

Экспрессия циркулирующих микроРНК в связи с лимфогенным метастазированием рака предстательной железы

М.Ю. Шкурников, Ю.А. Макарова, Е.Н. Князев, А.А. Зотиков, К.М. Нюшко, Б.Я. Алексеев, А.Д. Каприн

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

Контакты: Максим Юрьевич Шкурников mshkurnikov@imscs.msu.ru

Введение. Метастазы в лимфатические узлы при раке предстательной железы (РПЖ) являются неблагоприятным прогностическим фактором. Разработка неинвазивных методов диагностики метастазов имеет важное клиническое значение.

Цель исследования – поиск циркулирующих микроРНК-маркеров метастазов в лимфатические узлы и изучение взаимосвязи профилей экспрессии дифференциально экспрессированных микроРНК плазмы и их генов-мишеней в первичных опухолях.

Материалы и методы. Собрана коллекция из 10 образцов плазмы крови больных РПЖ стадии pN0M0 и 10 образцов стадии pN1M0. Профили экспрессии микроРНК плазмы проанализированы на чипах GeneChip miRNA 4.0 (Affymetrix, США). Для микроРНК с различным уровнем экспрессии между двумя группами не менее чем в 2 раза ($p < 0,05$) проведен поиск генов-мишеней. Осуществлен биоинформационный анализ транскриптомов 392 первичных опухолей предстательной железы коллекции PRAD базы данных TCGA (TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov/>): 318 образцов стадии pN0M0 и 74 – стадии pN1M0.

Результаты. У группы pN1M0 выявлено значимое снижение уровня экспрессии 17 микроРНК в плазме крови. Анализ профилей экспрессии образцов первичных опухолей показал, что из 88 генов, уровень экспрессии которых изменился в 1,5 раза и более, 11 служат мишенями 17 обнаруженных нами микроРНК. Интересно, что в большинстве (8 из 11) случаев экспрессия генов-мишеней в первичной опухоли возрастает.

Заключение. Обнаружено снижение уровня экспрессии 17 микроРНК плазмы крови у больных РПЖ с метастазами в лимфатические узлы (pN1M0) по сравнению с больными без метастазов (pN0M0). Анализ транскриптомов первичных опухолей позволяет предполагать, что обнаруженные в плазме изменения отражают происходящие в процессе лимфогенного метастазирования изменения профилей экспрессии микроРНК и их генов-мишеней в первичных опухолях. Обнаруженные микроРНК могут служить потенциальными маркерами лимфогенного метастазирования при РПЖ.

Ключевые слова: рак предстательной железы, лимфатический узел, микроРНК, регионарное метастазирование

Для цитирования: Шкурников М.Ю., Макарова Ю.А., Князев Е.Н. и др. Экспрессия циркулирующих микроРНК в связи с лимфогенным метастазированием рака предстательной железы. Онкоурология 2018;14(1):87–93.

DOI: 10.17650/1726-9776-2018-14-1-87-93

Circulating microRNA expression in connection with prostate cancer lymphogenous metastasis

M.Yu. Shkurnikov, Yu.A. Makarova, E.N. Knyazev, A.A. Zotikov, K.M. Nyushko, B.Ya. Alekseev, A.D. Kaprin

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

Background. Lymph node metastases in prostate cancer (PC) are a negative prognostic factor. Non-invasive methods for their diagnostics are of primary importance.

Objectives are identification of miRNA markers of lymph node metastases in plasma of PC patients and investigation of changes in primary tumors transcriptomes and plasma miRNA profiles during metastasis.

Materials and methods. Plasma of 20 PC patients (10 with pN0M0 and 10 with pN1M0 stage) were collected and plasma miRNA expression was profiled on GeneChip miRNA 4.0 arrays (Affymetrix, USA). Target genes were searched for miRNAs with significant expression difference between pN0M0 and pN1M0 groups (fold change ≥ 2 ; $p < 0,05$). In addition, bioinformatic analysis of 392 PC primary tumors transcriptomes from PRAD collection (TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov/>) was done (318 for pN0M0 stage and 74 for pN1M0 stage).

