

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-108-116



Сравнительная оценка уровней опухолеассоциированных микроРНК экзосом плазмы крови и асцитической жидкости пациентов с раком яичников

Е.И. Джугашвили¹, Н.В. Юнусова², А.И. Яловая³, А.Е. Григорьева³, Е.Е. Середа², Л.А. Коломиец², С.Н. Тамкович^{1,3}

¹ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2;

²Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный медицинский исследовательский центр Российской академии наук»; 634009 Томск, пер. Кооперативный, 5;

³ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8

Контакты: Светлана Николаевна Тамкович s.tamkovich@ngsu.ru

Введение. Рак яичников (РЯ) входит в число злокачественных новообразований женской репродуктивной системы с высокой летальностью. Применяемые в настоящее время онкомаркеры данной патологии не обладают высокими чувствительностью и специфичностью. В связи с этим перспективными направлениями молекулярной онкологии являются исследование механизмов канцерогенеза РЯ и поиск новых биомаркеров жидкостной биопсии для ранней неинвазивной диагностики новообразований. Известно, что опухолевые клетки активно секретируют во внеклеточное пространство экзосомы, в состав которых входят биологически активные молекулы, участвующие в канцерогенезе и претендующие на роль диагностических маркеров. Ранее было показано, что микроРНК-24 (miR-24) и микроРНК-101 (miR-101) переносятся в составе экзосом при РЯ и участвуют в процессе деградации внеклеточного матрикса, ремоделировании стромы, ангиогенезе и подвижности раковых клеток.

Цель исследования – оценка представленности и диагностической значимости miR-24 и miR-101 в экзосомах плазмы и асцитической жидкости больных РЯ.

Материалы и методы. В исследование включены образцы крови и асцитической жидкости больных РЯ ($n = 20$) и образцы крови здоровых женщин ($n = 19$). Экзосомальную природу везикул подтверждали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, трекового анализа и проточной цитофлуориметрии. После выделения экзосомальной РНК определяли относительный уровень микроРНК с использованием обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Наибольшая концентрация экзосом выявлена в асцитической жидкости больных РЯ, при этом концентрация экзосом в плазме крови этих пациенток оказалась достоверно выше, чем у здоровых женщин. Относительные уровни miR-24 и miR-101 в экзосомах плазмы крови здоровых женщин были достоверно выше, чем в экзосомах плазмы крови и асцитической жидкости больных РЯ; при этом уровни этих микроРНК в экзосомах плазмы и асцитической жидкости пациентов достоверно не различались.

Заключение. Полученные результаты подтверждают перспективность экзосомальных miR-101 и miR-24 для диагностики РЯ методом жидкостной биопсии.

Ключевые слова: экзосомы, плазма, асцит, опухолеассоциированные микроРНК, miR-24-3p, miR-101, рак яичников

Для цитирования: Джугашвили Е.И., Юнусова Н.В., Яловая А.И. и др. Сравнительная оценка уровней опухолеассоциированных микроРНК экзосом плазмы крови и асцитической жидкости пациентов с раком яичников. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):108–116. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-108-116

Comparative assessment of the exosomal tumor-associated microRNA levels in blood plasma and ascitic fluid in ovarian cancer patients

E.I. Dzhusashvili¹, N.V. Yunusova², A.I. Yalovaya³, A.E. Grigorieva³, E.E. Sereda², L.A. Kolomiets², S.N. Tamkovich^{1,3}

¹Novosibirsk State University; 2 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia;

²Scientific Research Institute of Oncology of the Tomsk National Medical Research Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Cooperative Lane, Tomsk 634009, Russia;

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8 Akademika Lavrent'eva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia

Contacts: Svetlana Nikolaevna Tamkovich *s.tamkovich@g.nsu.ru*

Introduction. Ovarian cancer (OC) is one of the malignant neoplasms of the female reproductive system with a high mortality rate. Currently used tumor markers of this pathology do not have high sensitivity and specificity. In this regard, promising areas of molecular oncology are the study of the mechanisms of carcinogenesis of OC and the search for new biomarkers of liquid biopsy for early non-invasive diagnosis of neoplasms. It is known that tumor cells actively secrete exosomes into the extracellular space, which include biologically active molecules involved in carcinogenesis and claiming to be diagnostic markers. It was previously shown that microRNA-24 (miR-24) and microRNA-101 (miR-101) are transported as part of exosomes in OC and are involved in the degradation of the extracellular matrix, stromal remodeling, angiogenesis, and cancer cell motility.

Aim. To evaluate the representation and diagnostic significance of miR-24 and miR-101 in plasma exosomes and ascitic fluid of OC patients.

Materials and methods. The study included blood and ascitic fluid samples from OC patients ($n = 20$) and blood samples from healthy women ($n = 19$). The exosomal nature of the vesicles was confirmed by transmission electron microscopy, nanotracing analysis, and flow cytometry. After isolation of exosomal RNA, the relative level of miRNA was determined using reverse transcription and real-time polymerase chain reaction.

Results. The highest concentration of exosomes was found in the ascitic fluid of OC patients, while the concentration of exosomes in the blood plasma of these patients was significantly higher than in healthy women. Relative levels of miR-24 and miR-101 in exosomes of blood plasma of healthy women were significantly higher than in exosomes of blood plasma and ascitic fluid of OC patients; at the same time, the levels of these miRNAs in exosomes of plasma and ascitic fluid of patients did not differ significantly.

Conclusion. The results obtained confirm the promise of exosomal miR-101 and miR-24 for the diagnosis of OC by liquid biopsy.

