

ВОЗМОЖНОСТЬ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОЧАГОВЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПУТЕМ АНАЛИЗА МИКРОРНК

М. С. Князева¹, Т. М. Шестопалова², Л. М. Забегина¹, А. В. Шалаев¹, А. К. Ратникова³,
В. А. Кащенко³, С. Л. Воробьев², А. В. Малек^{1✉}

1. НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

2. Национальный центр клинической морфологической диагностики, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

3. СЗОНКЦ им. Л. Г. Соколова ФМБА России, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

✉ anastasia@malek.com.ru

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Поиск потенциально маркерных молекул микроРНК в материале узловых образований поджелудочной железы.

Материалы и методы. В исследование были включены образцы ткани очаговых образований поджелудочной железы с гистологическим заключением: хронический панкреатит ($n = 23$), интраэпителиальная неоплазия low grade /PanIN-1/2 ($n = 19$) и high grade степени /PanIN-3 ($n = 8$), инвазивная протоковая карцинома ($n = 26$). В рамках работы был проведен широкий профайлинг пулов образцов разных гистологических типов, выбор потенциально маркерных микроРНК, анализ экспрессии выбранных молекул микроРНК во всех образцах, включенных в исследование, поиск статистически значимых различий между группами образцов, апробация нового алгоритма интерпретации полученных результатов путем вычисления соотношений концентраций «реципрокных пар» микроРНК. Метод анализа: обратная транскрипция с последующей количественной ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. Уровень экспрессии молекул miR-216a и miR-217 снижается в ряду: PanIN-1/2 > PanIN-3 > протоковая карцинома ПЖ. Также в клетках инвазивной протоковой карциномы поджелудочной железы повышена экспрессия miR-375 и снижена экспрессия miR-143. Высокая точность дифференциальной диагностики ($AUC > 0,95$) очагов хронического панкреатита и инвазивной протоковой карциномы ПЖ может быть обеспечена с помощью панели из четырех молекул miR-216a, miR-217, miR-1246 и let-7a.

Заключение. Оценка экспрессии молекул микроРНК в материале очаговых образований ПЖ с целью дифференциальной диагностики протоковой карциномы имеет диагностический потенциал, но метод требует валидации с использованием большей коллекции биологических образцов.

Ключевые слова: микроРНК, рак поджелудочной железы, протоковая неоплазия, хронический панкреатит, ОТ-ПЦР, диагностика

Для цитирования: Князева М. С., Шестопалова Т. М., Забегина Л. М., Шалаев А. В., Ратникова А. К., Кащенко В. А., Воробьев С. Л., Малек А. В. Возможность дифференциальной диагностики очаговых образований поджелудочной железы путем анализа микроРНК. Южно-Российский онкологический журнал. 2023; 4(3):20-35. <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2023-4-3-3>, <https://elibrary.ru/gugsok>

Для корреспонденции: Малек Анастасия Валерьевна – д.м.н., заведующая лабораторией субклеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация.

Адрес: 197758, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68

E-mail: anastasia@malek.com.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5334-7292>

SPIN: 6445-3432, AuthorID: 129474

ResearcherID: R-8804-2016

Scopus Author ID: 35741075000

Соблюдение этических стандартов: в работе соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, ред. 2013). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России (выписка 27/27 из протокола заседания № 1 от 28.01.2021 г.). Информированное согласие получено от всех участников исследования.

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства Здравоохранения Российской Федерации «Разработка и клиническая апробация методов диагностики и прогнозирования эффекта терапии онкологических заболеваний на основе анализа микроРНК в биопсийном материале» (№ 121032300206-4) 2021–2023 гг. и в рамках проекта по соглашению № 075-15-2021-709, уникальный (идентификатор проекта RF-2296.61321X0037), финансируемого Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Статья поступила в редакцию 24.01.2023; одобрена после рецензирования 05.07.2023; принята к публикации 14.09.2023.

© Князева М. С., Шестопалова Т. М., Забегина Л. М., Шалаев А. В., Ратникова А. К., Кащенко В. А., Воробьев С. Л., Малек А. В., 2023

PROSPECTS OF DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF FOCAL LESION OF PANCREAS BY THE MICRORNA ASSESSMENT

M. S. Kniazeva¹, T. M. Shestopalova², L. M. Zabegina¹, A. V. Shalaev¹, A. K. Ratnikova³, V. A. Kashchenko³,
S. L. Vorobyev², A. V. Malek¹✉

1. N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St. Petersburg, Russian Federation

2. National Center for Clinical Morphological Diagnostics, St. Petersburg, Russian Federation

3. North-Western District Scientific and Clinical Center named after L. G. Sokolov, St. Petersburg, Russian Federation

✉ anastasia@malek.com.ru

ABSTRACT

Purpose of the study. Identification of potential miRNA markers in material of focal pancreatic lesions.

Materials and methods. Samples of focal pancreatic lesions after histological evaluation were enrolled in the study including chronic pancreatitis (ChP) ($n = 23$), low-grade pancreatic intraepithelial neoplasia /PanIN-1/2 ($n = 19$), high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia /PanIN-3 ($n = 8$), and invasive pancreatic ductal adenocarcinoma PDAC ($n = 26$). Workflow of research included the profiling of cancer-associated miRNA in pooled samples, the selection of potential marker miRNAs, the assessment of selected miRNAs expression in total collection of specimens, the identification of differentially expressed miRNAs, and the approbation of new algorithm of data interpretation via ratio of "reciprocal miRNA pair". Consequent reactions of revers transcription and quantitative real-time PCR were used.

Results. The expression levels of miR-216a and miR-217 were decreased in the following order: PanIN-1/2 > PanIN-3 > PDAC. Moreover, miR-375 was up-regulated while miR-143 was down-regulated in the PDAC. Differential diagnostics of PDAC versus focal chronic pancreatitis might be performed with high accuracy ($AUC > 0.95$) by assessment panel of four molecules: miR-216a, miR-217, miR-1246 and Let-7a.

Conclusion. The assessment of microRNAs in pancreatic lesions is a promising approach for the differential diagnosis of PDAC, but this technology requires further validation with an increase in the number of samples.

Keywords: microRNA, pancreatic cancer, ductal neoplasia, chronic pancreatitis, RT-PCR, diagnostics

For citation: Kniazeva M. S., Shestopalova T. M., Zabegina L. M., Shalaev A. V., Ratnikova A. K., Kashchenko V. A., Vorobyev S. L., Malek A. V. Prospects of differential diagnosis of focal lesion of pancreas by the microRNA assessment. South Russian Journal of Cancer. 2023; 4(3):20-35. <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2023-4-3-3>, <https://elibrary.ru/gugsok>

For correspondence: Anastasia V. Malek – Dr. Sci. (Med.), head of the laboratory of sub-cellular technologies, N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St. Petersburg, Russian Federation.

Address: 68 Leningradskaya str., pos. Pesochnyi, St. Petersburg 197758, Russian Federation

E-mail: anastasia@malek.com.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5334-7292>

SPIN: 6445-3432, AuthorID: 129474

ResearcherID: R-8804-2016

Scopus Author ID: 35741075000

Compliance with ethical standards: the ethical principles presented by the World Medical Association Declaration of Helsinki (1964, ed. 2013) were observed in the work. The study was approved by the local Ethics committee of the N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (extract 27/27 from the protocol of meeting No. 1 dated 01/28/2021). Informed consent was received from all participants of the study.

Funding: the study was supported in frame of the state task of the Russian Federation Ministry of Health "Development and clinical testing of methods for diagnosing and predicting the results of oncological diseases based on the analysis of microRNA in biopsy material" (No.121032300206-4) 2021–2023 and in frame of project RF-2296.61321X0037 (contract No. 075-15-2021-709) supported by Ministry of Science and high education of the Russian Federation.

Conflict of interest: the authors declare that there are no obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

The article was submitted 24.01.2023; approved after reviewing 05.07.2023; accepted for publication 14.09.2023.

