

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-78-89



Малоинвазивная диагностика рака легкого на основе анализа внеклеточной микроРНК крови

М.Ю. Коношенко^{1,2}, П.П. Лактионов^{1,2}, Ю.А. Ланцухай², С.В. Пак², С.Э. Красильников², О.Е. Брызгунова^{1,2}

¹ФГБУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России; Россия, 630055 Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

Контакты: Мария Юрьевна Коношенко msol@ngs.ru

Введение. Одной из причин высокой смертности больных раком легкого (РЛ) является нехватка высокочувствительных диагностических маркеров этого заболевания. В качестве таковых могут быть предложены маркеры генетических и эпигенетических процессов, характерных для опухолевых клеток, например микроРНК. Известно, что внеклеточная/циркулирующая микроРНК биологических жидкостей в комплексах с белками или упакованная во внеклеточные везикулы представляет интерес для диагностики опухолевых заболеваний.

Цель исследования – выполнить сравнительный анализ экспрессии микроРНК в составе внеклеточных везикул и супернатанта плазмы крови больных РЛ и доноров и предложить на основании полученных результатов диагностическую панель для выявления пациентов с данной патологией.

Материалы и методы. Из образцов крови доноров и больных РЛ методом последовательного центрифугирования была получена плазма крови. Затем из части супернатанта плазмы методом агрегации – осаждения полиэтиленгликолем/синим декстраном выделена фракция внеклеточных везикул (размером 40–150 нм). Из обеих собранных фракций плазмы крови больных РЛ и доноров с использованием гуанидина изотиоцианата и октановой кислоты получены микроРНК. Экспрессия 17 микроРНК, участвующих в механизмах развития РЛ, по нашим данным и данным литературы, в вышеупомянутых фракциях плазмы крови была проанализирована методом петлевой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. В ходе исследования во фракциях внеклеточных везикул и супернатанта плазмы крови обнаружены 29 и 10 пар микроРНК соответственно, экспрессия которых достоверно различалась между больными немелкоклеточным РЛ и донорами. Таким образом, внеклеточные везикулы плазмы обладают большим потенциалом с точки зрения диагностики РЛ на основе оценки относительной экспрессии микроРНК по сравнению с плазмой крови. Разработан диагностический алгоритм, основанный на исследовании aberrантной экспрессии 8 различных микроРНК (miRNA-30e, -1, -125b, -133, -222, -374, -425, -660) в составе 6 пар, позволяющий выявить немелкоклеточный РЛ II–IV стадии в 100 % случаев.

Заключение. Внеклеточные везикулы являются более перспективными, диагностически значимыми микроРНК по сравнению с микроРНК плазмы крови. Для диагностики больных немелкоклеточным РЛ предложена панель из 8 микроРНК, характеризующаяся 100 % чувствительностью и специфичностью.

Ключевые слова: рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, микроРНК, диагностические маркеры, жидкостная биопсия, микровезикулы, плазма крови

Для цитирования: Коношенко М.Ю., Лактионов П.П., Ланцухай Ю.А. и др. Малоинвазивная диагностика рака легкого на основе анализа внеклеточной микроРНК крови. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):78–89. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-78-89

Cell-free plasma miRNAs analysis for low invasive lung cancer diagnostics

M. Yu. Konoshenko^{1,2}, P. P. Laktionov^{1,2}, Yu. A. Lancuhaj², S. V. Pak², S. E. Krasilnikov², O. E. Bryzgunova^{1,2}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; 8 Akademika Lavrentieva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia;

²Meshalkin Siberian Federal Biomedical Research Center, Ministry of Health of Russia; 15 Rechkunovskaya St., Novosibirsk 630055, Russia

Contacts: Maria Yurievna Konoshenko msol@ngs.ru

Introduction. The high mortality rate in patients with lung cancer (LC) is due to the lack of highly sensitive diagnostic markers of this disease. Genetic and epigenetic alterations in tumor cells, for example, aberrant microRNA expression, can be proposed. It is known that extracellular/circulating microRNA of biological fluids, in complexes with proteins, or packaged in extracellular vesicles is of interest for the diagnosis of tumor diseases.

Aim. To perform a comparative analysis of miRNA expression in plasma and plasma extracellular vesicles of LC patients and healthy donors. Based on the obtained results, to propose a diagnostic panel to identify patients with LC.

Materials and methods. Blood plasma was obtained from blood samples of healthy donors and LC patients by sequential centrifugation. Then, a fraction of extracellular vesicles (40–150 nm in size) was isolated from a part of the obtained plasma supernatant by the method of aggregation-precipitation with polyethylene glycol/blue dextran. MicroRNAs were isolated from both blood plasma fractions of patients and healthy donors using guanidine isothiocyanate and octanoic acid. Expression of 17 miRNAs most characteristic for the development of LC according to our and literature data in the above-mentioned blood plasma fractions was analyzed by stem-loop reverse transcription polymerase chain reaction.

Results. 29 and 10 miRNA pairs were differentially expressed in plasma extracellular vesicles and plasma of lung cancer patients and donors. Thus, plasma extracellular vesicles are characterized by greater potential as a source for miRNA based lung cancer diagnostic panels in comparison with blood plasma. Diagnostic algorithm based on aberrant miRNA expression of 8 different miRNAs (miRNA-30e, -1, -125b, -133, -222, -374, -425, -660) composed in 6 pairs was designed. This algorithm allows to diagnose 100 % of patients with lung cancer stages II–IV.

Conclusion. Extracellular plasma vesicles represent a promising source of diagnostically significant microRNAs compared to plasma microRNAs. For the diagnosis of patients with non-small cell lung cancer with 100 % sensitivity and specificity, a panel of 8 microRNAs (6 miRNA pairs) was proposed.

Keywords: lung cancer, non-small cell lung cancer, miRNA, diagnostic markers, liquid biopsy, microvesicles, blood plasma

For citation: Konoshenko M.Yu., Laktionov P.P., Lancuhaj Yu.A. et al. Cell-free plasma miRNAs analysis for low invasive lung cancer diagnostics. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(2):78–89. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-78-89

ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого (РЛ) – одно из наиболее распространенных в мире онкологических заболеваний, которое каждый год уносит жизни все большего числа людей (1,8 млн человек в 2020 г. [1]). Высокую смертность больных РЛ связывают с распространенностью и поздним выявлением заболевания, что обуславливает необходимость повышения эффективности его диагностики [2]. Многочисленные исследования молекулярных механизмов развития данной патологии свидетельствуют о том, что анализ генетических и эпигенетических изменений в клетках опухоли может быть использован для диагностики онкологических заболеваний и разработки новых типов терапии РЛ [3].

В основе канцерогенеза лежат нарушения в регуляции клеточного цикла, апоптоза, аутофагии, ангиогенеза, механизмы, поддерживающие раковые стволовые клетки, восстановление разрывов ДНК и т. д. Эти процессы управляются рядом сигнальных путей и контролируются клеточными рецепторами, транскрипционными факторами, а также регуляторами экспрессии генов, такими как модификаторы гистонов, метилирование ДНК и микроРНК. Многочисленные исследования указывают на важнейшую роль микроРНК в развитии онкологических заболеваний [4–6]. МикроРНК из клеток опухоли могут попадать во внеклеточные жидкости. Стабильность микроРНК в тканях и биологических жидкостях, а также малая инвазивность метода получения образца, простота выполнения исследования и легкость детекции делают их привлекательными биомаркерами рака. Известно, что часть микроРНК внеклеточных жидкостей упакована во внеклеточные везикулы (ВВ), а часть циркулирует в свободном виде, как правило, в комплексах с белками/липопротеинами/протеогликанами [7]. Показано, что экспрессия микроРНК в обеих фракциях плазмы крови обладает диагностическим потенциалом [8–10].

