

Транскриптомный профиль мочи при злокачественных новообразованиях яичника

Д. С. Кутилин^{1✉}, Ф. Е. Филиппов², Н. В. Порханова², А. Ю. Максимов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

² ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Российская Федерация

✉ k.denees@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Биоинформатический поиск транскриптомных маркеров (на основании метаболомных данных) и их валидация в моче больных серозной аденокарциномой яичников.

Материалы и методы. В исследование было включено 70 пациенток с диагнозом серозная аденокарцинома яичников и 30 условно здоровых индивидуумов. Поиск генов-регуляторов метаболитов и микроРНК регуляторов генов осуществляли с использованием метода машинного обучения Random forest. Выделение рибонуклеиновой кислоты (РНК) производили с помощью набора RNeasy Plus Universal Kits. Уровень транскриптов микроРНК в моче определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Оценку различий проводили с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони.

Результаты. С использованием метода Random forest были установлены взаимосвязи метаболит-ген регулятор (47 генов) и метаболит-микроРНК регулятор (613 уникальных микроРНК). Выявленные микроРНК были валидированы методом ПЦР в режиме реального времени. Обнаружено изменения уровня транскриптов микроРНК miR-382-5p, miR-593-3p, miR-29a-5p, miR-2110, miR-30c-5p, miR-181a-5p, let-7b-5p, miR-27a-3p, miR-370-3p, miR-6529-5p, miR-653-5p, miR-4742-5p, miR-2467-3p, miR-1909-5p, miR-6743-5p, miR-875-3p, miR-19a-3p, miR-208a-5p, miR-330-5p, miR-1207-5p, miR-4668-3p, miR-3193, miR-23a-3p, miR-12132, miR-765, miR-181b-5p, miR-4529-3p, miR-33b-5p, miR-17-5p, miR-6866-3p, miR-4753-5p, miR-103a-3p, miR-423-5p, miR-491-5p, miR-196b-5p, miR-6843-3p, miR-423-5p и miR-3184-5p в моче пациенток относительно условно-здоровых индивидуумов.

Заключение. Таким образом, транскриптомное профилирование мочи позволило как выявить потенциальные маркеры заболевания, так и лучше понять молекулярные механизмы изменений, лежащих в основе развития рака яичников.

Ключевые слова: микроРНК, полимеразная цепная реакция, машинное обучение, биоинформатика, серозная аденокарцинома яичника, моча, биомаркеры

Для цитирования: Кутилин Д. С., Филиппов Ф. Е., Порханова Н. В., Максимов А. Ю. Транскриптомный профиль мочи при злокачественных новообразованиях яичника. Южно-Российский онкологический журнал. 2024; 5(3): 76-90. <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2024-5-3-7>, <https://elibrary.ru/zovxqo>

Для корреспонденции: Кутилин Денис Сергеевич – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, д. 63

E-mail: k.denees@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>

SPIN: 8382-4460, AuthorID: 794680

Scopus Author ID: 55328886800

Соблюдение этических стандартов: в работе соблюдались этические принципы, предьявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, ред. 2013). Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (выписка из протокола заседания № 15 от 14.06.2022 г.). Информированное согласие получено от всех участников исследования

Финансирование: финансирование данной работы не проводилось. Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации: <https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>

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

Статья поступила в редакцию 19.07.2024; одобрена после рецензирования 22.08.2024; принята к публикации 27.08.2024

© Кутилин Д. С., Филиппов Ф. Е., Порханова Н. В., Максимов А. Ю., 2024

Urine transcriptomic profile in terms of malignant ovarian tumors

D. S. Kutilin¹✉, F. E. Filippov², N. V. Porkhanova², A. Yu. Maksimov¹

¹ National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

² Clinical Oncology Dispensary No. 1, Krasnodar, Russian Federation

✉ k.denees@yandex.ru

ABSTRACT

Purpose of the study. Bioinformatic search for transcriptomic markers (based on metabolomic data) and their validation in the urine of serous ovarian adenocarcinoma patients.

Materials and methods. The study included 70 patients with serous ovarian adenocarcinoma and 30 conditionally healthy individuals. The search for metabolite regulator genes and gene regulator microRNAs was performed using the Random forest machine learning method. Ribonucleic acid (RNA) was isolated using the RNeasy Plus Universal Kits. The level of microRNA transcripts in urine was determined by real-time PCR. Differences were assessed using the Mann-Whitney test with Bonferroni correction.

Results. Using the Random forest method, metabolite-regulator gene (47 genes) and metabolite-regulator microRNA (613 unique microRNA) relationships were established. The identified microRNAs were validated by real-time PCR. Changes in the levels of microRNA transcripts were detected: miR-382-5p, miR-593-3p, miR-29a-5p, miR-2110, miR-30c-5p, miR-181a-5p, let-7b-5p, miR-27a-3p, miR-370-3p, miR-6529-5p, miR-653-5p, miR-4742-5p, miR-2467-3p, miR-1909-5p, miR-6743-5p, miR-875-3p, miR-19a-3p, miR-208a-5p, miR-330-5p, miR-1207-5p, miR-4668-3p, miR-3193, miR-23a-3p, miR-12132, miR-765, miR-181b-5p, miR-4529-3p, miR-33b-5p, miR-17-5p, miR-6866-3p, miR-4753-5p, miR-103a-3p, miR-423-5p, miR-491-5p, miR-196b-5p, miR-6843-3p, miR-423-5p and miR-3184-5p in the urine of patients compared to conditionally healthy individuals.

Conclusion. Thus, urine transcriptome profiling allowed both to identify potential disease markers and to better understand the molecular mechanisms of changes underlying ovarian cancer development.

Keywords: microRNAs, polymerase chain reaction, machine learning, bioinformatics, ovarian serous adenocarcinoma, urine, biomarkers

For citation: Kutilin D. S., Filippov F. E., Porkhanova N. V., Maksimov A. Yu. Urine transcriptomic profile in terms of malignant ovarian tumors. South Russian Journal of Cancer. 2024; 5(3): 76-90. (In Russ.). <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2024-5-3-7>, <https://elibrary.ru/zovxqo>

For correspondence: Denis S. Kutilin – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Address: 63 14 line str., Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

E-mail: k.denees@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>

SPIN: 8382-4460, AuthorID: 794680

Scopus Author ID: 55328886800

Compliance with ethical standards: the research study is carried out in compliance with the ethical principles set forth by World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, ed. 2013. The study was approved by the Committee on Biomedical Ethics at the National Medical Research Center for Oncology (extract from the minutes of the meeting No. 15 dated 06/14/2022). Informed consent was received from all participants of the study

Funding: this work was not funded. The work was performed with scientific equipment provided by the Central Research Institute of the National Medical Research Center for Oncology: <https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>

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 19.07.2024; approved after reviewing 22.08.2024; accepted for publication 27.08.2024

ВВЕДЕНИЕ

Рак яичников (РЯ) в настоящее время занимает одну из ведущих позиций по показателям заболеваемости и смертности в мире и Российской Федерации среди гинекологических злокачественных новообразований [1, 2]. РЯ включает множество подтипов опухолей, каждый из которых имеет отличительные биологические и клинические характеристики. Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), выделяют серозную карциному, эндометриоидную карциному, муцинозную карциному, светлоклеточную карциному, злокачественную опухоль Бреннера, серозно-муцинозную карциному, недифференцированную карциному и смешанную эпителиальную карциному [3, 4].

У большинства пациенток РЯ имеет спорадический характер, обычно выявляется поздно, а общая 5-летняя выживаемость составляет всего 30–40 %. Раннее обнаружение РЯ является наиболее важным фактором повышения выживаемости пациенток [5, 6]. Необходимы новые методические подходы, в том числе современные подходы молекулярной биологии, для раннего обнаружения и улучшения диагностики данного заболевания. Применение геномики и метаболомики открыли новую главу исследований, которая позволит разработать новые инструменты для ранней диагностики и мониторинга течения онкологических заболеваний. Достижения в метаболомных подходах с использованием жидкостной или газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (МС) высокого разрешения открыли новые перспективы для одновременного обнаружения и идентификации биомаркеров в биологических образцах [7].

Проведенное нами ранее исследование [8] метаболомного профиля мочи методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием показало, что у пациенток с серозной карциномой яичников наблюдается дисбаланс в содержании некоторых жирных кислот и их производных, ацилкарнитинов, фосфолипидов, аминокислот и их производных, а также некоторых производных азотистых оснований. При этом 26 метаболитов с аномальной концентрацией в моче могут иметь определенный потенциал в качестве неинвазивных биомаркеров РЯ у женщин, относящихся к группам высокого риска.