ВВЕДЕНИЕ

В структуре онкологической заболеваемости России на рак поджелудочной железы (РПЖ) приходится 3,4 % случаев, по частоте встречаемости эта нозология занимает 11 место. За период с 2010 по 2020 гг. наблюдался рост абсолютного числа впервые установленных диагнозов РПЖ с 7522 до 9275 случаев. В структуре онкологической смертности населения России доля диагнозов РПЖ составила 6,8 %, что соответствовало 5 позиции в списке наиболее «фатальных» диагнозов. Абсолютное число умерших от РПЖ за период 2010-2020 гг. возросло с 7783 до 9625 [1]. Кумулятивная пятилетняя выживаемость пациентов с РПЖ (М/Ж) составляет 22,2 / 33,3 % – при I стадии; 14,9 / 13,7 % – при II; 8,4 / 5,9 % – при III; 3,4 / 3,9 % – при IV стадии впервые поставленного диагноза [2]. Представленные статистические данные подтверждают известный факт низкой «курабельности» РПЖ и указывают на ухудшение эпидемиологической ситуации, наблюдаемое вопреки развитию диагностических и лечебных технологий.

В основе современных диагностических стандартов лежат методы физикального обследования, лабораторные и инструментальные методы исследования, такие как эндосонография (ЭУС), динамическая мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ) брюшной полости [3]. Проведение биопсии с последующим морфологическим исследованием биопсийного материала рекомендовано всем пациентам с подозрением на РПЖ, при этом хирургическое вмешательство в ряде случаев может быть выполнено без морфологического подтверждения; назначение консервативного лечения требует обязательной морфологической верификации. Современные диагностические алгоритмы не решают в полной мере задачу своевременной диагностики РПЖ. Задача внедрения скрининга для определенных групп риска и повышения эффективности диагностики РПЖ представляется актуальной и предполагает различные подходы [4], включая методы предиктивной аналитики [5], инновационные технологии жидкостной биопсии [6; 7], высокотехнологичные методы визуализации патологии. Современные инструменты позволяют сочетать эндо-УЗИ с технологиями контрастирования [8], эластографией, тонкоигольной аспирационной биопсией [9]. Прецизионная тонкоигольная аспирационная биопсия под контролем эндосонографии (ЭУС-ТАБ) постепенно

входит в широкую клиническую практику, открывая перспективы, во-первых, расширения области применения методов морфологического анализа и, во-вторых, разработки новых технологий молекулярной диагностики биопсийного материала.

Основным преимуществом метода ЭУС-ТАБ с последующим изготовлением цитологических мазков и клеточного блока является относительно низкая инвазивность. Отечественными авторами была показана высокая чувствительность (93 %) и специфичность (100 %) комплексного морфологического исследования материала ЭУС-ТАБ при использовании технологии изготовления клеточных блоков, рассчитанных с учетом результатов последующей гистологической диагностики операционного материала [10]. Несмотря на очевидные преимущества, технология и результативность ЭУС-ТАБ сопровождается известными объективными и субъективными трудностями последующей цитологической диагностики. Тонкоигольная пункция позволяет получить микрофрагменты ткани образований железы и клеточную взвесь, результативность анализа которых определяется объемом и топикой аспирата. Сложности так же возникают в оценке пролиферативных процессов протокового эпителия, которые наблюдаются как в участках состоявшейся интраэпителиальной неоплазии (прежде всего PanIN3), так и в участках реактивной гиперплазии, ассоциированной с течением панкреатита; клеточные признаки при этом схожи, и дифференциальная диагностика часто затруднена в связи с малым количеством материала. В отличие от гистологического исследования операционного материала в материале ТАБ сложнее оценивать состояние базальной мембраны, структурность и нежелезистые паттерны органа. В этой связи дополнительные технологии молекулярной диагностики эпителиальных изменений могут повысить информативность комплексного морфологического диагноза.

МикроРНК – короткие регуляторные молекулы, контролирующие стабильность белок-кодирующих РНК и эффективность белкового синтеза. Трансформация эпителия протоков железы отражает многоступенчатый процесс развития протоковой аденокарциномы (доминирующей морфологической формы РПЖ); этот процесс сопровождается изменением профиля экспрессии (или состава) молекул микроРНК. Поэтому, анализ состава микроРНК в биопсийном материале представляется

перспективным методом диагностики очаговых поражений ПЖ, что подтверждается активностью исследований и количеством соответствующих публикаций. Поиск в базе научной литературы PubMed по ключевым словам «pancreatic cancer AND miRNA» выдает более 2,8 тысяч публикаций. Анализ имеющейся научной информации представлен в ряде обзорных статей [11-15], но в клинической практике пока нет примеров диагностических тест-систем на основе анализа микроРНК в материале узловых образований ПЖ.

Цель исследования: на основании анализа экспрессии опухоль-ассоциированных микроРНК выбрать потенциальные микроРНК-маркеры РПЖ, оценить показатели диагностической значимости метода и разработать алгоритм анализа данных ПЦР. Оценить возможность и целесообразность разработки и внедрения в клиническую практику метода дифференциальной диагностики патологических процессов ПЖ на основе анализа микроРНК в материале ЭУС-ТАБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

План исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, выписка 27/27 № 1 от 28.01.2021 г. Всеми пациентами было подписано информированное согласие на участие в исследовании. Перед включением в исследование биологические образцы и клинические данные были деперсонализированы.

В исследовании были включены пациенты, проходившие лечение в ФГБУ СЗОНКЦ им. Л. Г. Соколова и в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России. В соответствии со стандартами оказания медицинской помощи и клиническими рекомендациями (ID:355) всем пациентам были проведены панкреато-дуоденальная резекция или панкреатэктомия. Материал образований ПЖ немедленно помещался в забуференный раствор 10 % формалина в соотношении 1:10 и после 24 часовой фиксации вырезался в кассеты для дальнейшей гистологической проводки и последующей световой микроскопии. На основе гистологического исследования окрашенных гематоксилином эозином препаратов в исследование был включен материал от 47 пациентов. В большинстве случаев анализ препаратов позволил выделить участки тка-

ни с разной морфологической структурой, поэтому для дальнейшего исследования было подготовлено 76 репрезентативных образцов.

Выделение РНК

Из образцов ткани были приготовлены срезы толщиной 3–4 мкм, депарафинизация срезов проводилась путем инкубации в 1 мл минерального масла (MP Biomedicals, США) при 65 °C – 15 мин, затем масло и парафин удалялись с помощью двух отмывок 96 % этанолом. Протеолиз был проведен в 100 мкл раствора протеиназы К, 2 мг/мл (активность: 30 ед. акт. /мг, Альгимед-Техно, Беларусь) при 60 °C – 1 час. Оставшуюся после протеолиза ткань осаждали путем центрифугирования (10 000x g, 4 °C – 10 мин), супернатант (~100 мкл) переносили в чистую пробирку, добавляли 200 мкл буфера (0,8М ацетат натрия; pH 4,0; 0,5 % октановой кислоты) и 100 мкл р-ра гуанидин изотиоцианата (3М), перемешивали, и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Образец переносили на спин-колонку, заполненную сорбентом (BioSilica, Россия), промывали дважды буфером для промывки № 1 (500 мкл; 0,5М гуанидин изотиоцианат; 10М трис-ацетат; pH 6,5; 50 % этанол; 1 % 2-меркаптоэтанол) и дважды буфером для промывки № 2 (500 мкл; 75 % этанол; 0,1М хлорид натрия, 10М трис-гидрохлорид; pH 7,5. РНК с поверхности сорбента элюировали с помощью 50 мкл буфера для элюции (10М NaHCO₃, 10 мМ ЭДТА). Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США).

«Профайлинг» опухоль-ассоциированных микроРНК

С целью выбора потенциально маркерных молекул был проведен анализ экспрессии (профайлинг) 85 микроРНК, ассоциированных с процессом неопластической трансформации. Для этого были сформированы «пулы», представляющие собой смеси РНК образцов сходной морфологии: хронический панкреатит (ChP), интраэпителиальная неоплазия ПЖ (PanIN), инвазивная протоковая аденокарцинома ПЖ (PDAC). Анализ был проведен с помощью набора реагентов, производства компании Exiqon (miScript II RT Kit, miRCURY LNA miRNA Cancer-Focus PCR Panel), который предполагает последовательное проведение реакции полиаденилирования, обратной транскрипции всех молекул РНК с помощью поли-Т праймера, и реакции

количественной ПЦР в реальном времени для 85 молекул микроРНК. Интенсивность амплификации оценивалась с помощью ДНК-интерколирующего реагента SYBR-green. Все реакции были проведены в соответствии с протоколом производителя на амплификаторе CFX96 Touch™ (Bio-Rad, США).

