. Данная микроРНК является важным регулятором клеточной пролиферации, миграции и апоптоза [31–34]. В ранее проведенных исследованиях продемонстрировано, что miR-21 действует как онкоген при некоторых видах рака человека, включая рак яичников [35], немелкоклеточный рак легкого [36] и колоректальный рак [37, 38].

Установлено, что miR-21 способствует малигнизации клеток путем непосредственного воздействия на ряд генов-супрессоров опухолей [35, 37].

MiR-21 принадлежит к редкому классу микроРНК, так как она расположена в 3'-нетранслируемой области гена белка мембраны вакуолей 1 (VMP1), также известного как TMEM49. Более того, показано, что экспрессия miR-21-5p подавляет экспрессию гена VMP1 через путь PTEN/АКТ/TFEB. В свою очередь, TFEB-индуцированная активация транскрипции VMP1 может ингибировать экспрессию miR-21 [39].

В исследованиях С. Melbø-Jørgensen и соавт. показана гиперэкспрессия miR-21-5p в тканях у пациентов с РПЖ, перенесших радикальную простатэктомию [40]. J. Ribas и соавт., Т. Li и соавт. также продемонстрировали увеличение экспрессии hsa-miR-21-5p при РПЖ по сравнению с нормальной тканью предстательной железы [41, 42].

P. Porzyski и соавт. при анализе микроРНК в крови обнаружили, что специфичность miR-21 для диагностики РПЖ составляет 0,75 [43], а В. Yang и соавт. сообщили, что она может достигать 0,93 [44]. К.Р. Seputra и соавт. в мета-анализе, включившем 6 работ, заключили, что определение экспрессии данной микроРНК в крови также может служить биомаркером прогрессирования РПЖ [45].

Кроме этого, в небольшом числе публикаций было продемонстрировано повышенное содержание miR-21-5p в моче у пациентов с РПЖ [46, 47], а в исследовании R.R. Gunawan и соавт. на выборке из 20 пациентов с РПЖ и 20 пациентов с ДГПЖ экспрессия miR-21-5p в образцах мочи различалась более чем в 12 раз между группами и продемонстрировала более высокие чувствительность и специфичность по сравнению с ПСА [48]. Эти данные в совокупности с результатами представленного исследования могут свидетельствовать о потенциальной диагностической значимости определения miR-21 у пациентов с РПЖ.

Таким образом, результаты проведенного исследования добавляют информации к растущему количеству доказательств того, что измененная экспрессия микроРНК miR-21, miR-451a и miR-144-3p связана с РПЖ и может быть выявлена в образцах мочи.