Так было показано, что в моче у пациентов с РЯ 14 метаболитов (кинуренин, фенилаланил-валин, лизофосфатидилхолин (18:3), лизофосфатидилхолин (18:2), аланил-лейцин, лизофосфатидилхолин (20:4), L-фенилаланин, фосфатидилинозитол (34:1), 5-метокситриптофан, 2-гидроксимиристиновая кислота, 3-оксохоловая кислота, лизофосфатидилхолин (14:0), индолакриловая кислота, лизофосфатидилсерин (20:4)) имеют значимо более высокую концентрацию по сравнению с условно здоровыми индивидуумами. Содержание 12 соединений, наоборот, было понижено (L-бета-аспартил-L-фенилаланин, миристиновая кислота, деканоилкарнитин, аспартил-глицин, малонилкарнитин, 3-гидроксибутирилкарнитин, 3-метилксантин, 2,6-диметилгептаноилкарнитин, 3-оксододекановая кислота, N-ацетилпролин, L-октаноилкарнитин, каприлоилглицин) [8].

Определение ряда указанных выше соединений с высокой точностью в образцах мочи – процедура, требующая дорогостоящего оборудования и осуществляемая только в небольшом количестве медицинских учреждений. В этой связи чрезвычайно актуальным является переход к более доступным прогностическим маркерам, например, к транскриптомным данным. В этом плане особый интерес представляет уровень транскриптов микроРНК в моче [9].

МикроРНК – это короткие некодирующие рибонуклеиновые кислоты (РНК), которые регулируют экспрессию генов катализируя разрушение мРНК, либо ингибируя трансляцию мРНК в белок. Зрелая микроРНК представляет собой одноцепочечную РНК размером порядка 22 нуклеотидов, получающуюся из первичного транскрипта. МикроРНК являются транскрипционными регуляторами и модулируют экспрессию генов путем взаимодействия с комплементарными нуклеотидными последовательностями мРНК-мишеней [10]. МикроРНК вносят значительный вклад в инициацию и развитие различных молекулярных событий, включая инициацию онкогенеза, прогрессирование и метастазирование опухолей, что делает микроРНК потенциальными биомаркерами для оценки прогрессирования и прогноза рака [11]. Изучение регуляторной сети микроРНК-мРНК имеет большое значение как для выяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе канцерогенеза, так и создания панели новых биомаркеров.

Цель исследования: биоинформатический поиск транскриптомных маркеров (на основании метаболомных данных) и их валидация в моче больных серозной аденокарциномой яичников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование было включено 70 пациенток с диагнозом РЯ (серозная аденокарцинома низкой ($n = 30$) и высокой степени злокачественности ($n = 30$), T1a – 4, T1b – 3, T1c – 5, T2a – 3, T2b – 5, T3a – 14, T3b – 6, T3c – 30) и 30 условно здоровых добровольцев (без каких-либо известных патологий), составляющих контрольную группу.

В качестве объектов исследования использованы образцы мочи. Перед проведением исследования пациенты дали информированное согласие на научное использование биологических образцов. Мочу собирали до начала лечения.

Оценка экспрессии микроРНК

500 мкл образца мочи смешивали с 900 мкл реагента QIAzol (QIAGEN). Дальнейшее выделение тотальной РНК осуществляли с помощью набора RNeasy Plus Universal Kits согласно протоколу производителя. Для выявления зрелых микроРНК и малой РНК U6 использовали метод, предложенный Balcells I. и соавт. [12]. Выделенную суммарную РНК использовали в реакции обратной транскрипции, которая проводилась одновременно с полиаденилированием РНК, с использованием специфичных RT-праймеров. Далее проводилась детекция полученной комплементарной ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ).

Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров осуществляли с использованием алгоритма Balcells I. [12]. Для каждой микроРНК подбирали несколько комплектов олигонуклеотидов, из которых выбирали те, которые характеризовались наиболее высокой эффективностью обратной транскрипции и ПЦР. Эффективность обратной транскрипции оценивали по значениям пороговых циклов (Ct), полученных при анализе синтетических аналогов микроРНК и мРНК (ЗАО «Биосан», Россия), взятых в известной концентрации. Эффективность амплификации (E) для каждой системы оценивали с помощью построения калибровочной кривой, используя для анализа разведения соответствующих РНК, выделенных из клинических проб согласно описанному выше протоколу (усредненное значение E было равно 2,0). Стабильность экспрессии для подбора референсных генов оценивали с помощью алгоритма geNorm [13]. Первоначальный список предлагаемых нормализаторов

для микроРНК включал: miR-191 (экспрессия этой микроРНК была наиболее стабильной в 13 сравниваемых тканях [14]); miR-23a (в качестве нормализатора, подходящего для анализа образцов шейки матки [15] и U6 (традиционно используется в качестве отдельного эталона для нормализации данных экспрессии микроРНК). С помощью алгоритма geNorm для нормализации данных экспрессии микроРНК был выбран U6.

Для каждой микроРНК отдельно проводили реакцию обратной транскрипции в одном повторе. Для обратной транскрипции использовали реакционную смесь, содержащую 1x поли(A) буфер (BioLabs), 10 U/мкл Reverse Transcriptase MMLV (Синтол), 0,1 mM dNTPs (Синтол), 0,1 mM АТФ (BioLabs), 1 μ M RT-праймера, 0,5 U/мкл Poly(A)-полимераза (BioLabs) и 1 мкг тотальной РНК. Реакцию проводили в течение 15 мин. при 16 °C, 15 мин. при 42 °C, затем обратную транскриптазу инактивировали 2 мин. при 95 °C.

Изменение относительной экспрессии микроРНК оценивали методом ПЦР-РВ. Амплификацию проводили в 20 мкл PCR-смеси, содержащей 1x PCR-буфер, 0,25 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1 ед. акт. Taq-DNA-полимеразы, по 500 нМ прямого и обратного праймеров. Постановку RT-qPCR каждого образца проводили в трех повторях. Полученные смеси инкубировали в амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, США) по следующей программе: 2 мин. 94 °C, 50 циклов: денатурация при 95 °C 10 сек., отжиг и элонгация – 63 °C 30 сек. Результаты, соответствующие Ct > 40, были признаны отрицательными.

Относительную экспрессию (RE) рассчитывали по формуле $RE = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Нормализацию результатов проводили по референсному локусу и уровню экспрессии соответствующих микроРНК мишеней в образцах контрольной группы, последовательно по схеме, приведенной ниже:

1. Нормализация по референсному локусу: $\Delta C(t) = C(t)_{target} - C(t)_{reference}$, где $C(t)_{reference}$ – C(t) референсного локуса.

2. Расчет $E^{-\Delta C(t)}$ по каждой микроРНК для каждого пациента контрольной группы и основной группы.

3. Расчет медианы $E^{-\Delta C(t)}$ по каждому локусу для контрольной группы и основной группы.

4. Нормализация по контрольной группе и окончательный результат как кратность изменения: $RE = E^{-\Delta C(t)}_{\text{медиана основной группы}} / E^{-\Delta C(t)}_{\text{медиана контрольной группы}}$ (что тождественно $RE = E^{-\Delta\Delta C(t)}$ [16]).

Статистическая и биоинформационная обработка данных

Оценку различий проводили с использованием критерия Манна Уитни для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$, для учета множественного сравнения использовали поправку Бонферрони. Анализ данных проводился на языке

программирования Python с использованием библиотеки SciPy [17].