Keywords: exosomes, plasma, ascites, tumor-associated microRNAs, miR-24-3p, miR-101, ovarian cancer

For citation: Dzhugashvili E. I., Yunusova N. V., Yalovaya A. I. et al. Comparative assessment of the exosomal tumor-associated microRNA levels in blood plasma and ascitic fluid in ovarian cancer patients. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(2):108–16. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-108-116

ВВЕДЕНИЕ

Частота развития перитонеальной диссеминации при первичном раке яичников (РЯ) достигает высоких значений, в том числе из-за поздней диагностики заболевания, что в дальнейшем отрицательно влияет на эффективность хирургического и химиотерапевтического лечения [1]. Отсутствие высокочувствительных и специфичных онкомаркеров для раннего выявления РЯ приводит к тому, что 5-летняя выживаемость пациенток не достигает 30 % [2]. Асцитическая жидкость в малом количестве обнаруживается уже на начальных стадиях онкологического процесса, причем по мере прогрессирования РЯ ее объем увеличивается. Известно, что асцитическая жидкость является средой с уникальным опухолевым микроокружением и содержит как биологически активные молекулы, так и секретируемые опухолевыми клетками внеклеточные везикулы [3]. Среди внеклеточных везикул наибольший интерес представляют экзосомы — мембранные везикулы размером 30–150 нм, несущие на своей поверхности тетраспанины CD9, CD63 и CD81 [4]. Экзосомы не только паракринно влияют на окружающие клетки, но и передают информацию клеткам отдаленных органов. Показано, концентрация экзосом в крови повышается при различных злокачественных новообразованиях [5–8], при этом в асцитической жидкости больных РЯ их

содержание выше, чем в плазме крови [9]. Липидный бислой защищает экзосомальные микроРНК от гидролиза нуклеазами, что увеличивает время циркуляции таких РНК в отличие от свободно циркулирующих микроРНК в крови и других биологических жидкостях [10, 11]. На сегодняшний день неизвестно, как именно происходит сортировка некодирующих РНК в экзосомы, тем не менее информация об опухолеассоциированных микроРНК увеличивается с каждым годом. На различных клеточных моделях и тканях опухолей было показано, что miR-24-3p и miR-101 участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП), ингибируют апоптоз, стимулируют пролиферацию и ангиогенез, а также участвуют в клеточной миграции и метастазировании [12–14]. Однако до сих пор неизвестны представленность и диагностическая значимость данных микроРНК в экзосомах плазмы и асцитической жидкости больных РЯ. Поскольку при РЯ микроРНК-24 (miR-24) и микроРНК-101 (miR-101) вовлечены в механизмы канцерогенеза и метастазирования, представляется актуальным провести сравнительную оценку уровней данных микроРНК в составе экзосом биологических жидкостей у здоровых женщин (ЗЖ) и пациенток с РЯ для оценки их применимости в качестве биомаркеров для жидкостной биопсии, а также в качестве прогностических маркеров агрессивного течения заболевания.

Цель исследования – оценка представленности и диагностической значимости miR-24 и miR-101 в экзосомах плазмы и асцитической жидкости больных РЯ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. Образцы крови ЗЖ, не имевших онкологической патологии и заболеваний репродуктивной системы, а также генетически не предрасположенных к ним ($n = 19$; средний возраст 43 года), получены из ГБУЗ НСО «Центральная клиническая больница», образцы крови и асцитической жидкости первичных больных РЯ ($n = 20$; средний возраст 56 лет) – из отделения гинекологии Научно-исследовательского института онкологии Томского национального медицинского исследовательского центра. Характеристика пациенток с РЯ представлена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика пациенток с раком яичников ($n = 20$)

Table 1. Characteristics of the patients with ovarian cancer ($n = 20$)

Показатель Parameter	Число больных, n (%) Number of patients, n (%)
Серозная карцинома Serous carcinoma	20 (100)
Стадия по классификации FIGO (2013): FIGO (2013) stage:	
IIВ	2 (10)
IIIВ	3 (15)
IIIС	15 (75)
Высокая степень злокачественности High malignancy grade	20 (100)
Объем асцитической жидкости, мл: Ascitic fluid volume, mL:	
<200	5 (25)
200–1000	5 (25)
>1000	10 (50)

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 4: FIGO – Международная федерация акушерства и гинекологии (International Federation of Obstetrics and Gynecology).

Note. Here and in Tables 3 and 4: FIGO – International Federation of Obstetrics and Gynecology.

Кровь и асцитическая жидкость больных РЯ были собраны до начала лечения. Объем асцитической жидкости оценивали с помощью ультразвукового исследования. Были сформированы клинические подгруппы больных РЯ с малым (<200 мл), средним (200–1000 мл) и большим (>1000 мл) объемами асцитической жидкости. Для определения индекса перитонеального канцероматоза (peritoneal cancer index, PCI) использовали компьютерную томографию и/или диагностическую лапароскопию. Значение этого показателя у включенных в исследование больных было в диапазоне от 8 до 16 баллов. Устанавливали наличие в семейном анамнезе РЯ или РЯ в сочетании с раком молочной железы.

Выделение и характеристика экзосом. Экзосомы выделяли из плазмы (из 18 мл венозной крови) и асцитической жидкости (из 18–20 мл) с помощью ультрафильтрации и последующего ультрацентрифугирования, как описано ранее [15]. Образцы экзосом ресуспендировали в 400 мкл фосфатного буфера (10 мМ фосфатный буфер; 0,15 М NaCl; pH 7,5), аликвотировали и хранили при температуре -80°C или в жидком азоте. Аликвоты размораживали 1 раз перед использованием.

Размер везикул и целостность их мембран оценивали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), как описано ранее [16].

Трековый анализ проводили на анализаторе частиц NanoSight® LM10 с использованием голубого лазера (45 мВ на длине волны 488 нм) и камеры C11440-5B. Измерение проводили трижды согласно инструкциям по использованию прибора: длительность записи 1 мин, чувствительность камеры 15 у. е., пороговый уровень 5 у. е. На видео анализировали не менее 200 треков. Для оценки данных использовали программное обеспечение NTA версии 2.3.