Заключение

Уровень miR-21-5p, miR-451a и miR-144-3p в образцах мочи с секретом предстательной железы после пальцевого ректального исследования может быть потенциальным неинвазивным диагностическим критерием РПЖ. Необходимы дальнейшие исследования с большей популяцией для изучения роли miR-21-5p, miR-451a и miR-144-3p в качестве биомаркеров РПЖ, а также сопоставление их экспрессии с клиническими данными пациентов для выявления потенциальных комбинаций в целях повышения диагностической значимости.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rawla P. Epidemiology of prostate cancer. *World J Oncol* 2019;10(2):63–89. DOI: 10.14740/wjon1191
2. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
3. Archer M., Dogra N., Kyprianou N. Inflammation as a driver of prostate cancer metastasis and therapeutic resistance. *Cancers* 2020;12:2984. DOI: 10.3390/cancers12102984
4. Prensner J.R., Rubin M.A., Wei J.T., Chinnaiyan A.M. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med* 2012;4(127):127rv123. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003180
5. Draisma G., Etzioni R., Tsodikov A. et al. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(6):374–83. DOI: 10.1093/jnci/djp001
6. Carroll P.R., Parsons J.K., Andriole G. et al. NCCN guidelines insights: prostate cancer early detection, version 2.2016. *J Natl Compr Cancer Netw* 2016;14(5):509–19. DOI: 10.6004/jnccn.2016.0060
7. Wang W., Wang M., Wang L. et al. Diagnostic ability of %p2PSA and prostate health index for aggressive prostate cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* 2014;4:5012. DOI: 10.1038/srep05012
8. Fradet Y., Saad F., Aprikian A. et al. Upm3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology* 2004;64(2):311–5. DOI: 10.1016/j.urology.2004.03.052
9. Hessels D., Klein Gunnewiek J.M., van Oort I. et al. Dd3(pca3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003;44(1):8–15. DOI: 10.1016/S0302-2838(03)00201-X
10. Nakanishi H., Groskopf J., Fritsche H.A. et al. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: Implication in selecting candidates for active surveillance. *J Urol* 2008;179(5):1804–9. DOI: 10.1016/j.juro.2008.01.013
11. Van Gils M.P., Cornel E.B., Hessels D. et al. Molecular PCA3 diagnostics on prostatic fluid. *Prostate* 2007;67(8):881–7. DOI: 10.1002/pros.20564
12. Cui Y., Cao W., Li Q. et al. Evaluation of prostate cancer antigen 3 for detecting prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2016;6:25776. DOI: 10.1038/srep25776
13. He L., Hannon G.J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5(7):522–31. DOI: 10.1038/nrg1379
14. Lewis H., Lance R., Troyer D. et al. miR-888 is an expressed prostatic secretions-derived microRNA that promotes prostate cell growth and migration. *Cell Cycle* 2014;13(2):227–39. DOI: 10.4161/cc.26984
15. Haj-Ahmad T.A., Abdalla M.A., Haj-Ahmad Y. Potential urinary miRNA biomarker candidates for the accurate detection of prostate cancer among benign prostatic hyperplasia patients. *J Cancer* 2014;5(3):182–91. DOI: 10.7150/jca.6799
16. Stuopelyte K., Daniunaite K., Bakavicius A. et al. The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. *Br J Cancer* 2016;115(6):707–15. DOI: 10.1038/bjc.2016.233
17. Fredsøe J., Rasmussen A.K.I., Thomsen A.R. et al. Diagnostic and prognostic microRNA biomarkers for prostate cancer in cell-free urine. *Eur Urol Focus* 2018;4(6):825–33. DOI: 10.1016/j.euf.2017.02.018
18. Lohrer P., Karathanasis N., Londin E. et al. IsoMiRmap: fast, deterministic and exhaustive mining of isomiRs from short RNA-seq datasets. *Bioinformatics* 2021;37(13):1828–38. DOI: 10.1093/bioinformatics/btab016
19. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15(12):550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8
20. Pan X., Wang R., Wang Z.X. The potential role of miR-451 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *Mol Cancer Ther* 2013;12(7):1153–62. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0802
21. Kretov D.A., Walawalkar I.A., Mora-Martin A. et al. Ago2-dependent processing allows miR-451 to evade the global microRNA turnover elicited during erythropoiesis. *Mol Cell* 2020;78(2):317–28.e6. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.02.020
22. Kohrs N., Kolodziej S., Kuvarcina O.N. et al. MiR144/451 expression is repressed by RUNX1 during megakaryopoiesis and disturbed by RUNX1/ETO. *PLoS Genet* 2016;12(3):e1005946. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005946
23. Azzouzi I., Moest H., Wollscheid B. et al. Deep sequencing and proteomic analysis of the microRNA-induced silencing complex in human red blood cells. *Exp Hematol* 2015;43(5):382–92. DOI: 10.1016/j.exphem.2015.01.007
24. Foley S.J., Soloman L.Z., Wedderburn A.W. et al. A prospective study of the natural history of hematuria associated with benign prostatic hyperplasia and the effect of finasteride. *J Urol* 2000;163(2):496–8. DOI: 10.1016/S0022-5347(05)67910-4
25. Ghandi M., Huang F.W., Jané-Valbuena J. et al. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature* 2019;569(7757):503–8. DOI: 10.1038/s41586-019-1186-3
26. Liu Y., Yang H.Z., Jiang Y.J., Xu L.Q. MiR-451a is downregulated and targets PSMB8 in prostate cancer. *Kaohsiung J Med Sci* 2020;36(7):494–500. DOI: 10.1002/kjm2.12196
27. 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
28. Bai M., Lei Y., Wang M. et al. Long non-coding RNA SNHG17 promotes cell proliferation and invasion in castration-resistant prostate cancer by targeting the miR-144/CD51 axis. *Front Genet* 2020;11:274. DOI: 10.3389/fgene.2020.00274
29. Wang G., Yao L., Yang T. et al. MiR-451 suppresses the growth, migration, and invasion of prostate cancer cells by targeting macrophage migration inhibitory factor. *Transl Cancer Res* 2019;8(2):647–54. DOI: 10.21037/tcr.2019.03.28
30. Fan B., Jin X., Ding Q. et al. Expression of miR-451a in prostate cancer and its effect on prognosis. *Iran J Public Health* 2021;50(4):772–9. DOI: 10.18502/ijph.v50i4.6002
31. Cappellesso R., Tinazzi A., Giurici T. et al. Programmed cell death 4 and microRNA 21 inverse expression is maintained in cells and exosomes from ovarian serous carcinoma effusions. *Cancer Cytopathol* 2014;122(9):685–93. DOI: 10.1002/cncy.21442
32. Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005;65(14):6029–33. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0137
33. Meng F., Henson R., Wehbe-Janek H. et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133(2):647–58. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.05.022
34. Venturutti L., Romero L.V., Urtreger A.J. et al. Stat3 regulates ErbB-2 expression and co-opts ErbB-2 nuclear function to induce miR-21 expression, PDCD4 downregulation and breast cancer metastasis. *Oncogene* 2016;35(17):2208–22. DOI: 10.1038/onc.2015.28
35. Chan J.K., Blansit K., Kiet T. et al. The inhibition of mir-21 promotes apoptosis and chemosensitivity in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2014;132(3):739–44. DOI: 10.1016/j.ygyno.2014.01.034
36. Xue X., Liu Y., Wang Y. et al. Mir-21 and mir-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating socs1, socs6, and pten. *Oncotarget* 2016;7(51):84508–19. DOI: 10.18632/oncotarget.13022
37. Wu Y., Song Y., Xiong Y. et al. MicroRNA-21 (miR-21) promotes cell growth and invasion by repressing tumor suppressor PTEN