В настоящем исследовании предпринята попытка разработки диагностической панели для выявления больных немелкоклеточным РЛ (НМРЛ) на основе нескольких внеклеточных микроРНК из плазмы крови и ВВ плазмы крови. Проанализированы концентрации 17 микроРНК, экспрессия которых, согласно полученным нами ранее результатам [11, 12], а также анализу доступных данных литературы [13–30], коррелирует с развитием РЛ в целом и НМРЛ в частности.

Цель исследования – выполнить сравнительный анализ экспрессии микроРНК в составе ВВ и супернатанта плазмы крови больных РЛ и доноров и предложить на основании полученных результатов диагностическую панель для выявления пациентов с данной патологией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе Национального медицинского исследовательского центра им. акад. Е.Н. Мешалкина проанализированы образцы крови доноров ($n = 17$, возраст $62,9 \pm 6,3$ года) и первичных больных НМРЛ (табл. 1).

Образцы крови больных РЛ и доноров центрифугировали в течение 20 мин при 400 г и 4 °С (центрифуга MLW K70D) для осаждения клеток крови. Полученный супернатант центрифугировали в течение 20 мин при 1600 г и 4 °С (центрифуга MLW K70D).

Супернатант отбирали и центрифугировали в течение 20 мин при 17000 g и 4 °С для осаждения клеточного дедриса (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Фракцию ВВ получали методом последовательных агрегации в присутствии голубого декстрана и осаждения 20 % полиэтиленгликолем, как описано ранее [31].

Таблица 1. Характеристика больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ)

Table 1. Characteristics of non-small cell lung cancer (NSCLC) patient groups

Показатель	Больные НМРЛ (n = 17) NSCLC patients (n = 17)
Возраст, лет Age, years	52,6 ± 5,2
Т-стадия, %: T-stage, %:	
T2	29,4
T3	35,3
T4	35,3
N0	17,6
N1	29,4
N2	47,1
N3	23,5
M0	58,8
M1a–b	41,2
Стадия, %: Tumor stage, %:	
IIIА	17,6
IIIВ	17,6
IIIС	17,6
IVА	23,6
IVВ2	3,6

Обе фракции размораживали перед применением 1 раз. Из собранных фракций плазмы крови больных РЛ и доноров с использованием гуанидина изотиоцианата и октановой кислоты методом, описанным ранее [32], были выделены суммарные микроРНК. Затем с помощью обратной петлевой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) была проанализирована экспрессия 17 микроРНК [32, 33].

Относительную экспрессию микроРНК оценивали в 2 постановках (сетах). В 1-й постановке анализировали miR-19b, -74a, -324, -22-3p, -222-3p, -133, -144, -425, во 2-й – miR-205, -660, -30e, -125b, -92a, -378, -375, -27b, -31. Для дальнейшей оценки были рассчитаны значения ΔCt (разница пороговых циклов) каждой пары микроРНК внутри сета. Далее было проанализировано распределение значений ΔCt . Достоверность межгрупповых различий оценена с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (программа MedCalc).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Значения порогового цикла (Ct), полученные после профилирования микроРНК, нормализовали с помощью метода попарных отношений, который позволяет эффективно оценивать экспрессию всех

возможных комбинаций 2 микроРНК [34]. С помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) были выявлены пары микроРНК, характеризующиеся различной экспрессией у больных РЛ и доноров (табл. 2).

Обнаружено, что пар микроРНК, достоверно различающихся по экспрессии у больных НМРЛ и доноров, существенно больше во фракции ВВ плазмы крови, чем в супернатанте плазмы. Кроме того, различия относительной экспрессии в составе ВВ характеризуются большей достоверностью (пары микроРНК с $p < 0,001$). В плазме крови были обнаружены достоверные различия по 10 парам микроРНК ($p < 0,05$ – 8 пар; $p < 0,01$ – 2 пары), в то время как во фракции ВВ – по 29 ($p < 0,05$ – 7 пар; $p < 0,01$ – 7 пар; $p < 0,001$ – 15 пар) (табл. 2; рис. 1).

Наибольший интерес с точки зрения разработки надежных и диагностически устойчивых панелей представляют собой пары микроРНК, которые характеризуются наименьшим значением p и наибольшим значением ΔCt . К таким парам относятся miR-133/-222, miR-133/-374, miR-133/-425, miR-205/-125, miR-205/-30, miR-205/-378, miR-30/-660 и miR-125/-660 (при оценке их относительной экспрессии в ВВ плазмы). Результаты анализа ROC-кривых, чувствительности и специфичности каждой пары микроРНК как диагностических маркеров РЛ свидетельствуют о том, что именно во фракции ВВ находится большинство пар с наилучшими диагностическими показателями (наибольшими значениями площади под кривой (area under curve, AUC) и чувствительностью при 100 % специфичности) (табл. 2; рис. 2).

На основе подхода к созданию диагностических панелей, разработанного нами ранее [35] с использованием в качестве референсных средних значений $\Delta Ct \pm 2SD$ (SD – standard deviation, стандартное отклонение), была проанализирована возможность выявлять больных РЛ на основе оценки относительной экспрессии каждой пары микроРНК. Обнаружено, что оценка относительной экспрессии пары miR-133/-374 позволяет диагностировать наибольшее количество больных НМРЛ – 82 %. В то же время с помощью панели микроРНК, состоящей из 3 пар (miR-133/-374, miR-30/-660, miR-125/-660), можно выявить 100 % пациентов с РЛ. Для увеличения диагностической чувствительности и устойчивости эта минимальная панель была дополнена еще 3 парами микроРНК (miR-31/-125, miR-133/-425, miR-133/-222). Расширенная панель позволяет диагностировать каждого исследованного больного РЛ на основе оценки относительной экспрессии как минимум 2 различных пар микроРНК (от 2 до 5 различных пар микроРНК) (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным литературы, внеклеточные микроРНК крови представляют собой перспективные маркеры для диагностики онкологических заболеваний,

