

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

На правах рукописи

БРЫЗГУНОВА ОЛЬГА ЕВГЕНЬЕВНА

**Внеклеточные микроРНК и aberrантно-метилированные ДНК как маркеры
онкологических заболеваний предстательной железы**

1.5.4 – биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
к.б.н. Лактионов Павел Петрович

Новосибирск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Источники внеклеточных нуклеиновых кислот, их состав и концентрация	14
1.1.1. Внеклеточные микроРНК в биологических жидкостях	15
1.1.2. Внеклеточные ДНК крови	19
1.2. Нарушение состава и концентраций микроРНК и вДНК при развитии онкологических заболеваний предстательной железы	23
1.2.1. Роль микроРНК в развитии РПЖ	24
1.2.2. Нарушения метилирования ДНК при онкологических заболеваниях предстательной железы: особенности и использование в диагностике	32
1.3. Особенности работы с внеклеточными нуклеиновыми кислотами биологических жидкостей	35
1.3.1. Выделение внеклеточных микроРНК из биологических жидкостей: влияющие факторы и используемые методы	35
1.3.2. Методы исследования внеклеточных микроРНК	48
1.3.3. Особенности работы с небольшими количествами вДНК	52
1.3.4. Методы исследования метилирования вДНК	55
1.4. Заключение по главе «обзор литературы»	65
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	67
2.1. Материалы	67
2.1.1. Реактивы	67
2.1.2. Оборудование	68
2.1.3. Условия ПЦР и ПЦР-системы, использованные в работе	68
2.1.4. Клинические характеристики здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями предстательной железы	74
2.1.5. Клетки, используемые в работе	77
2.2. Методы	77
2.2.1. Культивирование клеток линий HeLa и HUVEC.	77
2.2.2. Учёт биологических образцов	78

2.2.3. Подготовка образцов различных фракций крови и мочи.....	78
2.2.4. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ).....	80
2.2.5. Оценка концентрации белка в препаратах внеклеточных везикул	81
2.2.6. Электрофоретический анализ в денатурирующих условиях по Леммли и Вестерн-блот	81
2.2.7. Подготовка образцов нуклеиновых кислот и их анализ	81
2.2.8. Статистический анализ полученных данных	90
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	94
3.1. Разработка методологических подходов к исследованию внНК.....	94
3.1.1. Выделение внеклеточных микроРНК из крови и мочи.....	94
3.1.2. Характеристики количественных методов на основе полимеразной цепной реакции, используемые в работе	107
3.2. Особенности циркуляции и состав внеклеточных микроРНК при развитии онкологических заболеваний предстательной железы	108
3.2.1. Сравнительное исследование внеклеточных везикул мочи здоровых мужчин и больных раком предстательной железы	109
3.2.2. Количественное определение общего белка в составе внеклеточных везикул мочи	112
3.2.3. Исследование нуклеиновых кислот ВВ мочи.....	114
3.2.4. МикроРНК мочи	117
3.2.5. МикроРНК мочи – расширенный поиск потенциальных онкомаркеров рака предстательной железы.....	121
3.2.6. Исследование внеклеточных микроРНК мочи при помощи микрочипового анализа	127
3.2.7. Верификация панели из 12 микроРНК в составе биологических жидкостей - потенциальных биомаркеров новообразований предстательной железы	151
3.3. Аберрантные изменения внеклеточных ДНК.....	165
3.3.1. Особенности метилирования внеклеточной ДНК в культуре первичных и трансформированных клеток.....	166
3.3.2. Особенности метилирования внеклеточной ДНК, циркулирующей в крови при онкологических заболеваниях предстательной железы.....	168
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	193
ВЫВОДЫ.....	196
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	198
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	200

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	260
ПЕРЕЧЕНЬ ТАБЛИЦ.....	263
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	266
<i>Приложение 1. Список научных трудов, вошедших в диссертацию.</i>	<i>266</i>
<i>Приложение 2. Концентрация внДНК в крови здоровых доноров и больных пациентов, выделенная и оцененная различными методами</i>	<i>272</i>
<i>Приложение 3. Активация различных генов при помощи микроРНК при прогрессировании рака предстательной железы</i>	<i>282</i>
<i>Приложение 4. Сниженная регуляция различных генов при помощи микроРНК при прогрессировании рака предстательной железы</i>	<i>296</i>
<i>Приложение 5. Суммарные данные сравнения статуса метилирования цитозинов в составе свободной внДНК плазмы крови у пациентов с РПЖ с объединенной группой, включающей ЗД и пациентов с ДГПЖ.</i>	<i>304</i>
<i>Приложение 6. Суммарные данные сравнения статуса метилирования цитозинов в составе свободной внДНК плазмы крови у пациентов с ДГПЖ с объединенной группой, включающей ЗД и пациентов с РПЖ.</i>	<i>306</i>
<i>Приложение 7. Суммарные данные сравнения статуса метилирования цитозинов в составе свободной внДНК плазмы крови у здоровых доноров с объединенной группой, включающей пациентов с РПЖ и ДГПЖ.</i>	<i>316</i>
<i>Приложение 8. Диагностическая ценность статуса метилирования индивидуального цитозина или парных цитозинов при сравнении пациентов с РПЖ и группы ЗД.....</i>	<i>320</i>

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования.

По данным разных стран в последующие годы в мире ожидается резкий рост заболеваемости раком и в течение следующих двух десятилетий число новых случаев составит более 30,2 миллионов, что приведет к увеличению примерно на 30% число людей, проживших 5 и более лет после постановки диагноза. Рак предстательной железы (РПЖ) за последний год сравнялся по заболеваемости с раком лёгкого (занимавшего ранее лидирующие позиции) и теперь оба этих онкологических недуга делят первое место среди мужского населения не только в России, но и в мире. Даже в развитых странах пятилетняя относительная выживаемость при распространенных формах РПЖ в среднем не превышает 32%, тогда как при локальных формах РПЖ этот показатель достигает 97% [1, 2]. Кроме того, в России за последние 30 лет РПЖ не только значительно «помолодел», но и метастатическая форма заболевания теперь диагностируется в 6 раз чаще у мужчин в возрасте от 15 до 40 лет [3].

Несмотря на быстрое развитие методов молекулярной биологии, включая высокопроизводительное секвенирование, которое постепенно начинает использоваться в клинической диагностике, нехватка высокоточных маркеров онкологических заболеваний предстательной железы, пригодных для широкого рутинного использования, ощущается очень остро. Связано это с набором и характеристиками используемых на сегодняшний день диагностических методов (оценка в крови уровня простатического специфического антигена (ПСА), пальцево-ректальное обследование (ПРИ) и трансректальное УЗИ (ТРУЗИ), с последующим забором биопсийного материала), являющихся либо инвазивными, либо обладающими низкими показателями чувствительности и/или специфичности. Используемые для диагностики РПЖ генетические маркеры, такие, например, как PCA3, TMPRSS2-ERG, обладают существенно лучшими, чем ПСА диагностическими характеристиками (чувствительность vs специфичности: 95% vs 65% (для PCA3), 37% vs 87% (для TMPRSS2-ERG) и менее 40% (по обоим показателям для ПСА) [4]), которые, тем не менее, нуждаются в улучшении (для их повсеместного использования).

«Золотым стандартом» диагностики, а также морфологических и иммуногистохимических анализов для характеристики онкологического заболевания до сих пор является биопсия ткани. Однако это инвазивная процедура, которая может быть довольно сложной в зависимости от состояния пациента и расположения опухоли. Кроме того, биопсия ткани в связи с гетерогенностью опухоли зачастую не позволяет получить информацию об

интегральном клональном составе опухоли, не говоря про генетические особенности метастатических очагов.

Исследования внеклеточных нуклеиновых кислот, начатые в 70е-годы прошлого века Анкером и Строуном [5], привели к обнаружению в 1993 году в плазме крови больных раком кишечника мутированных форм гена *K-ras* [6]. Это инициировало начало интенсивных работ по анализу внеклеточных нуклеиновых кислот (внНК) в составе различных биологических жидкостей, которые с 2017 г. получили название «жидкостной биопсии» [7, 8]. В настоящее время под этим термином понимают исследование молекулярных биомаркеров, встречающихся во внеклеточных жидкостях организма [9]. Жидкостная биопсия имеет ряд преимуществ перед стандартной биопсией ткани, поскольку является неинвазивной (или малоинвазивной в зависимости от типа жидкости) процедурой, не требует специальных условий для забора образца или госпитализации; позволяет многократно забирать образцы для анализа в любой момент времени, практически не вызывает побочных эффектов, дает информацию о клеточном/генетическом разнообразии опухоли и метастаз, потенциально позволяет прогнозировать ответ опухоли на лечение, состояние ремиссии и рецидива.

Помимо гена *K-ras*, упомянутого выше, к первым онкомаркерам жидкостной биопсии можно отнести также мутированные формы онкогенов *N-ras* и *P53* [10–12]. Позднее у пациентов с онкологическими заболеваниями в плазме крови были обнаружены и aberrантно-метилованные формы промоторных областей генов [13], опухолеспецифичная мРНК [14], а также опухолеспецифичные микроРНК [15] - известные регуляторы экспрессии генов.

Несмотря на высокую активность РНКаз в тканях и биологических жидкостях [16–19], мРНК онкомаркеры нашли своё применение в диагностике с использованием жидкостной биопсии, но, в основном, в клеточных осадках мочи [4, 20, 21]. Внеклеточные микроРНК (вн-микроРНК) существенно более стабильны в биологических жидкостях [22, 23], поскольку обнаруживаются в составе надмолекулярных комплексов с белками, например с AGO1, AGO2, nucleophosmin 1 (NPM1), Tamm-Horsfall protein (THP), а также в различных микровезикулах, в том числе и в экзосомах [24–32]. В отличие от внеклеточных ДНК (внДНК) и внеклеточных РНК (внРНК), которые попадают в биологические жидкости в результате клеточной смерти, вн-микроРНК могут секретироваться живыми клетками и выполнять роль паракринного сигнала, межклеточной коммуникации, в том числе и с микроокружением опухоли и раковыми нишами [33]. На сегодняшний день известно, что концентрации и набор вн-микроРНК колеблются в зависимости от заболевания и его тяжести [33–35].

МикроРНК (18-25 н.) - некодирующие молекулы РНК [36], основной механизм работы которых заключается в негативной регуляции экспрессии генов-мишеней [24, 37]. При этом специфичность микроРНК как регулятора активности гена определяется взаимодействием

6-7 нуклеотидов в составе последовательности микроРНК, иногда подкрепленные неканоническим спариванием 5'-концевого нуклеотида микроРНК с аденозином в мРНК мишени. Большинство микроРНК могут регулировать активность до нескольких сотен генов, в связи с отсутствием строгой специфичности при взаимодействии с мРНК [38]. Вн-микроРНК представляют особый интерес для характеристики опухолей, поскольку они являются эпигенетическими регуляторами активности генов и вовлечены в регуляцию многочисленных биологических процессов (эпителиально-мезенхимальный переход, апоптоз и пролиферация, репарация ДНК, дифференцировка, инвазия и миграция и т.д.), определяющих в конечном итоге степень её злокачественности и чувствительности к проводимому лечению [39–43]. Концентрации онкоспецифических вн-микроРНК достаточны для их надежного выявления, по меньшей мере, при помощи количественной ОТ-ПЦР [44, 45]. Однако, несмотря на высокий интерес исследователей к микроРНК и огромные финансовые вложения (только в США и Северной Америке клинические испытания с использованием технологии микроРНК составили 97,4 млн долларов США в 2019 году [46]), на медицинском рынке до сих пор нет диагностических/прогностических тестов на их основе, одобренных FDA. Хотя существуют небольшие компании активно продвигающие диагностику на основе микроРНК для различных типов заболеваний: Interpace Diagnostics (ThyraMIR®/ThyGENX®) для оценки риска развития рака щитовидной железы и поджелудочной железы, Rosetta Genomics/Precision Therapeutics (miRview mets) и Genoptix (Reveal) — компании по обнаружению рака неизвестной или неопределенной локализации и TAmiRNA (OsteomiR и ThrombomiR), обнаруживающие маркеры остеопороза или сердечно-сосудистых заболеваний, соответственно. В настоящее время продолжается клиническая валидация панелей микроРНК для ранней диагностики различных заболеваний тремя европейскими консорциумами, финансируемыми FP7, а именно BestAgeing, RiskyCAD и EURenOmics. [46].

Другим эпигенетическим регулятором активности генов является метилирование/деметилирование цитозинов в составе CpG-островков, например промотонных областей генов. В отличие от микроРНК метилирование промотора (первого экзона) затрагивает только экспрессию нижележащего гена (генов) [47–49]. Методология исследования метилирования ДНК хорошо разработана и основана на использовании специфичных нуклеаз или химической конверсии ДНК.

При этом чувствительность и специфичность выявления метилированных форм ДНК довольно высоки (достаточно иметь на старте фентограммы и пикограммы ДНК [50–52]). При помощи ПЦР можно выявить метилированную форму ДНК в присутствии более чем 99% неметилированной формы, а высокопроизводительное секвенирование позволяет еще на несколько порядков увеличить не только чувствительность, но и специфичность анализа

метилованных последовательностей [53, 54]. В связи с этим исследование aberrантного метилирования ДНК при развитии онкологических заболеваний и попытки поиска aberrантно метилированных маркеров предпринимаются ещё с 80-х годов прошлого века [55] и по настоящее время [56]. Тем не менее, 15 лет исследований в этой области завершились созданием только двух диагностических тестов, основанных на детекции метилированных форм генов (Epi proColon® и Epi proLung®), одобренных для использования в Европейском союзе и Китае и только одного теста (Epi proColon®), одобренного FDA в США (<https://www.epiprocolon.com/us/>, <http://www.epigenomics.com>, 26 июня 2023 г.), что указывает на наличие фундаментальных и технических научных проблем, осложняющих поиск aberrантно метилированных онкомаркеров.

Настоящее исследование было направлено на выяснение фундаментальных причин, ограничивающих использование aberrантно метилированных ДНК-онкомаркеров, внеклеточных микроРНК, разработку методических подходов и решений, которые позволили бы приблизиться к созданию высокоточных диагностикомов РПЖ.

Цель и задачи исследования.

Целью представленного исследования являлось изучение внеклеточных микроРНК крови и мочи и локус-специфичного метилирования вДНК крови больных онкологическими заболеваниями предстательной железы и здоровых доноров, а также оценка возможности создания на основе полученных знаний диагностикомов для выявления онкологических заболеваний предстательной железы.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1) разработать быстрые, простые, надёжные и высокоэффективные методы выделения микроРНК из крови и мочи, пригодные для эффективной работы с образцами доноров и использования в рутинных клинических лабораториях;

2) изучить внеклеточные везикулы (ВВ) мочи здоровых доноров (ЗД) и больных РПЖ, а именно морфологию, распределение по размерам, а также содержание в них белка, ДНК и РНК, включая микроРНК;

3) изучить распределение микроРНК в парных образцах бесклеточной фракции и фракции суммарных внеклеточных везикул (СВВ) мочи в группах ЗД и пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) и РПЖ с использованием микрочиповых технологий;

4) на основе полученных результатов и их анализа разработать стратегию алгоритма анализа данных, позволяющую выявлять диагностические микроРНК и формировать панели микроРНК, пригодные для дифференциальной диагностики онкологических заболеваний ПЖ;

5) при помощи количественной петлевой ОТ-ПЦР верифицировать панели микроРНК-онкомаркеров;

6) при помощи локус-специфичного высокопроизводительного секвенирования исследовать молекулярные паттерны метилирования промоторных областей генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* в составе внДНК плазмы и суммарного пула внДНК (сумм-внДНК) крови (свободных плазмы и связанных с поверхностью клеток крови); оценить возможность использования локус-специфичного метилирования вышеперечисленных генов в составе внДНК плазмы и сумм-внДНК крови для дифференциальной диагностики опухолей предстательной железы.

Научная новизна и практическая значимость работы.

Для исследования изучаемых внеклеточных микроРНК были разработаны высокоэффективные, быстрые, простые в исполнении и экономичные методы их выделения из плазмы крови и мочи. Такие методы выделения вн-микроРНК из биологических жидкостей (без необходимости использования опасных/высокотоксичных реагентов) были предложены впервые. Предложенный метод выделения из различных фракций крови и мочи вн-микроРНК в присутствии октановой кислоты не требует специального оборудования, условий и высококвалифицированного персонала и может быть использован для изготовления коммерческих наборов для клинических диагностических лабораторий.

В рамках работы с использованием микрочиповых технологий впервые выполнено исследование распределения вн-микроРНК в парных образцах бесклеточной фракции (супернатант, полученный после центрифугирования при 17000g) и фракции суммарных внеклеточных везикул (СВВ) мочи в группах здоровых доноров (ЗД) и пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) и раком предстательной железы (РПЖ). Показано, что состав и концентрации микроРНК СМ и СВВ отличаются, кроме того, во фракции СВВ больных и здоровых встречается больше дифференциально-экспрессированных микроРНК, причем их концентрации также отличаются сильнее, чем во фракции СМ. Полученные данные верифицированы при помощи TaqMan ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Показано, что вн-микроРНК ВВ мочи являются удобным источником диагностического материала для дифференциальной диагностики онкологических заболеваний предстательной железы (ПЖ). Предложен новый подход использования данных об отношении концентраций отдельных пар вн-микроРНК в составе биологических жидкостей, позволяющий выбрать устойчивую панель микроРНК - маркеров ДГПЖ и РПЖ. Наилучшие комбинации микроРНК в составе различных фракций биологических жидкостей, позволяющие отличить все три исследуемые группы доноров между собой, были впервые предложены и охарактеризованы

с последующей оценкой их диагностической ценности. Предложена панель, состоящая из восьми микроРНК, позволяющая классифицировать пациентов с РПЖ, ДГПЖ и ЗД с абсолютными показателями чувствительности и специфичности.

При помощи локус-специфичного высокопроизводительного секвенирования промоторных областей генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* в образцах внДНК крови после химической конверсии показано, что отдельные цитозины в составе CpG динуклеотидов могут быть произвольно метилированы, однако встречаются позиции метилирования и профили метилирования отдельных молекул ДНК отличающие больных ДГПЖ и РПЖ от ЗД.

Этим же методом впервые показано, что уровень метилирования внДНК выше в пуле сумм-внДНК крови, что свидетельствует о нём, как о более удобном источнике диагностических aberrантно-метилированных ДНК. Кроме того, анализ данных высокопроизводительного локус-специфичного метилирования генов *GSTP1* и *RNF219* в пуле сумм-внДНК позволяет классифицировать пациентов всех исследуемых групп с абсолютными показателями чувствительности и специфичности.

Полученные результаты по анализу изменений концентраций вн-микроРНК и статуса метилирования внДНК биологических жидкостей ЗД и больных с опухолями ПЖ могут быть использованы для скрининга на этапах постановки диагноза, а диагностическая система, использующая панель из восьми микроРНК-маркеров может быть рекомендована для подготовки технической документации, необходимой для регистрации медицинских изделий для диагностики *in vitro*.

Объект исследования.

Внеклеточные микроРНК плазмы крови и мочи и внеклеточные ДНК крови здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями предстательной железы (ДГПЖ и РПЖ), а также внеклеточные ДНК в культурах клеток человека.

Методы исследования.

Исследования выполнены на образцах крови и мочи больных доброкачественной гиперплазией и раком предстательной железы; в качестве контрольных были использованы аналогичные образцы биологических жидкостей здоровых мужчин. В результате выполнения исследования разработаны методы выделения РНК, включая методы с использованием силикатных носителей, использованы такие методы как трансмиссионная электронная микроскопия, масштабная количественная SYBR Green ОТ-ПЦР микроРНК-мишеней с LNA-праймерами в рамках микрочипового исследования экспрессии микроРНК, количественная петлевая ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени, локус-специфичное

высокопроизводительное секвенирование вДНК после химической конверсии, биоинформатические и статистические методы анализа полученных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1) предложенные протоколы выделения коротких РНК из крови и мочи превосходят существующие аналоги по эффективности выделения, скорости, трудоёмкости и простоте использования. Выделенные образцы РНК не содержат ингибиторов ПЦР и пригодны для дальнейшего исследования современными методами (количественная ОТ-ПЦР, секвенирование и т.д.);

2) в моче ЗД и больных РПЖ присутствуют ВВ различного размера и белкового состава, содержащие ДНК, РНК и микроРНК. ВВ, выделенные из мочи онкологических больных с заболеваниями предстательной железы, содержат микроРНК ассоциированные с развитием опухолей ПЖ;

3) анализ данных масштабного исследования представленности 84-х микроРНК во фракциях СМ и ВВ мочи ЗД и онкологических больных с заболеваниями ПЖ позволяет идентифицировать микроРНК наиболее характерные для опухолей ПЖ. Биоинформационный анализ мишеней выявленных микроРНК, их участия в регуляции экспрессии белков, сигнальных каскадах, в том числе связанных с развитием РПЖ, может быть использован для уточнения панели потенциальных микроРНК-маркеров.

4) предложены подходы к формированию панели микроРНК-маркеров, и сформирована такая панель, позволяющая с высокой точностью и специфичностью классифицировать все группы доноров, входящих в исследование, а именно здоровых мужчин и больных ДГПЖ и РПЖ, причем ВВ содержат больше диагностически значимых микроРНК;

5) при помощи TaqMan ОТ-ПЦР исследована представленность 12-ти микроРНК из выбранной панели в составе фракций СМ, ВВ мочи и в плазме крови на независимых группах испытуемых. Определение в пуле ВВ мочи концентраций восьми микроРНК в составе шести пар позволяет классифицировать пациентов с РПЖ, ДГПЖ и ЗД с абсолютными показателями чувствительности и специфичности;

6) данные локус-специфичного высокопроизводительного секвенирования промоторных областей генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* в составе вДНК крови после бисульфитной конверсии демонстрируют множественные паттерны метилирования цитозинов отдельных молекул ДНК исследуемых локусов. Выбраны паттерны метилирования индивидуальных ДНК, на основании которых с абсолютной чувствительностью и специфичностью удалось классифицировать все исследуемые

группы доноров (ЗД, ДГПЖ и РПЖ). Сумм-внДНК крови являются более предпочтительным источником аберрантно метилированных ДНК для диагностики больных РПЖ, чем внДНК плазмы крови и могут быть использованы для эффективной диагностики РПЖ.

Публикации и апробация работы.

По результатам диссертационной работы опубликовано 20 печатных работ в рецензируемых журналах, индексируемых в международных базах Web of Science и/или Scopus, получены 2 патента РФ на изобретение и 1 разработанная база данных внесена в Реестр РФ (Приложение 1).

Материалы диссертации были представлены на российских и зарубежных конференциях, включая «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013); «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2013); «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2013); VIII съезд онкологов и радиологов СНГ и Евразии (Казань, 2014); Международную конференцию по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии (Москва, 2014); «EMBO Workshop» (Томск, 2015); «CNAPS IX, X, XI» (Berlin, 2015; Montpellier, 2017; Jerusalem, 2019); II, III, IV, V, VI Петербургские онкологические форумы «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020); III международную конференцию молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, 2016); V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, конференцию ADFLIM (Сочи, 2016); II, III Всероссийские конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2016, 2017); IX Международный конгресс (Москва, 2017); International conference «Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications» (Томск, 2017); Всероссийские конференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2017, 2019); XII Международный Конгресс Российского общества онкоурологов (Москва, 2017); Конференцию «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты» (Горно-Алтайск, 2018); V Международную конференцию ПОСТГЕНОМ'2018 (Казань, 2018); «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров» (Санкт-Петербург, 2019); 44th ESMO Congress (Barcelona, 2019) (Приложение 1).

Личный вклад автора.

Все представленные в работе результаты получены лично автором или при его непосредственном участии и руководстве на всех этапах исследования, в том числе и при выполнении кандидатских и студенческих дипломных работ. Публикации за первым

авторством автора диссертации написаны непосредственно самим автором, остальные были написаны и подготовлены к публикации при непосредственном участии автора.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка цитированной литературы, списка иллюстративного материала и таблиц, восьми приложений. Материал работы изложен на 339 страницах машинописного текста (12 шрифт, интервал 1,5) и содержит 35 рисунков, 37 таблиц, 8 приложений. Библиография включает 866 литературных источников.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

О присутствии циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот, а именно вДНК в крови человека впервые сообщили Р. Mandel и Р. Metais (1948) [57, 58]. Однако поначалу эти данные не привлекли особого внимания научного сообщества. Исследования вДНК возобновились лишь в 60-х годах после обнаружения вДНК в крови больных системной красной волчанкой [59]. В 1970-х годах было обнаружено увеличение концентрации вДНК в крови онкологических больных [60]. Позднее вДНК в связи со своим огромным диагностическим потенциалом, вызвала стремительный рост исследовательского интереса, в том числе и с точки зрения клинического применения [61]. На сегодняшний день уже не только в крови, но и в других биологических жидкостях обнаруживают как вДНК, так и иные виды внеклеточных нуклеиновых кислот, включая микроРНК [62–64]. Информация о происхождении внеклеточных нуклеиновых кислот, их количестве у больных с различными заболеваниями, особенностях строения, факторах, влияющих на циркуляцию в биологических жидкостях, а также о возможностях их использования в медицине постоянно обновляется [57, 65, 66], в том числе и благодаря последним технологическим достижениям в области высокопроизводительных методов анализа нуклеиновых кислот.

1.1. Источники внеклеточных нуклеиновых кислот, их состав и концентрация

Потенциальными источниками внеклеточных нуклеиновых кислот служат все органы и ткани организма [67]. На сегодняшний день предложено несколько гипотез появления циркулирующих нуклеиновых кислот в кровотоке [68]. Одна из них - это высвобождение фрагментов нуклеиновых кислот в кровотоки как нормальными, так и опухолевыми клетками в основном путем апоптоза и/или некроза [69–71]. Полногеномный анализ паттернов тканеспецифичного метилирования в составе вДНК у здоровых людей показал, что большая часть вДНК имеет гемопоэтическое происхождение (55% лейкоцитарное и 30% из предшественников эритроцитов) [72]. Известно, что быстрорастущие злокачественные опухоли часто сталкиваются с гипоксией и дефицитом питательных веществ, что происходит из-за недостаточного, лакунарного типа кровоснабжения. Это приводит к некротической гибели клеток в центральной области солидных опухолей [73]. Анализ концов ДНК и её фрагментации доказывает апоптотическое происхождение не менее 20% циркулирующих ДНК (цирДНК). В то же время, наличие в кровотоке высокомолекулярных фрагментов ДНК и большое количество 5'-выступающих концов у больных раком молочной железы подтверждают гипотезу о

некротическом происхождении основной части циркулирующего ДНК при развитии злокачественных новообразований даже на ранних стадиях [70]. Помимо апоптоза и некроза, внНК могут появляться и в результате такой запрограммированной клеточной гибели, как онкоз [74], который связан с нарушением энергетического и ионного балансов и характеризуется повышенной проницаемостью мембран, набуханием клетки, комплекса Гольджи и ЭПР, разрушением лизосом и митохондрий, агрегацией хроматина при отсутствии уплотнений хроматиновых телец.

Кроме того, нуклеиновые кислоты в кровотоке могут появляться и в результате активной секреции как здоровыми, так и опухолевыми клетками [5, 72, 75, 76], причём показано, что, например ДНК, опухолевые клетки секретируют большее количество по сравнению с нормальными [77]. РНК, включая микроРНК, дополнительно могут секретироваться клетками в межклеточную среду, попадая затем в кровоток, лимфу и другие биологические жидкости, например, в составе экзосом [69, 78, 79].

Уровень внеклеточных нуклеиновых кислот в кровотоке определяется балансом между процессами высвобождения НК, гидролиза и выведения НК. ВнНК могут деградировать под действием ферментов тканевой жидкости, крови, лимфы, цереброспинальной жидкости и т.д. [80–82]. Выведение с последующим гидролизом внНК из крови осуществляется преимущественно печенью, селезенкой, почками или лимфатическими узлами [72, 80, 82].

В составе внНК мочи можно обнаружить внНК как из клеток урогенитального тракта, так и всего организма; описаны случаи обнаружения в моче характерных онкомаркеров, например, при онкологических заболеваниях головы и шеи, молочных желез и т.д. [83, 84].

Точный механизм происхождения внНК мочи до сих пор является предметом дискуссий. В литературе описано несколько вариантов их появления в этой биологической жидкости: (1) из умирающих клеток эпителия мочевого пузыря и предстательной железы, (2) из кровотока, (3) из опухолевых клеток, попавших в мочеполовой тракт и (4) посредством секреции клетками мочеполовой системы [85, 86].

1.1.1. Внеклеточные микроРНК в биологических жидкостях

Известно, что в зависимости от типа клеток в них может содержаться до 120000 молекул зрелой микроРНК [87], представляющих собой небольшие некодирующие молекулы РНК размером от 18 до 25 н. Эта молекулярная популяция гетерогенна, на текущий момент у человека аннотировано не менее 3000 микроРНК [88]. При этом микроРНК могут иметь изоформы, различающиеся последовательностью 5'- или 3'-концов [89–91] и GC-составом. Кроме того, микроРНК могут содержать модифицированные основания и модификации остова (таблица 1.1.) [92–100], включая метилирование, уридилирование, аденилирование,

редактирование аденозина в инозин с помощью РНК-зависимой аденозиндеаминазы (ADAR) или включение псевдоуридинов, которые способны дополнительно влиять на время полужизни специфических микроРНК в биологических жидкостях, придавая им повышенную устойчивость к экзонуклеазам и более высокое сродство к связывающим микроРНК биомолекулам.

Таблица 1.1. Особенности строения внеклеточных микроРНК (возможные варианты химических модификаций)

Химические модификации	Ссылки
3'-уридилирование	[92–94]
Аденилирование	[92, 94]
Модификация N6-метиладенозина (m6A)	[101–103]
3'-концевое 2'-О-метиличирование	[92, 95, 101, 104]
Модификация 5-метилцитозина (m ⁵ C)	[101, 105]
Правка аденозин-в-инозин	[92–94, 102, 106]
Модификация псевдоуридина (Ψ)	[101]

Например, метилированная микроРНК-21-5p более устойчива к расщеплению 3'→5'-экзорибонуклеазной полирибонуклеотидной нуклеотидилтрансферазой 1 (PNPT1) и имеет более высокое сродство к Argonaute-2 (AGO2), что может способствовать ее более высокой стабильности и более сильному ингибированию трансляции белка запрограммированной клеточной гибели 4 (PDCD4), соответственно [104]. Поскольку вн-микроРНК имеют своё происхождение из клеточного пула, можно предположить, что они также имеют те же структурные особенности, что и клеточные микроРНК.

Время жизни свободных РНК в биологических жидкостях очень короткое (15 сек в крови по данным [107]). Это связано с присущей РНК лабильностью структуры, особенно в присутствии двухвалентных катионов металлов [108, 109], а также с высокими уровнями активности рибонуклеазы и фосфодиэстеразы, обнаруженными в большинстве биологических жидкостей [110–114]. Последовательности с более низким содержанием GC и стабильными вторичными дуплексными структурами, по-видимому, менее стабильны [115]. Несмотря на это, было показано, что эндогенная РНК сохраняется в кровотоке значительно дольше — от нескольких минут до нескольких часов и даже дней [116]. Внеклеточные микроРНК относительно стабильны в крови, моче, спинномозговой жидкости, бронхоальвеолярном лаваже, лимфе, слюне, молоке, слезах и др., сопротивляются деградации при комнатной температуре до 4 дней и могут выдерживать кипячение, многократные циклы замораживания -

оттаивания, высокий или низкий pH [24, 117, 118]. Наблюдаемая стабильность обеспечивается комплексообразованием с белками, липопротеинами, надмолекулярными комплексами и упаковкой в мембранные везикулы и безмембранные частицы (таблица 1.2.).

Таблица 1.2. Надмолекулярные комплексы внеклеточных микроРНК

Формы связывания	ссылки
Микрочастицы с мембранным покрытием	
Апоптотические тельца (0,1–5 мкм)	[106, 119, 120]
Микровезикулы (>0,5 мкм)	[120–124]
Эктосомы (100–600 нм)	[25]
Онкосомы (1–10 мкм)	[120, 125, 126]
Экзосомы (30–150 нм)	[25, 120, 121, 123, 127–132]
Специфические микровезикулы (простасомы (50 нм – 0,5 мкм), меланосомы (>0,5 мкм), «тромбоцитарная пыль» (~130–500 нм))	[132–136]
Микрочастицы, не содержащие мембран	
Липопротеины высокой плотности (ЛВП) (7-20 нм)	[124, 137–142]
Липопротеины низкой плотности (ЛПНП) (20-25 нм)	[138, 139, 141]
Различные РНК-связывающие белки (например, AGO1, AGO2, нуклеофосмин 1 (NPM1) и др.)	[26–31, 124, 143]
Экзомеры (~35 нм (<50 нм))	[32, 144]
МикроРНК, ассоциированные с поверхностью клеток крови	[127, 131]

МикроРНК часто упакованы в комплексы с белками: такие микроРНК, как, например, микроРНК-16 и -92а, преимущественно (до 95%) соосажаются с белковой фракцией [27]. В клетке основными партнерами микроРНК являются белки Аргонавты (у человека это AGO1–4). Поэтому неудивительно, что вн-микроРНК в супернатантах клеток MCF-7, крови [26], моче [145] и перикардиальной жидкости [146] были обнаружены в комплексах с AGO2 (Kd ~20–80 нМ) [147–149]. Профилирование с использованием технологии количественной ОТ-ПЦР 375 микроРНК во фракциях при гель-фильтрации плазмы крови человека показало, что более 67% проанализированных микроРНК связаны с фракциями, содержащими белок AGO2, и основная часть таких микроРНК могла быть выделена путем иммунопреципитации AGO2 из плазмы [30]. Помимо AGO2, микроРНК в крови может находиться в комплексе с белком AGO1 [28]. Поскольку количество микроРНК в клетке резко превышает количество белков AGO (в 14 раз), значительная часть зрелых микроРНК может быть связана с RISC [150–152] и другими белками с классическими РНК-связывающими мотивами, такими как HuR, AUF1 и др. [149], участвующими в транспорте и функционировании микроРНК [153, 154].

В крови вн-микроРНК также были обнаружены в виде небольших комплексов размером 30–40 кДа, содержащих нуклеофосмин (NPM1) [29], которые проходят даже через диализные

мембраны. Однако это взаимодействие, обнаруженное *in vitro*, пока не подтверждено в экспериментах *in vivo* [26, 32]. В других биологических жидкостях иные партнеры по взаимодействию могут быть более распространены, например, в моче была показана возможная связь микроРНК с белком Тамма-Хорсфалла (ТНР; уромодулин) [155], причём содержание уромодулина в моче может достигать 30% от количества общего белка [156].

Липопротеины высокой и, в меньшей степени, низкой плотности (ЛПВП и ЛПНП, соответственно) представляют собой еще один тип подтвержденных транспортеров микроРНК в крови, несущих различные популяции микроРНК [138–140]. ЛПВП и ЛПНП представляют собой супрамолекулярные комплексы размером от 5 до 1000 нм (нано- или микрочастицы), состоящие из липопротеинов и набора липидов [157, 158]. Несмотря на высокие концентрации ЛПВП и ЛПНП, по оценкам, они содержат не более 10% вн-микроРНК, обнаруживаемых в плазме крови [139].

Значительная часть вн-микроРНК в крови, моче и других биологических жидкостях упакована в покрытые мембраной внеклеточные везикулы (ВВ), которые секретируются нормальными и раковыми клетками [159–163]. ВВ - это собирательный термин, описывающий частицы размером 30–1000 нм, покрытые двойным слоем мембраны, включающие экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца, различающиеся по размеру, структуре, поверхностным маркерам, молекулярному составу и включающие различные подмножества микроРНК (таблица 1.2.) [119, 122, 123, 164]. В среднем в одном миллилитре крови и мочи содержится 10^8 - 10^{12} и $3\text{--}8 \times 10^9$ экзосом, соответственно [165, 166]. В некоторых сообщениях предполагается, что экзосомы могут быть основными переносчиками микроРНК в крови и слюне [131]. Из экзосом, полученных из 4 мл сыворотки крови можно выделить примерно 2–10 нг РНК; из экзосом, полученных из 10 мл мочи можно выделить примерно 2–4 нг РНК, в то время как цельная сыворотка крови и моча содержат примерно в 10 раз больше РНК [165]. Таким образом, значительная часть вн-микроРНК должна быть связана с белками, комплексами и везикулами, отличными от экзосом. Стехиометрический анализ показал, что содержание микроРНК в экзосомах не так велико, как считалось ранее, и в среднем составляет не более чем одну копию индивидуальной микроРНК на экзосому [167]. Следует отметить, что большинство микроРНК-16 и микроРНК-223, упакованных в экзосомы, оказались в комплексах с AGO2, что подлило масла в огонь дискуссии о доминирующей форме циркуляции микроРНК в крови [168].

Молекулярная структура апоптотических телец не столь единообразна, как у экзосом [120] и может включать в себя множество белков, фрагменты геномной ДНК, большинство типов РНК, включая зрелые и незрелые микроРНК [119, 169].

На сегодняшний день не существует общепринятой гипотезы образования свободного пула вн-микроРНК. Некоторые типы комплексов, несущих микроРНК, могут активно секретироваться (экзосомы) [170], в то время как другие микроРНК (свободные от везикул) могут попадать в кровь путем пассивной утечки из поврежденных или умирающих клеток [24, 171, 172]. Более того, неизвестным остаются и скорости клиренса разных комплексов вн-микроРНК, что, несомненно, может влиять на время полужизни разных популяций вн-микроРНК.

1.1.2. Внеклеточные ДНК крови

Как уже упоминалось выше, на время персистирования внДНК в биологических жидкостях может в значительной мере влиять как взаимодействие с различными белковыми комплексами, так и особенности структуры внДНК, определяющие устойчивость к нуклеазам и взаимодействие с белками. Особенности структуры внДНК определяются внутриклеточными процессами, которые влияют на метилирование, окисление, модификацию гистонов, скорость гибели разных типов клеток и вариант клеточной смерти, от которого зависит фрагментация ДНК, структура циркулирующих комплексов внДНК (размер внДНК, наличие апоптотических телец, наличие/отсутствие упаковки внДНК в мембранные структуры).

Строение внДНК может быть связано и с источником внДНК, а именно из геномной или митохондриальной родительской ДНК. В некоторых исследованиях описаны и небольшие кольцевые ДНК, микроДНК и одноцепочечные (ss), вирусные, бактериальные ДНК или ДНК из пищи (растительного или животного происхождения) [61, 72]. Эти уникальные виды ДНК имеют свои особенности (размер), которые могут влиять на связывание с белками и поведение в биологических жидкостях [61, 173].

Непосредственно в кровотоке время жизни внДНК определяется активностью нуклеаз, взаимодействием внДНК с клетками крови и тканей и эффективностью выведения внДНК из крови [65, 70, 71].

Считается, что внДНК упакована в основном в нуклеосомы, при этом межнуклеосомный гистон H1 в кровотоке замещен амилоидом P [174–177], который является одним из белков неспецифического гуморального иммунного ответа [178]. Помимо этого, цирДНК может также связываться с факторами транскрипции, обычно с белками, которые защищают ДНК от нуклеаз в крови [174]. Внеклеточные ДНК способны связываться и с поверхностью клеток, как через специфические [179], так и неспецифические (scavenger receptors) [180] мембранные рецепторы, что может индуцировать онкотрансформацию клеток [181].

Кроме того, внДНК, как и внРНК, входит в состав различных типов внеклеточных везикул, таких как апоптотические тельца, микровезикулы и экзосомы [61, 65, 70, 182, 183].

Однако доля экзосомальной внДНК не превышает 0,1–0,5% от общей внДНК крови [184]; хотя по другим данным, которые, впрочем, не были подтверждены в дальнейших работах, более 90% внДНК связано с экзосомами [166].

По данным многочисленных исследований концентрация внДНК в крови онкологических больных в целом выше, чем у здоровых доноров, при промежуточных значениях концентрации внДНК в биологических жидкостях больных доброкачественными опухолями (Приложение 2), однако такое распределение подтверждается далеко не во всех исследованиях [185–187]. На заре эры внДНК было выполнено большое количество исследований, направленных на выяснение возможности использования оценки концентрации внДНК в качестве раннего предиктора рака, прогностического маркера, предиктора размера опухоли, агрессивности или распространения метастазов [187–196]. Данные, представленные в Приложении 2 демонстрируют прогностическую эффективность оценки концентрации внДНК. В среднем 1 мл плазмы онкологического больного содержит примерно 1500 эквивалентов диплоидного генома (ГЭ) (~10 нг ДНК) [71]. Концентрация внДНК увеличивается при нарастании злокачественных процессов, таких как повышенная агрессивность и инвазивность. У пациентов с доброкачественными заболеваниями концентрация внДНК в крови часто выше, чем у здоровых доноров, но ниже, чем у онкологических больных [185, 197, 198]. Кроме того, она увеличивается на поздних стадиях рака [199] и часто значительно выше у пациентов с метастатическим раком и у пациентов с опухолями большого размера [71, 200]. Это указывает на то, что повышение концентрации внДНК является маркером прогрессирования заболевания. Однако следует отметить, что концентрация внДНК значительно различается у пациентов с опухолями [201]. Кроме того, диагностическая оценка концентрации внДНК, основанная на сравнении среднего/медианы, по-видимому, не имеет практического применения, а ROC-анализ не демонстрирует хорошей диагностической эффективности. При этом не обнаружено существенных различий в концентрации внДНК в крови больных с разными онкологическими заболеваниями (Приложение 2) [186, 202]. Таким образом, попытки использовать оценку концентраций внДНК в качестве специфического маркера какого-то определённого типа рака, по-видимому, не имеют клинической перспективы. Как упоминалось ранее, многие процессы могут влиять на концентрацию внДНК, и разные ткани вносят свой вклад в эти значения. Как показало исследование тканеспецифического метилирования, основными источниками внДНК являются лейкоциты (55%), предшественники эритроцитов (30%), эндотелиальные клетки сосудов (10%) и даже гепатоциты (1%) [203]. Таким образом, внеклеточная опухолевая ДНК в биологических жидкостях онкологических больных разбавлена большим количеством ДНК не опухолевого происхождения и обычно составляет 0,01–2% от общего количества внДНК [71, 204–206].

Лишь в нескольких публикациях утверждается, что содержание опухолевой вДНК в крови может превышать 10% от общего количества вДНК у пациентов на поздних стадиях рака [207, 208], достигая 47,9% [209] или даже 93% [210]. По данным исследования Cell Lung Cancer Evolution Through Therapy (TRACERx) можно предположить, что первичная опухолевая нагрузка в 1 см^3 , 10 см^3 или 100 см^3 (то есть $9,4 \times 10^7$ клеток, $3,02 \times 10^8$ клеток и $\sim 10^9$ клеток, соответственно) приведет к средней частоте аллеля – 0,006%, 0,1% и 1,3%, соответственно [71].

Как описано в обзоре N. Papadopoulos [211], опухолевая вДНК у больных с распространенными опухолями разных типов рака не выявляется с одинаковой чувствительностью, что, скорее всего, связано с разным удельным количеством молекул опухолевой ДНК. Количество вДНК может варьироваться в зависимости от типа неметастатической опухоли. Кроме того, локализация опухоли может влиять на количество выбрасываемой в кровь опухолевой ДНК. Фактическая доля опухолевой вДНК от разных видов рака примерно одинакова (рис. 2 в [211]).

Такие данные резко ограничивают диагностический потенциал оценки общей концентрации вДНК как специфического признака опухоли, но не отрицают ее полезности как признака общих метаболических процессов, а также дают понимание исследователю о возможном количестве опухолевой вДНК, что важно при разработке различных диагностикумов с использованием таких методов, как ПЦР, NGS и т.д.

Учитывая, что время полужизни вДНК в крови составляет примерно 2 часа [212] и то, что в крови наблюдается высокая активность ДНК-гидролизующих ферментов, небольшие фрагменты ДНК также могут циркулировать в крови, но, поскольку они недостаточно эффективно выделяются и детектируются, сведений об этом факте практически нет. Тем не менее, было обнаружено, что белки сыворотки крови могут взаимодействовать с дезоксирибонуклеотидами длиной более восьми оснований и защищать их от ДНКаз [213]. Есть предположение, что у здоровых людей динамика деградации ДНК после высвобождения из клеток является постоянной [174]; однако фрагментация вДНК в крови не случайна, она отражает процессы, связанные с ДНК в родительских клетках [214] и анализ размера фрагментов ДНК может позволить определить её источник [174]. В целом было показано, что вДНК обогащена фрагментами размером 120–160 п.н., но длинные фрагменты ДНК также были обнаружены [175, 215] и, в некоторых сообщениях, в значительных количествах [70]. На образование длинных фрагментов вДНК может влиять, в том числе и НЕТоз, клеточный ответ на бактериальные и вирусные инфекции [216].

Результаты многочисленных исследований, направленных на выявление связи фрагментации ДНК с онкологическими процессами, противоречивы. В некоторых исследованиях индекс фрагментации (соотношение длинных и коротких фрагментов) в плазме

больных раком был выше, чем у здоровых (400 против 100 п.н. (гинекологические раковые заболевания и рак молочной железы) [217], 247 против 115 п.н. (рак молочной железы) [218]), причем индекс фрагментации ДНК увеличивался с тяжестью заболевания и более высокой стадией рака молочной железы [219] и рака предстательной железы [220]. В других исследованиях не было выявлено достоверных различий между пациентами с доброкачественными и злокачественными заболеваниями (347 и 137 п.н. (желудочно-кишечные, гинекологические, урологические [221])), либо индекс фрагментации был ниже у пациентов со злокачественными заболеваниями (300 и 60 п.н. (колоректальный рак [222])). Такие несоответствия могут быть связаны с характеристиками каждого вида рака или различиями в подготовке образцов, хранении и методах выделения нуклеиновых кислот. На фрагментацию внДНК (а именно повышенную устойчивость к ней внДНК размером менее 500 п.н. [223–227]) также может влиять большее содержание GC, которое во внДНК колеблется от 30,5% до 74,8%, тогда как содержание GC в ядерной ДНК составляет 38% [214, 224, 226]. Помимо обогащения внДНК содержанием CG [227, 228], было показано и содержание в ней оснований 8-oxodG [229, 230]. Состав внДНК препятствует ее связыванию с гистонами и другими ДНК-связывающими белками, такими как метил-СрG-связывающие белки (MBP) [231, 232], что, в свою очередь, может увеличить активность гистондеацетилазы и, следовательно, упаковку метилированной ДНК. Метилирование гистонов также может влиять на упаковку ДНК и, следовательно, на стабильность ДНК в различных биологических жидкостях. Напротив, показано, что уровень ацетилирования гистона H4 прямо коррелирует с чувствительностью хроматина к ДНКазе I [233]. Ранее мы обнаружили, что метилированная ДНК, как свободная, так и упакованная в нуклеосомы, более стабильна, чем неметилированная ДНК (из-за большей устойчивости к ДНКазам и связывания с белками [50]), и, таким образом, гиперметилированная ДНК, включая специфически метилированную ДНК опухолевых клеток, сверхпредставлена во внДНК [234–236].

Следует отметить, что основным ДНК-гидролизующим ферментом крови является ДНКазы I, которая более чем в 100 раз более активна, чем ДНКазы II [237]. Пирофосфатаза и фосфодиэстераза I [238, 239], а также другие белки с нуклеазной активностью [240–244] присутствуют в крови, но их активность в отношении внДНК в кровотоке еще не изучена. Активность ДНКазы I в крови обратно пропорциональна концентрации актина, основного ингибитора активности ДНКазы [245–247], и считается, что повышение концентрации актина у больных системной красной волчанкой связано с повышением концентрации внДНК [248]. В любом случае было показано, что ДНКазы I является основным фактором, регулирующим концентрацию внДНК в крови [185, 202, 249]. Повышенный уровень актина и белков,

связывающих актин [250] у онкологических больных является дополнительным фактором, способствующим увеличению у этих больных концентрации внДНК.

Физиологическое состояние также может влиять на концентрацию внДНК [251–254]. Показано влияние на концентрацию внДНК физической активности [251, 255], старения [256], гемодиализа [252], трансплантации [253], воспаления, диабета, травмы, сепсиса [254], ишемического инсульта [254, 257] и др. Онкологические пациенты с большим «опухолевым бременем» раковых клеток и/или опухолями, обычно состоящими из быстро делящихся клеток, таких как острый лейкоз или лимфома высокой степени злокачественности, а также опухоли, которые хорошо реагируют на терапию, подвергаются наибольшему риску развития синдрома лизиса опухоли (СЛО). СЛО может возникать спонтанно (до лечения рака), но чаще в течение недели после начала лечения [258]. Такой лизис опухолевых клеток способен вызывать массивное высвобождение ДНК [259], что, как следствие, приводит к увеличению не только количества внДНК, но и представленности опухолевой ДНК в этой фракции, а также активации биологических процессов, выполняемых внДНК раковых клеток. Кроме того, на циркуляцию, в том числе и на концентрацию внДНК влияет связывание ДНК с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК, это явление подробно описано в [184]). Было обнаружено, что метаболические нарушения, сопровождающие развитие рака, например нарушения липидного обмена, смещают распределение скп-цирДНК и свободной внДНК в сторону свободной внДНК [184]. Несмотря на отсутствие текущей информации о скп-цирДНК, более ранние исследования показали, что, как скп-цирДНК, так и свободная внДНК, могут влиять на концентрацию друг друга [186, 260, 261].

Следующим существенным фактором является элиминация внДНК из крови. Гломерулярная дисфункция, как было показано на примере аутоиммунных заболеваний типа системной красной волчанки, сильно увеличивает концентрацию внДНК [262], что подтверждает почечную ультрафильтрацию как основного пути элиминации внДНК; однако потенциально могут быть задействованы и другие механизмы [263].

1.2. Нарушение состава и концентраций микроРНК и внДНК при развитии онкологических заболеваний предстательной железы

Внеклеточные микроРНК и внДНК биологических жидкостей являются удобным источником нуклеиновых кислот, имеющих своё происхождение из опухолевых клеток и их окружения, и могут использоваться для диагностики развития опухоли [264, 265]. К числу таких маркеров онкотрансформации можно смело отнести вн-микроРНК и aberrантно-метилированные внДНК [266, 267].

Известно, что микроРНК участвуют в регуляции до 60% генов, кодирующих белки [268]; соответственно, оценка экспрессии микроРНК при различных видах онкологических заболеваний в последние годы представляет собой актуальную проблему молекулярной онкологии. Значительная часть таких исследований сосредоточена на поиске опухолеспецифичных микроРНК, потенциально пригодных для разработки диагностических систем [269]. Действительно, показано, что экспрессия некоторых микроРНК в опухолевых клетках и тканях, а также в биологических жидкостях онкологических больных отличается от нормы [270–273].

К наиболее перспективным маркерам онкотрансформации в составе вДНК, являющимся одним из самых ранних событий, относится метилирование цитозинов в 5-м положении CpG-динуклеотидов [274, 275]. Известно, что в опухолевых клетках нарушено метилирование ДНК, включая гиперметилирование промоторных областей генов, подавляющих опухоль, и деметилирование регуляторных областей генов, участвующих в онкогенезе [276, 277]. Нарушение метилирования найдено практически во всех опухолях, что делает аберрантно-метилированные маркеры надежным признаком опухолевой трансформации [278].

1.2.1. Роль микроРНК в развитии РПЖ

На заре исследований аберрантной экспрессии генов под влиянием микроРНК идея о том, что одна или несколько микроРНК могут надежно диагностировать рак с высокой чувствительностью и специфичностью, не оправдалась. В последнее время для поиска наборов диагностических микроРНК широко используются высокопроизводительные анализы и анализ больших массивов образцов тканей или внеклеточных микроРНК в биологических жидкостях [279–282]. Основные биологические свойства микроРНК, а именно особенности микроРНК-зависимой регуляции экспрессии генов [283], такие как регуляция одной мРНК несколькими микроРНК и участие одной микроРНК в регуляции нескольких генов, делают такие подходы более адекватными с научной точки зрения. Попытки связать экспрессию определенного набора микроРНК с тканеспецифичностью опухоли также не увенчались успехом, поскольку изменения одних и тех же микроРНК наблюдались в опухолях разных типов [284, 285]. Эти особенности микроРНК (как регуляторов экспрессии генов) определяют как полезность микроРНК в качестве внешних ингибиторов онкогенов, так и снижение ценности микроРНК как терапевтических агентов. Очевидно, что использование микроРНК в диагностике или терапии требует комплексного анализа подтвержденных данных в отношении не только экспрессии микроРНК, но и соответствующих мРНК-мишеней, регуляторных путей, включающих эти гены, и общей сложной системы клеточной регуляции. С другой стороны,

мишени микроРНК можно искать путём прямого анализа конкретных генов, которые активируются или подавляются в опухолевых клетках и которые также существенно важны для клеточной трансформации и поддержания фенотипа и функциональной активности этих трансформированных клеток. При реализации таких подходов необходимо учитывать, что многие гены, открытые с помощью микрочипов или MPS, даже при хорошем RPKM (количество прочтений на кб модели экзона на миллион картированных прочтений) и р-значения частоты ложных открытий, не подтвердились, как специфичные гены, связанные с заболеванием, тогда как гены, выбранные как функционально важные, оказались фундаментальными для развития патологического состояния или хорошими предикторами заболевания [286].

