



Е.В. Киселева¹, Ф.С. Нефедьев¹, А.А. Захаренко¹, М.И. Зарайский^{1,2}, Р.Ю. Селиверстов^{2,3}

Полуколичественный анализ микроРНК-21 в слюне и плазме крови как неинвазивный метод диагностики колоректального рака, рака легкого и глиальных опухолей

¹ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

²ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург

³ИМЧ РАН, Санкт-Петербург

E.V. Kiseleva¹, F.S. Nefedev¹, A.A. Zakharenko¹, M.I. Zarski^{1,2}, R.Yu. Seliverstov^{2,3}

Semi-Quantitative Analysis of Mirna-21 in Saliva and Blood Plasma as a Non-Invasive Method for Diagnosing Colorectal Cancer, Lung Cancer and Glial Tumors

¹Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, the Russian Federation

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, the Russian Federation

³N.P. Bekhtereva institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences

Малые некодирующие белок РНК (микроРНК), включая микроРНК-21, в последние годы являются предметом изучения как потенциальные малоинвазивные ранние онкомаркеры.

Цель. Оценить уровни экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови как метода диагностики колоректального рака (КРР), рака легкого (РЛ) и глиальных церебральных опухолей (ГЦО).

Материалы и методы. Уровни экспрессии микроРНК-21 в плазме крови (ПМР-21) и слюне (СМР-21) пациентов с КРР (n = 65), РЛ (n = 14), ГЦО (n = 21) и 66 здоровых добровольцев (КГ) измерены методом полимеразной цепной реакции обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) и выражены в условных единицах (УЕ). Для выявления предикторов КРР, РЛ, ГЦО применяли однофакторный анализ. Для формирования рисков классов наличия онкологического процесса использовали логистическую регрессию.

Результаты. СМР-21 (УЕ) при КРР (9,67 ± 18,52), ГЦО (2,51 ± 2,39), РЛ (12,27 ± 14,78) и КГ (1,30 ± 2,45) и ПМР-21 (УЕ) при КРР (3,71 ± 7,38), ГЦО (2,17 ± 2,05), РЛ (8,69 ± 6,76) и КГ (0,84 ± 0,64) статистически значимо (p < 0,001) отличались между собой. СМР-21, но не ПМР-21, при КРР с небольшой глубиной инвазии опухоли (T *in situ*, T2) был выше, чем при T4 (p = 0,004; p = 0,042). Этого не наблюдалось у больных с РЛ (СМР-21: p = 0,36; ПМР-21: p = 0,6). Предикторами наличия КРР были возраст > 61 года, СМР-21 ≥ 2,0 УЕ или ПМР-21 ≥ 1,6 УЕ (чувствительность и специфичность — 52 % и 89 %, 61 % и 83 % соответственно). Предикторами для РЛ были: возраст ≥ 54 лет, ПМР-21 ≥ 3,5 УЕ или СМР-21 ≥ 2,5 УЕ (чувствительность и специфичность — 78 % и 64 %, 100 % и 86 % соответственно). Предикторами для ГЦО предикторами были: ПМР-21 ≥ 1,5 УЕ или СМР-21 ≥ 1,6 УЕ (чувствительность и специфичность — 57 % и 71 %, 88 % и 77 % соответственно). Регрессионный анализ прогнозирования наличия онкологического процесса на основе СМР-21 хорошо показал себя при КРР (AuROC = 0,79), в отличие от РЛ (AuROC = 0,70) и ГЦО (AuROC = 0,55).

Introduction. Small, non-protein-coding RNAs (miRNAs), including miRNA-21, has been the subject of recent research as potential minimally invasive early tumor markers.

Aim. To evaluate miRNA-21 expression levels in saliva and blood plasma as a diagnostic method for colorectal cancer (CRC), lung cancer (LC), and cerebral gliomas (CG).

Materials and methods. The expression levels of miRNA-21 in blood plasma (PmiR-21) and saliva (SmiR-21) of patients with CRC (n = 65), LC (n = 14), CG (n = 21), and 66 healthy volunteers as a control group (CG), were measured using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and expressed in arbitrary units (AU). Univariate analysis was applied to identify predictors for CRC, LC, and CG. Logistic regression was used to create risk categories for the presence of cancer.