Поиск генов-регуляторов метаболитов и микроРНК регуляторов генов осуществляли с использованием метода машинного обучения Random forest («случайный лес»), который сочетает в себе метод бэггинга Бреймана и метод

Таблица 1. Метаболиты и гены регуляторы метаболических путей

Метаболиты*	Гены регуляторы	Ферменты
Кинуренин	<i>KYNU, KMO, KYAT3, IDO</i>	кинурениназа, кинуренин-3-монооксигеназа, кинуренинаминотрансфераза 3, индоламин-пиррол-2,3-диоксигеназа
Фенилаланил-валин	<i>PAH</i>	фенилаланингидроксилаза
Миристиновая кислота	<i>PPARA, PPARGC1A, CYP4Z1, IYD, FASN, PLA2G5, LGALS13</i>	синтаза жирных кислот, домен бета-кетоацилсинтазы, кальций-зависимая фосфолипаза A2, растворимый лектин 13, связывающий галактозид
Лизофосфатидилхолины	<i>PLA2G2A, PLB1, LPCAT1</i>	фосфолипазой A2, лизофосфолипаза, LPC-ацилтрансфераза
Деканоилкарнитин	<i>ACADM, ACADS, CROT</i>	ацил-КоА-дегидрогеназа, карнитиноктаноилтрансфераза (Carnitine O-Octanoyltransferase)
Малонилкарнитин	<i>CPT1, CPT1A, ACADM</i>	пальмитоил-КоА-трансфераза, малонил-КоА-декарбоксилазы
Аланил-лейцин	<i>GAL, PGA3</i>	галанин, пепсиноген А
3-гидроксibuтирилкарнитин	<i>ACADM, CRAT</i>	3-гидрокси-ацилКоА-дегидрогеназа, карнитин-О-ацетилтрансфераза
3-метилксантин	<i>PDE4D</i>	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D
L-фенилаланин	<i>PAH, DDC</i>	фенилаланингидроксилаза, ДОФА-декарбоксилаза
Фосфатидилинозитол	<i>PIK3CA, PIK3CB, PIK3C2A, PLCB1, PIGL</i>	фосфатидилинозитол-3-киназа, 1-фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатфосфодиэстераза бета-1, N-ацетилглюкозаминил фосфатидилинозитол-де-N-ацетилаза
2,6 диметилгептаноилкарнитин	<i>ACADM, CRAT</i>	3-гидрокси-ацилКоА-дегидрогеназа, карнитин-О-ацетилтрансфераза
5-метокситриптофан	<i>TPH1</i>	триптофангидроксилаза
3-оксодекановая кислота	<i>FASN, OXSM</i>	3-оксоацилсинтаза, синтаза жирных кислот
2-гидроксимиристиновая кислота	<i>NMT1</i>	н-миристоилтрансфераза 1
3-оксохололевая кислота	<i>FABP6</i>	гастротропин
Индолакриловая кислота	<i>KYAT1</i>	кинуренинаминотрансфераза 1 (kynurenine aminotransferase 1)
N-ацетилпролин	<i>APEH</i>	N-ацилпептидгидролаза
L-октаноилкарнитин	<i>CROT, COT, CPT2, CPT1</i>	карнитин-О-октаноилтрансфераза, карнитин-О-пальмитоилтрансфераза 2(Carnitine O-octanoyltransferase, Carnitine O-palmitoyltransferase 2)
Каприлоилглицин	<i>ACADM, ODC1, GLYATL1</i>	3-гидрокси-ацилКоА-дегидрогеназу, орнитиндекарбоксилаза 1, глицин N-ацилтрансфераза
Лизофосфатидилсерин	<i>GPR34, PLATA</i>	лизофосфатидилсериновый рецептор 1, фосфолипаза a1

Примечание: * – перечень метаболитов на основании данных статьи [8]

Таблица 2. Метаболиты, гены регуляторы метаболических путей и взаимодействующие с ними микроРНК

Метаболиты	Гены регуляторы	микроРНК
1 Кинуренин	<i>KYNU, KMO, KYAT3, IDO1</i>	KMO: miR-30b-3p, miR-153-5p, miR-149-3p, miR-363-5p, miR-624-3p, miR-937-5p, miR-1233-3p, miR-1238-3p, miR-1972, miR-3200-5p, miR-4319, miR-3689a-5p, miR-3689b-5p, miR-4478, miR-3689e, miR-4695-5p, miR-4724-5p, miR-664b-3p, miR-5684, miR-6758-5p, miR-6780a-5p, miR-6799-5p, miR-6856-5p, miR-6867-5p, miR-6883-5p, miR-6894-5p, miR-6894-5p, miR-7106-5p, miR-7106-5p, miR-1273h-5p, miR-12122. KYNU: miR-30a-3p, miR-200c-3p, miR-382-5p, miR-382-5p, miR-2117, miR-3654, miR-4652-3p, miR-4743-3p, miR-6739-3p, miR-6879-3p, miR-6885-3p, miR-10397-5p, miR-4638-5p, miR-30a-3p, miR-200c-3p, miR-382-5p, miR-382-5p, miR-2117, miR-3654, miR-4652-3p, miR-4743-3p, miR-6739-3p, miR-6879-3p, miR-6885-3p, miR-10397-5p. KYAT3: miR-5692c, miR-5692b, miR-5692c, miR-5692b, miR-5692c, miR-5692b. IDO1: miR-593-3p, miR-891a-3p, miR-5683, miR-6728-3p
2 Фенилаланил-валин	<i>PAH</i>	miR-23a-3p, miR-4502, miR-12132
3 Миристиновая кислота	<i>PPARA, PPARGC1A, CYP4Z1, IYD, FASN, PLA2G5, LGALS13</i>	IYD: miR-760, miR-29a-5p, miR-208a-5p, miR-30b-3p, miR-184, miR-195-3p, miR-320a-3p, miR-373-5p, miR-483-3p, miR-551b-5p, miR-643, miR-646, miR-1224-5p, miR-320b, miR-922, miR-1202, miR-1205, miR-1287-3p, miR-513c-3p, miR-1321, miR-3144-3p, miR-3152-5p, miR-3185, miR-3191-5p, miR-3199, miR-514b-5p, miR-4279, miR-3663-5p, miR-3681-5p, miR-3689a-3p, miR-3689b-3p, miR-4429, miR-4452, miR-3689c, miR-4531, miR-4533, miR-3972, miR-3976, miR-451b, miR-4731-5p, miR-4796-3p, miR-4799-3p, miR-5003-3p, miR-5195-3p, miR-5588-5p, miR-6509-3p, miR-6737-5p, miR-6737-3p, miR-6752-3p, miR-6764-3p, miR-6779-5p, miR-6780a-5p, miR-6824-3p, miR-6829-5p, miR-6830-5p, miR-6849-5p, miR-6849-3p, miR-6882-5p, miR-6894-3p, miR-7106-5p, miR-7844-5p, miR-8052, miR-8069, miR-8078, miR-146a-5p, miR-607, miR-3614-5p, miR-4482-3p, miR-197-3p, miR-744-3p, miR-3187-3p, miR-3652, miR-4420, miR-4430, miR-4633-5p, miR-4642, miR-4781-3p, miR-5698, miR-6499-3p, miR-6787-3p, miR-6843-3p, miR-6848-3p, miR-588, miR-4423-5p, miR-6501-5p CYP4Z1: miR-2110, FASN: miR-30c-5p, LGALS13: miR-4650-3p PLA2G5: miR-765, miR-3682-3p, miR-4533, miR-2467-3p, miR-4786-3p, miR-1253, miR-3191-5p, miR-6847-5p, miR-11181-3p, miR-3916 PPARA: miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-20b-5p, miR-181d-5p, miR-22-3p, miR-140-5p, miR-372-3p, miR-330-5p, miR-331-3p, miR-345-3p, miR-520d-3p, miR-551b-5p, miR-619-5p, miR-622, miR-2113, miR-665, miR-939-3p, miR-1976, miR-3116, miR-3183, miR-4251, miR-3690, miR-550b-2-5p, miR-4436a, miR-4443, miR-4515, miR-4717-5p, miR-4723-5p, miR-4745-5p, miR-4749-5p, miR-4755-3p, miR-5591-5p, miR-6126, miR-6131, miR-6134, miR-6505-3p, miR-6734-3p, miR-6744-3p, miR-6753-3p, miR-6766-5p, miR-6791-5p, miR-6805-3p, miR-6817-5p, miR-6852-5p, miR-6873-3p, miR-6880-5p, miR-7151-3p, miR-8071, let-7b-5p, let-7e-5p, miR-224-3p, miR-302a-3p, miR-326, miR-335-3p, miR-429, miR-511-5p, miR-8085, miR-10394-5p, miR-10524-5p, miR-9851-5p, miR-7107-3p, miR-7110-3p, miR-7155-3p, miR-7158-3p, miR-7976, miR-1233-5p, miR-4651, miR-6757-5p, miR-6778-5p, miR-27a-5p, miR-34a-5p, miR-130b-5p, miR-196b-5p, miR-607, miR-1249-5p, miR-3689d, miR-5006-5p, miR-6756-5p, miR-6788-5p, miR-6797-5p, miR-6851-5p PPARGC1A: let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p, let-7e-5p, miR-23b-3p, miR-138-5p, miR-409-5p, miR-487a-3p, miR-193b-3p, miR-4458, miR-6884-5p, miR-23a-3p, miR-193a-3p, miR-485-3p, miR-3666, miR-3681-3p, miR-211-5p, miR-485-5p, miR-342-5p, miR-452-5p, miR-511-5p, miR-508-5p, miR-573, miR-659-3p, miR-764, miR-1825, miR-2116-3p, miR-2682-3p, miR-3929, miR-4436a, miR-4649-5p, miR-4664-5p, miR-4713-5p, miR-4728-3p, miR-122b-3p, miR-4768-5p, miR-4769-3p, miR-5003-5p, miR-5006-3p, miR-5011-5p, miR-5591-3p, miR-5685, miR-6124, miR-6740-3p, miR-6818-3p, miR-6833-3p, miR-6845-3p, miR-6892-3p, miR-7110-5p, miR-7703, miR-7850-5p, miR-8075, miR-8485, miR-148a-5p, miR-214-3p, miR-222-3p, miR-9898, miR-6083