В этой главе с использованием данных, полученных при сравнении результатов экспериментальных исследований и анализа биоинформатических ресурсов, описаны гены, уровень экспрессии которых повышается или понижается под влиянием микроРНК при развитии рака предстательной железы. Особое внимание уделено генам, непосредственно связанным с трансформацией клеток, сохранением фенотипа трансформированных клеток, способностью опухоли к инвазии и распространению при РПЖ.

Поскольку существующие диагностические маркеры РПЖ не отвечают современным требованиям [287], первостепенное значение приобретают новые подходы к диагностике и терапии этого заболевания, что обязательно требует тщательного анализа экспрессии мРНК, микроРНК и связывающих их регуляторных путей. В этой главе проанализированы исследования, изучающие влияние микроРНК на экспрессию генов с использованием андрогензависимых и андрогеннезависимых клеточных линий (таблица 1.3.) и тканей предстательной железы. Несмотря на то, что практически весь обзор литературы диссертационной работы посвящён анализу внеклеточных НК, в этой подглаве проанализированы работы, выполненные на клеточных линиях, поскольку именно в этих исследованиях продемонстрировано прямое взаимодействие между микроРНК и мРНК-мишенью, тогда как из исследований *in vivo* можно извлечь только корреляции. Обязательным условием для включения исследовательской работы в анализ было описание «прямого» эксперимента, предназначенного для подтверждения влияния конкретной микроРНК на экспрессию определенного гена (например, с использованием репортерных систем анализа). В общей сложности было проанализировано 176 генов, участвующих во многих биологических процессах, включая регуляцию клеточного цикла, рост клеток, выживаемость клеток, апоптоз, пролиферацию, метастазирование, трансформацию, ангиогенез и химиорезистентность. Важно отметить, что экспрессия большинства из этих генов (132 гена) в клеточных линиях и тканях РПЖ повышена (Приложения 3, 4).

Таблица 1.3. Андрогеннезависимые и андрогензависимые клеточные линии РПЖ

Клеточная линия	Происхождение	Чувствительность к андрогенам
C4-2	Метастатическая сублиния LNCaP	Андроген-независимые
C4-2B	Метастатическая сублиния LNCaP	
CRPC	Кастрационно-резистентные клетки РПЖ	
CWR22rv1	Линия клеток РПЖ человека, полученная из гормоно-резистентной рецидивирующей опухоли CWR22R	
DU-145	Метастазы первичной аденокарциномы предстательной железы в центральную нервную систему	
LNCaP-AI	Определяется как клеточная линия LNCaP, способная расти в очищенной от угля сыворотке	
LNCaP-Abl	Линия получена путем культивирования андроген-чувствительных клеток LNCaP в обедненной андрогенами среде в течение 87 пассажей	
M12, F6 сублиния AD	M12, сильно опухолевое метастатическое производное, росло как дезорганизованная масса клеток без поляризации, тогда как сублиния F6, слабо онкогенный, неметастатический вариант M12, возвращалась к образованию ацинусов, сродни P69 (неопухолегенные эпителиальные клетки предстательной железы)	
PC3	Линии аденокарциномы человека, поясничный метастаз	
PC3-M	Метастазный вариант PC3	
PC-3M-luc	Линия, экспрессирующая люциферазу, получена из PC3-M	
PC3 PDGF-D	Сверхэкспрессия тромбоцитарного фактора роста-D в PC3	
BRH1 ^{CmiR101}	BRH1 ^{CAFTD} (опухолегенная доброкачественная гиперплазия предстательной железы) трансдуцировали лентивирусными частицами, содержащими векторы EGFP-микроРНК-101	Андроген-зависимые
CW22	Ксенотрансплантат рака предстательной железы человека	
LAPC4	Линия создана из ксенотранспантированной ткани рака предстательной железы	
LAPC9	Модель ксенотрансплантата, метастазы в бедренную кость	
LNCaP	Аденокарцинома предстательной железы человека	
LNCaP-FGC	Быстрорастущая колониальная линия, производная от LNCaP	
MDA-PCa-2b	Линия получена из костного метастаза чёрного мужчины с аденокарциномой простаты	
PC-346C	Линия создана в результате трансуретральной резекции первичной опухоли, экспрессирует андрогенный рецептор (AR) дикого типа (wt) и секретирует простатспецифический антиген (ПСА)	
PPC-1	Низкодифференцированная аденокарцинома	

Клеточная линия	Происхождение	Чувствительность к андрогенам
RWPE-1	Клеточная линия незлокачественного эпителия предстательной железы	
22RV1	Получена из CWR22R, линия ксенотрансплантатов андрогензависимого РПЖ	
WPE1-NB26	Линия прогрессивного РПЖ, полученная из клеток того же типа (клетки RWPE1)	

Одновременный анализ изменения экспрессии отдельных мРНК, связанных с канцерогенезом, и микроРНК, регулирующих экспрессию этих генов, позволяет более рационально и доказательно отбирать микроРНК, вовлеченные в опухолевую трансформацию, а также выявлять кандидатные маркерные микроРНК для таргетной терапии РПЖ. Однако такой подход будет эффективен только при использовании достоверных данных об участии мРНК в клеточных процессах и сигнальных путях, лежащих в основе инициации и развития РПЖ, а также о влиянии микроРНК на экспрессию этих мРНК.

Например, одним из основных процессов, участвующих в канцерогенезе, является апоптоз, который играет ключевую роль в нормальном развитии органов и тканей, в том числе в развитии и функционировании предстательной железы, а также в самообновлении железистой ткани предстательной железы. Апоптоз клеток предстательной железы при злокачественных новообразованиях рассматривается как «спящий» процесс, требующий прямой активации [288], что также подтверждается подавлением «центрального» апоптотического гена *P53*, вызываемым, например, микроРНК-125b (Приложение 4) [289]. Поверхностные рецепторы, цитозольные и ядерные факторы, митохондрии и т.д. участвуют в регуляции апоптоза [290]. Очевидно, что ключевые игроки в регуляции апоптоза могут быть вовлечены в развитие рака и выступать в качестве его маркеров или использоваться в его терапии. Например, андрогены играют важнейшую роль в возникновении и развитии РПЖ [291]. Любые недостатки в андрогензависимой регуляции апоптоза усиливают канцерогенез и прогрессирование злокачественной опухоли до андрогеннезависимого состояния, до сих пор не поддающегося эффективному лечению [292].

Терапия РПЖ путем абляции андрогенов (ингибирования синтеза андрогенов), которая инициирует апоптоз железистых эпителиальных клеток простаты и инволюцию опухоли, успешно применялась ещё в 1940-х годах [293]. Однако, как сообщалось впоследствии, РПЖ у пациентов, первично отвечающих на гормональную терапию, рецидивирует в среднем в течение 3 лет в кастрационно-резистентную форму. Это может быть связано с генетическими и

эпигенетическими нарушениями в регуляции гена рецептора андрогенов (*AR*), такими как, например, его амплификация, метилирование, мутации в лиганд-связывающем домене и сплайсинг *AR* без этого домена [292]. Андрогены ингибируют апоптоз, блокируя активацию каспазного каскада и ядерного фактора-κВ, ослабляя экспрессию и процессинг белка Вах, отменяя расщепление белка Bid и высвобождение цитохрома С, необходимого, например, в процессах регенерации [294]. Известно, что экспрессия гена *AR* регулируется несколькими микроРНК, включая микроРНК-31, -34а, -124, -141 и -488* (Приложение 3) [271, 295–299], которые являются ингибиторами экспрессии *AR*, а также часто гипохеэкспрессированы при РПЖ, что говорит об их потенциале в качестве маркеров РПЖ и использовании в качестве терапевтических агентов.

Гены, участвующие в регуляции клеточной пролиферации, зачастую участвуют и в индукции фенотипа опухолевых клеток, и его поддержании. Ген *BMI1* является одним из генов, экспрессия которого изменяется при возникновении и прогрессировании РПЖ; это ключевой регулятор самообновления взрослых клеток предстательной железы, играющий важную роль в инициации и прогрессировании РПЖ [300]. Экспрессия *BMI1* может повышаться в клетках опухоли предстательной железы путём подавления микроРНК, таких как микроРНК-30d, -128, -200b, -200с, -203 и -221 (Приложение 3) [301, 302]. Некоторые данные свидетельствуют о том, что *BMI1* усиливает антиоксидантный ответ, тем самым обеспечивая выживаемость клеток РПЖ после химиотерапии на основе доцетаксела. Антиоксидантные гены, контролируемые *BMI1*, гиперэкспрессируются при агрессивных формах РПЖ и могут быть включены в число потенциальных предикторов неэффективности химиотерапии [303].

Информация об участии генов и/или микроРНК и их взаимодействиях в биологических процессах, в том числе при развитии различных заболеваний, полученная как в экспериментальных исследованиях, так и в биоинформатических исследованиях, собрана в различных базах данных, таких как DIANA, STRING, PANTHER, GENEMANIA, DISGENER, KEGG GENES, Genetic Testing Registry, инструмент miRWalk и др., которые накапливают в себе данные из нескольких баз данных. В частности, базы данных DIANA, STRING, PANTHER и другие содержат информацию об изменении экспрессии генов и микроРНК при прогрессировании РПЖ. Однако только часть из 199 генов, описанных в этой главе, может быть найдена в этих базах данных, несмотря на то, что базы данных достаточно полны и содержательны; более того, считается, что лишь небольшая часть этих генов связана с РПЖ.

Наиболее полная картина наблюдается при анализе описанных в этой главе генов с использованием базы данных STRING, которая содержит в себе информацию о 189 генах (из 199); однако изменение их экспрессии при прогрессировании РПЖ показано только для 20 из них (рис. 1.1.).

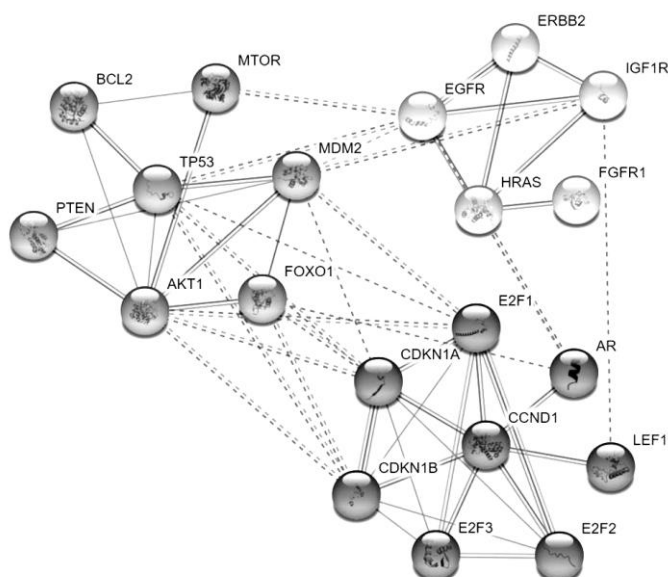


Рисунок 1.1. Пример анализа данных относительной взаимосвязи 20 генов, экспрессия которых изменяется при прогрессировании рака предстательной железы (данные базы STRING).

Как выяснилось, все эти 20 генов функционально делятся на три группы (рис. 1.1.), а именно те, которые участвуют в процессах апоптоза (*TP53*, *BCL2*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN* и *FOXO1*), регуляции пролиферации, клеточной подвижности и внутриклеточной передаче сигнала (*EGFR*, *ERBB-2/HER2*, *FGFR1*, *HRAS* и *IGF1R*), а также регуляции клеточного цикла, метаболизма и процессов биосинтеза (*CCND1*, *LEF1*, *E2F2*, *E2F3*, *E2F1*, *CDKN1B*, *CDKN1A* и *AR*).

По данным базы GENEMANIA, содержащей в себе информацию о 175 генах, описанных в этой главе, только 22 из них связаны с развитием РПЖ. Помимо 20 генов, упоминающихся в базе данных STRING, в базе GENEMANIA содержится информация о связи работы генов *KRAS* и *CDK2* с развитием РПЖ. Это свидетельствует о необходимости использования не одного, а нескольких интернет-ресурсов при разработке диагностических/прогностических систем и инструментов, а также при анализе результатов экспериментов.

Анализ распределения генов по их клеточным и белковым функциям может быть использован при поиске наиболее функционально значимых онкогенов и их регуляторов. В частности, согласно базе данных PANTHER, 176 генов (часть генов, рассмотренных в приложениях 3, 4) в основном относятся к тем, которые отвечают за «связывание» и «каталитическую активность» (рис. 1.2. А), биологические процессы («клеточные процессы» и «метаболические процессы») (рис. 1.2. Б) и клеточные компоненты («часть клетки» и «органелла») (рис. 1.2. В).

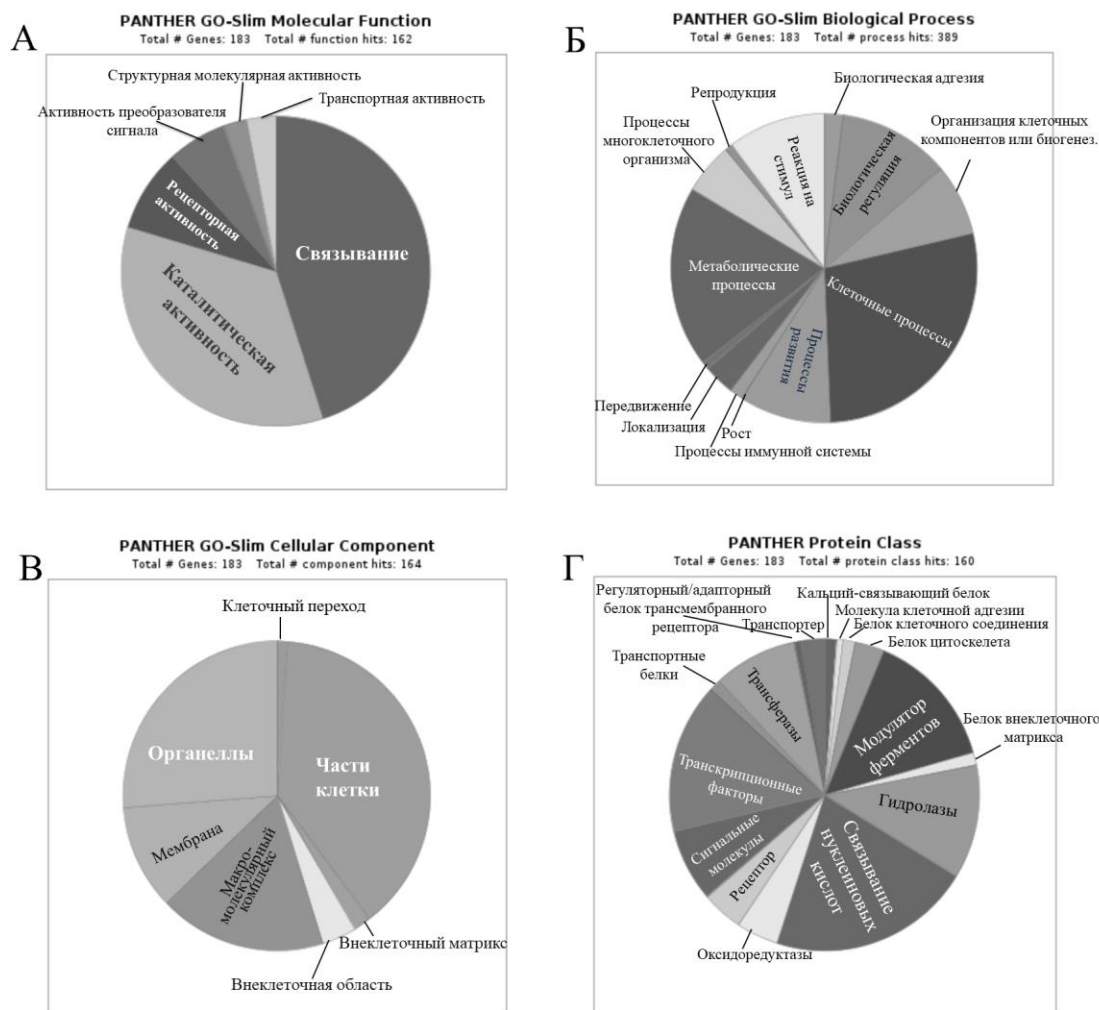


Рисунок 1.2. Пример анализа данных распределения генов по их функциям при помощи базы PANTHER. (А) Молекулярные функции; (Б) Биологические процессы; (В) Клеточные компоненты; (Г) Классы белков.

Белки (рис. 1.2. Г), кодируемые этими генами, в основном представлены белками, которые связывают нуклеиновые кислоты (30 генов, включая *AR*, *ZNF217*, *FOXO1*, *E2F1*, *PCAF*, *MDM4*, *SOX2* и *FOXO1*); факторы транскрипции (20 генов, включая *AR*, *ZNF217*, *FOXO1*, *GTF2H1* и *P53*); модуляторы ферментов (21 ген, включая *CCND2*, *HRAS*, *CASP7*, *SEPT6* и *KRAS*); сигнальные молекулы (13 генов, включая *FGF2*, *WNT5a*, *BCL2* и *WNT3a*) и рецепторы (*PAR2*, *LAMC1*, *TRPM8*, *FZD7*, *CSA*, *ITGB1* и *TGFBR1*). Очевидно, что гены таких клеточных функций, как регуляция клеточного цикла и пролиферация, а также гены, кодирующие белки, принадлежащие к классам «связывание нуклеиновых кислот» и «сигнальные молекулы», имеют первостепенное значение как предикторы и терапевтические мишени рака.

Для поиска микроРНК, регулирующих экспрессию интересующего гена, могут быть полезны несколько подходов, включая прямые эксперименты, биоинформатический анализ последовательностей мРНК и микроРНК, а также работа с базами данных и с литературой. Например, *AR* — один из индукторов РПЖ [304] (база данных DIANA), соответственно, микроРНК-регуляторы экспрессии *AR* представляют собой интересные мишени как для диагностики РПЖ, так и для терапии. Информация, собранная в базе TargetScan, может быть использована для поиска таких микроРНК. По данным TargetScan, наиболее вероятными кандидатами в регуляторы экспрессии *AR* являются следующие микроРНК: -9, -19a, -124, -130a, -130b, -301a, -301b, -454, -3666 и -4295. Экспериментальные исследования, посвященные анализу влияния микроРНК на экспрессию *AR* при РПЖ (Приложение 4), рассматриваемые в этой главе, подтверждают участие только микроРНК-124; однако, в литературе описаны дополнительные микроРНК, а именно, *let-7c*, микроРНК-31, -34a, -124, -141, -488* и -371, информация о которых отсутствует в базе данных TargetScan. Все эти микроРНК регулируют экспрессию путём прямого связывания с мРНК гена *AR* [271, 296, 298, 299, 305, 306], за исключением *let-7c*, которая ингибирует экспрессию *AR* посредством регуляции *c-Мус* [297]. Таким образом, всесторонний анализ генов, регулирующих экспрессию интересующего гена, а также микроРНК, регулирующих эти гены, необходим для уточнения поиска регуляторных микроРНК.

Кроме того, на основании прямых исследований биологических жидкостей некоторые из перечисленных выше микроРНК (*let-7c*, микроРНК-19a, -34a и -141) можно рассматривать как маркеры РПЖ, пригодные для разработки диагностических панелей [272, 273, 281, 307, 308]. При этом необходимо отметить, что эти же микроРНК могут влиять на экспрессию генов, функции которых нарушены при других типах рака. Например, согласно базе данных DIANA, микроРНК-19a и -34a участвуют в прогрессировании глиомы и меланомы, а также рака эндометрия, поджелудочной железы, толстой кишки и прямой кишки. Таким образом, анализ опубликованных данных и баз данных сокращает количество мишеней-кандидатов и позволяет оптимизировать их поиск при разработке диагностических и прогностических панелей различных заболеваний, в том числе РПЖ. Современные ресурсы биоинформатики предоставляют широкие возможности для целенаправленного анализа данных, полученных в широкомасштабных исследованиях микроРНК при различных заболеваниях, включая РПЖ, и выбора мишеней для их верификации в качестве маркеров или терапевтических средств; к сожалению, on-line базы не всегда содержат все необходимые данные по соответствующим экспериментальным исследованиям.

1.2.2. Нарушения метилирования ДНК при онкологических заболеваниях предстательной железы: особенности и использование в диагностике

Аберрантно метилированная ДНК обнаружена в опухолях различных тканей. При РПЖ в основном гиперметилированы гены-супрессоры опухолей, участвующие в восстановлении повреждений ДНК, клеточной адгезии, апоптозе, контроле клеточного цикла, передаче сигналов и гормональных реакциях, например *RARb*, *GSTP1*, *CDH13*, *RASSF1A*, *APC*, *P16*, *DAPK*, *FNIT*, *MGMT* и *CDH1* [309] и потенциально являющиеся онкомаркерами. В частности, анализ профиля метилирования промоторной области гена *GSTP1* (глутатион-S-трансфераза P1) в пуле вДНК предполагал выявление рака предстательной железы с чувствительностью до 52% при специфичности в 89% [310, 311].

При РПЖ фенотип гиперметилирования связан с клиническими признаками неблагоприятного прогноза. Многие гены, такие как *GSTP1*, *APC*, *MDR1*, *MGMT* и *RASSF1A*, демонстрируют более высокую частоту метилирования при РПЖ по сравнению с ДГПЖ и иными неопухолевыми заболеваниями простаты. Кроме того, гиперметилирование генов *RARb*, *RASSF1A*, *GSTP1*, *CDH13*, *APC*, *RUNX3*, *MDR1* и *Cyclin D2* связано с более высокими показателями Глисона и уровня ПСА [309]. Поскольку эпигенетические изменения множественны, то именно мультигенные панели имеют ключевое значение для увеличения чувствительности и специфичности диагностических систем. Например, одновременный анализ аберрантного метилирования в крови генов *GSTP1*, *RASSF1A*, *RARβ2* и *FOXA1* способствовал увеличению чувствительности до 72% [312]. Для раннего выявления РПЖ подавала надежду и панель генов *MCAM*, *ERα* и *ERβ* с чувствительностью и специфичностью 75% и 70%, соответственно. Генная панель *ST6GALNAC3*, *CCDC181* и *HAPLN3* имела чувствительность до 67% при 100% специфичности [312]. Ранее в наших исследованиях [313] при анализе цирДНК плазмы крови с помощью CpG island microarray были обнаружены два гена (*KIAA1539* и *RNF219*), продемонстрировавшие значительные различия, зависящие от заболевания ($P < 0,05$) и независимые от возраста ($P < 0,05$). Более того, по предварительным результатам анализ статуса метилирования гена *RNF219* позволял отличать больных РПЖ от ДГПЖ с чувствительностью 61% и специфичностью 71%.

Аберрантное метилирование во вДНК плазмы крови «нашумевших» высокоспецифичных генов *Septin 9* и *SHOX2* при раке кишечника и лёгкого [314, 315] при РПЖ не показало таких впечатляющих (до 90% специфичности и чувствительности) результатов, хотя и позволило различить группы пациентов с РПЖ и без (в исследовании принимали участие пациенты, имевшие повышенный уровень ПСА и отклонения от нормы при ТРУЗИ и/или ПРИ в анамнезе, которым была выполнена биопсия под контролем МРТ) [316]. Тесты Epi proColon®

и Epi proLung® одобрены для использования в качестве диагностических тестов в Китае и Европейском союзе, а Epi proColon® дополнительно одобрен и FDA в США (<https://www.epiprocolon.com/us/>, <http://www.epigenomics.com>, 26 июня 2023 г.). Успехи, достигнутые компанией Epigenomics GA на рынке онкодиагностики с использованием вДНК плазмы крови, подтверждают её перспективность, однако тот факт, что во всём мире представлены только две диагностические системы, указывает на наличие значительных проблем (связанных, в том числе, и с ограниченными знаниями о закономерностях метилирования циркулирующей ДНК) в поиске приемлемых aberrантно-метилированных онкомаркеров. Причиной этому является и более низкое удельное содержание опухолеспецифической вДНК в плазме крови, по сравнению с тканью опухоли [208], в связи с избытком «балластной» вДНК из нормальных тканей. Более того, поскольку общий пул ДНК содержит ДНК из всех тканей организма, сходство паттернов метилирования в опухолевых клетках с паттернами метилирования в нормальных клетках разных тканей, таких как, например, нейроны или клетки костного мозга / сперматогенного эпителия [317] может приводить к росту ложноположительных результатов теста. Кроме того, обнаружение опухолеспецифических молекул в крови осложняется тканеспецифичным/ возрастным/ аллель-специфичным метилированием ДНК [318, 319]. Точное измерение количества aberrантно-метилированной ДНК потенциального маркерного гена также осложняется явлением гетерогенного метилирования [318, 319]. Действительно детальный анализ при помощи секвенирования после бисульфитной конверсии более 700000 фрагментов вДНК сыворотки крови, полученных от более чем 50 человек (как онкологических больных, так и здоровых доноров), выявил неопределимую сложность паттернов метилирования цитозина. Исследуемый пул вДНК содержал молекулы почти со всеми мыслимыми паттернами метилирования цитозина в каждом локусе [318], что подтверждает возможность каждого динуклеотида CpG в каждой молекуле ДНК-матрицы быть как метилированным, так и неметилированным (см. иллюстрацию [319]).

Биология гетерогенного метилирования до конца не изучена [320]. Гетерогенные профили метилирования могут возникать в результате гетерогенности опухолевых клеток [321] вследствие их высокой вариабельности [322], например, в процессе развития опухоли в результате стохастических эпигенетических aberrаций на стадии «эволюции» [323, 324], а также на стадии метастазирования [324]. Все эти процессы приводят к появлению в кровотоке множества опухолеспецифичных молекул, а это означает, что обнаружение отдельных aberrантно-метилированных молекул в общем пуле вДНК становится чрезвычайно сложной задачей. У разных доноров даже при внешне одинаковых типах опухолей спектр эпигенетических изменений может быть разным [324]. Простейшая ситуация имеет место,

когда смесь состоит из полностью метилированных и полностью неметилированных молекул; например, когда клетки одновременно содержат эти два варианта аллелей [325]. При создании диагностических систем статус метилирования ДНК определяют в рамках ПЦР-ампликонов, сформированных на матрице, конвертированной бисульфитом ДНК [326] и в случае, когда есть только 2 варианта метилирования задача по выявлению метилированных и неметилированных локусов не представляет проблем. Действительно, для того чтобы выявить полностью метилированный или полностью неметилированный локус ДНК методом ПЦР достаточно двух независимых систем праймеров/зондов. В случае гетерогенного метилирования, т.е. при наличии аллелей с разным паттерном метилирования, обнаружение молекул с искомым паттерном метилирования представляет собой гораздо более сложную задачу, которую невозможно решить с помощью метилспецифичной ПЦР (см.п. 1.3.4.). Следует отметить, что простое высокопроизводительное секвенирование конвертированной бисульфитной обработкой ДНК так же не решает поставленную задачу в силу низкого покрытия. Для решения такой задачи требуется локус-специфичное высокопроизводительное секвенирование образцов, которое подразумевает амплификацию определенного локуса ДНК после её химической конверсии с последующим секвенированием полученного ампликона [327]. Несмотря на развитие современных методов секвенирования, изучение метилирования внеклеточных ДНК, происходящих из опухоли, на полногеномном уровне представляет собой сложную задачу из-за низкой концентрации внДНК (в среднем 10-100 нг/мл) [71, 328], низкого удельного содержания опухолеспецифической ДНК (в среднем 0,1-1%) [71, 329], деградации, потери ДНК и неполной конверсии цитозинов при бисульфитной обработке [330], не говоря про вариабельность метилирования аллелей опухолевой ткани и тканеспецифичное метилирование. Следовательно, поиск специфичных паттернов метилирования требует высокопроизводительного секвенирования с множественным покрытием локуса, а также серьёзной биоинформатической обработки больших объёмов данных и их фильтрации. Изучение метилирования отдельных локусов методом локус-специфичного NGS-секвенирования требует несравненно меньших ресурсов, чем полногеномное секвенирование, как в плане самого секвенирования, так и биоинформатического и статистического анализов полученных данных.

1.3. Особенности работы с внеклеточными нуклеиновыми кислотами биологических жидкостей

1.3.1. Выделение внеклеточных микроРНК из биологических жидкостей: влияющие факторы и используемые методы

В последние два десятилетия учёными из многих стран мира активно ведётся изучение биологии микроРНК и их транспорт из клеток и во внутриклеточное пространство, включая различные биологические жидкости. Как уже упоминалось выше, высокая стабильность и ценность внеклеточных микроРНК позволяет рассматривать их в качестве перспективных диагностических и прогностических биомаркеров множества заболеваний, в том числе и онкологических заболеваний различного генеза [33, 331, 332].

Точная оценка профилей вн-микроРНК зависит от очистки, количественной оценки и биоинформационного анализа данных (рис. 1.3.).

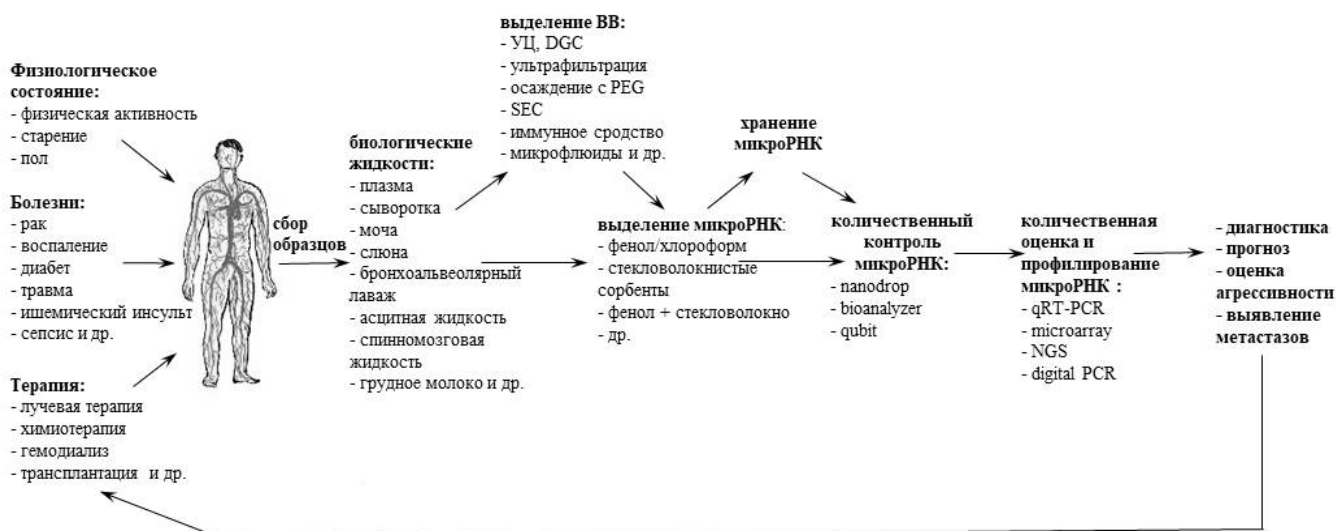


Рисунок 1.3. Факторы, влияющие на генерацию внеклеточных микроРНК биологических жидкостей, этапы пробоподготовки и анализа вн-микроРНК.

Основные характеристики и эффективность методов выделения микроРНК во многом определяются биологическими свойствами микроРНК, их последовательностью и взаимодействием с другими биомолекулами (см. п.1.1.1., таблица 1.1). Эффективность выделения микроРНК, чистота и качество полученных препаратов вн-микроРНК влияют на точность, воспроизводимость и надежность их количественного анализа и диагностические характеристики, основанных на детекции микроРНК диагностических систем.

Как уже было описано выше, небольшое количество микроРНК обнаруживается во внеклеточном пространстве и в биологических жидкостях (см. рис. 1 в [333]). Стабильность

вн-микроРНК в крови и других биологических жидкостях связана с их упаковкой в надмолекулярные комплексы, которые защищают их от РНК-гидролизующих ферментов (см. п.1.1.1., см. таблица 1.2.). Одновременно упаковка микроРНК в прочные комплексы мешает при выделении микроРНК, именно поэтому требуется разрушение таких комплексов.

Первым ключом к успешному изучению вн-микроРНК является количественное и воспроизводимое выделение микроРНК из образцов биологических жидкостей независимо от их первичной структуры, модификаций и состава биологических жидкостей. Между тем, методологические аспекты, определяющие эффективность и воспроизводимость очистки вн-микроРНК и пробоподготовки, часто привлекают мало внимания. При этом, в реальной практике диагностически значимая граница значений концентраций микроРНК довольно узка, и, таким образом, точные и воспроизводимые преаналитические подходы могут значительно улучшить сравнительный анализ экспрессии микроРНК.

В этой главе описан анализ современных методов выделения вн-микроРНК из биологических жидкостей и факторы, влияющие на его эффективность.

1.3.1.1. Работа с биологическими жидкостями и их хранение перед выделением микроРНК

Ключевой этап выделения вн-микроРНК включает отделение жидкой части биологических жидкостей от клеток и клеточного дебриса. Это необходимо для предотвращения загрязнения образца клеточными микроРНК. Более половины (почти 58%) диагностически значимых микроРНК высоко экспрессируются, по крайней мере, в одном типе клеток крови [334]. Гемолиз приводит к значительному увеличению уровней многих вн-микроРНК, включая, прежде всего, микроРНК-451a, специфичную для эритроцитов [334–337]. Значительное количество эпителиальных клеток присутствует в моче, слюне, цереброспинальной и других биологических жидкостях [338–340] и должно быть удалено, прежде чем они смогут внести свой вклад в состав вн-микроРНК посредством активной секреции или пассивной утечки. Обычно клетки удаляются последовательными центрифугированиями на низких и, затем (клеточный дебрис) на высоких скоростях [341, 342] с последующим отделением супернатанта от осадка клеток и дебриса.

Условия хранения образцов биологических жидкостей перед удалением клеточного дебриса и последующим хранением плазмы/сыворотки крови, бесклеточной фракции мочи и других жидкостей влияют на эффективность выделения и количественного определения вн-микроРНК [343, 344]. Использование образцов, хранившихся в суспензионной смоле [344], а также длительное хранение образца может снизить концентрацию микроРНК в образце, как и многократные циклы замораживания-оттаивания [333, 343]. Как описано в обзоре [333], при промежуточном хранении (< 20 месяцев) при -80°C или -20°C не наблюдается существенных

различий в уровнях микроРНК в сыворотке, тем не менее некоторые отдельные микроРНК серьёзно деградировали в зависимости от условий хранения. При хранении образцов при -20°C в пределах 2–4 лет наблюдалось незначительное снижение, а после 6 лет хранения было замечено значительное снижение уровня микроРНК, которое только усиливалось с течением времени [333].

Хранение в сухом виде, например, засохших пятен сыворотки, так же влияет на сохранность микроРНК; неполное высыхание блотов перед хранением принципиально влияло на сохранность микроРНК [333].

В опытах с мочой была обнаружена удивительная стабильность микроРНК: 10 циклов замораживания - оттаивания приводили к гидролизу 63-77% исходной микроРНК; за 5-ти дневный срок хранения мочи при комнатной температуре интактными оставались 35% микроРНК, а при 4°C - 42–56% исходной микроРНК [345].

При этом не исключено, что разные фракции микроРНК, в частности микроРНК в составе ВВ и белковых комплексов, могут различаться по чувствительности к условиям хранения. Например, экзосомальные микроРНК были стабильны при различных условиях хранения [346].

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что стабильность микроРНК в биологических жидкостях может отличаться; способ и время хранения должны определяться в отдельных исследованиях и приниматься во внимание при решении поставленных в каждом конкретном случае задач.

1.3.1.2 Общие соображения и технические параметры, определяющие метод выделения

При выборе метода выделения микроРНК из биологических жидкостей необходимо учитывать особенности их состава (ионы, белки, полисахариды и др.), которые могут повлиять на формирование надмолекулярных комплексов микроРНК и со-выделение ингибиторов ферментативных реакций. Необходимо учитывать природу комплексов микроРНК и вклад разного типа взаимодействий (ионных, неионных) в прочность таких комплексов. Например, плазма крови здорового взрослого человека содержит большое количество белков с общей концентрацией 7,2 г/дл [347] и до 90% микроРНК в плазме крови могут находиться в форме комплексов не покрытых мембраной [142]. Моча содержит большое количество азота, с преобладанием мочевины, фосфора, натрия и калия, с общим содержанием взвешенных веществ 21 мг/л, наличием специфических легко преципитирующих белков и общим содержанием растворенных твердых веществ 31,4 мг/г [348], что сильно отличается от плазмы крови и должно учитываться при разработке методов выделения микроРНК. При этом распределение в моче микроРНК в составе микровезикул и комплексов, не покрытых мембраной неизвестно, но есть

данные, что количество микроРНК, упакованных в экзосомы, составляет $7,3 \pm 1,7$ нг на 100 мл мочи, а доля экзосомальной микроРНК по сравнению с другими малыми РНК составляет $50,4 \pm 5,7\%$ [156].

Прогресс методов выделения вн-микроРНК сделал очевидным положения о том, что любой эффективный протокол должен успешно решать три основные задачи:

- обеспечивать полную диссоциацию комплексов микроРНК с биомолекулами различной природы;
- защищать микроРНК от ферментативной и неферментативной деградации при выделении независимо от их последовательности;
- предотвращать загрязнение препаратов микроРНК ингибиторами ферментов, используемых в последующих аналитических процедурах или при использовании дополнительных реагентов, необходимых для детекции микроРНК (например, флуорофоров).

В то время как многочисленные протоколы позволяют выделять тотальную РНК, несколько более современных вариантов специально адаптированы для выделения микроРНК и обеспечивают либо выделение тотальной РНК без потери микроРНК, либо селективную очистку микроРНК [115]. Выбор метода выделения не только определяет качество и количество выделенной микроРНК в целом, но может способствовать выделению определенных отдельных вн-микроРНК (обогащению), что приводит к различиям в экспрессии одних и тех же микроРНК, выделенных разными методами. Выделение, по крайней мере, некоторых вн-микроРНК зависит от используемого метода, что может быть связано с неполной диссоциацией комплексов вн-микроРНК и подтверждает связи эффективности выделения с последовательностью микроРНК и типом формируемых надмолекулярных комплексов [349]. Например, в зависимости от начального объёма используемых биологических образцов, условия выделения могут благоприятствовать выделению GC-бедных микроРНК [350]. Такие различия в эффективности выделения могут иметь существенное влияние на точность определения исходных концентраций разных микроРНК, что важно, при нормализации данных.

Успешное высвобождение микроРНК из комплексов является ключом к эффективному её выделению. Комплексы разного типа могут иметь разное сродство и стабилизироваться за счёт разного типа взаимодействий (ионного, гидрофобного и др.). ВВ содержат мембрану с различными комбинациями липидов: фосфатидилсерина, холестерина, церамида и сфинголипидов в экзосомах [351, 352]; лисфосфатидилхолины, сфингомиелин и ацилкарнитины в микровезикулах [164, 353, 354]. Высокое содержание липидов и липопротеинов в составе ВВ должно быть удалено во время выделения микроРНК, и любое взаимодействие биополимеров с микроРНК должно быть нарушено.

Полная диссоциация гетерогенных комплексов в присутствии большого количества биомолекул различной природы часто требует использования большого избытка денатурирующих растворов. Это справедливо для плазмы крови, сыворотки и особенно мочи. Для обеспечения адекватной денатурации и удаления из образцов высокого содержания белка (альбумина, иммуноглобулинов, компонентов коагуляции и комплемента среди прочего), соотношение лизирующего реагента и образца должно быть увеличено в несколько раз. В разных протоколах вместе с объёмом исходной жидкости это наиболее изменчивый шаг [355], что приводит к использованию большого объёма реагентов для осаждения или повышению эффективности связывания микроРНК адсорбентами.

Таким образом, при планировании исследования микроРНК необходимо выбрать метод выделения с учетом следующих параметров: тип образца, ожидаемый тип упаковки микроРНК и её количество, совместимость метода с последующими приложениями (например, с методом выделения ВВ), продолжительность и стоимость процедуры, доступная инфраструктура (например, способность безопасно обращаться с опасными веществами и утилизировать их).

1.3.1.3. Методы выделения микроРНК из биологических жидкостей

Подавляющее большинство используемых в настоящее время методов выделения микроРНК из биологических жидкостей основано на экстракции гуанидин тиоцианата-фенола-хлороформа, впервые предложенной P. Chomczynski и N. Sacchi в 1987 г. [356, 357]. Этот метод позволяет эффективно фракционировать РНК, ДНК и белки и диссоциировать большую часть комплексов микроРНК, поэтому он считается «золотым стандартом» для выделения тотальной РНК (и микроРНК). Ряд коммерческих наборов, например, Trizol LS, используют экстракцию на основе фенола для быстрого и упрощенного выделения микроРНК, а также могут дополнительно специализироваться на работе с конкретными типами образцов, такими как сыворотка и плазма крови, ткани животных или растений [115]. Такие продукты, как miRVANA и miRNeasy, включают дополнительную стадию очистки на колонках со стекловолоконными сорбентами для обогащения микроРНК [358]. Методы твердофазной экстракции используют взаимодействие между функциональными группами нуклеиновых кислот и твердыми сорбентами в определенных условиях. Адсорбцию нуклеиновых кислот на поверхности стекловолокна можно регулировать с помощью хаотропных агентов при различных pH, температуре и ионной силе и дополнительно усиливать добавлением ионов двухвалентных металлов в сорбционный буфер или в сам сорбент [359]. Эффективность элюции также зависит от pH и температуры, хотя в последнее время вода, не содержащая РНКаз, является предпочтительным буфером для элюции, учитывая ее удобство для большинства последующих применений.

Ряд сравнительных анализов показывает, что метод, основанный на экстракции гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформом превосходит остальные по эффективности, но разные версии протокола различаются по производительности (таблица 1.4.) [360].

Однако при всех достоинствах этот метод имеет ряд существенных ограничений. Процедура длительна (40–60 мин) и плохо масштабируется на исходный объём пробы, использует токсичные реагенты (фенол), т.е. требует использования защитного оборудования (вытяжной шкаф) и утилизации химических отходов. К недостаткам метода также можно отнести частичную потерю РНК при низком содержании GC [361]. Всё вышеперечисленное создает трудности для его рутинного использования, в том числе в клинических условиях [362].

На сегодняшний день было предложено несколько стратегий замены кислой фенол-хлороформной экстракции. В наборе Exiqon (miRCURY RNA Isolation Kit) вместо трудоёмкой процедуры органической экстракции, диссоциация комплексов вн-микроРНК и осаждение избыточного содержания белка и липопротеинов осуществляется при помощи патентованных реагентов, очистка микроРНК от оставшихся в супернатанте биомолекул выполняется с использованием колонок из стекловолокна. Экстракция занимает всего 30 минут и позволяет избежать высокотоксичных химических реагентов. Согласно нескольким исследованиям, этот подход не менее эффективен, чем фенол-хлороформная экстракция [358, 363]. К возможным недостаткам метода можно отнести частичную потерю микроРНК в результате неполной денатурации комплексов или со-осаждения с избытком биополимеров, присутствующих в биологических жидкостях. Имеются также данные о том, что в дальнейшем для исследования полученных препаратов путём секвенирования микроРНК может потребоваться дополнительная стадия фосфорилирования [358, 363].

Некоторые методы выделения могут быть использованы при необходимости планирования специфических последующих анализов. Например, наиболее распространенным методом изучения комплексов белок/РНК является ко-иммунопреципитация РНК с антителами против взаимодействующего с ней белка [364]. Для выделения к раствору добавляют антитела, которые затем иммобилизуют на сорбенте и выделяют микроРНК из адсорбированных комплексов. При помощи таких подходов исследовали комплексы микроРНК-AGO2 [31].

Таблица 1.4. Сравнительные характеристики различных методов выделения микроРНК.

Эффективность различных методов выделения с точки зрения выхода, чистоты и уровня детекции микроРНК	микроРНК и метод обнаружения	Тип образца	Ссылки
Total RNA isolation kit < miRNeasy kit, the miRVana PARIS kit	miRCURY LNA real-time PCR panel	сыворотка	[365]
TRIzol-based miRNA isolation<The miRNeasy Mini kit	qRT-PCR микроРНК-92а, -126	плазма, сыворотка	[366]
miRvana microRNA Isolation kit, QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit> miRNeasy Serum/Plasma Kit	qRT-PCR микроРНК-21, -191, синтетическая-микроРНК-159а	плазма	[367]
miRNeasy Serum/Plasma kit, MagnaZol™ cfRNA Isolation Reagent	NGS	плазма	[368]
miRCURY Cell and Plant Kit без использования гликогена < TRIzol LS (LT) с последующей очисткой с использованием колонок mirVana с гликогеном/без гликогена < miRCURY Cell and Plant Kit с гликогеном < mirVana kit с гликогеном/без гликогена miRCURY Cell and Plant Kit с гликогеном < miRCURY Biofluids kit с гликогеном/без гликогена miRNeasy Serum/Plasma system slightly < miRCURY Biofluids kit	qRT-PCR микроРНК-16, -21, cel-микроРНК-39	плазма	[358]
TRIzol LS (LT); miRNA purification kit <mirVana PARIS kit	qRT-PCR cel-микроРНК-39	плазма	[369]
TRIzol LS (LT); miRNeasy mini kit; mirVana PARIS kit; miRNA purification kit	qRT-PCR микроРНК-21		
mirVana PARIS, Trizol LS (LT) с mirVana, miRCURY <miRNeasy, <miRNeasy с RNeasy MinElute Cleanup Kit	Bioanalyser	экзосомы мочи	[170]
mirVana PARIS (с добавлением дополнительной стадии органической экстракции),< miRNeasy kit	qRT-PCR	плазма, сыворотка	[370]
сопоставимые результаты: miRNeasy mini kit, Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Kit = NucleoSpin miRNAs Plasma kit	Microarray	моноклеарные клетки периферической крови	[350]

Эффективность различных методов выделения с точки зрения выхода, чистоты и уровня детекции микроРНК	микроРНК и метод обнаружения	Тип образца	Ссылки
MirVana PARIS kit, TRIzol-LS (LT) < miRNeasy Serum/Plasma Kit		свежая плазма	
TRIzol-LS (LT) < mirVana PARIS kit, TRIzol-LS после mirVana kit < miRNeasy Serum/Plasma kit		замороженная плазма	
сопоставимые результаты с точки зрения значений Cq: miRCURY RNA Isolation Kits, Plasma/Serum Circulating и Exosomal RNA Purification Mini Kit, NucleoSpin miRNA Plasma, miRNeasy Serum/Plasma Kit, Direct-zol RNA MiniPrep	miRCURY microRNA QC PCR Panel (Exiqon) микроРНК-18a, -21, -29a	плазма	[371]
TRIzol-LS (LT) < miRNeasy, mirVana miRNA Isolation Kit < TRIzol-LS (LT) в комбинации с miRNeasy < miRCURY RNA Isolation Kit < SeraMir exoRNA columns	RT-qPCR, микроРНК-16 и let-7i	ВВ мочи, выделенные с помощью ультрафильтрации или из мононуклеарных клеток периферической крови	[372]
PAXgene и Tempus whole blood RNA пробирки для консервации Qiagen (PAXgene Blood miRNA Kit), Life Technologies (MagMAX для пробирок со стабилизированной кровью RNA Isolation Kit), Norgen Biotek (Norgen Preserved Blood RNA Purification Kit I и Kit II), и 2 (полу-) автоматических протокола на QIAasympyony (Qiagen) и MagMAX Express-96 Magnetic Particle Processor (Life Technologies) Norgen Kit II с PAXgene < Norgen Kit I с Tempus Tubes	qRT-PCR микроРНК-1, -16, -30b и микроРНК-133a	кровь	[371]

Эффективность различных методов выделения с точки зрения выхода, чистоты и уровня детекции микроРНК	микроРНК и метод обнаружения	Тип образца	Ссылки
QIAGEN Exo kit < Фракция после ультрацентрифугирования с использованием miRNeasy kits и the NucleoSpin kit	miRCURY microRNA QC PCR Panel (Exiqon) микроРНК-103, -191, -23а, -451, -18а, -21, -29а	ВВ	[373]
Похожие значения Cq: miRNeasy Mini Kit, miRNeasy Serum/Plasma kit, exoRNeasy Serum/Plasma Starter Kit, Plasma/Serum RNA Purification Mini Kit, Direct-zol™ RNA MiniPrep, NucleoSpin miRNA Plasma		плазма	
miRNeasy немного лучше, чем miRCURY	RT-qPCR микроРНК-16, -106а, -222, -223	экзосомы плазмы	[360]
miRCUR < miRNeasy miRCURY biofluids = miRNeasy kits	RT-qPCR, микроРНК-30с-2-3р, -106а, -204, -222, -141	плазма	
miRCURY < miRNeasy		экзосомы мочи	
miRNeasy Serum/Plasma kit, Plasma/Serum Circulating RNA Purification Kit < miRCURY RNA Isolation Kit - Biofluids; mirVana PARIS Kit; NucleoSpin miRNA Plasma	TaqMan miRNA PCR system (Applied Biosystems, California, USA), miRCURY LNA microRNA PCR system (Exiqon) и miScript miRNA PCR system (Qiagen), микроРНК-16,-141, -135а	плазма	

Эффективность различных методов выделения с точки зрения выхода, чистоты и уровня детекции микроРНК	микроРНК и метод обнаружения	Тип образца	Ссылки
PureLink commercial column extraction kit < TiO2 nanofibers	qRT-PCR микроРНК-21, -191, spiked cel-микроРНК-54	MDA-MB-231 клетки рака молочной железы	[360]
Метод, основанный на использовании фенола и колонок и на использовании колонок в присутствии или отсутствии двух РНК-носителей (РНК дрожжей и РНК MS2); другие носители и их отсутствие < РНК дрожжей	NGS	плазма	[374]
ExoRNeasy Serum/Plasma Starter Kit (Cat. 77023), Plasma/Serum RNA Purification Mini Kit, Direct-zol™ RNA MiniPrep < miRNeasy kits (Mini and Serum/Plasma kits) and NucleoSpin kit	Bioanalyzer, qRT-PCR микроРНК-122, -21-1, -30d, -451a	плазма	[375]
Метод выделения с использованием реагентов Trizol LS < miRNeasy mini kit на 35%	qRT-PCR RNU6, микроРНК-145, -20a	сыворотка	[376]
Trizol LS < miRCURY < miRNeasy kit, с некоторыми особенностями относительно разных объемов проб	NGS , qRT-PCR микроРНК-106a, -222, -16, -223	плазма и циркулирующие экзосомы	[377]
mirVana и the Plasma/Serum RNA Purification Mini < miRNeasy Serum/Plasma < miRCURY Biofluids и the miRNeasy Advanced Serum/Plasma	NGS , qRT-PCR let-7a-5p, микроРНК-150-5p, -16-5p, -122-5p, -21-5p, -191-5p, cel-микроРНК-39-3p	вн-микроРНК плазмы	[378]
exoRNeasy Serum/Plasma Exosome немного < Ультрацентрифугирование + miRNeasy kit		микроРНК ВВ плазмы	
Circulating Nucleic Acid Kit < TRIzol LS (TF); miRNeasy; RNA extraction kit и the MiRCURY RNA Isolation Kit - средне	NGS	плазма	[64]
miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen, Germany), miRVANA miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA), и TRIzol LS (TF) < Urine microRNA purification kit,	qRT-qPCR микроРНК-16, -10a-5p, -196a-5p) и экзогенная cel-микроРНК-39	образцы спинномозговой жидкости	[379]

Эффективность различных методов выделения с точки зрения выхода, чистоты и уровня детекции микроРНК	микроРНК и метод обнаружения	Тип образца	Ссылки
Quick-cfRNA Serum and plasma; Isolate II miRNA kit; PureLink RNA mini kit; Monarch total RNA miniprep kit < miRNeasy Serum/Plasma Advanced kit < miRNeasy Serum/Plasma kit	qRT-PCR микроРНК-19b, -92a, -93, -103, -144, -345-3p, -486, -494-3p, -1306	овечья плазма свежая и замороженная	[115]

<, > - лучше или хуже с точки зрения выхода, чистоты и уровня обнаружения микроРНК.