Анализ экспрессии отдельных молекул микроРНК

Анализ экспрессии отдельных молекул микроРНК в материале каждого образца ($n = 76$) был проведен методом ОТ-ПЦР с помощью наборов производства компании «Альгимед-Техно» (Беларусь). Набор для анализа каждой микроРНК предполагал проведение двух-фланговой («two-tailed») микроРНК-специфичной реакции обратной транскрипции с использованием ОТ-праймера, «фланги» которого комплиментарно связывали 3'- и 5'-концы молекулы микроРНК, ориентируясь «навстречу» друг другу. Такая технология праймирования реакции обратной транскрипции обеспечивала ее высокую специфичность [16]. Затем проводилась реакция количественной ПЦР в реальном времени с использованием двух микроРНК-специфичных ПЦР праймеров. Интенсивность амплификации оценивали с помощью флуоресцентно-меченного ПЦР зонда. Все реакции ОТ-ПЦР проводились в соответствии с протоколами производителя, каждый анализ был сделан в трех повторах на амплификаторе CFX96 Touch™ (Bio-Rad, США).

Статистика

Нормализация данных «профайлинга» производилась согласно рекомендациям производителя: результаты анализа каждого образца были нормализованы относительно среднего арифметического значения пороговых циклов (Ct) трех референсных молекул. Перед сравнением результатов анализа отдельных образцов (пулов) была проведена нормализация относительно «меж-планшетных» калибраторов. Молекулы для последующего анализа выбирались путем простого сравнения нормализованных значений Ct.

Нормализация данных анализа отдельных молекул ($n = 24$) в индивидуальных образцах ($n = 76$) была проведена двумя альтернативными способами: относительно среднеарифметического для всех исследований ($24 \times 76 = 1842$) значения порогового цикла (total Ct) и относительно одной из 24 исследуемых молекул, для которой был харак-

терен наиболее стабильный уровень экспрессии в исследуемых образцах. Для выбора оптимального нормализатора, стабильность (или вариабельность) экспрессии анализируемых молекул оценивали с помощью алгоритма NormFinder [17]. Нормализация проводилась по стандартной методике подсчета (формула 1):

$$dCt = 2^{Ct(miRNA) - Ct(нормализатор)}$$

Оценку статистической значимости разницы уровней экспрессии отдельных микроРНК в сравниваемых группах проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Прогностическую значимость каждой молекулы оценивали с помощью ROC-анализа (построения ROC-кривой и вычисления значения AUC). Также был произведен поиск оптимальных соотношений относительных концентраций так называемых «реципрокных пар» молекул микроРНК (молекул с разнонаправленными и ассоциированными с процессом неопластической трансформации изменениями уровней экспрессии). Для автоматизированного решения этой задачи был разработан программный алгоритм. Реципрокные пары формировались как все возможные комбинации 24 тестируемых микроРНК. Общее количество анализируемых пар было определено по формуле 2:

$$P_n^r = \frac{n!}{(n-r)! \times r!}$$

(где P – число уникальных комбинаций, n – общее число молекул (24), r – число молекул в каждой комбинации (2)). Затем для каждой пары был определен параметр соотношения эффективности амплификации (Ratio miR-1/miR-2) по формуле 3:

$$dCt = 2^{Ct(miR-1) - Ct(miR-2)}$$

Оценка диагностической значимости таких параметров производилась аналогично значимости отдельных молекул: с помощью ROC-анализа и вычисления значения AUC.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования, подготовка образцов

В практике анализа материала ЭУС-ТАБ очаговых образований ПЖ клиническое значение имеет дифференциальная диагностика между состоя-

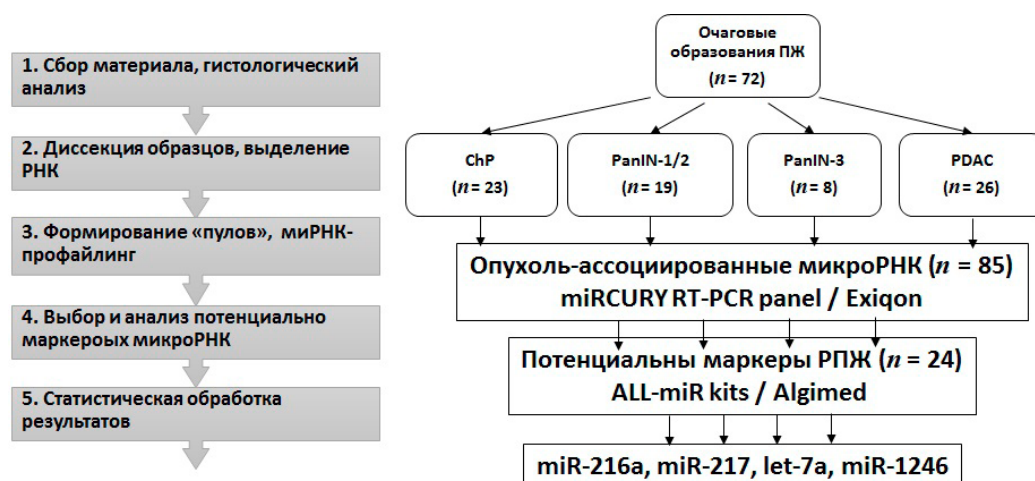


Рис. 1. Дизайн исследования.

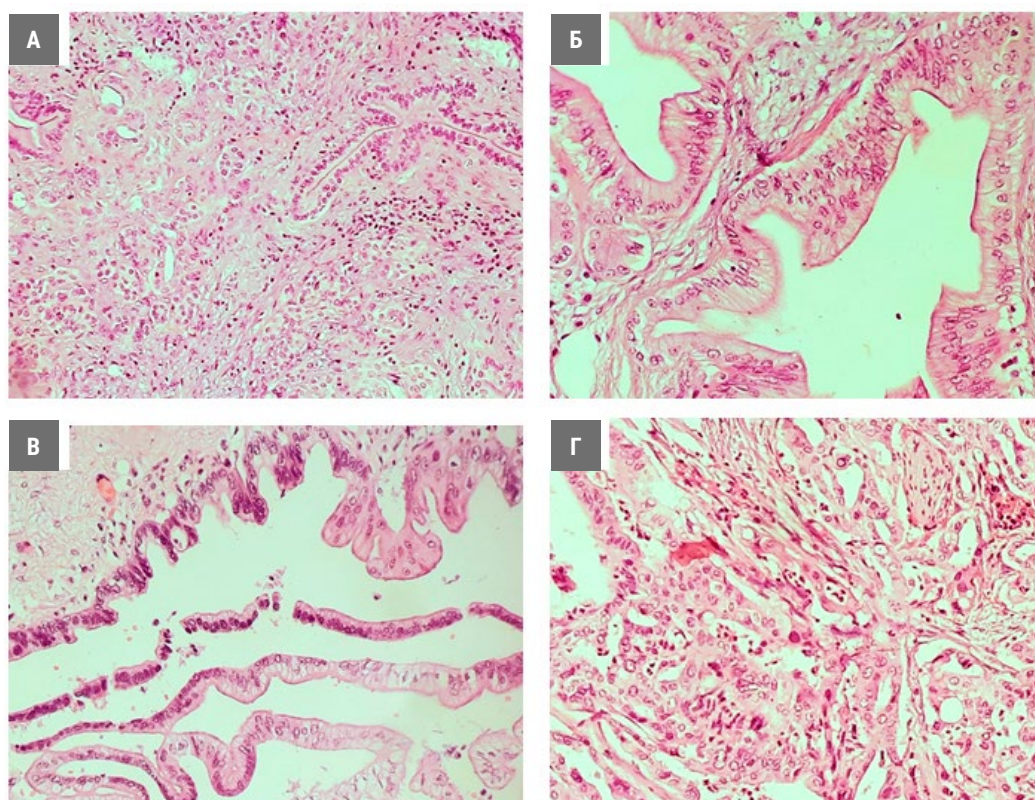


Рис. 2. Репрезентативные примеры участков патологических образований ПЖ.