Концентрацию экзосомального белка определяли с помощью коммерческого набора NanoOrange Protein (Molecular Probes, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Оценку CD9/CD63/CD81/CD24 субпопуляций экзосом плазмы крови и асцитической жидкости проводили методом проточной цитофлуориметрии, как описано ранее [9], в ЦКП «Медицинская геномика» Томского национального исследовательского медицинского центра. Среднюю интенсивность флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI) анализировали и сравнивали с изотип-контролем (BD bioscience, Германия) и отрицательным контролем.

Оценка относительных уровней микроРНК. РНК выделяли из 66 мкл экзосом плазмы и асцитической жидкости (полученных из 3 мл крови или асцитической жидкости для исследования уровня 3 микроРНК) с использованием коммерческого набора (Biosilica, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Выделенную РНК концентрировали осаждением с гликогеном и изопропанолом и растворяли в 35 мкл воды [15]. Количество выделенной РНК определяли спектрофотометрически с помощью Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, США).

Реакцию обратной транскрипции по матрице микроРНК проводили по ранее описанному протоколу [17]. Праймеры и флуоресцентные зонды для обратной транскрипции и TaqMan полимеразной цепной реакции (ПЦР) были синтезированы в лаборатории медицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск). Реакцию обратной транскрипции проводили в 10 мкл, содержащих 4,5 мкл РНК, 25 нмоль каждого из микроРНК-специфичных праймеров, 0,5 единиц RiboLock ингибитора

РНКазы (Fermentas, Литва), 50 единиц M–MuLV-RN ревертазы (Fermentas, Литва), 2,5 мкл 5 × MMLV реакционного буфера (Fermentas, Литва) и 125 ммоль каждого dNTP. Реакцию проводили при 16 °C в течение 30 мин, затем при 42 °C в течение 30 мин и при 70 °C в течение 10 мин. В качестве отрицательного контроля использовали воду.

Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени выполняли на анализаторе LightCycler 480 II (Roche, Швейцария). Все реакции проводили в дублях в 49 мкл, содержащих 9 мкл реакционной смеси после обратной транскрипции, 1 мкл (1 единица) Taq-ДНК-полимеразы (Fermentas, Вильнюс, Литва), 2,4 мкл 10 × ПЦР-буфера (750 мМ Трис-НСl (рН 8,8 при 25 °C), 32 мМ MgCl₂, 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Твин-20), 200 мМ каждого dNTP, 480 нМ микроРНК-специфичного прямого праймера, 640 нМ универсального обратного праймера и 240 нМ специфичного TaqMan флуоресцентного зонда. После первой денатурации при температуре 95 °C в течение 3 мин реакцию проводили за 45 циклов при температуре 95 °C в течение 15 с и 60 °C в течение 45 с. Полученные значения уровня РНК-мишени нормализовали на miR-16, вычисляя dCt, как было описано ранее [18].

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6.0. Выполнен анализ данных на соответствие выборки нормальному распределению с использованием критерия Шапиро–Уилка. Все данные выражены как медианы с межквартильным размахом или в виде средних значений со стандартными ошибками. Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни и критерия Краскела–Уоллиса. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$. Достоверность корреляции оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена. При анализе учитывали только статистически значимые корреляционные связи ($p < 0,05$). С целью прогнозирования риска развития

РЯ использовался метод полиномиальной логистической регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеризация экзосом. Размер везикул и целостность их мембран оценивали с помощью ТЭМ (рис. 1).

В образцах плазмы крови ЗЖ и плазмы крови и асцитической жидкости пациенток с РЯ обнаружены везикулы размером ≤ 100 нм с характерными для экзосом чашеобразной формой и низкой электронной плотностью [5, 19].

С помощью трекового анализа было показано, что экзосомы в плазме и асцитической жидкости больных РЯ несколько крупнее, чем в плазме ЗЖ (различия недостоверны) (рис. 2). Впервые установлено, что концентрация экзосом в асцитической жидкости достоверно выше ($p < 0,05$), чем в плазме крови больных РЯ ($35,7 \pm 6,5 \times 10^{10}$ и $14,1 \pm 3,4 \times 10^{10}$ везикул/мл соответственно), а также выше, чем в плазме крови ЗЖ ($6,0 \pm 1,4 \times 10^{10}$ везикул/мл).

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул с помощью проточной цитофлуориметрии выявлены экзосомальные маркеры CD9, CD24, CD63 и CD81. Сочетание неконъюгированных и конъюгированных с FITC антител позволяет идентифицировать различные субпопуляции экзосом. По снижению MFI субпопуляции экзосом распределялись следующим образом: экзосомы плазмы крови ЗЖ и больных РЯ – CD9/CD24 > CD9/CD81 > CD9/CD63, экзосомы асцитической жидкости – CD9/CD24 > CD9/CD81 \approx CD9/CD63 (рис. 3). Средняя интенсивность флуоресценции отрицательного и изотипического контролей составила 145 и 155 соответственно.

Экспрессия CD24, CD63 и CD81 на поверхности CD9-положительных экзосом у пациенток с РЯ была выше, чем у ЗЖ, однако статистически значимые различия ($p < 0,05$) выявлены только между экспрессией тетраспанина CD24 на экзосомах плазмы крови ЗЖ