Total RNA isolation kit, (Norgen, Thorold, Ontario, Canada); Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Mini Kit, (Norgen, Thorold, Ontario, Canada); Urine microRNA purification kit, (Norgen, Thorold, Ontario, Canada); MiRNeasy kit, (Qiagen, Hilden, Germany); QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit, (Qiagen, Hilden, Germany); ExoRNeasy Serum/Plasma Starter Kit, (Qiagen, Hilden, Germany); MiRNeasy Serum/Plasma Kit, (Qiagen, Hilden, Germany); MiRNeasy with RNeasy MinElute Cleanup Kit, (Qiagen, Hilden, Germany); QiaSymphony RNA extraction kit, (Qiagen, Hilden, Germany); MiRVana PARIS (Ambion, Life Technologies, Austin, TX, USA); MiRVana microRNA Isolation kit (Ambion, Life Technologies, Austin, TX, USA); Trizol LS reagent (LT) (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); MiRCURY RNA isolation kit Biofluids (Exiqon, Vedbaek, Denmark); MiRCURY Cell and Plant Kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark); MiRCURY Biofluids kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark); MagnaZol™ cfRNA Isolation Reagent (Bioo Scientific, Austin, TX, USA); ThermoFisher Scientific Ambion TRIzol LS Reagent (TF) (Thermo Fisher Scientific, Third Avenue Waltham, MA, USA); PureLink commercial column extraction kit (Thermo Fisher Scientific, Third Avenue Waltham, MA, USA); NucleoSpin miRNA Plasma kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany); Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, USA); Quick-cfRNA Serum and plasma (Zymo Research, Irvine, CA, USA); SeraMir™ exoRNA columns (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA); PureLink RNA mini kit (Bioline, Memphis, TN, USA); Monarch total RNA miniprep kit (NEB, Hitchin, UK).

Связанные с липопротеинами микроРНК можно выделить с помощью последовательного ультрацентрифугирования плазмы в градиенте плотности с использованием соли бромида калия. Другим методом, используемым для разделения липопротеинов плазмы, является гель-хроматография, часто с использованием FPLC-хроматографов с колонками, заполненными стационарными фазами высокого разрешения [380]. Аффинная хроматография с использованием колонок, связанных с моноклональными антителами, специфичными к аполипопротеинам, предлагает ещё один подход к выделению липопротеинов плазмы. Однако использование низкого pH, необходимого для элюирования липопротеинов, удерживаемых иммуноаффинной колонкой, приводит к потенциальному риску потери нуклеиновых кислот из очищенного липопротеина [380]. Таким образом, ультрацентрифугирование с последовательной плотностью остается стандартом для выделения четко определенных классов липопротеинов в количествах, достаточных для проведения последующих исследований функций липопротеинов и состава РНК *in vitro* или *in vivo* [380].

Наконец, существуют методы и наборы, предназначенные для выделения микроРНК из источников, отличных от биологических жидкостей, но которые могут быть адаптированы для вн-микроРНК. Например, RNAgem (microGEM, Southampton, Великобритания) обеспечивает выделение тотальной РНК и микроРНК из клеток млекопитающих, тканей, насекомых, бактерий и вирусов в одной пробирке с изменением температурного режима используя подход, основанный на разделе фаз.

Наличие или отсутствие осаждения микроРНК и тип со-осадителя могут влиять на выход микроРНК во время её выделения. Стадия повторного осаждения представляет собой дополнительную стадию обработки образца микроРНК, которая приводит к увеличению времени выделения и потенциальной потере микроРНК. Подобная проблема известна для преципитации циркулирующей ДНК, для которой в случае непредсказуемой потери или загрязнения ДНК известны некоторые протоколы осаждения, особенно те, в которых использовались положительно заряженные соединения [381]. Обычно в качестве носителей используют РНК-бактериофаги (MS2), дрожжевую РНК, тРНК и гликоген [368, 382–384]. Наиболее распространенным со-осадителем является гликоген; однако было показано, что комбинация тРНК и гликогена значительно улучшает выход и чистоту РНК и максимизирует извлечение микроРНК из плазмы при использовании реагентов TRIzol LS [384]. Несомненно, большим плюсом использования гликогена в качестве носителя является отсутствие компонентов нуклеиновой природы в его составе, которые могут мешать последующему анализу микроРНК (NGS, микрочиповая технология и др.).

Были предприняты многочисленные попытки сравнить эффективность различных методов выделения микроРНК (таблица 1.4.). В большинстве этих исследований сравниваются

протоколы выделения микроРНК из плазмы крови, и чаще всего простая фенол-хлороформная экстракция превосходит как фенольную экстракцию с методами очистки на основе колонок, так и методы на основе колонок без использования фенола (таблица 1.4.). Не было получено убедительных результатов в отношении различий в производительности методов на основе колонок, что позволяет предположить, что, по-прежнему, необходимы еще большие усилия для сравнения существующих методов выделения и разработки универсальных стандартов для выделения микроРНК (таблица 1.4.; [341]).

Быстро развивающиеся микрофлюидные технологии могут ещё больше улучшить выделение вн-микроРНК. Микрофлюидные приборы представляют собой компактные устройства, состоящие из сети микроканалов диаметром от десятков до сотен микрометров, способных работать с вязкими средами в диапазоне концентраций от пико- до микролитров. Для настройки движения жидкости используются специализированные блоки. Микрофлюидные устройства обладают огромным потенциалом и способны воспроизводить лабораторные методы на микроуровне с высокой точностью и специфичностью [385]. Выделение микроРНК, а также их обнаружение — одна из областей применения микрофлюидных технологий. Недавно разработанные микрофлюидные платформы могут выполнять эффективное разделение экзосом и обнаружение экзосомальных микроРНК для жидкостных биопсий в одном устройстве. Такие методы обладают преимуществами целостности и скоростью процедуры [386]. Более того, в микромасштабных процессах расход реагентов может быть уменьшен с миллилитров до микролитров [385].

Таким образом, описанные данные ясно показывают, что не существует единого наиболее эффективного метода выделения вн-микроРНК, а выбор методологии часто диктуется типом образца и свойствами исследуемой фракции микроРНК, а также простотой использования в контексте каждого конкретного исследовательского проекта. Это полностью согласуется с мнением NIH Extracellular RNA Communication Consortium, утверждающим, что, несмотря на значительное развитие методологии, оптимального метода выделения микроРНК не существует и работа по разработке и оптимизации новых подходов к этой проблеме должна быть продолжена [363]. На данный момент, как попытки уточнить и оптимизировать существующие технологии, так и исследование новых подходов могут изменить эту парадигму и дать значительный импульс исследованиям вн-микроРНК, что потенциально может способствовать появлению некоторых из них в условиях клиник.

1.3.2. Методы исследования внеклеточных микроРНК

Исследование онкоспецифичных вн-микроРНК, их поиск в образцах биологических жидкостей осложняется несколькими факторами. Во-первых, гипотезонезависимые подходы, такие как высокопроизводительное секвенирование, стали доступны в России только в начале второй декады 21 века. Во-вторых, использование гипотезо-зависимых подходов, таких как микрочиповые технологии, ограничивает исследование конечным набором мишеней и низкой концентрацией онкоспецифических вн-микроРНК в биологических жидкостях (т.е. детектируется только то, что может быть детектировано в определенной системе). В-третьих, при исследовании микроРНК неизбежно используется обратная транскрипция (в этой главе упоминаются прямые, гибридизационные методы детекции микроРНК, поскольку они сильно уступают ПЦР по чувствительности и специфичности), т.е. их концентрации оцениваются не напрямую, а, следовательно, необходимо нормализовать данные с использованием адекватных подходов. Ещё одной проблемой является существование нескольких вариантов исполнения высокопроизводительного секвенирования, анализа с использованием микрочипов и количественной ПЦР [387], и, соответственно, как и было показано, при сравнении полученных разными методами данных об экспрессии микроРНК, они, в лучшем случае, совпадают на 55% [388]. Таким образом, переход исследователя/пользователя между различными вариантами анализа требует больших трудозатрат, направленных на сближение данных и минимизацию потерь значимых отличий в экспрессии микроРНК.

1.3.2.1. Анализ с использованием микрочиповых технологий (microarray)

Микрочипы – это миниатюрные системы гибридизации, использующиеся при анализе примерно известного спектра микроРНК в образцах. Эта методология позволяет параллельно выполнять высокоуровневый анализ ограниченного набора сотен микроРНК [22], однако, требующая на старте большого количества РНК (100-1000 нг) и использующая преамплификацию, что может увеличивать число ошибок в данных [389]. Принцип использования микрочипов основан на обратной гибридизации в твердой фазе. Зонды ковалентно связаны с твердым носителем, в то время, как микроРНК маркируются и присутствуют в жидкой фазе [22]. К сожалению, этот метод исследования не является количественным и требует верификации полученных результатов с помощью ОТ-ПЦР.

Модификации метода включают в себя, в том числе и решение проблем, связанных с трудностями стандартизации температур плавления в связи с небольшим размером последовательностей микроРНК. Например, с использованием зондов на основе LNA (Locked

Nucleic Acid) [390] можно не только снизить разницу в температурах плавления, но и дифференцировать микроРНК с близкими последовательностями [389].

Необходимо отметить, что «микрочипами» часто называют технологии исследования экспрессии микроРНК, которые, по сути, ими не являются. Так, микрочипы компании Qiagen, например, панели miRCURY LNA miRNA SYBR® Green PCR основаны на количественной SYBR Green ПЦР образцов с использованием LNA-праймеров, что позволяет выравнивать температуры плавления праймеров и унифицировать ПЦР системы, тем самым заметно усиливать получаемые сигналы [391].

На сегодняшний день на рынке для исследования микроРНК представлены также микрочипы фирмы ThermoFisher (GeneChip® miRNA 2.0 Array), позволяющие анализировать 0,1 аттомоль микроРНК в 100 нг суммарной РНК [392]; Agilent Technologies, требующие на старте общей РНК около 100 нг [393]; Qiagen (miScript® miRNA PCR Array), требующие на старте общей РНК около 10 нг [394] и др.

1.3.2.2. Секвенирование малых форм РНК

В отличие от исследования микроРНК с помощью микрочиповых технологий, секвенирование нового поколения (NGS, next generation sequencing) позволяет проанализировать весь спектр этих малых молекул (в том числе и иные типы малых РНК, например, таких, как пиРНК), т.е. не нуждается в информации об отдельных микроРНК в образце, требует от 1-10 нг очищенной короткой РНК на старте (Ion Torrent, Life Technologies; TruSeq, Illumina). Различные погрешности количественной оценки при применении современных методов пробоподготовки преодолеваются за счёт использования идентификаторов или уникальных молекулярных индексов (УМИ). Но и этот метод не является идеальным, поскольку включает стадии лигирования/преамплификации, что, в свою очередь, влечёт за собой потерю данных о малопредставленных микроРНК и может приводить к нарушению соотношения концентраций микроРНК в исходном и анализируемом образцах [363, 389]. Секвенирование также не является количественным методом, поскольку число прочтений для конкретной последовательности напрямую не связано с её количеством [395]. Кроме того, при избыточном содержании в образце какой-либо микроРНК, количество прочтений для остальных микроРНК снижается. Необходимо также принимать во внимание, что для сравнения разных образцов, количество прочтений микроРНК должно быть одинаковым.

К недостаткам исследования микроРНК при помощи как секвенирования, так и микрочиповых технологий относится обязательное использование современных и достаточно сложных методов биоинформатического анализа для интерпритации полученных данных.

Суммируя всё вышеописанное, стоит упомянуть о необходимости верификации полученных при секвенировании данных (как и в случае использования микрочипов), например, с использованием ОТ-ПЦР [363, 389].

1.3.2.3. Количественный ОТ-ПЦР анализ

На сегодняшний день именно надёжный и экономичный, чувствительный и специфичный метод ОТ-ПЦР, позволяющий работать с малыми количествами микроРНК на старте, является основным (эталонным), как для верификации данных, полученных при помощи, например, секвенирования и микрочиповой технологии, так и для анализа микроРНК в диагностических лабораториях [22]. С использованием ОТ-ПЦР можно проанализировать, как одну, так и при использовании микропланшетов, в которых одна точка соответствует одной ПЦР-реакции, панель из сотен микроРНК [396].

Однако, несмотря на простоту дизайна и исполнения, метод имеет не мало нюансов и «тонкостей», которые необходимо учитывать для получения воспроизводимых результатов и их корректной интерпритации. Поскольку микроРНК - это короткие последовательности рибонуклеотидов, которые не имеют общих последовательностей (в отличие от мРНК), для их амплификации нельзя использовать стандартные пары праймеров. Именно это вынуждает исследователей использовать один из двух основных подходов при выполнении, как реакции обратной транскрипции, так и самой ПЦР, а именно выбор между флуоресцентно-меченым TaqMan-зондом и интеркалирующим красителем (SYBR Green) для количественной детекции продукта [389, 397]. Так, поскольку размер зрелой молекулы микроРНК сопоставим по размерам с длиной праймеров, необходимо до постановки количественной ПЦР увеличить размер молекулы микроРНК. Одним из способов является реакция обратной транскрипции с использованием специфичного для каждой микроРНК петлевого (stem-loop) праймера (см. рис.1а в [398]), в результате которой синтезируется кДНК размером 50-60 нуклеотидов. Этот подход используют такие фирмы, как 3D Gene и Thermo Fisher [397]. Ещё одним методом увеличения молекулы микроРНК может служить синтез поли-U или поли-A цепочки на 3'-конце микроРНК, используемый фирмами Exiqon, Genescreen, Qiagen и Quantabio [397], а также лигирование адаптера (см. рис.1б в [398]). Третьим вариантом является использование петлевого ОТ-праймера с концами, комплементарными обоим концам (2-Tail) исследуемой микроРНК (см. рис.1в в [398]). В результате ОТ синтезируется молекула кДНК необходимого для дальнейшей ПЦР размера с обоими концами, комплементарными исходной микроРНК. Более того, в этом случае в реакции ПЦР используются два, а не один (как в предыдущих случаях) специфических праймера [398]. Помимо различных структурных вариантов праймера для обратной транскрипции (включая шпильки, в том числе и для получения кДНК со

спиленной структурой) существуют варианты праймеров и для кПЦР, например, их биотинилирование [397].

К модификациям описанных протоколов относится также использование праймеров, в составе которых присутствуют LNA-нуклеотиды («замкнутые», для выравнивания температур плавления при анализе разных микроРНК), а также TaqMan-зондов с малобороздочными лигандами, которые способствуют увеличению специфичности детекции изоформ [389, 399–403].

В некоторых работах используется метод циркуляризации микроРНК с помощью лигазы [397], с последующим анализом циркуляризованной микроРНК с помощью Sybr Green ОТ-ПЦР с перекрывающимися праймерами.

1.3.2.4. Варианты нормализации при исследованиях микроРНК

В зависимости от метода исследования микроРНК, варианты нормализации данных могут быть различны. Так, при получении большого объёма данных с помощью микрочипов, пользуются нормализацией на общее среднее значение сигнала (от всех микроРНК) [404], а при секвенировании данные представляются в виде RPM, т.е. количестве прочтений индивидуальной микроРНК на миллион прочтений. Таким образом, исследователь способен выявить основные закономерности/тенденции в полученных данных, но нет никаких гарантий, что подобные закономерности сохранятся при использовании для анализа того же образца меньшего числа детектируемых аналитической системой микроРНК.

ОТ-ПЦР за одну постановку позволяет получить меньшее число данных и, соответственно, система нормализации для неё должна быть иная. Метод $2^{-\Delta\Delta CT}$ позволяет выполнить оценку концентрации целевых микроРНК относительно «стандарта» [405], в качестве которого изначально предлагали использовать snRNU6 и snRNU48 (небольшие ядерные РНК, snRNAs). Однако их размер (> 100 п.н.), превышающий размер микроРНК в несколько раз, являлся основным недостатком, поскольку вносил свой вклад в эффективность как выделения, так и ОТ-ПЦР, что могло приводить не только к систематической ошибке анализа, но и к получению ошибочных результатов [389, 406]. В некоторых работах для нормализации данных использовали микроРНК-155 или микроРНК-16, в качестве стабильно экспрессируемых микроРНК - стандартов, однако данные о повышенном уровне микроРНК-16 в клетках крови и влиянии гемолиза, условий обработки и хранения образца привели к необходимости смены нормализатора [27, 389, 406]. Поскольку уровень одиночных микроРНК отличается между донорами и зависит от различных физиологических факторов, то их использование не является надёжным и статистически устойчивым. Именно поэтому было предложено использовать наборы микроРНК, например, микроРНК-16 + микроРНК-93 или

даже наборы большего числа микроРНК (например, let-7a, микроРНК-221, -191, -181a, -26a [407, 408] или микроРНК-197, -19b, -24, -146, -15b, -19a [409]). Однако при создании таких панелей нормализаторов, даже принимая во внимание их стабильность, значительно возрастает общая стоимость потенциального диагностического теста. Ещё одним из вариантов может быть использование для нормализации эндогенной и синтетической микроРНК, например, микроРНК-484 и cel-miR-39 (микроРНК нематоды *C. elegans*) [410]. При этом cel-miR-39 добавляется в образец на стадии выделения и зачастую эта микроРНК является “spike-in” контролем эффективности стадий выделения/пересадки и других стадий работы с образцом [363, 411].

Наиболее перспективным на сегодняшний день подходом для нормализации полученных данных является использование в одном и том же образце парных отношений изучаемых микроРНК [335, 412]. В этом случае при анализе панели микроРНК, каждая микроРНК может быть нормализатором для каждой микроРНК и есть возможность в составе небольшой панели подобрать устойчивые диагностические/прогностические пары с наибольшей разницей dCT [413]. Математически было подтверждено, что этот метод не зависит от добавленного и внутреннего контролей и, как для данных секвенирования, так и для RT-qPCR является более надежным, чем существующие методы нормализации на основе «эталонного» контроля [414].

Использование информации о парном изменении концентраций микроРНК может способствовать пониманию фундаментальных биологических процессов и их особенностей [335] и решить сложную проблему нормализации данных для идентификации надежных биомаркеров на основе анализа микроРНК, соответствующих реальной клинической практике.

1.3.3. Особенности работы с небольшими количествами вДНК

На значение концентрации внеклеточной ДНК в конечном итоге могут повлиять большое количество факторов (рис. 1.4., Приложение 2 на примере такой биологической жидкости, как кровь), включая преаналитические и аналитические методы, размер, структуры, другие особенности вДНК, а также физиологическое состояние донора вДНК.

За последние десятилетия методы, используемые для выделения и анализа вДНК, претерпели значительные изменения. В начале эры вДНК методы измерения их концентраций основывались на прямой оценке с помощью антител против ДНК и гистонов [415, 416], а также интеркалирующих флуоресцентных красителей [417] (Приложение 2).

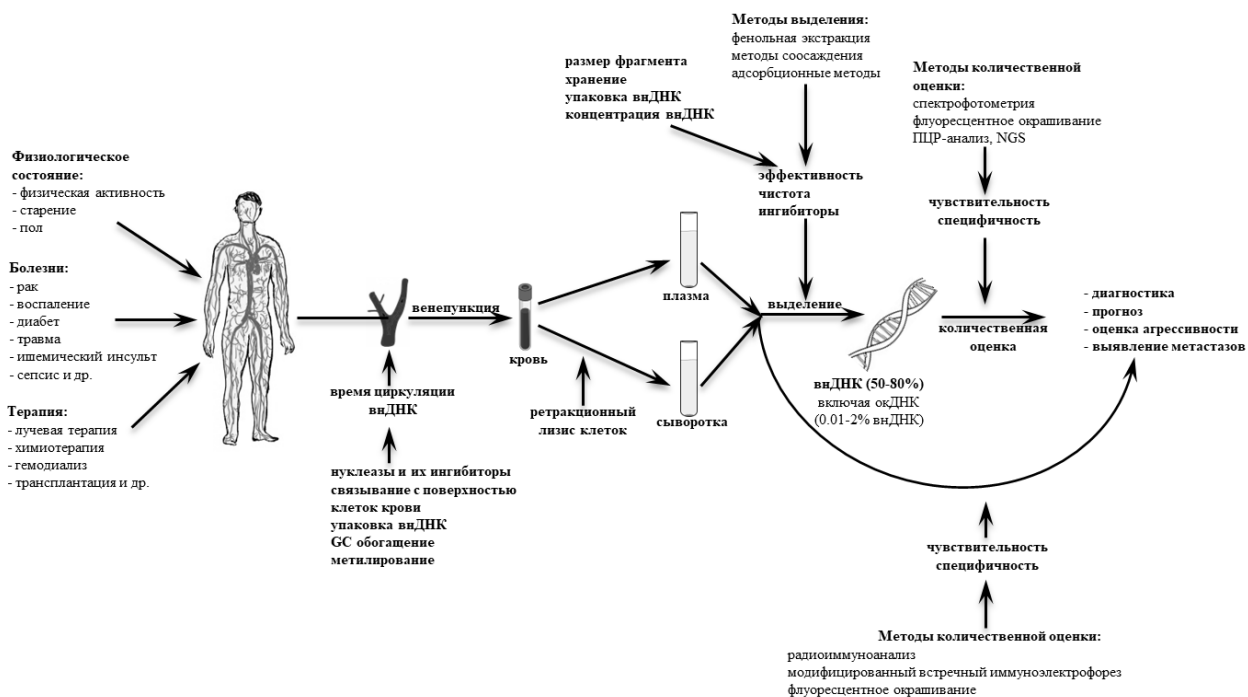


Рисунок 1.4. Основные факторы, влияющие на оценку концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК в крови.

Появление данных о комплексах внДНК в крови (нуклеосомах, белках крови и др.) и влиянии биополимеров крови на флуоресценцию ДНК-связывающих красителей заставило исследователей перейти к измерению изолированной ДНК. Фенольная экстракция с последующим осаждением спиртом [418] считалась золотым стандартом, хотя и было предложено несколько адсорбентов [419, 420] и методов со-осаждения внДНК [421–424]. Со временем, выделение внДНК с использованием стекловолнистых фильтров [425] стало наиболее распространенным методом, несмотря на то, что метод фенольной экстракции дает в среднем на 20% более высокий выход внДНК, чем ДНК-связывающие колонки [426, 427]. Принимая во внимание множество используемых методов, нельзя упускать из виду особенности протоколов выделения, такие как эффективность выделения внДНК, чистота препаратов или предполагаемое выделение определенных пулов ДНК. Например, адсорбенты на основе стекла не позволяют выделять чрезмерно длинные (около 48 т.п.н.) молекулы ДНК из-за их прочного связывания с адсорбентом [419]. Кроме того, в крови содержится множество различных типов ингибиторов ПЦР, которые могут загрязнять выделенные образцы внДНК и препятствовать дальнейшему анализу [428]. Сегодня существует множество коммерческих наборов на основе колонок и магнитных шариков, оптимизированных для получения внДНК из биологических жидкостей [420], но при использовании в каждом конкретном исследовании внДНК необходимо учитывать их преимущества и недостатки. В целом, например, из плазмы крови эти методы позволяют выделять 50–80% внДНК (размером более 100 п.н.) [420].

Следует отметить, что условия хранения (в течение 24 и 48 ч) и температура (20–25°C и 4–8°C) не оказывают существенного влияния на концентрацию внДНК в плазме крови [429]. Однако длительное хранение как выделенной внДНК, так и просто образцов плазмы крови приводит к существенной деградации ДНК (примерно на 30% в год) [430]. Для оценки концентрации внДНК используются такие методы, как спектрофотометрия [418, 425], флуоресцентные красители (Hoechst 33258 [417] или бисцианидные красители [431]), радиоактивное мечение [432] и различные типы ПЦР-анализа [210, 433]. Все перечисленные методы имеют преимущества и недостатки. Например, спектрофотометрический метод прост, но имеет низкую чувствительность (10 мкг/мл) и специфичность. Методы, основанные на флуорометрии, являются более точными и чувствительными для количественного определения ДНК, чем спектрофотометрия (1,60 нг/мкл (диапазон 25-75-го перцентиля: 1,10-2,10) против 0,080 нг/мкл (диапазон 25-75-го перцентиля: 0,050-0,130)) и менее чувствительны к примесям РНК и белка в выделенных образцах внДНК [434]. При этом флуоресцентные красители имеют различную специфичность для ДНК и их типичных примесей [435]. Количественная ПЦР является хорошим выбором для оценки концентрации внДНК, но корреляция между количеством суммарной ДНК и количеством целевых локусов для ПЦР, а также эффективность ПЦР с использованием внДНК должны быть проверены в предварительных экспериментах. Ранние исследования показали обратную зависимость эффективности ПЦР от размера молекул ДНК [417], но в дальнейшем она не учитывалась, вероятно, из-за более эффективного нагрева и охлаждения в ПЦР-аппаратах следующего поколения.

Следует отметить, что концентрации внДНК, оцененные с использованием количественной ПЦР, обычно были заметно ниже, чем обнаруженные с помощью флуоресценции [256, 436], а последние ниже, чем обнаруженные с помощью иммуноанализа [437]. В современных методах, используемых для исследования внДНК или их диагностического применения, обычно используют ПЦР, так как это более точно, удобно и корректно. Однако, как упоминалось ранее, различные локусы геномной ДНК избыточно или недостаточно представлены во внДНК [438–441]. Например, было показано, что во внДНК доля интронов, экзонов и промежуточных участков гена составляет 24%, 1% и 75% от таковой в геномной ДНК, соответственно [224], а большая часть внДНК состоит из повторяющихся элементов (88% против 59% в клеточной ДНК [438]). Более того, также было показано относительно большее количество генов Alu-повторов [439, 440, 442], перичентромерных tandemных повторов (TR) и уменьшение центромерных α -сателлитов и LINE элементов во внДНК [443]. Анализ последовательности внДНК, полученной из культивируемых клеток остеосаркомы костей человека, указывает на чрезмерное представление ALU: L1, ERV (K) класса II, MaLR, TcMar-Tigger, сателлитов и простых повторов (мини-сателлитов), в то время,

как элементы длинных концевых повторов (LTR) и элементы ДНК недостаточно представлены или встречаются на уровнях, сравнимых с таковыми в геноме человека [438].

Данные NGS, полученные в последние годы, дают много информации о содержании внДНК в пересчете на среднее значение геном-эквивалента или числа копий в суммарной ДНК и опухолевой ДНК [444]. В частности, профилирование внДНК на основе NGS является перспективным аналитическим инструментом в изучении мутантных генов с высокой чувствительностью, что указывает на высокую клиническую значимость в неинвазивной онкологии.

Как концентрации внДНК, так и результаты более детальных анализов, очевидно, зависят от особенностей возникновения внДНК, циркуляции, перераспределения по органам и тканям и выведения из организма, а также от метода выделения внДНК [256]. Учитывая отмеченные выше свойства каждого метода выделения ДНК [418–420], эти данные не выглядят спорными. Зависимость размера внДНК от метода выделения была подробно описана Р. Jiang и Y. Lo [445].

Многочисленные исследования были направлены на сравнение внДНК здоровых доноров и пациентов с различными типами онкологических заболеваний (Приложение 2). Как описано выше, в ранних исследованиях было обнаружено, что концентрации внДНК значительно выше у пациентов по сравнению со здоровыми донорами. Зависимость данных от используемого метода анализа представлена в различных работах [446, 447] и наиболее очевидна в исследовании J. Jylhävä и др. [256], где концентрации внДНК, оцененные с помощью ПЦР и с использованием флуоресцентных красителей, различались на несколько порядков. Кроме того, особенности фрагментации и выделения внДНК могут быть причиной отсутствия согласованных данных из-за размера ДНК (различная эффективность ПЦР и флуоресценции), а также наличия ингибиторов ПЦР или неслучайной фрагментации внДНК.

1.3.4. Методы исследования метилирования внДНК

Как уже упоминалось выше, одним из факторов, обеспечивающих стабильность внеклеточных ДНК в биологических жидкостях, является метилирование ДНК. Аберрантно метилированная ДНК опухолевых клеток благодаря своей повышенной стабильности способна более долгое время циркулировать внутри организма, потенциально представляя собой диагностический онкомаркер. Так, например, при введении в хвостовую вену мыши неметилированного ПЦР-продукта промоторной области гена GSTP1 размером 164 п.н. через 5 мин инкубации его остается менее 7%, а через 60 мин менее 5%; в то время как метилированного ПЦР-продукта через 5 мин в кровотоке остаётся более 50%, а через час - 45% [50].

Действительно, изменения в статусе метилирования вДНК, циркулирующих в крови, обнаруживают при развитии многих онкологических заболеваний, включая рак предстательной и молочной желёз, мочевого пузыря, почек, кишечника, лёгкого и т.д. [448–450], причём уже на ранних стадиях (IA и IB) [451, 452].

На рынке существует несколько коммерческих систем, например, QX100TMDroplet DigitalTMPCR system (“Bio-Rad”), BioMark System (“Fluidigm”) на платформе 12.765 Digital Arrays (“Fluidigm”), позволяющих с использованием технологий цифровой (digital) ПЦР (например, метод Methyl-BEAMing) анализировать статус метилирования цитозинов, используя на старте вДНК, полученную из 0,5 мл плазмы крови [453, 454]. Однако на сегодняшний день, как уже упоминалось выше, в клинической практике FDA одобрен только тест Epi proColon (для диагностики рака кишечника), в основе которого лежит оценка статуса метилирования промоторной области гена *SEPT9* [449].

Одной из причин такого малого количества диагностических тестов на рынке может служить несовершенство методов анализа статуса метилирования ДНК, в том числе связанное с низкой концентрацией и высокой фрагментацией опухолевой ДНК в биологических жидкостях.

Методы изучения aberrантного метилирования вДНК основаны на подходах, имеющих отношение для решения двух классов задач - к масштабному, в том числе и полногеномному исследованию вДНК, а также к анализу отдельных локусов ДНК.

На сегодняшний день основными методами исследования aberrантного метилирования вДНК биологических жидкостей, удовлетворяющими таким требованиям, как возможность работы с низким количеством минорной популяции высокофрагментированной ДНК в присутствии большого количества балластной ДНК (из тканей не опухолевого происхождения) являются: ПЦР, специфичная к метилированию (MSP, methylation specific PCR); ПЦР, опосредованная лигированием тупых концов ДНК (BLM-PCR, blunt-ended ligation-mediated PCR); одонуклеотидное удлинение праймера, чувствительное к метилированию (Ms-SNuPE, methylation-sensitive single nucleotide primer extension); высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC, high performance liquid chromatography); иммунопреципитация метилированной ДНК (MeDIP, methylated DNA immunoprecipitation); выделение метилированных CpG-островков с использованием белков MBD2 (MIRA, methylated CpG island recovery assay); шарики, эмульсия, амплификация и магниты (Methyl-BEAMing, beads, emulsion, amplification and magnetics); матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, времяпролётная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization, time-f-flight mass spectrometry); количественный анализ метилирования малых (следовых) количеств ДНК после полногеномной амплификации (qMAMBA, quantitative methylation analysis of minute DNA amounts after whole bisulfiteome amplification); анализ метилирования

ДНК с использованием микрочипов (до 56 фрагментов в каждом образце) (MethDet56, microarray-mediated methylation analysis of 56 fragments in each sample); массовое параллельное секвенирование (МПС); секвенирование ДНК, основанное на наблюдении за работой единичной молекулы ДНК-полимеразы (SMRT, single molecule real-time sequencing); одномолекулярное секвенирование (tSMS, true single molecule sequencing).

Все перечисленные выше подходы для изучения статуса метилирования вДНК можно разделить на три группы:

- I. ферментативные, использующие в своей основе различные эндонуклеазы рестрикции, «чувствительные» к метилированной форме цитозина в участке узнавания;
- II. химические, использующие в своей основе модификации неметилированных и метилированных цитозинов;
- III. смешанные, использующие в своей основе комбинацию подходов, описанных в пунктах I и II.

Вначале рассмотрим подходы, используемые для исследования статуса метилирования именно выбранных локусов вДНК.

1.3.4.1. Поиск метилированных цитозинов в составе вДНК без использования метилчувствительных эндонуклеаз рестрикции

Ещё в 1992 году М. Frommer с соавторами разработали метод исследования статуса метилирования цитозинов, в основе которого лежит их модификация бисульфитом [455]. Этот метод считается «золотым стандартом» и используется многими исследователями по сей день: образец вДНК обрабатывают бисульфитом натрия, что приводит к сульфонированию только тех цитозинов, которые не имеют в своей структуре метильной группы; далее дезаминирование цитозинов с последующей конверсией в урацилы выполняют в щелочных условиях (реакция десульфонирования).

Использование метода бисульфитной конверсии имеет как свои преимущества в виде высокой чувствительности (начиная с 2 пг ДНК [52]), точности (благодаря возможности одновременного анализа цепей, изначально комплементарных друг другу), возможности исследования отдельных молекул вДНК и одно из самых важных – это возможность детектировать метилированную форму цитозина в присутствии 97-99% неметелированной формы цитозина, так и недостатки, основными из которых являются частичная деградация ДНК [330], возможная неполная денатурация ДНК при наличии «сложной» вторичной структуры или в районах протяженных повторов с последующей неполной модификацией цитозинов.

На сегодняшний день некоторым коммерческим организациям (например, «Zymo Research» (США) и «Qiagen» (Германия)) удалось оптимизировать условия бисульфитной

конверсии для получения на выходе достаточного для последующего анализа количества ДНК-мишени [456].

Таким образом, в результате конверсии с последующей амплификацией выбранного локуса все неметилированные цитозины будут определены, как тимины, а метилированные – как цитозины [457, 458].

Далее с использованием специальных комплементарных праймеров (в зависимости от решаемых задач праймеры могут не содержать в своём составе CpG-динуклеотидов) амплифицируют или достраивают цепи ДНК (или одну цепь, поскольку после бисульфитной конверсии цепи ДНК перестают быть комплементарными друг другу). При необходимости увеличения количества вДНК можно воспользоваться предварительной полногеномной амплификацией, например, как это описано в методе qMAMBA [51], позволяющем анализировать вДНК от 100 пкг.

Далее проанализировать полученные продукты ПЦР можно с использованием различных методик: пиросеквенирование (однако при этом теряется часть информации, связанная с профилем метилирования индивидуальных молекул ДНК) [318, 456], секвенирование [458], МПС [459] или клонирование в векторе с последующим секвенированием вставки [460].

Примером использования бисульфитного секвенирования может служить работа, посвященная оценке aberrантного метилирования индивидуальных цитозинов в составе вДНК крови и мочи при развитии рака предстательной железы, выполненная с использованием праймеров, не содержащих в своей структуре CpG-динуклеотидов [458]. Авторам удалось выполнить секвенирование по Сэнгеру, имея на старте вДНК, полученную из 1 мл плазмы крови или 10 мл бесклеточного супернатанта мочи. Несомненным плюсом использования такой методологии является возможность исследования протяженных последовательностей, а минусом – отсутствие возможности выполнить количественную оценку.

Ещё одним способом увеличения чувствительности, например, при анализе метилирования вДНК после бисульфитной конверсии методом пиросеквенирования, является двухэтапная ПЦР (nested PCR) с праймерами, не содержащими в своей структуре CpG-динуклеотиды [456].

За последние десятилетия было разработано несколько вариантов ПЦР, позволяющих изучать aberrантное метилирование вДНК после бисульфитной конверсии: ПЦР, специфичная к метилированию (MSP), использующая в работе пары праймеров, комплементарные исключительно к метилированной либо к неметилированной форме вДНК; ПЦР с одновременным использованием эндонуклеаз рестрикции (COBRA) [461–464]; количественная SybrGreen I или TaqMan ПЦР, использующая так же, как и MSP праймеры/зонды комплементарные только к метилированной или неметилированной форме ДНК [465].

Потенциально метилированную форму внДНК в присутствии 99,9% неметилированной формы можно обнаружить методом Methyl-BEAMing ПЦР в сочетании с проточной цитометрией [54]. Отличие метода от описанных выше заключается в первоначальном гидролизе ДНК нуклеазами и только затем обработкой её бисульфитом с последующей амплификацией получившихся индивидуальных молекул внутри наночастиц воды, суспендированных в непрерывной масляной фазе. Благодаря тому, что в пределах своей наночастицы воды нарабатываются тысячи идентичных копий одной ДНК-матрицы, можно сравнить этот процесс с клонированием отдельных молекул ДНК в плазмидный вектор. Далее оценивают статус метилирования индивидуально для каждой молекулы ДНК с помощью гибридизации полученных ПЦР-продуктов с флуоресцентными зондами, являющимися специфичными для одной из форм ДНК (метилированной или неметилированной).

Существуют и другие варианты ПЦР (MethyLight ПЦР [466, 467], HeavyMethyl ПЦР [468]) при которых с помощью специфических к метилированной или неметилированной форме ДНК зондов с разными флуорофорами или олигонуклеотидных блокаторов возможна детекция метилированной внДНК при 10000-кратном избытке неметилированной ДНК. К сожалению, при использовании как этих видов ПЦР, так и некоторых других, невозможно выяснить статус метилирования каждого конкретного цитозина в анализируемом локусе внДНК.

Решить эту проблему возможно комбинацией таких методов как HeavyMethyl ПЦР и Ms-SNuPE [469], причём при использовании низких количеств внДНК на старте (от 14 пг) в присутствии 2000-кратного избытка неметилированной формы ДНК. При такой комбинации после бисульфитной конверсии и ПЦР с использованием специфичных к конвертированной ДНК праймеров [470], полученные ПЦР-продукты инкубируют с [^{32} P]dCTP, [^{32} P]dTTP или флуоресцентно меченными dCTP/dTTP и такими Ms-SNuPE праймером(ами), последовательность которых заканчивается перед исследуемым цитозином. Использование ddCTP/ddTTP или α -S-ddCTP/ α -S-ddTTP вместо dCTP/dTTP позволяет оценивать включение нуклеотида при помощи MALDI-TOF MS или HPLC хроматографии [471–473].

Таким образом, несомненным плюсом в использовании бисульфитной конверсии является возможность изучения метилированной внДНК в большом избытке неметилированной формы.

1.3.4.2. Поиск aberrантно-метилированных цитозинов внДНК при помощи метилчувствительных эндонуклеаз рестрикции

Исследование статуса метилирования цитозинов может быть выполнено и с использованием подхода, абсолютно отличающегося от описанного выше, а именно при помощи рестриктаз чувствительных/не чувствительных к присутствию метильной группы в

пятом положении цитозина. Некоторые примеры таких эндонуклеаз рестрикции приведены в таблице 1.5. Использование этих ферментов возможно как парами, например HpaII и MspI, SmaI и XmaI, HpaII и HinfII [474–476], так и индивидуально, например Tsp509I [477], Bsh1236I (BstUI) [478]. Однако при работе с эндонуклеазами рестрикции необходимо принимать во внимание требующуюся для фермента «глубину» метилирования исследуемой последовательности, например, для работы BlnI и MteI (таблица 1.5.) необходимо наличие не менее двух, а для PkrI не менее трёх m^5C на обе цепи в изучаемом локусе вДНК [479, 480]. Более того, активность, эндонуклеазы MteI возрастает при увеличении в сайте узнавания числа метилированных цитозинов [479].

Специфичность гидролиза ферментов (таблица 1.5.) может достигать 99,8%, даже при содержании в образце 70-100% метилированной формы вДНК, при этом минимально необходимое количество вДНК для исследования составляет фемтограммы [50].

Анализ негидролизированных молекул ДНК можно выполнить, например, с использованием практически любого из вариантов количественной ПЦР [50, 477, 481] при условии расположения сайта гидролиза между прямым и обратным праймерами. Метод BLM-PCR [482], основанный на предварительном лигировании адаптеров к вДНК с дальнейшей ПЦР, где один из праймеров идентичен адаптору, также позволяет проанализировать результаты гидролиза вДНК метилчувствительными эндонуклеазами.

Повысить точность и специфичность выявления m^5C в составе CG-динуклеотидов при значительном избытке неметилированной формы цитозина можно с использованием комбинации описанных методов, а именно добавить в смесь для ПЦР анализа вДНК после бисульфитной конверсии термостабильную эндонуклеазу рестрикции Tsp509I, практически нечувствительную к составу буферных растворов и гидролизующую ДНК по сайтам ААТТ (т.е. исходно неметилированную форму вДНК при наличии последовательности ААТСГ) [477].

К недостаткам использования описанной методологии относятся, во-первых, трудности с выявлением единичных молекул в исследуемом образце, что является необходимым условием для использования в современной клинической онкодиагностике. Примером такой необходимости могут служить тесты на рак кишечника «Epi proColon test» и на рак легкого «Epi proLung test», доступные на европейском рынке и направленные на поиск метилированной формы генов *Septin 9* и *SHOX2* («Epigenomics», Германия), соответственно, в пуле вДНК плазмы крови. Во-вторых, невозможность анализа статуса метилирования цитозинов вне сайта узнавания эндонуклеазы рестрикции.

Таблица 1.5. Метилчувствительные эндонуклеазы рестрикции

Фермент	Сайт узнавания
Aat II	GACGT↓C
Acc II	CG↓CG
Aor13H I	T↓CCGGA
Aor51H I	AGC↓GCT
Aox I	↓PuG(m ⁵ C)Py
BisI	G(m ⁵ C)↓NGC
BlsI	G(m ⁵ C)N↓GC (m ⁵ C)G↑N(m ⁵ C)G
Bsh 1236 I	CG↓CG
BspT104 I	TT↓CGAA
BssH II	G↓CGCGC
Cfr10 I	R↓CCGGY
Cla I	AT↓CGAT
Cpo I	CG↓GWCCG
Eco52 I	C↓GGCCG
GlaI	Pu(m ⁵ C)↑GPy
GluI	G(m ⁵ C)↓NG(m ⁵ C)
Hae II	RGCGC↓Y
Hap II	C↓CGG
Hha I	GCG↓C
HpyCh4IV	A↓CGT
Kro I	G↓C(m ⁵ C)GGC
Mte I	G(m ⁵ C)G(m ⁵ C)↑NG(m ⁵ C)G(m ⁵ C)
Mlu I	A↓CGCGT
Nae I	GCC↓GGC
Not I	GC↓GGCCGC
Nru I	TCG↓CGA
Nsb I	TGC↓GCA
Pcs I	(m ⁵ C)GNNNNN↑NN(m ⁵ C)G
Pkr I	GCN↑GC
PmaC I	CAC↓GTG
Psp1406 I	AA↓CGTT
Pvu I	CGAT↓CG
Sac II	CCGC↓GG
Sal I	G↓TCGAC
Sma I	CCC↓GGG
SnaB I	TAC↓GTA

Однако оба описанных выше подхода имеют перспективу применения при исследовании уже изученных локусов с присутствием сайтов узнавания ферментов и известным профилем метилирования.

Кроме того, при использовании масштабных методов исследования, описанных ниже, эндонуклеазы рестрикции подходят как нельзя лучше.

1.3.4.3. Методы масштабного исследования метилирования геномов

В отличие от масспектрометрии и ПЦР в режиме реального времени, технологии масштабных исследований позволяют проанализировать одновременно в одном образце несколько аберрантных изменений метилирования цитозинов в составе вДНК, что особенно важно для персонализированной медицины. Методы масштабного исследования метилирования геномов можно разделить на два основных типа – МПС и микрочиповые технологии (microarray).

Использование технологий микрочипов (microarray).

К основным преимуществам технологий микрочипов, вне зависимости от подхода к их изготовлению (иммобилизация на подложке заранее синтезированных олигонуклеотидов химическим путем или синтез ДНК заданной последовательности непосредственно на матрице [483]), относятся их высокая воспроизводимость и точность, а также возможность мультиплексирования. Анализ метилирования ДНК (и геномной, и внеклеточной) при помощи микрочипов включает пробоподготовку с использованием как одного, так и комбинации методов, а именно: гидролиза, очистки с использованием аффинной хроматографии и бисульфитной конверсии с последующим связыванием полученных фрагментов с комплементарным олигонуклеотидом, расположенным в строго определенном участке микрочипа [484]. В зависимости от объекта исследования подходящая платформа может быть различной. Например, достичь оптимальных результатов при использовании ДНК-микрочипов NimbleGen («Roche») удастся при анализе ДНК размером не менее 200 н и в количестве от 250 до 1000 нг/мкл [485]. Наилучшее соотношение показателей специфичности, чувствительности и шума может быть достигнуто при использовании микрочипов с более длинными зондами (60-членные Agilent и NimbleGen в сравнении с 25-членными Affymetrix) [483]. Необходимо отметить, что описанные платформы работают с ДНК, обогащённой аффинными методами и/или обработкой матрицы рестриктазами.

Для изучения метилирования множества CpG-позиций в составе вДНК с разрешением в один CpG-динуклеотид можно воспользоваться платформами, разработанными фирмой Illumina (США) [53] и использующими в качестве субстрата ДНК, модифицированную бисульфитом (от 200 нг ДНК на старте [484]). Благодаря платформе Illumina Sentrix Array Matrix bead array platform возможно проанализировать 1536 локусов в 96 образцах [483]. Однако остается

сложным применение этого подхода в крупномасштабных исследованиях в связи с необходимостью разработки большого числа селективных праймеров.

Тем не менее, необходимо отметить, что наиболее распространенным подходом к исследованию метилирования вДНК на основе микрочипов остаются платформы фирмы Illumina, отлично приспособленные для сравнительного анализа статуса метилирования уже изученных локусов на крупных выборках образцов и обеспечивающие чувствительность и специфичность анализа вДНК, выделенной из 300 мкл сыворотки крови более 90% [459].

Несмотря на мнение многих исследователей о том, что технологии масштабных исследований с использованием микрочипов являются более простыми, включая обработку полученных результатов, и доступными по сравнению с МПС, их низкое разрешение, невозможность анализа профиля метилирования цитозинов в каждой конкретной молекуле, ограниченность анализа только участками генома с заранее известными последовательностями, являются основными недостатками использования микрочипов не зависимо от фирмы производителя.

Использование технологий массового параллельного секвенирования

Исторически первой технологией МПС для анализа метилирования отдельных цитозинов в составе вДНК на рынке появилась 454 LifeSciences/Roche [318]. Метод был основан на пиросеквенировании ПЦР-продуктов, полученных с использованием праймеров, содержащих баркоды на 5'-конце и матрицы (не менее 100 нг), предварительно модифицированной бисульфитом. Использование технологии 5-ти буквенных баркодов с последующим эквимольным смешиванием ПЦР-продуктов от разных пациентов позволяло получать индивидуальную информацию о каждом из них всего за один раунд секвенирования.

Наиболее распространенной является технология Illumina, позволяющая с точностью более 99,9% проанализировать миллион одноцепочечных фрагментов ДНК, вне зависимости от того, модифицирована ли ДНК бисульфитом, с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов, которые встраиваются в комплементарную цепь (один цикл секвенирования = встройке одного нуклеотида) [486].

В технологии SOLiD 4 Analyzer ("Applied Biosystems") используется лигазная цепная реакция с дальнейшим секвенированием молекул ДНК на магнитных частицах, позволяющая выполнять анализ до 96 образцов одновременно с точностью прочтения до 99,94% и производительностью за один раунд более 100 млрд. п.н. [486, 487]. Столь высокая точность достигается возможностью зачитывания каждого нуклеотида дважды, однако система секвенирования идентифицирует палиндромные последовательности как разные случайные [486].

Следует отметить, что при увеличении анализируемых фрагментов ДНК, производительность технологии секвенирования снижается. Например, с использованием SOLiD можно проанализировать фрагменты размером 75 н, в то время как технологией 454 - последовательности до 800 н. При увеличении производительности секвенирования возникает необходимость более сложного выравнивания, картирования и сборки коротких фрагментов ДНК и, в целом, более сложного биоинформатического анализа [488].

Ошибки секвенирования могут возникать и на этапах амплификации при использовании любых методик МПС, поскольку применяемые ДНК-полимеразы не обладают 100%-ной точностью, в связи с чем, могут вводить различные мутации в клонально-амплифицированные популяции матриц, что в дальнейшем анализе может рассматриваться как вариант последовательности [489].

При выборе метода секвенирования внеклеточной ДНК необходимо учитывать возможную глубину секвенирования (покрытие), являющуюся важным показателем при исследовании небольшого количества внДНК на старте и при незначительном содержании опухолевой ДНК в общем пуле внДНК. Так, например, имея на старте 50 нг внДНК размером 300 п.н. и количеством опухолевой ДНК в 1%, ожидаемое количество aberrантно метилированных молекул одного локуса не превышает 100. Таким образом, покрытие должно быть не менее 15000 для получения корректной информации о статусе метилирования цитозинов в изучаемом локусе.

При необходимости секвенирования длинных молекул ДНК можно воспользоваться более современным методом SMRT (single-molecule real-time, компании Pacific Biosciences (PacBio)), позволяющим отследить работу единичной молекулы ДНК-полимеразы и, соответственно, выполнить исследование отдельных молекул внДНК размером до 13,6 т.п.н. с точностью секвенирования 99,8% [490, 491].

Метод Ion Torrent Sequencing [492], не использующий модифицированные нуклеотиды, а основанный на детекции протонов, образующихся при синтезе цепи ДНК, позволяет обнаружить aberrантное метилирование внДНК (от 30 нг на старте) со средним покрытием 2500 на ген [493, 494], но приспособлен к прочтению лишь коротких последовательностей [486]. Кроме того, к недостаткам метода относится и значительное количество ошибок (однонуклеотидные вставки и делеции) во время секвенирования, хотя обновлённый программный продукт Ion Reporter частично решает эту проблему [486].

Одним из новейших способов секвенирования внеклеточной ДНК, пригодного для оценки aberrантного метилирования цитозинов без применения химических реагентов для их модификации можно рассматривать метод nanopore DNA sequencing (cfNano) [495]. В основе метода лежит оценка электрического тока, изменяющегося в зависимости от нуклеотида,

транспортируемого сквозь пору из α -гемолизина стафилококка. Несмотря на заявленную разработчиками высокую точность метода в 99,8% [496], размер изучаемого локуса должен быть не более 830 п.н. Для оценки статуса метилирования внДНК с использованием cfNano достаточным является 0,2-кратное покрытие генома (2,5 млн выровненных прочтений) [495], однако частота ошибок Nanopore выше, чем у Illumina, да и цена исследования в расчете на одну базу с помощью cfNano выше [495]. Конечно, существует несколько областей, в которых секвенирование метилированных форм внДНК с помощью Nanopore может обеспечить уникальные преимущества по сравнению с другими методами, особенно использующими при пробоподготовке бисульфитную конверсию (в связи с фрагментацией и деградацией внДНК), а именно Nanopore позволяет отличить 5mC от других модификаций, таких как 5hmC, 5fC и 5CaC [495].

Таким образом, информация об aberrантном метилировании цитозинов в составе внДНК может быть получена при помощи различных методов, каждый из которых имеет свои соотношения чувствительности, специфичности, точности, надёжности, трудоёмкости и финансовой затратности. Выбор в пользу конкретного из них должен определяться поставленной задачей, количеством доступного материала на старте и необходимой точностью.

1.4. Заключение по главе «обзор литературы»

В связи с непрекращающимся ростом числа онкологических заболеваний, включая рак предстательной железы, и отсутствием высокоточных методов их диагностики как в России, так и по всему миру, высоким приоритетом остаётся поиск онкомаркеров, в том числе и с возможностью их анализа в клиниках любого уровня оснащённости и персоналом различного уровня квалификации. Жидкостная биопсия, например кровь, являясь «носителем» информации от всех органов и тканей, может по праву считаться одним из самых перспективных источников разнообразных потенциальных диагностических маркеров, причём не только онкологических заболеваний. Простота получения биоматериала (крови и мочи) с анализом в конечной точке с помощью экономичных методов ПЦР/ОТ-ПЦР таких стабильных и доступных биомаркеров, как внеклеточные нуклеиновые кислоты, способствует охвату больших групп населения, но всё же этот подход ещё недостаточно реализован в современной клинической практике. Причиной могут служить ряд технических трудностей, основанных на отсутствии стандартов на преаналитических и аналитических этапах исследований не только размеров выборки, но и источника (например, в составе внеклеточных везикул), методов выделения и анализа нуклеиновых кислот, включая вн-микроРНК.

Именно поэтому на первый план при создании различных диагностикумов до сих пор должны выходить работы по повышению эффективности и воспроизводимости методов получения вННК из различных источников, увеличению точности используемых аналитических систем, стандартизации стадий контроля качества и способов нормализации данных для минимизации изменчивости получаемых результатов.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы

В исследовании использовались такие материалы, как: LiClO_4 , MgCl_2 , NaCl , KCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, трис(гидроксиметил)аминометан (трис), гуанидин изотиоцианат, Tween-20, соляная кислота, агароза для электрофореза, легкоплавкая агароза для электрофореза, полиакриламид, бисакриламид, SDS, TBS, бромистый этидий, трипановый синий, спермидин, ЭДТА, ацетат натрия, полиэтиленгликоль 6000, полиэтиленгликоль 20000, октановая кислота, дитиотреитол, NaIO_4 , NaF , PMSF, Na_2MoO_4 , триэтиламин, 2-меркаптоэтанол, Hoechst 33258, хлороформ, фенол (Sigma, США); натрий лимоннокислый, железо сернокислое, бромфеноловый синий, нитрат серебра, ЭДТА, персульфат аммония (Fluka, Швейцария); декстран синий 2000 кДа (Ferrak Berlin, Германия); PBS (ICN, США); гликоген (20 мг/мл, Fermentas, Вильнюс, Литва); среда для разделения лимфоцитов, SYBR Green I, PicoGreen (Molecular Probes, США); раствор для элюции РНК (БиоСилика, Россия); буфер для ПЦР, для обратной транскрипции, нуклеотид трифосфаты (dNTP) (BiolabMix, Россия); EZ DNA Methylation-Gold™ (Zymo Research, Ирвин, Калифорния, США), мышинные моноклональные анти-CD63, CD24 и CD9-антитела (Abcam), NanoOrange Protein Quantitation Kit (Invitrogen, США), набор DNA 500 на Shimadzu MCE-202 MultiNA (Shimadzu Corporation, Киото, Япония), GenJet Kit (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), ДНК NEBNext Ultra (New England BioLabs, Массачусетс, США); miRCURY LNA miRNA qPCR panel (Exiqon, Danmark); реактивы для пиросеквенирования PyroGold reagent kit (Biotage AB, США); этанол, изопропанол, ацетон.