Примечание: А – фиброзирующий хронический панкреатит (ChP): структура железы с выраженными структурными изменениями, потерей ацинарных клеток, выраженным фиброзом с воспалительной инфильтрацией, сдавленными деформированными протоками и участками пролиферации мелких протоков; Б – интраэпителиальное поражение (PanIN1/2): мелкие протоки поджелудочной железы с выстилкой из однослойного цилиндрического протокового эпителия с преимущественно базально расположенными ядрами (PanIN1), а также участками с признаками псевдостратификации – ядрами, располагающимися на разном уровне (PanIN2); В – интраэпителиальное поражение (PanIN3): крупный проток поджелудочной железы, выстланный преимущественно клетками с клеточной и ядерной атипией, высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, гиперхромией ядер, неровными ядерными контурами, потерей полярности ядер, фигурами митозов, частью по типу foamy-gland pattern (пенистые клетки), частично со слизееобразованием и онкоцитарной дифференцировкой. Атипичные клетки располагаются в пределах базальной мембраны; Г – инвазивная протоковая аденокарцинома (PDAC) с распространенной периневральной инвазией. Окраска во всех случаях гематоксилином-эозином.

ниями, имеющими сходную клиническую и сонографическую картины: хронический панкреатит (Chronic pancreatitis, ChP), интраэпителиальные поражения разной степени злокачественности (Pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN), и инвазивная протоковая аденокарцинома (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC). С учетом задачи поиска

маркеров дифференциальной диагностики перечисленных состояний, план исследования предполагал последовательное выполнение следующих этапов: 1) гистологический анализ патологии ПЖ (операционный материал), 2) выбор и микродиссекция участков с соответствующей морфологической картиной, выделение РНК, 3) формирование «пу-

Таблица 1. «Профиль» экспрессии 18 потенциально маркерных молекул микроРНК в неизменной ткани ПЖ и клетках очаговых образований различной морфологии

№	МикроРНК	Относительный уровень экспрессии в патологических образцах (miRNA Cancer-Focus PCR Panel)			Относительный уровень экспрессии в клетках неизменной ткани поджелудочной железы (miRNATissueAtlas2)
		ChP	PanIN1/2/3	PDAC	
1	hsa-let-7a-5p	9,13	14,41	7,80	512,4
2	hsa-miR-10b-5p	0,50	0,40	0,60	111,5
3	hsa-miR-15a-5p	0,80	1,29	0,82	143,6
4	hsa-miR-23a-3p	6,96	4,43	5,21	462,7
5	hsa-miR-24-3p	10,03	7,67	8,31	177,2
6	hsa-miR-26b-5p	2,22	2,73	1,70	415,5
7	hsa-miR-27a-3p	10,25	9,31	7,08	229,1
8	hsa-miR-29c-3p	2,21	5,91	2,86	1298,3
9	hsa-miR-125b-5p	32,56	17,24	17,46	426,3
10	hsa-miR-126-3p	13,02	7,50	5,39	532,6
11	hsa-miR-141-3p	2,99	10,13	3,02	82
12	hsa-miR-143-3p	3,20	3,92	6,22	94,6
13	hsa-miR-145-5p	23,79	12,19	23,60	509,2
14	hsa-miR-146b-5p	0,51	0,80	0,61	82,1
15	hsa-miR-155-5p	0,32	0,39	0,28	74,7
16	hsa-miR-192-5p	1,38	4,25	4,08	24,6
17	hsa-miR-200a-3p	0,38	1,01	0,90	22,8
18	hsa-miR-200c-3p	7,56	10,96	5,16	17,4

Таблица 2. Перечень молекул дополнительно включенных в исследование

№	МикроРНК	Относительный уровень экспрессии в клетках неизменной ткани поджелудочной железы (miRNATissueAtlas2)	Источник литературы
1	hsa-miR-375-3p	20,4	[19]
2	hsa-miR-451a-5p	4650,4	[13]
3	hsa-miR-1246	3416,7	[20]
4	hsa-miR-1290	886,3	[21]
5	hsa-miR-216a-5p	42,3	[22]
6	hsa-miR-217-5p	20,1	[23]

лов» РНК из образцов с характерной морфологией и анализ 85 опухоль-ассоциированных микроРНК («профайлинг»), 4) выбор и анализ потенциально маркерных молекул микроРНК, 5) статистическая обработка результатов. Дизайн исследования схематично представлен на рисунке 1.

Препараты ChP при отборе на площади всего среза не содержали ткани опухоли, морфологическая картина варьировала от слабой воспалительной инфильтрации с умеренным фиброзом (как внутريدольковым, так и перидуктальным) до выраженной воспалительной реакции с участками фиброзирующего Ch P. В группу PanIN1/2 были включены образцы внутрипротоковых папиллярных муцинозных неоплазий (Intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN) и муцинозных кистозных опухолей (Mucinous cystic neoplasm, MCN) с низкой степенью дисплазии. Препараты этой группы могли включать в себя небольшие фрагменты неизменной ткани ПЖ. Группа PanIN3 включала образцы дисплазии тяжелой степени, включая случаи IPMN и MCN, исключалось наличие участков PDAC. Группа PDAC была представлена типичными гистотипами и двумя случаями муцинозной цистаденокарциномы с умеренной или низкой степенью дифференцировки. Данная категория содержала в срезах небольшие участки сочетания с PanIN3.

В ходе световой микроскопии были выделены зоны с соответствующей морфологической картиной, проведена микродиссекция выбранных участков ткани для последующего выделения РНК. В ряде случаев из одного образца был получен

материал для разных групп. В итоге в исследование были включены следующие образцы: ChP ($n = 23$), PanIN1/2 ($n = 19$), PanIN3 ($n = 8$), PDAC ($n = 26$). Репрезентативные примеры участков с характерной морфологической картиной, выбранных для исследования, представлены на рисунке 2.

Выбор потенциально «маркерных» микроРНК

Тотальная РНК была выделена из всех образцов. Наблюдался большой разброс концентраций РНК (0,5-350 нг/мкл), что могло быть следствием неоднородности ткани и/или разной степени сохранности внутриклеточных РНК в разных участках. РНК, выделенные из гистологически сходных образцов, были объединены в равных массовых долях в так называемые «пулы» для предварительного анализа профиля экспрессии потенциально маркерных молекул. Такой подход позволяет провести сравнительный анализ групп образцов максимально экономично, но без возможности оценки статистической значимости полученных результатов. Проведенный анализ позволил оценить разницу между тремя состояниями: хроническим панкреатитом (ChP), интраэпителиальной неоплазией любой степени (PanIN1/2/3) и инвазивной протоковой аденокарциномой ПЖ (PDAC). Молекулы микроРНК с относительно высоким и существенно отличающимся уровнем экспрессии в трех группах были выбраны для последующего анализа. Дополнительным критерием отбора служила информация о детектируемой ранее экспрессии

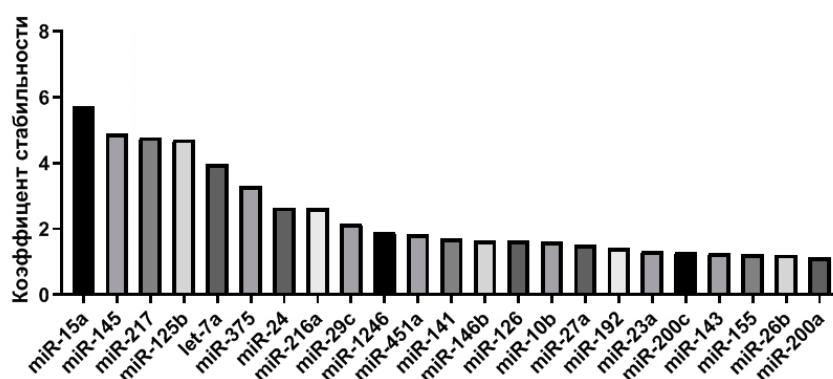


Рис. 3. Результаты оценки экспрессионной вариабельности молекул микроРНК (n.23) в анализируемых образцах (n.76) с помощью алгоритма NormFinder.

Примечание: алгоритм NormFinder [17] позволяет ранжировать анализируемые молекулы в соответствии с уровнем стабильности / вариабельности их экспрессии в группе исследуемых образцов. Коэффициент стабильности = 1 соответствует молекуле, уровень экспрессии которой идентичен во всех образцах, такие молекулы могут быть использованы в качестве нормализаторов. В рамках проведенного эксперимента максимально стабильный уровень экспрессии был показан для miR-200a.