Results. The level of 17 miRNAs were significantly lower in plasma of pN1M0 group. Analysis of primary tumors expression profiles revealed 88 genes with significantly different expression between pN0M0 and pN1M0 groups (fold change $\geq 1,5$; $p < 0,05$). 11 of these genes are the potential targets of 17 miRNAs with lower levels in plasma of pN1M0 group. Interestingly, in most cases (8 out of 11) expression of these genes in primary tumor is elevated.

Conclusion. The level of 17 miRNAs were significantly lower in plasma of PC patients with lymph nodes metastases (pN1M0). Analysis of primary tumor transcriptomes revealed a possible connection between miRNAs and their target genes levels in primary tumor and plasma. 17 plasma miRNAs found in this work could be a novel non-invasive markers of lymph nodes metastases in PC.

Key words: prostate cancer, lymph node, microRNA, regional metastasis

For citation: Shkurnikov M.Yu., Makarova Yu.A., Knyazev E.N. et al. Circulating microRNA expression in connection with prostate cancer lymphogenous metastasis. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2018;14(1):87–93.

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) — одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований у мужчин в пожилом возрасте. Метастазирование РПЖ в лимфатические узлы является неблагоприятным прогностическим фактором [1]. Клетки первичной опухоли попадают в лимфатические капилляры и затем проникают в лимфатические узлы. Согласно современным представлениям этому процессу способствуют различные факторы, секретируемые опухолью. С их помощью формируются так называемые преме́тастатические ниши, облегчающие опухолевой клетке закрепление в новом окружении [2, 3]. Ряд данных свидетельствует о том, что короткие РНК (микроРНК, секретируемые опухолью) могут способствовать формированию таких преме́тастатических ниш [4]. Также на процесс метастазирования, вероятно, могут влиять микроРНК, секретируемые другими клетками организма.

МикроРНК представляют собой короткие одноцепочечные молекулы длиной ~22 н. Они транскрибируются в составе длинных предшественников, из которых эндонуклеаза Drosha вырезает так называемые пре-микроРНК — шпильчатую структуру длиной около 70 н., которая экспортируется в цитоплазму. В цитоплазме другая эндонуклеаза — Dicer — подвергает пре-микроРНК дальнейшему процессингу, в результате которого образуется двуцепочечная РНК длиной ~22 н. Эта РНК ассоциирует с одним из белков семейства Ago, который расплетает РНК-дуплекс. Одна из цепей затем деградирует. В результате микроРНК в комплексе с Ago образует сердцевину RISC (RNA-induced silencing complex). За счет комплементарных РНК—РНК-взаимодействий RISC ассоциирует с мишенями матричной РНК, что вызывает репрессию трансляции и последующую деградацию матричной РНК. Оказалось, что микроРНК могут секретироваться клетками и, возможно, выполнять роль переносчиков сигнала. К настоящему времени циркулирующие микроРНК обнаружены во всех биологических жидкостях, в том числе в плазме крови [4].

Чрезвычайно важным представляется выявление специфических изменений состава циркулирующих микроРНК плазмы в ходе метастазирования. Это может пролить свет на механизмы метастазирования, будет способствовать разработке новых подходов к лечению метастазов и малоинвазивной диагностике их образования. В частности, создание тест-сис-

тем на основе анализа профиля циркулирующих микроРНК позволит избежать применения расширенной тазовой лимфодиссекции. В данной работе были исследованы профили экспрессии циркулирующих микроРНК плазмы у больных РПЖ стадий pN0M0 и pN1M0. Также было проведено ретроспективное изучение профилей экспрессии генов первичных опухолей предстательной железы с метастазами в регионарные лимфатические узлы и без них.

Материалы и методы

Коллекция образцов плазмы крови 20 больных РПЖ была сформирована в ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. Коллекция состояла из 2 частей: в группу miR-pN0M0 были включены 10 образцов пациентов без поражения регионарных лимфатических узлов и отдаленных метастазов, в группу miR-pN1M0 — 10 образцов пациентов с метастазами в регионарные лимфатические узлы.

Выделение плазмы осуществляли согласно разработанному ранее протоколу, минимизирующему гемолиз и выход микроРНК из форменных элементов крови [5]. Уровень гемолиза оценивали спектрофотометрически [6]. Выделение тотальной РНК производили из 200 мкл плазмы крови путем гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с последующей сорбцией на кремниевой мембране с помощью набора реагентов miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя.