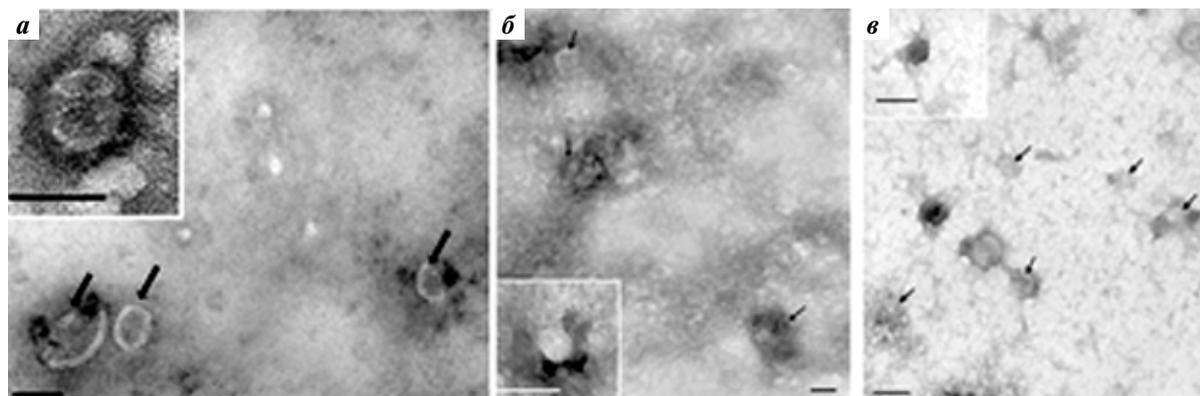


Рис. 1. Общий вид препаратов экзосом, полученных из плазмы крови здоровых женщин (а), плазмы крови (б) и асцитической жидкости (в) больных раком яичников. Трансмиссионная электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорно-вольфрамовой кислотой. На вставках и стрелками отмечены экзосомы. Масштаб шкалы соответствует 100 нм

Fig. 1. General appearance of exosome samples obtained from plasma of healthy women (a), plasma (б) and ascitic fluid (в) of patients with ovarian cancer. Transmission electron microscopy, phosphotungstic acid negative staining. Panels and arrows show exosomes. Scale is 100 nm

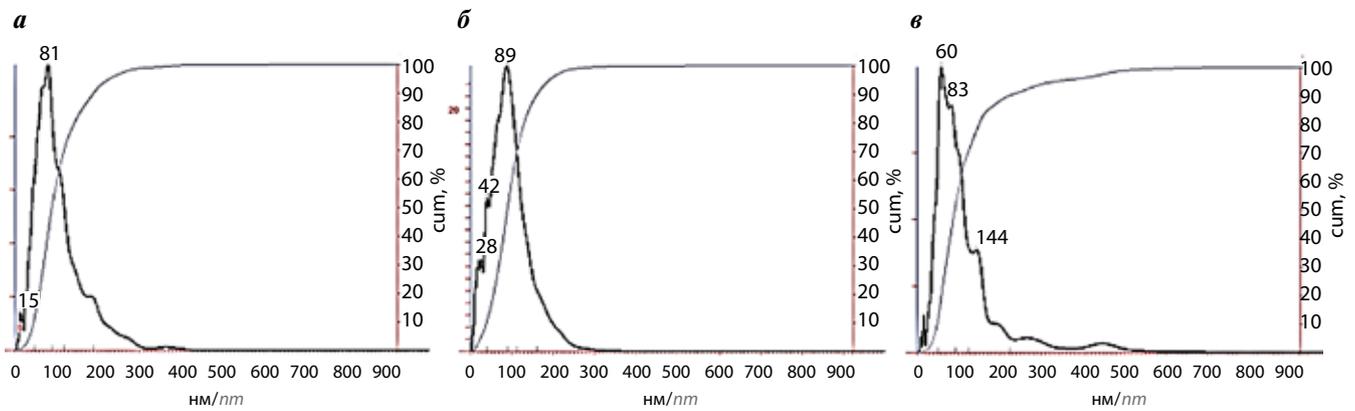


Рис. 2. Результаты трекового анализа экзосом из индивидуальных образцов плазмы крови здоровых женщин (а), плазмы крови (б) и асцитической жидкости (в) больных раком яичников

Fig. 2. Results of tracking analysis of exosomes from individual plasma samples of healthy women (a), plasma (б) and ascitic fluid (в) samples of patients with ovarian cancer

и больных РЯ (1080 ± 162 и 1400 ± 238 соответственно), а также на экзосомах плазмы крови и асцитической жидкости больных РЯ (1400 ± 238 и 2300 ± 276 соответственно).

Уровень экзосомальных miR-24 и miR-101 у здоровых женщин и больных раком яичников. Ранее было показано, что экспрессия miR-24 и miR-101 по сравнению с парными образцами достоверно снижена в тканях карцином высокой степени злокачественности, в том числе РЯ [12]. Поскольку уровень miR-16 в составе экзосом здоровых доноров и онкологических больных достоверно не различался, данная микроРНК была выбрана для нормировки уровней микроРНК-мишеней [20–22]. Действительно, для экзосомальной miR-16 показатели Ct в норме и при РЯ составили 32,09 и 31,89 соответственно. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили в рабочем диапазоне Ct 23,15–34,35; экзогенная контрольная cel-miR-39 была обнаружена во всех образцах (Ct 25 ± 1). Относительные уровни miR-24-3p и miR-101 в образцах экзосом ЗЖ и больных РЯ представлены в табл. 2.

Относительный уровень miR-24-3p в экзосомах плазмы крови больных РЯ был достоверно ниже по сравнению с данным показателем у ЗЖ ($p < 0,01$) (см. табл. 2), при этом уровень этой микроРНК не различался в экзосомах плазмы крови и асцитической