Ферменты: ДНКаза I (без РНКазной активности), РНКаза А (без ДНКазной активности) (Fermentas, Литва), Т4 ДНК полимераза, Т4 ДНК лигаза, метилаза SssI (New England Biolabs, Pickering, Канада), ингибитор РНКазы RiboLock (Fermentas, Вильнюс, Литва), Т4 полинуклеотид киназа, БиоМастер HS-qPCR (2×) (BioLabMix, Россия), Hotstar Taq полимераза (Qiagen, Хильден, Германия); обратная транскриптаза вируса лейкоза мышей была любезно предоставлена д.б.н. Ходыревой С.Н. (Лаборатория биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия).

Реактивы без указания страны производства являются отечественными с квалификацией осч или хч.

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$ с удельной активностью 3×10^3 Ки/мМоль был синтезирован и любезно предоставлен к.б.н. Семеновым Д.В. (лаборатория биотехнологии, ИХБФМ СО РАН).

Для приготовления всех буферных растворов использовали деионизованную апиrogenную воду, полученную на установке Arium 611 VF (Sartorius Stedim Biotech, Германия), при необходимости (для выполнения ПЦР, секвенирования и т.д.) воду дополнительно автоклавируют.

2.1.2. Оборудование

В работе было использовано следующее оборудование: рН-метр Sartorius PB-11, установка для очистки воды Arium 611 VF (Sartorius stedim biotech, Германия); центрифуга с охлаждением Eppendorf 5810R, центрифуги «Pico-Heraeus» и «K26-MLW Janetzki» (Германия); «J21-Beckman», «Beckman Coulter Optima TM L-90k» с ротором SW 40Ti (Beckman Coulter, Великобритания); Микроспин FV-2400 (Биосан, Латвия); шейкер «vortex-genie2» (Scientific Industries, США); встряхиватель «Titramax 1000» (Heidolph, Италия); амплификатор T-professional basic gradient (Biometra, Германия); видеосистема «DNA Analyzer», источник питания «Эльф-4» (ДНК-технология, Россия); спектрофотометр «Genesys 10 UV» (Thermo Scientific, США); микротермостат М-208 (Бис-Н, Россия); система детекции (Molecular Imager® FX, BioRad, США); трансэлюминатор (Vilber Lourmat, Франция); флуориметр VersaFluor™ (BioRad, Hercules, CA, США); ПЦР амплификаторы iCycler iQ5 (BioRad, США) и LightCycler480 II (Roche, Швейцария); качалка «Titramax 1000» (Heidolph, США); Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, США); просвечивающий электронный микроскоп JEM1400 (Jeol, Япония); цифровая камера Veleta (Olympus SIS, Германия); прибор для капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Калифорния, США); термоциклер Veriti (Applied Biosystems, Уолтем, Массачусетс, США); термоциклер TProfessional Basic Thermocycler (Biometra, Гёттинген, Германия); флуориметр Qubit (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США); счетчик β -частиц Tri-Carb 2800 TR (PerkinElmer, Иллинойс, США), пиротеквенатор PSQ 96MA (Biotage AB, США).

2.1.3. Условия ПЦР и ПЦР-системы, использованные в работе

Для выполнения петлевой ОТ-ПЦР в режиме реального времени использовали олигонуклеотиды, указанные в таблице 2.1. Объем каждой реакции обратной транскрипции составил 20 мкл. Состав реакции: 5 мкл микроРНК-матрицы, по 250 мкМ каждого dNTP, 50 нМ каждого праймера, 1 ед. ингибитора RiboLock RNase, 100 ед. обратной транскриптазы MMLV, 4 мкл реакционного буфера 5×MMLV (250 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 250 мМ КСl, 20 мМ MgCl₂, 50 мМ DTT). Условия реакции: 16°C – 30 мин, 42°C – 30 мин, 70°C – 10 мин. В качестве

отрицательного контроля использовали те же смеси, не содержащие РНК-матрицы. Выполняли обратную транскрипцию на амплификаторе T-professional basic gradient.

Все ПЦР в режиме реального времени для анализа концентраций микроРНК выполняли в дублях на приборе iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System. Суммарный объем реакции в каждой пробирке составил 30 мкл. Состав реакции: 5 мкл продукта ОТ-реакции, разбавленного водой в 2 раза, 3 мкл 10×ПЦР-буфера (750 мМ Трис-НCl (pH 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween-20, 4 мМ MgCl₂, 250 мкМ каждого dNTP, 1,25 ед. ДНК-полимеразы Taq, 600 нМ прямого праймера, 800 нМ универсального обратного праймера и 300 нМ специфического зонда TaqMan. Условия реакции: 95°C – 3 мин, далее 50 циклов: 95°C – 15 сек и 60°C – 45 сек.

Таблица 2.1. Последовательности праймеров и зондов для анализа уровня микроРНК, используемых для обратной транскрипции и TaqMan ПЦР в режиме реального времени*.

Универсальный обратный праймер 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
hsa-miR-16-5p ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGCCAA-3' Прямой 5'-GCCCCGTAGCAGCACGTAATAT-3' Зонд 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACCGCCAA-(FQ)-3'
hsa-miR-19b-3p ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAGTT-3' Прямой 5'-CGCTGTGCAAATCCATGCAA-3' Зонд 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACTCAGTT-(BHQ)-3'
hsa-miR-21-5p ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACA-3' Прямой 5'-GCCCCGTAGCTTATCAGACTGAT-3' Зонд 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACTCAACA-(FQ)-3'
hsa-miR-22 ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAGTT-3' Прямой 5'-AAGCTGCCAGTTGAAG-3' Зонд 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACACAGTT-(BHQ)-3'
hsa-miR-25-3p ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAGAC-3' Прямой 5'-CCGCCATTGCACTTGTCTCG-3' Зонд 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACTCAGAC-(FQ)-3'
hsa-miR-30e ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTTCCA-3' Прямой 5'-GCCCTGTAAACATCCTTGAC-3' Зонд 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACCTTCCA-(BHQ)-3'
hsa-miR-31-5p ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCTAT-3' Прямой 5'-CAGGCAAGATGCTGGCA-3' Зонд 5'-(FAM)-TCGCACTGGATACGACAGCTAT-(BHQ)-3'

hsa-miR-92a ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAGGC-3' Прямой 5'-CGCTATTGCACTTGTCCCG-3' Зонд 5'-(FAM)-CGCACTGGATACGACACAGGC-(BHQ)-3'
hsa-miR-125b-5p ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCACAA-3' Прямой 5'-CGTCCCTGAGACCCTAACTT-3' Зонд 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACTCACAA-(BHQ)-3'
hsa-miR-126-3p ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCATTA-3' Прямой 5'-CCGCTCGTACCGTGAGTAAT-3' Зонд 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACGCATTA-(FQ)-3'
hsa-miR-200b-3p ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCATCA-3' Прямой 5'-GTAATACTGCCTGGTAATG-3' Зонд 5'-(FAM)-CGCACTGGATACGACTCATCA-(BHQ)-3'
hsa-miR-205-5p ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGACT-3' Прямой 5'-CCTCCTTCATTCCACCGGA-3' Зонд 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACCAGACT-(BHQ)-3'
hsa-miR-375 ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCACGC-3' Прямой 5'-GCCCTTTGTTTCGTTCCGGCTC-3' Зонд 5'-(FAM)-TCGCACTGGATACGACTCACGC-(BHQ)-3'
hsa-miR-378a-3p ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCCTTC-3' Прямой 5'-GACTGGACTTGGAGTCA-3' Зонд 5'-(FAM)-CGCACTGGATACGACAAAGTC-(BHQ)-3'
hsa-miR-425-5p (miR-425) ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACG-3' Прямой 5'-ТААТGACACGATCACTCC-3' Зонд 5'-(FAM)-CGCACTGGATACGACTCAACG-(BHQ)-3'
hsa-miR-660-5p ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAACTC-3' Прямой 5'-CCCATTGCATATCGGAG-3' Зонд 5'-(FAM)-GCACTGGATACGACCAACTC-(BHQ)-3'
cel-miR-39-3p ОТ 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAAGCT-3' Прямой 5'-АТТCACCGGGTGTAAATC-3' Зонд 5'-(FAM)-CACTGGATACGACCAAGCTGA-(BHQ)-3'

Количественная оценка уровня метилирования в образцах внДНК и генДНК клеточных линий HeLa и HUVEC была выполнена при помощи SYBR Green I MS-qPCR в режиме реального времени на приборе BioRad IQ5 Real-Time PCR Detection System. Для этого

использовали смесь, содержащую однократный ПЦР-буфер (3мМ MgCl₂, 16мМ (NH₄)₂SO₄, 65 мМ Трис-НCl, рН 8,8, 0,05% Tween-20); dNTP (0,25 мМ каждый); олигонуклеотидные праймеры, специфичные к метилированной или независимой от метилирования последовательностям области гена RARbeta2 (0,3 мМ прямой и обратный) (таблица 2.2.); 1 ед.ак. Taq I ДНК-полимеразы; 5 мкл конвертированной ДНК образца в конечном объеме 30 мкл. ПЦР выполняли на приборе ICycler iQ.

В качестве отрицательного контроля была использована вода и неметилированные ПЦР-продукты гена RARbeta2 (194 п.н.), в качестве положительного контроля - метилированные ПЦР-продукты гена RARbeta2 (194 п.н.) (таблица 2.2.), конвертированные при помощи EZ DNA Methylation Kit. Калибровкой для каждой постановки служили ПЦР-продукты соответствующего фрагмента (таблица 2.2.), предварительно наработанные и очищенные электрофорезом с последующей электроэлюцией. Концентрации стандартов определяли спектрофотометрически.

Для оценки уровня метилирования отдельных CpG-сайтов методом пиросеквенирования были получены биотинилированные матрицы ДНК с использованием двух раундов амплификации. В первом раунде в качестве матрицы использовали 5 мкл ДНК образца. Реакционная смесь содержала однократный ПЦР буфер (2 мМ MgCl₂, 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 65 мМ Трис-НCl, рН=8,8, 0,05% Tween); dNTP (0,25 мМ каждый); по 0,3 мМ прямого и обратного олигонуклеотидного праймера, специфичного к независимой от метилирования последовательности более длинной области гена RARbeta2 (X56849.1, 931-1117) (таблица 2.3.); 1 ед.ак. Taq I ДНК-полимеразы в конечном объеме 30 мкл.

Таблица 2.2. Последовательности праймеров для оценки уровня метилирования фрагмента гена RARbeta2 используемые для постановки реакций количественной MS-qPCR

Форма гена RARbeta2	Последовательность праймера (5'-3')	Размер продукта, п.н.	Условия ПЦР
Независимая от метилирования (X56849.1, 931-1117)	Прямой: TTGTTTGAGGATTGGGATG Обратный: TACCATTTTCCAAACTTACTC	186	95°C – 3мин, (95°C – 25сек, 55°C – 5сек, 72°C – 30сек) x40
Метилированная форма (X56849.1, 938-1098)	Прямой: AGGATTGGGATGTCGAGAACGC Обратный: CTCGACCAATCCAACCGAAACG	161	95°C – 3мин, (95°C – 25сек, 65°C – 5сек, 72°C – 30сек) x40
(X56849.1, 924-1117)	Прямой: ATGCGAGCTGTTTGAGGACT Обратный: TTACCATTTTCCAGGCTTGC	194	

Таблица 2.3. Последовательности праймеров для оценки уровня метилирования индивидуальных CpG в составе фрагмента гена *RARbeta2*, используемые для постановки реакций пиросеквенирования

Назначение праймера	Последовательность праймера (5'-3')	Размер продукта, п.н.	Условия ПЦР
RARbeta2, внешние (X56849.1, 858 -1128)	Прямой: GGAAGTGAGTTGTTTAGAGGTT Обратный: CAAATAATCATTTACCATTTTCCA	269	95°C – 3мин, (95°C – 25сек, 55°C – 20сек, 72°C – 25сек) x40
RARbeta2, внутренние (X56849.1, 931-1116)	Прямой: TTGTTTGAGGATTGGGATGT Обратный: biotin- TACCATTTTCCAAACTTACTC	186	95°C – 3мин, (95°C – 25сек, 55°C – 20сек, 72°C – 25сек) x25
Секвенирующий 1	seq1: TTGTTTGAGGATTGGGATGT		
Секвенирующий 2	seq2: AGGAGAATTTGGGATTTTTTTGGGA		

Перед вторым раундом концентрацию амплификационных смесей оценивали при помощи флуоресцентного красителя Hoescht 33258 в буфере, содержащем 10 мМ трис-HCl, pH 7,0, 1 мМ ЭДТА, 0,2 М NaCl на приборе VersaFluor™ при длине волны возбуждения 360 нм и испускания 460 нм. В следующем раунде амплификации использовали по 1 мкл реакционных смесей, полученных в первом раунде ПЦР, выровненных по концентрации. ПЦР смесь содержала те же компоненты в конечном объеме 30 мкл, как и в первом раунде амплификации, за исключением праймеров, которые в этом раунде использовались в виде специфичных к независимой от метилирования последовательности короткой области гена *RARbeta2* (0,3 мкМ прямой и обратный - биотинилированный на 5' конце). Условия ПЦР описаны в Таблице 2.3.

Полученные после второго раунда амплификации ПЦР-продукты были гибридизованы с секвенирующими праймерами по протоколу, рекомендованному производителем и подготовлены для пиросеквенирования на приборе PSQ 96MA с использованием PyroGold SQA reagent kit. Полученные результаты были проанализированы с использованием компьютерной программы Q-CpG software (V 1.0.9. Pyrosequencing AB, США).

TaqMan ПЦР в режиме реального времени, нацеленный на *LINE 1* элементы, была выполнена в дублях на приборе iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System. Общий объем ПЦР смеси составлял 30 мкл (из них 5 мкл ДНК-матрицы и 15 мкл 2×QuantiTect Kit). Условия реакции описаны в таблице 2.4.

Таблица 2.4. Олигонуклеотиды* и условия ПЦР используемые в работе при анализе статуса метилирования цитозинов в составе циркулирующей ДНК крови.

Название	Последовательность (без штрих-кода)	Концентрация праймера/пробы, нМ	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Размер ПЦР-продукта со штрих-кодами, п.н.	Количество СГ	Состав буфера (1х)	Условия ПЦР
LINE1-For LINE1-Rev LINE1-Probe	5'-AATGGAAG ATGAAATGAA TGAAATGA-3' 5'-TTCCATTCT CCCCATCACTT TCA-3' 5'-FAM-GAGAA GGGAAGTTTA GAGAAAAAAG AAT-FQ-3'	600/ 300	-	155	-	BioMaster qPCR Mix (Biolabmix)	95°C – 3мин, (95°C – 15сек, 60°C – 60сек)х40
RNF219-For RNF219-Rev	5'-(Y1-12)GTGA TTGTGGGTAT AGTTATAAAA- 3' 5'-(X1-8)ACTAC CCCCATCTCCC AAAA-3'	600	177	161	17	Hotstart PCR буфер с дополни- тельным MgCl ₂ (конечная концентрация 5 мМ), 1 мМ dNTPs и 0.65 единиц Hotstart Taq полимеразы	95°C – 15мин, (95°C – 60сек, 58°C – 45сек, 72°C – 60сек)х50
KIAA1539-For KIAA1539-Rev	5'-(X1-8)AGGA AGGAGGAGAT AAAGTGAT-3' 5'-(Y1-12)CCCC TCTAACTTAT CATCACA-3'	600	105	89	5		
GSTP1-For GSTP1-Rev	5'-(Y1-12)ATTT GGGAAAGAGG GAAAGGTT-3' 5'-(X1-8)CTCTT CTAAAAAATC C-3'	600	158	142	17		

*Все ПЦР-системы обладают высокой специфичностью, что подтверждается отсутствием «фоновых» сигнала в отрицательном контроле. Все олигонуклеотиды были синтезированы в Лаборатории медицинской химии (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

При оценке статуса локус-специфичного метилирования промоторных областей генов *RNF219* (NC_000013.11, 125-285), *KIAA1539* (chr9: 35103583-35103671) и *GSTP1* (NG_012075.1, 4998-

5139) в составе цирДНК крови у здоровых доноров и пациентов с ДГПЖ и РПЖ методом секвенирования были использованы уникальные штрих-коды (таблица 2.5.).

Таблица 2.5. Информация об уникальных штрих-кодах

Штрих-коды	С прямым или обратным праймером для каждой мишени использовался определённый штрих-код		
	RNF219	KIAA1539	GSTP1
X1: TAGATCGC, X2: CTCTCTAT, X3: TATCCTCT, X4: AGAGTAGA, X5: ACTGCATA, X6: AAGGAGTA, X7: CTAAGCCT, X8: CCTCTCTG	Обратный	Прямой	Обратный
Y1: TCGCCTTA, Y2: CTAGTACG, Y3: TTCTGCCT, Y4: GCTCAGGA, Y5: AGGAGTCC, Y6: CATGCCTA, Y7: GTAGAGAG, Y8: CCTCTCTG, Y9: AGCGTAGC, Y10: CAGCCTCG, Y11: TGCCTCTT, Y12: TCCTCTAC	Прямой	Обратный	Прямой

2.1.4. Клинические характеристики здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями предстательной железы

Для выполнения поставленных задач была собрана коллекция образцов плазмы крови, мочи и внеклеточных везикул этих биологических жидкостей 98 больных РПЖ, 57 больных ДГПЖ, первично поступивших в Областной онкологический диспансер с 2013 по 2017 гг и НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия) с 2018 по 2021 гг, и 133 клинически здорового мужчины (без каких-либо жалоб на заболевания мочеполовой системы и онкологических заболеваний в анамнезе) – донора, полученных из отделения переливания крови НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина г. Новосибирска с 2013 по 2021 гг.

Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288). Все эксперименты с образцами биологических жидкостей были одобрены этическими комитетами ИХБФМ СО РАН, Новосибирского областного онкологического диспансера (№ 15309-01 от 22.12.2008). Письменное информированное согласие было предоставлено всеми участниками.

Для подтверждения гистопатологических особенностей и стадии опухолевого процесса у пациентов с онкологическими заболеваниями простаты применялись различные методы визуализации и выполнялась биопсия предстательной железы. Стадия онкологического процесса была определена в соответствии с Международной классификацией опухолей по системе TNM (ВОЗ, 1990), где Т-первичная опухоль; N-региональные лимфатические узлы;

М-отдаленные метастазы. Ни один из пациентов не проходил лечение до или во время сбора образцов крови, т.е. относился к первичным пациентам.

Клинические показатели доноров описаны в таблицах 2.6-2.9.

Коллекция образцов использовалась для следующих экспериментов:

- 1) для исследования размера и состава внеклеточных везикул мочи (таблица 2.6.);
- 2) для исследования уровня внеклеточных микроРНК в моче с использованием микрочиповых технологий (таблица 2.7.);
- 3) для верификации данных по уровню внеклеточных микроРНК в крови и моче (таблица 2.8.);
- 4) для оценки статуса метилирования цитозинов в составе вДНК крови (таблица 2.9.).

Таблица 2.6. Характеристика группы здоровых доноров и больных РПЖ, образцы которых использовали в экспериментах по изучению размера внеклеточных везикул мочи

	Группы	
	Пациенты с РПЖ, n=20	Здоровые доноры, n=14
Возраст		
Среднее±SEM	72±1,5	59±1,7
Диапазон	63-82	48-73
Общий ПСА, нг/мл	20±3	1,1±0,15
Стадия РПЖ (T ₂₋₃ N _x M _{x,1})		
T ₂	7 (50%)	нет
T ₃	7 (50%)	
N _x	14 (100%)	
M _x	13 (93%)	
M ₁	1 (7%)	
Глисон		
5-6	1 (7%)	нет
6	5 (36%)	
7	8 (57%)	

Таблица 2.7. Характеристика группы здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями предстательной железы, участвующих в исследовании уровня внеклеточных микроРНК в моче с использованием микрочиповых технологий

	Группы		
	Пациенты с РПЖ n=10	Пациенты с ДГПЖ n=10	Здоровые доноры n=10
Возраст			
Среднее±SD	70,5±5,4	68±7,1	57,5±5,5
Диапазон	56-82	53-81	48-66
Общий ПСА, нг/мл	16,3±5,9	11,6±4,9	0,82±0,2
Стадия РПЖ			
T ₂ N _x M _x	5 (50%)	нет	нет
T ₃ N _x M _x	5 (50%)		
Глисон			
6	5 (50%)	нет	нет
7	5 (50%)		

Таблица 2.8. Характеристика группы здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями предстательной железы, участвующих в верификации выбранной панели микроРНК

	Группы		
	Пациенты с РПЖ n=10	Пациенты с ДГПЖ n=8	Здоровые доноры n=11
Возраст			
Среднее±SD	61,9±6,0	72,2±9,7	54,8±3,6
Диапазон	54-71	63-81	50-60
Общий ПСА, нг/мл	8,2±0,9	6,3±2,1	0,9±0,1
Стадия РПЖ			
T ₁ N ₀ M ₀	3 (30%)	нет	нет
T ₂ N ₀ M ₀	7 (70%)		
Глисон			
5	1 (10%)	нет	нет
6	3 (30%)		
7	6 (60%)		

Таблица 2.9. Характеристика группы здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями предстательной железы, участвующих в анализе статуса метилирования внДНК крови.

	Группы		
	Пациенты с РПЖ n=20	Пациенты с ДГПЖ n=17	Здоровые доноры n=18
Возраст			
Среднее±SD	67,6±7,3	66,6±7,5	61,7±6,6
Диапазон	55 - 77	54-79	53-74
Общий ПСА, нг/мл			
Среднее±SD	17,5±12,3	10,7±8,5	1,2±0,7
Диапазон	4,8-48,7	0,6-41,5	0,2-2,3
Стадия РПЖ			
T2bNxMx	7 (35%)	нет	нет
T2cNxMx	6 (30%)		
T3aNxMx	4 (20%)		
T3bNxMx	3 (15%)		
Глисон			
Неизвестен	1 (5%)	нет	нет
4-5	1 (5%)		
5	2 (10%)		
5-6	3 (15%)		
6	7 (35%)		
7	4 (20%)		
8	2 (10%)		

Данные пациентов, образцы биологических жидкостей которых использовались в экспериментах по разработке методов выделения вн-микроРНК и внеклеточных везикул, не представлены.

2.1.5. Клетки, используемые в работе

Клетки цервикальной аденокарциномы человека Hela были получены из American Cell Type collection. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека HUVEC были получены и культивировались, как описано в [497].

Лейкоциты человека были получены из отделения переливания крови НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия).

2.2. Методы

2.2.1. Культивирование клеток линий HeLa и HUVEC.

Клетки линий HeLa и HUVEC культивировали в стандартных условиях [498]. Для изучения статуса метилирования цитозинов в составе CpG-сайтов внДНК клетки HeLa и

HUVES высевали в плотности 10^4 клеток/см². Спустя 16 ч после посева клетки промывали DMEM и культивировали в свежей питательной среде. Через разные промежутки времени собирали питательную среду и клетки с последующим выделением ДНК из полученных фракций (см. п. 2.2.7.12.).

2.2.2. Учёт биологических образцов

При получении биологических образцов вся информация касательно как данных пациентов, включая возраст, пол, диагноз, особенности заболевания, жалобы, полученное лечение, исход и т.д., так и объёмы полученных образцов и их различных фракций, а также примечания (наличие гемолиза в крови, крови в моче и т.д.) вносились в специально разработанную «Базу данных учета биологических образцов и описания клинко-патологических характеристик пациентов с заболеваниями предстательной железы (БД-ЗПЖ)», содержащую суммарно двенадцать таблиц. Одиннадцать таблиц, входящих в БД-ЗПЖ позволяют структурировать и сохранять информацию относительно клинко-патологических показателей больных с онкологическими заболеваниями предстательной железы, полученную из медицинских документов (на протяжении всего времени нахождения пациента под медицинским наблюдением); двенадцатая таблица предназначена для учёта различных образцов крови и мочи (включая образцы биополимеров исследуемых биологических жидкостей), полученных от пациентов (как с новообразованиями ПЖ, так и из групп риска) или здоровых доноров. Использование БД-ЗПЖ позволяет группировать и анализировать все имеющиеся данные о пациентах и выполненных исследованиях, способствуя поиску новых маркеров, ассоциированных с развитием РПЖ.

При необходимости с использованием базы данных выполнялся многофакторный поиск по любому «признаку» или совокупности «признаков» входного формата, а также систематизировался отобранный массив.

2.2.3. Подготовка образцов различных фракций крови и мочи

Общая схема получения образцов супернатантов и внеклеточных везикул крови и мочи указана на рисунке 2.1.

2.2.3.1. Получение супернатантов крови и мочи

Образцы периферической крови собирали в пробирки Vacutainer, содержащие ЭДТА, и фракционировали на плазму и клетки крови в течение 4 часов после забора крови. Для этого, плазму отбирали из образцов крови после двойного центрифугирования при 400g в течение

15 минут и 800g в течение 20 минут. В случае использования образцов плазмы крови для исследования aberrантной экспрессии микроРНК, плазму дополнительно центрифугировали при 17000g в течение 20 мин. Все три центрифугирования выполнялись при температуре +4°C (рис. 2.1.А).

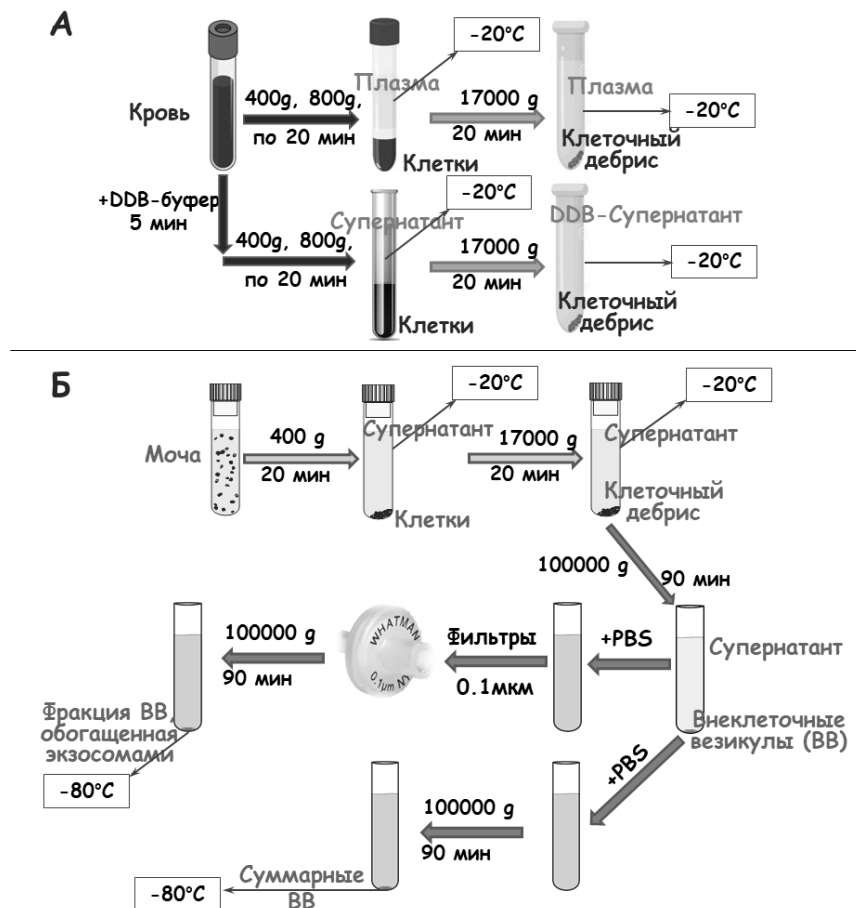


Рисунок 2.1. Схема получения различных фракций супернатантов и внеклеточных везикул крови (А) и мочи (Б).

Далее образцы плазмы аликвотировались и замораживались (кроме $\frac{1}{2}$ объема образца после 17000g, используемой для получения суммарных внеклеточных везикул (см. ниже п. 2.2.3.2.) при -20°C до последующего использования.

Образцы мочи с каждого донора/пациента были собраны в стерильные контейнеры до проведения каких-либо медицинских процедур. Клетки и клеточный дебрис удаляли (рис. 2.1.Б) последовательными центрифугированиями при 400g и 17000g в течение 20 минут при комнатной температуре. Далее $\frac{1}{2}$ объема полученного супернатанта мочи использовалась для получения суммарных внеклеточных везикул (СВВ) мочи, с последующим получением фракции внеклеточных везикул, обогащенной экзосомами (ФОЭ) (см. ниже п. 2.2.3.2.), другая часть супернатанта аликвотировалась и хранилась при -20°C до последующего использования.

2.2.3.2. Получение фракций внеклеточных везикул из крови и мочи

Мочу (5 мл) или плазму крови (500 мкл) доводили до 12 мл фосфатно-солевым буфером (PBS), переносили в 14 мл центрифужную пробирку с открытым верхом Ultra-Clear™ (Beckman Coulter, Brea, CA) и центрифугировали при 100000g в течение 90 минут при 18°C в центрифуге Beckman Coulter Optima™ L-90k с ротором SW 40Ti. К полученному осадку добавляли 20 мл PBS, ресуспендировали, ½ часть использовали для получения фракции суммарных ВВ. Для этого супернатант центрифугировали повторно в тех же условиях (Рис. 2.1.). Полученный осадок ресуспендировали в 500 мкл PBS, замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C.

Вторую часть использовали для получения фракции ФОЭ. Для этого фильтровали суспензию микрочастиц через фильтры с диаметром пор 0,1 мкм (Minisort High-Flow, Sartorius) и повторно осаждали центрифугированием при 100000g, 18°C, 90 мин (Рис. 2.1.). Полученный осадок ресуспендировали в 500 мкл PBS, замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C.

2.2.4. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

ТЭМ была выполнена в группе микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН под руководством проф. д.б.н. Рябчиковой Е.И. Свежие образцы СВВ и ФОЭ (20 мкл), получение которых описано в п.2.2.3.2. и на рисунке 2.1. адсорбировали в течение 1 мин на медных сетках, покрытых формварной пленкой и стабилизированных углем. Затем сетки помещали для негативного контрастирования на каплю 0,5% раствора уранилацетата в дистиллированной воде или 2% раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты (5-10 сек), избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой, сетки высушивали на воздухе. Распределение внеклеточных везикул по размерам оценивали с использованием 36 изображений ТЭМ от трех здоровых доноров и трех пациентов с РПЖ (шесть изображений на пациента, в среднем ~ 39 везикул на изображение и не менее 200 на пациента). Подсчёт производился вручную с шагом 10 нм; например, группа 31-40 нм содержит везикулы размером от 30,1 нм до 40 нм. Для оценки экспрессии поверхностных маркерных белков 10 мкл размороженной суспензии инкубировали в течение 18 ч на орбитальном шейкере Eppan 358S с 10 мкл 0,5% BSA/PBS и 3 мкл мышиных моноклональных анти-CD63, CD24 и CD9-антител (100 мкг/мл). После инкубации везикулы адсорбировали в течение 1 мин на медных сетках, покрытых пленкой формвара и стабилизированных углем. Далее сетки дважды промывали PBS в течение 2 мин и инкубировали с конъюгатом (белок А - коллоидное золото) в течение 2 ч во влажной камере на шейкере при комнатной температуре, после чего снова дважды промывали PBS в течение 2 мин с последующим окрашиванием фосфорновольфрамовой кислотой в течение 10 сек, как описано ранее [499, 500]. Сетки анализировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа

JEM1400 (80 кВ, Jeol, Япония), снабженного цифровой камерой Veleta (Olympus SIS, Германия). Измерения проводили с помощью программы iTEM (Olympus SIS, Германия).

2.2.5. Оценка концентрации белка в препаратах внеклеточных везикул

Концентрацию белка оценивали с помощью набора NanoOrange Protein Quantitation Kit в соответствии с рекомендациями производителя. Препараты СВВ и ФОЭ лизировали в течение 10 мин на льду в буфере для лизиса (125 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 4% SDS, 0,1 М DTT), затем инкубировали при 95°C в течение 10 мин с рабочим раствором реагента NanoOrange. Флуоресценцию измеряли на флуориметре VersaFluor™ при длинах волн возбуждения 480 нм и испускания 580 нм относительно стандартных растворов БСА.

2.2.6. Электрофоретический анализ в денатурирующих условиях по Леммли и Вестерн-блот

Электрофорез был выполнен в 10-20% полиакриламидном геле (соотношение полиакриламидного геля 30:1) в денатурирующих условиях с помощью SDS PAGE, буферов Леммли и 4,5% концентрирующего геля [501]. Вначале образцы инкубировали в буфере (62,5 мМ Трис-НСl (рН 6,8), 10% глицерин, 0,5% SDS и 2,5% β-меркаптоэтанол), содержащим бромфенол синий в течение 5 мин при 95°C, а далее центрифугировали при 17000g в течение 5 мин с последующим нанесением на гель. После этого из геля переносили белки на нитроцеллюлозную мембрану в буфере Вестерн-блот (217 мМ Трис-глицин (рН 8,6) и 9,5% этанол) с последующим окрашиванием мембраны коллоидным серебром [502].

2.2.7. Подготовка образцов нуклеиновых кислот и их анализ

2.2.7.1. Выделение микроРНК из плазмы крови с использованием октановой кислоты

Внеклеточные микроРНК были выделены из супернатанта плазмы крови (после 17000g) и фракции СВВ плазмы. Для этого к необходимому объёму (V) образца последовательно, с тщательным перемешиванием после внесения в раствор каждого компонента, добавляли 0,03 V 100% 2-меркаптоэтанола, 0,67 V 6,75 М GuSCN и 1 V 3,75% раствора октановой кислоты в 2 М растворе ацетата натрия, рН 4,0. Инкубировали 3 минуты при комнатной температуре [503]. Далее в образцы вносили синтетическую cel-miR-39-3p в количестве 5×10^7 копий на выделение для дальнейшего контроля эффективности выделения микроРНК. Затем добавляли 2,67 V 96% этанола, перемешивали и наносили супернатант на микроколонку производства «Биосилика» с использованием вакуумного насоса. Далее в колонку вносили 600 мкл буфера для промывки №1 (0,5 М GuSCN, 10 мМ Трис-ацетат (рН 6,5), 50% этанол), центрифугировали на центрифуге

Biofuge pico heraeus при 13000 об/мин в течение 1 минуты. После этого в колонку вносили 700 мкл буфера для промывки №2 (10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0.1 M NaCl, 75% этанол), центрифугировали при 13000 об/мин в течение 1 минуты. Затем переносили колонку в новую пробирку и вносили в неё 120 мкл буфера для элюции производства «БиоСилика» и инкубировали 5 минут при комнатной температуре с последующим двойным центрифугированием при 2000 об/мин и 13000 об/мин в течение 1 минуты каждое. Для последующего анализа микроРНК концентрировали, как описано в п.2.2.7.7.

2.2.7.2. Выделение микроРНК из плазмы крови с использованием хлороформа (однофазный протокол)

Образцы плазмы крови перед исследованием хранились при -20°C. После процедуры оттаивания для удаления криопреципитата образцы центрифугировали (3000g, 5 мин). Из полученного супернатанта (150 мкл) выделяли микроРНК. Для этого, образец плазмы смешивали с 4,5 мкл 2-меркаптоэтанола и 300 мкл денатурирующего буфера (6 M гуанидина изотиоцианат и 15 mM Трис-ацетат, pH 6,5). Смесь тщательно перемешивали в течение 5 сек и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 1,35 мл раствора этанол/хлороформ (в пропорции 2:1), тщательно перемешивали с последующей инкубацией в течение 5 мин при комнатной температуре. Далее смесь центрифугировали (10000g, 5 мин) и наносили супернатант на колонку со стекловолокнистым сорбентом производства БиоСилика. После этого колонку дважды промывали по 300 мкл буфером для промывки 1 (1 M GuSCN, 2,5 mM Трис-ацетат, 50% этанол, 25% хлороформ и 1% 2-меркаптоэтанол) с последующей сушкой стекловолокнистого сорбента центрифугированием (10000g, 1 мин). Далее дважды промывали колонку по 300 мкл буфером для промывки 2 (0,1 M NaCl, 75% этанол и 10 mM Трис-HCl, pH 7,5) с последующей сушкой стекловолокнистого сорбента центрифугированием (10000g, 1 мин). Колонку переносили в новую пробирку и элюировали РНК со стекловолокнистого сорбента добавлением 120 мкл элюирующего буфера для РНК производства БиоСилика с последующей инкубацией в течение 5 мин при комнатной температуре и последовательным центрифугированием (400g, 1 мин и 10000g, 1 мин). Полученный элюат содержит очищенную микроРНК.

2.2.7.3. Выделение микроРНК из мочи с использованием октановой кислоты

Внеклеточные микроРНК были выделены из супернатанта мочи (после 17000g) и фракций ВВ мочи. Для этого к необходимому объёму (V) образца последовательно, с тщательным перемешиванием после внесения в раствор каждого компонента, добавляли 0,025 V 100% 2-меркаптоэтанола, $\frac{1}{2}$ V 6,75M GuSCN и 1 V 3,75% раствора октановой кислоты в

2М растворе ацетата натрия, pH 4,0. Инкубировали 3 минуты при комнатной температуре [503]. Далее в образцы вносили синтетическую cel-miR-39-3p в количестве 5×10^7 копий на выделение для дальнейшего контроля эффективности выделения микроРНК. Затем добавляли 2,5 V 96% этанола, перемешивали и наносили супернатант на микроколону производства «БиоСилика» с использованием вакуумного насоса. Далее все процедуры выполняли аналогично, как описано в п.2.2.7.1. Сухой осадок тщательно растворяли пипетированием в 30 мкл воды и хранили при -20°C .

2.2.7.4. Выделение микроРНК из мочи с использованием хлороформа (однофазный протокол)

Внеклеточные микроРНК предложенным ниже методом были выделены из супернатантов мочи (после 400g и 17000g) и фракций СВВ и ФОЭ мочи. Для этого, к 1 V образца с тщательным перемешиванием последовательно добавляли 0,03 V 100% 2-меркаптоэтанола и 2 V денатурирующего буфера (6 М GuSCN и 15 мМ трис-ацетат, pH 6,5). Смесь перемешивали в течение 5 с и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 9 V раствора этанол/хлороформ (2 объема этанола и один объем хлороформа), тщательно перемешивали и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Полученный образец центрифугировали при 10000g в течение 5 мин. Далее наносили полученный супернатант на микроколону со стекловолокнистым сорбентом производства «Биосилика» и выполняли выделение микроРНК аналогично ранее описанной процедуре выделения из плазмы крови (см п.2.2.7.2.).

Концентрировали микроРНК, как описано в п.2.2.7.7.

2.2.7.5. Выделение микроРНК из крови и мочи с использованием фенола и хлороформа

Модифицированную кислую экстракцию фенол-хлороформом выполняли, взяв за основу протокол, описанный в [356] и использовали для выделения микроРНК из образцов плазмы крови и супернатанта мочи. Для этого, 1 объём образца последовательно смешивали с равным объёмом денатурирующего буфера (1% 2-меркаптоэтанол и 3 М GuSCN в случае плазмы или 1 М GuSCN в случае мочи) и 0,0375 V 2 М ацетата натрия, pH 4,0. Затем последовательно, с тщательным перемешиванием добавляли 2 V фенола и 0,35 V хлороформа. Смесь центрифугировали при 10000g, 4°C в течение 20 мин. После разделения фаз, водную фазу собирали и повторно проводили экстракцию фенолом. Водную фазу, полученную после второй экстракции, смешивали с равным объёмом 2 М ацетата натрия, pH 4,0, двойным объёмом 96% этанола и очищали на колонках со стекловолокнистым сорбентом производства «Биосилика». Далее колонку промывали 300 мкл буфера для промывки 1 (0,3 М GuSCN, 10 мМ трис-ацетат,

pH 6,5, 50% этанол, 1% 2-меркаптоэтанол) и 300 мкл буфера для промывки 2 (0,1 М NaCl, 75% этанол и 10 мМ трис-HCl, pH 7,5), как описано в п.2.2.7.2. МикроРНК элюировали с колонки 120 мкл элюирующего раствора производства «Биосилика». Концентрировали микроРНК, как описано в п.2.2.7.7.

2.2.7.6. Выделение микроРНК с использованием набора Exiqon miRCURY

Выделение микроРНК из плазмы крови и мочи с использованием набора Exiqon miRCURY (№ 300112) было выполнено в соответствии с рекомендациями производителя. Дополнительный этап осаждения микроРНК был выполнен, как описано в п.2.2.7.7., для получения химически более чистого препарата микроРНК.

2.2.7.7. Осаждение микроРНК

Для получения химически более чистого препарата и концентрирования микроРНК, к полученному образцу (микроРНК в 120 мкл элюирующего буфера производства «Биосилика») добавляли, с тщательным перемешиванием после внесения каждого компонента, 1,5 мкл гликогена (20 мг/мл), 12 мкл 3 М ацетата натрия (pH 7,4) и 130 мкл изопропанола. Смесь инкубировали 30 минут при -20°C, после чего центрифугировали при 13000g, 4°C в течение 15 минут. Супернатант удаляли декантацией, контролируя положение осадка на дне пробирки. К осадку добавляли 300 мкл 70% этанола, центрифугировали в течение 5 минут при 7500g и при 4°C. Супернатант удаляли декантацией, контролируя положение осадка на дне пробирки. В пробирку вносили 300 мкл 96% этанола, центрифугировали при 7500g в течение 5 минут при 4°C. Супернатант удаляли декантацией, контролируя положение осадка. Сушили осадок в течение 20-40 мин при комнатной температуре. Сухой осадок тщательно растворяли пипетированием в 30 мкл воды и хранили при -20°C.

2.2.7.8. Количественный анализ с использованием [³²P]-меченой микроРНК

Радиоактивный изотоп фосфора вводили в синтетический рибоолигонуклеотид hsa-miR-21-5p (5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3', синтезированный в лаборатории Химии РНК ИХБФМ СО РАН), с использованием T4 полинуклеотид киназы [504]. Для этого к 0,2 о.е. рибоолигонуклеотида добавляли 5 ед. T4 полинуклеотид киназы в буфере, содержащем 0,1 мМ спермидин, 5 мМ ДТТ, 50 мМ трис-HCl (pH 7.6), 10 мМ MgCl₂, 0,1 мМ ЭДТА в присутствии 14 мБк [γ -³²P]-АТФ и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Далее добавляли к полученной смеси 5 ед. T4 полинуклеотид киназы и инкубировали при -20°C в течение ночи (10-12 часов).

Полученный радиоактивно-меченый рибоолигонуклеотид микроРНК-21 был очищен с использованием гель-электрофореза (16% полиакриламидный гель (соотношение акриламид:бисакриламид = 30:1) с 8 М мочевиной). Далее при помощи радиоавтографии определяли положение полученного продукта реакции в геле. После этого методом электроэлюции (200 В в течение 1 часа) переносили из геля радиоактивно меченые рибоолигонуклеотиды на ДЕАЕ-целлюлозу с последующей элюцией образца 5-ю сменами 3М LiClO₄ в воде по 20 мкл каждая. Осаждение полученных олигонуклеотидов выполняли 10-кратным избытком двух процентного раствора LiClO₄ в ацетоне (5 мин при 14000g). Далее осадок дважды промывали ацетоном и высушивали в течение одного часа при комнатной температуре. Полученный очищенный рибоолигонуклеотид растворяли в 30 мкл воды и при помощи спектрофотометра определяли его концентрацию.

Смесь радиоактивно меченого и немеченого рибоолигонуклеотидов использовали в дальнейших экспериментах в соотношении 1:9 (хранили полученную смесь на льду и смешивали с исследуемыми образцами перед выделением только после добавления к последним β-меркаптоэтанола и денатурирующего буфера (100 нмоль на 100 мкл образца)). Далее с использованием счета по Черенкову на счетчике β-частиц Tri-Carb 2800 TR измеряли радиоактивность препаратов против контрольных образцов, содержащих равное количество рибоолигонуклеотида, разбавленное в равном объеме соответствующего раствора (буфер для отмывки, буфер для элюции, вода).

2.2.7.9. Количественный анализ внеклеточных микроРНК с использованием TaqMan ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Уровень экспрессии полученных микроРНК оценивали с использованием петлевой количественной TaqMan ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Обратную транскрипцию (ОТ) на матрицах микроРНК выполняли, как описано Chen et al. [399]. Праймеры и зонды дизайнировали самостоятельно. Их нуклеотидные последовательности и условия проведения реакций указаны в п.2.1.3 и таблице 2.1. В качестве отрицательного контроля использовали воду и препараты геномной ДНК.

2.2.7.10. Профилирование внеклеточных микроРНК мочи с использованием микрочиповых технологий

С использованием платформы miRCURY LNA miRNA qPCR во фракциях мочи (СМ после центрифугирования при 17000g и СВВ) был выполнен сравнительный анализ профиля экспрессии микроРНК. Набор микроРНК был скомбинирован из микроРНК стандартной панели

Urine Exosomes Focus Panel (Exiqon Ltd, Дания), предназначенной для анализа микроРНК мочи, и дополнительных микроРНК, выбранных на основании анализа литературных данных об экспрессии микроРНК в тканях предстательной железы и моче при онкологических заболеваниях этого органа (таблица 2.10.). Всего в анализ было включено 84 микроРНК-маркеров и 8 нормализаторов.

Таблица 2.10. Состав панели для определения экспрессии микроРНК

hsa-let-7a-5p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-346
hsa-let-7b-5p	hsa-miR-1285-3p	hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-25-3p	hsa-miR-34a-5p
hsa-let-7c-5p	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-375
hsa-let-7d-3p	hsa-miR-133a-3p	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-378a-3p
hsa-let-7d-5p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-423-5p
hsa-let-7e-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-425-5p
hsa-let-7f-5p	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-429
hsa-let-7g-5p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-205-5p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-451a
hsa-let-7i-5p	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-483-5p
hsa-miR-100-5p	hsa-miR-149-5p	hsa-miR-210-3p	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-484
hsa-miR-101-3p	hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-214-3p	hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-574-3p
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-582-5p
hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-660-5p
hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-31-3p	hsa-miR-92a-3p
hsa-miR-107	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-31-5p	hsa-miR-93-5p
hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-22-5p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-99b-5p
hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-187-3p	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-33a-5p	cel-miR-39-3p

2.2.7.11. Выделение и анализ суммарных ДНК и РНК из биологических жидкостей

Суммарную ДНК и РНК из различных фракций биологических жидкостей выделяли с использованием наборов для выделения ДНК или РНК производства БиоСилика, соответственно, с последующим осаждением нуклеиновых кислот ацетоном и триэтиламином, как описано ранее [381]. Концентрацию ДНК измеряли с использованием флуоресцентного красителя Hoescht 33258 [505] или с помощью мультиплексной TaqMan ПЦР (α -сателлитные элементы и повторы LINE1) [381]. В качестве калибровки использовали геномную ДНК лейкоцитов здорового донора.

Образцы РНК обрабатывали ДНКазой I при 37°C в течение 30 минут, а один образец РНК от пациента с РПЖ дополнительно обрабатывали РНКазой А. Распределение РНК по размеру анализировали с использованием системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer и набора RNA 6000 Pico Kit. МикроРНК из всех фракций выделяли с использованием однофазного протокола, как описано [506]. Концентрации микроРНК (микроРНК-16, -19b, -25, -125b и -205) определяли с помощью петлевой TaqMan ОТ-ПЦР, как

описано в [506]. Праймеры и зонды, а также условия реакций для обратной транскрипции и количественной ПЦР перечислены в главе 2.1.3.

Распределение размеров РНК, выделенных из крови и мочи человека с использованием протокола GuSCN/ОсА (см. п.2.2.7.1. и п.2.2.7.3.), анализировали с помощью капиллярного электрофореза и наборов для анализа малой РНК фирмы Agilent в соответствии с протоколом производителя. Электрофореграммы анализировали с использованием программы Agilent 2100 Expert B.02.07.

2.2.7.12. Выделение внеклеточной и геномной ДНК и оценка их концентраций

Для исследования уровня метилирования цитозинов гена *RARbeta2* в составе внДНК и генДНК клеток линий HeLa и HUVEC, ДНК выделяли с использованием коммерческого набора производства БиоСилика в соответствии с рекомендациями производителя.

Внеклеточную ДНК из 2 мл плазмы крови или 4 мл супернатанта крови для анализа статуса метилирования промоторных областей генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* выделяли в дублях с помощью набора для выделения ДНК из плазмы крови производства БиоСилика в соответствии с рекомендациями производителя и элюировали в 240 мкл воды (без нуклеазной активности). Далее:

1) с использованием флуоресцентного красителя PicoGreen (в соответствии с рекомендациями производителя) определяли концентрацию свободной внДНК в плазме и связанной с поверхностью клеток крови. Флуоресцентный сигнал детектировали на длинах волн 480 нм/520 нм приборе VersaFluor™.

2) полученную внДНК (225 мкл) смешивали с 5 мкл гликогена (20 мг/мл) и 1/10 объемом 50 мМ триэтиламина, затем смесь осаждали 5-ю объемами ацетона [381]. После переосаждения внДНК растворяли в 52 мкл воды. Аликвоту ДНК, полученную на этом этапе (2 мкл), разводили в 6 раз и оценивали её количественно с помощью TaqMan ПЦР в режиме реального времени нацеленной на *LINE 1* элементы (см. п.2.1.3. и таблицу 2.4.). Образцы ДНК замораживали и хранили при температуре -20°C до использования.

Геномная ДНК, полученная из «ядерной» фракции лейкоцитов здорового мужчины, использовалась как контроль для неметирированной ДНК (т.е. соответствовала полностью неметирированной ДНК в локусах исследуемых генов) в качестве стандартов для калибровочных кривых при выполнении TaqMan ПЦР в режиме реального времени. «Ядерную» фракцию получали путём лизиса лейкоцитов буфером, содержащим 50 мМ трис-НCl, 0,6% Nonidet P-40, 0,15 М NaCl, 1 мМ Na₂MoO₄, 1 мМ PMSF, 2 мМ ЭДТА (15 мин, 4°C) с последующим осаждением ядер центрифугированием (10000g, 15 мин).

Выделение геномной ДНК выполняли с помощью сорбции на мелкодисперсное активированное стекло, как описано [507]. Далее, к полученному препарату ДНК, с целью удаления примесей РНК, добавляли 0,5 мкл 10 мг/мл РНКазы А и инкубировали 30 мин при 37°C. После этого повторяли процедуру выделения ДНК. По соотношению оптической плотности A_{260}/A_{280} оценивали степень чистоты полученного препарата ДНК.

2.2.7.13. Подготовка полностью неметилированных и метилированных ПЦР-продуктов

ПЦР-продукты гена *RARbeta2* (194 п.н., (таблица 2.2.)), содержащие в себе фрагменты *RARbeta2*, используемые для MS-qPCR (независимый от метилирования и специфичный для метилированной формы, таблица 2.2.) были наработаны при помощи ПЦР. Реакционная смесь для ПЦР состояла из матричной последовательности (5 мкл геномной ДНК HUVES), 0,3 мМ прямого и обратного праймеров, 1 ед.ак. Taq DNA полимеразы в буфере для ПЦР, содержащим 2 мМ $MgCl_2$) в конечном объёме 30 мкл. Метилированные ПЦР-продукты готовили путем обработки полученных выше ПЦР-продуктов метилазой Mss.I. Затем все полученные ПЦР-продукты гена *RARbeta2* (метилированные и неметилированные) были конвертированы, как описано в п. 2.2.7.14.

2.2.7.14. Бисульфитная конверсия ДНК

Обработку бисульфитом проводили с использованием набора EZ DNA Methylation-Gold™ в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы (50 мкл) полученных вДНК (~10–30 нг), аналогичные количеству геномной ДНК или ПЦР-продуктов фрагмента гена *RARbeta2* (194 п.н.) подвергали бисульфитной конверсии одновременно. Элюировали ДНК в 32 мкл элюирующего буфера. Аликвоту ДНК (2 мкл) использовали для определения её концентрации с помощью TaqMan ПЦР в режиме реального времени на *LINE 1* элементы (кроме работ с использованием ПЦР-продуктов гена *RARbeta2*) (см. п.2.2.7.15.). Типичный выход вДНК после бисульфитной конверсии колебался между 70% и 80%. Оставшиеся 30 мкл образца хранили при температуре -20°C до выполнения дальнейшего анализа.