Образцы РНК анализировали с помощью микрочипов GeneChip miRNA 4.0 (Affymetrix, США), детектирующих все некодирующие и малые РНК, входящие в базу данных miRBase v. 20, включая зрелые и незрелые микроРНК. Совместную предобработку CEL-файлов и оценку экспрессий индивидуальных наборов проб осуществляли с помощью пакета программного обеспечения Transcriptome Analysis Console (сборка 4.0.0.25) в режиме ANOVA eBayes. Из анализа были исключены микроРНК с кодами MIMAT более 2000, поскольку большинство из них являются слабо верифицированными. МикроРНК с разницей представленности между группами miR-pN0M0 и miR-pN1M0 не менее чем в 2 раза и уровнем достоверности $p < 0,05$ после поправки Бенджамини—Хохберга отбирали для последующего анализа. Для отобранных микроРНК проводили поиск генов-мишеней с использованием базы данных miRTarBase [7]. Среди найденных

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов

Table 1. Clinical characteristics of the patients

Характеристика Characteristic	ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia		TCGA-PRAD	
	Группа miR- pN0M0 (n = 10) miR-pN0M0 group (n = 10)	Группа miR- pN1M0 (n = 10) miR-pN1M0 group (n = 10)	Группа seq- pN0M0 (n = 318) seq-pN0M0 group (n = 318)	Группа seq- pN1M0 (n = 74) seq-pN1M0 group (n = 74)
Возраст, лет Age, years	66,2 ± 9,7	61,7 ± 4,3	61,29 ± 6,62	61,59 ± 7,0
Классификация TNM: TNM classification:				
T1N0M0	—	—	2	—
T2N0M0	6	—	132	—
T3–4N0M0	4	—	184	—
ТлюбаяN1M0 TanyN1M0	—	10	—	74
Сумма баллов по шкале Глисона: Total Gleason score:				
≤6	4	4	19	—
7	2	3	183	12
8	2	—	40	14
9	1	3	75	46
10	1	—	1	2
Уровень простатического специфического антигена, нг/мл: Prostate-specific antigen level, ng/ml:				
нет данных no data	—	—	17	9
<10	6	7	272	58
10–20	2	1	7	3
>20	2	2	22	4
Уровень простатического специфического антигена (среднее значение ± стандартное отклонение), нг/мл Prostate-specific antigen level (mean ± standard deviation), ng/ml	11,4 ± 9,7	8,2 ± 8,9	32,9 ± 189,7	23,8 ± 122,2

Примечание. Все эксперименты проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации.

Note. All experiments were conducted in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki.

генов-мишеней отбирали гены, являющиеся мишенями по меньшей мере 2 из отобранных микроРНК.

Для проведения ретроспективного анализа из коллекции PRAD базы данных TCGA (TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov/>) были получены результаты секвенирования РНК опухолей 392 пациентов с РПЖ, относящихся к 2 группам: в группу seq-pN0M0 включены данные 318 больных РПЖ без поражения регионарных лимфатических узлов, в группу seq-pN1M0 – данные 74 больных РПЖ с поражением регионарных лимфатических узлов.

Клиническая характеристика групп пациентов представлена в табл. 1.

Результаты

Анализ профиля микроРНК плазмы больных РПЖ у группы miR-pN1M0 выявил значимое снижение уровня экспрессии 17 циркулирующих микроРНК плазмы крови по сравнению с группой miR-pN0M0 (табл. 2). Интересно, что повышения уровня каких-либо циркулирующих микроРНК в плазме крови не обнаружено. Количество молекул различных видов микроРНК в плазме сильно отличается, причем 10 наиболее высокопредставленных видов составляют ~85 % от общего числа молекул микроРНК в плазме [8]. Среди обнаруженных нами 5 микроРНК входят в десятку наиболее высокопредставленных микроРНК плазмы (см. табл. 2) [8, 9].