Results. SmiR-21 (AU) in CRC (9.67 ± 18.52), CG (2.51 ± 2.39), LC (12.27 ± 14.78), and CG (1.30 ± 2.45), as well as PmiR-21 (AU) in CRC (3.71 ± 7.38), CG (2.17 ± 2.05), LC (8.69 ± 6.76), and CG (0.84 ± 0.64), differed significantly (p < 0.001). SmiR-21, but not PmiR-21, was higher in CRC with shallow tumor invasion (T *in situ*, T2) compared to T4 (p = 0.004; p = 0.042). This trend was not observed in LC patients (SmiR-21: p = 0.36; PmiR-21: p = 0.6). Predictors for CRC were age > 61 years, SmiR-21 ≥ 2.0 AU, or PmiR-21 ≥ 1.6 AU (sensitivity and specificity — 52 % and 89 %, 61 % and 83 %, respectively). Predictors for LC were age ≥ 54 years, PmiR-21 ≥ 3.5 AU, or SmiR-21 ≥ 2.5 AU (sensitivity and specificity — 78 % and 64 %, 100 % and 86 %, respectively). For CG patients, predictors were PmiR-21 ≥ 1.5 AU or SmiR-21 ≥ 1.6 AU (sensitivity and specificity — 57 % and 71 %, 88 % and 77 %, respectively). Regression analysis for predicting the presence of cancer based on SmiR-21 performed well in CRC (AuROC = 0.79), unlike LC (AuROC = 0.70) and CG (AuROC = 0.55).

Заключение. SMP-21 является перспективным для диагностики онкологических заболеваний и может быть применен как новый неинвазивный тест при КРР, включая ранние его стадии, и при солидных опухолях других локализаций.

Ключевые слова: молекулярная диагностика; микроРНК-21; плазма крови; слюна; полимеразная цепная реакция в реальном времени (ОТ-ПЦР); колоректальный рак (КРР)

Для цитирования: Киселева Е.В., Нефедьев Ф.С., Зарайский М.И., Селиверстов Р.Ю. Полуколичественный анализ микроРНК-21 в слюне и плазме крови как неинвазивный метод диагностики колоректального рака, рака легкого и глиальных опухолей. Вопросы онкологии. 2023;69(5):863–870. doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-5-863-870

✉ Контакты: Киселева Елена Владимировна, cc221@yandex.ru

Conclusion. SmiR-21 shows promise for diagnosing cancer and can be used as a new non-invasive test for CRC, including its early stages, and for solid tumors in other locations.

Keywords: molecular diagnostics; miRNA-21; blood plasma; saliva; real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); colorectal cancer (CRC)

For citation: Kiseleva EV, Nefedev FS, Zakharenko AA, Zaraiski MI, Seliverstov RYu. Semi-quantitative analysis of miRNA-21 in saliva and blood plasma as a non-invasive method for diagnosing colorectal cancer, lung cancer and glial tumors. *Voprosy Onkologii*. 2023;69(5):863–870. (In Russ.). doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-5-863-870

Введение

Хорошо известно, что одним из основных факторов, ассоциированных с выживаемостью пациентов с онкологическим процессом является раннее выявление заболевания, что справедливо как для КРР [1], так и для других солидных раков, например, РЛ и ГЦО [2, 3].

Однако отсутствие ранних клинических симптомов и недостаточная чувствительность традиционных онкомаркеров (СА-19,9, РЭА, АФП) [4] существенно ограничивают раннюю диагностику практически при всех солидных раках. Визуальные методы, такие как ФКС при КРР или КТ легких при РЛ хоть и повышают частоту выявления заболевания, однако их инвазивность и радиационные характеристики лимитируют их применение в качестве метода скрининга [5].

Вышеуказанные недостатки методов диагностики опухолей обозначили необходимость в поиске новых биомаркеров, позволяющих проводить минимально инвазивную раннюю диагностику злокачественных новообразований, а также прогнозировать течение и эффективность терапии, что является одной из приоритетных задач современной онкологии.

В настоящее время разрабатываются новые методы обнаружения рака, в т. ч. основанные на определении уровня экспрессии микроРНК. МикроРНК представляют собой эндогенные одноцепочечные некодирующие малые РНК длиной ~ 22 нуклеотида, которые регулируют более 30 % генома человека.

Способность микроРНК секретироваться во внеклеточное пространство и затем транспортироваться в циркулирующие жидкости организма в удивительно стабильной форме делает их идеальными кандидатами на роль биомаркеров для обнаружения рака с помощью жидкостной биопсии. Инкапсулированные во внеклеточные везикулы или связанные со специальными липидными белками, они устойчивы к расщеплению РНКазами [6]. В этой связи помимо периферической крови они могут быть обнаружены

в различных жидкостях организма, включая слюну, спинномозговую жидкость, асцит, мочу, грудное молоко и сперму [7]. Благодаря своим свойствам, циркулирующие микроРНК эффективно выделяются из биологических жидкостей, а их количество возможно измерить с высокой чувствительностью и специфичностью при помощи ПЦР диагностики в реальном времени, ДНК-микрочипов и метода РНК секвенирования [8].