2.2.7.15. TaqMan ПЦР в режиме реального времени

TaqMan ПЦР в режиме реального времени, нацеленный на *LINE 1* элементы (см. п.2.1.3. и таблицу 2.4.), был разработан для амплификации как исходной, так и обработанной бисульфитом ДНК, для контроля количественных потерь ДНК в результате бисульфитной обработки и с целью дальнейшего её использования в качестве матрицы в локус-специфичной

ПЦР. Геномная ДНК лейкоцитов мужчины до и после бисульфитной конверсии использовалась для получения калибровочных кривых при постановке ПЦР-реакций.

2.2.7.16. Амплификация выбранных локусов

При выполнении локус-специфичной ПЦР трёх генов (*GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* (также известного, как *FAM214B*)) продукты ПЦР, полученные от каждого донора, были индивидуально закодированы парой уникальных индексов по 8 п.н. (таблица 2.5.), разработанных J. Sarogas [508], для избегания ошибок при анализе данных секвенирования. Интересующие локусы амплифицировали с использованием Hotstar Taq полимеразы в соответствии с рекомендациями производителя, внося небольшие изменения. Вкратце, 5 мкл обработанной бисульфитом ДНК амплифицировали в условиях, описанных в (п.2.1.3. и таблице 2.4.).

Для исключения появления химерной ДНК между молекулами, полученными от больных и здоровых доноров, продукты ПЦР были закодированы с использованием восьми 5'-прямых (Xn) и 12 обратных праймеров (Yn) (таблица 2.5.); в результате образцы от трёх исследуемых групп доноров не содержали общих штрих-кодов. Обнаруженные при дальнейшем анализе последовательности с комбинациями праймеров отсутствующих при приготовлении библиотек, считались химерными и исключались из анализа. Реакции проводили с использованием термоциклера Veriti. После амплификации продукты ПЦР хранили при температуре -20°C до использования. В качестве положительного и отрицательного контролей при каждой постановке ПЦР использовали 5 нг геномной ДНК лейкоцитов мужчины после бисульфитной конверсии и образец, не содержащий ДНК-матрицу, соответственно. Количество полученных ПЦР-продуктов определяли с использованием набора DNA 500 на Shimadzu MCE-202 MultiNA. Выход локус-специфичной амплификации с метилнезависимыми праймерами для каждого образца составлял не менее 50 нг ДНК.

2.2.7.17. Подготовка ДНК-библиотек для последующего секвенирования

Для приготовления ДНК-библиотек ПЦР-продукты одного гена и одной исследуемой группы доноров объединяли в эквимольных количествах, рассчитанных с использованием анализа данных ПЦР-продуктов Shimadzu MCE-202. Далее очищали их в 2% агарозном геле с использованием набора GenJet Kit и определяли количество с помощью флуориметра Qubit. Для приготовления библиотек использовали не менее 100 нг смеси ПЦР-продуктов. Библиотеки ДНК готовили с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext Ultra в соответствии с протоколом производителя. Качество полученной библиотеки (концентрацию и размер полученных продуктов) оценивали с помощью высокочувствительного ДНК-чипа Agilent на биоанализаторе Agilent 2100. Библиотеки анализировали с помощью секвенирования

Illumina MiSeq с парными концами 150 + 150 н в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН. Продукты ПЦР с использованием полностью метилированной и полностью неметилированной ДНК использовали в качестве положительного и отрицательного контролей секвенирования, соответственно.

2.2.8. Статистический анализ полученных данных

2.2.8.1. Статистическая обработка данных aberrантной экспрессии микроРНК

Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5 и при помощи языка R (версия 3.3.1) в оболочке Rstudio (версия 1.0.136, пакеты RandomForrest, Boruta, pROC,[403] (The R Project for Statistical Computing. Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 16 December 2018)). Для сравнения групп использовался пакет stats (v.3.3.1). Специфичность и чувствительность аналитических систем характеризовали ROC-кривыми (Receiving Operator Characteristic curves). Значения порогового цикла (Ct) для всех микроРНК, полученные с использованием количественной ОТ-ПЦР, были нормализованы (либо на значения микроРНК-16, либо попарно [335, 412]). При использовании нормализации на основе отношений микроРНК, для каждой пары были рассчитаны пороговые значения разности циклов (dCt) [335, 412]. Для определения разницы между медианными значениями dCt разных исследуемых групп была рассчитана разница значений dCt (ddCt).

Первичную обработку данных, полученных с использованием микрочипов Exiqon, выполняли в Exiqon Services по протоколу производителя. Образцы, значения пороговых циклов которых превышали 37, и те, в которых разница пороговых циклов не превышала 5 между отрицательным контролем и специфичным продуктом, исключали из анализа. С использованием алгоритма NormFinder определяли в образцах стабильность экспрессии микроРНК [509]. Вначале в качестве нормализатора использовали глобальное среднее (усредненный уровень экспрессии всех микроРНК в образцах) [510], а именно усреднённое значение порогового цикла всех микроРНК в образце вычитали из значений порогового цикла для каждой микроРНК (Ct), получая, таким образом, значение разницы пороговых циклов (dCt). Значения разницы разниц пороговых циклов (ddCt) получали для определения разницы между медианными значениями различных групп.

В связи с тем, что часть микроРНК в исследовании с использованием микрочиповых технологий не детектировалась в нескольких образцах, для их учёта использовали следующий подход: вначале для каждой группы случайным образом (выбор без возвращения) выбирали 9 значений для каждой комбинации пар микроРНК; далее оценивали их значимость в качестве предикторов РПЖ, ЗД или ДГПЖ с использованием алгоритма Boruta. Этот шаг выполняли

тысячу раз. Значимые предикторы фиксировали на каждом шаге. После этого, разность медиан отобранных пар микроРНК оценивали между группами и с использованием bootstrap подхода строили 95% доверительный интервал [511]. Если доверительный интервал включал нулевое значение, то такие комбинации исключали из дальнейшего анализа. Для остальных комбинаций микроРНК выполняли сравнение групп с помощью перестановочного теста Манна-Уитни (Asymptotic Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Достоверными считались отличия между группами с $P < 0,05$. Для того чтобы скорректировать уровень статистической значимости при выполнении множественных сравнений был применён алгоритм Бенджамини-Хохберга (padj). Расчет площади под ROC-кривой (AUC) был выполнен при исследовании диагностической значимости комбинаций микроРНК, а именно оценки специфичности и чувствительности при разделении исследуемых групп.

При верификации полученных данных по анализу уровня микроРНК в биологических жидкостях с использованием петлевой ОТ-ПЦР в режиме реального времени, ПЦР выполнялась в двух независимых постановках (по 5 и 7 микроРНК); в связи с этим нормализация использовалась только внутри каждой группы. Таким образом, из 12 проанализированных микроРНК было сформировано 31 соотношение микроРНК. Для каждого соотношения рассчитывали значения разности Ct (dCt) и разность значений dCt (ddCt) между каждой парой типов образцов (СМ — ВВ мочи, СМ — плазма крови и ВВ мочи — плазма крови). Для каждого соотношения микроРНК рассчитывали средние dCt, средние ddCt и их стандартные отклонения в каждой из фракций биологических жидкостей. Сравнения между группами выполнялись с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Фишера (Fisher's Post-Hoc Test). $P < 0,05$ считались статистически значимыми значениями. Поправка Бенджамини-Хохберга (padj) использовалась для корректировки статистической значимости множественных сравнений. Был выполнен анализ мощности и минимальный размер выборки, необходимый для подтверждения обнаруженных различий (был рассчитан при 95% и 99% уровне значимости и 95% статистической мощности). Специфичность и чувствительность аналитических систем оценивали с помощью ROC-кривых. Площадь под кривыми ROC (AUC) использовали в качестве меры диагностической эффективности соотношений микроРНК. Для изучения корреляции уровней соотношения микроРНК с характеристиками донора использовали коэффициент корреляции Спирмена.

2.2.8.2. Статистическая обработка данных aberrантного метилирования ДНК

Результаты NGS-секвенирования, а именно статус метилирования отдельных CpG-динуклеотидов изучаемых локусов внеклеточных ДНК крови анализировали с помощью

программного обеспечения BiQ Analyzer HT, используя минимальную скорость преобразования 0,95 и исключая чтения с нераспознанными сайтами.

Для оценки представленности в группах больных и здоровых пациентов последовательностей с метилированным или неметилированным цитозином, мы ввели переменные, которые соответствуют долям таких последовательностей. Символ «С» соответствует метилированному цитозину, а «Т» – неметилированному цитозину (урацилу/тимидину после химической конверсии/амплификации). Переменные *GSTP1.C1* – *GSTP1.C17* соответствуют долям (в общем количестве) последовательностей с метилированным цитозином в исследуемом локусе гена *GSTP1* с 1-ой по 17-ю позицию, соответственно. Аналогичные переменные были введены для исследуемых локусов генов *RNF219* и *KIAA1539*: *RNF219.C1* – *RNF219.C17* и *KIAA1539.C1* – *KIAA1539.C5*.

Для оценки представленности последовательностей с метилированным или неметилированным цитозином в двух разных позициях одной и той же молекулы, мы ввели переменные, которые соответствуют долям таких последовательностей. Например, переменная *RNF219.C4.T10* обозначала долю последовательностей с метилированным цитозином в 4-й позиции и неметилированным в 10-й позиции исследуемого локуса гена *RNF219*. Метилирование по одной из позиций и попарно «сцепленное» метилирование локусов генов *GSTP1*, *RNF219*, *KIAA1539* описывалось формулой $2 \times (17 + 4 \times (17 \times 16 \div 2)) + 5 + 4 \times (5 \times 4 \div 2) = 1167$ переменных.

Был выполнен статистический анализ распределения переменных в следующих группах сравнения:

1. Больные РПЖ против общей группы, включающей ЗД и ДГПЖ;
2. ЗД против общей группы, включающей пациентов с РПЖ и ДГПЖ;
3. Пациенты с ДГПЖ против общей группы, включающей ЗД и пациентов с РПЖ.

Для каждой из введенных переменных (положение CpG-динуклеотида), соответствующих метилированию, сравнивали группы сравнения с помощью точного критерия Манна – Уитни. Для более наглядного представления данных, представлены скорректированные *p*-значения в соответствии с подходом Бонферрони, которые представляют собой *p*-значения, умноженные на количество сравнений (3×1167). Различия, соответствующие *p*-значениям $< 0,05 \div (3 \times 1167)$ (то есть, когда скорректированные *p*-значения были $< 0,05$), считались значимыми.

Помимо *p*-значений, были выполнены расчеты следующих показателей точности прогнозов для каждого сравнения: чувствительность при 100% специфичности, специфичность при 100% чувствительности, точность для перекрестной проверки, чувствительность для перекрестной проверки, специфичность для перекрестной проверки и ROC AUC с 95%

доверительным интервалом Делонга для перекрестной проверки. Доверительные интервалы Делонга не приводились в случае, когда $ROC\ AUC = 1$, поскольку в этих случаях они всегда равны (1, 1).

Была использована перекрестная проверка с исключением по одному, прогнозируемые значения были рассчитаны с помощью логистической регрессии с весами, уравнивающими группы сравнения. Точность перекрестной проверки, чувствительность и специфичность были рассчитаны для порога 0,5. Если для переменной было достигнуто полное разделение (100% чувствительность для 100% специфичности для некоторого порогового значения), то точность, чувствительность, специфичность и ROC AUC указывались как 100%. Кроме того, для переменных были определены пороговые значения, используемые для разделения сравниваемых групп. В случае полного разделения пороговое значение представляет собой среднее геометрическое двух ближайших значений, одно из которых берётся из одной группы сравнения, а другое — из другой группы сравнения. Если одно из двух ближайших значений равно нулю, то вместо этого использовалось среднее арифметическое. Если полное разделение групп не достигалось, то пороговое значение указывалось как максимизирующее чувствительность + специфичность, а отношение не указывалось.

Для увеличения точности прогноза сравнения групп РПЖ и ЗД была рассмотрена модель логистической регрессии с несколькими предикторными переменными, а именно с весами, уравнивающими группы сравнения. Переменные были выбраны напрямую на основе точности прогнозирования перекрестной проверки с исключением по одному. Анализ был выполнен с помощью R v. 3.6.3 (R Core Team).

2.2.8.3. Биоинформационный анализ результатов

Анализ полученных результатов выполняли с использованием таких on-line доступных баз данных, как DIANA-mirPath v.3.0 (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr>), TargetScan v.7.1 (https://www.targetscan.org/vert_71/), miRDB (<http://mirdb.org>), MiRTarBase (https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/search.php), PANTHER™ v.10.0 (<http://pantherdb.org>) и STRING (<http://version10.string-db.org>).

Вначале мишени микроРНК были предсказаны, основываясь на данных DIANA, MiRTarBase, TargetScan и miRDB. Далее онтология предсказанных генов, участвующих в развитии рака предстательной железы, была проанализирована с помощью базы данных STRING. Биологические процессы, в которых принимают участие эти гены и их молекулярные функции были проанализированы с использованием базы данных PANTHER. Базу данных Exocarta, содержащую экспериментальные данные о составе экзосом, использовали для определения экзосомальной принадлежности белков.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время существует ряд нерешенных исследовательских задач, связанных с изучением вн-микроРНК и внДНК в различных биологических жидкостях, в том числе в крови и моче. Например, до сих пор не существует общепринятых стандартов для преаналитического, аналитического и постаналитического этапов исследования потенциальных онкомаркеров, включая протоколы сбора, обработки и хранения биологических образцов, процедуры выделения внНК, а также процедуры количественной оценки биомаркеров с последующим анализом полученных данных и т.д. Такое отсутствие единообразия при использовании методов и планировании работы не только приводит к трудностям при сравнении результатов разных исследований, но и снижает их ценность [512].

3.1. Разработка методологических подходов к исследованию внНК

3.1.1. Выделение внеклеточных микроРНК из крови и мочи

Поскольку внеклеточные микроРНК различных биологических жидкостей, включая кровь и мочу, представляют собой огромный интерес не только с фундаментальной точки зрения, но и для диагностической медицины, то разработке диагностических систем, основанных на их использовании, посвящено огромное количество исследований и публикаций.

Известно, что биологические жидкости содержат в своём составе большое количество биополимеров ненуклеотидной природы, а именно белки, липопротеины, липиды и их комплексы, включая различные комплексы с микроРНК [26, 64, 65, 140, 145]. Эти биомолекулы могут препятствовать выделению микроРНК и влиять на качество выделенной микроРНК, мешая работе ферментов, используемых для их анализа. Кроме того, РНК-гидролизующие ферменты могут влиять на количество выделенной микроРНК и необходимость их ингибирования не должна быть упущена из виду.

Таким образом, из вышеописанного следует, что на сегодняшний день одной из актуальных проблем исследований микроРНК при РПЖ является получение высокоочищенных препаратов недеградированных микроРНК, пригодных для последующего анализа.

Как уже было отмечено в литературном обзоре, далеко не все методы, представленные на рынке или описанные в литературе, могут быть использованы для выполнения исследования микроРНК с условием, что такое исследование требует высокоэффективного выделения микроРНК, а методы должны быть простыми, воспроизводимыми и производительными.

Пилотные эксперименты по количественному определению концентраций микроРНК при помощи количественной ОТ-ПЦР, которые мы выполнили перед началом работ по теме вн-микроРНК, показали, что доступные коммерческие наборы не отвечают нашим требованиям.

В частности, наборы, основанные на использовании Тризола, отличаются трудоёмкостью, плохой воспроизводимостью, дороговизной, а наборы от компании Qiagen неплохо подходят для выделения микроРНК из крови, но совершенно не подходят для выделения микроРНК из мочи. Кроме того, с помощью последовательных разведений образцов вн-микроРНК нами было обнаружено, что вне зависимости от метода выделения образцы микроРНК содержат ингибиторы полимераз. Более того, в этих же экспериментах мы обнаружили, что микроРНК биологических жидкостей находятся в виде прочных комплексов с биомолекулами крови и мочи, а разрушение таких комплексов при помощи воздействия хаотропных агентов невозможно.

Тот факт, что внеклеточные микроРНК биологических жидкостей экранированы от действия гидролизующих ферментов различными биополимерами, например липопротеинами низкой и высокой плотности [25, 27, 139] или инкапсуляцией в мембранные везикулы, включая экзосомы [123, 131, 134], хорошо известен. Стабильность надмолекулярных комплексов микроРНК в высоких концентрациях хаотропных солей позволяла предположить, что гидрофобные взаимодействия вносят существенный вклад в стабильность этих комплексов.

Нами были предложены два метода выделения вн-микроРНК из биологических жидкостей:

1). Первый метод основан на использовании **раствора Фолча** (истинный однофазный раствор состоящий из хлороформа, спирта и воды, предложенный ранее для эффективной экстракции липидов [513]). Образцы биологических жидкостей смешивали с растворами гуанидинизотиоцианата и затем с раствором, содержащим хлороформ и этанол (в пропорции этанол: хлороформ: вода - 2:1:1). Конечный раствор наносили на микроколону со стекловолокнистым сорбентом производства ООО «БиоСилика», отмывали колонку от избытка реагентов и элюировали микроРНК.

Как было показано ранее, 1 М гуанидинизотиоцианат и 50% этанол способствуют эффективному связыванию малых РНК с диоксидом кремния [514]. Мы проверили влияние разных концентраций GuSCN на сорбцию микроРНК из плазмы крови и мочи (по 10 здоровых доноров в каждой группе), используя радиоактивно меченую микроРНК-21. В качестве контроля меченую микроРНК-21 выделяли из воды. Для сравнения эффективности однофазного протокола, выделяли меченую микроРНК и с использованием кислой фенол-хлороформной экстракции с последующей очисткой на колонках со стекловолокнистым

сорбентом производства ООО «БиоСилика». Эффективность выделения микроРНК определяли в процентном отношении радиоактивной метки, оставшейся в определённой фракции (осадок, органическая фаза, проскок, микроколлонка или элюат), к исходному раствору радиоактивно-меченой микроРНК-21 (таблица 3.1.).

Таблица 3.1. Остаточная радиоактивность различных фракций при выделении микроРНК

	Осадок/ Органическая фаза Среднее±SD (%)	Проскок Среднее±SD (%)	Колонка* Среднее±SD (%)	Элюат Среднее±SD (%)
Однофазный метод с использованием хлороформа и этанола				
Контроль, 4 М GuSCN	не детектировалась**	0,8±0,7	8,1±2,2	72,5±3,6
Плазма, 4 М GuSCN	15,3±1,8	23,3±3,2	6,1±2,1	54,9±3,1
Плазма, 2 М GuSCN	56,3±5,1	12,2±1,7	3,9±1,8	24,8±4,8
Плазма, 1 М GuSCN	63,1±4,9	11,4±2,6	3,1±1,5	14,1±3,7
Моча, 4,5 М GuSCN	25,0±1,9	27,0±3,1	6,0±1,7	47,0±2,1
Моча, 4,5 М GuSCN,	8,3±0,9	28,0±3,3	9,5±1,2	57,1±1,4
Кислая экстракция фенол-хлороформом				
Контроль	18,4±2,1	9,2±1,5	15,6±3,1	56,4±3,6
Плазма	22,1±3,4	21,3±2,2	14,7±2,3	40,9±4,4
Моча	18,1±1,9	33,0±2,0	3,0±0,9	30,0±4,1

*Остаточная радиоактивность микроколлонки.

**Не формировался осадок при отсутствии плазмы.

При использовании кислой экстракции фенол-хлороформом дополнительная очистка при помощи стекловолнистого сорбента позволяла увеличить конечный выход микроРНК примерно на 20% по сравнению с оригинальным протоколом, описанным в [356] (данные не представлены).

Наиболее эффективное выделение микроРНК наблюдалось при использовании 4 М GuSCN в буфере для сорбции (72,5% в контроле, 54,9% из плазмы крови и 47% из мочи). Уменьшение концентрации гуанидинизотиоцианата приводило к увеличению преципитации микроРНК с последующим её осаждением (до 63% в осадке, таблица 3.1.). При выделении микроРНК из мочи дополнительное разведение GuSCN перед добавлением смеси этанол–хлороформ увеличивает выход микроРНК до 57,1%. Такое увеличение выхода может быть связано с природным повышенным содержанием солей в моче (относительно плазмы крови), которые могут влиять на связывание микроРНК с диоксидом кремния.

Для сравнения, эффективность выделения микроРНК методом кислой экстракции с использованием фенол-хлороформа, составила 56,4%, 40,9% и 30% при использовании контрольного водного раствора, плазмы и мочи, соответственно. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что однофазный метод с использованием хлороформа и

этанола более чем на 14% эффективнее кислой экстракции фенол-хлороформом при выделении микроРНК из плазмы крови и почти на 30% при выделении микроРНК из мочи.

Поскольку при работе с меченой микроРНК мы получаем информацию только о количестве радиоактивного изотопа в образце, но не в состоянии учесть гидролиз меченой молекулы, эффективность выделения микроРНК из плазмы крови 5-ти здоровых доноров была дополнительно проверена методом количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием в качестве матрицы 150 нМ синтетической не модифицированной микроРНК-21. Предварительно было показано, что концентрация эндогенной микроРНК-21 в плазме крови здоровых доноров незначительна по сравнению с добавленной микроРНК и не превышает 0,1% от введенного количества. Результаты сравнения обоих методов выделения микроРНК представлены на рисунке 3.1.(А).

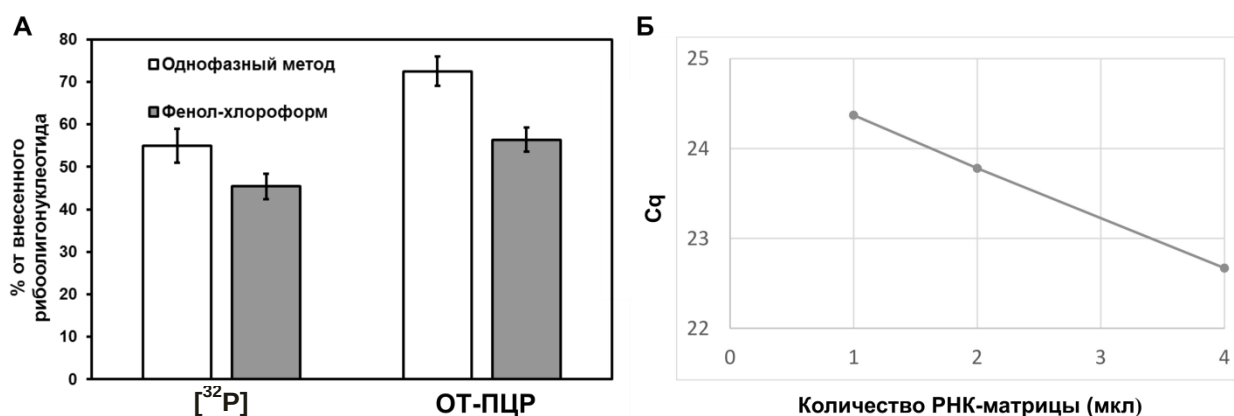


Рисунок 3.1. (А) Эффективность выделения синтетической микроРНК-21 из плазмы крови здоровых доноров при помощи однофазного метода и кислой экстракции фенол-хлороформом. **(Б)** Кривая разбавления микроРНК-матрицы на стадии обратной транскрипции. Значения порогового цикла ОТ-ПЦР отложены по вертикали, стандартное отклонение не превышало 0,2 цикла.

Как и в исследованиях с использованием меченого рибоолигонуклеотида, в случае использования ОТ-ПЦР в режиме реального времени наибольшая эффективность выделения микроРНК из плазмы крови была показана для однофазного протокола (рис. 3.1.А). Кроме того, полученные данные косвенно указывают на отсутствие ингибиторов, препятствующих количественному определению РНК, в выделенных препаратах микроРНК. Дополнительные доказательства высокого качества микроРНК, выделенных по однофазному протоколу, были получены путём анализа кривой разбавления матрицы микроРНК в 2 и 4 раза, используемой на стадии обратной транскрипции. Полученная линейная кривая (рис. 3.1.Б) указывает на отсутствие каких-либо ингибиторов в образцах микроРНК, выделенных по однофазному протоколу, что напрямую является доказательством пригодности однофазного протокола для дальнейшего исследования с помощью методов, основанных на ОТ-ПЦР.

Для проверки способности однофазного протокола выделять с высокой эффективностью и эндогенную микроРНК, микроРНК-16, -21 и -126 выделяли в дублях из 10 образцов плазмы крови (300 мкл) здоровых доноров с помощью однофазного протокола и кислотной экстракции фенол-хлороформом с последующим переосаждением изопропанолом, как описано в п.2.2.7.7., и дальнейшим анализом количественной ОТ-ПЦР.

Представленные в таблице 3.2. результаты демонстрируют сходные значения порогового цикла (C_t без статистически значимых отличий ($p > 0,05$)) для образцов, полученных с использованием обоих методов.

Таблица 3.2. Значения порогового цикла (C_t) для эндогенных микроРНК, выделенных из плазмы крови двумя методами.

	микроРНК-16 Среднее $\pm$ SD	микроРНК-126 Среднее $\pm$ SD	микроРНК-21 Среднее $\pm$ SD
Однофазный метод	20,78 $\pm$ 1,43	25,23 $\pm$ 1,44	28,91 $\pm$ 2,50
Экстракция фенол-хлороформом	21,03 $\pm$ 1,81	25,00 $\pm$ 1,62	28,73 $\pm$ 1,97

Учитывая тот факт, что форма циркуляции различных микроРНК может отличаться, необходимо было доказать, что усовершенствованный однофазный протокол выделения позволяет извлекать внеклеточные микроРНК из разнообразных комплексов и частиц биологических жидкостей. Для этого внеклеточные микроРНК плазмы крови и мочи 50-ти и 10-ти здоровых доноров, соответственно, были выделены в дублях с использованием однофазного протокола с последующим осаждением изопропанолом и концентрация некоторых из них (встречающихся по литературным данным [131, 165, 515] в крови не только в составе экзосом, но и в составе нуклеопротеиновых комплексов) была оценена при помощи ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Значения пороговых циклов во всех образцах колебались от 18 до 36 (Таблица 3.3.).

Таблица 3.3. Значения порогового цикла (C_t , Среднее $\pm$ SD) для внеклеточных микроРНК, выделенных из плазмы крови и мочи при помощи однофазного протокола.

микроРНК	-16	-19b	-25	-205	-125b	-21	-126
Плазма	21,1 $\pm$ 2,2	24,5 $\pm$ 2,8	26,9 $\pm$ 1,2	33,8 $\pm$ 0,5	32,7 $\pm$ 1,8	28,6 $\pm$ 1,8	25,5 $\pm$ 2,0
Моча	26,7 $\pm$ 0,5	34,9 $\pm$ 2,5	22,7 $\pm$ 0,7	29,9 $\pm$ 1,8	35,0 $\pm$ 1,8		

Полученные нами данные о значениях пороговых циклов для внеклеточных микроРНК крови и мочи согласуются с данными других исследователей, показавших, например, что для микроРНК-16, выделенной из плазмы крови человека с помощью коммерческого набора miRVana, среднее значение C_t составляет 22 [516]; средние значения C_t , полученные для микроРНК-126 и микроРНК-25, выделенных с помощью miRNeasy, составляли в среднем от

24,0 до 24,5 [517]; для микроРНК-205, выделенной из плазмы с помощью Trizol LS, средние значения C_q составляли примерно 32 [518]; при нормировке значений C_t микроРНК-126 на микроРНК-16, выделенных с помощью miRvana, dC_t в среднем составляла 8,2 (среднее значение $C_t=20$) [519]; а соотношение микроРНК-21/микроРНК-16 в среднем составляло около 5 [520], что согласуется с нашими результатами.

Таким образом, усовершенствованный однофазный протокол позволяет выделять высококачественные препараты микроРНК из крови и мочи, пригодные для дальнейших исследований, включая методы, в основе которых лежит ОТ-ПЦР. Результаты наших дальнейших экспериментов (не описанных в этой работе) свидетельствуют о возможности выделения микроРНК однофазным протоколом из других биологических жидкостей, фракционированных везикул и других биологических образцов, особенно обогащенных липидами, включая ткани, с последующим их анализом при помощи ОТ-ПЦР. Кроме того, выделение микроРНК при помощи усовершенствованного однофазного протокола занимает меньше времени по сравнению с кислой экстракцией фенол-хлороформом (таблица 3.4.), что является несомненным плюсом при ежедневной работе с большим количеством образцов. К числу недостатков метода можно отнести существенное увеличение объема образца из-за необходимости его смешивания с раствором гуанидинизотиоцианата и смесью хлороформа со спиртом. Это особенно чувствительно при выделении микроРНК из мочи, в которой концентрация микроРНК меньше, чем в плазме [165].

Таблица 3.4. Временные характеристики однофазного метода и кислой фенол-хлороформной экстракции.

Этап	Фенол-хлороформ, мин	Однофазный метод, мин
Денатурация	15	5
Экстракция	20	-
Фракционирование	1	-
Нанесение на микроколону	3	3
Промывка	5	5
Элюция	5	5
Суммарное время без переосаждения	49	18
Общее время выделения	99	68

2). Разрушение надмолекулярных комплексов и осаждение биополимеров биологических жидкостей при помощи октановой кислоты.

Уже много лет назад было показано, что октановая кислота (ОсА) в низких концентрациях (0,04 М) формирует нерастворимые комплексы с некоторыми белками плазмы крови, в том числе и с α -, β -глобулинами, альбумином и т.д. [521]. Гамма-глобулины практически не осаждаются в присутствии октановой кислоты, поэтому фракционирование

плазмы/сыворотки крови октановой кислотой было предложено для выделения иммуноглобулинов [522, 523].

Известно, что октановая кислота способна связываться с гидрофобными участками биомолекул, поэтому мы предположили, что использование ОсА может быть эффективно для разрушения надмолекулярных комплексов микроРНК с биомолекулами. Необходимо отметить, что набор для выделения микроРНК от компании Exiqon так же использует некий химический реагент (он не описан в литературе и нам не удалось найти патентов на сей счет), осаждающий основную часть биомолекул плазмы крови.

В своей работе мы протестировали ряд условий, включая концентрации реагентов и время их инкубации с плазмой крови и мочой, для полноценного осаждения белков и белковых комплексов и/или разрушения внеклеточных комплексов микроРНК, в том числе и в составе везикул разного размера и происхождения. МикроРНК выделяли из 200 мкл плазмы и 400 мкл мочи 10-ти здоровых доноров, добавляя в буфер для сорбции разные концентрации ОсА и GuSCN, а также варьируя его pH. С помощью количественной ОТ-ПЦР, нацеленной на микроРНК-16 и -126, оценивали эффективность выделения. С использованием спектрофотометра Genesys 10 UV на длинах волн 260 нм и 280 нм определяли остаточное количество белка в супернатанте, предварительно разбавляя его в 10 раз (0,02 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5 в TBS).

Результаты этой серии экспериментов представлены на рисунке 3.2.

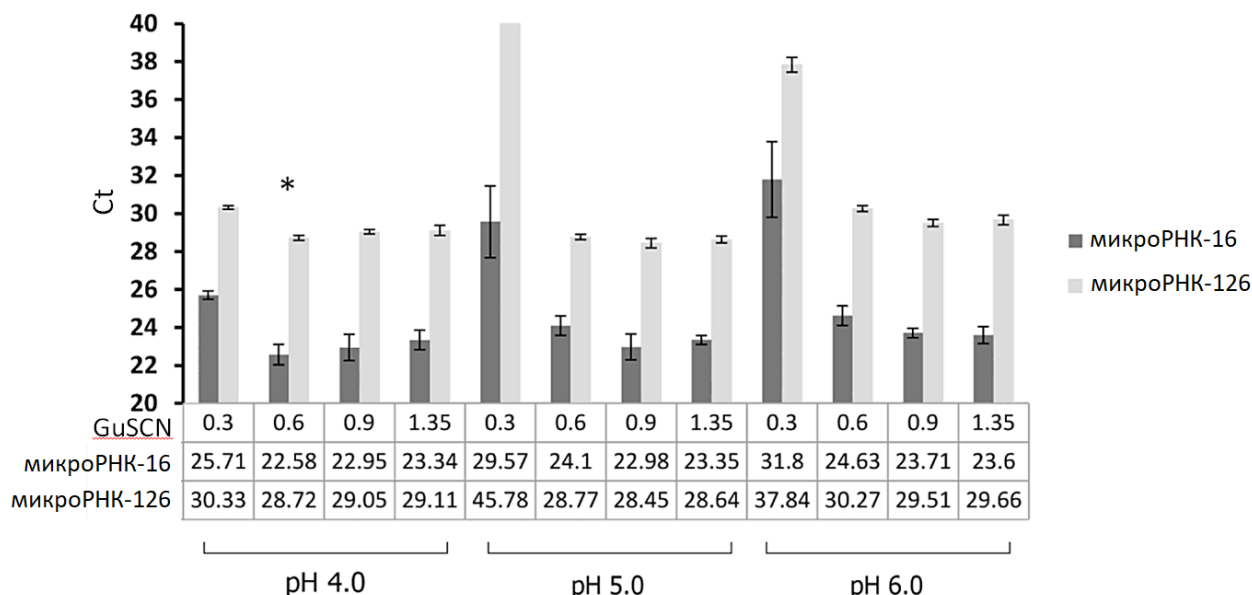


Рисунок 3.2. Сравнение эффективности выделения микроРНК из плазмы крови в зависимости от концентрации GuSCN и pH при постоянном значении концентрации ОсА = 0,5%.

График представлен в виде: среднее±SD.

Оптимальные условия выделения микроРНК указаны звёздочкой (*).

Наиболее эффективно микроРНК из плазмы крови выделяется в присутствии 0,6 М GuSCN, 0,5% ОсА и условиях pH 4,0; кроме того, при этих условиях выделения остаточное количество белка в супернатанте минимально (таблица 3.5.). При сохранении концентрации ОсА, pH 4,0 и уменьшении концентрации GuSCN до 0,3 М, в супернатанте обнаруживалось меньшее количество белка, а значительная часть микроРНК, как мы предполагаем, подвергалась со-осаждению совместно с биополимерами (таблица 3.5.).

Таблица 3.5. Сравнение эффективности выделения микроРНК из плазмы крови в зависимости от концентрации ОсА, GuSCN и pH.

ОсА, %	GuSCN, М	pH	микроРНК-16, Среднее±SD	микроРНК-126, Среднее±SD	Оптическая плотность, нм	
					260	280
0,5	0,3	4	25,7±0,2	30,3±0,1	0,66	0,27
	0,6	4	22,6±0,5	28,7±0,1	0,81	0,29
	0,9	4	23±0,7	29,1±0,1	0,96	0,35
	1,35	4	23,3±0,5	29,1±0,3	1,46	0,67
	0,3	5	29,6±1,9	45,8±1,7	1,11	0,76
	0,6	5	24,1±0,5	28,8±0,1	0,83	0,28
	0,9	5	23±0,7	28,5±0,3	0,95	0,31
	1,35	5	23,3±0,2	28,6±0,2	1,34	0,54
	0,3	6	31,8±2	37,8±0,4	1,6	1,4
	0,6	6	24,6±0,5	30,3±0,2	0,91	0,36
	0,9	6	23,7±0,3	29,5±0,2	1,01	0,44
	1,35	6	23,6±0,4	29,7±0,3	1,62	0,8
1,5	0,3	4	25,4±0,3	28,6±0,3	0,67	0,27
	0,6	4	25,3±0,9	29,0±0,1	0,79	0,28
	0,9	4	25,3±0,3	28,2±0,4	0,91	0,3
	1,35	4	32,6±1,5	27,9±0,5	1,13	0,42
	0,3	5	30,2±0,5	35,4±0,2	0,68	0,26
	0,6	5	26±0,7	28,3±0,3	0,76	0,25
	0,9	5	26±0,1	28,2±0,6	0,86	0,26
	1,35	5	26±0,2	28,4±0,2	1,12	0,35
	0,3	6	25,9±0,1	37,5±0,5	0,99	0,74
	0,6	6	26,1±0,2	28,4±0,3	0,82	0,27
	0,9	6	26,2±0,3	28,0±0,3	0,94	0,33
	1,35	6	25,4±0,1	28,5±0,5	1,31	0,56
2,5	0,3	4	26,7±0,0	30,1±0,2	0,65	0,27
	0,6	4	24,3±0,5	28,8±0,1	0,75	0,27
	0,9	4	24,5±0,1	28,1±0,1	0,89	0,3
	1,35	4	24,1±0,4	28,3±0,4	1,37	0,6
	0,3	5	36,6±0,6	36,5±0,4	0,67	0,28
	0,6	5	24,6±0,7	28,6±0,2	0,75	0,25
	0,9	5	24,3±0,6	28,4±0,3	0,87	0,27
	1,35	5	24,2±0,3	28,8±0,1	0,98	0,28
	0,3	6	46,2	39,8±0,9	0,89	0,61
	0,6	6	27,1±0,2	30,8±0,1	0,83	0,32
	0,9	6	25,6±0,2	29,3±0,3	0,89	0,27
	1,35	6	24,8±0,4	28,7±0,2	1,13	0,41

*Серым выделены оптимальные условия выделения микроРНК

Наиболее эффективными для выделения микроРНК оказались условия: 0,5% ОсА, 0,9 М GuSCN и pH 5,0, хотя остаточное количество белка, обнаруженное в супернатантах плазмы крови, было минимальным в присутствии 0,5% ОсА, 0,6 М GuSCN и при pH 4,0. Наиболее эффективными для выделения микроРНК из мочи оказались условия: 1,5% ОсА, 1,35 М GuSCN, pH 4,0 (рис. 3.3.). Стоит отметить, что в супернатанте мочи в этих же условиях количество белка было наименьшим (таблица 3.6.).

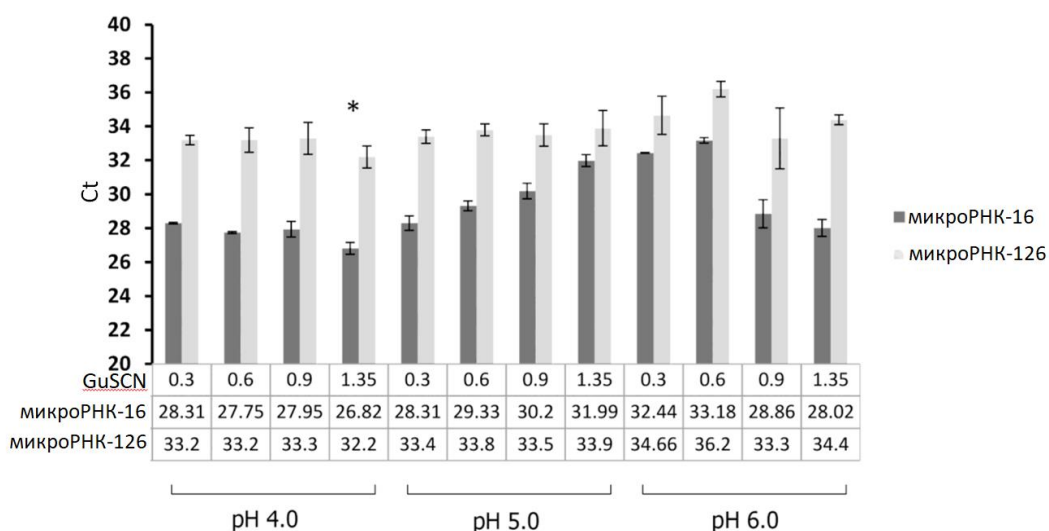


Рисунок 3.3. Сравнение эффективности выделения микроРНК из мочи в зависимости от концентрации GuSCN и pH при постоянном значении концентрации ОсА = 1,5%.

График представлен в виде: среднее±SD.

Оптимальные условия выделения микроРНК указаны звёздочкой (*).

Таким образом, использование комбинации GuSCN и ОсА способствует эффективному выделению микроРНК из крови и мочи, в том числе и в составе различных биополимеров.

Как было показано ранее, эффективность осаждения белков ОсА зависит от её концентрации, а также от температуры, значений pH и разбавления образца [524]. Осаждение основной неиммуноглобулиновой фракции белков происходит при pH 4,2 и 4,5, снижение эффективности осаждения наблюдалось при увеличении pH до значения 5,1 [521, 522]. При концентрации ОсА в 2-3% и температуре 22°C происходит полное осаждение α- и β-глобулинов, а также альбумина [524]. Основную роль во взаимодействии ОсА с белками играют их тирозиновые остатки и силы Ван-дер-Ваальса [525, 526].

Далее мы оценивали качество и размер полученных с использованием ОсА препаратов микроРНК при помощи Bioanalyzer Agilent 2100 и набора для анализа малых РНК (детектирует суммарную фракцию РНК размером от 6 до 150 н, включая микроРНК (18-25 н)). Было показано, что, как в образцах микроРНК, выделенных из плазмы крови, так и выделенных из

мочи, с использованием GuSCN/ОсА присутствуют короткие РНК, размером от 10 до 50 н. (рис. 3.4.).

Таблица 3.6. Сравнение эффективности выделения микроРНК из мочи в зависимости от концентрации ОсА, GuSCN и pH.

ОсА, %	GuSCN, М	pH	микроРНК-16, Среднее±SD	микроРНК-126, Среднее±SD	Оптическая плотность, нм	
					260	280
0,5	0,3	4	29,3±0,1	33,5±0,7	0,58	0,47
	0,6	4	27,1±0,2	32,5±0,0	0,75	0,5
	0,9	4	27,3±0,1	33,5±0,2	0,8	0,46
	1,35	4	27,6±0,3	34,5±0,6	0,96	0,46
	0,3	5	35,6±0,1	34,5±0,3	0,54	0,42
	0,6	5	28,4±0,1	35,1±0,4	0,65	0,42
	0,9	5	28,3±0,2	34,8±1	0,76	0,41
	1,35	5	28±0,6	35±2,2	0,94	0,44
	0,3	6	35,8±1	41,1±0,8	0,59	0,45
	0,6	6	29, 7±0,8	33,8±0,6	0,63	0,4
	0,9	6	27,4±0,1	34,5±0,3	0,76	0,42
	1,35	6	27,1±0,1	33,6±0,7	0,97	0,44
1,5	0,3	4	28,3±0,5	33,2±0,9	0,56	0,47
	0,6	4	27,8±0,4	33,2±0,7	0,66	0,44
	0,9	4	28±0,4	33,3±0,4	0,72	0,41
	1,35	4	26,8±0,3	32,2±0,4	0,91	0,44
	0,3	5	28,3±0,5	33,4±0,7	0,58	0,45
	0,6	5	29,3±0,4	33,8±1	0,63	0,41
	0,9	5	30,2±0,0	33,5±1,1	0,72	0,41
	1,35	5	32±0,2	33,9±0,5	0,91	0,43
	0,3	6	32,4±0,8	34,7±1,8	0,56	0,42
	0,6	6	33,2±0,5	36,2±0,3	0,67	0,42
	0,9	6	28,9±0,2	33,3±1,2	0,73	0,41
	1,35	6	28±0,3	34,4±0,0	0,9	0,41
2,5	0,3	4	34,2±0,5	34,4±2,5	0,57	0,45
	0,6	4	34,9±0,3	38,3±0,7	0,65	0,43
	0,9	4	41,7±1,4	35,2±0,4	0,76	0,45
	1,35	4	25±0,4	32,3±0,5	0,91	0,43
	0,3	5	42,9±2,3	33,1±0,8	0,49	0,38
	0,6	5	33±0,8	35,2±0,4	0,65	0,43
	0,9	5	40,6±1,3	36±1,2	0,7	0,39
	1,35	5	43,5±1	34±1,9	0,87	0,39
	0,3	6	44,8±1,4	42,6±0,4	0,547	0,42
	0,6	6	36,1±0,7	35,1±0,6	0,66	0,42
	0,9	6	38,5±0,4	34,3±1,6	0,73	0,42
	1,35	6	42,6±0,2	37,9±0,0	0,93	0,43

*Серым выделены оптимальные условия выделения микроРНК

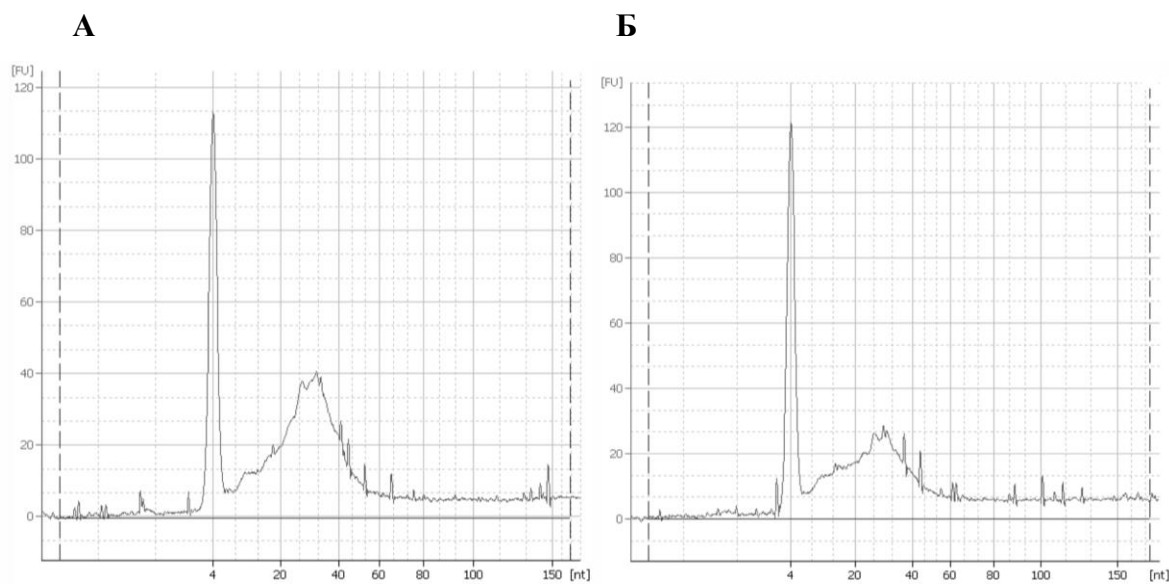


Рисунок 3.4. Данные Bioanalyzer Agilent 2100 образцов внеклеточных микроРНК, выделенных из плазмы крови (А) и мочи (Б). Показано распределение по размеру нуклеотидов (nt) РНК и интенсивность флуоресценции. Внутренним стандартом является пик 4 н.

По результатам наших экспериментов можно сделать вывод о том, что протокол выделения микроРНК из крови и мочи с использованием GuSCN/ОсА пригоден для получения препаратов коротких РНК. В завершении мы решили сравнить разработанный нами протокол выделения микроРНК из биологических жидкостей с использованием смеси GuSCN/ОсА со стандартной экстракцией фенол-хлороформом [357] и коммерческим набором miRCURY RNA Isolation Kit - Biofluids (Exiqon) [358, 527].

Набор miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids был разработан относительно недавно (на момент начала нашего исследования) в качестве альтернативы существующим коммерческим методам на основе фенола. Его преимуществами являются отсутствие фенола и отсутствие трудоёмкой стадии разделения фаз, что сокращает время, необходимое для выделения, и упрощает его использование [362]. Он превосходит по эффективности выделения микроРНК из плазмы крови, экзосом или культивируемых клеток другие коммерческие наборы, включая Trizol LS [358, 527], что говорит о высокой эффективности разрушения комплексов микроРНК с биомолекулами и эффективной сорбции/десорбции микроРНК на колонках со стекловолокном [527].

Для сравнения трёх методов нами были использованы образцы плазмы крови и мочи здоровых мужчин (по 10 человек в группе, способ получения образцов описан в главе «Материалы и методы»). Выделение микроРНК с помощью miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids выполнялось согласно рекомендациям производителя. Вне зависимости от используемого протокола выделения, на последнем шаге все микроРНК подвергались стадии

пересадения (см. п.2.2.7.7.). Оценку эффективности методов проводили с помощью количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени, нацеленной на микроРНК-16 и микроРНК-126. Выбор в пользу именно этих микроРНК был сделан в связи с их распространенностью в плазме крови. Сравнения значений пороговых циклов (Ct) выполняли между образцами, полученными от одних и тех же доноров, выделенных разными протоколами. Показано, что разработанный нами протокол с использованием смеси GuSCN/ОсА наиболее эффективен по сравнению с оставшимися двумя, а именно в 7,2 и почти в 1,4 раза эффективнее экстракции фенол-хлороформом и практически в 1,7 и 2,9 раза эффективнее коммерческого набора miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids при выделении из плазмы крови микроРНК-16 и микроРНК-126, соответственно (таблица 3.7.).

Таблица 3.7. Эффективность выделения микроРНК из плазмы крови и мочи

		GuSCN/ОсА	фенол-хлороформ	miRCURY Biofluids Kit
Плазма	микроРНК-16	21,9±1,7	22,8±1,5	22,6±1,5
	микроРНК-126	30,7±0,6	31,2±0,3	32,2±1,4
Моча	микроРНК-16	29,8±1,9	31±1	37±1
	микроРНК-126	34,2±1,9	34,7±1,1	ND ^{**}

* Данные представлены в формате среднее±SD

** Сигнал не детектировался

При выделении микроРНК из мочи также была показана наилучшая эффективность при использовании протокола на основе GuSCN/ОсА. Предложенный протокол превосходил в 2,3 и 1,5 раза экстракцию фенол-хлороформом при детекции микроРНК-16 и -126, соответственно, и в 142 раза набор miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids при детекции микроРНК-16 в моче, в то время как сигнал от микроРНК-126 при выделении набором miRCURY RNA Isolation Kit вообще не детектировался (таблица 3.7.).

Несмотря на присутствие в методе miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids реагентов для осаждения биополимеров из биологических жидкостей, эффективности выделения микроРНК при его использовании по сравнению с экстракцией фенол-хлороформом либо очень близки (в случае плазмы крови), либо значительно ниже (в случае мочи), что, по-видимому, связано с различной эффективностью выделения микроРНК из разных комплексов. Метод, разработанный нами, на основе использования смеси GuSCN/ОсА является более универсальным, и позволяет выделять микроРНК из различных биологических жидкостей (по меньшей мере, из крови и мочи) с высокой эффективностью и воспроизводимостью.

Поскольку протоколы с использованием GuSCN/ОсА и miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids имеют общий фундаментальный подход к выделению микроРНК (хотя удаление/истощение белков достигается с помощью разных химических агентов), нам было

интересно понять, что вызвало такие резкие различия в их эффективности. Для сравнения эффективности удаления белков обоими протоколами, были измерены значения поглощения супернатантов при 260 и 280 нм, а также оставшиеся белки были исследованы с помощью SDS PAGE.

Наиболее эффективно белки из плазмы крови удаляют реагенты, входящие в состав miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids ($A_{260}/A_{280}=0,45/0,16$ по сравнению с протоколом с использованием GuSCN/OcA: $0,54/0,27$). Однако протокол GuSCN/OcA наиболее эффективен в удалении белков из мочи ($A_{260}/A_{280}=0,88/0,73$ по сравнению с miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids: $1,12/0,88$). При обработке плазмы крови набором miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids на SDS PAGE выявлялся минорный белок размером 52 кДа (мы предполагаем, что это может быть предшественник изоформы 1 витамина D-связывающего белка, антитромбин III, каталитическая цепь карбоксипептидазы N и другие белки [528, 529]), в то время, как при обработке смесью GuSCN/OcA выявляются порядка десяти белков, в том числе IgG и альбумин (рис. 3.5.).

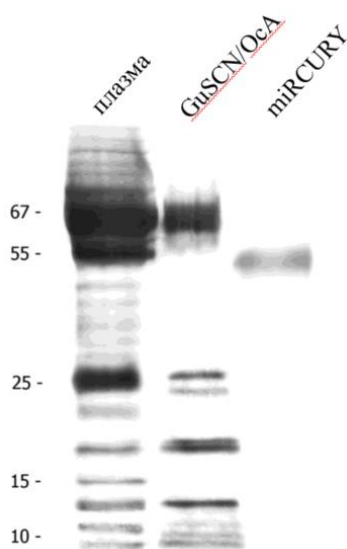


Рисунок 3.5. SDS-PAGE супернатанта плазмы крови человека после осаждения белков разными методами.

Полученные данные свидетельствуют о более агрессивном осаждении белков набором miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids, что может привести к со-осаждению части микроРНК. Как было показано с помощью ОТ-ПЦР, оставшиеся в супернатанте плазмы крови белки после осаждения методом GuSCN/OcA в оптимальных условиях, не мешают выделению микроРНК из различных биологических жидкостей (Таблица 3.7)

Подводя итог можно сказать, что разработанные нами протоколы (однофазный метод и с использованием октановой кислоты) позволяют быстро, с высокой эффективностью и воспроизводимостью выделять микроРНК (вне зависимости от способа упаковки) из различных биологических жидкостей (рис. 3.1., 3.4., таблицы 3.2. - 3.6.). По эффективности оба протокола сравнимы между собой, однако, при работе с большим количеством образцов и с образцами

большого объема удобнее использовать метод, основанный на использовании октановой кислоты.