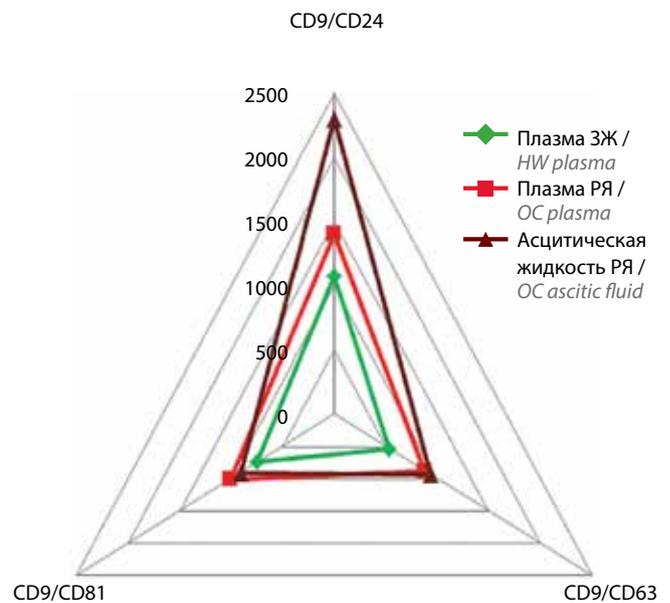


Рис. 3. Экспрессия CD24, CD63 и CD81 на поверхности CD9-положительных экзосом плазмы крови здоровых женщин (ЗЖ) и экзосом плазмы крови и асцитической жидкости больных раком яичников (РЯ). Средняя интенсивность флуоресценции

Fig. 3. CD24, CD63 and CD81 expression on the surface of CD9-positive exosomes from plasma of healthy women (HW) and exosomes from plasma and ascitic fluid of patients with ovarian cancer (OC). Mean fluorescence intensity

Таблица 2. Относительные уровни miR-24-3p и miR-101 в составе экзосом плазмы крови здоровых женщин (ЗЖ), плазмы крови и асцитической жидкости больных раком яичников (РЯ), медиана и диапазон значений (минимальное; максимальное)

Table 2. Relative miR-24-3p and miR-101 levels and ranges (minimum, maximum) in exosomes from plasma of healthy women (HW), plasma and ascitic fluid of patients with ovarian cancer (OC)

микроРНК microRNA	Плазма ЗЖ HW plasma	Плазма больных РЯ OC patient plasma	Асцитическая жидкость больных РЯ OC patient ascitic fluid
miR-24	–4,20 (–8,24; –0,12)	–6,68* (–9,35; –0,80)	–5,44 (–10,84; –2,10)
miR-101	8,77 (3,29; 11,14)	7,18* (5,50; 8,35)	6,92 (3,49; 8,80)

* $p < 0,05$ при сравнении уровня микроРНК-мишени в экзосомах плазмы больных РЯ и ЗЖ.

* $p < 0,05$ for comparison of target microRNA level in exosomes of OC patients and HW.

Таблица 3. Взаимосвязь уровня miR-24 в экзосомах плазмы и асцитической жидкости больных раком яичников с клиническими показателями, медиана [27–75 %]

Table 3. Correlation of miR-24 levels in exosomes from plasma and ascitic fluid of patients with ovarian cancer with clinical characteristics, median [27–75 %]

Показатель Parameter	Уровень miR-24 в экзосомах плазмы miR-24 level in plasma exosomes	<i>p</i>	Уровень miR-24 в экзосомах асцитической жидкости miR-24 level in ascitic fluid exosomes	<i>p</i>
Возраст, лет: Age, years: <56 (<i>n</i> = 10) ≥56 (<i>n</i> = 10)	–6,5 [–7,4; –5,8] –6,4 [–9,1; –4,8]	0,67	–5,7 [–8,6; –3,6] –5,5 [–9,0; –5,0]	0,75
Стадия по классификации FIGO: FIGO stage: IIВ – IIIАВ (<i>n</i> = 5) IIIС (<i>n</i> = 15)	–6,9 [– 8,0; –0,8] –6,4 [– 7,6; –5,8]	0,89	–3,8 [–10,8; –2,2] –5,7 [–8,8; –5,0]	0,78
Рак яичников в семейном анамнезе: Ovarian cancer in family history: есть (<i>n</i> = 4) present (<i>n</i> = 4) нет (<i>n</i> = 16) absent (<i>n</i> = 16)	–5,8 [– 8,0; –5,2] –6,5 [– 8,0; –4,8]	1,00	–3,6 [–4,5; –3,4] –5,7 [–9,0; –3,8]	1,00
Объем асцитической жидкости, мл: Ascitic fluid volume, c. u.: <200 (<i>n</i> = 5) 200–1000 (<i>n</i> = 5) >1000 (<i>n</i> = 10)	–6,0 [– 6,3; –5,8] –7,9 [– 8,7; –6,2] –6,5 [– 7,4; –4,3]	0,35	–5,5 [–5,7; –3,6] –8,9 [–9,6; –5,6] –5,3 [–8,6; –3,8]	0,43
Индекс перитонеального канцероматоза, у. е.: Peritoneal cancer index, c. u.: ≤9 (<i>n</i> = 10) >9 (<i>n</i> = 10)	–7,8 [–8,2; –6,0] –6,4 [–7,4; –4,8]	0,35	–8,9 [–10,1; –5,7] –5,3 [–8,6; –3,6]	0,22

жидкости больных РЯ. Аналогичная картина наблюдалась для miR-101 ($p < 0,01$) (см. табл. 2). У онкологических больных выявлена достоверная сильная (по шкале Чеддока) прямая корреляция между относительными уровнями опухолеассоциированных микроРНК в экзосомах плазмы крови и экзосомах асцитической жидкости ($R = 0,7995$ и $R = 0,9983$ для miR-24 и для miR-101 соответственно).

Не выявлено взаимосвязи между уровнями miR-24 и miR-101 в экзосомах плазмы крови и асцитической жидкости с возрастом, семейным анамнезом, объемом асцита и PCI у больных РЯ, однако уровень miR-101 в экзосомах асцитической жидкости коррелировал со стадией по FIGO ($p = 0,03$) (табл. 3 и 4).

Логистический регрессионный анализ был выполнен для оценки возможности использования уровня микроРНК в экзосомах плазмы крови для прогнозирования риска развития РЯ. В первую регрессионную модель в качестве предикторов включены возраст, наличие в семейном анамнезе РЯ или РЯ в сочетании с раком молочной железы, а также уровни miR-24 и miR-101 в плазме крови. Также была построена вторая прогностическая модель, включающая меньшее количество анализируемых параметров (без учета возраста), но обладающая более высокой чувствительностью.