Таблица 2 (продолжение). Метаболиты, гены регуляторы метаболических путей и взаимодействующие с ними микроРНК

Метаболиты	Гены регуляторы	микроРНК
4 Лизофосфатидилхолины	<i>PLA2G2A, PLB1, LPCAT1</i>	LPCAT1 : miR-27a-3p, miR-370-3p, miR-4739, miR-4768-3p, miR-4783-3p. PLB1 : miR-3162-5p, miR-4529-3p, miR-4740-5p. PLA2G2A : miR-765, miR-3652, miR-6134, miR-6745, miR-6756-5p, miR-6769a-5p, miR-6785-5p, miR-6769b-5p, miR-7847-3p
5 Деканоилкарнитин	<i>ACADM, ACADS, CROT</i>	CROT : miR-33a-5p, miR-373-3p, miR-33b-5p, miR-17-5p, miR-500a-5p, miR-501-5p, miR-1250-3p, miR-4659b-3p, miR-219b-5p, miR-4795-3p, miR-6807-3p, miR-6867-5p, miR-522-3p, miR-4325, miR-5004-3p, miR-6833-5p, miR-221-3p. ACADM : miR-4437, miR-5580-3p, miR-6529-5p, miR-3184-5p, miR-4704-3p. ACADS : miR-484
6 Малонилкарнитин	<i>CPT1A, ACADM</i>	ACADM : miR-4437, miR-5580-3p, miR-6529-5p, miR-3184-5p, miR-4704-3p. CPT1A : miR-653-5p, miR-328-3p, miR-6866-3p, miR-1296-3p, miR-1322, miR-6883-5p, miR-7-2-3p, miR-335-3p, miR-520a-3p, miR-4310, miR-4287, miR-6718-5p, miR-6785-5p, miR-6869-3p, miR-7856-5p, miR-93-5p, miR-4293, miR-4322, miR-4707-3p, miR-24-3p, miR-6849-3p
7 Аланил-лейцин	<i>GAL, PGA3</i>	GAL : miR-922, miR-4742-5p, miR-4753-5p, miR-4436b-3p, miR-5004-5p, miR-5089-3p, miR-15b-5p, miR-138-1-3p, miR-302d-5p, miR-6810-5p, miR-3976. PGA3 : miR-2467-3p, miR-1909-5p, miR-6743-5p, miR-1913, miR-2115-5p, miR-4646-5p, miR-5006-5p, miR-6857-5p, miR-11399, miR-5008-5p, miR-4649-3p, miR-423-5p, miR-3679-5p, miR-423-3p, miR-1296-3p, miR-3126-5p, miR-6759-3p, miR-3180, miR-6763-5p, miR-769-3p, miR-3139, miR-5571-5p, miR-6768-5p, miR-761, miR-3151-5p, miR-18a-5p, miR-4672, miR-6873-3p, miR-6875-3p, miR-3156-5p, miR-6771-5p, miR-6879-5p, miR-3945
8 3-гидроксibuтирил-карнитин	<i>ACADM, CRAT</i>	ACADM : miR-4437, miR-5580-3p, miR-6529-5p, miR-3184-5p, miR-4704-3p. CRAT : miR-936, miR-1207-5p, miR-6764-5p, miR-7150, miR-10392-3p
9 3-метилксантин	<i>PDE4D</i>	PDE4D : miR-18a-5p, miR-31-5p, miR-148a-3p, miR-301a-3p, miR-148b-3p, miR-875-5p, miR-6766-3p, miR-26a-5p, miR-103a-3p, miR-107, miR-139-5p, miR-362-3p, miR-339-5p, miR-18b-5p, miR-448, miR-487a-3p, miR-4429, miR-203a-3p, miR-211-3p, miR-124-3p, miR-149-5p, miR-99b-3p, miR-372-3p, miR-373-5p, miR-520a-3p, miR-520d-3p, miR-625-5p, miR-641, miR-1301-3p, miR-449c-5p, miR-1266-5p, miR-1321, miR-1912-3p, miR-2114-5p, miR-3125, miR-3187-5p, miR-4261, miR-4280, miR-3646, miR-3689a-5p, miR-3689b-5p, miR-3922-5p, miR-4446-3p, miR-3689d, miR-3689e, miR-4492, miR-4502, miR-4511, miR-3977, miR-4646-5p, miR-4675, miR-4698, miR-4741, miR-4756-5p, miR-4768-3p, miR-5193, miR-1295b-5p, miR-5589-3p, miR-6500-3p, miR-548az-5p, miR-6504-5p, miR-6511a-5p, miR-6512-5p, miR-6809-5p, miR-6809-3p, miR-6829-5p, miR-6839-5p, miR-6859-5p, miR-5787, miR-6077, miR-6796-3p, miR-6860, miR-7114-5p, miR-7151-3p, miR-8080, miR-8081, miR-8086, miR-195-5p, miR-3136-5p, miR-6080, miR-6888-5p, miR-340-5p, miR-4439, miR-3148, miR-6857-3p, miR-497-5p
10 L-фенилаланин	<i>PAH, DDC</i>	PAH : miR-23a-3p, miR-4502, miR-12132. DDC : miR-875-3p, miR-3166, miR-4502, miR-3158-3p

случайных подмножеств. Результатом модели «случайного леса» является предсказанная вероятность того, что целевой ген или микроРНК является истинным регулятором конкретного метаболита [18].

Для выбора минимальных наборов микроРНК использовали LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator) – пенализованную логистическую регрессию на языке программирования R в оболочке Rstudio. Важность переменных определяли путем подсчета числа bootstrap-моделей с ненулевой коэффициентом переменной [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биоинформатический анализ связи метаболомного профиля мочи с экспрессией генов и микроРНК

С использованием метода машинного обучения Random forest, реализованном на языке программирования R, был проведен анализ метаболомных данных из статьи [8], а также баз данных Human Metabolome Database (HMDB, <https://hmdb.ca/metabolites>).

На первом этапе были установлены взаимосвязи метаболит-фермент и фермент-ген регулятор. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 2 (окончание). Метаболиты, гены регуляторы метаболических путей и взаимодействующие с ними микроРНК