3.1.2. Характеристики количественных методов на основе полимеразной цепной реакции, используемые в работе

Все условия реакций, а также последовательности используемых олигонуклеотидов для работ как с микроРНК, так и с ДНК описаны в главе «Материалы и методы».

Уровень 17-ти внеклеточных микроРНК оценивали при помощи количественной петлевой TaqMan ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Чувствительность аналитических систем составила 10-100 копий микроРНК. Точность анализа, характеризуемая коэффициентом вариации, не превышала 9,4%.

Для оценки статуса метилирования CpG-динуклеотидов в составе геномной ДНК (генДНК) и внДНК в культуре первичных и трансформированных клеток с помощью метода MS-qPCR был выбран фрагмент гена *RARbeta2*, содержащий 13 сайтов CpG. Для определения суммарного количества гена *RARbeta2*, содержащегося в образце после проведения бисульфитной конверсии, была разработана количественная ПЦР независимая от метилирования и основанная на использовании пары праймеров, фланкирующей фрагмент гена *RARbeta2* длиной 186 п.н. (931-1117, Genbank accession no X56849). Было показано, что эта система позволяет детектировать модифицированную бисульфитом натрия ДНК человека методом SYBR-Green MS-qPCR с чувствительностью 25 копий. Коэффициент вариации, характеризующий межэкспериментальную точность и определенный по данным трёх независимых экспериментов, составил 10,5%. Для детекции метилированной формы *RARbeta2* методом SYBR-Green MS-qPCR были использованы праймеры, фланкирующие фрагмент длиной 161 п.н. (938-1098, Genbank accession no X56849). Чувствительность системы составила 30 копий, коэффициент вариации - 9,7%.

Для оценки уровня метилирования каждого цитозина в составе фрагмента гена *RARbeta2* использовался метод пиросеквенирования, чувствительность которого составила 2,5% ML, коэффициент вариации - 3,5%.

Для оценки концентрации внДНК крови до и после бисульфитной конверсии были разработаны праймеры, нацеленные на *LINE 1* элементы. Для работы по исследованию aberrантного метилирования внДНК крови были разработаны праймеры, узнающие участки генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* и не содержащие в своём составе CpG-динуклеотидов, т.е., соответственно, они не могли быть метилированы. При помощи такого подхода мы амплифицировали искомые локусы генов вне зависимости от их метилирования. Чувствительность TaqMan ПЦР систем составила 5 пг ДНК. Точность ПЦР в режиме реального

времени, выраженная коэффициентом вариации, составила 12%, эффективность ПЦР была от 97,4% до 99,5%.

3.2. Особенности циркуляции и состав внеклеточных микроРНК при развитии онкологических заболеваний предстательной железы

Как уже было упомянуто ранее в главе «Обзор литературы» микроРНК биологических жидкостей могут быть упакованы в надмолекулярные комплексы с биомолекулами или в покрытые мембраной частицы (таблица 1.2.). При этом микроРНК могут попадать во внеклеточную среду как с помощью активной секреции, так и в результате клеточной смерти (см. п. 1.1.1). Состав микроРНК-содержащих структур биологических жидкостей определяется механизмом их возникновения, циркуляции (распределения по органам и тканям) и выведения. Вклад механизмов высвобождения комплексов микроРНК, клеточных популяций, высвобождающих микроРНК и особенности биологических жидкостей, например клубочковая фильтрация, реабсорбция, контакт с протоком предстательной железы, влияют на то, в каком виде вн-микроРНК представлены в этих жидкостях и какие клетки вносят вклад в их появление [530].

Известно, что в жидкости предстательной железы и в моче присутствуют различные популяции внеклеточных везикул [83, 530], включая экзосомы (30–100 нм), простасомы (50–500 нм), эктосомы (50–1000 нм), онкосомы (50–500 нм) и микровезикулы (100–1000 нм) [531]. Экзосомы мочи представляют собой относительно небольшие везикулы сферической [532], блюдцевидной [533] или чашевидной формы [534, 535], которые содержат белки, мРНК и микроРНК [536] и высвобождаются клетками во всех сегментах нефрона и мочеполового тракта [537]. Экзосомы, продуцируемые клетками предстательной железы, перемещаются с секретом ПЖ через эякуляторные протоки, которые впадают непосредственно в уретру и попадают в мочу, где их можно легко обнаружить [538]. Физиологические и молекулярные характеристики ВВ могут предоставить ценную информацию о клеточном происхождении и патофизиологическом состоянии [83, 530].

Известно, что в моче постоянно присутствуют клетки эндотелия мочевого пузыря и мочевыводящих протоков. В рамках этой работы мы не исследовали эти клетки, а использовали бесклеточную фракцию для оценки вклада различных надмолекулярных комплексов микроРНК в формирование суммарного пула микроРНК мочи. Для этого мы разделяли мочу на четыре фракции: 1 - обедненная клетками моча (супернатант 1), т.е. супернатант, полученный после центрифугирования мочи при 400g (предположительно содержит все типы везикул,

присутствующих в моче, белки и белковые агрегаты мочи, клеточные фрагменты и дебрис, а также внеклеточные нуклеиновые кислоты не связанные с мембранными везикулами);

2 - супернатант, полученный после центрифугирования супернатанта 1 при 17000g (супернатант 2) (содержит крупные внеклеточные везикулы мочи, растворимый белок мочи и внеклеточные нуклеиновые кислоты не упакованные во внеклеточные везикулы); 3 - фракция, содержащая суммарные внеклеточные везикулы (СВВ), представляющая собой осадок после ультрацентрифугирования супернатанта 2 (при 100000g) и состоящая из экзосомоподобных частиц, а также микровезикул до 200–300 нм; 4 - фракция, обогащённая мелкими везикулами, включая экзосомы (ФОЭ), полученная путём фильтрации фракции СВВ через фильтры с диаметром пор 0,1 мкм.

Состав ВВ изучали во фракциях СВВ и ФОЭ, концентрацию микроРНК оценивали во всех полученных фракциях мочи.

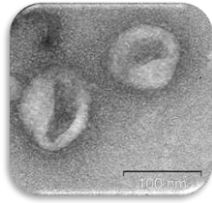
3.2.1. Сравнительное исследование внеклеточных везикул мочи здоровых мужчин и больных раком предстательной железы

Для описания внеклеточных везикул, в том числе и экзосом, обычно используется комбинация таких параметров, как размер, морфология и наличие специфических поверхностных маркеров. По литературным данным экзосомы отличаются тем, что в их мембранах имеются/экспонированы тетраспаниновые рецепторы CD63 и CD9, которые опосредуют адгезию экзосом к поверхности реципиентной клетки [83, 530, 539–541], и часто встречается рецептор CD24 – маркер активно делящихся и дифференцирующихся клеток [542, 543].

Основываясь на данных ТЭМ, нами было показано, что фракции СВВ мочи здоровых доноров и больных РПЖ содержат ВВ размером от 20 до 230 нм. Большинство везикул имели вид сферических пузырей или «чашечек», что указывает на их экзосомальное/эндоцитарное происхождение (рис. 3.6.А). Доля везикул размером от 30 до 120 нм (размер экзосом) составила 95% и 90% от общего числа везикул в образцах СВВ здоровых доноров и больных РПЖ, соответственно (согласно критерию Манна-Уитни эта разница была незначительной (рис. 3.7.А)); доля крупных частиц (до 230 нм) не превышала 5% и 10%, соответственно. Фильтрация фракции СВВ сквозь фильтр с диаметром пор 0,1 мкм увеличивала долю экзосомоподобных везикул размером от 30 до 120 нм почти до 100%, удаляя практически полностью везикулы размером более 110 нм (рис. 3.7.Б).

Связывание антител к CD9, CD24 и CD63 с поверхностью экзосомоподобных частиц наблюдалось практически для всех везикул размером от 30 до 100 нм и позволяет предположить, что эти частицы являются экзосомами (рис. 3.6.Б).

А



Б

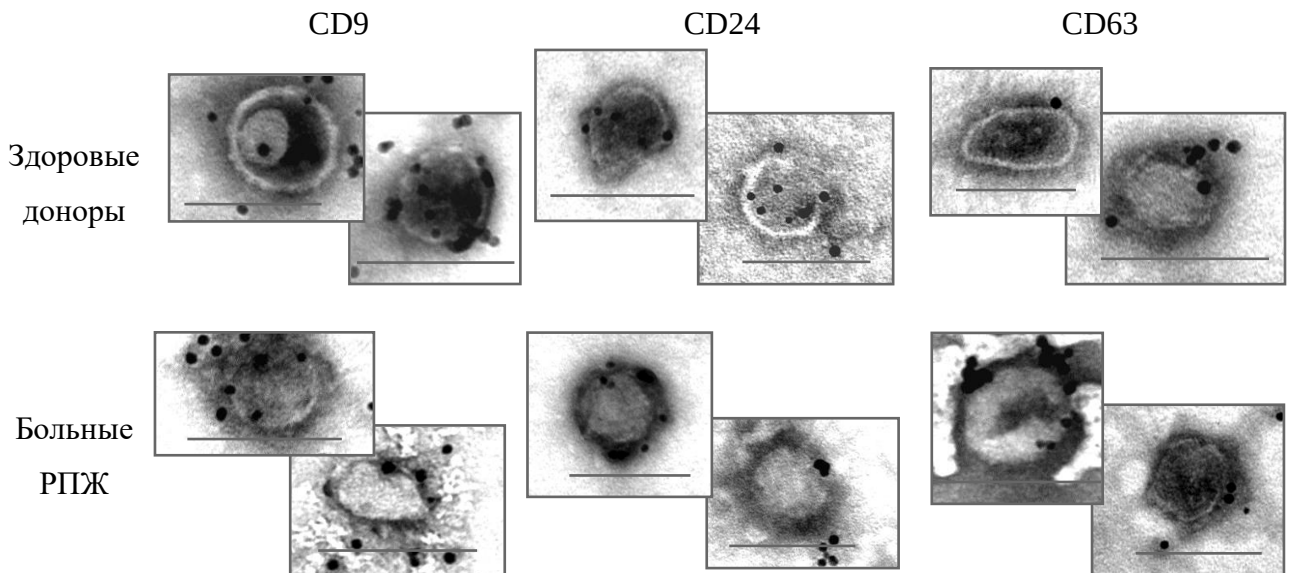
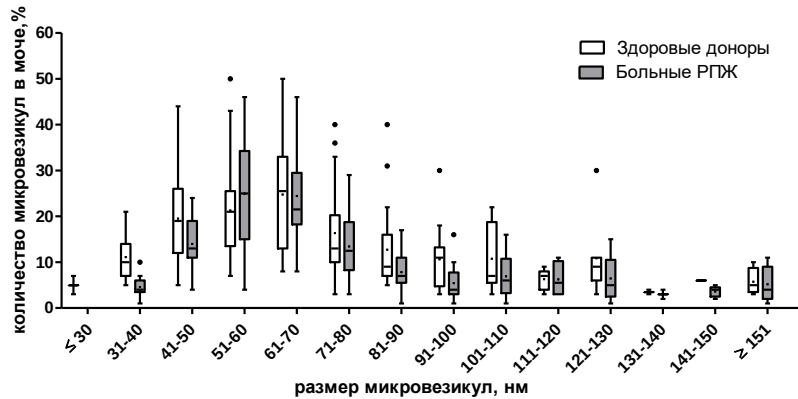


Рисунок 3.6. Внешний вид и размер внеклеточных везикул мочи. (А) Ультраструктура отдельных экзосомоподобных микрочастиц мочи. (Б) ТЭМ-изображения ВВ мочи здоровых доноров и больных РПЖ до и после фильтрации сквозь фильтры с диаметром пор 0,1 мкм, меченые антителами к CD9, CD24 и CD63. Масштабная линия - 100 нм.

А



Б

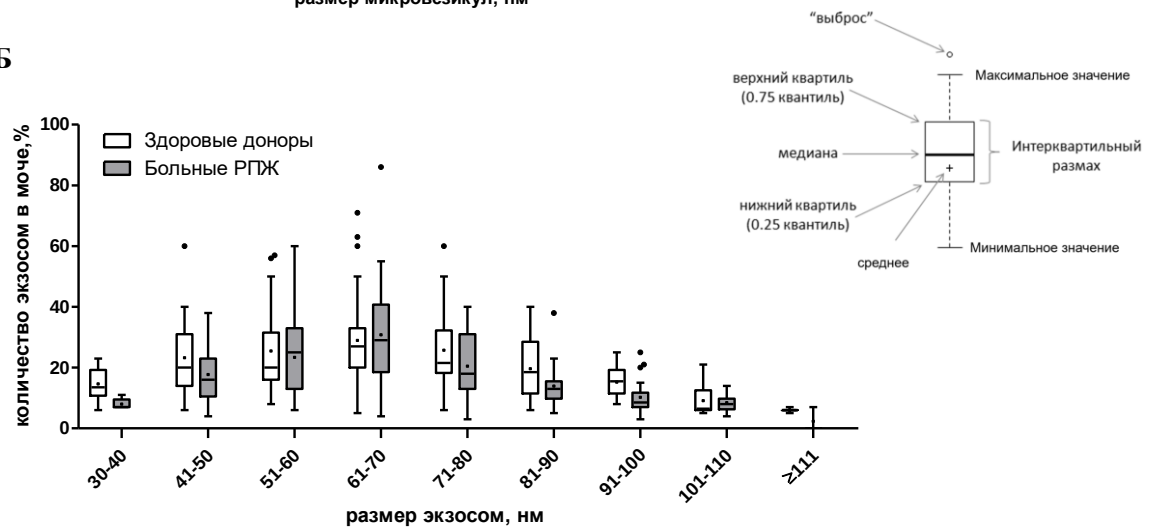


Рисунок 3.7. Распределение по размеру внеклеточных везикул мочи здоровых доноров и больных РГЖ до (А) и после (Б) фильтрации сквозь фильтры с диаметром пор 0,1 мкм.

Полученные нами результаты в целом коррелируют с литературными, демонстрирующими, что, во-первых, размер экзосом мочи варьирует от 30 до 100 нм [165, 536, 537, 544, 545]; во-вторых, что большинство из них попадают в диапазон 35–40 нм [163, 546]; в-третьих, несмотря на фильтрацию ВВ сквозь фильтры с диаметром пор 0,1 мкм [547], значительное их количество размером 300–400 нм остаётся в моче (данные получены с использованием NanoSight LM10 (Malvern, UK)) (рис. 3.8.).

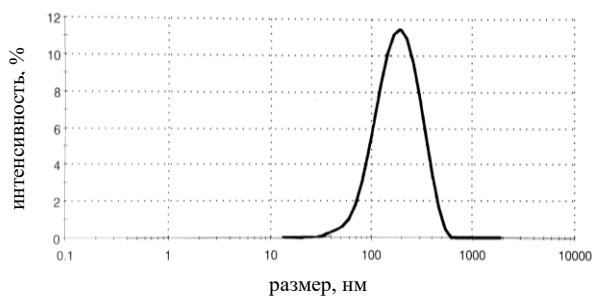


Рисунок 3.8. Распределение по размерам ВВ мочи, выделенных ультрацентрифугированием и визуализированных с помощью NanoSight LM10.

Данные ТЭМ относительно фракции СВВ были подтверждены методом динамического светорассеяния с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). Основная ширина полученных пиков соответствовала 180–260 нм. Этим методом было подтверждено наличие частиц близкого размера (149 ± 20 нм) в моче 3Д и больных РПЖ (по 2 образца в каждой группе) (рис. 3.9.).

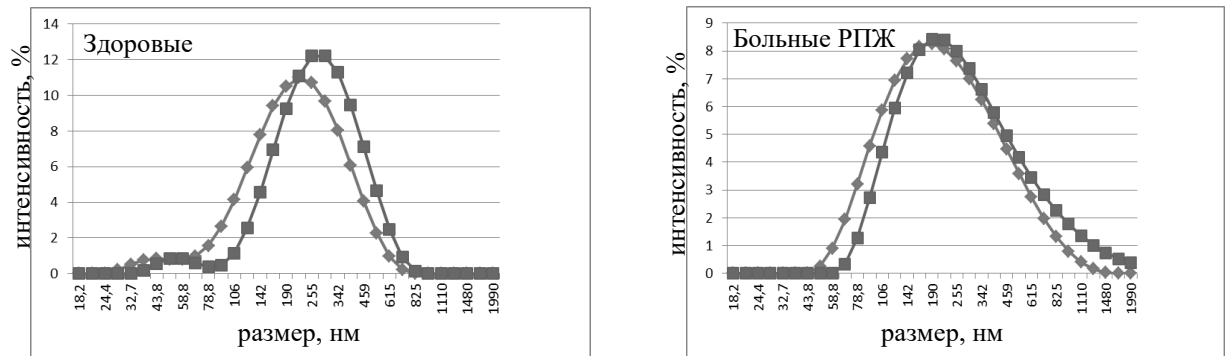


Рисунок 3.9. Распределение по размерам ВВ мочи, выделенных ультрацентрифугированием и визуализированных с помощью Zetasizer Nano ZS.

Необходимо отметить, что переоценка размера ВВ с помощью NanoSight LM10 и Zetasizer Nano ZS, а также недооценка размера при использовании ТЭМ [548] в сочетании с влиянием циклов замораживания/оттаивания потенциально могут мешать сравнению распределения ВВ по размерам и сравнению их профилей между различными исследованиями. В нашем исследовании изображения, полученные с использованием ТЭМ до и после фильтрации через фильтры с диаметром пор 0,1 мкм демонстрируют незначительное влияние подготовки образца для выполнения ТЭМ на размер ВВ.

Таким образом, показано, что в моче 3Д и больных РПЖ профиль СВВ примерно одинаковый, а их количество достаточно для дальнейшего изучения.

3.2.2. Количественное определение общего белка в составе внеклеточных везикул мочи

Косвенно количество микровезикул и экзосом можно оценить по концентрации общего белка в их препаратах. В литературе есть сообщения о том, что 48% общего белка мочи содержится в её осадке, 49% находится в растворимом виде [549] и 3% присутствует в составе экзосом [550, 551], которые содержат как универсальные [552], так и уникальные наборы белков [553].

В нашем исследовании концентрацию белка в препаратах ВВ мочи оценивали с помощью набора NanoOrange Protein Quantification Kit, который включает в себя стадию нагрева образца с детергентом для лизиса везикул. Достоверных отличий в концентрациях

белка в препаратах ВВ мочи у онкологических больных и здоровых доноров обнаружено не было (рис. 3.10.). Концентрации белка в препаратах ВВ мочи составили $12 \pm 0,7$ мг/мл и $9 \pm 0,4$ мг/мл, соответственно (рис. 3.10.А), что соответствует 171 ± 22 нг и 140 ± 21 нг на мл мочи (рис. 3.10.Б). С учетом нормальной концентрации белка в моче (около 33 мкг/мл) и разведений при выделении ВВ, включая этапы ресуспендирования и центрифугирования, препараты ВВ содержали не более 3 нг/мл остаточного белка мочи. Таким образом, содержание белка в препаратах ВВ составляет примерно 0,6% от общего белка мочи. Следует отметить, что только 75% общего белка СВВ было связано с ФОЭ, которые составляют 90-95% всех везикул. Таким образом, 5–10% крупных везикул (>110 нм) содержали 25% всего белка, ассоциированного с ВВ, что свидетельствует о разной природе мелких (<100 нм) и крупных, богатых белком ВВ. Например, часть крупных везикул могут быть эктосомами, которые отличаются от экзосом механизмом высвобождения и составом, в том числе и белковым [530]. При развитии различных заболеваний урогенитального тракта белковый состав ВВ может изменяться, некоторые исследователи предполагают развитие методов диагностики на основе анализа белков ВВ [530].

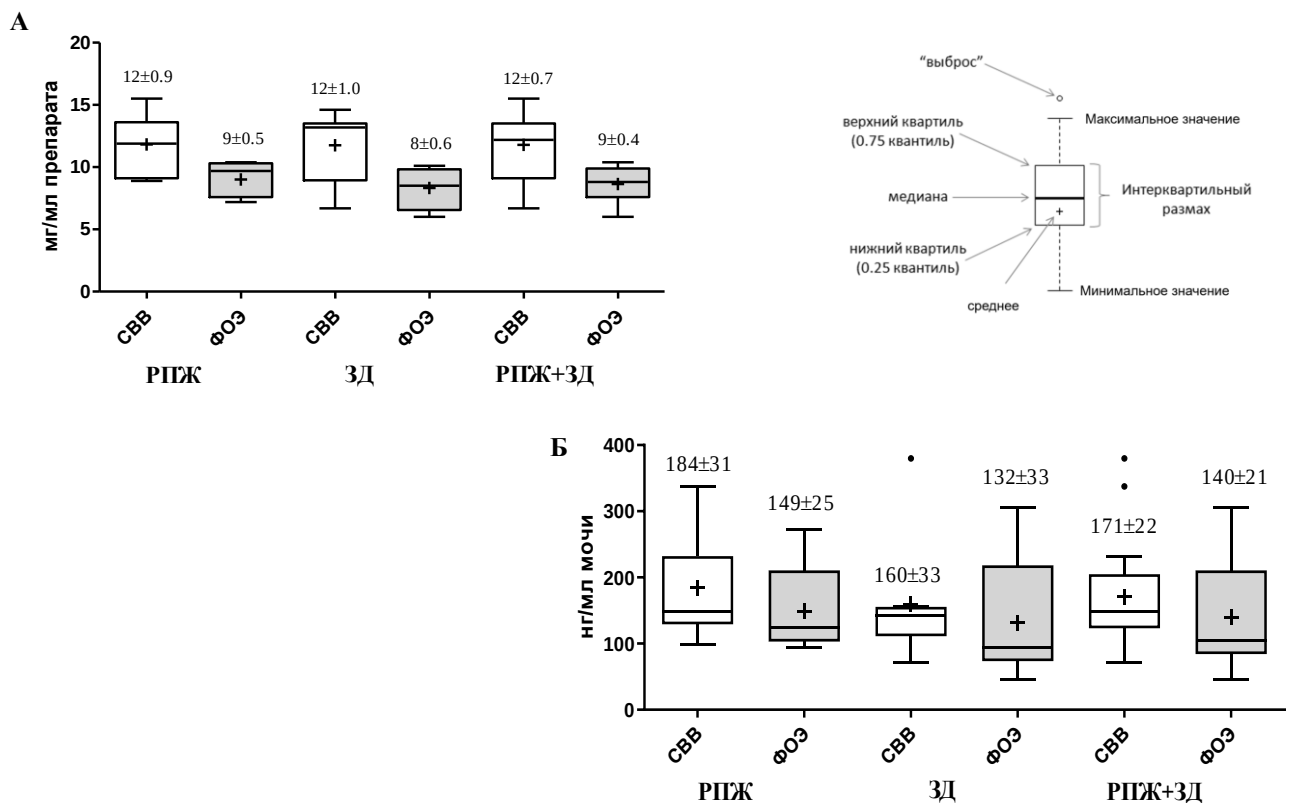


Рисунок 3.10. Концентрация белка в составе ВВ мочи больных РПЖ и здоровых доноров, представленные в мг на мл препарата (А) или нг на мл мочи (Б).

По литературным данным спектр белков, обнаруживаемых в экзосомах мочи, включает более трех тысяч наименований [554] и продолжает быстро расширяться [552]. Некоторые авторы сообщают о концентрации белка в экзосомах мочи здоровых доноров от 2,78 до 11,8 мкг/мл мочи [532, 551]; результаты других исследователей варьируют от 0,11 до 0,635 мкг/мл мочи [555, 556]. Следует отметить, что используемый нами флуоресцентный краситель NanoOrange (в отличие от BCA assay kit) обеспечивает высокую специфичность обнаружения белка, а протоколы для выделения ВВ из мочи включали несколько стадий промывки и повторного осаждения, что уменьшало загрязнение препаратов ВВ белком мочи. Принимая во внимание распределение микровезикул по размеру во ФОЭ и более крупных везикул (рис. 3.7.), тривиальная оценка их внутреннего объема показывает, что экзосомы и более крупные везикулы имеют примерно равный внутренний объем. Поскольку более крупные везикулы несут примерно 25% общего белка ВВ, логично предположить, что состав биополимеров/биомолекул мелких везикул во ФОЭ и более крупных везикул сильно различается.

3.2.3. Исследование нуклеиновых кислот ВВ мочи

На момент нашего исследования было известно, что в составе экзосом встречаются мРНК и микроРНК, а относительно ДНК были несистемные и плохо стыкующиеся друг с другом данные [557–561]. Поскольку нами было обнаружено, что в микрочастицах мочи находится много белка, было исследовано также содержание ДНК и РНК. ДНК в составе фракции СВВ и ФОЭ мочи оценивали при помощи мультиплексной TaqMan ПЦР (α -сателлитные элементы и повторы *LINE1*) (см. п. 2.2.7.11.).

В нашем исследовании не было обнаружено достоверных отличий в концентрациях внеклеточной ДНК в препаратах СВВ и ФОЭ мочи больных РПЖ и ЗД. Значение медианы для концентрации ДНК во фракции СВВ составило 18 пг/мл (максимальное значение было 200 пг/мл), а во ФОЭ – 2,6 пг/мл (максимальное значение было 50 пг/мл) (рис. 3.11.). Известно, что концентрация вДНК в моче здорового мужчины составляет от 6 нг/мл до 50 нг/мл [562]. Таким образом, во фракции микрочастиц содержится не более 0,2% общей вДНК мочи, что составляет всего несколько геном-эквивалентов ДНК. Такая низкая концентрация вДНК представляет ее исследование крайне сложным, а результаты неоднозначными, и не позволяет использовать эту ДНК в диагностических целях.

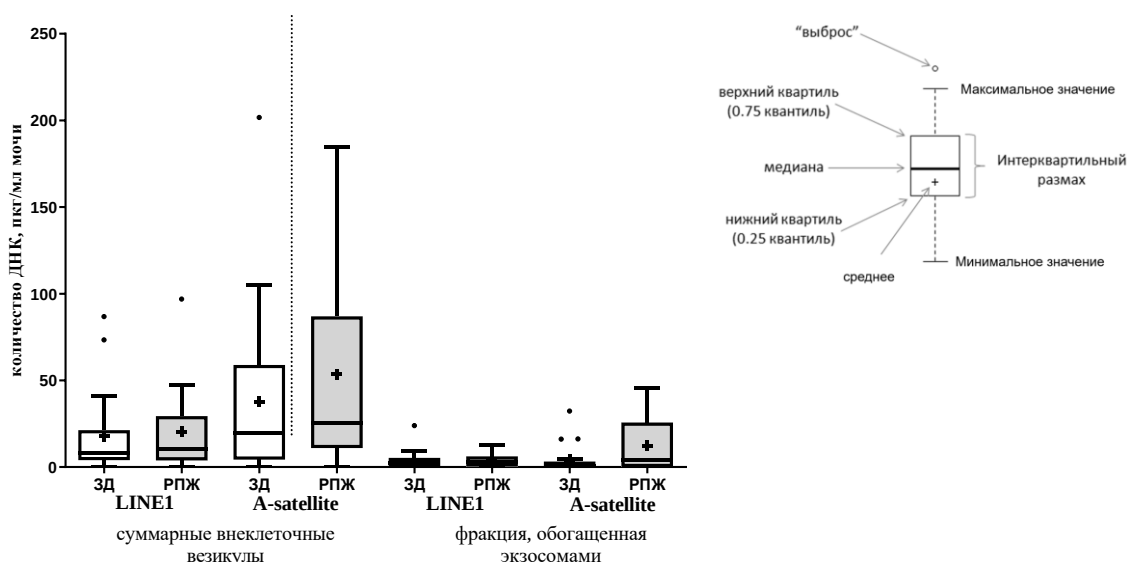


Рисунок 3.11. Концентрация ДНК в препаратах ВВ мочи здоровых доноров и больных РПЖ, определенная с помощью мультиплексной TaqMan ПЦР нацеленной на *LINE1* элементы и α -сателлитные повторы ДНК человека.

Предположительно, внДНК ВВ мочи может быть связана с поверхностью везикул, подобно фрагментам ДНК размером 25–1500 н., чувствительным к обработке ДНКазой и обнаруженным в препаратах экзосом мочи К. Miranda с соавт. [563]. Двухцепочечная геномная ДНК также ранее была обнаружена в препаратах экзосом сыворотки крови [564] и экзосом, высвобождаемых из клеток рака поджелудочной железы и клеточных линий GBM [564, 565] в количествах, сравнимых с обнаруженными в нашем исследовании. Кроме того, и более короткая митохондриальная ДНК была обнаружена в экзосомах миобластов C2C12 [566], клеток глиобластомы и астроцитов [567]. Присутствие рецепторов клеточной поверхности на экзосомах, в том числе опосредующих связывание ДНК, может служить объяснением наличия чувствительности ДНК из фракции внеклеточных везикул к ДНК-гидролизующим ферментам [568].

Концентрация РНК во ФОЭ и СВВ мочи (рис. 3.12.) у здоровых доноров и больных РПЖ также находилась в диапазоне пикограмм на миллилитр мочи и не превышала 290 пг/мл мочи. Ранее было показано, что концентрация внРНК в моче здорового мужчины составляет от 24 нг/мл до 140 нг/мл [562], что так же говорит о содержании не более 0,2% внРНК в составе ВВ от суммарной внРНК мочи. Размер суммарной РНК в составе ВВ мочи здоровых доноров и пациентов с РПЖ в обеих фракциях внеклеточных везикул варьировал от 30 до 180 н. (рис. 3.12.). Полученные нами профили суммарных РНК были близки к профилям, полученным F. Royo с соавторами [547] и характерны для РНК экзосом.

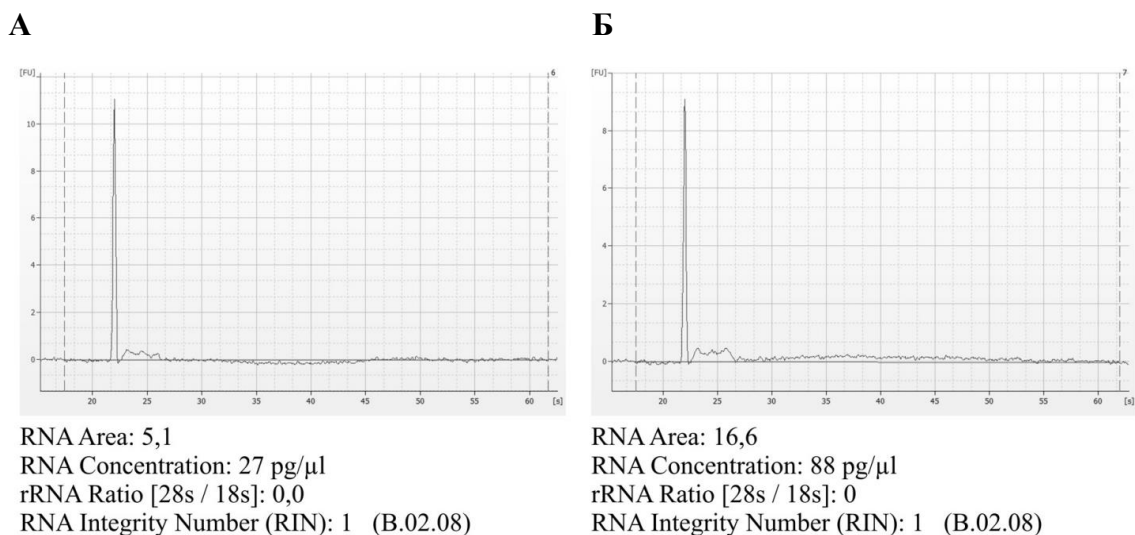
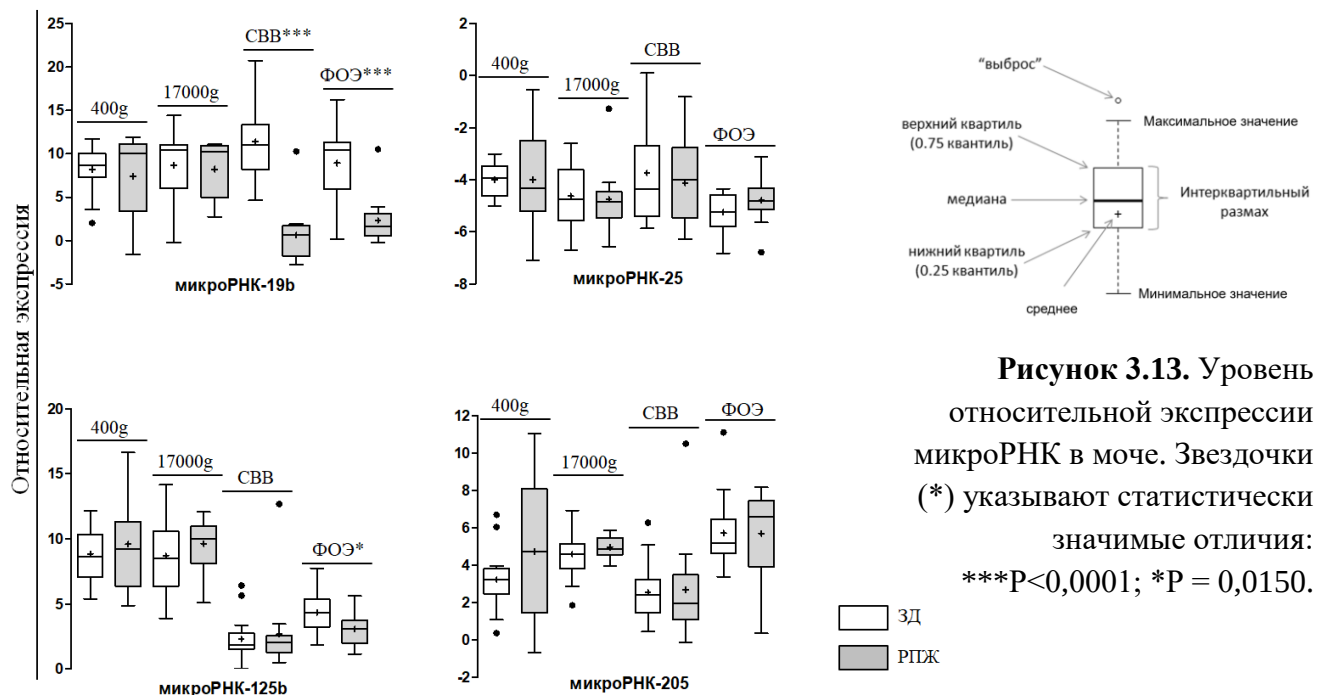


Рисунок 3.12. Данные Bioanalyzer Agilent 2100 образцов внеклеточных РНК, выделенных из ФОЭ мочи здоровых доноров (А) и больных РПЖ (Б). Показаны распределение по размеру нуклеотидов РНК и интенсивность флуоресценции. Внутренним стандартом является пик 22 н.

Такие профили предполагают наличие tРНК (73–93 н.), 5,8 rРНК (~150 н.), snoРНК (10–20 н.), snРНК (60–300 н.), рiРНК (29–30 н.), miРНК (20–25 н.), siРНК (21–25 п.н.) и фрагментированных РНК [165] в препаратах ВВ. В литературе имеются и альтернативные данные о РНК в составе экзосом/микровезикул мочи. Некоторые из них свидетельствуют о наличии в основном интактных 18S и 28S rРНК и концентрации РНК в диапазоне от 381 ± 47 нг/мл до 410 ± 28 нг/мл [563] и до 0,2–0,4 нг/мл [165]; в других исследованиях говорится о том, что 80% экзосомной РНК представляет собой микроРНК [170], причём её количество составляет от 15 нг/мл мочи и выше [544, 546]. Вполне вероятно, что расхождения в данных о размере и концентрации РНК возникают из-за различий в способах её выделения, которые могут оказывать влияние не только на стабильность РНК, включая микроРНК, но и на эффективность выделения РНК разного размера. С точки зрения практического использования микроРНК по-прежнему считаются выгодными мишенями для диагностики, а их концентрации во фракциях ВВ мочи в диапазоне десятков пг/мл согласно математическим расчётам достаточны для надёжной детекции (как описано выше, в 1 мл мочи содержится 10^9 экзосом, в каждой из которых находится ~по 1 молекуле микроРНК [569]; на сегодняшний день у человека известно около 3000 микроРНК [88], таким образом, из экзосом, выделенных из 1 мл мочи можно получить около 3×10^5 копий одной микроРНК, что является достаточным при ПЦР-анализе).

3.2.4. МикроРНК мочи

Для того чтобы выяснить как распределены микроРНК в моче, встречаются ли они в одинаковом количестве в разных фракциях или распределены неравномерно и преимущественно представлены в одной из фракций, а также изменяется ли количество вн-микроРНК при развитии рака предстательной железы, мы исследовали концентрации микроРНК экспрессия которых у пациентов с РПЖ отчается от таковой у ЗД [570, 571]. Были выбраны четыре микроРНК (микроРНК-19b, -25, -205, -125b), которые ранее были предложены в качестве потенциальных маркеров РПЖ [571–573]. МикроРНК-16, характеризующаяся относительно стабильной экспрессией, была использована в качестве нормализатора. Таким образом, при помощи TaqMan ОТ-ПЦР в режиме реального времени (см п. 2.2.6.9.) нами были измерены концентрации пяти микроРНК в супернатантах, полученных после центрифугирования мочи при 400g и 17000g, а также во фракциях СВВ и ФОЭ (рис. 3.13.). Выделяли микроРНК с использованием однофазного протокола (хлороформ: спирт: вода), как описано в п.2.2.7.4.



Для изучения распределения микроРНК между фракциями были рассчитаны коэффициенты корреляции между концентрациями микроРНК в пересчёте на исходный объем мочи с учетом всех разведений и в предположении равной эффективности ОТ и ПЦР (таблица 3.8.). Данные, представленные в таблице 3.8., показали, что микроРНК присутствуют как во фракциях ВВ, так и во фракциях их не содержащих. Значимые корреляции ($|R| > 0,6$, $P < 0,05$) концентраций микроРНК в разных фракциях мочи информируют о том, что эти микроРНК одинаково представлены и с более-менее близкой эффективностью могут быть

выделены из этих фракций. Например, микроРНК-16 и -205 хорошо представлены во фракциях ФОЭ и СВВ в обеих группах доноров, т.е. эти микроРНК локализованы преимущественно во фракции внеклеточных везикул. Кроме того, полученные данные указывают на то, что микроРНК-16 преимущественно находится во ФОЭ мочи независимо от состояния здоровья; в отличие от микроРНК-19b, которая преимущественно обнаруживалась во ФОЭ у больных РПЖ, но не у здоровых доноров (рис. 3.14.).

Таблица 3.8. Корреляция Спирмена для оценки изменений экспрессии микроРНК между различными фракциями мочи*.

Здоровые доноры				Больные РПЖ		
	17000g	СВВ	ФОЭ	17000g	СВВ	ФОЭ
микроРНК-16						
400g	0,08 (P=0,7)	0,58 (P=0,009)	0,43 (P=0,058)	0,009 (P=0,98)	-0,03 (P=0,91)	-0,09 (P=0,75)
17000g		0,12 (P=0,62)	0,06 (P=0,8)		0,03 (P=0,93)	0,2 (P=0,49)
СВВ			0,9 (P<0,00001)			0,89 (P=0,00002)
микроРНК-19b						
400g	-0,35 (P=0,12)	0,16 (P=0,52)	-0,006 (P=0,98)	0,22 (P=0,45)	0,32 (P=0,27)	0,37 (P=0,19)
17000g		0,16 (P=0,5)	0,12 (P=0,6)		0,33 (P=0,25)	0,32 (P=0,27)
СВВ			0,42 (P=0,07)			0,89 (P=0,00002)
микроРНК-25						
400g	0,27 (P=0,25)	0,43 (P=0,06)	0,26 (P=0,27)	-0,51 (P=0,06)	0,13 (P=0,65)	0,39 (P=0,17)
17000g		-0,02 (P=0,94)	-0,29 (P=0,21)		-0,64 (P=0,015)	-0,39 (P=0,17)
СВВ			0,74 (P=0,0003)			0,46 (P=0,09)
микроРНК-205						
400g	-0,04 (P=0,86)	0,53 (P=0,02)	0,57 (P=0,009)	0,42 (P=0,14)	0,43 (P=0,12)	0,43 (P=0,13)
17000g		0,21 (P=0,4)	0,02 (P=0,95)		0,43 (P=0,13)	0,15 (P=0,6)
СВВ			0,9 (P<0,00001)			0,74 (P=0,002)
микроРНК-125b						
400g	0,25 (P=0,29)	0,25 (P=0,3)	0,31 (P=0,18)	-0,19 (P=0,52)	0,28 (P=0,34)	0,28 (P=0,33)
17000g		0,32 (P=0,18)	0,37 (P=0,11)		-0,28 (P=0,34)	-0,35 (P=0,22)
СВВ			0,95 (P<0,00001)			0,95 (P<0,00001)

*все данные были нормированы на исходный объём мочи

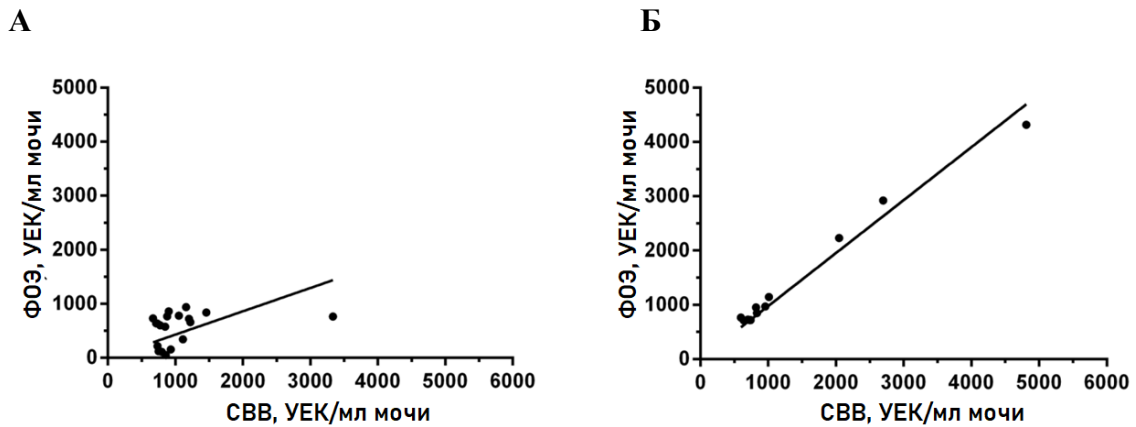


Рисунок 3.14. Пример графиков корреляции Спирмена для микроРНК-19b во фракциях СВВ и ФОЭ у здоровых доноров (А) и больных раком предстательной железы (Б). УЕК – условные единицы концентрации.

Перераспределение микроРНК между фракциями ВВ мочи и безвезикулярными фракциями предположительно происходит при развитии онкологического заболевания предстательной железы. Действительно, у здоровых доноров микроРНК-25 преимущественно упакована во ВВ (фракции ФОЭ/СВВ мочи ($R=0,74$, $P=0,0003$)), а у больных РПЖ ее количество возрастает в супернатанте после центрифугирования при 17000g ($R=-0,64$, $P=0,015$, 17000g/микровезикулы), т.е. наряду с упакованной во ВВ появляются невезикулярные комплексы этой микроРНК. Две оставшиеся из изучаемых микроРНК, микроРНК-205 и микроРНК-125b, в основном были обнаружены в СВВ как у здоровых доноров, так и у пациентов с РПЖ.

Наши данные показывают, что при развитии рака предстательной железы происходит перераспределение некоторых микроРНК, в частности, микроРНК-19b, которая обнаруживается в основном во фракциях ВВ у больных РПЖ, в отличие от ЗД, у которых она присутствует в безвезикулярных супернатантах. Это свидетельствует об активной секреции везикул, содержащих микроРНК-19b, опухолевыми клетками. Таким образом, распределение тех или иных микроРНК между безвезикулярными комплексами и различными типами ВВ может быть дополнительным диагностическим критерием наряду с изменениями экспрессии микроРНК и должно учитываться при разработке диагностических систем на основе внеклеточных микроРНК мочи. А использование ВВ в качестве источника микроРНК-биомаркеров вместо различных супернатантов мочи позволит преодолеть некоторые технические трудности работы с большими объемами жидкости при выделении РНК.

С использованием критерия Манна-Уитни, были найдены статистически значимые различия между значениями dCt микроРНК-19b во фракциях СВВ и ФОЭ ($P<0,0001$) и dCt микроРНК-125b во фракциях ФОЭ ($P = 0,0150$) у здоровых доноров и пациентов с РПЖ (таблица 3.9.).

Таблица 3.9. Экспрессия и диагностические характеристики микроРНК в образцах мочи здоровых доноров и больных РПЖ.

	Фракция мочи			
	400g	17000g	СВВ	ФОЭ
микроРНК-205				
ddCt, ЗД/РПЖ	-1,03	-0,40	-0,81	-0,25
Чувствительность	64%	71%	64%	57%
Специфичность	87%	55%	42%	75%
P value	0,2658	0,1324	0,9855	0,6618
микроРНК-125b				
ddCt, ЗД/РПЖ	-0,97	-0,35	-0,38	1,26
Чувствительность	50%	71%	64%	86%
Специфичность	67%	65%	53%	65%
P value	0,7107	0,2142	0,9564	0,0150
микроРНК-25				
ddCt, ЗД/РПЖ	-0,01	0,11	0,39	-0,46
Чувствительность	43%	64%	50%	71%
Специфичность	80%	55%	53%	60%
P value	0,8272	0,5403	0,5848	0,1369
микроРНК-19b				
ddCt, ЗД/РПЖ	2,94	0,70	11,01	6,08
Чувствительность	50%	50%	93%	79%
Специфичность	87%	60%	100%	95%
P value	0,6784	0,6119	<0,0001	<0,0001

ROC-анализ экспрессии микроРНК во всех фракциях мочи показал, что диагностически значимой была только разница в концентрациях микроРНК-19b во фракциях ВВ. Это позволило дифференцировать больных РПЖ от клинически здоровых доноров с 93% чувствительностью при 100% специфичности и с 79% чувствительностью при 95% специфичности для фракций СВВ и ФОЭ, соответственно (таблица 3.9.). Таким образом, мы показали, что количественное определение микроРНК (в частности, микроРНК-19b) в микровезикулах мочи может быть использовано в качестве одного из критериев диагностики рака предстательной железы.

В большинстве исследований для анализа микроРНК используется клеточный осадок мочи, полученный после низкоскоростного центрифугирования [281, 574]. Однако было показано, что большая часть РНК в клеточных осадках мочи имеет низкое качество и быстро деградирует [544]. Это неудивительно, поскольку в почках, мочевом пузыре и мочевыводящих путях наблюдается высокая активность РНКаз для поддержания стерильности и защиты выделительной системы от микробных инфекций [18].

В отличие от профилей микроРНК, обнаруженных в плазме крови, бесклеточная фракция мочи не содержит большого количества микроРНК, что подтверждают исследования с использованием 2,5 мл бесклеточной мочи, в которой было надежно обнаружено только 12 микроРНК [544]. Напротив, 1 мл плазмы или сыворотки крови может содержать в своём

составе более 500 микроРНК [575]. Низкое количество обнаруженных микроРНК во фракциях мочи, не содержащих клеток, дополнительно подтверждает наличие высокой активности РНКаз в мочевом пузыре по сравнению с сывороткой [576].

Объем мочи (20 мл), необходимый для выделения достаточного количества экзосом, намного больше, чем объем бесклеточной фракции мочи (2,5 мл), обычно используемый для выделения внеклеточной микроРНК. При этом в осадке экзосом, полученном ультрацентрифугированием, было обнаружено 184 микроРНК, только 7 из них были обнаружены и в бесклеточной фракции мочи [544]. Эти данные указывают на селективную упаковку микроРНК во ВВ или существенно меньшее время жизни невезикулярных комплексов микроРНК из мочи и подтверждают полученные нами данные о распределении вн-микроРНК в моче.

Независимо от метода выделения микроРНК, количественное её определение доказывает, что интактные микровезикулы, включая экзосомы, обогащены микроРНК по сравнению с клеточным осадком и бесклеточным компонентом мочи. Обилие микроРНК в экзосомах дополнительно поддерживает их функцию транспортных везикул, способных безопасно переместить генетический материал, заключенный и защищенный мембраной экзосом, который в противном случае был бы подвергнут гидролизу РНКазами. Представление о том, что ВВ мочи могут быть стабильным источником микроРНК, делает мочу привлекательным биологическим источником биомаркеров.

Поскольку обе фракции ВВ содержат диагностически значимые микроРНК в количестве, достаточном для анализа, но ROC-анализ показал частичную потерю диагностической информации, да и способ получения фракции СВВ менее трудозатратен, то в дальнейшем мы работали именно с фракцией СВВ мочи.

3.2.5. МикроРНК мочи – расширенный поиск потенциальных онкомаркеров рака предстательной железы

3.2.5.1. Поиск потенциальных онкомаркеров рака предстательной железы с помощью on-line доступных баз данных

Поскольку микроРНК-19b во внеклеточных везикулах мочи имела наибольшую диагностическую ценность, микроРНК-125b в экзосомах мочи имела приемлемую диагностическую ценность, а микроРНК-205 [577] и в плазме крови продемонстрировала хорошие диагностические характеристики ($AUC=0,85$, чувствительность 85% и специфичность 83%), мы проанализировали гены, на которые нацелены эти три микроРНК, с целью поиска дополнительных микроРНК - онкомаркеров, способных «усилить» потенциальную диагностическую систему на РПЖ.

Мишени для микроРНК-19b, -125b и -205 были идентифицированы с использованием базы данных DIANA со статистически значимым значением ($P < 0,05$). Обнаружено, что мишени для этих трех микроРНК пересекаются в рамках четырех путей KEGG (из 35, предложенных базой данных DIANA): протеогликан при раке (64 гена), вирусный канцерогенез (65 генов), рак предстательной железы (34 гена) и метаболизм углерода при раке (23 гена). Онтология всех 34 генов, участвующих в развитии рака предстательной железы (*BRAF*, *GSK3B*, *E2F1*, *ERBB2*, *NFKB1*, *E2F2*, *NRAS*, *PIK3CB*, *PIK3R5*, *RAF1*, *BCL2*, *CDKN1B*, *IGF1R*, *TP53*, *CREB1*, *PIK3R3*, *CCND1*, *CTNNB1*, *CCNE2*, *E2F3*, *AKT1*, *HSP90B1*, *HRAS*, *CREB3L2*, *CCNE1*, *PDGFD*, *CDKN1A*, *MAP2K1*, *FGFR2*, *PTEN*, *FGFR1*, *MAPK1*, *CREBBP*, *MDM2*) была дополнительно проанализирована с использованием базы данных PANTHER, предназначенной для классификации белков (и их генов) (рис. 3.15.).



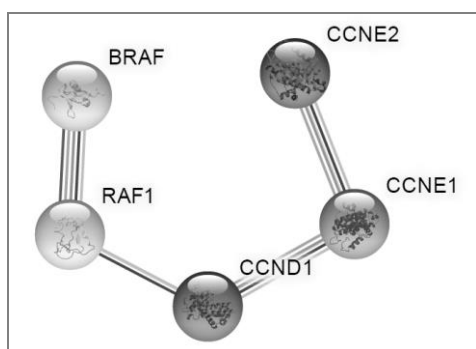
Рисунок 3.15. Данные базы PANTHER: биологические процессы, в которых принимают участие 34 гена при развитии рака предстательной железы.

Было обнаружено, что гены *CCND1*, *BRAF*, *CCNE1*, *CCNE2* и *RAF1* связаны с процессами репродукции, которые относятся к специфической функции предстательной железы (таблица 3.10.).

Согласно данным STRING (база данных известных и предсказанных белок-белковых взаимодействий), этот набор генов является компонентами одного и того же сигнального пути (рис. 3.16.).

Таблица 3.10. Функции генов, участвующих в процессах репродукции (данные базы STRING).