Обе модели оказались статистически значимыми. Чувствительность первой модели составила 80 %, специфичность – 77 %, статистическая значимость – $p = 0,001$; $\chi^2 = 19,927$. Чувствительность второй модели оказалась равной 87 %, специфичность – 79 %, статистическая значимость – $p = 0,000$; $\chi^2 = 19,412$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя основным источником онкогенеза являются злокачественные клетки, их взаимодействие с микроокружением опухоли имеет решающее значение для прогрессирования от одиночной опухолевой массы до отдаленных метастазов. Экзосомы опухолевого происхождения опосредуют ЭМП, пролиферацию и повышенную подвижность раковых клеток, а также стимулируют ангиогенез и ускользание от иммунного ответа [23–25]. Поскольку доля экзосомальной ДНК незначительна [16], ключевую роль в трансформации экзосомами клеток-реципиентов отводят РНК и белкам в их составе [26, 27]. Предположительно, рибонуклеиновые кислоты (длинная некодирующая РНК и микроРНК) действуют на клетку-мишень совместно с биологически активными белками, однако в литературе до сих пор отсутствуют данные о синергетическом действии опухолеассоциированных РНК и белков в составе экзосом.

Таблица 4. Уровень miR-101 в экзосомах плазмы и асцитической жидкости больных раком яичников в зависимости от клинических параметров, медиана [27–75 %]**Table 4.** miR-101 levels in exosomes from plasma and ascitic fluid of patients with ovarian cancer depending on clinical characteristics, median [27–75 %]

Показатель Parameter	Уровень miR-101 в экзосомах плазмы miR-101 level in plasma exosomes	<i>p</i>	Уровень miR-101 в экзосомах асцитической жидкости miR-101 level in ascitic fluid exosomes	<i>p</i>
Возраст, лет: Age, years: <56 (<i>n</i> = 10) ≥56 (<i>n</i> = 10)	7,0 [6,4; 7,7] 7,3 [6,1; 7,8]	0,89	6,8 [5,7; 7,2] 6,9 [6,4; 8,1]	0,42
Стадия по классификации FIGO: FIGO stage: IIВ–IIIAВ (<i>n</i> = 5) IIIC (<i>n</i> = 15)	7,3 [5,8; 7,8] 7,0 [6,4; 7,6]	0,94	5,4 [3,5; 6,1] 7,1 [6,5; 7,4]	0,03
Рак яичников в семейном анамнезе: Ovarian cancer in family history: есть (<i>n</i> = 4) present (<i>n</i> = 4) нет (<i>n</i> = 16) absent (<i>n</i> = 16)	6,7 [5,7; 7,6] 7,2 [6,4; 7,2]	0,63	7,1 [7,0; 7,2] 6,67 [5,9; 7,5]	0,63
Объем асцитической жидкости, мл: Ascitic fluid volume: <200 (<i>n</i> = 5) 200–1000 (<i>n</i> = 5) >1000 (<i>n</i> = 10)	6,5 [6,0; 6,9] 6,9 [6,1; 7,8] 7,6 [5,8; 7,7]	0,53	6,1 [5,5; 6,8] 7,6 [6,7; 8,6] 7,2 [6,3; 7,4]	0,14
Индекс перитонеального канцероматоза, у. е.: Peritoneal cancer index, с. u.:. ≤9 (<i>n</i> = 10) >9 (<i>n</i> = 10)	7,0 [6,4; 7,8] 7,2 [6,0; 7,7]	0,80	6,7 [5,7; 8,0] 7,1 [6,8; 7,3]	0,44

Согласно базе данных Exocarta (www.exocarta.org, данные на 18.03.2023), экзосомы участвуют в транспорте 2838 микроРНК. При исследовании механизмов канцерогенеза было показано, что повышенная экспрессия miR-101 значительно снижает способность клеток РЯ к пролиферации и инвазии *in vitro* путем ингибирования *SOCS2*, который является геном-супрессором и регулирует процессы клеточной пролиферации и апоптоза [28]. Кроме того, продемонстрировано, что факторы транскрипции ZEB1 и ZEB2 также являются мишенями miR-101 и их взаимодействие подавляет ген E-кадгерина. Это приводит к подавлению ЭМП, клеточной миграции и инвазии [13, 29]. При РЯ характерна пониженная экспрессия этой микроРНК [30], что коррелирует с низкой дифференцировкой опухоли и резистентностью к цисплатину [31].

MiR-24-3p также играет большую роль в пролиферации, инвазии и миграции клеток карциномы человека [32]. С помощью анализа *in silico* путем интеграции данных о взаимодействиях микроРНК и мишени, белок-белковых взаимодействиях и связях генов с заболеваниями была выявлена ассоциация между РЯ и экспрессией miR-24. В частности, повышенная экспрессия miR-24 в клетках ассоциируется со значительной индукцией клеточного апоптоза [33]. В дальнейших

исследованиях с помощью биоинформатического анализа было установлено, что miR-24 способствует резистентности клеток РЯ к цисплатину, опосредуя модули связанных с резистентностью к этому препарату генов культуры клеток OVCAR-8R, которые участвуют в процессах, тесно связанных с апоптозом, клеточным циклом и адгезией [14]. В прошлом году было обнаружено, что miR-24 способна подавлять метастазирование РЯ, поскольку действует на ЭМП клеток опухоли [34]. Несмотря на значительное число исследований, посвященных роли miR-24-3p в канцерогенезе и уровню ее экспрессии в экзосомах, данные литературы о наличии этой микроРНК в экзосомах плазмы крови и асцитической жидкости пациенток с РЯ немногочисленны.