Метаболиты	Гены регуляторы	микроРНК
11	Фосфатидилинозитол	<p>PIGL: miR-4651, miR-5087, miR-6499-3p, miR-6739-3p, miR-6764-5p, miR-212-5p, miR-659-3p, miR-3189-3p, miR-3934-3p, miR-378g, miR-4519, miR-6819-5p.</p> <p>PIK3C2A: miR-503-5p, miR-301b-3p, miR-6838-5p, miR-23a-5p, miR-29a-5p, miR-23b-5p, miR-510-5p, miR-1264, miR-2113, miR-1286, miR-3619-3p, miR-4423-3p, miR-4436a, miR-4484, miR-1343-3p, miR-6074, miR-6760-3p, miR-6867-5p, miR-212-5p, miR-150-5p, miR-378a-5p, miR-518a-5p, miR-1224-3p, miR-764, miR-6821-3p.</p> <p>PIK3CA: let-7i-5p, let-7e-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, let-7g-5p, miR-152-3p, miR-202-5p, miR-4429, miR-198, miR-548e-5p, miR-548o-3p, miR-2114-5p, miR-4430, miR-4493, miR-4659b-3p, miR-122b-5p, miR-4803, miR-5006-3p, miR-6797-3p, miR-1972, miR-2116-5p, miR-3157-5p, miR-3191-5p, miR-514b-5p, miR-4303, miR-4277, miR-3606-5p, miR-3614-3p, miR-3679-3p, miR-676-5p, miR-378g, miR-4446-5p, miR-4477b, miR-4486, miR-4652-3p, miR-6819-5p, miR-6857-5p, miR-6868-3p, miR-6893-3p, miR-7162-3p, miR-10526-3p, miR-12126, miR-139-5p, miR-422a.</p> <p>PIK3CB: miR-23b-3p, miR-362-5p, miR-3666, miR-3064-5p, miR-4465, miR-199a-3p, miR-199b-3p, miR-212-5p, miR-150-5p, miR-6504-5p, miR-204-3p, miR-671-5p, miR-1263, miR-3646, miR-4430, miR-4682, miR-5093, miR-6165, miR-6715a-3p, miR-7850-5p, miR-9500, miR-130b-5p, miR-3619-5p, miR-32-3p, miR-623, miR-542-5p, miR-548j-5p, miR-544b, miR-3614-5p, miR-3652, miR-548aw, miR-5703, miR-8077, miR-2117.</p> <p>PLCB1: miR-103a-3p, miR-107, miR-423-5p, miR-3129-5p, miR-139-5p, miR-124-3p, miR-138-1-3p, miR-302c-5p, miR-876-5p, miR-1244, miR-1322, miR-548s, miR-4267, miR-3692-3p, miR-4433a-3p, miR-4436a, miR-3978, miR-4647, miR-4659a-3p, miR-4670-3p, miR-5194, miR-548az-3p, miR-6783-3p, miR-6860, miR-7151-5p, miR-8056, miR-8063, miR-502-3p.</p>
12	2,6 диметилгептаноил-карнитин	ACADM : miR-4437, miR-5580-3p, miR-6529-5p, miR-3184-5p, miR-4704-3p. CRAT : miR-936, miR-1207-5p, miR-6764-5p, miR-7150, miR-10392-3p
13	5-метокситриптофан	TPH1 : miR-320a-3p, miR-450a-2-3p, miR-320b, miR-2110, miR-4435, miR-5693, miR-5702, miR-6830-5p, miR-12118
14	3-оксодекановая к-та	FASN : miR-30c-5p
15	2-гидроксимиристиновая кислота	NMT1 : miR-181a-5p, miR-214-3p, miR-491-5p, miR-432-5p, miR-922, miR-1202, miR-1205, miR-1972, miR-2110, miR-2682-3p, miR-3160-5p, miR-3176, miR-4303, miR-4291, miR-4447, miR-3972, miR-4667-5p, miR-4690-3p, miR-4700-5p, miR-23b-3p, miR-615-3p
16	3-оксохолоевая кислота	FABP6 : miR-208a-5p, miR-330-5p, miR-196b-5p, miR-3180-3p, miR-3181, miR-4278, miR-3689f, miR-4754, miR-4786-3p, miR-5190, miR-5195-3p, miR-6745, miR-6751-5p, miR-6769a-5p, miR-6771-5p, miR-6792-5p, miR-6821-5p, miR-7156-3p, miR-10226, miR-10392-5p
17	Индолакриловая кислота	KYAT1 : miR-423-5p, miR-6842-5p, miR-597-3p, miR-4710, miR-6741-5p, miR-6796-5p, miR-4447, miR-193b-3p
18	N-ацетилпролин	APEH : miR-1289
19	L-октаноилкарнитин	CROT : miR-33a-5p, miR-373-3p, miR-33b-5p, miR-17-5p, miR-500a-5p, miR-501-5p, miR-1250-3p, miR-4659b-3p, miR-219b-5p, miR-4795-3p, miR-6807-3p, miR-6867-5p, miR-522-3p, miR-4325, miR-5004-3p, miR-6833-5p, miR-221-3p. CPT2 : miR-433-3p, miR-6843-3p, miR-6848-3p, miR-208a-5p, miR-6742-3p, miR-34a-5p
20	Каприлоилглицин	ACADM : miR-4437, miR-5580-3p, miR-6529-5p, miR-3184-5p, miR-4704-3p. ODC1 : miR-423-5p, miR-3184-5p, miR-7973, miR-193b-3p. GLYATL1 : miR-1207-5p, miR-4668-3p, miR-4742-3p, miR-4999-5p, miR-664b-3p, miR-6846-3p, miR-6893-3p
21	Лизоосфатидилсерин	PLA1A : miR-3153, miR-7110-3p, miR-6754-5p, miR-6887-3p. GPR34 : miR-3193, miR-2909, miR-4738-5p, miR-486-3p, miR-6808-5p

Результаты взаимосвязи метаболит-ген-микроРНК представлены в табл. 2 и рис. 1–2. Видно, что содержание выявленных в моче метаболитов регулируется сложной сетью взаимодействий мРНК и микроРНК. Для двух метаболитов – миристиновой кислоты и фосфатидилинозитола выявлено 237 и 143 микроРНК соответственно, регулирующих содержание этих веществ в биологических жидкостях.

Таким образом, при биоинформационном анализе определен список из 613 уникальных микроРНК, участвующих в регуляции концентрации 21 метаболита. Из 613 микроРНК были выбраны только микроРНК с максимальной силой взаимодействия с мРНК генов регуляторов содержания метаболитов. Итоговый перечень содержал 91 микроРНК, представлен в табл. 3.

Таблица 3. Финальный перечень микроРНК, участвующих в регуляции концентрации метаболитов

Метаболиты	микроРНК
1 Кинуренин	KMO : miR-30b-3p, miR-153-5p, miR-149-3p, miR-363-5p. KYNU : miR-30a-3p, miR-200c-3p, miR-382-5p, miR-382-5p. KYAT3 : miR-5692c, miR-5692b, miR-5692c. IDOT : miR-593-3p, miR-891a-3p
2 Фенилаланил-валин	PAH : miR-23a-3p, miR-4502, miR-12132
3 Миристиновая кислота	IYD : miR-760, miR-29a-5p. CYP4Z1 : miR-2110, FASN : miR-30c-5p, LGALS13 : miR-4650-3p. PLA2G5 : miR-765, miR-3682-3p. PPARA : miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-20b-5p. PPARGC1A : let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p
4 Лизофосфатидилхолины	LPCAT1 : miR-27a-3p, miR-370-3p, miR-4768-3p. PLB1 : miR-3162-5p, miR-4529-3p. PLA2G2A : miR-765, miR-3652
5 Деканоилкарнитин	CROT : miR-33a-5p, miR-373-3p, miR-33b-5p, miR-17-5p. ACADM : miR-4437, miR-5580-3p, miR-6529-5p. ACADS : miR-484
6 Малонилкарнитин	ACADM : miR-4437, miR-5580-3p, miR-6529-5p. CPT1A : miR-653-5p, miR-328-3p, miR-6866-3p
7 Аланил-лейцин	GAL : miR-922, miR-4742-5p, miR-4753-5p. PGA3 : miR-2467-3p, miR-1909-5p, miR-6743-5p
8 3-гидроксибутирилкарнитин	ACADM : miR-4437, miR-5580-3p, miR-6529-5p
9 3-метилксантин	PDE4D : miR-18a-5p, miR-31-5p, miR-148a-3p
10 L-фенилаланин	PAH : miR-23a-3p. DDC : miR-875-3p, miR-3166
11 Фосфатидилинозитол	PIGL : miR-4651, miR-5087, miR-6499-3p. PIK3C2A : miR-503-5p, miR-301b-3p. PIK3CA : let-7i-5p, let-7e-5p, miR-19a-3p. PLCB1 : miR-103a-3p, miR-107, miR-423-5p
12 2,6 диметилгептаноилкарнитин	ACADM : miR-4437, miR-5580-3p, miR-6529-5p. CRAT : miR-936, miR-1207-5p
13 5-метокситриптофан	TPH1 : miR-320a-3p, miR-450a-2-3p, miR-320b
14 3-оксододекановая кислота	FASN : miR-30c-5p
15 2-гидроксимиристиновая к-та	NMT1 : miR-181a-5p, miR-214-3p, miR-491-5p
16 3-оксохелевая кислота	FABP6 : miR-208a-5p, miR-330-5p, miR-196b-5p
17 Индолакриловая кислота	KYAT1 : miR-423-5p, miR-6842-5p, miR-597-3p
18 N-ацетилпролин	APEH : miR-1289
19 L-октаноилкарнитин	CROT : miR-33a-5p, miR-373-3p, miR-33b-5p, miR-17-5p. CPT2 : miR-433-3p, miR-6843-3p
20 Каприлоилглицин	ACADM : miR-4437, miR-5580-3p, miR-6529-5p. ODC1 : miR-423-5p, miR-3184-5p. GLYATL1 : miR-1207-5p, miR-4668-3p
21 Лизофосфатидилсерин	PLA1A : miR-3153, miR-7110-3p. GPR34 : miR-3193, miR-2909