этих молекул в клетках ПЖ, представленная в базе данных «miRNATissueAtlas2» [18]. Таким образом, были выбраны 18 молекул. В таблице 1 представлены нормализованные показатели экспрессии выбранных молекул в клетках трех вариантов патологических очаговых образований: ChP, panIN1/2/3, PDAC и данные, относительно экспрессии этих молекул в клетках неизменной ткани поджелудочной железы (по данным miRNATissueAtlas2). Следует отметить, что сравнение представленных результатов анализа групп патологических и нормальных образцов не правомерно, т.к. это результаты разных исследований, выполненных разными методами. Но сравнительная оценка разных молекул в рамках определенного исследования может быть информативной. В целом, представленные результаты позволяют утверждать, что выбранные 18 молекул действительно активно экспрессируются в клетках ПЖ, а формирование очаговых образований путем хронической воспалительной реакции или малигнизации, вероятно, ассоциировано с изменением их экспрессионной и функциональной активности.

Анализ проведенных ранее исследований показал, что ряд молекул микроРНК, не включенных в miRCURY LNA miRNA Cancer-Focus PCR Panel, играет важную роль в развитии РПЖ и может иметь диагностический потенциал; они ($n = 6$) были также включены в исследование. Уровень экспрессии этих молекул в неизменной ткани ПЖ по данным «miRNATissueAtlas2» и ссылки на соответствующие исследования представлены в таблице 2. Таким образом, была сформирована «панель» из 24 потенциально маркерных молекул микроРНК.

Анализ потенциально маркерных молекул

Уровень экспрессии каждой из выбранных 24 молекул был оценен с помощью реакции микроРНК-специфичной двух-фланговой ОТ и последующей ПЦР в каждом образце, включенном в исследование. Специфичность ОТ обеспечивалась ОТ-праймером, имеющим два фланга для связывания с молекулой микроРНК. В результате реакции ОТ происходил синтез молекулы комплементарной ДНК, оба фланга которой имели микроРНК-специфичные участки для связывания с ПЦР-праймерами. Возможность

Таблица 3. Результаты сравнительного анализа экспрессии потенциально маркерных микроРНК в образцах очаговых образований РП разной морфологии

МикроРНК	ChP ($n = 23$)	PanIN1/2 ($n = 19$)	PanIN3 ($n = 8$)	PDAC ($n = 26$)	Kruskal-Wallis test
hsa-miR-143-3p	0,1	0,16	0,09	0,04	0,0007 ***
hsa-miR-217-5p	0,87	0,42	0,28	0,07	0,001 ***
hsa-miR-216a-5p	1,48	0,84	0,83	0,38	0,0032 **
hsa-miR-375-3p	0,2	0,32	0,13	0,48	0,0137 *
hsa-miR-200c-3p	0,18	0,23	0,24	0,10	0,0259 *
hsa-miR-1246	0,07	0,09	0,09	0,03	0,0336 *
hsa-miR-155-5p	0,4	0,38	0,31	0,22	0,1098
hsa-miR-146b-5p	1,4	2,56	2,5	0,84	0,1131
hsa-miR-26b-5p	0,42	0,23	0,58	0,22	0,1485
hsa-miR-192-5p	0,5	0,38	0,19	0,29	0,1538
hsa-miR-125b-5p	0,09	0,17	0,34	0,20	0,2127
hsa-miR-451a-5p	0,11	0,12	0,04	0,52	0,2323
hsa-miR-29c-3p	0,84	5,97	17,65	0,62	0,2599
hsa-miR-24-3p	0,09	0,1	0,12	0,09	0,3167
hsa-let-7a-5p	0,34	0,31	0,27	0,24	0,3674
hsa-miR-126-3p	0,96	1,05	0,66	1,00	0,4304
hsa-miR-10b-5p	51,04	70,6	50,47	74,01	0,4911

оценки уровней экспрессии микроРНК и высокая специфичность данного подхода были показаны ранее [24]. По результатам проведенного анализа молекула miR-1290 была исключена из последующих этапов исследования, так как уровень ее экспрессии в большинстве образцов оказался ниже предела чувствительности используемого метода.

С целью определения оптимального нормализатора данных ОТ-ПЦР, была проведена оценка вариабельности экспрессии каждой из 23 молекул с помощью алгоритма NormFinder, результаты представлены на рисунке 3.

Наиболее стабильный уровень экспрессии (stability value $\rightarrow$ 1) был показан для микроРНК-200a, которая в дальнейшем была использована в качестве нормализатора. Альтернативный метод нор-

мализации предполагает вычисление среднего арифметического значения пороговых циклов (total Ct), полученных в рамках исследования (76 образцов $\times$ 24 молекулы = 1824), и нормализации всех результатов относительно этого значения [25]. Результаты ОТ-ПЦР были нормализованы двумя методами: относительно значения total Ct и относительно Ct (миР-200a) для каждого индивидуального образца. Нормализованные значения были объединены в группы (ChP, PanIN1/2, PanIN3, PDAC), что позволило оценить разницу экспрессии отдельных молекул в исследуемых группах. Для ряда молекул наблюдались противоречия между результатами, полученными с помощью разных методов нормализации. Такие молекулы были исключены из последующего анализа. В расчет принимались только

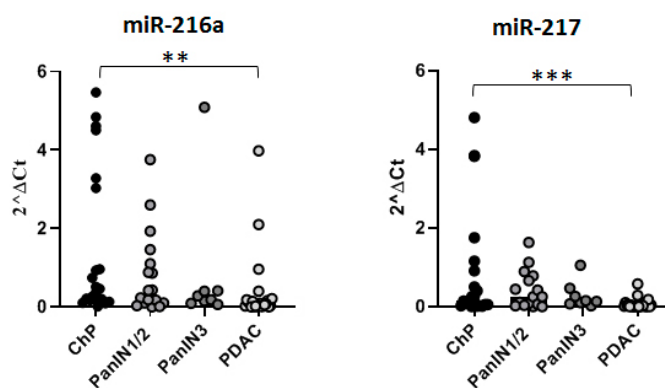


Рис. 4. Сравнительный анализ уровня экспрессии miR-216a и miR-217 в ткани образцов очаговых образований поджелудочной железы различной гистологической структуры.
 Примечание: группы образцов хронического панкреатита / ChP ($n = 23$), внутри-эпителиальная неоплазия легкой / PanIN-1/2 ($n = 19$), и тяжелой степени / PanIN-3 ($n = 8$), протоковая карцинома / PDAC ($n = 26$). Оценка статистической значимости наблюдаемой разницы проведена путем расчета критерия Краскела-Уоллиса (** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$)

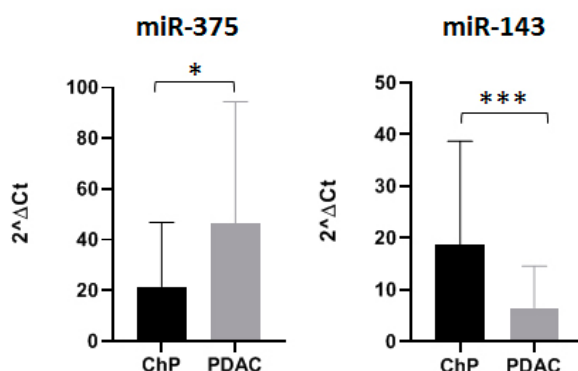


Рис. 5. Сравнительный анализ уровня экспрессии miR-375 и miR-143 в ткани очагов хронического панкреатита и РПЖ.
 Примечание: график представляет средние арифметические значения для группы образцов хронического панкреатита / ChP ($n = 23$) и протоковой карциномы / PDAC ($n = 26$). Оценка статистической значимости наблюдаемой разницы проведена путем расчета критерия Манн-Уитней (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$)

те результаты, которые были сходными при различных методиках нормализации, т.е. минимально зависели от них; таких молекул было 17 из 23.

Следующим этапом была проведена оценка статистической значимости разницы уровней экспрессии отдельных микроРНК между клиническими группами. Результаты представлены в таблице 3.

Для ряда молекул наблюдалась статистически значимое изменение экспрессионной активности в ряду PanIN-1/2 – PanIN-3 – PDAC. Например, повышение степени тяжести дисплазии протокового эпителия сопровождалось снижением уровня экспрессии miR-216a и miR-217 (рис. 4).

Полученные результаты позволяют предполагать, что низкая экспрессия этих молекул в мате-

риале ЭУС-ТАБ очагового поражения ПЖ может быть маркером его злокачественной природы. Статистически значимая разница между исследуемыми группами была получена еще для ряда молекул: miR-143, miR-375, miR-200c и miR-1246.