Таблица 2. Изменение уровня циркулирующих микроРНК в плазме крови пациентов групп *miR-pN0M0* и *miR-pN1M0*

Table 2. Changes in circulating microRNA plasma levels in patients from the *miR-pN0M0* and *miR-pN1M0* groups

№ No.	МикроРНК MicroRNA	Номер в базе данных miRBase Number in the miRBase database	Кратность изменения Fold change	<i>p</i>
1	hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	-14,98	0,0107
2	hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	-11,22	0,0031
3	hsa-miR-320a	MIMAT0000510	-7,34	0,0031
4	hsa-miR-451a	MIMAT0001631	-6,94	0,0328
5	hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	-6,35	0,0011
6	hsa-let-7c-5p	MIMAT0000064	-6,18	0,0013
7	hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	-4,62	0,0035
8	hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	-4,6	0,0031
9	hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	-4,49	0,0044
10	hsa-miR-185-5p	MIMAT0000455	-4,24	0,0318
11	hsa-miR-23a-3p	MIMAT0000078	-3,87	0,0031
12	hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	-3,52	0,0062
13	hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	-3,14	0,0035
14	hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445	-2,91	0,0044
15	hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	-2,67	0,0373
16	hsa-miR-25-3p	MIMAT0000081	-2,33	0,0034
17	hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	-2,06	0,014

Примечание. Жирным шрифтом выделены названия микроРНК, которые входят в число 10 наиболее высокопредставленных в плазме.

Note. MicroRNAs among the ten most abundant in plasma are shown in bold.

Среди потенциальных мишеней этих микроРНК, определенных с помощью miRTarget, оказалось 2828 генов, каждый из которых является мишенью по меньшей мере для 2 из них.

Были проанализированы данные секвенирования РНК образцов первичных опухолей предстательной железы, содержащиеся в базе данных TCGA. Сравнительный анализ 2 групп (*seq-pN0M0* и *seq-pN1M0*) показал, что 88 генов имеют значимую ($p < 0,05$) разницу в экспрессии в 1,5 раза и более. Из них 11 генов являются мишенями 2 и более отобранных нами микроРНК, причем экспрессия 8 из этих генов повысилась у группы *seq-pN1M0* (табл. 3).

Эти данные согласуются с обнаруженной нами пониженной экспрессией микроРНК, регулирующих эти гены. Кроме того, диапазон изменений (~1,5 раза) соответствует эффекту, который обычно оказывают микроРНК на свои гены-мишени. Экспрессия еще 3 генов понизилась (см. табл. 3), что, вероятно, об-

условлено причинами, не связанными с обнаруженными нами микроРНК. За различные клеточные процессы отвечают 8 генов с увеличенной экспрессией, однако для всех них выявлена повышенная экспрессия в злокачественных опухолях. Так, увеличенная экспрессия бета-тубулина 3 (*TUBB3*) ассоциирована с повышенной агрессивностью опухоли при РПЖ [9]. Высокие уровни экспрессии кинезинов 18В и 20А (*KIF18B* и *KIF20A*) связаны с неблагоприятным течением различных злокачественных заболеваний [10, 11]. Экспрессия убиквитинконъюгирующего фермента E2C (*UBE2C*) повышена при многих видах рака, включая РПЖ [12]. Экспрессия киназы *MELK* увеличена на поздних стадиях РПЖ. Интересно, что уровень ее экспрессии коррелирует с уровнем экспрессии *UBE2C* [13]. Повышенная экспрессия *CDC20*, вовлеченного в контроль клеточного цикла, увеличивает риск развития рецидива РПЖ [13]. Повышенная экспрессия регуляторной субъединицы нуклеотидредук-

Таблица 3. Гены-мишени 2 и более микроРНК, экспрессия которых отличается между группами seq-pN0M0 и seq-pN1M0

Table 3. Target genes of 2 or more microRNAs with different expression between the seq-pN0M0 and seq-pN1M0 groups

№ No.	Ген Gene	Число микроРНК Number of microRNAs	Кратность изменения Fold change	p
1	TUBB3	2	2,06	0,0003
2	KIF18B	2	1,88	0,0004
3	UBE2C	4	1,82	0,0053
4	KIF20A	2	1,74	0,0065
5	CDC20	2	1,72	0,0024
6	RRM2	8	1,69	0,0159
7	BIRC5	3	1,66	0,0343
8	MELK	4	1,65	0,0358
9	SMOC1	4	-2,00	0,0402
10	ACPP	2	-2,01	0,0012
11	ANPEP	2	-3,95	0,0014

тазы (*RRM2*) обнаружена в ряде опухолей и положительно коррелирует с их способностью к метастазированию [14]. Наконец, экспрессия ингибитора апоптоза *BIRC5* повышена на поздних стадиях РПЖ [15].