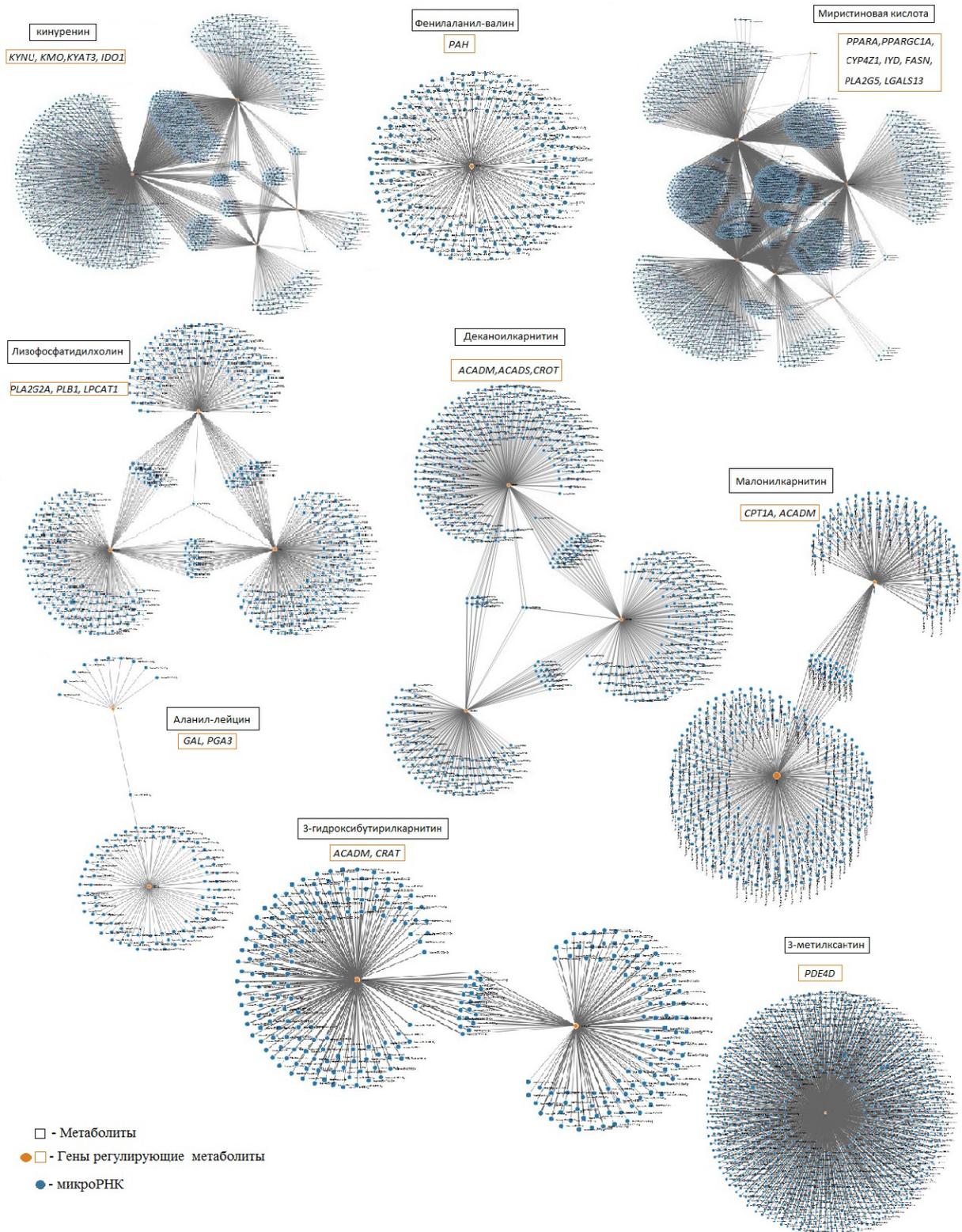


Рис. 1. Метаболиты, гены регуляторы метаболических путей и взаимодействующие с ними микроРНК

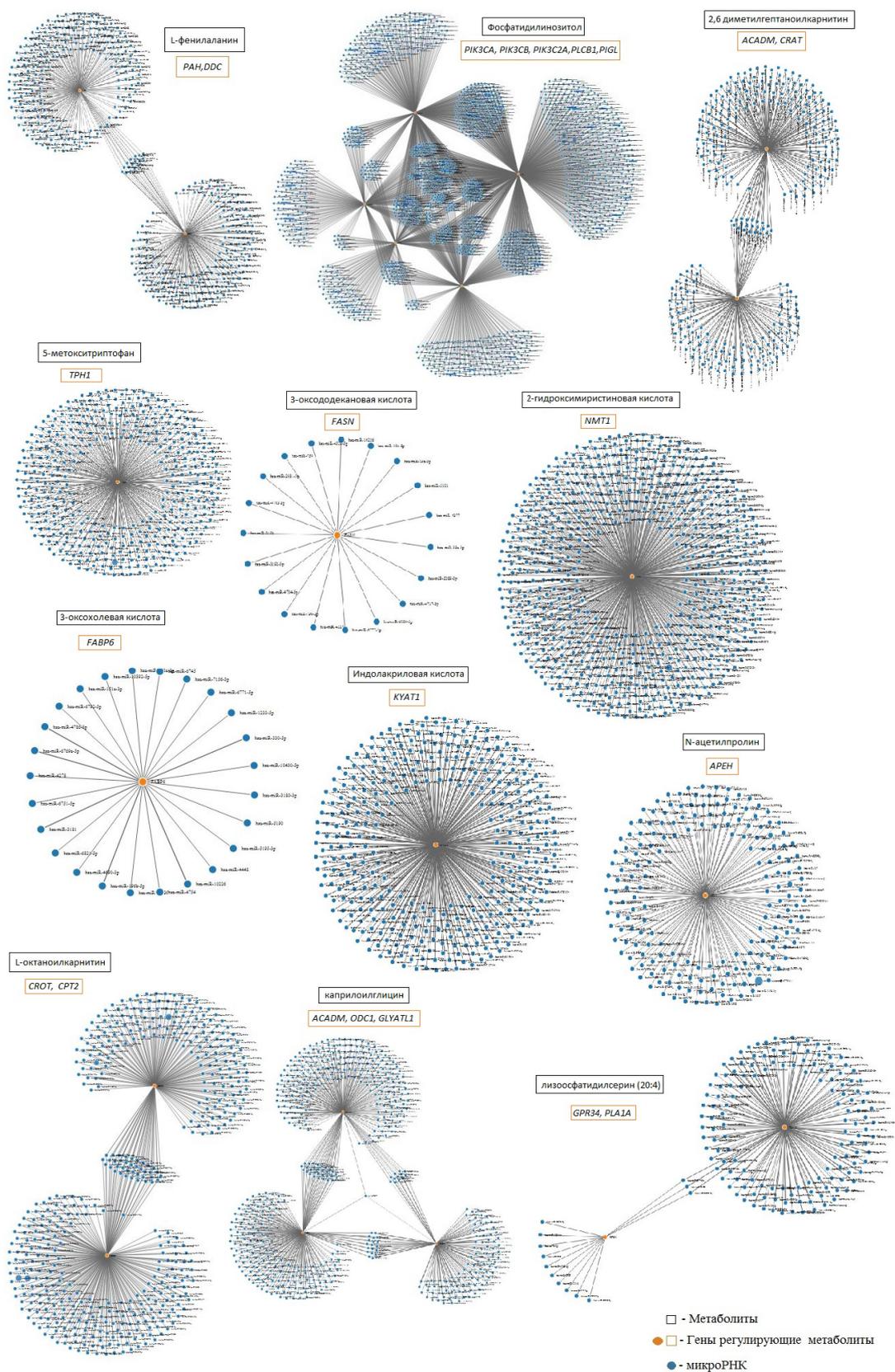


Рис. 2. Метаболиты, гены регуляторы метаболитических путей и взаимодействующие с ними микроРНК

Особенности содержания транскриптов микроРНК в моче пациентов с серозной аденокарциномой яичников

Сформированный список из 91 микроРНК, регулирующих активность 37 генов, был использован для валидации методом ПЦР в режиме реального времени на образцах мочи пациенток и условно-здоровых добровольцев.