В процессе изучения микроРНК было показано, что различные молекулы из этой группы участвуют в регуляции инициации туморогенеза, его дальнейшем развитии и метастазировании [9], а уровень экспрессии некоторых микроРНК коррелировал со стадией заболевания. Таким образом, эти микроРНК могут играть потенциальную роль в качестве диагностических и прогностических биомаркеров опухоли [10].

МикроРНК-21 является одной из наиболее известных микроРНК, вовлеченных в развитие рака у человека. Было высказано предположение, что микроРНК-21 действует как потенциальный онкоген. Также отмечено, что микроРНК-21 активируется при широком спектре злокачественных новообразований, включая рак легкого [2], рак желудка [11], рак поджелудочной железы [12], рак печени [13] и рак пищевода [14], однако её диагностическая роль при КРР все еще остается неопределенной [15].

В ряде исследований было показано, что уровень экспрессии циркулирующей микроРНК-21 может отличать больных раком от здоровых людей и предсказывать исходы заболевания. Однако существуют противоречивые результаты в отношении диагностической точности и прогностической ценности данной молекулы [16].

Известно, что микроРНК могут определяться в следовых концентрациях с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в различных биологических жидкостях. В попытке найти новый подход к ранней диагностике опухолей мы исследовали концентрации микроРНК-21 в слюне и плазме крови, как наиболее простых в полу-

чений и не требующих специальной подготовки средах.

Цель работы — оценить уровень экспрессии микроРНК-21в слюне и плазме крови в качестве метода диагностики онкологического процесса при колоректальном раке, раке легкого и глиальных церебральных опухолей.

Материалы и методы

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПСПБГМУ им. И.П. Павлова» Минздрава России № 185от 30.05. 2016 г.

В исследование были включены пациенты с КРР (n = 65), РЛ (n = 14), ГЦО (n = 21) и условно здоровые добровольцы (КГ; n = 66). Статистически значимых различий по полу в четырех группах выявлено не было, однако отмечалось статистическое различие по возрасту в исследуемых группах. Клинические характеристики исследуемых групп представлены в табл. 1.

Критериями включения в исследование были: а) отсутствие хирургического вмешательства по поводу онко-

логической патологии, химиотерапии и лучевой терапии в анамнезе; б) отсутствие любых острых воспалительных заболеваний и гематологической патологии; в) отсутствие метаболических нарушений.

От всех участников исследования было получено письменное информированное согласие.

Всем пациентам производился забор плазмы крови и слюны для определения экспрессии микроРНК-21, а также были выполнены инструментальные исследования (фиброколоноскопия, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, ультразвуковое исследование, рентгенография, биопсия образований) с целью выявления и подтверждения онкологического процесса.

Изучение уровней экспрессии микроРНК-21 в биологическом материале проводилось по стандартной общепринятой схеме полуколичественного анализа, который был описан нами ранее [17, 18]. Тотальная РНК выделялась из слюны и плазмы крови стандартным фенол хлороформным методом, с использованием фенольного реактива ExtractRNA (Евроген, Москва), согласно прилагаемой инструкции.

Реакция обратной транскрипции со специфическими праймерами для микроРНК-21 (табл. 2) выполнялась по технологии StemLoop.

Таблица 1. Клинические характеристики исследуемых групп

Показатель		КРР (n = 65)	РЛ (n = 14)	ГЦО (n = 21)	КГ (n = 66)	p
Пол	Женский	34	7	9	41	0,4024
	Мужской	31	7	12	25	
Возраст, лет (M±S)		66 ± 12	65 ± 10	48 ± 15	52 ± 16	< 0,0001
Т	T in situ	4 (6,15 %)	0			< 0,0001
	T1	0	5 (35,71 %)			
	T2	8 (12,3 %)	6 (42,86 %)			
	T3	22 (33,85 %)	1 (7,14 %)			
	T4	31 (47,69 %)	2 (14,29 %)			
N	N0	29 (44,62 %)	6 (42,86 %)			0,1165
	N1	23 (35,38 %)	6 (42,86 %)			
	N2	13 (20,0 %)	2 (14,28 %)			
M	M0	51 (78,46 %)	12 (85,71 %)			0,5402
	M1	14 (21,54 %)	2 (14,29 %)			
Стадия	0	4 (6,15 %)	0			0,3067
	I	7 (10,77 %)	4 (28,57 %)			
	II	14 (21,54 %)	4 (28,57 %)			
	III	26 (40 %)	3 (21,43 %)			
	IV	14 (21,54 %)	3 (21,43 %)			