Обсуждение

Мы выявили снижение уровня экспрессии 17 микроРНК у больных РПЖ с поражением регионарных лимфатических узлов (см. табл. 2). В плазме крови, как правило, обнаруживают 300–600 видов микроРНК [6, 9]. Источником микроРНК плазмы служат различные клетки. Главным образом, это клетки крови и тромбоциты [16, 17], но также и клетки удаленных органов. Кроме того, источником микроРНК служат опухоли [18]. Обнаружено даже, что может коррелировать изменение уровней микроРНК в опухоли и плазме крови [19].

МикроРНК плазмы крови значительно (в десятки и сотни раз) отличаются друг от друга по уровню представленности. Источниками наиболее высокопредставленных микроРНК служат клетки крови, хотя, очевидно, не только они, так как эти микроРНК имеют высокий уровень экспрессии и во многих других типах клеток [16]. Наибольшие (снижение более чем в 10 раз) изменения уровня обнаружены нами как раз для таких высокопредставленных микроРНК *hsa-miR-16-5p* и *hsa-miR-92a-3p* (см. табл. 2). Интересно, что *hsa-miR-16*, которая замыкает десятку наиболее высокопредставленных микроРНК плазмы крови [8], является хорошо изученной онкосупрессорной микроРНК. Снижение ее экспрессии в опухолях предстательной железы и клетках микроокружения

(cancer-associated fibroblasts) способствует росту и метастазированию опухоли [20, 21]. Для микроРНК *hsa-miR-92a-3p* (12 % от общего числа молекул микроРНК) [8] также была обнаружена сниженная экспрессия в низкодифференцированном РПЖ (сумма баллов по шкале Глисона ≥ 8) по сравнению с высокодифференцированными формами (сумма баллов по шкале Глисона 6) [22]. Таким образом, наши данные для плазмы крови согласуются с полученными ранее для тканей предстательной железы и могут свидетельствовать о том, что, помимо клеток крови, изменения экспрессии микроРНК предстательной железы также вносят вклад в изменения уровней микроРНК *hsa-miR-16* и *hsa-miR-92* плазмы.

Только 5 из 17 микроРНК, детектированных нами (см. табл. 2), входят в десятку наиболее высокопредставленных микроРНК плазмы. Это позволяет предполагать, что изменения уровней циркулирующих микроРНК связаны не только с клетками крови. В пользу этого предположения свидетельствует и то, что из 9 микроРНК, высвобождающихся в плазму при гемолизе эритроцитов (они же присутствуют в нормальной плазме вследствие секреции эритроцитами) [5], экспрессия 3 (*hsa-miR-20b*, *hsa-miR-107* и *hsa-miR-486*) не меняется у групп *miR-pN0M0* и *miR-pN1M0*.

С другой стороны, по данным крупномасштабного секвенирования все 17 микроРНК (см. табл. 2) обнаружены в ткани предстательной железы. Более того, они входят в 18 % наиболее высокопредставленных микроРНК предстательной железы [23]. Сравнение профилей экспрессии микроРНК первичных

опухолей у больных с метастазами в лимфатические узлы и без них (pT2/T3N1 и pT2/T3N0) показало, что из 17 детектированных нами микроРНК в группе pT2/T3N1 снижается экспрессия 13 (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-320a, hsa-miR-451a, hsa-miR-17-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-20a-5p) [23]. Это позволяет предполагать, что наблюдаемые нами изменения профиля микроРНК плазмы в большой степени обусловлены изменением экспрессии микроРНК в ткани опухоли.