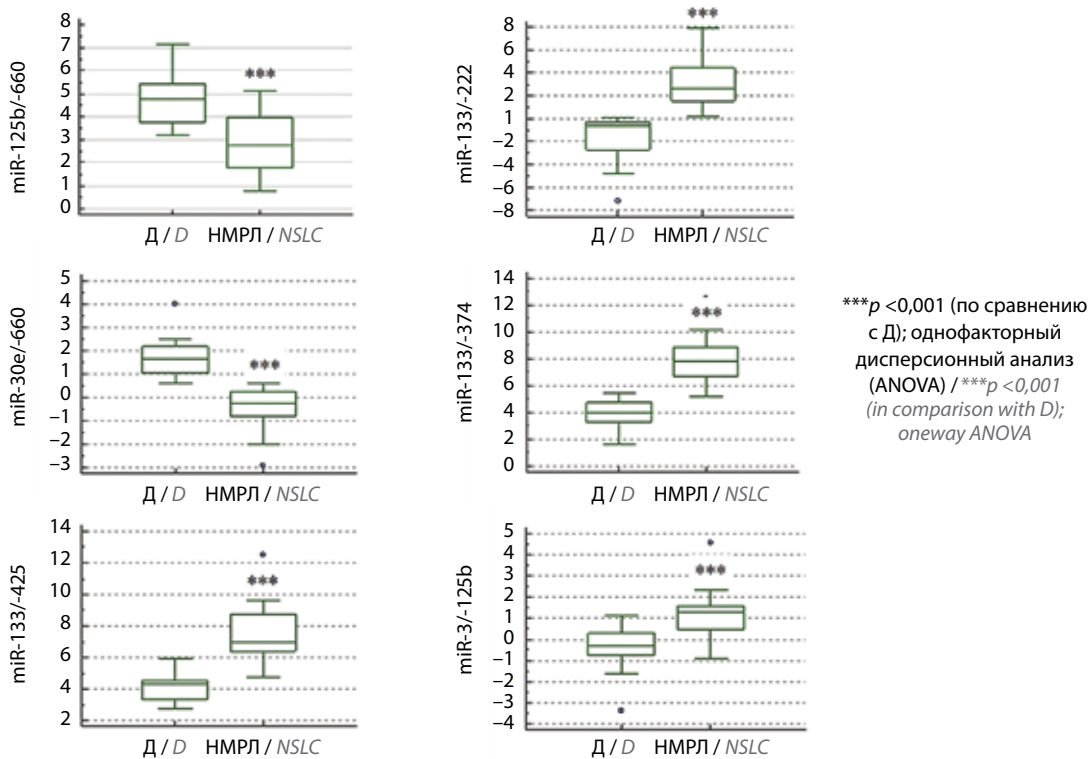


Рис. 1. Относительная экспрессия ΔCt некоторых микроРНК во фракции внеклеточных везикул плазмы крови доноров (Д) и больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ)

Fig. 1. ΔCt ratios of miRNA from blood extracellular vesicles of donors (D) and non-small cell lung cancer (NSLC) patients

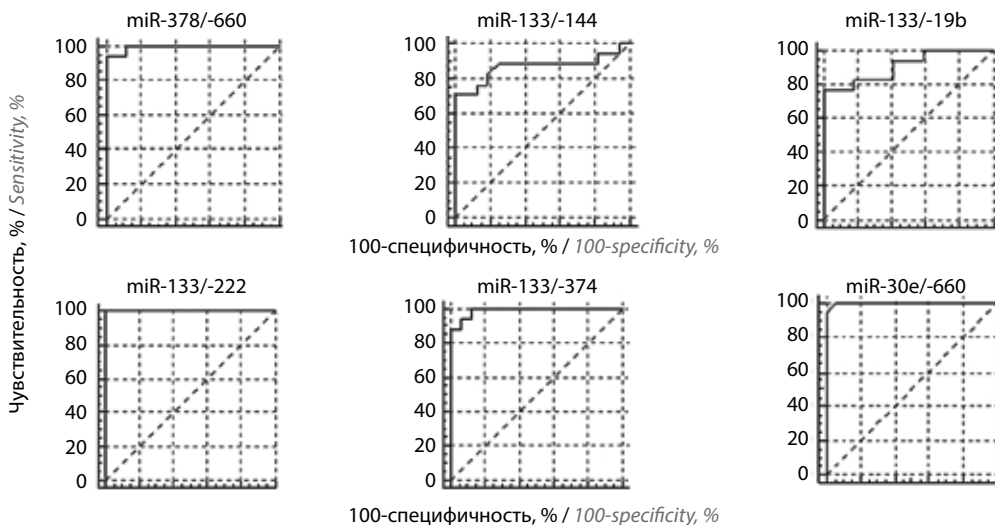


Рис. 2. ROC-анализ относительной экспрессии пар микроРНК во фракции внеклеточных везикул, обладающих наибольшей чувствительностью при 100 % специфичности

Fig. 2. ROC curve analysis of miRNA ratios with highest sensitivity and 100 % specificity in extracellular vesicles

в частности РЛ [12–30], рака предстательной железы [11, 22], остеосаркомы [12], рака яичников и др. Тем не менее диагностические тесты на основе анализа aberrантной экспрессии внеклеточных микроРНК не нашли широкого применения в клинических диагностических лабораториях. Это может быть связано в том числе с методологическими особенностями работы с микроРНК, такими как нормализация данных

об экспрессии микроРНК, недостаточная чувствительность ОТ-ПЦР, выделение образцов без наличия ингибиторов полимеразных реакций и т. д. [36]. В настоящей работе выполнено сравнительное исследование относительных уровней экспрессии 17 микроРНК во фракциях ВВ плазмы крови и общей плазмы крови у пациентов с НМЛР и доноров. Для выделения ВВ из плазмы крови был выбран перспективный с точки

Таблица 2. Пары микроРНК, характеризующиеся различной экспрессией у больных немелкоклеточным раком легкого и доноров во фракциях внеклеточных везикул и супернатанта плазмы крови

Table 2. miRNA ratios with significantly different expression in extracellular vesicles and cell-free plasma of non-small cell lung cancer patients and donors

Показатель Parameter	$p < 0,05$						$p \leq 0,01$		
	$\Delta Ct < 1$			$\Delta Ct \geq 1$			$1 < \Delta Ct < 2$		
	Пары микроРНК miRNA pairs	AUC	Чувствительность при 100 % специфичности, % Sensitivity at 100 % specificity, %	Пары микроРНК miRNA pairs	AUC	Чувствительность при 100 % специфичности, % Sensitivity at 100 % specificity, %	Пары микроРНК iRNA pairs	AUC	Чувствительность при 100 % специфичности, % Sensitivity at 100 % specificity, %
Внеклеточные везикулы Extracellular vesicles	miR-222/-19	70	12	miR-133/-425	97	76	miR-125/-375	78	12
	miR-30/-92	68	0	miR-222/-144	78	6	miR-222/-425	85	18
	miR-425/-374	64	44	miR-27/-125	75	6	miR-660/-92	83	6
				miR-324/-374	73	12			
Супернатант плазмы крови Cell-free plasma				miR-144/-374	72	24			
	miR-30/-378	71	29	miR-222/-19	68	29			
	miR-425/-19	68	6	miR-374/-19	69	35	miR-205/-27	72	20
				miR-27/-660	65	47			
				miR-378/-27	71	29			
				miR-378/-375	72	29			

Примечание. AUC – area under curve, площадь под кривой.

зрения внедрения в клиническую практику и технологически простой метод осаждения ВВ полиэтиленгликолем в присутствии голубого декстрана [31]. Эта технология не уступает по эффективности «золотому стандарту» выделения ВВ – ультрацентрифугированию, но в то же время не требует сложного дорогостоящего оборудования, позволяет значительно ускорить процедуру и снизить ее стоимость и трудоемкость.