В моче пациентов с серозной аденокарциномой яичников обнаружено статистически значимое ($p < 0,005$) изменение уровня транскриптов 47 микроРНК относительно условно-здоровых добровольцев (рис. 3).

Обнаружено значительное увеличение ($p < 0,05$) уровня miR-382-5p в 1,9 раза, miR-593-3p в 3,4 раза, miR-29a-5p в 2,6 раза, miR-2110 в 2,5 раза, miR-30c-5p в 2,9 раза, miR-181a-5p в 2,6 раза, let-7b-5p в 2,6 раза, miR-27a-3p в 1,9 раза, miR-370-3p в 2,6 раза, miR-6529-5p в 2,5 раза, miR-653-5p в 2,2 раза, miR-4742-5p в 2,4 раза, miR-2467-3p в 2,6 раза, miR-1909-5p в 3,5 раза, miR-6743-5p в 4,9 раза, miR-875-3p в 2,3 раза, miR-19a-3p в 4,9 раза, miR-208a-5p в 2,6 раза, miR-330-5p в 3,2 раза, miR-1207-5p в 3,5 раза, miR-4668-3p в 4,2 раза, miR-3193 в 2,6 раза относительно их уровня в моче условно-здоровых индивидуумов.

Также обнаружено значительное снижение ($p < 0,05$) уровня miR-23a-3p в 20,0 раз, miR-12132

в 4,0 раза, miR-765 в 1,8 раза, miR-181b-5p в 4,0 раза, miR-4529-3p в 1,8 раза, miR-33b-5p в 3,1 раза, miR-17-5p в 4,6 раза, miR-6866-3p в 1,7 раза, miR-4753-5p в 14,3 раза, miR-103a-3p в 19,6 раза, miR-423-5p в 3,0 раза, miR-491-5p в 1,7 раза, miR-196b-5p в 5,0 раз, miR-6843-3p в 2,3 раза, miR-423-5p в 4,6 раза и miR-3184-5p в 2,6 раза относительно их уровня в моче условно-здоровых индивидуумов.

Таким образом, в моче больных серозной аденокарциномой яичника обнаружен профиль микроРНК miR-382-5p, miR-593-3p, miR-29a-5p, miR-2110, miR-30c-5p, miR-181a-5p, let-7b-5p, miR-27a-3p, miR-370-3p, miR-6529-5p, miR-653-5p, miR-4742-5p, miR-2467-3p, miR-1909-5p, miR-6743-5p, miR-875-3p, miR-19a-3p, miR-208a-5p, miR-330-5p, miR-1207-5p, miR-4668-3p, miR-3193, miR-23a-3p, miR-12132, miR-765, miR-181b-5p, miR-4529-3p, miR-33b-5p, miR-17-5p, miR-6866-3p, miR-4753-5p, miR-103a-3p, miR-423-5p, miR-491-5p, miR-196b-5p, miR-6843-3p, miR-423-5p и miR-3184-5p дифференциальный для пациентов и условно-здоровых индивидуумов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании с применением методов машинного обучения установлены связи между метаболитами, изменившимися концентрации относительного

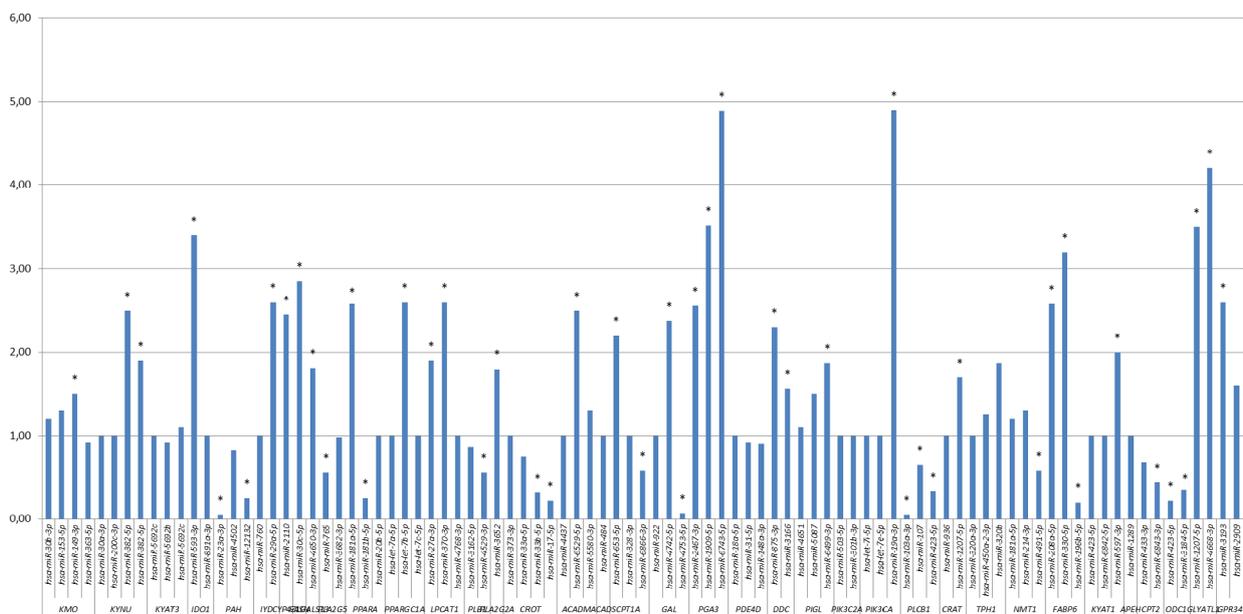


Рис. 3. Изменение уровня транскриптов 91 микро-РНК в моче больных серозной аденокарциномой яичников
Примечание: * – статистически значимое ($p < 0,05$) изменение уровня транскриптов относительно контрольной группы

тельно здоровых доноров, и генами, кодирующими белки участвующие в синтезе и деградации этих метаболитов, а также установлены связи между генами-регуляторами метаболитов и микроРНК-регуляторами этих генов.

При биоинформационном анализе определен список из 613 уникальных микроРНК, участвующих в регуляции концентрации 21 метаболита. Из 613 микроРНК были выбраны только микроРНК с максимальной силой взаимодействия с мРНК генов регуляторов содержания метаболитов. Итоговый перечень содержал 91 микроРНК, из которых 47 изменяли уровень своих транскриптов в моче (валидировано методом ПЦР).

Наиболее значимо у больных РЯ изменялся уровень транскриптов miR-382-5p, miR-593-3p, miR-29a-5p, miR-2110, miR-30c-5p, miR-181a-5p, let-7b-5p, miR-27a-3p, miR-370-3p, miR-6529-5p, miR-653-5p, miR-4742-5p, miR-2467-3p, miR-1909-5p, miR-6743-5p, miR-875-3p, miR-19a-3p, miR-208a-5p, miR-330-5p, miR-1207-5p, miR-4668-3p, miR-3193, miR-23a-3p, miR-12132, miR-765, miR-181b-5p, miR-4529-3p, miR-33b-5p, miR-17-5p, miR-6866-3p, miR-4753-5p, miR-103a-3p, miR-423-5p, miR-491-5p, miR-196b-5p, miR-6843-3p, miR-423-5p и miR-3184-5p относительно их уровня в моче условно-здоровых индивидуумов.

Изменение уровня экспрессии некоторых из этих микроРНК, по данным ряда авторов, ассоциировано с серозным раком яичников: hsa-miR-382-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-423-5p [20], hsa-miR-593-3p [21], hsa-miR-29a-5p [22, 23], hsa-miR-30c-5p [24, 25] и hsa-miR-30a-5p [26].

Тем не менее, выявленная нами панель микроРНК (miR-382-5p, miR-593-3p, miR-29a-5p, miR-2110, miR-30c-5p, miR-181a-5p, let-7b-5p, miR-27a-3p, miR-370-3p, miR-6529-5p, miR-653-5p, miR-4742-5p, miR-2467-3p, miR-1909-5p, miR-6743-5p, miR-875-3p, miR-19a-3p, miR-208a-5p, miR-330-5p, miR-1207-5p, miR-4668-3p, miR-3193, miR-23a-3p, miR-12132, miR-765, miR-181b-5p, miR-4529-3p, miR-33b-5p, miR-17-5p, miR-6866-3p, miR-4753-5p,

miR-103a-3p, miR-423-5p, miR-491-5p, miR-196b-5p, miR-6843-3p, miR-423-5p и miR-3184-5p) является уникальной и в таком сочетании в литературных источниках не представлена.

Очевидно, транскриптомный дисбаланс начинается в тканях и приводит к дисбалансу метаболомному, что в итоге отражается на составе биологических жидкостей организма, в том числе моче.