Примечание: КРР — колоректальный рак; РЛ — рак легкого; ГЦО — глиальные церебральные опухоли, КГ — условно- здоровые добровольцы

Таблица 2. Праймеры для обратной транскрипции

Праймер	Последовательность
микроРНК-21	5-gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgaactcaac-3
РНК U-6	5-gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacacaataatg-3

Таблица 3. Последовательности праймеров для ПЦР

Праймер	Последовательность
микроРНК-21 (прямой)	5-gcccctagcttatcagactgatg-3
РНК U-6 (прямой)	5-gcgcgtcgtgaagcgttc-3
Общий обратный	gtgcagggtccgaggt

В качестве реактива использовали набор ОТ-1 фирмы Синтол (Москва). Для каждой пробы РНК, выделенной из крови и слюны, готовились по 2 отдельные реакционные смеси для детекции генов микроРНК референц-гена. Каждая реакционная смесь состояла из буфера для обратной транскрипции — 5 мкл, 1 мкл праймера (U6 или МикроРНК-21) в концентрации 1 пмоль, 0,5 мкл фермента обратной транскриптазы фирмы Синтол (Москва) и 3 мкл раствора тотальной РНК, полученном на предыдущем этапе. Температурный профиль реакции: 30 мин. при температуре +16 °С, 30 мин. при температуре +42 °С, 5 мин. при температуре +85 °С с последующим охлаждением. Данный этап проводили на амплификаторе ДТ-Lite (ДНК-Технология, Москва).

Амплификацию проводили на приборе ДТ-Lite (ДНК-Технология, Москва) в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen с использованием набора М-439 (Синтол, Москва) для реализации протокола учета результатов в режиме реального времени. Для каждой пробы крови и слюны готовились по 2 отдельные реакционные смеси для детекции гена интереса микроРНК-21 и референц-гена U6. Каждая реакционная смесь состояла из 10 мкл воды, 10 мкл буфера (Синтол, Москва), 1 мкл прямого праймера (U6 или МикроРНК-21) в концентрации 1 пмоль и 1 мкл общего обратного праймера в концентрации 1 пмоль. Праймеры для ПЦР представлены в табл. 3.

Температурный профиль реакции: 10 мин. при температуре +95 °С и 45 циклов, состоящих из 15 сек. при температуре +95 °С и 1 мин. при температуре +60 °С. Данный этап проводили на амплификаторе ДТ-Lite (ДНК-Технология, Москва).

При расчётах использовали полуколичественную оценку уровней экспрессии микроРНК (УЕ) по протоколу 2– $\Delta\Delta C_t$, где C_t — цикл «выхода» сигнала накопления красителя на экспоненциальный уровень, по геометрическому протоколу, а $\Delta\Delta$ — разница между уровнями C_t для исследуемой микроРНК и гена сравнения U6. Полученные из амплификатора значения C_t вносили в таблицу Microsoft Office Excel 2007, где и производились все расчеты.

При описании числовых шкал использовались среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm S$). Сравнение групп проводили с помощью методов Манна – Уитни для количественных переменных, Хи-квадрат Пирсона для бинарных и категориальных показателей. Для выявления предикторов КРР, РЛ и ГЦО применяли однофакторный анализ. Логистическая множественная регрессия с пошаговым последовательным методом включения факторов в модель использовалась при построении модели прогнозирования КРР, РЛ и ГЦО. Для оценки качества построенных моделей применялась оценка площади под ROC-кривой (AuROC). Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10 и SASJMP [19].

Результаты

Уровни экспрессии микроРНК-21 в слюне (СМР-21) и плазме крови (ПМР-21) в исследуемых группах рака и КГ достоверно отличались между собой (табл. 4).

При сравнительном анализе уровни экспрессии СМР-21 и ПМР-21 в группе КРР, РЛ и ГЦО были значимо выше, чем в КГ. СМР-21 в КГ была ниже, чем в КРР ($p < 0,001$), РЛ ($p < 0,001$), ГЦО ($p < 0,001$). ПМР-21 в КГ также была ниже, чем в КРР ($p = 0,009$), РЛ ($p < 0,001$) и ГЦО ($p = 0,022$). Не было выявлено и статистически значимых различий уровней экспрессии СМР-21 между группами КРР и РЛ ($p = 0,38$), КРР и ГЦО ($p = 0,08$), РЛ и ГЦО ($p = 0,69$). Уровень экспрессии ПМР-21 был выше при РЛ, чем при КРР ($p = 0,001$) и ГЦО ($p = 0,001$). ПМР-21 при КРР был сравним с таковыми при ГЦО ($p = 0,82$).