При анализе базы данных TCGA нами обнаружено, что из 88 генов, экспрессия которых отличается в первичных опухолях групп seq-pN0M0 и seq-pN1M0, 11 генов служат мишенями 2 и более детектированных нами микроРНК (см. табл. 3). Экспрессия 8 из этих генов повышена в группе seq-pN1M0, причем все они являются онкогенами. Это соответствует предположению о том, что наблюдаемые изменения профиля микроРНК плазмы обусловлены снижением уровня микроРНК в первичной опухоли. Результат этого снижения – повышение экспрессии генов-мишеней. Альтернативным является предположение о том, что изменение уровня микроРНК в плазме вызвано изменениями метаболизма клеток микроокружения

опухоли или других клеток организма в результате усиливающегося влияния растущей опухоли на организм. В этом случае микроРНК плазмы могли быть абсорбированы опухолью и оказали влияние на экспрессию опухолевых генов. Вопрос о возможной коммуникации между клетками организма с помощью циркулирующих микроРНК в настоящее время широко обсуждается. Получены убедительные доказательства ее существования, в том числе между нормальными и опухолевыми клетками [2, 4]. Дальнейшие исследования могут прояснить, какой из этих 2 сценариев реализован в данном случае.

Заключение

В ходе настоящего исследования обнаружено снижение уровня экспрессии 17 микроРНК плазмы у больных РПЖ с метастазами в лимфатические узлы (pN1M0) по сравнению с пациентами без метастазов (pN0M0). Анализ транскриптомов первичных опухолей позволяет предполагать, что выявленные в плазме изменения отражают происходящие в процессе лимфогенного метастазирования изменения профилей экспрессии микроРНК и их генов-мишеней в первичных опухолях. Поэтому обнаруженные микроРНК могут служить потенциальными маркерами лимфогенного метастазирования при РПЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Smith J.A., Seaman J.P., Gleidman J.B., Middleton R.G. Pelvic lymph node metastasis from prostatic cancer: influence of tumor grade and stage in 452 consecutive patients. *J Urol* 1983;130(2):290–2. PMID: 6876275.
- Turchinovich A., Samatov T.R., Tonevitsky A.G., Burwinkel B. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet* 2013;4:119. DOI: 10.3389/fgene.2013.00119. PMID: 23825476.
- Peinado H., Zhang H., Matei I.R. et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer* 2017;17(5):302–17. DOI: 10.1038/nrc.2017.6. PMID: 28303905.
- Makarova J.A., Shkurnikov M.U., Wicklein D. et al. Intracellular and extracellular microRNA: an update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem* 2016;51(3–4):33–49. DOI: 10.1016/j.proghi.2016.06.001. PMID: 27396686.
- Shkurnikov M.Y., Knyazev E.N., Fomicheva K.A. et al. Analysis of plasma microRNA associated with hemolysis. *Bull Exp Biol Med* 2016;160(6):748–50. DOI: 10.1007/s10517-016-3300-y. PMID: 27165077.
- Шкурников М.Ю., Макарова Ю.А., Князев Е.Н. и др. Профиль микроРНК плазмы крови здоровых доноров. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2015;160(11):577–9. [Shkurnikov M.Yu., Makarova Yu.A., Knyazev E.N. et al. Profile of microRNA in blood plasma of healthy humans. *Bulletin eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2015;160(11):577–9. (In Russ.)].
- Chou C.H., Chang N.W., Shrestha S. et al. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res* 2015;44(D1):D239–47. DOI: 10.1093/nar/gkv1258. PMID: 26590260.
- Brenu E.W., Ashton K.J., Batovska J. et al. High-throughput sequencing of plasma microRNA in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *PLoS One* 2014;9(9):e102783. DOI: 10.1371/journal.pone.0102783. PMID: 25238588.
- Williams Z., Ben-Dov I.Z., Elias R. et al. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(11):4255–60. DOI: 10.1073/pnas.1214046110. PMID: 23440203.
- Liao W., Huang G., Liao Y. et al. High KIF18A expression correlates with unfavorable prognosis in primary hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2014;5(21):10271–9. DOI: 10.18632/oncotarget.2082. PMID: 25431949.
- Zhang W., He W., Shi Y. et al. High expression of KIF20A is associated with poor overall survival and tumor progression in early-stage cervical squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2016;11(12):e0167449. DOI: 10.1371/journal.pone.0167449. PMID: 27941992.
- Chen Z., Zhang C., Wu D. et al. Phospho-MED1-enhanced UBE2C locus looping drives castration-resistant prostate cancer growth. *EMBO J* 2011;30(12):2405–19. DOI: 10.1038/emboj.2011.154. PMID: 21556051.
- Kuner R., Fälth M., Pressinotti N.C. et al. The maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) is upregulated in high-grade prostate cancer. *J Mol Med (Berl)* 2013;91(2):237–48. DOI: 10.1007/s00109-012-0949-1. PMID: 22945237.
- Duxbury M.S., Whang E.E. RRM2 induces NF-kappaB-dependent MMP-9 activation and enhances cellular invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354(1):190–6. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.12.177. PMID: 17222798.