Современная клиническая онкогинекология испытывает серьезную потребность в эффективных биомаркерах, изменение уровней которых может служить доказательством возникновения злокачественного процесса. Неинвазивный и недорогой ПЦР анализ микроРНК в моче делает его особенно привлекательным инструментом скрининга. Применение данного подхода может позволить проводить частое тестирование женщин, принадлежащих к группам высокого риска и обеспечить длительное наблюдение за пациентами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биоинформатический анализ выявил перечень из 613 уникальных микроРНК, участвующих в регуляции 21 метаболита. При этом изменение уровня транскриптов 38 микроРНК (miR-382-5p, miR-593-3p, miR-29a-5p, miR-2110, miR-30c-5p, miR-181a-5p, let-7b-5p, miR-27a-3p, miR-370-3p, miR-6529-5p, miR-653-5p, miR-4742-5p, miR-2467-3p, miR-1909-5p, miR-6743-5p, miR-875-3p, miR-19a-3p, miR-208a-5p, miR-330-5p, miR-1207-5p, miR-4668-3p, miR-3193, miR-23a-3p, miR-12132, miR-765, miR-181b-5p, miR-4529-3p, miR-33b-5p, miR-17-5p, miR-6866-3p, miR-4753-5p, miR-103a-3p, miR-423-5p, miR-491-5p, miR-196b-5p, miR-6843-3p, miR-423-5p и miR-3184-5p) в моче имеет диагностический потенциал при раке яичников и является основой для дальнейших исследований. Таким образом, транскриптомное профилирование мочи позволило как выявить потенциальные маркеры заболевания, так и лучше понять молекулярные механизмы изменений, лежащих в основе развития РЯ.

Список источников

1. Reid BM, Permut JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med*. 2017 Feb;14(1):9–32. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084>
2. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019, 250 с.

3. Цандекова М. Р., Порханова Н. В., Кутилин Д. С. Молекулярная характеристика серозной аденокарциномы яичника: значение для диагностики и лечения. *Современные проблемы науки и образования*. 2020;(1):55. <https://doi.org/10.17513/spno.29428>, EDN: LTMXTL
4. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P, Kurzeder C, Mustea A, Wimberger P, et al. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet*. 2016 Apr;293(4):695–700. <https://doi.org/10.1007/s00404-016-4035-8>
5. Rooth C. Ovarian cancer: risk factors, treatment and management. *Br J Nurs*. 2013 Sep 12;22(17):S23–30. <https://doi.org/10.12968/bjon.2013.22.Sup17.S23>
6. Swiatly A, Plewa S, Matysiak J, Kokot ZJ. Mass spectrometry-based proteomics techniques and their application in ovarian cancer research. *J Ovarian Res*. 2018 Oct 1;11(1):88. <https://doi.org/10.1186/s13048-018-0460-6>
7. Veenstra TD. Metabolomics: the final frontier? *Genome Med*. 2012 Apr 30;4(4):40. <https://doi.org/10.1186/gm339>
8. Гуськова О. Н., Аллилуев И. А., Вереникина Е. В., Половодова В. В., Rogozin M. A., Мягкова Т. Ю. и др. Изменение концентрации метаболитов в моче как малоинвазивный маркер серозной аденокарциномы яичников. *Российский биотерапевтический журнал*. 2023;22(3):43–50. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-3-43-50>, EDN: KRLBXC
9. Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, Lewis CA, Vander Heiden MG, Locasale JW. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jul;71(4):333–358. <https://doi.org/10.3322/caac.21670>
10. Димитриади Т. А., Бурцев Д. В., Дженкова Е. А., Кутилин Д. С. МикроРНК как маркеры прогрессирования предраковых заболеваний в рак шейки матки. *Современные проблемы науки и образования*. 2020;(1):99. <https://doi.org/10.17513/spno.29529>, EDN: SPESSH
11. Abdelsattar ZM, Wong SL, Regenbogen SE, Jomaa DM, Hardiman KM, Hendren S. Colorectal cancer outcomes and treatment patterns in patients too young for average-risk screening. *Cancer*. 2016 Mar 15;122(6):929–934. <https://doi.org/10.1002/cncr.29716>
12. Balcells I, Cirera S, Busk PK. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol*. 2011 Jun 25;11:70. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-70>
13. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paeppe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
14. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. 2008 May;14(5):844–852. <https://doi.org/10.1261/rna.939908>
15. Shen Y, Li Y, Ye F, Wang F, Wan X, Lu W, et al. Identification of miR-23a as a novel microRNA normalizer for relative quantification in human uterine cervical tissues. *Exp Mol Med*. 2011 Jun 30;43(6):358–366. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.6.039>
16. Кутилин Д. С., Димитриади С. Н., Водолажский Д. И., Франциянц Е. М., Кит О. И. Влияние тепловой ишемии-реперфузии на экспрессию апоптоз-регулирующих генов в почечной ткани больных с почечно-клеточным раком. *Нефрология*. 2017;21(1):80–86. <https://doi.org/10.24884/1561-6274-2017-21-1-80-86>, EDN: XVGWWP
17. Jones E, Oliphant E, Peterson P. *SciPy: Open source scientific tools for python*. 2001.
18. Ding J, Li X, Hu H. TarPmiR: a new approach for microRNA target site prediction. *Bioinformatics*. 2016 Sep 15;32(18):2768–2775. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw318>
19. Цандекова М. Р., Порханова Н. В., Кит О. И., Кутилин Д. С. Малоинвазивная молекулярная диагностика серозной аденокарциномы яичника высокой и низкой степени злокачественности. *Онкогинекология*. 2021;(4(40)):35–50. https://doi.org/10.52313/22278710_2021_4_35, EDN: ACKKXS
20. Li Y, Yao L, Liu F, Hong J, Chen L, Zhang B, et al. Characterization of microRNA expression in serous ovarian carcinoma. *Int J Mol Med*. 2014 Aug;34(2):491–498. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1813>
21. Han Y, Zheng Y, You J, Han Y, Lu X, Wang X, et al. Hsa_circ_0001535 inhibits the proliferation and migration of ovarian cancer by sponging miR-593-3p, upregulating PTEN expression. *Clin Transl Oncol*. 2023 Oct;25(10):2901–2910. <https://doi.org/10.1007/s12094-023-03152-2>
22. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol*. 2009 Jan;112(1):55–59. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.08.036>

23. Kwon JJ, Factora TD, Dey S, Kota J. A Systematic Review of miR-29 in Cancer. *Mol Ther Oncolytics*. 2019 Mar 29;12:173–194. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2018.12.011>
24. Wu Q, Li G, Gong L, Cai J, Chen L, Xu X, et al. Identification of miR-30c-5p as a tumor suppressor by targeting the m6 A reader HNRNPA2B1 in ovarian cancer. *Cancer Med*. 2023 Feb;12(4):5055–5070. <https://doi.org/10.1002/cam4.5246>
25. Zhou J, Gong G, Tan H, Dai F, Zhu X, Chen Y, et al. Urinary microRNA-30a-5p is a potential biomarker for ovarian serous adenocarcinoma. *Oncol Rep*. 2015 Jun;33(6):2915–2923. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3937>
26. Gasparri ML, Casorelli A, Bardhi E, Besharat AR, Savone D, Ruscito I, et al. Beyond circulating microRNA biomarkers: Urinary microRNAs in ovarian and breast cancer. *Tumour Biol*. 2017 May;39(5):1010428317695525. <https://doi.org/10.1177/1010428317695525>

Информация об авторах:

Кутилин Денис Сергеевич ✉ – к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>, SPIN: 8382-4460, AuthorID: 794680, Scopus Author ID: 55328886800

Филиппов Федор Евгеньевич – врач онколог отделения онкогинекологии, ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Российская Федерация

Порханова Наталья Владимировна – д.м.н., доцент кафедры онкологии, врач онколог, ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Российская Федерация
SPIN: 2611-4840, AuthorID: 589928

Максимов Алексей Юрьевич – д.м.н., профессор, заместитель генерального директора, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9471-3903>, SPIN: 7322-5589, AuthorID: 710705, Scopus Author ID: 56579049500

Вклад авторов:

Кутилин Д. С. – концепция и дизайн исследования, проведение эксперимента, биоинформатический анализ, написание рукописи;
Филиппов Ф. Е. – проведение эксперимента, написание рукописи;
Порханова Н. В. – статистическая обработка данных;
Максимов А. Ю. – редактирование рукописи.