Интересно, что при сравнении групп образцов ChP и PDAC, без учета данных, полученных для образцов интраэпителиальных поражения разной степени злокачественности (PanIN1/2/3), наблюдалось повышение уровня экспрессии miR-375 и снижение уровня экспрессии miR-143, ассоциированные с процессом хронического воспаления (рис. 5).

С целью оценки перспектив использования анализа отдельных потенциально маркерных микроРНК именно в рамках данной диагностиче-

Таблица 4. Показатели эффективности дифференциальной диагностики хронического панкреатита и РПЖ путем анализа отдельных молекул микроРНК

МикроРНК	AUC	Чувс.	Спец.	ППЗ, %	НПЗ, %	Точность, %
hsa-miR-143-3p	0,75	70,59	82,61	79,17	75,00	77,50
hsa-miR-216a-5p	0,81	76,19	78,26	78,26	76,19	77,27
hsa-miR-217-5p	0,81	76,19	78,26	78,26	76,19	77,27
hsa-miR-375-3p	0,78	71,43	71,43	71,43	71,43	71,43

Таблица 5. Показатели эффективности дифференциальной диагностики хронического панкреатита (ChP) и РПЖ (PDAC) на основе оценки концентрационных соотношений «реципрокных пар» микроРНК

Пара микроРНК	AUC	Чувс.	Спец.	ППЗ, %	НПЗ, %	Точность, %
miR-1246/miR-217	0,95	95,24	82,61	95,00	83,33	88,64
miR-1246/miR-216a	0,95	90,00	91,30	91,30	90,00	90,70
miR-1246/miR-375	0,81	85,00	73,91	85,00	73,91	79,07
miR-143/miR-216a	0,83	81,25	82,61	86,36	76,47	82,05
let-7a/miR-216a	0,97	94,44	94,74	94,74	94,44	94,59
miR-155/miR-217	0,93	88,89	90,48	90,48	88,89	89,74
let-7a/miR-217	0,96	88,24	100,00	90,48	100,00	94,44
miR-155/miR-216a	0,91	83,33	90,48	86,36	88,24	87,18
miR-192/miR-216a	0,93	83,33	100,00	87,50	100,00	92,31
miR-192/miR-217	0,91	80,95	95,24	83,33	94,44	88,10
miR-143/miR-217	0,85	68,75	95,65	81,48	91,67	84,62
miR-200c/miR-216a	0,88	80,95	78,26	81,82	77,27	79,55
miR-200c/miR-217	0,88	75,00	78,26	78,26	75,00	76,74
miR-451a/miR-216a	0,81	80,00	78,26	81,82	76,19	79,07
miR-451a/miR-217	0,82	85,71	73,91	85,00	75,00	79,55

ской дилеммы, для молекул с максимальной разницей уровня экспрессии между сравниваемыми группами (miR-143, miR-217, miR-216a, miR-375) был проведен ROC анализ и подсчет стандартных параметров диагностической значимости. Результаты, представленные в таблице 4 и на рисунке 6, указывают на высокий диагностический потенциал этих маркеров.

Алгоритм дифференциальной диагностики

Нормализация результатов ОТ-ПЦР анализа микроРНК и клинически применимая интерпретация результатов такого анализа является нетривиальной задачей. Одним из подходов к ее решению представляется поиск молекул с реципрокным (разнонаправленным) характером опухоль-ассоциированных экспрессионных изменений и оценка соотношения концентраций таких молекул. Эффективность этого подхода была доказана ранее: значения таких экспрессионных соотношений могут иметь более высокий диагностический потенциал, чем показатели оценки экспрессии отдельных молекул [26].

В рамках данной работы был применен разработанный ранее расчетный алгоритм для поиска перспективных «реципрокных пар» микроРНК. Так, этот алгоритм предполагал подбор всех возможных пар молекул микроРНК (по формуле 2), расчет их концентрационных соотношений (по формуле 3) и ROC анализ полученных параметров (miR-1/miR-2

Ratio) в качестве маркеров дифференциальной диагностики ChP vs. PDAC. Таким образом для 276 пар молекул были рассчитаны показатели диагностической значимости, включая AUC, чувствительность, специфичность, позитивное предиктивное значение (positive predictive value, PPV), негативное предиктивное значение (negative predictive value, NPV) и диагностическая точность (accuracy). Представленные в таблице 5 результаты демонстрируют высокий диагностический потенциал многих «реципрокных пар» микроРНК (AUC > 0,8).

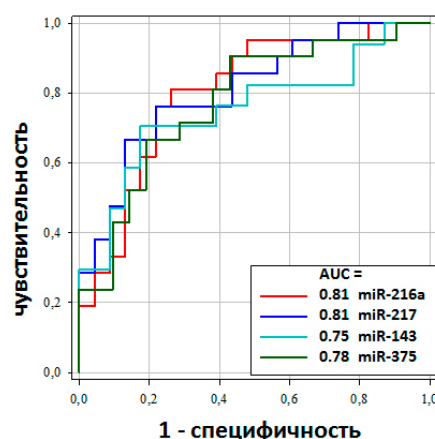


Рис. 6. Оценка диагностической ценности анализа отдельных молекул микроРНК в рамках дифференциальной диагностики хронического панкреатита и РПЖ. Примечание: представлены результаты ROC (Receiver operation curve) анализа и значения площади под кривыми AUC (area under curve) для четырех молекул.

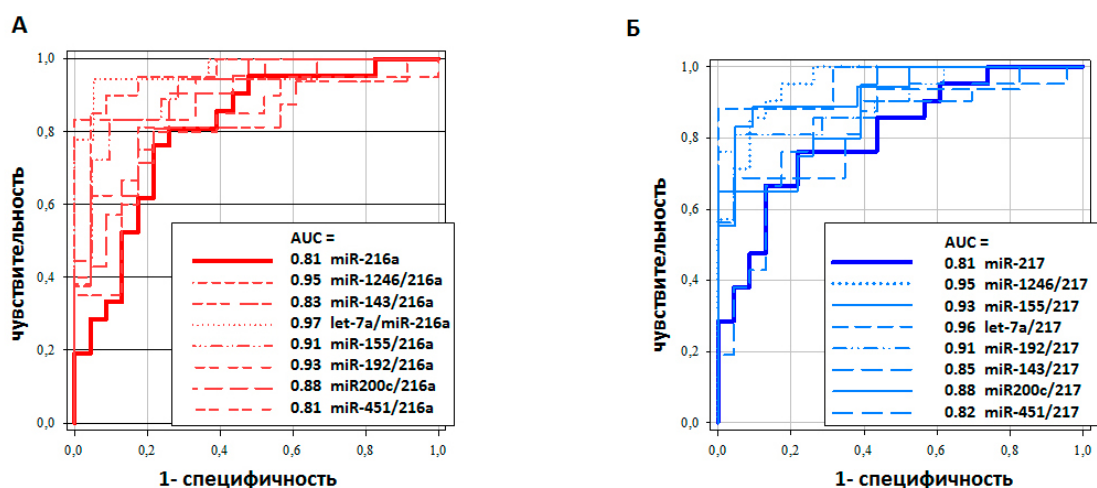


Рис. 7. Оценка диагностической ценности анализа «реципрокных пар» молекул микроРНК в рамках дифференциальной диагностики хронического панкреатита и РПЖ. Примечание: А – результаты оценки диагностического потенциала miR-216a и нескольких «реципрокных пар», формируемых этой молекулой. Б – результаты оценки диагностического потенциала miR-217 и нескольких «реципрокных пар», формируемых этой молекулой. Представлены результаты ROC (Receiver operation curve) анализа и значения площади под кривыми AUC (area under curve).

Из данных таблицы видно, что в состав «реципрокных пар» входят молекулы, имеющие относительно высокий диагностический потенциал в качестве индивидуальных маркеров. Но расчет соотношения концентрации этих молекул относительно концентраций молекул с «реципрокным» характером РПЖ-ассоциированных экспрессионных изменений, позволяет существенно повысить показатели диагностической значимости. На рисунке 7 представлены ROC-кривые, подтверждающие этот вывод для «реципрокных пар», которые формируют молекулы miR-216a и miR-217.