<i>CCND1</i>	Cyclin D1: регуляторный компонент комплекса циклин D1-CDK4 (DC), который фосфорилирует и ингибирует представителей семейства белков ретинобластомы (RB), включая <i>RB1</i> , и регулирует клеточный цикл во время перехода G1/S. Фосфорилирование <i>RB1</i> позволяет отделить фактор транскрипции E2F от комплекса RB/E2F и последующей транскрипцией генов-мишеней <i>E2F</i> , которые ответственны за прохождение через фазу G1. Гипофосфорилирует <i>RB1</i> в ранней фазе G1. Комплексы циклин D-CDK4 являются основными интеграторами различных митогенных и антимитогенных сигналов.
<i>RAF1</i>	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1: серин/треонин-протеинкиназа, которая действует как регулирующее звено между ассоциированными с мембраной Ras ГТФазами и каскадом MAPK/ERK, является важнейшим регуляторным звеном и функционирует как переключатель, определяющий решения клеточной судьбы, включая пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, выживание и онкогенную трансформацию. Активация <i>RAF1</i> инициирует каскад митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK), который включает последовательное фосфорилирование киназ MAPK с двойной специфичностью (MAP2K1/MEK1 и MAP2K2/MEK2) и киназы, регулируемые внеклеточными сигналами.
<i>CCNE1</i>	Cyclin E1: необходим для контроля клеточного цикла при переходе G1/S.
<i>BRAF</i>	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1: протеинкиназа, участвующая в передаче митогенных сигналов от клеточной мембраны к ядру. Может играть роль в постсинаптических ответах нейронов гиппокампа. Фосфорилирует <i>MAP2K1</i> и, таким образом, вносит свой вклад в путь передачи сигнала киназы MAP.
<i>CCNE2</i>	Cyclin E2: необходим для контроля клеточного цикла в поздней G1 и ранней S фазах.

**Рисунок 3.16.** Данные базы STRING: сеть взаимодействий пяти генов из категории процессов репродукции базы PANTHER.

Известно, что *CCND1*, *CCNE1*, *CCNE2* участвуют в регуляции активности CDK, тогда как *BRAF* и *RAF1* являются частью пути MAPK. Неудивительно, что анализ путей KEGG показал, что они связаны с развитием рака предстательной железы и путями при развитии других онкологических заболеваний — все 5 генов; с развитием гепатита В и путём PI3K-Акт

— 4 гена (*CCND1*, *CCNE1*, *CCNE2*, *RAF1*); с работой p53-пути и клеточного цикла – 3 гена (*CCND1*, *CCNE1*, *CCNE2*); с работой протеогликанов при раке, сигнальным путём FoxO, фокальной адгезией и рядом других видов рака, включая колоректальный рак, рак мочевого пузыря, немелкоклеточный и мелкоклеточный раки легкого, рак поджелудочной железы, глиому, меланому — 3 гена (*BRAF*, *RAF1*, *CCND1*).

Кроме того, регуляция этих пяти генов с помощью микроРНК-19b, -125b и -205 была перекрестно подтверждена с использованием трёх баз данных: TargetScan (база данных прогнозируемых мишеней микроРНК), MiRTarBase (база данных экспериментально подтвержденных взаимодействий микроРНК-мишеней) и miRDB (онлайн-база данных мишеней микроРНК). Согласно этим трем базам данных, ни одна из изученных микроРНК напрямую не нацелена на *BRAF* или *CCNE2*. *CCND1* является предполагаемой мишенью микроРНК-19b (TargetScan), и только miR125b, как было экспериментально подтверждено и в соответствии с данными MiRTarBase, нацелена на экспрессию *CCNE1*. В регуляции гена *RAF1* участвуют две микроРНК: микроРНК-19b (по данным всех трёх баз данных) и микроРНК-125b (по данным TargetScan и MiRTarBase). Таким образом, регуляция гена *RAF1* может быть важной особенностью клеток рака предстательной железы, что подтверждается опубликованными данными о нарушении регуляции пути RAF при раке предстательной железы [578, 579]. Соответственно, микроРНК, связанные с путем RAF, могут представлять собой удобные мишени для диагностики рака предстательной железы.

Анализ трех баз данных (TargetScan, MiRTarBase и miRDB) с учетом эффективности связывания микроРНК с последовательностями-мишенями, доступными в базе TargetScan, показал, что четыре микроРНК, нацеленных на ген *RAF1* (представлены одновременно в трёх базах данных): микроРНК-16, -195, -497 и -7 могут быть предложены в качестве потенциальных онкомаркеров для диагностики рака предстательной железы.

Аналогичным образом мы изучили экспрессию 64 генов, обнаруженных в KEGG и относящихся к изменениям протеогликанов при развитии онкологических заболеваний (*ESR1*, *BRAF*, *ACTB*, *TLR2*, *PRKCA*, *FZD5*, *ERBB2*, *ITGB1*, *EZR*, *ROCK1*, *SDC1*, *NRAS*, *THBS1*, *PIK3CB*, *WNT10B*, *CAV1*, *ARHGEF12*, *PIK3R5*, *PPP1CC*, *MAPK14*, *ACTG1*, *PXN*, *FRS2*, *RDX*, *IQGAP1*, *RAF1*, *TIAM1*, *WNT3*, *IGF1R*, *ERBB3*, *TWIST2*, *RRAS2*, *TP53*, *CTTN*, *SLC9A1*, *FZD4*, *NUDT16L1*, *CASP3*, *PIK3R3*, *CCND1*, *CTNNB1*, *HIF1A*, *AKT1*, *IGF2*, *FLNA*, *ITPR1*, *PRKX*, *DDX5*, *SRC*, *FGF2*, *PPP1R12C*, *FAS*, *HRAS*, *SDC2*, *FN1*, *CDKN1A*, *MAP2K1*, *SMO*, *VMP1*, *VEGFA*, *FGFR1*, *MAPK1*, *MDM2*, *PRKACB*). Известно, что основной функцией протеогликанов, принимающих участие в процессах развития организма и его дифференцировке [580], является поддержание контактов клетки с окружающим её внеклеточным матриксом [581]. Не удивительно, что протеогликанов вовлечены не только в процессы воспаления, но и в процессы развития опухолей, включая РПЖ

[582, 583], поскольку при злокачественной трансформации клеток наблюдаются структурные и функциональные изменения этих молекул, как в составе самих опухолевых клеток, так и их окружения [584, 585]. Только три из рассматриваемых генов (*CCND1*, *BRAF* и *RAF1* (таблица 3.10.)) участвуют в процессах репродукции, совпадая с генами, участвующими в развитии рака предстательной железы, описанными выше, включая перспективный онкоген *RAF1*.

Таким образом, выполненный биоинформатический анализ стал вторым большим шагом в поиске потенциальных микроРНК - маркеров для диагностики рака предстательной железы.

3.2.5.2. Разработка панели микроРНК для микрочипового исследования

Третьим шагом в поиске потенциальных микроРНК-онкомаркеров стало масштабное исследование 84-х вн-микроРНК мочи при помощи сравнительного анализа на платформе miRCURY LNA miRNA qPCR Panels, которая основана на количественной Sybr Green ПЦР выбранных микроРНК (таблица 2.10.) с использованием LNA праймеров.

Из предложенных для анализа микроРНК, входящих в панель Exiqon для исследования мочи, нами были выбраны 67 микроРНК, а остальные, специфичные для РПЖ микроРНК, были добавлены исходя из экспериментальных данных, полученных нами ранее и описанных в главах 3.2.4. и 3.2.6.1., анализа литературных данных и данных базы miRTarBase. А именно, исследуемая на платформе miRCURY микроРНК, по данным miRTarBase должна оказывать своё влияние на работу генов, описанных в главе 3.2.6.1., генов тестостеронового пути (*CYP19A1*, *SRD5A1*, *SRD5A2*, *AKR1C2*, *LHGR*, *HSD17B6* – ответственные за формирование резистентности или чувствительности клеток РПЖ к андрогенам), *AR* (андрогена) или иных генов, входящих в состав PI3K-AKT пути (сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназы, являющийся одним из наиболее часто активируемых путей передачи сигнала при развитии онкологических заболеваний человека, включая РПЖ [586]) и по литературным данным изменять уровень своей экспрессии при онкологических заболеваниях предстательной железы. Дополнительными «плюсами» для включения микроРНК в исследуемую панель было обнаружение их аберрантной экспрессии в крови и/или моче при развитии РПЖ, а также влияние на работу таких генов, как *BRCA1*, *BRCA2* (клинически значимые мутации в которых повышают риск развития РПЖ и его гистологическую степень, а также связаны с более агрессивным клиническим течением заболевания. Кроме того, их зачастую обнаруживают при наследственном РПЖ [587]), *GSTP1* и *RNF219*, гиперметилование которых зачастую наблюдается не только в опухолях предстательной железы, но и в биологических жидкостях при развитии РПЖ [309–311, 313].

Например, потенциальная перспективность микроРНК-125b, -16 и 195, предложенных фирмой Exiqon, была подтверждена как нашими исследованиями, описанными выше, так и

другими научными группами (причём как с точки зрения диагностики заболевания, так и прогноза ответа на проводимую терапию) [588–591]. Биоинформационный анализ также показал участие этих микроРНК в работе нескольких генов, описанных в главе 3.2.6.1, например *BCL2*, *AKT1*, *CCND1*, *FGFR1*, *WNT3* и д.р.

Потенциальная диагностическая и прогностическая роль в отношении РПЖ микроРНК-10b, -15a, -15b, -17, -20a, -21, -22, -23b, -24, -27b, -29a, -29b, -29c, -30a, -30b, -30c, -30d, -30e, -31, -34a, -92a, -93, -99b, -101, -103, -106b, -107, -126, -133a, -141, -145, -148a, -149, -151, -187, -191, -193b, -200a, -200b, -200c, -210, -221, -222, 375, -378, -423, -425, -429, -574, -582, -660, let-7b, let-7d, let-7g (в том числе и в составе внеклеточных везикул мочи), предложенных фирмой Exiqon была продемонстрирована в работах и обзорах [273, 296, 308, 588, 589, 591–608] и отражена в базе miRTarBase не только в отношении генов *BCL2* и *CCND1*, но и, например, *E2F3*, *E2F1*, *E2F2*, *PTEN*, *PDK1*, *AR*, *CCNE1*, *HIF1A*, *VEGFA*, *ERBB2*, *CREB1*, *CDKN1B*, *CTNNB1*, *AKT3*, *IGF1R*, *BRAF*, *FAS*, *NFKB1*, *HSP90B1*, *CDKN1A*, *CYP19A1*, *AKR1C2*, *LHGR*, *CCNE2*, *SRD5A2*, *RNF219*, *BRCA1*, *BRCA2* и д.р. Несомненным «плюсом» для включения микроРНК в исследование с помощью микрочипов являлось и её участие в процессах пролиферации и миграции клеток как, например, для микроРНК-29c, -30e, -34a, -141, -200b, -582, и let-7f [594, 595, 601, 606, 609].

Поскольку одной из наших задач было найти онкомаркеры, способные не только дискриминировать больных РПЖ от ЗД, но и больных ДГПЖ от всех исследуемых групп, то в панель из предложенных фирмой Exiqon помимо микроРНК-191, -16, -30a, -30c были включены и микроРНК-25, -26b, -106a, let-7a, let-7i и let-7e [590, 610–612] оказывающие своё влияние на работу таких генов, как *E2F1*, *CDKN1A*, *PTEN*, *CCND1*, *SRD5A2*, *IGF1R* и д.р.

Помимо микроРНК, предложенных для анализа фирмой Exiqon, в панель дополнительно были включены (как и описано выше) такие микроРНК, как микроРНК-19b и -205 (показавшие высокий диагностический и прогностический потенциалы, включая дискриминирование группы больных доброкачественным заболеванием (ДГПЖ), как в наших предыдущих исследованиях, так и в работах других авторов [273, 572, 588–590]. МикроРНК-19b и -205 оказывают своё влияние на работу таких генов, как *PTEN*, *CYP19A1*, *BCL2*, *HRAS*, *FGFR1*, *ERBB3*, *SRC*, *HSD17B6*, а также *BRCA1*, важность работы которых описана выше.

Дополнительно в панель Exiqon нами были добавлены микроРНК-33a, -100, -143, -146a, -183, -214, -331, -346, -483, -484 и let-7c, изменения уровней экспрессии которых наблюдаются при развитии и прогрессировании РПЖ [572, 588, 595, 604, 605, 613, 614]. Эти микроРНК отвечают за работу таких важных при развитии РПЖ генов, как *ACTB*, *HIF1A*, *IGF1R*, *AKT1*, *CCND1*, *FoxO1*, *PIK3R3*, *LHGR*, *CREBBP*, *SRD5A1*, *ROCK1*, *MAPK1*, *HSP90B1*, *SRD5A2*, *AR*, а также *BRCA1* и *BRCA2*. МикроРНК-130a, -1285 и let-7c были добавлены в панель, поскольку их

абберрантная экспрессия наблюдалась у больных ДГПЖ относительно РПЖ и/или ЗД [590, 597, 611, 612].

В заключении мы добавили в исследуемую панель микроРНК-451a, являющуюся не только потенциальным онкомаркером РПЖ и отвечающую за работу таких генов, как, например, *BCL2* и *АКТ1*, но и являющаяся «маркером» гемолиза и попадания крови в мочу [337, 595, 615].

3.2.6. Исследование внеклеточных микроРНК мочи при помощи микрочипового анализа

3.2.6.1. Распределение отдельных микроРНК между фракциями внеклеточных везикул и супернатантом мочи

Возможные пути и механизмы генерации пула внНК мочи были обсуждены ранее. В частности, клубочковая ультрафильтрация не позволяет в норме попасть из крови в мочу частицам размером более 6,4 нм и с молекулярным весом, превышающим 70 кДа [616]. С другой стороны, надмолекулярные комплексы микроРНК могут попадать в мочу из клеток эндотелия мочевого пузыря и мочеточника, равно как и из секрета предстательной железы. Особенности распределения микроРНК между фракциями мочи особенно важны для выбора оптимального источника микроРНК, попадающих в мочу именно из предстательной железы и являющихся потенциальными диагностическими маркерами заболеваний ПЖ. Для того чтобы выбрать такой источник/фракцию микроРНК мочи при помощи сравнительного анализа на платформе miRCURY LNA miRNA qPCR Panels была исследована экспрессия 84-х микроРНК, описанных в главе выше, в образцах СВВ и супернатанта мочи после 17000g (СМ) у трёх групп доноров (по 10 человек в каждой группе): здоровых доноров и больных ДГПЖ и РПЖ (см п. 2.2.7.10., таблица 2.7.). МикроРНК выделяли из 2 мл СМ и 200 мкл фракции СВВ, полученных из 20-30 мл мочи. Как уже упоминалось в главе «Обзор литературы», платформа miRCURY LNA miRNA qPCR основана на количественном SYBR Green ПЦР с LNA-праймерами и обладает более высокой чувствительностью, динамическим диапазоном и специфичностью, чем конвекционные микрочипы.

Не менее 70-ти из 84-х микроРНК было обнаружено в каждом образце не зависимо от группы доноров; кроме того, более чем в 70% образцов было выявлено 72 микроРНК. В таблице 3.11. представлены данные парных сравнений (ddCt) достоверно отличающиеся между фракциями мочи хотя бы в одной из исследуемых групп доноров/пациентов.

Таблица 3.11. Результаты сравнения экспрессии микроРНК между фракциями мочи, полученные с помощью микрочипового анализа.

микроРНК	РПЖ		ДГПЖ		ЗД	
	P-value	ddCt (CBB - CM)	P-value	ddCt (CBB - CM)	P-value	ddCt (CBB - CM)
let-7a-5p	0,6523	0,2596	0,5781	-0,3358	0,0469	-1,2472
let-7b-5p	0,0977	-1,9521	0,0156	-1,9732	0,0391	-2,8268
let-7c-5p	0,0781	-1,1113	0,0313	-0,8976	0,0547	-1,6267
let-7d-3p	0,0078	-1,1815	0,2188	-0,4889	0,0547	-0,5068
let-7i-5p	0,0273	-1,7690	0,0156	-1,9217	0,0313	-1,6297
miR-15a-5p	0,0039	-0,8210	0,9375	0,1126	0,1484	-0,9342
miR-22-3p	0,0039	-1,8357	0,0313	-1,3648	0,0156	-1,7192
miR-23b-3p	0,0039	1,0138	0,0313	0,6452	0,0078	0,7962
miR-25-3p	0,0039	-1,6459	0,0156	-1,5436	0,0156	-1,3614
miR-26b-5p	0,0391	1,2291	0,0781	0,6546	0,9453	-0,1485
miR-27b-3p	0,0195	0,7474	0,2969	0,2305	0,3125	-0,2335
miR-29a-3p	0,0078	0,7380	0,0313	0,8929	0,5469	-0,2138
miR-29b-3p	0,0039	1,4939	0,0469	1,0169	0,3828	0,1817
miR-29c-3p	0,0078	0,6175	0,0313	0,6002	0,7422	0,0017
miR-30a-5p	0,0078	0,9227	0,1563	0,3559	0,5469	0,1076
miR-30b-5p	0,0039	1,6768	0,0156	1,1478	0,0391	0,7509
miR-30c-5p	0,0039	2,1381	0,0156	1,1340	0,0078	1,1448
miR-30e-5p	0,0391	0,6934	0,2188	0,2621	0,6406	-0,3790
miR-31-3p	0,0313	1,3094	0,0313	0,8869	0,0547	1,1269
miR-31-5p	0,0039	0,7300	0,0313	1,0441	0,2500	0,2783
miR-34a-5p	0,0117	-1,0906	0,0781	-0,9627	0,0313	-1,4074
miR-92a-3p	0,0039	1,0340	0,0156	0,8423	0,0234	1,0953
miR-100-5p	0,0195	-0,9161	0,0469	-0,9736	0,0547	-1,1450
miR-101-3p	0,0039	0,9452	0,0156	1,0734	0,3828	0,2155
miR-106b-5p	0,5703	0,2037	0,0313	0,7032	0,2969	0,1872
miR-107	0,0273	0,4468	1,0000	0,0529	0,6406	0,1529
miR-141-3p	0,0195	0,8915	0,0156	1,3346	0,1953	0,3761
miR-146a-5p	0,0313	-1,1711	0,1250	-1,2522	0,1875	-0,8803
miR-193b-3p	0,0039	-1,2846	0,0313	-1,2351	0,1563	-1,1112
miR-200a-3p	0,0391	0,3168	0,0781	0,4157	0,7422	-0,1160
miR-205-5p	0,0195	-1,0134	0,0781	-0,8749	0,1563	-1,0264
miR-210-3p	0,0078	-1,5356	0,8125	-0,2770	0,0313	-0,9959
miR-221-3p	0,0547	-0,7723	0,0313	-0,9054	0,0156	-1,5029
miR-331-3p	0,0039	1,9201	0,0156	1,2673	0,0156	1,1551
miR-375	0,0078	-2,3628	0,0625	-1,8577	0,1094	-0,7023
miR-378a-3p	0,0039	-2,0432	0,0781	-1,2028	0,0234	-1,3745
miR-423-5p	0,0156	-2,1558	0,0156	-2,5596	0,1250	-1,2498
miR-425-5p	0,0078	-1,1336	0,2188	-0,9404	1,0000	0,0648
miR-429	0,0078	1,1766	0,0313	0,7491	0,0078	0,5323
miR-574-3p	0,0273	1,1174	0,4375	0,0890	0,5469	0,5830
miR-582-5p	0,0078	1,7516	0,0625	1,1115	0,3125	0,5471
miR-660-5p	0,0391	0,4908	0,4688	0,1660	1,0000	-0,0315

*CBB – фракция

CM – супернатант мочи после 17000g

Преимущественно различия в представленности микроРНК в обеих исследуемых фракциях мочи было качественным, но были обнаружены и микроРНК, представленные в основной своей массе в одной из фракций мочи. Так, например, микроРНК-451а и микроРНК-143-3р, были обнаружены в супернатанте мочи и практически отсутствовали в образцах СВВ. Присутствие микроРНК-451а именно в супернатанте мочи может объясняться её появлением из крови, поскольку, как было упомянуто выше, экспрессия этой микроРНК ассоциирована с гемолизом [617]; при этом, выделение фракции СВВ мочи позволяет избавиться от балластных микроРНК крови (количество свободных комплексов микроРНК в результате промывки и ультрацентрифугирования уменьшается минимум в 20 раз) [337, 615].

Наибольшее количество достоверных различий в уровнях микроРНК между исследуемыми фракциями мочи, оценённое с использованием критерия Уилкоксона, наблюдалось в группе больных РПЖ (38 микроРНК), наименьшее – в группе ЗД (15 микроРНК) (таблица 3.11.).

Данные таблицы 3.11 демонстрируют, что в моче больных РПЖ и ДГПЖ 43% детектируемых микроРНК ассоциированы с фракцией СВВ, т.е. эти микроРНК находятся преимущественно в супернатанте мочи. В моче здоровых доноров наоборот большая часть микроРНК (57%) находится в составе ВВ.

Для последующего анализа мишеней и функций микроРНК, основываясь на данных таблицы 3.11., были выбраны две группы микроРНК, причём для их формирования принимали во внимание, как значимость различий, так и их характер и амплитуду. В первую группу были включены девять микроРНК (let-7i-5р, микроРНК-22-3р, -23b-3р, -30b-5р, -30c-5р, -92a-3р, -93-5р, -331-3р, -429), ассоциированные предположительно с одной из изучаемых фракций вне зависимости от группы донора для которых значимые различия были выявлены в супернатанте и фракции СВВ мочи. Во вторую группу вошли микроРНК потенциально связанные с развитием РПЖ или какой-либо патологией предстательной железы, поскольку их экспрессия значительно отличалась между фракциями мочи только в группе здоровых доноров или больных РПЖ (let-7a-5р, -7d-3р, микроРНК-26b-5р, -27b-3р, -30a-5р, -30e-5р, -107, -375, -582-5р) или не отличалась только у здоровых доноров (микроРНК-29a-3р, -29b-3р, -29c-3р, -101-3р, -141-3р, -423-5р), но имелись различия в двух оставшихся группах. Мы предположили, что гены-мишени этих микроРНК могут быть связаны с развитием онкологических заболеваний предстательной железы. Именно поэтому далее с использованием базы данных DIANA были проанализированы общие для обеих групп мишени микроРНК. К сожалению, впоследствии, в рамках категорий KEGG, не было обнаружено прямой взаимосвязи между микроРНК-мишенями из первой группы и механизмами секреции или функциями ВВ. Среди общих мишеней части микроРНК присутствовали гены, участвующие в синтезе жирных кислот (Fatty

acid biosynthesis – FASN) и ряда сигнальных путей: Hippo signaling pathway (11 генов), pathways in cancer (22 гена), p53 signaling pathway (9 генов) (рис. 3.17.).

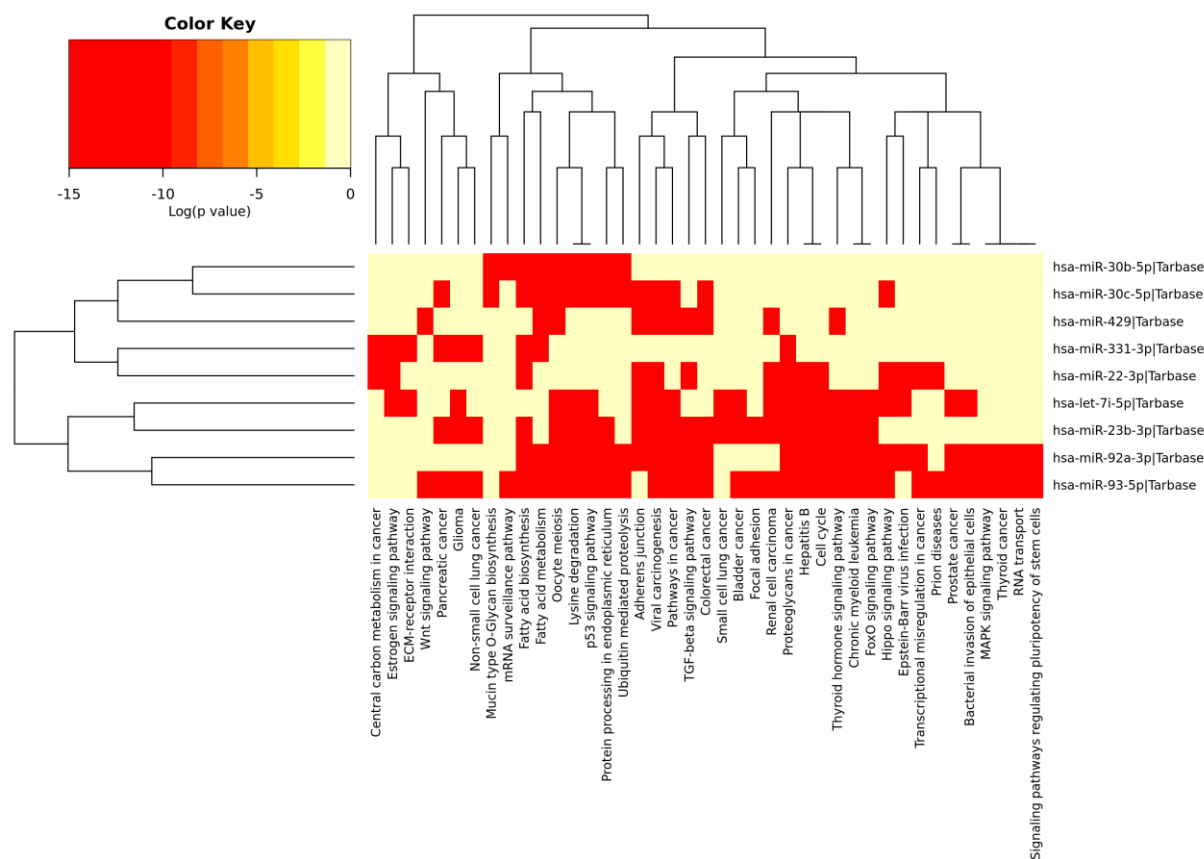


Рисунок 3.17. Данные базы DIANA: тепловая карта и кластерный анализ общих мишеней микроРНК (в терминах категорий KEGG), экспрессия которых отличается между фракциями мочи во всех изучаемых группах доноров (Группа 1).

Необходимо отметить, что белки FASN ранее уже обнаруживались в составе экзосом [618]. Поиск же общих мишеней микроРНК из группы 1 в рамках категорий GO показал, что этот набор микроРНК регулирует экспрессию некоторых РНК-связывающих белков (например, AGO1, ANNAK, HNRNPM, NUCKS1, NUFIP2, RC3H2), часть из которых были ранее экспериментально обнаружены в экзосомах (по данным Exocarta 5). Более того, структурный нуклеопротеин ANNAK был обнаружен ранее в экзосомах, секретируемых клетками рака простаты DU145 [619]. Таким образом, можно предположить, что секреция микроРНК в составе везикул или иных комплексов определяется внутриклеточными механизмами селекции способа секреции каждой конкретной микроРНК.

Что касается мишеней микроРНК из второй группы (т.е. микроРНК, потенциально связанных с развитием онкологических заболеваний предстательной железы), несмотря на другой характер распределения микроРНК между фракциями мочи, результаты анализа с использованием KEGG во многом были схожие (рис. 3.18.).

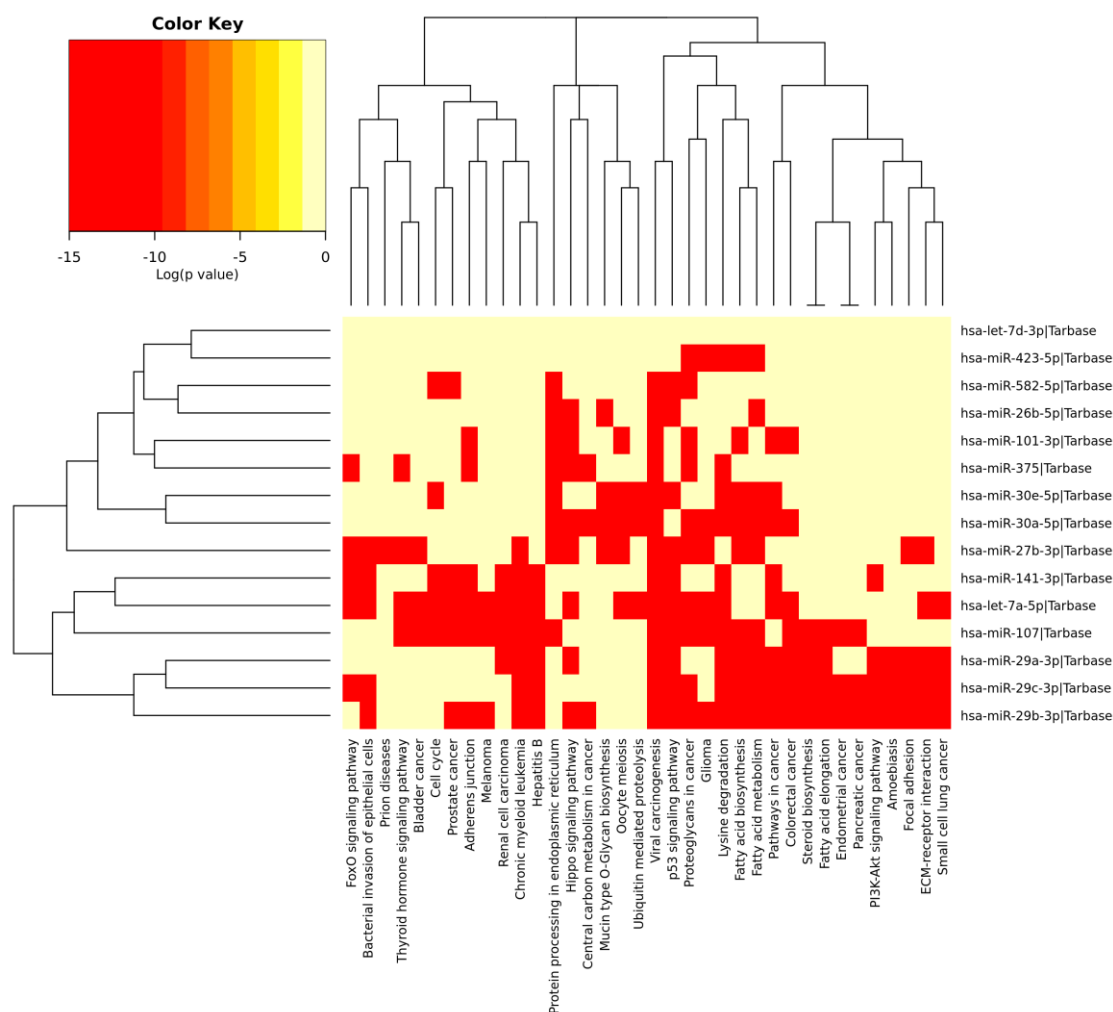


Рисунок 3.18. Данные базы DIANA: тепловая карта и кластерный анализ общих мишеней микроРНК (в терминах классификации KEGG), экспрессия которых отличается между фракциями мочи в зависимости от группы доноров (Группа 2).

Например, в этой группе также были обнаружены ферменты синтеза жирных кислот (Fatty acid biosynthesis), включая FASN. Помимо этого, было показано вовлечение этих микроРНК в регуляцию таких основных сигнальных путей, как p53 signaling (8 генов), Hippo signaling pathway (9 генов), cell cycle (13 генов), PI3K-Akt signaling (21 ген), включая связанные со злокачественной трансформацией: Transcriptional misregulation in cancer (11 генов), Pathways in cancer (18 генов), Proteoglycans in cancer (11). Необходимо отметить, что изменения в экспрессии этого набора микроРНК связаны и с развитием таких широко распространённых онкологических заболеваний, как рак мочевого пузыря, прямой кишки, эндометрия, меланома, глиома и хроническая миелоидная лейкемия.

Однако с нашей точки зрения наибольший интерес представляет связь такого набора микроРНК с экспрессией восьми генов из категории Prostate cancer, участвующих в развитии РПЖ (*IGF1R*, *GSK3B*, *CCND1*, *NRAS*, *TP53*, *MDM2*, *CTNNB1*, *CDKN1A*). При анализе данных PANTHER, только ген циклин D1 (*CCND1*) связан напрямую с репродуктивной функцией, но

по литературным данным все перечисленные гены проявляют себя как онкогены при развитии РПЖ [620–623].

К сожалению, нам не удалось однозначно подтвердить или опровергнуть гипотезы о функциях выделенных наборов микроРНК, однако из полученных данных можно сделать следующие выводы: 1. В зависимости от последовательности микроРНК в моче они могут находиться либо в составе везикул, либо в свободном от них виде. Этот факт подтверждает высокая разница пороговых циклов амплификации между микроРНК, выделенными из разных фракций мочи (например, для микроРНК-375 и -378a или let-7b, таблица 3.11.); 2. Для некоторых микроРНК (например, для микроРНК-375) наблюдаются отличия в представленности во фракциях СВВ и СМ у разных исследуемых групп больных и ЗД, что может свидетельствовать о взаимосвязи между упаковкой микроРНК в надмолекулярные комплексы в моче и состоянием здоровья предстательной железы.

Таким образом, данные об изменении экспрессии микроРНК, полученные с использованием микрочиповых технологий, подтверждают пилотные результаты о зависимости в моче упаковки микроРНК от последовательности, полученные с помощью ОТ-ПЦР и описанные в п.3.2.4. Однако анализ этих закономерностей осложнён такими факторами как 1. сложность и обширность регуляторных сетей микроРНК способных «маскировать» свои мишени, являющиеся наиболее значимыми в конкретном контексте и часто не позволяющие напрямую выявлять регуляторные пути, участвующие в определённом процессе; 2. недостаточные знания о регуляции секреции микроРНК и количественные аспекты их представленности в моче при физиологических условиях, а также о факторах, способных повлиять на селективность загрузки микроРНК в различные ВВ.

Несмотря на то, что мы выделили лишь две группы микроРНК, основываясь на особенностях их распределения между фракциями мочи, из рисунков 3.17. и 3.18. видно (на основании набора регулируемых мишеней), что в этих группах прослеживаются характерные подгруппы, в основе которых лежит пересечение наборов мишеней родственных микроРНК (например, микроРНК-29a, -29b, -29c и микроРНК-30a, -30e). Это доказывает, необходимость поиска иных дополнительных способов стратификации выбранных микроРНК для уменьшения неоднородности выборки и выполнения глубокого анализа их регуляторных сетей с целью наиболее адекватного анализа связи микроРНК во фракции СВВ с развитием онкологических заболеваний предстательной железы.

Именно поэтому мы попытались иначе проанализировать полученные при помощи микрочиповых технологий данные об экспрессии 84-х микроРНК в супернатанте и фракции СВВ мочи. Однако необходимо учитывать, что если сравнение экспрессии одной и той же микроРНК между фракциями мочи одного донора можно сделать без какой-либо

нормализации, то для сравнения уровня экспрессии микроРНК между донорами нормализация данных является обязательным условием. Для такой нормализации используется несколько подходов уже описанных ранее в представленной работе (п. 1.3.2.). Одним из оптимальных вариантов является нормализация экспрессии индивидуальной микроРНК на средний уровень экспрессии всех микроРНК, однако он хорош только при использовании масштабных методов исследования. Более удобным при использовании счетного числа мишеней является парная нормализация экспрессии микроРНК, при которой уровень одной микроРНК нормируется на каждую из оставшихся микроРНК. Из полученных в результате такой нормировки значений dCt выбираются характеристические (пары микроРНК [335, 412]), наиболее подходящие для разделения исследуемых групп. После этого, с использованием метода Random Forests с селекцией Boruta, были статистически обработаны такие данные, как относительная встречаемость отдельных значимых пар микроРНК относительно общего числа сравнений (запусков), разность медиан, доверительный интервал и значимость (p).

Для отбора лучших диагностических пар микроРНК были сформулированы условия/критерии их включения в диагностическую панель, а именно: 1. Дифференциальная экспрессия в максимальном количестве доноров/пациентов; 2. Наибольшее расстояние между медианами (dCt) в рассматриваемых группах доноров; 3. Наибольшая удаленность 95% доверительного интервала (CI) для разности медиан от 0, но не менее 0,1; 4. Наименьшее значение $padj$ (уровень значимости с поправкой на множественные сравнения) (таблица 3.12.). Таким образом, условие №1 (о наибольшей встречаемости определённых пар микроРНК (значимый критерий алгоритма Boruta)) позволяет отобрать пары, во-первых, наименее чувствительные к выбросам, а, во-вторых, микроРНК в составе этих пар потенциально могут более эффективно комбинироваться с оставшимися микроРНК для разделения исследуемых групп доноров. Условия №2 и №3 дают информацию о «разнесённости» значений в группах сравнения и важны для оценки практической применимости выполненного исследования, поскольку возможные технические погрешности измерений при значительной близости данных способны сильно повлиять на исход разделения групп при внедрении результатов исследования в практику. Условие №4 позволяет отобрать пары микроРНК, имеющие наибольшие отличия с точки зрения статистического анализа.

Панель формировали из пар микроРНК, которые максимально соответствовали четырём перечисленным критериям. После формирования пилотной панели для каждой выбранной пары микроРНК был выполнен ROC-анализ с определением площади под кривой (AUC) (таблица 3.12.).

Таблица 3.12. Значимые пары микроРНК для разделения групп здоровых доноров и больных ДГПЖ и РПЖ*

пары микроРНК	Частота встречаемости**, %	ΔC_t (95% CI)	AUC	P	Padj
СМ: 3Д-РПЖ (1770 пар)					
-107/-26b-5p	74,8	-0,74 (-1,94;-0,33)	0,93	0,001	0,02
-93-5p/-29b-3p	36,3	-0,54 (-1,31;-0,26)	0,92	0,002	0,02
-22-3p/-30e-5p	36,0	-0,76 (-1,95;-0,23)	0,86	0,007	0,03
-375/-26b-5p	6,2	-1,71 (-3,92;-0,17)	0,83	0,014	0,03
-29b-3p/-205-5p	4,6	1,92 (0,25;2,81)	0,88	0,004	0,02
-331-3p/-205-5p	0,3	1,72 (0,24;3,06)	0,79	0,002	0,04
-205-5p/-26b-5p	15,2	-1,4 (-3,17;-0,55)	0,88	0,004	0,02
-29a-3p/-205-5p	10,3	1,69 (0,57;2,74)	0,83	0,013	0,03
-151a-5p/-205-5p	6,3	1,18 (0,43;3,29)	0,84	0,01	0,03
let-7e-5p/-23b-3p	15,8	0,88 (0,27;1,35)	0,92	0,002	0,02
СМ: 3Д-ДГПЖ (254 пары)					
-30a-5p/let-7g-5p	98,5	0,57 (0,28;1,09)	0,83	0,014	0,04
-200a-3p/let-7a-5p	3,9	0,53 (0,03;1,34)	0,7	0,005	0,14
-205-5p/let-7a-5p	0,2	0,86 (0,06;2,71)	0,78	0,041	0,06
СМ: ДГПЖ-РПЖ (254 пары)					
-103a-3p/-30c-5p	28,6	1,03 (0,03;1,45)	0,79	0,034	0,05
-30c-5p/-30e-5p	21,8	-0,43 (-1,13;-0,17)	0,83	0,014	0,04
-100-5p/-30e-3p	18,9	0,73 (0,02;1,02)	0,77	0,05	0,05
-30c-5p/-16-5p	15,2	-0,74 (-1,36;-0,01)	0,84	0,011	0,04
-23b-3p/-103a-3p	8,8	-0,41 (-0,99;-0,03)	0,78	0,041	0,05
-100-5p/-30a-5p	7,2	0,52 (0,09;1,39)	0,79	0,034	0,05
СВВ: 3Д-РПЖ (849 пар)					
-20a-5p/-16-5p	50,3	0,39 (0,17;0,8)	0,89	0,003	0,02
-24-3p/-200b-3p	12,0	0,47 (0,13;1,08)	0,88	0,006	0,02
-101-3p/-30e-5p	11,8	-0,28 (-0,46;-0,09)	0,82	0,018	0,03
-24-3p/-16-5p	5,3	0,45 (0,09;0,95)	0,85	0,008	0,02
-99b-5p/-24-3p	3,5	-0,25 (-0,86;-0,06)	0,76	0,01	0,05
-30b-5p/-125b-5p	3,3	0,32 (0,06;0,91)	0,8	0,023	0,03
-31-5p/-16-5p	1,7	0,77 (0,08;1,23)	0,85	0,012	0,03
-30c-5p/-16-5p	0,3	0,42 (0;0,9)	0,82	0,016	0,03
-30b-5p/-16-5p	0,1	0,85 (0,08;1,5)	0,79	0,028	0,03
СВВ: 3Д-ДГПЖ (849 пар)					
-107/-31-5p	95,3	-0,73 (-1,95;-0,27)	0,87	0,007	0,01
-31-5p/-16-5p	61,5	0,79 (0,31;1,25)	0,89	0,004	0,01
-31-5p/-30e-3p	43,8	0,69 (0,15;1,5)	0,88	0,006	0,01
-31-5p/-200b-3p	23,9	0,58 (0,18;1,3)	0,88	0,006	0,01
-31-5p/-660-5p	22,1	0,74 (0,08;1,79)	0,84	0,002	0,01
-29a-3p/-660-5p	20,4	0,65 (0,38;1,06)	0,86	0,009	0,01
-31-5p/-200c-3p	17,3	0,63 (0,25;1,24)	0,83	0,014	0,02
-107/-141-3p	5,6	-0,79 (-1,95;-0,09)	0,78	0,041	0,04
-29a-3p/-30e-3p	1,6	0,82 (0,04;1,16)	0,84	0,011	0,01
-660-5p/-24-3p	0,8	-0,58 (-1,16;-0,05)	0,87	0,007	0,01
СВВ: ДГПЖ-РПЖ (254 пары)					
-191-5p/-31-5p	22,7	0,41 (0,16;1,09)	0,91	0,003	0,01
-100-5p/-30d-5p	11,1	0,32 (0,15;1,27)	0,84	0,011	0,02

пары микроРНК	Частота встречаемости**, %	ΔCt (95% CI)	AUC	P	Padj
-106b-5p/-191-5p	7,4	-0,71 (-1,34;-0,29)	0,88	0,004	0,01
-93-5p/-22-3p	2,9	-0,4 (-0,75;-0,02)	0,78	0,003	0,04
-191-5p/-200b-3p	0,3	0,54 (0,02;1,21)	0,83	0,013	0,02
-22-3p/-92a-3p	0,1	0,44 (0,12;0,89)	0,78	0,041	0,04
-191-5p/-200a-3p	0,1	0,69 (0,17;1,13)	0,83	0,013	0,02

*СВВ – фракция суммарных внеклеточных везикул, СМ - супернатант мочи.

**Указана частота встречаемости комбинации за 1000 запусков алгоритма Boruta

Таким образом, парная нормализация позволила идентифицировать значительное количество диагностических «сигнатур» и выявить в каждой группе сравнения уникальные наборы пар микроРНК (таблица 3.12.).

Было обнаружено, что часть пар микроРНК встречается чаще остальных, например, микроРНК-107/-26b-5p (74,8%, СМ: ЗД-РПЖ), микроРНК-30a-5p/let-7g-5p (98,5%, СМ: ЗД-ДГПЖ), микроРНК-20a-5p/-16-5p (50,3%, СВВ: ЗД-РПЖ) и микроРНК-107/-31-5p (95,3%, СВВ: ЗД-ДГПЖ). AUC для этих пар микроРНК варьирует от 0,7 до 0,93.

Для разделения групп ЗД и РПЖ с использованием микроРНК супернатанта мочи наилучшие показатели наблюдались для следующих пар микроРНК: микроРНК-375/-26b-5p, микроРНК-29a-3p/-205-5p (наилучшие показатели доверительного интервала разности медиан от нуля), микроРНК-331-3p/-205-5p, микроРНК-205-5p/-26b-5p, микроРНК-29b-3p/-205-5p и микроРНК-151a-5p/-205-5p (наибольшая разность медиан). Самый высокий процент встречаемости наблюдался для пары микроРНК-107/-26b-5p, однако разница медиан между этими двумя группами составила менее единицы (таблица 3.12.). При разделении этих же двух групп доноров, но с использованием фракции СВВ наибольшая выявляемость (50,3%) наблюдалась для пары микроРНК-20a-5p/-16-5p, однако разница медиан была невысокой (не превышала 0,39), в отличие от пар микроРНК-31-5p/-16-5p и микроРНК-30b-5p/-16-5p, для которых разница медиан составила 0,77 и 0,85, соответственно.

Для выявления больных ДГПЖ, т.е. разделения групп ЗД-ДГПЖ и ДГПЖ-РПЖ с использованием микроРНК супернатанта мочи были выявлены 3 и 6 пар микроРНК, соответственно. При этом у некоторых пациентов микроРНК из состава этих пар не были обнаружены, что сильно уменьшало их диагностическую ценность. В этом блоке экспериментов была выявлена лишь одна значимая (с частотой 98,5%) пара микроРНК, способная разделить группы ЗД и ДГПЖ - микроРНК-30a-5p/let-7g-5p. Пара микроРНК-103a-3p/-30c-5p в группе ДГПЖ-РПЖ хоть и имела разницу медиан больше единицы, но частота её выявления составила лишь 28,6%. При использовании микроРНК из фракции СВВ для разделения групп ЗД-ДГПЖ наибольшая разница медиан (0,82) была обнаружена для пары

микроРНК-29а-3р/-30е-3р, однако 95% доверительный интервал практически не отличался от нуля; наибольший процент выявляемости (95,3%) наблюдался для пары микроРНК-107/-31-5р. Для разделения групп ДГПЖ-РПЖ с использованием фракции СВВ наилучшие показатели наблюдались для пар микроРНК-191-5р/-31-5р (наибольшая частота встречаемости 22,7%) и микроРНК-106b-5р/-191-5р (максимальная dCt=0,71) (таблица 3.12.).

Как оказалось, несмотря на наличие уникальных пар микроРНК для каждой из шести групп сравнения, часть микроРНК была обнаружена одновременно в нескольких группах (таблица 3.12.). Ещё раз стоит отметить факт присутствия части микроРНК только в супернатанте мочи (микроРНК-23b-3р, -30а-5р, -205-5р) или только во фракции СВВ (микроРНК-24-3р, -31-5р, -200b-3р) (таблица 3.13.).

Таблица 3.13. Встречаемость отдельных микроРНК в различных парах среди всех групп сравнений

микроРНК	СМ			СВВ		
	ЗД-РПЖ	ЗД-ДГПЖ	ДГПЖ-РПЖ	ЗД-РПЖ	ЗД-ДГПЖ	ДГПЖ-РПЖ
-16-5р			✿	✿	✿	
-22-3р	✿					✿
-23b-3р	✿		✿			
-24-3р				✿	✿	
-29а-3р	✿				✿	
-30а-5р		✿	✿			
-30с-5р			✿	✿		
-30е-5р	✿		✿	✿	✿	
-31-5р				✿	✿	✿
-93-5 р	✿					✿
-100-5р			✿			✿
-107	✿				✿	
-200а-3р		✿				✿
-200b-3р				✿	✿	✿
-205-5р	✿	✿				

Следует отметить, что внутри каждой группы сравнения присутствуют микроРНК, многократно встречающиеся в разных комбинациях (таблица 3.12.). Например, при сравнении СМ: ЗД-РПЖ микроРНК-205-5р и -26b-5р были обнаружены в 50% и 40% комбинаций, соответственно, а в группе сравнения СВВ: ЗД-ДГПЖ микроРНК-31-5р встречалась в шести из 10 пар (таблица 3.14).

Таблица 3.14. Встречаемость некоторых микроРНК внутри групп сравнений.

Фракция мочи	Группы доноров	микроРНК	Встречаемость микроРНК, %	Общее число пар микроРНК в группе сравнения
Супернатант	ЗД-РПЖ	-205-5p	50	10
		-26b-5p	30	
		-29b-3p	20	
	ЗД-ДГПЖ	let-7a-5p	67	3
	ДГПЖ-РПЖ	-30c-5p	50	6
		-30e-5p	33	
		-100-5p	33	
		-103a-3p	33	
Суммарные внеклеточные везикулы	ЗД-РПЖ	-16-5p	56	9
		-24-3p	33	
		-30b-5p	22	
	ЗД-ДГПЖ	-31-5p	60	10
		-660-5p	30	
		-107	20	
		-30e-3p	20	
		-29a-3p	20	
	ДГПЖ-РПЖ	-191-5p	57	7
		-22-3p	29	

Предположительно, наиболее часто встречающиеся микроРНК (таблица 3.14) являются опухолеспецифичными. Необходимо отметить, что из-за наличия у больных РПЖ участков гиперплазии, а у пациентов с ДГПЖ недиагностированных очагов с признаками малигнизации, в супернатантах мочи наблюдалось небольшое отличие по значимости в парах микроРНК (таблица 3.12.).

Кроме того, необходимо принимать во внимание тот факт, что при развитии в предстательной железе гиперпластических доброкачественных процессов остаётся вероятность появления некоторых аберрантных микроРНК, не являющихся опухолеспецифичными, а специфичными для других тканей, экспрессия которых в норме не характерна для ПЖ. Это может быть связано с формой течения заболевания, а именно, при появлении стандартных очагов гиперплазии, параллельно могут возникать очаги дисплазии, нарушая структуру ПЖ. Такое течение заболевания считается факультативным предраком, хоть и не имеет в своей основе признаков злокачественной трансформации [624]. Также необходимо учитывать, что даже при современном уровне диагностики до 25% пациентов с ДГПЖ имеют очаги РПЖ [625]. Существует и латентная карцинома простаты, встречающаяся примерно в 15% случаев ДГПЖ [626, 627]. С другой стороны, у трети пациентов, страдающих раком переходной зоны предстательной железы, наблюдаются очаги ДГПЖ. Хотя ранее считалось, что не существует

связи этих двух патологий между собой [624], в последнее время всё же делается заключение о том, что ДГПЖ может являться фактором риска РПЖ [628].

Далее для выбранных пар микроРНК была оценена чувствительность и специфичность при разделении исследуемых групп. Показано, что при 100% специфичности наибольшей диагностической эффективностью обладают пары микроРНК-107/-26b-5p (AUC=0,93, чувствительность 80%), микроРНК-375-3p/-26b-5p (AUC=0,83, чувствительность 70%) для группы сравнения СМ: ЗД-РПЖ и пары микроРНК-31-5p/-16-5p (AUC=0,89, чувствительность 80%), микроРНК-31-5p/-200b (AUC=0,88, чувствительность 70%), микроРНК-31-5p/-30e-3p (AUC=0,88, чувствительность 80%) и микроРНК-31-5p/-660-5p (AUC=0,84, чувствительность 70%) для группы сравнения СВВ: ЗД-ДГПЖ (таблица 3.15.).

Далее, с использованием диаграмм распределений значений пар микроРНК, была выполнена оценка степени разделения этих пар в группах сравнения (рис. 3.19).

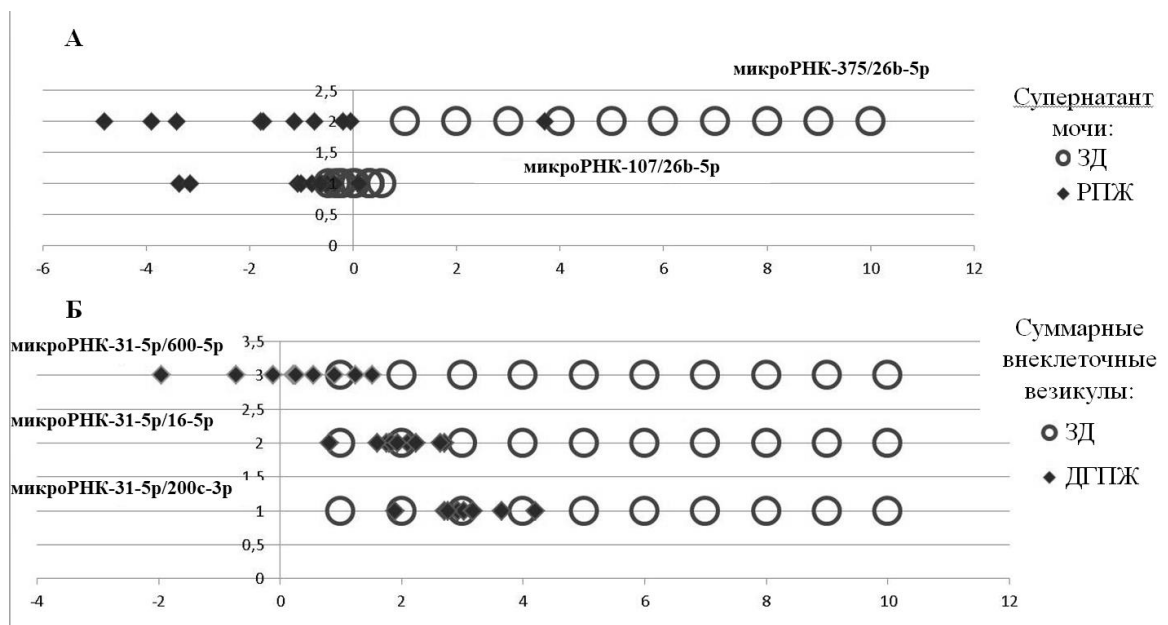


Рисунок 3.19. Диаграмма разделения некоторых пар микроРНК в составе супернатанта (А) и фракции суммарных внеклеточных везикул мочи (Б).

Анализируя рисунок 3.19. можно сделать вывод о том, что наиболее значимыми диагностическими показателями для разделения групп ЗД-РПЖ обладает пара микроРНК-375-3p/-26b-5p, присутствующая в супернатанте мочи, а для разделения групп ЗД-ДГПЖ – пара микроРНК-31-5p/-660-5p в составе фракции СВВ. Для всех остальных пар микроРНК в различных группах сравнения наблюдалось более «плотное» расположение значений отношений.