15. Kishi H., Igawa M., Kikuno N. et al. Expression of the survivin gene in prostate cancer: correlation with clinicopathological characteristics, proliferative activity and apoptosis. *J Urol* 2004;171(5): 1855–60. DOI: 10.1097/01.ju.0000120317.88372.03. PMID: 15076293.
16. Pritchard C.C., Kroh E., Wood B. et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012;5(3):492–7. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370. PMID: 22158052.
17. Cheng H.H., Yi H.S., Kim Y. et al. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS One* 2013;8(6):e64795. DOI: 10.1371/journal.pone.0064795. PMID: 23762257.
18. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(30):10513–8. DOI: 10.1073/pnas.0804549105. PMID: 18663219.
19. Mahn R., Heukamp L.C., Rogenhofer S. et al. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology* 2011;77(5):1265.e9–16. DOI: 10.1016/j.urology.2011.01.020. PMID: 21539977.
20. Musumeci M., Coppola V., Addario A. et al. Control of tumor and microenvironment cross-talk by miR-15a and miR-16 in prostate cancer. *Oncogene* 2011;30(41):4231–42. DOI: 10.1038/onc.2011.140. PMID: 21532615.
21. Bonci D., Coppola V., Musumeci M. et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 2008;14(11):1271–7. DOI: 10.1038/nm.1880. PMID: 18931683.
22. Walter B.A., Valera V.A., Pinto P.A., Merino M.J. Comprehensive microRNA profiling of prostate cancer. *J Cancer* 2013;4(5):350–7. DOI: 10.7150/jca.6394. PMID: 23781281.
23. Hart M., Nolte E., Wach S. et al. Comparative microRNA profiling of prostate carcinomas with increasing tumor stage by deep sequencing. *Mol Cancer Res* 2014;12(2):250–63. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0230. PMID: 24337069.

Вклад авторов

М.Ю. Шкурников: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, написание текста рукописи;

Ю.А. Макарова: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи;

Е.Н. Князев: получение данных для анализа, редактирование текста рукописи, научная консультация;

А.А. Зотиков: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

К.М. Нюшко: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

Б.Я. Алексеев: получение данных для анализа, разработка дизайна исследования, редактирование текста рукописи;

А.Д. Каприн: разработка дизайна исследования, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

M.Yu. Shkurnikov: developing the research design, obtaining data for analysis, article writing;

Yu.A. Makarova: developing the research design, article writing;

E.N. Knyazev: obtaining data for analysis, article editing, scientific consultation;

A.A. Zotikov: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

K.M. Nushko: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

B.Ya. Alekseev: obtaining data for analysis, developing the research design, article editing;

A.D. Kaprin: developing the research design, article editing.

ORCID авторов

М.Ю. Шкурников: <https://orcid.org/0000-0002-6668-5028>

Е.Н. Князев: <https://orcid.org/0000-0002-9414-2573>

Б.Я. Алексеев: <https://orcid.org/0000-0002-3398-4128>

А.Д. Каприн: <https://orcid.org/0000-0001-8784-8415>

ORCID of authors

M.Yu. Shkurnikov: <https://orcid.org/0000-0002-6668-5028>

E.N. Knyazev: <https://orcid.org/0000-0002-9414-2573>

B.Ya. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0002-3398-4128>

A.D. Kaprin: <https://orcid.org/0000-0001-8784-8415>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-00290).

Financing. The study was financed by the Russian Science Foundation (project No. 16-15-00290).

Статья поступила: 11.12.2017. **Принята к публикации:** 22.01.2018.

Article received: 11.12.2017. **Accepted for publication:** 22.01.2018.