Так, значение AUC для miR-216a равно 0,81, а для соотношений концентрации этой молекулы и miR-192, miR-1246 или let-7a значения AUC повышаются до 0,93, 0,95 и 0,97 соответственно. Аналогично, значение AUC для miR-217 равно 0,81, а для соотношений концентрации этой молекулы и miR-155, miR-1246 или let-7a значения AUC повышаются до 0,93, 0,95 и 0,96, соответственно. В целом, анализ «панели» из четырех молекул, miR-216a, miR-217, miR-1246 или let-7a, обеспечивает возможность расчета четырех параметров для дифференциальной диагностики хронического панкреатита и РПЖ, причем значение AUC этих параметров находится в диапазоне 0,95–0,97, чувствительность – 0,88–0,95, специфичность – 0,82–1.

ОБСУЖДЕНИЕ

В статье представлены результаты пилотного исследования, проведенного с целью оценки перспектив разработки метода дифференциальной диагностики очаговой патологии ПЖ на основе анализа микроРНК в материале биоптатов. В работе были использованы материалы послеоперационного гистологического исследования. Авторы предполагают, что полученные результаты послужат основой для создания инновационного метода молекулярного анализа материала ЭУС-ТАБ, который сможет дополнить и повысить диагностический потенциал стандартного морфологического исследования.

В ходе исследования был проведен анализ экспрессии 85 молекул микроРНК, функция которых ассоциирована с канцерогенезом, в материале 76 образцов, полученных от 47 прооперированных пациентов. Гистологическое исследование позволило сформировать четыре группы образцов, соответствующие диагнозам хронического

панкреатита (ChP), панкреатической интраэпителиальной неоплазии легкой степени (PanIN-1/2), внутри-эпителиальной неоплазии тяжелой степени (PanIN-3) и наиболее распространенной формы РПЖ (инвазивной протоковой аденокарциномы, PDAC). Анализ экспрессии микроРНК позволил выявить статистически значимые отличия уровней экспрессии в клинических группах для ряда молекул: miR-143, -217, -216a, -375, -200c, -1246. Полученные результаты имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

Участие miR-217 [23], -216a [22], -375 [19], -1246 [20] в процессе злокачественной трансформации протокового эпителия поджелудочной железы было показано ранее; эти данные были подтверждены результатами нашей работы. Угнетение экспрессии miR-143 в клетках РПЖ является интересной находкой, которая также находит подтверждение в научной литературе. Так, сравнительный анализ неизменной ткани железы и РПЖ, проведенный китайскими исследователями на материале 37 пациентов, показал аналогичные нашим результаты [27]. Кроме того, эктопическая экспрессия этой молекулы в различных линиях клеток РПЖ (MIA PaCa-2 and PANC-1) имела терапевтический эффект, угнетая пролиферацию и метастатический потенциал клеток [27; 28]. В экспериментах *in vitro* показано, что снижение концентрации / функциональной активности miR-143 в клетках РПЖ ассоциировано с активацией экспрессии ряда онкогенов (ARHGEF1 (GEF1), ARHGEF2 (GEF2), K-RAS), что подтверждает терапевтический потенциал синтетических аналогов этой молекулы.

В рамках нашего исследования статистически значимых изменений экспрессии miR-1246 обнаружено не было, но соотношение концентрации этой молекулы и концентрации miR-216a или miR-217 показало высокий диагностический потенциал. Полученные результаты указывают на возможность активации экспрессии этой молекулы в клетках РПЖ, причем этот процесс ассоциирован с угнетением экспрессии miR-216a или miR-217. Имеет ли эта ассоциация случайный характер или она биологически обоснована пока неизвестно. Анализ научной литературы не формирует однозначного представления об участии miR-1246 в развитии РПЖ. В ряде публикаций показан диагностический потенциал циркулирующий в плазме miR-1246 [6; 29], но какова связь между концентрацией этой молекулы в плазме и ее ролью в клетках РПЖ не ясно. Анализ биогенеза этой молекулы в опухолевых клет-

ках был недавно проведен группой американских исследователей [30]. Было показано, что miR-1246 является продуктом деградации малой ядерной РНК (RNU2-1), которая функционирует в составе ядерного комплекса сплайсосомы. В таком случае miR-1246 является продуктом неканонического пути синтеза микроРНК, а повышение внутриклеточной концентрации и/или секреции этой молекулы клетками РПЖ может не быть связано с ее ролью в процессе пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов-мишеней. В рамках нашего исследования было показано, что экспрессия молекулы let-7a имеет «реципрокный» характер относительно экспрессии miR-216a и miR-217. Биологический смысл этого феномена также пока неизвестен, но он может быть использован в рамках разработки алгоритма клинически приемлемой интерпретации результатов ОТ-ПЦР. В целом, полученные результаты дополняют имеющиеся представления о роли отдельных молекул микроРНК в развитии РПЖ.

Более существенным представляется практическое значение полученных результатов, которые продемонстрировали, во-первых, техническую возможность выделения и анализа микроРНК в биоптатах образований ПЖ с помощью отечественных реагентов, и, во-вторых, диагностический потенциал такого анализа. В плане разработки технологии, пригодной для клинического применения, необходимо приложить дополнительные усилия для (1) разработки метода консервации материала ЭУС-ТАБ и последующего выделения малых РНК и (2) определения оптимального (минимального) набора маркерных микроРНК для включения в диагностическую «панель» для дифференциальной диагностики очагового поражения поджелудочной железы. С целью обеспечения высоких и, главное, стабильных показателей диагностической значимости тест-системы важным аспектом является разработка алгоритма

интерпретации данных ОТ-ПЦР. Решение аналогичной задачи было реализовано нами в рамках создания тест-системы для оценки степени тяжести дисплазии цервикального эпителия [31]. Так, оптимальной представляется следующий аналитический алгоритм: полуколичественный анализ набора молекул микроРНК с разнонаправленными (реципрокными) РПЖ-ассоциированным экспрессионными изменениями, расчет концентрационных соотношений «реципрокных пар» молекул микроРНК, определение значимости каждого такого параметра с помощью алгоритма машинного обучения и вычисление итогового диагностического критерия, отражающего вероятность злокачественной природы образований железы. После оценки диагностических показателей на большой коллекции биопсийного материала разработанная тест-система может быть зарегистрирована в качестве изделия медицинского назначения и предложена для практического использования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках исследования удалось выявить несколько потенциально маркерных молекул микроРНК и показать, что оценка их экспрессии в материале очаговых образований ПЖ с целью дифференциальной диагностики протоковой карциномы имеет потенциал практического применения.

Разработка надежной и удобной для клинического применения диагностической технологии потребует продолжения исследований по двум основным направлениям: (1) расширение панели маркерных молекул и разработка алгоритма их комплексного анализа и (2) валидация диагностического потенциала новой технологии с использованием большей коллекции биологических образцов и разработка подходов клинически удобной и эффективной интерпретации результатов ОТ-ПЦР.

Список источников

1. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021, 252 с. Доступно по: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2021/11/zis-2020-elektronnaya-versiya.pdf>, Дата обращения: 20.06.2023.
2. Мерабишвили М. В. Выживаемость онкологических больных. Выпуск второй. Выпуск 2, ч.1; Санкт-Петербург, 2011, 329 с.
3. Каприн А. Д. Клинические рекомендации. Рак поджелудочной железы. Научный совет Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 2019, 67 с. Доступно по: https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak_podzheludochnoj_zhelezy.pdf, Дата обращения: 20.06.2023.