- in colorectal cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017;43(3):945–58. DOI: 10.1159/000481648
38. Asangani I.A., Rasheed S.A.K., Nikolova D.A. et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008;27(15):2128–36. DOI: 10.1038/sj.onc.1210856
39. Wang C., Peng R., Zeng M. et al. An autoregulatory feedback loop of miR-21/VMP1 is responsible for the abnormal expression of miR-21 in colorectal cancer cells. *Cell Death Dis* 2020;11(12):1067. DOI: 10.1038/s41419-020-03265-4
40. Melbø-Jørgensen C., Ness N., Andersen S. et al. Stromal expression of miR-21 predicts biochemical failure in prostate cancer patients with Gleason score 6. *PLoS One* 2014;9:e113039. DOI: 10.1371/journal.pone.0113039
41. Ribas J., Ni X., Haffner M. et al. MiR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res* 2009;69(18):7165–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1448
42. Li T., Li R.S., Li Y.H. et al. MiR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. *J Urol* 2012;187(4):1466–72. DOI: 10.1016/j.juro.2011.11.082
43. Porzycycki P., Ciszkowicz E., Semik M., Tyrka M. Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. *Int Urol Nephrol* 2018;50(9):1619–26. DOI: 10.1007/s11255-018-1938-2
44. Yang B., Liu Z., Ning H. et al. MicroRNA-21 in peripheral blood mononuclear cells as a novel biomarker in the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Cancer Biomark* 2016;17(2):223–30. DOI: 10.3233/CBM-160634
45. Seputra K.P., Purnomo B.B., Susianti H. et al. miRNA-21 as reliable serum diagnostic biomarker candidate for metastatic progressive prostate cancer: meta-analysis approach. *Med Arch* 2021;75(5):347–50. DOI: 10.5455/medarh.2021.75.347-350
46. Ghorbanmehr N., Gharbi S., Korsching E. et al. miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine-promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer. *Prostate* 2019;79(1):88–95. DOI: 10.1002/pros.23714
47. Danarto R., Astuti I., Umbas R., Haryana S.M. Urine miR-21-5p and miR-200c-3p as potential non-invasive biomarkers in patients with prostate cancer. *Turk J Urol* 2019;46(1):26–30. DOI: 10.5152/tud.2019.19163
48. Gunawan R.R., Astuti I., Danarto H.R. miRNA-21 as high potential prostate cancer biomarker in prostate cancer patients in Indonesia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2023;24(3):1095–9. DOI: 10.31557/APJCP.2023.24.3.1095

Вклад авторов

Д.Р. Долотказин: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, сбор материалов для анализа, написание текста статьи;
Д.А. Аверинская: анализ полученных данных, написание текста статьи;
Е.Н. Князев, М.П. Райгородская: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи;
О.Е. Колодеева, О.Е. Колодеева: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
М.Ю. Шкурников: разработка дизайна исследования, статистический анализ, научное редактирование текста статьи;
Б.Я. Алексеев: идея и разработка дизайна исследования, научное редактирование текста статьи.

Authors' contributions

D.R. Dolotkazin: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, obtaining data for analysis, article writing;
D.A. Averinskaya: analysis of the obtained data, article writing;
E.N. Knyazev, M.P. Raigorodskaya: developing the research design, analysis of the obtained data, article writing;
O.E. Kolodeeva, O.E. Kolodeeva: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
M.Yu. Shkurnikov: developing the research design, statistical analysis, article scientific editing;
B.Ya. Alekseev: idea and development of research design, article scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.Р. Долотказин / D.R. Dolotkazin: <https://orcid.org/0000-0003-2863-9001>
Д.А. Аверинская / D.A. Averinskaya: <https://orcid.org/0000-0003-3936-4728>
Е.Н. Князев / E.N. Knyazev: <https://orcid.org/0000-0002-9414-2573>
М.П. Райгородская / M.P. Raigorodskaya: <https://orcid.org/0000-0003-0527-7773>
О.Е. Колодеева / O.E. Kolodeeva: <https://orcid.org/0009-0006-7572-8970>
О.Е. Колодеева / O.E. Kolodeeva: <https://orcid.org/0009-0009-8475-4662>
М.Ю. Шкурников / M.Yu. Shkurnikov: <https://orcid.org/0000-0002-6668-5028>
Б.Я. Алексеев / B.Ya. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0002-3398-4128>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено при поддержке ПАО «Сбербанк».

Funding. The study was performed with the support of Sberbank.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России.

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 National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia.

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

Статья поступила: 08.12.2023. **Принята к публикации:** 06.02.2024.

Article submitted: 08.12.2023. **Accepted for publication:** 06.02.2024.