Таблица 4. Уровни экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме в исследуемых группах

Уровень экспрессии	КРР (n = 65)	РЛ (n = 14)	ГЦО (n = 21)	КГ (n = 66)	p
СМР-21, УЕ	9,67 ± 18,52	12,27 ± 14,78	2,51 ± 2,39	1,30 ± 2,45	< 0,0001
ПМР-21, УЕ	3,71 ± 7,38	8,69 ± 6,76	2,17 ± 2,05	0,84 ± 0,64	< 0,0001

Примечание: СМР-21 — микроРНК-21 в слюне; ПМР-21 — микроРНК-21 в плазме; КРР — колоректальный рак; РЛ — рак легкого; ГЦО — глиальные церебральные опухоли; КГ — условно здоровые добровольцы

Таблица 5. Корреляционный анализ микроРНК-21 в слюне и плазме и некоторых клинических показателей в группе КРР

Показатель	СМР- 21 (УЕ)	ПМР- 21 (УЕ)
Возраст, лет	-0,03	-0,15
Локализация	-0,24	-0,03
Стадия	-0,06	-0,11
T	-0,41*	-0,2
СА19.9 > N	-0,21	-0,1
РЭА > N	-0,16	-0,11
СМР-21 (УЕ)	1	0,31*
ПМР-21 (УЕ)	0,31*	1

Примечание: СМР-21 — микроРНК-21 в слюне; ПМР-21 — микроРНК-21 в плазме, РЭА — раковоэмбриональный антиген

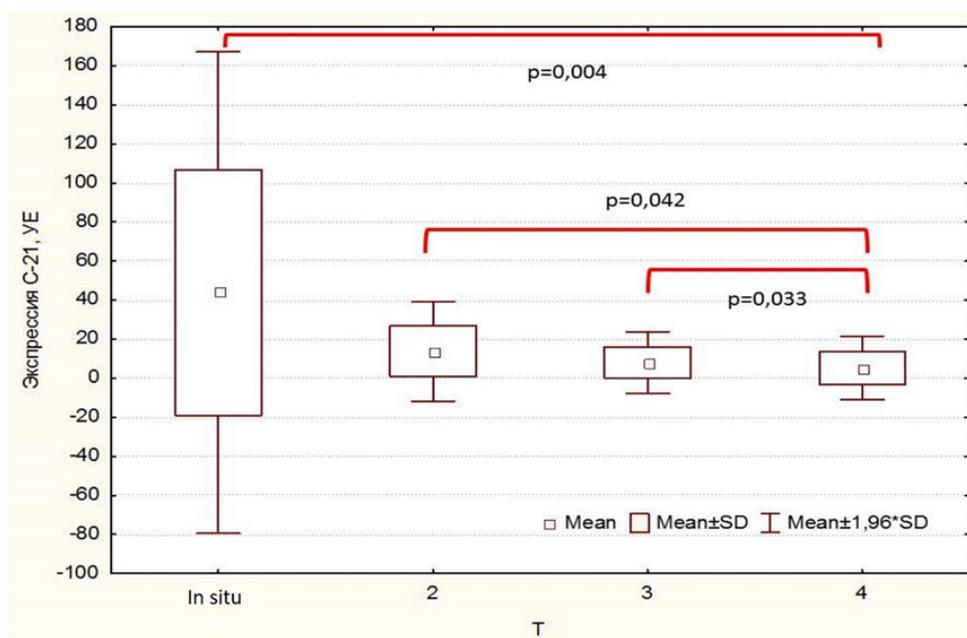


Рис. 1. Экспрессия СМР-21 при различных критериях Т у пациентов с КРР

Таблица 6. Результаты однофакторного анализа при КРР, РЛ и ГЦО

Предиктор	Относительный риск (95 % ДИ)	Уровень Р
	КРР	
СМР-21 ≥ 2,0 УЕ	2,51 (1,76; 3,58)	< 0,0001
ПМР-21 ≥ 1,6УЕ	2,41 (1,75; 3,31)	< 0,0001
Возраст, лет ≥ 61,0	2,65 (1,67; 4,21)	< 0,0001
РЭА >N	2,4 (1,93; 2,99)	< 0,0001
СА-19.9 > N	2,27 (1,85; 2,78)	0,0001
	РЛ	
СМР-21 ≥ 2,5УЕ	6,2 (2,38; 16,18)	< 0,0001
ПМР-21 ≥ 3,5УЕ	23 (7,60; 69,56)	< 0,0001
Возраст, лет ≥ 54,0	9,61 (1,32; 69,95)	0,0032
	ГЦО	
СМР-21 ≥ 1,6УЕ	4,75 (2,06; 10,97)	< 0,0001
ПМР-21 ≥ 1,5УЕ	4,77 (2,37; 9,60)	< 0,0001
Возраст, лет < 63,0	2,42 (0,78; 7,49)	0,0930