Обнаружено, что пар микроРНК, экспрессия которых достоверно различается у больных РЛ и доноров, существенно больше во фракции ВВ плазмы (29 пар: 7 пар – $p < 0,05$; 7 пар – $p < 0,01$; 15 пар – $p < 0,01$), чем в супернатанте плазмы (10 пар: 8 пар – $p < 0,05$; 2 пары – $p < 0,01$). Таким образом, фракция микроРНК, обогащенная с помощью выделения ВВ, представляет собой перспективный источник микроРНК и ее можно использовать для разработки диагностики НМРЛ. Это полностью согласуется с полученными нами ранее при аналогичном исследовании больных раком предстательной железы данными. Так, мы выявили, что фракция ВВ мочи обладает большим потенциалом для разработки диагностической панели на основе микроРНК для рака предстательной железы по сравнению с бесклеточной фракцией мочи [32].

Уровень микроРНК в составе ВВ плазмы больных РЛ существенно отличается от такового у доноров [37–40]. Диагностический алгоритм, предложенный в настоящей работе на основе оценки относительной экспрессии микроРНК во фракции ВВ плазмы крови, позволил диагностировать 100 % доноров, больных НМРЛ. Этот алгоритм заключается в сравнении относительной экспрессии 6 пар микроРНК (8 различных микроРНК: miRNA-30e, -31, -125b, -133, -222, -374, -425, -660) с референсными значениями. Кроме того, участие этих микроРНК в патогенезе РЛ подтверждено другими исследованиями (табл. 4).

Так, например, было показано, что экспрессия miR-30e была достоверно ниже в образцах тканей, плазмы [41] и ВВ плазмы крови больных РЛ [42]. Более того, анализ экспрессии miR-30e в микровезикулах плазмы позволяет дифференцировать пациентов по стадии заболевания и, следовательно, по необходимости и эффективности хирургического вмешательства [42]. В работах на клеточных линиях было показано, что miR-30e играет роль онкосупрессора: усиление экспрессии этой микроРНК приводит к снижению пролиферации, миграции, инвазии, подавлению эпителиально-мезенхимального перехода, а также к усилению апоптоза, в то время как уменьшение экспрессии

$p \leq 0,01$			$p \leq 0,001$					
$\Delta Ct > 2$			$1 < \Delta Ct < 2$			$\Delta Ct > 2$		
Пары микроРНК miRNA pairs	AUC	Чувствительность при 100 % специфичности, % Sensitivity at 100 % specificity, %	Пары микроРНК miRNA pairs	AUC	Чувствительность при 100 % специфичности, % Sensitivity at 100 % specificity, %	Пары микроРНК miRNA pairs	AUC	Чувствительность при 100 % специфичности, % Sensitivity at 100 % specificity, %
miR-133/-324	94	88	miR-125/-660	87	65	miR-133/-144	87	71
miR-22/-133	85	0	miR-30/-31	86	53	miR-133/-19	91	76
miR-22/-222	87	53	miR-30/-375	81	35	miR-133/-222	100	100
miR-324/-222	80	35	miR-31/-125	84	53	miR-133/-374	99	88
			miR-378/-92	84	35	miR-133/-425	97	76
						miR-205/-125	88	35
						miR-205/-30	86	53
						miR-205/-378	87	24
						miR-30/-660	99,9	94
						miR-378/-660	99	94
miR-133/-19	79	44	—	—	—	—	—	—

Note. AUC – area under curve.

miRNA-30e – к противоположным результатам [43, 44]. В качестве механизмов онкосупрессивного действия miRNA-30e предлагают регуляцию осей ITGA6, USP22 ITGA6/PI3K/АКТ и SOX9 [41, 43–45]. В связи с ключевой ролью miR-30e в патогенезе РЛ было предложено использовать ее для разработки таргетной терапии, тем более что увеличение экспрессии этой микроРНК усиливает чувствительность к терапии gefinitибом [46]. Тем не менее некоторые данные литературы противоречивы. Например, было показано, что, с одной стороны, miR-31 активирует опухолевый процесс, усиливая пролиферацию, миграцию, развитие метастазов в лимфатических узлах и подавляя апоптоз, а с другой – ингибирует стволовые раковые клетки (см. табл. 4). Аналогично одни исследования продемонстрировали, что miR-222 усиливает пролиферацию, миграцию, инвазию, жизнеспособность опухолевых клеток и подавляет апоптоз, а в ходе других было выявлено, что повышенная экспрессия этой микроРНК снижает жизнеспособность опухолевых клеток (см. табл. 4). Подобные противоречия могут возникать при работе на различных моделях и при использовании разных источников микроРНК (ткани, клеточные линии, внеклеточные жидкости, микровезикулы, экзосомы), методов выделения, а также в связи с ограниченной

выборкой исследованных объектов. Внеклеточные везикулы плазмы крови и суммарная плазма могут содержать разные наборы микроРНК [47–49]. Несмотря на большой интерес к микроРНК биологических жидкостей как к маркерам различных заболеваний, экспрессия выбранных микроРНК в плазме крови и в ВВ плазмы крови остается малоизученной. В настоящей работе относительная экспрессия пар микроРНК miR-133/-374, miR-31/-125b, miR-133/-425, miR-133/-222 была повышена, а пар miR-30e/-660, miR-125b/-660 – понижена во фракции ВВ плазмы крови больных РЛ по сравнению с донорами. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об онкосупрессорной роли miR-133, -660, -31 и о том, что miR-374, -30e, -125b, -425 и -222 активизируют опухолевые процессы (хотя следует уточнить, что это некоторое упрощение, поскольку одна микроРНК из пары может выполнять лишь роль нормализатора). Эти сведения полностью согласуются с данными литературы о роли miR-133, -660, -374, miR-425, -222 в развитии РЛ, в то время как относительно miR-31, -30e и -125b получены противоречивые результаты (см. табл. 4).

Участие выбранных микроРНК в онкогенезе РЛ подтверждает их перспективность в качестве диагностических биомаркеров данной патологии и свидетельствует

Таблица 3. Результаты анализа микроРНК внеклеточных везикул больных немелкоклеточным раком легкого и доноров по диагностическому алгоритму

Table 3. The results of analysis of miRNA packed in extracellular vesicles of non-small cell lung cancer patients and donors by diagnostic algorithm

Образец Sample	Пороговое значение ΔCt Threshold value ΔCt						Результат Result
	miR-133/ -374 >6,0	miR-30/ -660 <0,1	miR-125/ -660 <2,6	miR-31/ -125 >1,7	miR-133/ -425 > 6,0	miR-133/ -222 >3,2	
Больной: Patient:							
1	+	+	-	-	+	-	+
2	+	+	+	-	-	-	+
3	-	+	+	-	-	-	+
4	-	+	-	+	-	-	+
5	+	+	+	-	+	+	+
6	+	-	-	-	+	+	+
7	+	-	-	-	+	-	+
8	+	+	+	-	+	+	+
9	+	-	-	-	+	-	+
10	+	+	+	+	+	-	+
11	+	+	-	-	+	+	+
12	+	-	-	-	+	+	+
13	-	-	+	+	-	-	+
14	+	+	-	+	+	+	+
15	+	+	-	-	+	+	+
16	+	+	-	-	+	+	+
17	+	-	-	-	+	+	+
Донор: Donor:							
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-