4. Yang J, Xu R, Wang C, Qiu J, Ren B, You L. Early screening and diagnosis strategies of pancreatic cancer: a comprehensive review. *Cancer Commun (Lond)*. 2021 Dec;41(12):1257–1274. <https://doi.org/10.1002/cac2.12204>
5. Sharma A, Kandlakunta H, Nagpal SJS, Feng Z, Hoos W, Petersen GM, et al. Model to Determine Risk of Pancreatic Cancer in Patients With New-Onset Diabetes. *Gastroenterology*. 2018 Sep;155(3):730–739.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.05.023>
6. Madhavan B, Yue S, Galli U, Rana S, Gross W, Müller M, et al. Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *Int J Cancer*. 2015 Jun 1;136(11):2616–2627. <https://doi.org/10.1002/ijc.29324>
7. Michálková L, Horník Š, Sýkora J, Habartová L, Setnička V. Diagnosis of pancreatic cancer via 1H NMR metabolomics of human plasma. *Analyst*. 2018 Dec 3;143(24):5974–5978. <https://doi.org/10.1039/c8an01310a>
8. Bunganič B, Laclav M, Dvořáková T, Bradáč O, Traboulsi E, Suchánek Š, et al. Accuracy of EUS and CEH EUS for the diagnosis of pancreatic tumours. *Scand J Gastroenterol*. 2018;53(10–11):1411–1417. <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1524023>
9. Facciorusso A, Martina M, Buccino RV, Nacchiero MC, Muscatiello N. Diagnostic accuracy of fine-needle aspiration of solid pancreatic lesions guided by endoscopic ultrasound elastography. *Ann Gastroenterol*. 2018;31(4):513–518. <https://doi.org/10.20524/aog.2018.0271>
10. Михетько А. А., Артемьева А. С., Ивко О. В., Ткаченко О. Б., Гринкевич М. В., Сидорова А. Н. и др. Эндоскопическая эндосонография с тонкоигольной аспирационной биопсией в диагностике опухолей поджелудочной железы. *Вопросы онкологии*. 2021;67(3):397–404. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2021-67-3-397-404>
11. Daoud, A.Z.; Mulholland, E.J.; Cole, G.; McCarthy, H.O. MicroRNAs in Pancreatic Cancer: biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators. *BMC Cancer* 2019, 19, 1130. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6284-y>.
12. Ariston Gabriel AN, Wang F, Jiao Q, Yvette U, Yang X, Al-Ameri SA, et al. The involvement of exosomes in the diagnosis and treatment of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2020 Aug 27;19(1):132. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01245-y>
13. Fathi M, Ghafouri-Fard S, Abak A, Taheri M. Emerging roles of miRNAs in the development of pancreatic cancer. *Biomed Pharmacother*. 2021 Sep;141:111914. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111914>
14. O'Neill RS, Stoita A. Biomarkers in the diagnosis of pancreatic cancer: Are we closer to finding the golden ticket? *World J Gastroenterol*. 2021 Jul 14;27(26):4045–4087. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i26.4045>
15. Sohrabi E, Rezaie E, Heiat M, Sefidi-Heris Y. An Integrated Data Analysis of mRNA, miRNA and Signaling Pathways in Pancreatic Cancer. *Biochem Genet*. 2021 Oct;59(5):1326–1358. <https://doi.org/10.1007/s10528-021-10062-x>
16. Androvic P, Valihrach L, Elling J, Sjoback R, Kubista M. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res*. 2017 Sep 6;45(15):e144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx588>
17. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004 Aug 1;64(15):5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
18. Keller A, Gröger T, Tschernig T, Solomon J, Laham O, Schaum N, et al. miRNATissueAtlas2: an update to the human miRNA tissue atlas. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jan 7;50(D1):D211–D221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab808>
19. Yonemori K, Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. MicroRNA in pancreatic cancer. *J Hum Genet*. 2017 Jan;62(1):33–40. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.59>
20. Hasegawa S, Eguchi H, Nagano H, Konno M, Tomimaru Y, Wada H, et al. MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2014 Oct 14;111(8):1572–1580. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.454>
21. Ta N, Huang X, Zheng K, Zhang Y, Gao Y, Deng L, et al. miRNA-1290 Promotes Aggressiveness in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Targeting IKK1. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(2):711–728. <https://doi.org/10.1159/000495328>
22. Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnouj A, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2007 Jun 28;26(30):4442–4452. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210228>
23. Hong TH, Park IY. MicroRNA expression profiling of diagnostic needle aspirates from surgical pancreatic cancer specimens. *Ann Surg Treat Res*. 2014 Dec;87(6):290–297. <https://doi.org/10.4174/astr.2014.87.6.290>
24. Korobkina EA, Knyazeva MS, Kil YV, Titov SE, Malek AV. Comparative analysis of RT-qPCR based methodologies for microRNA detection. *Klin Lab Diagn*. 2018;63(11):722–728. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-722-728>

25. Marabita F, de Candia P, Torri A, Tegnér J, Abrignani S, Rossi RL. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform.* 2016 Mar;17(2):204–212. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv056>
26. Knyazeva M, Korobkina E, Karizky A, Sorokin M, Buzdin A, Vorobyev S, et al. Reciprocal Dysregulation of MiR-146b and MiR-451 Contributes in Malignant Phenotype of Follicular Thyroid Tumor. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 19;21(17):5950. <https://doi.org/10.3390/ijms21175950>
27. Xie F, Li C, Zhang X, Peng W, Wen T. MiR-143-3p suppresses tumorigenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS. *Biomed Pharmacother.* 2019 Nov;119:109424. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109424>
28. Hu Y, Ou Y, Wu K, Chen Y, Sun W. MiR-143 inhibits the metastasis of pancreatic cancer and an associated signaling pathway. *Tumour Biol.* 2012 Dec;33(6):1863–1870. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0446-8>
29. Wei J, Yang L, Wu YN, Xu J. Serum miR-1290 and miR-1246 as Potential Diagnostic Biomarkers of Human Pancreatic Cancer. *J Cancer.* 2020;11(6):1325–1333. <https://doi.org/10.7150/jca.38048>
30. Xu YF, Hannafon BN, Khatri U, Gin A, Ding WQ. The origin of exosomal miR-1246 in human cancer cells. *RNA Biol.* 2019 Jun;16(6):770–784. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1585738>
31. Князева М. С., Забегина Л. М., Конева О. М., Лютынский В. В., Смирнова О. А., Жамойдик В. И. и др. Оценка степени тяжести цервикальной дисплазии путем анализа микроРНК в материале цервикального мазка. *Онкогинекология.* 2022;(3(43)):57–68. https://doi.org/10.52313/22278710_2022_3_57, EDN: NCDHZF

Информация об авторах:

Князева Маргарита Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории субклеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2079-5061>, SPIN: 1435-9601, AuthorID: 1170597, Scopus Author ID: 57201116352

Шестопалова Татьяна Михайловна – врач-патологоанатом, врач клинической лабораторной диагностики, ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-6273>, SPIN: 7579-0951, AuthorID: 1183632

Забегина Лидия Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории субклеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0827-1641>, SPIN: 9886-7610, AuthorID: 1108887, Scopus Author ID: 57218621246

Шалаев Андрей Владимирович – младший научный сотрудник лаборатории субклеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-6994>, SPIN: 9971-1945, AuthorID: 1165260, Scopus Author ID: 57211294093

Ратникова Анна Константиновна – к.м.н., врач-кардиолог высшей категории, младший научный сотрудник, ФГБУ «СЗОНКЦ им. Л. Г. Соколова ФМБА России», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3279-6448>, SPIN: 4086-7164, AuthorID: 1076748

Кащенко Виктор Анатольевич – д.м.н., профессор, заместитель генерального директора по научно-образовательной работе, ФГБУ «СЗОНКЦ им. Л. Г. Соколова ФМБА России» г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4958-5850>, SPIN: 9814-3956, AuthorID: 340730, ResearcherID: K-8778-2015, Scopus Author ID: 7003374162

Воробьев Сергей Леонидович – к.м.н., директор, врач-патологоанатом, ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7817-9069>, SPIN: 5920-0603, AuthorID: 934523

Малек Анастасия Валерьевна ✉ – д.м.н., заведующая лабораторией субклеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5334-7292>, SPIN: 6445-3432, AuthorID: 129474, ResearcherID: R-8804-2016, Scopus Author ID: 35741075000

Участие авторов:

Князева М. С. – разработка методов анализа, проведение лабораторного этапа работы, включая выделение РНК, ОТ-ПЦР, анализ результатов, работа над текстом, подготовка иллюстраций;

Шестопалова Т. М. – гистологическая диагностика, выбор и подготовка материала, микродиссекция, подготовка микрофотографий;

Забегина Л. М. – разработка и реализация алгоритма расчета соотношения концентраций «реципрокных пар» микроРНК, участие в лабораторных этапах работы, анализ результатов;

Шалаев А. В. – участие в лабораторных этапах работы, включая выделение РНК, ОТ-ПЦР, анализ результатов, подготовка иллюстраций;

Ратникова А. К. – участие в клинических этапах работы, включая подбор пациентов и сбор клинических данных;

Кащенко В. А. – концепция исследования, организация клинических этапов работы, включая подбор пациентов и сбор клинических данных;

Воробьев С. Л. – концепция исследования, организация лабораторной части работы, включая подготовку и проведение гистологических исследований, научное редактирование текста;

Малек А. В. – концепция исследования, организация лабораторной части исследования, включая выделение и анализа микроРНК, анализ результатов ОТ-ПЦР, итоговые выводы, подготовка иллюстраций, написание исходного текста.