Примечание: СМР-21 — микроРНК-21 в слюне; ПМР-21 — микроРНК-21 в плазме; КРР — колоректальный рак; РЛ — рак легкого; ГЦО — глиальные церебральные опухоли; РЭА — раковоэмбриональный антиген

Таблица 7. Регрессионный анализ прогнозирования КРР, РЛ и ГЦО

Фактор	Среднее удельное/максимальное изменение риска, %	Отношение шансов (ДИ 95 %)	Коэфф. регрессии	Р	Значимость регрессии
Прогнозирование КРР					
Константа			-4,7609	< 0,0001	AuROC = 0,789, n = 131, p < 0,0001
СМР-21УЕ	6,1 % / 71,4 %	1,30 (1,11; 1,53)	0,2636	0,0014	
Возраст, лет	1,5 % / 76,4 %	1,07 (1,03; 1,10)	0,0655	< 0,0001	
Прогнозирование РЛ					
Константа			-2,3646	< 0,0001	AuROC = 0,702, n = 80, p < 0,0001
СМР-21УЕ	4,0 % / 90,4 %	1,24 (1,06; 1,45)	0,2169	0,0069	
Прогнозирование ГЦО					
Константа			-2,2905	<0,0001	AuROC = 0,552, n = 87, p < 0,0001
ПМР-21УЕ	21,6 % / 90,6 %	2,42 (1,43; 4,10)	0,8829	0,0010	

Примечание: СМР-21 — микроРНК-21 в слюне; ПМР-21 — микроРНК-21 в плазме; КРР — колоректальный рак; РЛ — рак легкого; ГЦО — глиальные церебральные опухоли

Так как ГЦО не классифицируется по TNM классификации опухолевого процесса, наиболее однородными были группы КРР и РЛ. Эти две группы статистически значимо отличались по степени распространенности опухолевого процесса (критерия Т классификации TNM). Различий по критериям N и M классификации TNM, а также стадии опухолевого процесса выявлено не было (табл. 1).

Уровень экспрессии СМР-21 в группе КРР у пациентов с Т4 был статистически значимо ниже, чем при Т *in situ*, Т2 и Т3 (рис. 1).

Уровень экспрессии ПМР-21 при разных критериях Т опухоли значимо не отличался ($p = 0,85$). При проведении сравнительного анализа уровней экспрессии СМР-21 и ПМР-21 в группе пациентов с РЛ по критерию Т классификации TNM значимых отличий выявлено не было ($p = 0,36$ и $p = 0,6$ соответственно).

Корреляционный анализ показал статистически значимую прямую связь СМР-21 с ПМР-21 и обратную связь с критерием Т по классификации TNM ($p \leq 0,05$) (табл. 5).

В качестве наиболее значимых предикторов наличия онкологического процесса были выявлены СМР-21, ПМР-21, а также возраст для любого из исследуемых типов рака (табл. 6).

Чувствительность и специфичность уровня экспрессии ПМР-21 $\geq 1,6$ УЕ и СМР-21 ≥ 2 УЕ в качестве маркеров КРР составили 52 % и 89 % и 61 % и 83 %, РЛ при ПМР-21 $\geq 3,5$ УЕ и СМР-21 $\geq 2,5$ УЕ — 78 % и 100 % и 64 % и 86 %, для ГЦО при ПМР-21 $\geq 1,5$ УЕ и СМР-21 $\geq 1,6$ УЕ — 57 % и 88 % и 71 % и 77 % соответственно.

Результаты регрессионного анализа прогнозирования колоректального рака, рака легкого, глиальных церебральных опухолей на основе уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне представлены в табл. 7.

Обсуждение

МикроРНК-21 является онкогенной микроРНК, чья сверхэкспрессия была показана в различных опухолях человека. Стабильность микроРНК в различных биологических жидкостях, а также возможность их выделения простыми методами делает их перспективными новыми неинвазивными биомаркерами, представляющими особый интерес [20].