о том, что они могут иметь более широкое клиническое применение. Кроме того, выбранные микроРНК регулируют различные сигнальные пути, что гарантирует чувствительность и стабильность диагностики. Несмотря на значительное количество работ, в которых описывается участие различных микроРНК в развитии РЛ, наше исследование является одним из немногих, демонстрирующих высокий диагностический потенциал микроРНК, упакованных во ВВ [42, 50]. Таким образом, подход, основанный на анализе относительной экспрессии микроРНК из ВВ плазмы крови, набор микроРНК и разработанный нами диагностический алгоритм могут быть в дальнейшем верифицированы на больших выборках доноров и определена их специфичность относительно конкретного вида рака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе сравнительного исследования относительной экспрессии микроРНК ВВ и супернатанта плазмы крови больных НМРЛ и доноров обнаружены 29 и 10 пар микроРНК соответственно, относительная экспрессия которых у больных РЛ и доноров во фракциях ВВ и супернатанта плазмы крови достоверно различалась. Показано, что оценка относительной экспрессии микроРНК ВВ плазмы имеет большую значимость для диагностики НМРЛ по сравнению с анализом относительной экспрессии микроРНК плазмы крови. Разработан диагностический алгоритм, основанный на исследовании aberrантной экспрессии 8 различных микроРНК в составе 6 пар микроРНК, позволяющий диагностировать 100 % больных НМРЛ II–IV стадии.

Таблица 4. Участие микроРНК в диагностическую панель в развитии рака легкого (РЛ) (по данным литературы)
 Table 4. The involvement of miRNAs from diagnostic panel in lung cancer (LC) development (according to literature data)

МикроРНК miRNA	Экспрессия микроРНК в образцах РЛ по сравнению с образцами доноров miR expression in LC samples in comparison with donors			Экспрессия микроРНК, ассоциированная с плохим прогнозом miR expression associated with poor prognosis	Экспрессия микроРНК, ассоциированная с прогрессией опухоли miR expression associated with tumor progression	Биологический эффект Biological effect	Гены-мишени и сигнальные пути, с помощью которых осуществляется биологический эффект Target genes and signal pathways	Влияние на эффективность лечения Effect on therapy effectiveness	Ссылки References
	Ткань Tissue	Плазма Plasma	Клеточные линии Cell lines						
miR-30e	↓	↓	—	↓	↓/↑	Ингибирует пролиферацию, миграцию, инвазию и эпителиально-мезенхимальный переход, стимулирует апоптоз/клеточный рост Inhibits proliferation, migration, invasion, epithelial mesenchymal transition, enhances apoptosis/enhances cell growth	Сигнальный путь ITGA6/PI3K/АКТ, USP22, SOX9, RPN13 ?	Повышает чувствительность к терапии gefинитибом Enhances sensitivity to gefitinib	[41, 43–46, 51–54]
miR-31	↑	↑	↑	↑	↑	Усиливает пролиферацию, миграцию, развитие метастазов в лимфатических узлах, подавляет апоптоз/ингибирует стволовые раковые клетки Enhances proliferation, migration, lymph nodes metastasis, inhibits apoptosis/inhibits cancer stem cells	Ось TNS1/p53, LATS2, VAP1, ABCB9, FOXO1, сигнальные пути MET-PI3K-Акт, RAS/MAPK (через HuR) ?	Ингибирует апоптоз, индуцированный цисплатином Inhibits apoptosis induced by cisplatin	[45, 55–62]
miR-125b	↓	—	—	—	—	—	—	—	[45, 63]
miR-133	—	↓	↓	—	—	Ингибирует пролиферацию, миграцию, инвазию и эпителиально-мезенхимальный переход, усиливает апоптоз Inhibits proliferation, migration, invasion, epithelial mesenchymal transition, enhances apoptosis	EGFR, FLOT2 через сигнальный путь Акт, FOXQ1-TGF-β, PKM2, MMP 14 ?	Повышает чувствительность к радиотерапии Enhances sensitivity to radiotherapy	[65–69]

Окончание табл. 4
The end of table 4

Микро-РНК miRNA	Экспрессия микроРНК в образцах РЛ по сравнению с образцами доноров miR expression in LC samples in comparison with donors		Экспрессия микроРНК, ассоциированная с плохим прогнозом miR expression associated with poor prognosis	Экспрессия микроРНК, ассоциированная с прогрессией опухоли miR expression associated with tumor progression	Биологический эффект Biological effect	Гены-мишени и сигнальные пути, с помощью которых осуществляется биологический эффект Target genes and signal pathways	Влияние на эффективность лечения Effect on therapy effectiveness	Ссылки References
	Ткань Tissue	Плазма Plasma						
miR-222	↑	–	↑	–	Усиливает пролиферацию, миграцию, инвазию, жизнеспособность опухолевых клеток, подавляет апоптоз/ингибирует жизнеспособность опухолевых клеток Enhances proliferation, migration, invasion, cell viability, inhibits apoptosis/inhibits cell viability	PUMA (Bcl-2-связывающий компонент 3), EGFR, P27, ETS1 ?	Повышает резистентность к gefitinib Enhances resistance to gefitinib	[70–78]
miR-374	–	–	↑	–	Усиливает инвазию Enhances invasion	–	–	[79]
miR-425	↑	–	↑	↑	Усиливает пролиферацию, миграцию, инвазию, способность формировать колонии, метастазирование Enhances proliferation, migration, invasion, colony formation, metastasis	СРВЕ1, сигнальный путь РТЕН/Р13К/АКТ через DAPK1, AMPH-1, FOXJ3 ?	Повышает резистентность к терапии на основе препаратов платины Enhances resistance to platinum-based therapy	[80–84]
miR-660	↓	↓/↑ в экзосомах (in plasma exosomes)	↓	–	Усиливает пролиферацию, миграцию, инвазию, способность формировать колонии, клеточный рост/подавляет клеточный рост, пролиферацию и метастазирование Enhances proliferation, migration, invasion, colony formation, cell growth/inhibits cell growth, proliferation and metastasis	MDM2-p53, KLF9	–	[85–87]

Примечание. ↑ – повышенная экспрессия в образцах больных РЛ по сравнению с донорами/в линиях клеток РЛ по сравнению с псевдонормальными клетками эпителия легких.
↓ – пониженная экспрессия в образцах больных РЛ по сравнению с донорами/в линиях клеток РЛ по сравнению с псевдонормальными клетками эпителия легких.