Настоящее исследование показало, что экзосомы как асцитической жидкости, так и плазмы крови больных РЯ несут опухолеспецифические микроРНК. Сравнительный анализ miR-24-3p и miR-101 в экзосомах этих биологических жидкостей показал возможность выявления РЯ до развития асцита, что позволит в дальнейшем использовать данные экзосомальные маркеры крови для ранней диагностики и оценки эффективности противоопухолевой терапии с помощью жидкой биопсии.

Построенные для прогнозирования риска развития РЯ регрессионные модели оказались статистически значимыми. Мы рассматриваем полученные результаты по использованию микроРНК в экзосомах плазмы крови для прогнозирования риска развития РЯ как предварительные, однако весьма обнадеживающие. В перспективе оценка уровней miR-24-3p и miR-101 в экзосомах плазмы крови может быть применена для прогнозирования риска возникновения РЯ в общей популяции женщин с учетом и без учета возраста в дополнение к тестированию на мутации BRCA1/BRCA2, особенно при наличии в семейном анамнезе РЯ или рака молочной железы в сочетании с РЯ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования выявлено достоверное изменение уровней опухолеассоциированных микроРНК в составе экзосом плазмы крови больных РЯ по сравнению с этим показателем у ЗЖ. Показана прямая достоверная корреляция уровней miR-24-3p и miR-101 в экзосомах крови с уровнем этих микроРНК в экзосомах асцитической жидкости онкологических больных, что указывает на перспективность экзосомальных miR-101 и miR-24-3p для диагностики РЯ методом жидкостной биопсии. Полученные результаты расширяют наше понимание биологии канцерогенеза и являются еще одним шагом на пути к разработке новых методов диагностики и лечения РЯ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ding H., Zhang J., Zhang F. et al. Nanotechnological approaches for diagnosis and treatment of ovarian cancer: a review of recent trends. *Drug Deliv* 2022;29(1):3218–32. DOI: 10.1080/10717544.2022.2132032
- Bhardwaj B., Thankachan S., Venkatesh T. et al. Liquid biopsy in ovarian cancer. *Clinica Chimica Acta* 2020;510:28–34. DOI: 10.1016/j.cca.2020.06.047
- Guo L., Guo N. Exosomes: potent regulators of tumor malignancy and potential bio-tools in clinical application. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015;95(3):346–58. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.04.002
- Tenchov R., Sasso J.M., Wang X. et al. Exosomes-Nature's lipid nanoparticles, a rising star in drug delivery and diagnostics. *ACS Nano* 2022;16(11):17802–46. DOI: 10.1021/acsnano.2c08774
- Yunusova N., Kolegova E., Sereda E. et al. Plasma exosomes of patients with breast and ovarian tumors contain an inactive 20S proteasome. *Molecules* 2021;26(22):6965. DOI: 10.3390/molecules26226965
- Tutanov O., Orlova E., Proskura K. et al. Proteomic analysis of blood exosomes from healthy females and breast cancer patients reveals an association between different exosomal bioactivity on non-tumorigenic epithelial cell and breast cancer cell migration *in vitro*. *Biomolecules* 2020;10(4):495. DOI: 10.3390/biom10040495
- Ye S.B., Li Z.L., Luo D.H. et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 2014;5(14):5439–52. DOI: 10.18632/oncotarget.2118
- Xia Y., Hu X., Di K. et al. Combined detection of exosome concentration and tumor markers in gastric cancer. *J Biomed Nanotechnol* 2020;16(2):252–8. DOI: 10.1166/jbn.2020.2887
- Yunusova N., Patysheva M., Molchanov S. et al. Metalloproteinases at the surface of small extracellular vesicles in advanced ovarian cancer: Relationships with ascites volume and peritoneal canceromatosis index. *Clin Chim Acta* 2019;494:116–22. DOI: 10.1016/j.cca.2019.03.1621
- Joyce D.P., Kerin M.J., Dwyer R.M. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for breast cancer. *Int J Cancer* 2016;139(7):1443–8. DOI: 10.1002/ijc.30179
- Kalra H., Drummen G.P., Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci* 2016;17(2):170. DOI: 10.3390/ijms17020170
- Yang D., Sun Y., Hu L. et al. Integrated analyses identify a master microRNA regulatory network for the mesenchymal subtype in serous ovarian cancer. *Cancer Cell* 2013;23(2):186–99. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.12.020
- Braga E.A., Fridman M.V., Kushlinskii N.E. Molecular mechanisms of ovarian carcinoma metastasis: key genes and regulatory microRNAs. *Biochemistry (Mosc)* 2017;82(5):529–41. DOI: 10.1134/S0006297917050017
- Liu W., Wang S., Zhou S. et al. A systems biology approach to identify microRNAs contributing to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Mol Biosyst* 2017;13(11):2268–76. DOI: 10.1039/c7mb00362e
- Konoshenko M., Sagaradze G., Orlova E. et al. Total blood exosomes in breast cancer: potential role in crucial steps of tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 2020;21(19):7341. DOI: 10.3390/ijms21197341
- Tutanov O., Shtam T., Grigor'eva A. et al. Blood plasma exosomes contain circulating DNA in their crown. *Diagnostics (Basel)* 2022;12(4):854. DOI: 10.3390/diagnostics12040854
- Konoshenko M.Y., Bryzgunova O.E., Lekchnov E.A. et al. The influence of radical prostatectomy on the expression of cell-free MiRNA. *Diagnostics (Basel)* 2020;10(8):600. DOI: 10.3390/diagnostics10080600
- Tamkovich S., Tutanov O., Efimenko A. et al. Blood circulating exosomes contain distinguishable fractions of free and cell-surface-associated vesicles. *Curr Mol Med* 2019;19(4):273–85. DOI: 10.2174/1566524019666190314120532
- Zhang W., Ou X., Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: a potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis. *Int J Oncol* 2019;54(5):1719–33. DOI: 10.3892/ijo.2019.4742
- Hagrass H.A., Sharaf S., Pasha H.F. et al. Circulating microRNAs – a new horizon in molecular diagnosis of breast cancer. *Genes Cancer* 2015;6(5–6):281–7. DOI: 10.18632/genesandcancer.66
- Bryzgunova O.E., Zaripov M.M., Skvortsova T.E. et al. Comparative study of extracellular vesicles from the urine of healthy individuals and prostate cancer patients. *PLoS One* 2016;11(6):e0157566. DOI: 10.1371/journal.pone.0157566
- McDermott A.M., Kerin M.J., Miller N. Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer studies. *PLoS One* 2013;8(12):e83718. DOI: 10.1371/journal.pone.0083718
- Matsumoto Y., Kano M., Murakami K. et al. Tumor-derived exosomes influence the cell cycle and cell migration of human esophageal cancer cell lines. *Cancer Sci* 2020;111(12):4348–58. DOI: 10.1111/cas.14660
- Pathania A.S., Prathipati P., Challagundla K.B. New insights into exosome mediated tumor-immune escape: Clinical perspectives