В данном исследовании были проанализированы уровни экспрессии микроРНК-21 в слюне и в плазме, как наиболее доступных биосред, у пациентов с КРР, РЛ, ГЦО и у здоровых добровольцев. Выявлено повышение уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови в группах пациентов с КРР, РЛ и ГЦО по срав-

нению с группой здоровых добровольцев, как и было продемонстрировано в ряде исследований [17, 18, 21].

Уровень экспрессии СМР-21 обладает высокими чувствительностью и специфичностью, а также хорошими ПЦП и ПЦО в качестве маркера КРР и других исследованных раков. При КРР чувствительность и специфичность СМР-21 выше, чем РЭА и СА 19.9 [22] и сравнима с тестом FOB [23].

При проведении однофакторного анализа были определены ключевые предикторы онкологического процесса — СМР-21, ПМР-21 и возраст. Прогностическое значение в отношении КРР, РЛ и ГЦО такого фактора как возраст хорошо известно. Также в последнее время появились исследования, оценивающие уровень экспрессии ПМР-21 при данных видах рака [2, 17, 18], тогда как прогностическое значение СМР-21 для КРР, РЛ и ГЦО нами продемонстрировано впервые.

Регрессионный анализ прогнозирования наличия КРР, РЛ и ГЦО с включением в модель СМР-21 и ПМР-21 выполнен нами впервые (табл. 7). Модель прогнозирования КРР, включившая СМР-21 и возраст, обладала лучшими характеристиками качества по сравнению с моделями прогнозирования РЛ и ГЦО, что позволяет сделать предварительный вывод о том, что СМР-21 хорошо рекомендует себя в качестве маркера КРР по сравнению с РЛ и ГЦО. В группе РЛ и ГЦО были включено небольшое число пациентов, что является одним из ограничений нашего исследования. Валидизация СМР-21 как метода ранней диагностики и прогнозирования КРР и других онкологических процессов требует дальнейших исследований на большей когорте пациентов.

Одним из интересных и впервые продемонстрированных наблюдений нашего исследования стал факт более высокого уровня экспрессии СМР-21 при небольшой глубине инвазии опухоли при КРР (рис. 1), а также наличие обратной корреляции СМР-21 и показателя Т, классификации TNM (табл. 5). Ранее нами было показано отсутствие значимых индивидуальных корреляций и линейной регрессии экспрессии микроРНК-21 в плазме и слюне у пациентов с КРР [18], что указывает на различные регуляторные механизмы, определяющие уровень экспрессии этой микроРНК в различных биологических материалах. Кроме того, в известной нам литературе [24, 25] исследования уровней экспрессии микроРНК-21 описаны в основном в плазме пациентов с КРР. Данные по слюнной микроРНК у этих больных практически не встречаются. С нашей точки зрения можно лишь предположить, что СМР-21 при

KPP играет ключевую роль в основном при начальных стадиях онкологического процесса до инвазии и метастазирования, однако это требует дальнейших исследований.

Заключение

Определение уровня экспрессии СМР-21 является перспективным в диагностике онкологических заболеваний и может быть применен как новый неинвазивный тест при КРР, включая ранние его стадии, а также при других онкологических процессах.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Funding

The study was performed without external funding.

Участие авторов:

Киселева Е.В. — написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных;

Нефедьев Ф.С. — написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи;

Захаренко А.А. — написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;

Зарайский М.И. — обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных;

Селиверстов Р.Ю. — получение данных для анализа, анализ полученных данных.

Authors' contributions

Kiselyova E.V. — contributed to manuscript writing, conducted a literature review on the article's topic, acquired data for analysis, and analyzed the obtained data;

Nefedev F.S. — contributed to manuscript writing and conducted a literature review on the article's topic;

Zakarenko A.A. — contributed to manuscript writing, conducted a literature review on the article's topic, and analyzed the obtained data;

Zarayskiy M.I. — conducted a literature review on the article's topic, acquired data for analysis, and analyzed the obtained data;

Seliverstov R.Y. — acquired data for analysis and analyzed the obtained data.