Note. ↑ increased expression in LC patient samples compared to donor/LC lines compared to pseudonormal lung epithelial cells; ↓ reduced expression in LC patient samples compared to donor/LC cell lines compared to pseudonormal lung epithelial cells.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
- Eberhardt W.E., Pötting C., Gauler T.C. et al. Phase III study of surgery versus definitive concurrent chemoradiotherapy boost in patients with resectable stage IIIA(N2) and selected IIIB non-small-cell lung cancer after induction chemotherapy and concurrent chemoradiotherapy (ESPA-TUE). *J Clin Oncol* 2015;33(35):4194–201. DOI: 10.1200/JCO.2015.62.6812
- Chang K., Wang H. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nat Genet* 2013;45(10):1113–20. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2015.04.02
- Sempere L.F., Azmi A.S., Moore A. microRNA-based diagnostic and therapeutic applications in cancer medicine. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2021;12(6):e1662. DOI: 10.1002/wrna.1662
- Dhawan A., Scott J.G., Harris A.L., Buffa F.M. Pan-cancer characterisation of microRNA across cancer hallmarks reveals microRNA-mediated downregulation of tumour suppressors. *Nat Commun* 2018;9(1):5228. DOI: 10.1038/s41467-018-07657-1
- He B., Zhao Z., Cai Q. et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer. *Int J Biol Sci* 2020;16(14):2628–47. DOI: 10.7150/ijbs.4720
- Fredsoe J., Rasmussen A.K.I., Thomsen A.R. et al. Diagnostic and prognostic microRNA biomarkers for prostate cancer in cell-free urine. *Eur Urol Focus* 2018;4(6):825–33. DOI: 10.1016/j.euf.2017.02.018
- Hu C., Meiners S., Lukas C. et al. Role of exosomal microRNAs in lung cancer biology and clinical applications. *Cell Prolif* 2020;53(6):e12828. DOI: 10.1111/cpr.12828
- Yi M., Liao Z., Deng L. et al. High diagnostic value of miRNAs for NSCLC: quantitative analysis for both single and combined miRNAs in lung cancer. *Ann Med* 2021;53(1):2178–93. DOI: 10.1080/07853890.2021.2000634
- Gao S., Guo W., Liu T. et al. Plasma extracellular vesicle microRNA profiling and the identification of a diagnostic signature for stage I lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2022;113(2):648–59. DOI: 10.1111/cas.15222
- Osipov I.D., Zaporozhchenko I.A., Bondar A.A. et al. Cell-free miRNA-141 and miRNA-205 as prostate cancer biomarkers. *Adv Exp Med Biol* 2016;924:9–12. DOI: 10.1007/978-3-319-42044-8_2
- Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Ponomaryova A.A. et al. Profiling of 179 miRNA expression in blood plasma of lung cancer patients and cancer-free individuals. *Sci Rep* 2018;8(1):6348. DOI: 10.1038/s41598-018-24769-2
- Li C., Yin Y., Liu X. et al. Non-small cell lung cancer associated microRNA expression signature: integrated bioinformatics analysis, validation and clinical significance. *Oncotarget* 2017;8(15):24564–78. DOI: 10.18632/oncotarget.15596
- Huang W., Huang W., Hu J. et al. Two microRNA panels to discriminate three subtypes of lung carcinoma in bronchial brushing specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(11):1160–7. DOI: 10.1164/rccm.201203-0534OC
- Wu C., Cao Y., He Z. et al. Serum levels of miR-19b and miR-146a as prognostic biomarkers for non-small cell lung cancer. *Tohoku J Exp Med* 2014;232(2):85–95. DOI: 10.1620/tjem.232.85
- Boeri M., Verri C., Conte D. et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(9):3713–8. DOI: 10.1073/pnas.1100048108
- Zhou X., Wen W., Shan X. et al. A six-microRNA panel in plasma was identified as a potential biomarker for lung adenocarcinoma diagnosis. *Oncotarget* 2016;8(4):6513–25. DOI: 10.18632/oncotarget.14311
- Liu M., Gao J., Huang Q. et al. Downregulating microRNA-144 mediates a metabolic shift in lung cancer cells by regulating GLUT1 expression. *Oncol Lett* 2016;11(6):3772–6. DOI: 10.3892/ol.2016.4468
- Pan H.L., Wen Z.S., Huang Y.C. et al. Down-regulation of microRNA-144 in air pollution-related lung cancer. *Sci Rep* 2015;5:14331. DOI: 10.1038/srep14331
- Zhang G., An H., Fang X. MicroRNA-144 regulates proliferation, invasion, and apoptosis of cells in malignant solitary pulmonary nodule via zinc finger E-box-binding homeobox 1. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(5):5960–7.
- Ling B., Wang G.X., Long G. et al. Tumor suppressor miR-22 suppresses lung cancer cell progression through post-transcriptional regulation of ErbB3. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138(8):1355–61. DOI: 10.1007/s00432-012-1194-2
- Xin M., Qiao Z., Li J. et al. miR-22 inhibits tumor growth and metastasis by targeting ATP citrate lyase: evidence in osteosarcoma, prostate cancer, cervical cancer and lung cancer. *Oncotarget* 2014;7(28):44252–65. DOI: 10.18632/oncotarget.10020
- Hosseini S.A., Seidi M., Yaghoobi H. Designed miR-19a/b sponge induces apoptosis in lung cancer cells through the PI3K-PTEN-Akt pathway regulation. *Mol Biol Rep* 2022;49(9):8485–93. DOI: 10.1007/s11033-022-07670-0
- Zhang X., Wang X., Chai B. et al. Downregulated miR-18a and miR-92a synergistically suppress non-small cell lung cancer via targeting Sprouty 4. *Bioengineered* 2022;13(4):11281–95. DOI: 10.1080/21655979.2022.2066755
- Reis P.P., Drigo S.A., Carvalho R.F. et al. Circulating miR-16-5p, miR-92a-3p, and miR-451a in plasma from lung cancer patients: potential application in early detection and a regulatory role in tumorigenesis pathways. *Cancers* 2020;12(8):2071. DOI: 10.3390/cancers12082071
- Wang Z., Pan L., Yang L. et al. Long non-coding RNA GATA6-AS1 sponges miR-324-5p to inhibit lung cancer cell proliferation and invasion. *Onco Targets Ther* 2020;13:9741–51. DOI: 10.2147/OTT.S256336
- Zhang Y., Xu H. Serum exosomal miR-378 upregulation is associated with poor prognosis in non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Lab Anal* 2020;34(6):e23237. DOI: 10.1002/jcla.23237
- Ji K.X., Cui F., Qu D. et al. MiR-378 promotes the cell proliferation of non-small cell lung cancer by inhibiting FOXG1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22(4):1011–9. DOI: 10.26355/eurev_201802_14383
- Cao X., Zhong W., Guo S. et al. Low expression of miR-27b in serum exosomes of non-small cell lung cancer facilitates its progression by affecting EGFR. *Open Med (Wars)* 2022;17(1):816–25. DOI: 10.1515/med-2022-0472
- Zhong S., Golpon H., Zardo P. et al. miRNAs in lung cancer. A systematic review identifies predictive and prognostic miRNA candidates for precision medicine in lung cancer. *Transl Res* 2021;230:164–96. DOI: 10.1016/j.trsl.2020.11.012
- Konoshenko M.Y., Lekchnov E.A., Bryzgunova O.E. et al. Isolation of extracellular vesicles from biological fluids via the aggregation-precipitation approach for downstream miRNAs detection. *Diagnostics* 2012;11(3):384. DOI: 10.3390/diagnostics11030384
- Lekchnov E.A., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S. et al. Protocol for miRNA isolation from biofluids. *Anal Biochem* 2016;499:78–84. DOI: 10.1016/j.ab.2016.01.025
- Konoshenko M.Y., Lekchnov E.A., Bryzgunova O.E. et al. The panel of 12 cell-free microRNAs as potential biomarkers in prostate neoplasms. *Diagnostics* 2020;10(1):38. DOI: 10.3390/diagnostics10010038
- Landoni E., Miceli R., Callari M. et al. Proposal of supervised data analysis strategy of plasma miRNAs from hybridisation array data with an application to assess hemolysis-related deregulation. *BMC Bioinformatics* 2015;16:388. DOI: 10.1186/s12859-015-0820-9
- Bryzgunova O.E., Zaporozhchenko I.A., Lekchnov E.A. et al. Data analysis algorithm for the development of extracellular