- and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2021;1876(2):188624. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188624
25. Paskheh M.D.A., Entezari M., Mirzaei S. et al. Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling. *J Hematol Oncol* 2022;15(1):83. DOI: 10.1186/s13045-022-01305-4
 26. Sahebi R., Langari H., Fathinezhad Z. et al. Exosomes: new insights into cancer mechanisms. *J Cell Biochem* 2020;121(1):7–16. DOI: 10.1002/jcb.29120
 27. Yi Y., Wu M., Zeng H. et al. Tumor-derived exosomal non-coding rnas: the emerging mechanisms and potential clinical applications in breast cancer. *Front Oncol* 2021;11:738945. DOI: 10.3389/fonc.2021.738945
 28. Zheng H.B., Zheng X.G., Liu B.P. miRNA-101 inhibits ovarian cancer cells proliferation and invasion by down-regulating expression of SOCS-2. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(11):20263–70.
 29. Liang H., Yu T., Han Y. et al. LncRNA PTAR promotes EMT and invasion-metastasis in serous ovarian cancer by competitively binding miR-101-3p to regulate ZEB1 expression. *Mol Cancer* 2018;17(1):119. DOI: 10.1186/s12943-018-0870-5
 30. Xu Y., Xu L., Zheng J. et al. MiR-101 inhibits ovarian carcinogenesis by repressing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Open Bio* 2017;7(9):1258–66. DOI: 10.1002/2211-5463.12257
 31. Liu L., Guo J., Yu L. et al. miR-101 regulates expression of EZH2 and contributes to progression of and cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol* 2014;35(12):12619–26. DOI: 10.1007/s13277-014-2585-6
 32. Wang H., Chen C., Ding K. et al. MiR-24-3p as a prognostic indicator for multiple cancers: from a meta-analysis view. *Biosci Rep* 2020;40(12):BSR20202938. DOI: 10.1042/BSR20202938
 33. Yuan D., Cui X., Wang Y. et al. Enrichment analysis identifies functional microRNA-disease associations in humans. *PLoS One* 2015;10(8):e0136285. DOI: 10.1371/journal.pone.0136285
 34. Lin H., Xu X., Chen K. et al. LncRNA CASC15, MiR-23b cluster and SMAD3 form a novel positive feedback loop to promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in ovarian cancer. *Int J Biol Sci* 2022;18(5):1989–2002. DOI: 10.7150/ijbs.67486

Вклад авторов

Е.И. Джугашвили: получение экспериментальных данных, обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи;
 Н.В. Юнусова: разработка концепции исследования, получение экспериментальных данных, написание текста статьи;
 А.И. Яллова, А.Е. Григорьева: получение экспериментальных данных;
 Е.Е. Серeda: статистический анализ данных;
 Л.А. Коломиец: подбор пациентов для включения в исследование;
 С.Н. Тамкович: разработка концепции исследования, получение экспериментальных данных, редактирование.

Authors' contribution

E.I. Dzhugashvili: obtaining experimental data literature review on the topic of the article, article writing;
 N.V. Yunusova: development of the research concept, obtaining experimental data, article writing;
 A.I. Yalovaya, A.E. Grigorieva: obtaining experimental data;
 E.E. Sereda: statistical data analysis;
 L.A. Kolomiets: selection of patients for inclusion in the study;
 S.N. Tamkovich: development of the research concept, obtaining experimental data, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.И. Джугашвили / E.I. Dzhugashvili: <https://orcid.org/0000-0003-0465-3124>
 Н.В. Юнусова / N.V. Yunusova: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>
 А.Е. Григорьева / A.E. Grigorieva: <https://orcid.org/0000-0001-9853-223X>
 Е.Е. Серeda / E.E. Sereda: ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7752-9346>
 Л.А. Коломиец / L.A. Kolomiets: <https://orcid.org/0000-0002-6854-8940>
 С.Н. Тамкович / S.N. Tamkovich: <https://orcid.org/0000-0001-7774-943X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта базового бюджетного финансирования Минобрнауки России № 121030200173-6 «Диагностика и терапия онкологических заболеваний».

Funding. The work was carried out within the framework of the basic budget financing project of the Ministry of Education and Science of Russia No. 121030200173-6 “Diagnosis and therapy of oncological diseases”.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный медицинский исследовательский центр Российской академии наук» (протокол № 2 от 15.01.2020).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the ethics of Scientific Research Institute of Oncology of the Tomsk National Medical Research Center of the Russian Academy of Sciences (protocol No. 2 от 15.01.2020).

The patients gave written informed consent to the publication of their data.

Статья поступила: 16.12.2022. **Принята к публикации:** 04.04.2023.

Article submitted: 16.12.2022. **Accepted for publication:** 04.04.2023.