ЛИТЕРАТУРА

- Ciccolallo L, Capocaccia R, Coleman MP, et al. Survival differences between European and US patients with colorectal cancer: role of stage at diagnosis and surgery. *Gut*. 2005;54(2):268-73. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.044214>.
- Wei J, Gao W, Zhu CJ, et al. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer*. 2011;30(6):407-14. <https://doi.org/10.5732/cjc.010.10522>.
- Crocetti E, Trama A, Stiller C, et al. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur J Cancer*. 2012;48(10):1532-42. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.12.013>.
- Немцова М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярно-биологические маркеры в практической онкологии. Лабораторная служба. 2014;3(1):14-22 [Nemtsova MV, Kushlinskiĭ NE. Molecular Biological Markers in Oncological Practice. Laboratory Service. 2014;3(1):14-22 (In Russ.)].
- Wang H, Peng R, Wang J, et al. Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. *Clin Epigenetics*. 2018;10:59. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0492-1>.
- Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett*. 2013;329(2):125-36. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.001>.
- Vanni I, Alama A, Grossi F, et al. Exosomes: a new horizon in lung cancer. *Drug Discov Today*. 2017;22(6):927-36. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.03.004>.
- Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 2012;12:358-369. <https://doi.org/10.1038/nrg3198>.
- Baek D, Villén J, Shin C, et al. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008;455(7209):64-71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>.
- Ferracin M, Veronese A, Negrini M. Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10(3):297-308. <https://doi.org/10.1586/erm.10.11>.
- Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer*. 2010;102(7):1174-9. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605608>.
- Ali S, Almhanna K, Chen W, et al. Differentially expressed miRNAs in the plasma may provide a molecular signature for aggressive pancreatic cancer. *Am J Transl Res*. 2010;3(1):28-47.
- Bihrer V, Waidmann O, Friedrich-Rust M, et al. Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(10):e26971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026971>.
- Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2011;105(1):104-11. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.198>.
- Xu F, Xu L, Wang M, et al. The accuracy of circulating microRNA-21 in the diagnosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2015;17(5):O100-7. <https://doi.org/10.1111/codi.12917>.
- Zeng W, Tu Y, Zhu Y, et al. Predictive power of circulating miRNAs in detecting colorectal cancer. *Tumour Biol*. 2015;36(4):2559-67. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2872-2>.
- Селиверстов Р.Ю., Зарайский М.И., Тюрин Р.В., и др. МикроРНК в мониторинге эволюции глиальных церебральных опухолей. Сибирский онкологический журнал. 2020;19(3):47-53 [Seliverstov RYu, Zarayskiy MI, Tyurin RV, et al. MicroRNA in monitoring of the evolution of glial cerebral tumors. Siberian Journal of Oncology. 2020;19(3):47-53 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2020-19-3-47-53>.
- Sazanov AA, Kiselyova EV, Zakharenko AA, et al. Plasma and saliva miR-21 expression in colorectal cancer patients. *J Appl Genet*. 2017;58(2):231-237. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0379-9>.
- О. Реброва. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA.

- МедиаСфера: Москва, 2002 [Rebrova OYu. Statistical analysis of medical data. Application of the application package STATISTICA. MediaSphere: Moscow, 2002 (In Russ.)].
20. Ferracin M, Veronese A, Negrini M. Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010;10(3):297-308. <https://doi.org/10.1586/erm.10.11>.
 21. Salem M, Okba S, Morad S, et al. Altered expression of miRNA-155 and miRNA-21 and higher numbers of T cells in the peripheral blood of early diagnosed lung cancer patients. *Int J Cancer Biomed Res.* 2020;4(1):19-25. <https://doi.org/10.21608/jcbr.2020.21668.1009>.
 22. Knudsen AB, Zauber AG, Rutter CM, et al. Estimation of benefits, burden, and harms of colorectal cancer screening strategies: modeling study for the US preventive services task force. *JAMA.* 2016;315(23):2595-609. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.6828>.
 23. Fitzpatrick-Lewis D, Ali MU, Warren R, et al. Screening for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer.* 2016;15(4):298-313. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.03.003>.
 24. Nielsen BS, Jørgensen S, Fog JU, et al. High levels of microRNA-21 in the stroma of colorectal cancers predict short disease-free survival in stage II colon cancer patients. *Clin Exp Metastasis.* 2011;28(1):27-38. <https://doi.org/10.1007/s10585-010-9355-7>.
 25. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA.* 2008;299(4):425-36. <https://doi.org/10.1001/jama.299.4.425>.

Поступила в редакцию 22.03.2023

Прошла рецензирование 30.06.2023

Принята в печать 31.08.2023

Сведения об авторах

Киселева Елена Владимировна / Kiseleva Elena Vladimirovna / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2830-1687>.

Нефедьев Федор Сергеевич / Nefedev Fedor Sergeevich / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6706-5499>.

Захаренко Александр Анатольевич / Zakharenko Alexander Anatolevich / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8514-5377>.

Зарайский Михаил Игоревич / Zaraiski Michail Igorevich / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7605-4369>.

Селиверстов Роман Юрьевич / Seliverstov Roman Yurevich / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9284-1119>.