- miRNA-based diagnostic systems for prostate cancer. *PLoS One* 2019;14(4):e0215003. DOI: 10.1371/journal.pone.0215003
36. Bryzgunova O.E., Konoshenko M.Y., Zaporozhchenko I.A. et al. Isolation of cell-free miRNA from biological fluids: influencing factors and methods. *Diagnostics (Basel)* 2021;11(5):865. DOI: 10.3390/diagnostics11050865
 37. Dejima H., Iinuma H., Kanaoka R. et al. Exosomal microRNA in plasma as a non-invasive biomarker for the recurrence of non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 2017;13(3):1256–63. DOI: 10.3892/ol.2017.5569
 38. Kanaoka R., Iinuma H., Dejima H. et al. Usefulness of plasma exosomal microRNA-451a as a noninvasive biomarker for early prediction of recurrence and prognosis of non-small cell lung cancer. *Oncology* 2018;94(5):311–23. DOI: 10.1159/000487006
 39. Liu Q., Yu Z., Yuan S. et al. Circulating exosomal microRNAs as prognostic biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8(8):13048–58. DOI: 10.18632/oncotarget.14369
 40. Munagala R., Aqil F., Gupta R.C. Exosomal miRNAs as biomarkers of recurrent lung cancer. *Tumor Biol* 2016;37(8):10703–14. DOI: 10.1007/s13277-016-4939-8
 41. Silva J., García V., Zaballos Á. et al. Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur Respir J* 2011;37(3):617–23. DOI: 10.1183/09031936.00029610
 42. Zhuang L., Shou T., Li K. et al. MicroRNA-30e-5p promotes cell growth by targeting PTPN13 and indicates poor survival and recurrence in lung adenocarcinoma. *J Cell Mol Med* 2017;21(11):2852–62. DOI: 10.1111/jcmm.13198
 43. Li W., Yang P., Zhong C. et al. The circ-PITX1 promotes non-small cell lung cancer development via the miR-30e-5p/ITGA6 axis. *Cell Cycle* 2022;21(3):304–21. DOI: 10.1080/15384101.2021.2020041
 44. Dong W., Zhang H., Dai Y. et al. circRNA circFAT1(e2) Elevates the development of non-small-cell lung cancer by regulating miR-30e-5p and USP22. *BioMed Res Int* 2021;2021:6653387. DOI: 10.1155/2021/6653387
 45. Gao W., Shen H., Liu L. et al. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137(4):557–66. DOI:10.1007/s00432-010-0918-4
 46. Ning Z.Q., Lu H.L., Chen C. et al. MicroRNA-30e reduces cell growth and enhances drug sensitivity to gefitinib in lung carcinoma. *Oncotarget* 2017;8(3):4572–81. DOI: 10.18632/oncotarget.13944
 47. Silva J., García V., Zaballos Á. et al. Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur Respir J* 2011;37(3):617–23. DOI: 10.1183/09031936.00029610
 48. Turchinovich A., Burwinkel B. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol* 2012;9(8):1066–75. DOI: 10.4161/rna.21083
 49. Lunavat T.R., Lesley C., Dae-Kyum K. et al. Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells – evidence of unique microRNA cargos. *RNA Biol* 2015;12(8):810–23. DOI: 10.1080/15476286.2015.1056975
 50. Huang X., Tiezheng Y., Tschannen M. et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 2013;14:319. DOI: 10.1186/1471-2164-14-319
 51. Markou A., Sourvinou I., Vorkas P.A. et al. Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013;81(3):388–96. DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.05.007
 52. Cui Y., Zhao L., Zhao S. et al. MicroRNA-30e inhibits proliferation and invasion of non-small cell lung cancer via targeting SOX9. *Human Cell* 2019;32(3):326–33. DOI: 10.1007/s13577-018-0223-0
 53. Xu G., Cai J., Wang L. et al. MicroRNA-30e-5p suppresses non-small cell lung cancer tumorigenesis by regulating USP22-mediated Sirt1/JAK/STAT3 signaling. *Exp Cell Res* 2018;362(2):268–78. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.11.027
 54. He J., Jin S., Zhang W. et al. Long non-coding RNA LOC554202 promotes acquired gefitinib resistance in non-small cell lung cancer through upregulating miR-31 expression. *J Cancer* 2019;10(24):6003–13. DOI: 10.7150/jca.35097
 55. Liu X., Sempere L.F., Ouyang H. et al. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors. *J Clin Invest* 2010;120(4):1298–309. DOI: 10.1172/JCI39566
 56. Zhu C., Wang S., Zheng M. et al. miR-31-5p modulates cell progression in lung adenocarcinoma through TNSI/p53 axis. *Strahlenther Onkol* 2022;198(3):304–14. DOI: 10.1007/s00066-021-01895-x
 57. Hou C., Sun B., Jiang Y. et al. MicroRNA-31 inhibits lung adenocarcinoma stem-like cells via down-regulation of MET-PI3K-Akt signaling pathway. *Anticancer Agents Med Chem* 2016;16(4):501–18. DOI: 10.2174/1871520615666150824152353
 58. Zhang J., Li D., Zhang Y. et al. Integrative analysis of mRNA and miRNA expression profiles reveals seven potential diagnostic biomarkers for non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2020;43(1):99–112. DOI: 10.3892/or.2019.7407
 59. Cheng X., Sha M., Jiang W. et al. LINC00174 suppresses non-small cell lung cancer progression by up-regulating LATS2 via sponging miR-31-5p. *Cell J* 2022;24(3):140–7. DOI: 10.22074/cellj.2022.7991
 60. Wang Y., Shang S., Yu K. et al. miR-224, miR-147b and miR-31 associated with lymph node metastasis and prognosis for lung adenocarcinoma by regulating PRPF4B, WDR82 or NR3C2. *Peer J* 2020;8:e9704. DOI: 10.7717/peerj.9704
 61. Meng W., Ye Z., Cui R. et al. MicroRNA-31 predicts the presence of lymph node metastases and survival in patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2013;19(19):5423–33. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0320
 62. Zeng X., Liu D., Peng G. et al. MicroRNA-31-3p promotes the invasion and metastasis of non-small-cell lung cancer cells by targeting forkhead Box 1 (FOXO1). *Comput Math Methods Med* 2022;2022:4597087. DOI: 10.1155/2022/4597087
 63. Sun X., Zhang S., Ma X. Prognostic value of microRNA-125 in various human malignant neoplasms: a meta-analysis *Clin Lab* 2015;61(11):1667–74. DOI: 10.7754/clin.lab.2015.150408
 64. Kazempour Dizaji M., Farzanegan B., Bahrami N. et al. Expression of miRNA1, miRNA133, miRNA191, and miRNA24, as good biomarkers, in non-small cell lung cancer using real-time PCR method. *Asian Pac J Cancer Prev* 2022;23(5):1565–70. DOI: 10.31557/APJCP.2022.23.5.1565
 65. Liu S., Chen J., Zhang T. et al. MicroRNA-133 inhibits the growth and metastasis of the human lung cancer cells by targeting epidermal growth factor receptor. *J BUON* 2012;24(3):929–35.
 66. Liu G., Li Y.I., Gao X. Overexpression of microRNA-133b sensitizes non-small cell lung cancer cells to irradiation through the inhibition of glycolysis. *Oncol Lett* 2016;11(4):2903–8. DOI: 10.3892/ol.2016.4316
 67. Wei G., Xu Y., Peng T. et al. miR-133 involves in lung adenocarcinoma cell metastasis by targeting FLOT2. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018;46(2):224–30. DOI: 10.1080/21691401.2017.1324467
 68. Xiao B., Liu H., Gu Z. et al. Expression of microRNA-133 inhibits epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells by directly targeting FOXQ1. *Arch Bronconeumol* 2016;52(10):505–11. DOI: 10.1016/j.arbres.2015.10.016
 69. Xu M., Wang Y.Z. miR-133a suppresses cell proliferation, migration and invasion in human lung cancer by targeting MMP-14. *Oncol Rep* 2013;30(3):1398–404. DOI: 10.3892/or.2013.2548
 70. Peinado P., Andrades A., Martorell-Marugán J. et al. The SWI/SNF complex regulates the expression of miR-222, a tumor suppressor microRNA in lung adenocarcinoma. *Human Mol Gen* 2021;30(23):2263–71. DOI: 10.1093/hmg/ddab187
 71. Wu Q., Yu L., Lin X. et al. Combination of serum miRNAs with serum exosomal miRNAs in early diagnosis for non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res* 2020;12:485–95. DOI: 10.2147/CMAR.S232383

72. Chen W., Li X. MiR-222-3p promotes cell proliferation and inhibits apoptosis by targeting PUMA (BBC3) in non-small cell lung cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2020;19:1533033820922558. DOI: 10.1177/1533033820922558
73. Garofalo M., Romano G., Di Leva G. et al. EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers. *Nat Med* 2011;18:74–82. DOI: 10.1038/nm.2577
74. Mao K.P., Zhang W.N., Liang X.M. et al. MicroRNA-222 expression and its prognostic potential in non-small cell lung cancer. *Sci World J* 2014;908326. DOI: 10.1155/2014/908326
75. Zhong C., Ding S., Xu Y. et al. MicroRNA-222 promotes human non-small cell lung cancer H460 growth by targeting p27. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(4):5534–40.
76. Sun Q., Jiang C.W., Tan Z.H. et al. MiR-222 promotes proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells by targeting ETS1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21(10):2385–91.
77. Hetta H.F., Zahran A.M., El-Mahdy R.I. et al. Assessment of circulating miRNA-17 and miRNA-222 expression profiles as non-invasive biomarkers in egyptian patients with non-small-cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2019;20(6):1927–33. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.6.1927
78. Kim Y., Sim J., Kim H. et al. MicroRNA-374a expression as a prognostic biomarker in lung adenocarcinoma. *J Pathol Transl Med* 2019;53(6):354–60. DOI: 10.4132/jptm.2019.10.01
79. Wang G., Ji X., Li P. et al. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes containing microRNA-425 promote migration, invasion and lung metastasis by down-regulating CPEB1. *Regen Ther* 2022;20:107–16. DOI: 10.1016/j.reth.2022.03.007
80. Guo Z., Ye H., Zheng X. et al. Extracellular vesicle-encapsulated microRNA-425-derived from drug-resistant cells promotes non-small-cell lung cancer progression through DAPK1-mediated PI3K/AKT pathway. *J Cell Physiol* 2021;236(5):3808–20. DOI: 10.1002/jcp.30126
81. Zhou J.S., Yang Z.S., Cheng S.Y. et al. miRNA-425-5p enhances lung cancer growth via the PTEN/PI3K/AKT signaling axis. *BMC Pulm Med* 2020;20(1):223. DOI: 10.1186/s12890-020-01261-0
82. Jiang L., Ge W., Geng J. miR-425 regulates cell proliferation, migration and apoptosis by targeting AMPH-1 in non-small-cell lung cancer. *Pathol Res Pract* 2019;215(12):152705. DOI: 10.1016/j.prp.2019.152705.
83. Fu Y., Li Y., Wang X. et al. Overexpression of miR-425-5p is associated with poor prognosis and tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark* 2020;27(2):147–56. DOI: 10.3233/cbm-190782
84. Yuwen D., Ma Y., Wang D. et al. Prognostic role of circulating exosomal miR-425-3p for the response of NSCLC to platinum-based chemotherapy. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent* 2019;28(1):163–73. DOI: 10.1158/1055-9965.epi-18-0569
85. Fortunato O., Boeri M., Moro M. et al. Mir-660 is downregulated in lung cancer patients and its replacement inhibits lung tumorigenesis by targeting MDM2-p53 interaction. *Cell Death Dis* 2014;5(12):e1564. DOI: 10.1038/cddis.2014.507
86. Qi Y., Zha W., Zhang W. Exosomal miR-660-5p promotes tumor growth and metastasis in non-small cell lung cancer. *J BUON* 2019;24(2):599–607.
87. Moro M., Di Paolo D., Milione M. et al. Coated cationic lipid-nanoparticles entrapping miR-660 inhibit tumor growth in patient-derived xenografts lung cancer models. *J Control Release* 2019;308:44–56. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.07.006

Вклад авторов

М.Ю. Коношенко, О.Е. Брызгунова: разработка дизайна исследования, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;

П.П. Лактионов: анализ данных, написание текста статьи;

Ю.А. Ланцухай, С.В. Пак, С.Э. Красильников: сбор биоматериала, предоставление клинических данных больных и доноров.

Authors' contribution

M.Y. Konoshenko, O.E. Bryzgunov: development of research design, conducting experiments, analysis and interpretation of data, article writing;

P.P. Laktionov: data analysis, article writing;

Yu.A. Lantsukhaj, S.V. Pak, S.E. Krasilnikov: collection of biomaterial, provision of clinical data of patients and donors.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.Ю. Коношенко / M.Yu. Konoshenko: <https://orcid.org/0000-0003-2925-9350>

П.П. Лактионов / P.P. Laktionov: <https://orcid.org/000-0002-0866-0252>

Ю.А. Ланцухай / Yu.A. Lantsukhaj: <https://orcid.org/0009-0004-4174-7300>

С.В. Пак / S.V. Pak: <https://orcid.org/0009-0009-6221-2758>

С.Э. Красильников / S.E. Krasilnikov: <https://orcid.org/0000-0003-0687-0894>

О.Е. Брызгунова / O.E. Bryzgunova: <https://orcid.org/0000-0003-3433-7261>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках проектов базового бюджетного финансирования Минобрнауки России (№ 121030200173-6) и Минздрава России (№ 121031300227-2).

Funding. The study was carried out within the framework of the basic budget financing projects of the Ministry of Education and Science of Russia (No. 121030200173-6) and the Ministry of Health of Russia (No. 121031300227-2).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (протокол № 10 от 22.12.2008).

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 Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences (protocol No. 10 of 22.12.2008).

Статья поступила: 15.09.2022. **Принята к публикации:** 13.03.2023.

Article submitted: 15.09.2022. **Accepted for publication:** 13.03.2023.