Таблица 3.15. Статистические показатели наилучших пар микроРНК-потенциальных диагностических предикторов.

Источник	Группа сравнения	Пары микроРНК	AUC	Пороговое значение	95% CI	Чувствительность%	Специфичность%
СМ	ЗД-РПЖ	-205-5p/-26b-5p	0,88	<-3,37	0,72-1,04	30	100
		-107/-26b-5p	0,93	<-0,49	0,81-1,05	80	100
		-375/-26b-5p	0,83	<-0,69	0,63-1,04	70	100
		-151a-5p/-205-5p	0,84	>3,15	0,65-1,03	30	100
		-29b-3p/-205-5p	0,88	>2,03	0,73-1,03	50	100
		-29a-3p/-205-5p	0,83	>3,34	0,64-1,02	20	100
		-331-3p/-205-5p	0,79	>5,65	0,56-1,02	10	100
	ЗД-ДГПЖ	-30a-5p/let-7g-5p	0,83	<-2,32	0,61-1,06	33	100
	ДГПЖ-РПЖ	-30c-5p/-30e-5p	0,83	>-0,79	0,64-1,03	20	100
		-103a-3p/-30c-5p	0,79	<1,15	0,57-1,01	60	100
СВВ	ЗД-РПЖ	-20a-5p/-16-5p	0,85	<0,72	0,65-1,05	56	100
		-30b-5p/-16-5p	0,83	<-2,96	0,64-1,02	22	100
		-31-5p/-16-5p	0,79	<1,83	0,56-1,01	38	100
		-24-3p/-200b-3p	0,93	<1,31	0,82-1,04	67	100
	ЗД-ДГПЖ	-31-5p/-200c-3p	0,83	<3,06	0,64-1,03	60	100
		-31-5p/-16-5p	0,89	<2,26	0,73-1,05	80	100
		-107/-141-3p	0,78	>5,21	0,55-1,01	10	100
		-31-5p/-200b-3p	0,88	<3,1	0,72-1,04	70	100
		-31-5p/-30e-3p	0,88	<1,25	0,71-1,05	80	100
		-29a-3p/-30e-3p	0,84	<-0,14	0,66-1,03	40	100
		-31-5p/-660-5p	0,84	<0,57	0,66-1,03	70	100
		-29a-3p/-660-5p	0,86	<-0,73	0,67-1,04	20	100
		-20a-5p/-16-5p	0,73	<0,82	0,47-0,99	70	100
		-107/-31-5p	0,87	>1,32	0,67-1,06	10	100
	ДГПЖ-РПЖ	-191-5p/-200a-3p	0,83	<2,6	0,65-1,01	40	100
		-191-5p/-31-5p	0,91	<0,06	0,77-1,05	33	100
		let-7i-5p/let-7a-5p	0,83	<4,61	0,61-1,04	57	100
		-100-5p/-200b-3p	0,81	<3,87	0,60-1,02	56	100
		-106b-5p/-191-5p	0,88	>0,39	0,72-1,04	30	100

В результате выполненного анализа сравнения парных отношений микроРНК в составе двух фракций мочи у трёх групп доноров, наибольшее число диагностически-значимых пар микроРНК было обнаружено для разделения групп ЗД-РПЖ, независимо от выбранной фракции мочи. Наилучшими статистическими показателями обладали пары микроРНК-107/-26b-5p и микроРНК-375-3p/-26b-5p в составе супернатанта мочи (таблица 3.15).

При ином сравнении групп доноров (ЗД-ДГПЖ и ДГПЖ-РПЖ), к сожалению, при используемой статистической обработке полученных данных не удалось выявить достоверно

отличающиеся пары микроРНК во фракции СВВ, а во фракции СМ достоверность отличий некоторых пар микроРНК находилась на границе значимости (таблица 3.12.). Однако при сравнении групп ЗД-ДГПЖ во фракции СВВ было обнаружено наибольшее число диагностически значимых пар микроРНК: микроРНК-31-5p/-16-5p, микроРНК-31-5p/-200b, микроРНК-31-5p/-30e-3p, микроРНК-31-5p/-660-5p (таблица 3.15.).

Таким образом, несмотря на присутствие в составе супернатанта мочи микроРНК со всего мочеполового тракта, а не только имеющих простатическое/опухолеспецифическое происхождение, полученные нами результаты свидетельствуют о возможном использовании этой фракции мочи при создании диагностикомов онкологических заболеваний предстательной железы. Различия в содержании микроРНК в разных фракциях мочи могут быть связаны с неравным распределением некоторых микроРНК между внеклеточными белково-липидными комплексами и ВВ. Таким образом, любая из этих фракций мочи потенциально может быть использована для поиска диагностических и прогностических микроРНК [281, 572, 591, 592, 629–637].

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости использования нескольких, а не одной, комбинаций микроРНК для создания диагностических систем, позволяющих со 100% специфичностью и чувствительностью разделять исследуемые группы доноров между собой. Так, например, при разделении групп ЗД-РПЖ при 100% специфичности пары микроРНК-107/-26b-5p или микроРНК-375/-26b-5p отдельно друг от друга обладают чувствительностью в 80% и 70%, соответственно, а при одновременном их анализе чувствительность полученной системы возрастает до 100% (таблица 3.15.). При разделении групп ЗД-ДГПЖ с использованием фракции СВВ, одновременный анализ пар микроРНК-31-5p/-16-5p и микроРНК-20a-5p/-16-5p позволяет увеличить чувствительность диагностической системы до 100%, в отличие от 80% и 70%, соответственно, полученных при отдельном их анализе (таблица 3.15.).

Как уже упоминалось выше, в большинстве случаев при наличии у пациента РПЖ обнаруживаются и очаги ДГПЖ [624]. В связи с этим, при разработке диагностических систем (или их наборов, чему и посвящена наша дальнейшая работа) на основе оценки уровня микроРНК существует необходимость анализа большего количества пар в обеих фракциях мочи для разделения групп пациентов со 100% специфичностью и чувствительностью (например, СМ: микроРНК-103a-3p/-30c-5p (чувствительность 60%) + СВВ: микроРНК-100-5p/-200b-3p (чувствительность 50%) + СВВ: let-7i-5p/let-7a-5p (чувствительность 40%) (таблица 3.15.)).

3.2.6.2. Алгоритм анализа данных о концентрации внеклеточных микроРНК мочи для постановки диагноза больным с онкологическими заболеваниями предстательной железы

В подтверждение литературных данных [592, 637] и как уже было упомянуто выше, нами была показана необходимость использования оценки уровня экспрессии нескольких микроРНК, а не одной, для создания надёжных диагностических систем онкологических заболеваний. Большинство исследователей используют в качестве контрольной только группу здоровых доноров, однако, как следует из предыдущей главы, для точной диагностики РПЖ требуется вовлечение в исследование больных и с другими заболеваниями ПЖ и, в первую очередь, больных с ДГПЖ. Кроме того, при внедрении полученных результатов в клиническую практику необходимо учитывать погрешности при манипулировании растворами, включая постановку ОТ-ПЦР. Ошибки измерений необходимо учитывать как при выборе микроРНК-маркеров (или их пар), так и при оценке уровня значимости (cut-off) для адекватного выбора интервалов значений с учетом роста выборки.

Представленный здесь алгоритм описывает ряд шагов, необходимых для определения значений cut-off и последовательного анализа данных экспрессии микроРНК в соответствии с выбранными значениями cut-off, для более простой и надежной постановки диагноза. Пары микроРНК выбирали, начиная с пар, которые имели наибольшую чувствительность при 100%-ной специфичности, принимая также во внимание разницу в уровне экспрессии маркеров между группами. Создание такой диагностической системы включает следующие этапы (рис. 3.20., на примере систем для постановки диагноза «точно РПЖ»):

Шаг 1. Выбираем группу сравнения (в данном случае «РПЖ») и контрольную (здесь «ЗД+ДГПЖ»). Анализируем отношение уровней выбранных пар микроРНК во фракции СМ или СВВ. Если распределение значений является нормальным, то рассчитываем среднее значение и стандартное отклонение (SD) для контрольной группы; если же условие нормальности не выполнено, то выполняем расчёты медианы и квантилей 5% и 95% (Q5, Q95). В настоящем исследовании для всех случаев было подтверждено нормальное распределение, поэтому были рассчитаны средние значения и стандартное отклонение.

Шаг 2. Анализируем данные об отношениях микроРНК в образцах (выбранной фракции мочи) пациентов с РПЖ. Пороговое значение (cut-off) определяем как «среднее +2SD» или «среднее-2SD», полученное из анализа отношений пар микроРНК в контрольной группе «ЗД+ДГПЖ». Если в большинстве случаев значения у группы сравнения были меньше, чем у контрольной группы, то используется «-2SD», в противном случае используется «+2SD» (рис. 3.20). Считается, что группа сравнения со значениями dCt/ddCt определенной пары микроРНК в одной и той же фракции мочи за пределами cut-off относится к РПЖ.

Шаг 3. Для оставшихся пациентов выполняем оценку отношений уровня либо той же пары микроРНК, но в другой фракции мочи, либо следующей пары микроРНК в той же/другой фракции мочи. Как и ранее, выявление больного РПЖ происходит путём сравнения значений dCt/ddCt со средними пороговыми значениями $\pm 2SD$, полученными в контрольной группе «ЗД+ДГПЖ». А именно, считается, что пациента можно отнести к группе больных РПЖ при условии значения dCt/ddCt выше среднего значения $+2SD$ или ниже среднего значения $-2SD$.

Шаг 4. Шаги 2 и 3 повторяем с использованием следующих пар микроРНК, при условии невозможности отнесения образца группы сравнения в группу «точно РПЖ» на предыдущих шагах. Алгоритм повторяем до тех пор, пока все пациенты не будут правильно классифицированы или не будет исчерпан пул аналитических систем.

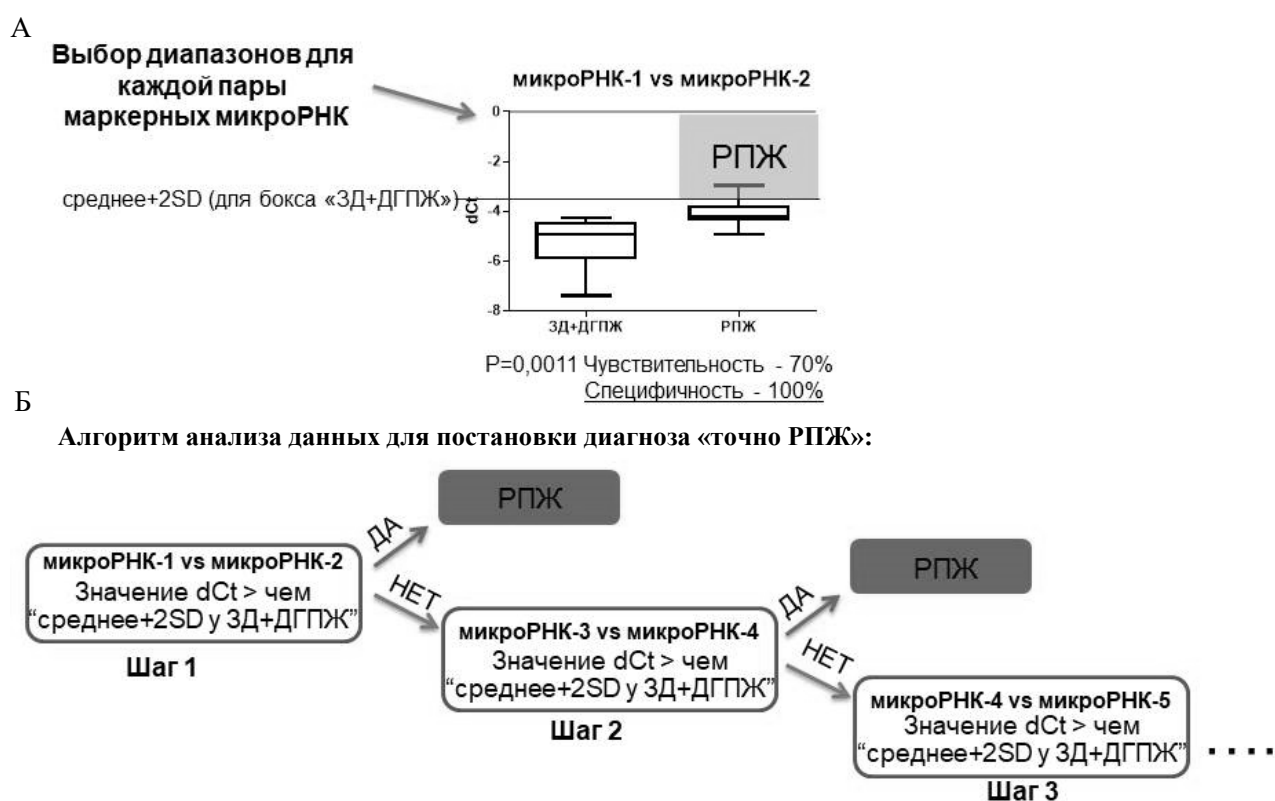


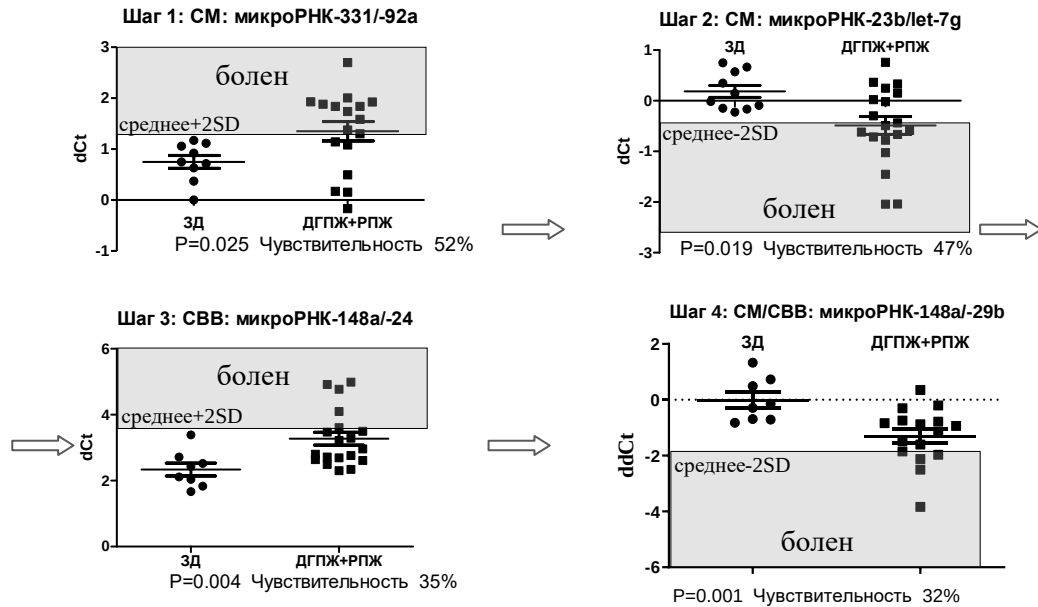
Рисунок 3.20. Общая схема алгоритма анализа данных для выявления и мониторинга больных раком предстательной железы. (А) Определение диапазона для каждой пары маркерных микроРНК; (Б) Общая схема алгоритма анализа данных для постановки диагноза «точно РПЖ».

Такая структура алгоритма позволяет использовать наименьшее количество аналитических систем. Для увеличения достоверности анализа и статистической мощности один и тот же подход можно повторить с использованием разных комбинаций пар микроРНК и с использованием различных сочетаний групп в качестве контролей. Например, наряду с описанным алгоритмом для постановки диагноза «точно РПЖ», можно составить блоки для постановки диагнозов «точно болен» (ДГПЖ+РПЖ относительно группы ЗД (контроль)),

«точно не РПЖ» (ЗД+ДГПЖ относительно группы РПЖ (контроль)), «точно здоров» (ЗД относительно группы ДГПЖ+РПЖ (контроль)) (рис. 3.21).

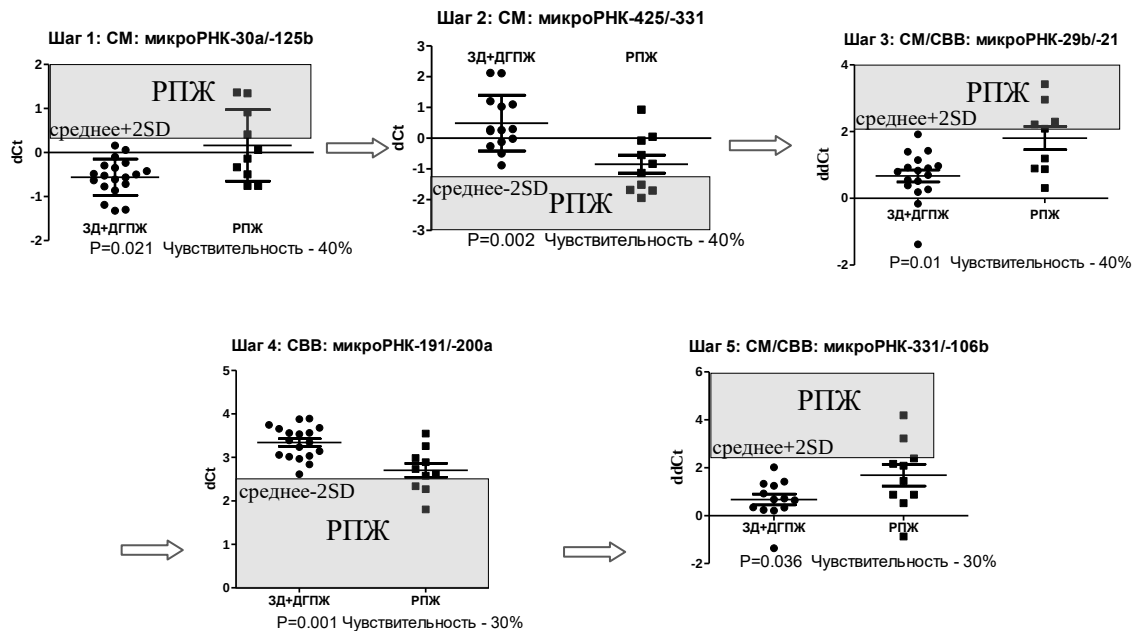
А: «Точно болен»

ДГПЖ+РПЖ относительно группы ЗД (контроль)



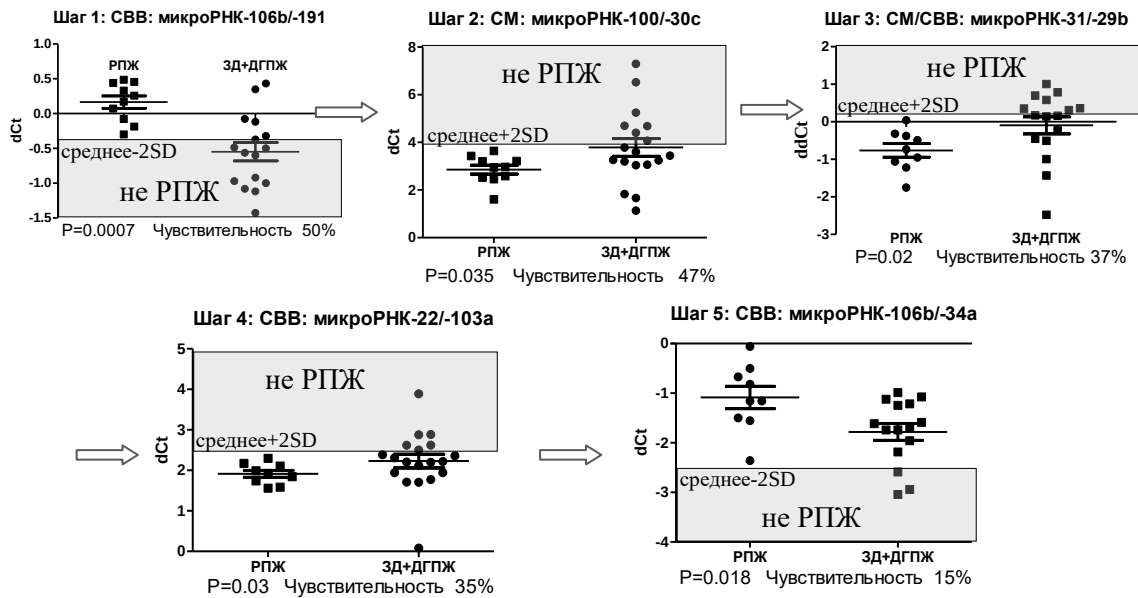
Б: «Точно РПЖ»

РПЖ относительно группы ЗД+ДГПЖ (контроль)



В: «Точно не РПЖ»

ЗД+ДГПЖ относительно группы РПЖ (контроль)

**Г: «Точно здоров»**

ЗД относительно группы ДГПЖ+РПЖ (контроль)

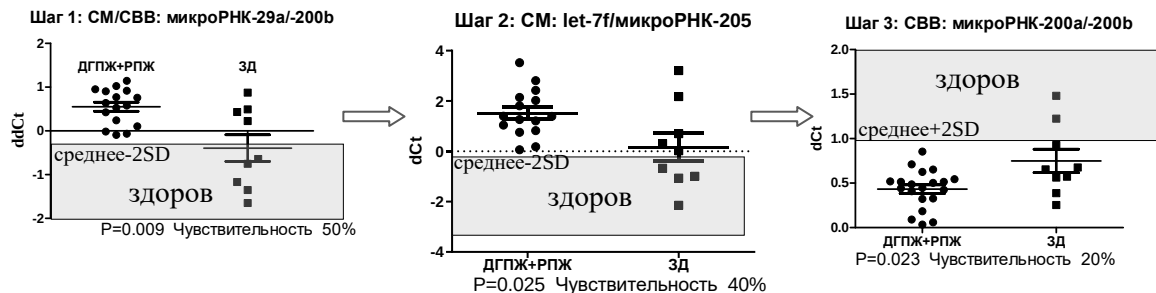


Рисунок 3.21. Блок-схема алгоритма анализа данных для выявления больных раком предстательной железы. (А) Блок для выявления больных с онкологическими заболеваниями предстательной железы (ДГПЖ+РПЖ); (Б) Блок для выявления больных РПЖ; (В) Блок для выявления доноров, не имеющих признаков РПЖ; (Г) Блок для выявления здоровых доноров. Значения чувствительности и Р указаны для каждой аналитической системы.

Таким образом, предложенный алгоритм анализа данных позволил:

- определить пациентов, страдающих онкологическими заболеваниями предстательной железы (ДГПЖ или РПЖ) с абсолютной чувствительностью и специфичностью (рис. 3.21.А; таблица 3.16), используя анализ уровня экспрессии 7-ми микроРНК (вошедших в четыре аналитические системы) в различных фракциях мочи;
- выявить пациентов с РПЖ с 90% чувствительностью при 100% специфичности (рис. 3.21.Б; таблица 3.17), анализируя уровень экспрессии 9-ти микроРНК (вошедших в пять аналитических систем);

- с абсолютной чувствительностью и специфичностью выявить пациентов, не имеющих признаков РПЖ (ЗД и ДГПЖ) (рис. 3.21.В; таблица 3.18), анализируя уровень экспрессии 9-ти микроРНК (вошедших в пять аналитических систем);
- с абсолютной чувствительностью и специфичностью выявить здоровых доноров (рис. 3.21.Г; таблица 3.19.), анализируя уровень экспрессии 5-ти микроРНК (вошедших в три аналитические системы).

Поскольку нам не удалось идентифицировать одного пациента, как больного РПЖ (таблица 3.17.), но получилось отнести его к группе пациентов с онкологическими заболеваниями предстательной железы («точно болен») (таблица 3.16.), точность предложенного алгоритма анализа данных составила 97,5%.

Таблица 3.16. Пример использования алгоритма анализа данных для выявления больных с онкологическими заболеваниями предстательной железы

№ Образца	Шаг 1 микроРНК -331/-92a (CM)	Шаг 2 микроРНК -23b/let-7g (CM)	Шаг 3 микроРНК -148a/-24 (CBV)	Шаг 4 микроРНК- 148a/-29b (CM/CBV)	Количество систем, давших положительный результат
Пациенты с ДГПЖ					
1	✿				1
2	✿				1
3	✿	✿	✿		3
4			✿		1
5			✿		1
6			✿		1
7	✿	✿		✿	3
8				✿	1
9		✿			1
10	✿				1
Пациенты с РПЖ					
1	✿				1
2		✿			1
3			✿	✿	2
4	✿				1
5		✿	✿	✿	3
6	✿	✿	✿	✿	4
7	✿				1
8	✿	✿			2
9		✿			1
10		✿		✿	2

ДГПЖ+РПЖ относительно группы ЗД (контроль)

Таблица 3.17. Пример использования алгоритма анализа данных для выявления больных раком предстательной железы

№ Образца РПЖ	Шаг 1 микроРНК -30a/-125b (СМ)	Шаг 2 микроРНК К -425/-331 (СМ)	Шаг 3 микроРНК -29b/-21 (СМ/СВВ)	Шаг 4 микроРНК -191/-200a (СМ)	Шаг 5 микроРНК -331/-106b (СМ/СВВ)	Количество систем, выдавших положительный результат
1	✱					1
2						0
3	✱	✱	✱			3
4				✱	✱	1
5		✱			✱	1
6	✱	✱		✱		4
7						1
8	✱	✱	✱	✱	✱	5
9			✱			1
10			✱			1

РПЖ относительно группы ЗД+ДГПЖ (контроль)

Таблица 3.18. Пример использования алгоритма анализа данных для выявления доноров, не имеющих признаков РПЖ

№ Образца	Шаг 1 микроРНК -106b/-191 (СВВ)	Шаг 2 микроРНК -100/-30c (СМ)	Шаг 3 микроРНК -31/-29b (СМ/СВВ)	Шаг 4 микроРНК -22/-103a (СВВ)	Шаг 5 микроРНК -106/-34a (СВВ)	Количество систем, давших положительный результат
ЗД						
1	✱	✱				2
2			✱	✱		1
3						1
4				✱		1
5				✱		1
6	✱					1
7		✱				1
8	✱	✱	✱	✱		4
9		✱				1
10	✱					1
Пациенты с ДГПЖ						
1	✱		✱			2
2	✱	✱	✱			3
3	✱	✱	✱	✱		4
4	✱					1
5		✱				1
6	✱					1
7					✱	1
8	✱				✱	2
9			✱	✱		2
10					✱	1

ЗД+ДГПЖ относительно группы РПЖ (контроль)

Таблица 3.19. Пример использования алгоритма анализа данных для выявления группы здоровых доноров

№ Образца РПЖ	Шаг 1 микроРНК -29a/-200b (CM/CBV)	Шаг 2 let-7f/ микроРНК-205 (CM)	Шаг 3 микроРНК -200a/-200b (CBV)	Количество систем, выдавших положительный результат
1	✿			1
2			✿	1
3	✿		✿	2
4	✿			1
5	✿			1
6		✿		1
7		✿		1
8		✿		1
9		✿		1
10	✿			1

ЗД относительно группы ДГПЖ+РПЖ (контроль)

Некоторые пациенты классифицируются как больные РПЖ (таблица 3.17.) или как не имеющие признаков РПЖ (таблица 3.18.) по данным относительной экспрессии двух или более пар микроРНК, т.е. диагностическая панель обладает свойством избыточности. Однако это увеличивает устойчивость и надежность диагностической системы, обеспечивает высокую чувствительность при отсутствии ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Высокая диагностическая эффективность является принципиальной характеристикой диагностических систем, что отличает использование предложенной диагностической панели от иммунохимических и/или инструментальных методов, не обладающих такой диагностической эффективностью.

Возможно, при увеличении выборки доноров верхние и нижние пороговые значения (cut off) могут измениться, и для повышения эффективности и чувствительности предложенной диагностической системы необходимо будет включение дополнительных значений как выше, так и ниже значений «среднего $\pm$ 2SD» относительно контрольной группы. Кроме того, количество анализируемых пар микроРНК в любом из предложенных блоков может быть увеличено, что приведёт к дополнительному усовершенствованию диагностической системы, повышению чувствительности и охвата, надежности классификации и, возможно, для фенотипирования опухоли с последующей оптимизацией предложенной пациенту терапии.

Таким образом, на данном этапе работы, предложенная диагностическая панель включает в себя 24 микроРНК (микроРНК-21, -22, -23b, -24, -29a, -29b, -30a, -30c, -31, -34a, -92a, -100, -103a, -106b, -125b, -148a, -191, -200a, 200b, -205, -331, -425 и let-7f, let7g). Как было описано выше, в литературе имеются данные о вовлечении некоторых из выбранных нами микроРНК (например, микроРНК-191, -425 и др. [573]) в развитие РПЖ и возможности их

применения в диагностических [588, 589] и прогностических [280, 573, 588, 595] целях. Используя доступные базы данных, описанные выше (DIANA, STRING, PANTHER), мы провели биоинформатический анализ уже 24-х микроРНК, выбранных нами, используемых во всех 4-х блоках диагностической системы. По данным DIANA, эти микроРНК контролируют 78 генов, участвующих в развитии РПЖ.

Эти гены связаны с такими молекулярными процессами, как: связывание с клеточными компонентами (41,7%, из них 8,8% ответственны за связывание хроматина, 28,1% - со связыванием нуклеиновых кислот, а 63,2% - с белками), каталитическая активность (38%, при этом 80,5% из них ответственны за активность трансферазы), активность рецептора (6,5%) по базе PANTHER. Что касается биологических процессов, то мишени микроРНК были связаны с клеточными процессами (23,3%, из них 65,3% ответственны за клеточную коммуникацию), метаболическими процессами (21,8%), реакцией на стимулы (15,6%), биологической регуляцией (12,6%) и процессами развития (7,3%, из них 34,8% ответственны за дифференцировку клеток, 17,4% - за гибель клеток и 17,4% - за развитие эктодермы).

Из 78 генов в базе данных STRING была обнаружена информация о 77 генах, из которых 73 участвуют в развитии РПЖ. Детальный анализ был выполнен для 10-ти генов, являющихся общими мишенями микроРНК в трех блоках предложенного алгоритма анализа данных, относящихся к категории «больных» («точно болен», «точно РПЖ», «точно не РПЖ»), но отсутствующих в блоке, отнесённого к категории «здоровый» и одного гена (*HRAS*), нацеленного исключительно на микроРНК, входящую в состав блока «здоровый». Согласно базе данных STRING, эти 11 генов (таблица 3.20.) ответственны за развитие РПЖ и могут быть разделены на две группы (рис. 3.22.). Более того, по разным данным, экспрессия этих генов может повышаться или понижаться в зависимости от типа клеточной линии: *PDGFRA* (↑), *E2F2* (↑+↓), *HSP90AA1* (↑), *RAF1* (↑), *EGFR* (↑), *ARAF* (нет информации), *AKT2* (↑), *PDPK1* (↑+↓), *CREBBP* (↑), *PDGFRB* (↑+↓), *HRAS*(↑). Согласно базе PANTHER гены *PDGFRA*, *PDGFRB*, *E2F2*, *EGFR*, *CREBBP* и *HRAS* отвечают за процессы связывания; гены *ARAF*, *RAF1*, *HRAS*, *AKT2*, *CREBBP* и *PDPK1* - за каталитическую активность; а гены *PDGFRB*, *PDGFRA* и *EGFR* связаны как с активностью рецептора, так и с активностью преобразователя сигнала. Что касается клеточных компонентов, то описанные гены были связаны с частями клетки, макромолекулярными комплексами и мембраной в равных пропорциях (по 33,33%).

Таблица 3.20. Функции генов, согласно базе данных STRING, обнаруженных одновременно в 3-х блоках диагностического алгоритма, относящихся к категории «больных» («точно болен», «точно РПЖ», «точно не РПЖ»), но отсутствующих в блоке, отнесённого к категории «здоровый» и одного гена (*HRAS*), нацеленного исключительно на микроРНК, входящую в состав блока «здоровый».

<i>RAF1</i>	V-raf-1 гомолог вирусного онкогена лейкоза мыши 1; Серин/треонин-протеинкиназа, действующая как важнейшее регуляторное звено между ассоциированными с мембраной Ras-ГТФазами и каскадом MAPK/ERK, функционирует как переключатель, определяющий решения клеточной судьбы, включая пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, выживание и онкогенную трансформацию. Активация <i>RAF1</i> инициирует каскад митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK), который включает последовательное фосфорилирование MAPK киназ с двойной специфичностью (MAP2K1/MEK1 и MAP2K2/MEK2) и киназы, регулируемой внеклеточным сигналом.
<i>PDGFRA</i>	Рецептор тромбоцитарного фактора роста, альфа-полипептид; Тирозин-протеинкиназа, действующая как рецептор клеточной поверхности для PDGFA, PDGFB и PDGFC и играющая важную роль в регуляции эмбрионального развития, клеточной пролиферации, выживания и хемотаксиса. В зависимости от контекста, способствует или ингибирует пролиферацию и миграцию клеток. Играет важную роль в дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Необходим для нормального развития скелета и закрытия головы во время эмбрионального развития.
<i>PDGFRB</i>	Рецептор тромбоцитарного фактора роста, бета-полипептид; Тирозин-протеинкиназа, которая действует как рецептор клеточной поверхности для гомодимеров PDGFB и PDGFD и для гетеродимеров, образованных PDGFA и PDGFB. Играет важную роль в регуляции эмбрионального развития, клеточной пролиферации, выживания, дифференцировки, хемотаксиса и миграции, а также в развитии кровеносных сосудов, способствуя пролиферации, миграции и привлечению перicytes и гладкомышечных клеток к эндотелиальным клеткам.
<i>CREBBP</i>	CREB-связывающий белок; Ацетирует гистоны, давая специфическую метку для активации транскрипции. Также ацетирует негистоновые белки, такие как NCOA3 и FOXO1. Специфически связывается с фосфорилированным CREB и усиливает его транскрипционную активность в отношении генов, чувствительных к цАМФ.
<i>EGFR</i>	Рецептор эпидермального фактора роста; Рецепторная тирозинкиназа связывающая лиганды семейства EGF и активирующая несколько сигнальных каскадов для преобразования внеклеточных сигналов в соответствующие клеточные ответы.
<i>HRAS</i>	v-Ha-ras гомолог вирусного онкогена саркомы крысы Харви; Белки Ras связывают GDP/GTP и обладают внутренней активностью ГТФаз.
<i>HSP90AA1</i>	Белок теплового шока размером 90 кДа альфа (цитозольный), член класса A1; Молекулярный шаперон, способствующий созреванию, поддержанию структуры и правильной регуляции специфических белков-мишеней, участвующих, например, в контроле клеточного цикла и передаче сигнала.
<i>PDPK1</i>	3-фосфоинозитидзависимая протеинкиназа-1; Серин/треонинкиназа, действующая как основная киназа, фосфорилирующая и активирующая

	подгруппу семейства протеинкиназ AGC. Её мишенями являются протеинкиназа В (PKB/AKT1, PKB/AKT2, PKB/AKT3), рибосомальная протеинкиназа S6 p70 (RPS6KB1), рибосомальная протеинкиназа S6 p90 (RPS6KA1, RPS6KA2 и RPS6KA3), циклическая АМР-зависимая протеинкиназа (PRKACA), протеинкиназа С (PRKCD и PRKCZ), сывороточная и глюкокортикоид-индуцируемая киназа (SGK1, SGK2 и SGK3), р21-активируемая киназа-1 (PAK1), протеинкиназа PKN (PKN1 и PKN2).
<i>E2F2</i>	Фактор транскрипции E2F2; Активатор транскрипции, связывающий ДНК совместно с белками DP через сайт узнавания E2, 5'-TTTC[CG]CGC-3', обнаруживаемый в промоторной области ряда генов, продукты которых участвуют в регуляции клеточного цикла или в репликации ДНК. Комплекс DRTF1/E2F участвует в контроле перехода клеточного цикла от фазы G1 к фазе S. E2F2 специфически связывается с RB1 в зависимости от стадии клеточного цикла.
<i>ARAF</i>	Гомолог вирусного онкогена V-raf саркомы мыши 3611; Участвует в передаче митогенных сигналов от клеточной мембраны к ядру. Также может регулировать сигнальный каскад TOR.
<i>AKT2</i>	Гомолог вирусного онкогена тимомы мышей 2 V-akt; AKT2 является одной из 3-х близкородственных серин/треониновых протеинкиназ (AKT1, AKT2 и AKT3), называемых киназой АКТ, которые регулируют многие процессы, включая метаболизм, пролиферацию, выживание клеток, рост и ангиогенез, поглощение глюкозы.

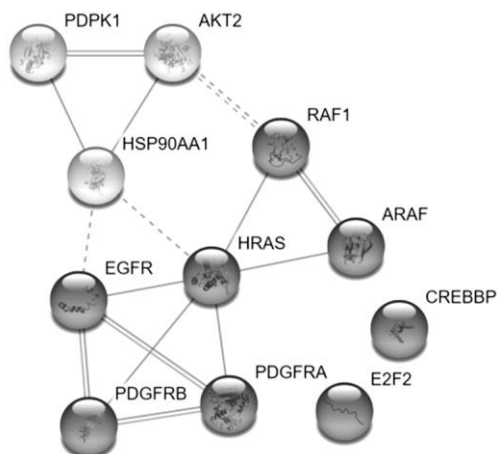


Рисунок 3.22. Данные базы STRING: сеть взаимодействий 10-ти генов, обнаруженных одновременно в 3-х блоках диагностического алгоритма, относящихся к категории «больных» («точно болен», «точно РПЖ», «точно не РПЖ»), но отсутствующих в блоке, отнесённого к категории «здоровый» и одного гена (*HRAS*), нацеленного исключительно на микроРНК, входящую в состав блока «здоровый».

Как показал анализ информации, находящейся в используемых базах данных, большинство микроРНК (15 из 24), присутствующих в диагностическом алгоритме, участвуют в регуляции сигнального пути p53, меньшее количество микроРНК нацелено на регуляцию других важных путей, связанных с развитием РПЖ, включая TNF - 2 гена, AMPK - 2 гена, mTOR - 1 ген, MAPK - 7 генов, ERBB - 7 генов (база данных DIANA). Это указывает на то, что анализ панели, сконструированной из этих микроРНК, потенциально может выявить статус множественных ключевых регуляторных путей, повышая ценность и актуальность диагностической системы.

Согласно базе данных DIANA несколько микроРНК из блока «точно РПЖ», в том числе микроРНК-331 и микроРНК-125, регулируют такие гены-мишени, как *BRAF*, *GSK3B*, *E2F1*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *EGFR*, *AKT2*, *MAPK1*, взаимодействующие с ERBB-путем и участвующие в развитии РПЖ. По литературным данным, в новообразованиях, например, при раке молочной железы, шейки матки, толстой кишки, эндометрия, пищевода, легких и поджелудочной железы часто наблюдаются нарушения регуляции генов именно из семейства ERBB [638–640]. Повышенная экспрессия *ERBB2/HER2* способствует пролиферации, метастазированию, ангиогенезу, прогрессированию опухоли, подавляет апоптоз и коррелирует с плохой выживаемостью пациентов с РПЖ. Этот ген является мишенью для нескольких терапевтических препаратов, направленных на лечение РПЖ; так, например, целекоксиб, являющийся ингибитором *COX-2*, обладает антиандрогенными свойствами, опосредованными ингибированием киназы рецептора ErbB [641]. Из описанных в таблице 3.20 генов, согласно базе DIANA, в настоящее время существуют терапевтические препараты (Капивасертиб и Ипатасертиб) только на ген *AKT*.

Таким образом, выбранные микроРНК участвуют в регуляции ключевых путей развития РПЖ, что потенциально может расширить полезность предлагаемой диагностической системы за пределы выявления и диагностики рака.

3.2.7. Верификация панели из 12 микроРНК в составе биологических жидкостей - потенциальных биомаркеров новообразований предстательной железы

Анализируя aberrantную экспрессию микроРНК в различных биологических жидкостях при развитии онкологических заболеваний, необходимо принимать во внимание факт небольшой разницы в концентрациях микроРНК – потенциальных онкомаркеров между исследуемыми группами доноров. Такая особенность микроРНК приводит исследователя к необходимости более тщательно продумывать дизайн экспериментов, включая количество и тип spike-in контролей, количество необходимых повторений, а также разработку нескольких критериев включения и/или исключения как донорских образцов крови и мочи, так и самих микроРНК, полученных из этих образцов. Сформулировав все эти требования и разработав аналитические системы, можно приступить к выполнению следующего шага исследования – верификации полученных данных на независимых выборках здоровых доноров и онкологических больных.

Основываясь на данных, описанных в предыдущей главе, нами была выполнена верификация полученных результатов с использованием сравнительного анализа уровня экспрессии 12-ти микроРНК (в составе 31-ой пары) во фракциях мочи (СВВ и СМ) и плазме

крови (поскольку зачастую врачам удобнее работать именно с этой биологической жидкостью) при помощи количественной петлевой ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для всех микроРНК были разработаны системы TaqMan ОТ-ПЦР (таблица 2.1.) с рабочим диапазоном 24–38 пороговых циклов (Ct). Отрицательные контроли для всех TaqMan ОТ-ПЦР систем либо вообще не давали флуоресцентного сигнала, либо полученный сигнал имел значение Ct минимум на семь циклов выше минимального обнаруживаемого значения в анализируемом образце. В качестве внутреннего контроля использовали микроРНК нематод *cel-miR-39*, сигнал от которой наблюдался во всех исследуемых образцах при значениях Ct 25 ± 1 .

В таблицах 3.21. и 3.22. показаны результаты сравнительного анализа соотношений (dCt и ddCt) экспрессии микроРНК или значений dddCt в соответствующих группах. Показаны только статистически значимые различия.

К сожалению (как мы и ожидали), в плазме крови достоверных межгрупповых различий соотношения микроРНК нами не было выявлено. Основным источником большинства соотношений дифференциально экспрессируемых микроРНК была фракция СВВ мочи. Эти результаты согласуются с последней тенденцией, предполагающей, что внеклеточные везикулы являются мощным источником биомаркеров (таких как PCA3 и TMPRSS2:ERG [642]). Например, широкодоступный в США тест ExoDx Prostate Intelliscore включает в себя анализ PCA3, TMPRSS2:ERG и SPDEF [20, 21].

Аберрантные изменения 15-ти пар микроРНК (состоящие из 12-ти микроРНК), по крайней мере в одной из изучаемых фракций биологических жидкостей, позволили дифференцировать здоровых доноров и пациентов с РПЖ (таблица 3.21. (группа сравнения РПЖ-ЗД)). Среди них 14-ть пар были обнаружены во фракции СВВ мочи и одна в СМ. Анализ уровней экспрессии 10-ти микроРНК (входящих в состав 20-ти пар: 14 в составе СВВ и 9 в СМ) позволил разделить группы пациентов с РПЖ и ДГПЖ. Особый интерес представляют собой 10 пар микроРНК, для которых значения dCt в группах ЗД и ДГПЖ были выше или ниже таковых для группы пациентов с РПЖ (т.е. значения dCt имели одинаковый знак). Такая общая направленность различий значений при сравнении групп РПЖ со ЗД и ДГПЖ позволяет предположить, что эти микроРНК потенциально могут дифференцировать не только группу здоровых доноров, но и разделять между собой пациентов со злокачественными и доброкачественными новообразованиями (таблица 3.21., выделены серым цветом). Наконец, анализ отношений 15-ти пар микроРНК (15 в составе СВВ и две — в СМ) позволил разделить между собой группы ЗД и ДГПЖ. Для пяти пар микроРНК разница значений dCt между группами ЗД и РПЖ или ДГПЖ имела одинаковую направленность (таблица 3.21., выделены серым цветом). Принимая во внимание статистическое распределение данных, минимальный

размер выборки для подтверждения полученных результатов при 95% значимости и мощности не превышал 18 участников на группу, увеличиваясь до 35 на группу при 99% значимости.

Таблица 3.21. Значения ddCt для дифференциально экспрессируемых пар микроРНК в следующих группах сравнения: РПЖ-ЗД, РПЖ-ДГПЖ, ДГПЖ-ЗД

Пары микроРНК	РПЖ - ЗД		РПЖ - ДГПЖ		ДГПЖ - ЗД	
	СВВ	СМ	СВВ	СМ	СВВ	СМ
22/19b		-1,7 *	3,2 ***		-2,2 **	-1,6 *
19b/92a	-8,2 ***		-8,4 ***	1,5 *		
378a/19b	1,8 **		2,5 ***	-1,7 *		
425/19b	1,0 **		1,6 ***			
22/92a	-6,7 ***		-4,7 ***			
378a/92a	-5,9 ***		-5,4 ***			
425/92a	-6,7 ***		-6,3 ***			
22/378a				1,5 *	-1,5 *	-1,5 *
22/425			1,6 ***		-1,6 **	
31/30e	-7,4 ***				-4,8 **	
125b/30e	-6,0 ***		5,6 ***	-1,3 *		
200b/30e	-8,4 ***				-5,3 **	
205/30e	-7,0 ***		-5,8 ***			
375/30e	-5,0 **		-3,5 **			
660/30e	-4,4 ***		-5,9 ***		1,5 *	
125b/31				-3,0 *	4,3 **	
205/31				-0,74 *		
375/31					3,3 *	
660/31					6,3 **	
200b/125b				3,4 *	-4,9 **	
375/125b			2,1 *			
660/125b	1,7 *				2,0 *	
205/200b				-2,8 *	4,1 *	
375/200b	3,3*				3,8 *	
660/200b				-2,9 *	6,8 *	
660/375			-2,4 *		3,0 *	
Количество aberrantly экспрессируемых пар микроРНК	14	1	14	9	15	2

Серым выделены значения ddCt с общей направленностью различий при сравнении групп РПЖ и ЗД.

*** P<0,001; ** P<0,01; *P<0,05. СВВ: значения ddCt пар микроРНК во фракции суммарных внеклеточных везикул мочи; СМ: значения ddCt пар микроРНК в супернатанте мочи

Изучение репрезентативности микроРНК выявило 20 пар со значимыми различиями в значениях ddCt для любых двух фракций биологических жидкостей между пациентами с РПЖ и здоровыми донорами (таблица 3.22.), в том числе 16 соотношений, по-разному распределенных между фракциями СВВ и супернатантом мочи, а также одно и 15 соотношений между плазмой и СМ или СВВ, соответственно.

Таблица 3.22. Значения dddCt для дифференциально экспрессируемых пар микроРНК в следующих группах сравнения: РПЖ-ЗД, РПЖ-ДГПЖ, ДГПЖ-ЗД.

Пары микроРНК	РПЖ - ЗД			РПЖ - ДГПЖ			ДГПЖ - ЗД		
	СВВ-СМ	Пл-СМ	СВВ-Пл	СВВ-СМ	Пл-СМ	СВВ-Пл	СВВ-СМ	Пл-СМ	СВВ-Пл
22/19b	2,9***	-2,3*		3,4***		2,1*			
19b/92a	-9,2***		-8,5***	-9,9***		-7,5***			
378a/19b	3,2**			4,4***					
425/19b	2,8**			2,8**					
22/92a	-6,1***		-7,3***	-6,0**		-4,8**			
378a/92a	-5,6**		-6,0***	-5,2**		-5,4***			
425/92a	-6,2***		-7,2***	-6,5***		-6,2***			
22/378a			-1,4*						2,1*
22/425						1,4*			-1,5*
31/30e	-8,0***		-9,5**	-3,9**					-4,2*
125b/30e	5,8***		-7,5***	-4,3***		-6,1***			
200b/30e	-9,5***		-11,8***	-5,3*		-5,0**			-4,3***
205/30e	-6,7***		-9,4***	-5,1*		-7,0*			
375/30e	-3,3**		-5,9***			-4,3**			
660/30e	-4,4***		-4,0***	-5,4***		-5,7***			
200b/125b			-4,3***						-2,8**
375/125b	2,4*								
660/125b			3,5***						2,5**
375/200b			5,9***	3,0**					3,2**
660/200b	5,1*		7,8***						5,3***
660/375	-1,1*								2,0*
Количество aberrантно экспрессируемых пар микроРНК	16	1	15	13	0	11	0	0	9

Серым выделены значения dddCt с общей направленностью различий при сравнении групп РПЖ и ЗД.

*** P<0,001; ** P<0,01; *P<0,05

СВВ-СМ: значения dddCt пар микроРНК между фракциями суммарных внеклеточных везикул и супернатантом мочи; Пл-СМ: значения dddCt пар микроРНК между плазмой крови и супернатантом мочи; СВВ-Пл: значения dddCt пар микроРНК между фракцией суммарных внеклеточных везикул и плазмой крови

Точно так же 15 пар микроРНК были по-разному распределены между пациентами с РПЖ и ДГПЖ (13 для фракций СВВ-СМ, ни одного для супернатанта мочи — плазмы крови, 11 для фракции СВВ — плазма крови). Общая направленность различий в сравнении РПЖ с группами ЗД и ДГПЖ была обнаружена для 21 значения dddCt (таблица 3.22., выделены серым цветом). Были обнаружены значимые отличия между пациентами с ДГПЖ и здоровыми донорами в значениях девяти пар микроРНК при анализе группы СВВ - плазма крови. Двадцать одно соотношение микроРНК при сравнении групп РПЖ-ЗД и РПЖ-ДГПЖ имело одинаковый знак различия в распределении, в то время как при сравнении групп ЗД-РПЖ и ЗД-ДГПЖ число

тех же соотношений с одинаковыми знаками было всего семь. Две пары микроРНК (микроРНК-31/-30е и микроРНК-200b/-30е) в составе СВВ мочи и плазмы крови были по-разному распределены между тремя группами, причём в прогрессивном порядке (таблица 3.22). Примечательно, что выбор по-разному распределённых соотношений не был идентичен по-разному экспрессируемым соотношениям микроРНК ни в одном из типов образцов.

Минимальный размер выборки, необходимый для проверки данных, описанных в таблице 3.22., составил не более 35 доноров при 95% значимости и мощности и 40 доноров на группу при 99% значимости (за исключением отношения микроРНК-660/-375, которое потребовало бы 75 участников в группе).

Оценка диагностической эффективности соотношений микроРНК для классификации групп доноров была выполнена при помощи анализа ROC - кривой. В таблицах 3.23. - 3.26. показаны полученные значения чувствительности при 100% специфичности для разделения больных РПЖ от контрольной группы (ДГПЖ+ЗД) и попарной дискриминации РПЖ от ЗД, РПЖ от ДГПЖ и ДГПЖ от ЗД, соответственно.

Таблица 3.23. Данные анализа ROC-кривых (чувствительность при 100% специфичности) больных РПЖ в сравнении с группой «ЗД+ДГПЖ»

Пары микроРНК	СВВ	СМ	Плазма	СВВ-СМ	Плазма-СМ	СВВ-Плазма
19b/92a	100			100		90
22/19b				90		
22/92a	70			60		60
378a/19b	80			90		
378a/92a	60			60		60
425/19b	70					
425/92a	80			70		90
125b/30e	100			100		100
200b/30e	100			90		100
205/30e	100			80		
31/30e	100			100		60
375/30e						80
660/30e	100			60		

СВВ: dCt значений уровня микроРНК во фракции СВВ

СМ: dCt значений уровня микроРНК в супернатанте мочи

Плазма: dCt значений уровня микроРНК в плазме

СВВ-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракциях СВВ и СМ

Плазма-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК в СМ и плазме

СВВ-Плазма: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракции СВВ и плазме

Соотношения с наибольшей чувствительностью выделены жирным шрифтом.

Таблица 3.24. Данные анализа ROC-кривых (чувствительность при 100% специфичности) больных РПЖ в сравнении с группой ЗД.

Пары микроРНК	СВВ	СМ	Плазма	СВВ-СМ	Плазма-СМ	СВВ-Плазма
19b/92a	100			100		90
22/19b		70		90	90	
22/92a	80			60		100
378a/19b	78			90		
378a/92a	70					
425/19b	67			70	80	
425/92a	90			70		90
125b/30e	100			100		100
200b/30e	100			90		100
205/30e	100		60	90		100
31/30e	100			100		70
375/30e	90					
378a/425	70					
660/30e	100					

СВВ: dCt значений уровня микроРНК во фракции СВВ

СМ: dCt значений уровня микроРНК в супернатанте мочи

Плазма: dCt значений уровня микроРНК в плазме

СВВ-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракциях СВВ и СМ

Плазма-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК в СМ и плазме

СВВ-Плазма: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракции СВВ и плазме

Соотношения с наибольшей чувствительностью выделены жирным шрифтом.

МикроРНК, выделенные из фракции СВВ мочи и входящие в состав шести пар (микроРНК-125/-30е, микроРНК-200/-30е, микроРНК-205/-30е, микроРНК-31/-30е, микроРНК-660/-30е и микроРНК-19b/-92a), продемонстрировали наивысшую диагностическую ценность (таблицы 3.23.–3.25.), что позволяет разделять пациентов с РПЖ от объединенной контрольной группы «ЗД+ДГПЖ» со 100% чувствительностью при 100% специфичности (таблица 3.23.). Значения dCt для этих соотношений микроРНК показаны на рисунке 3.23.

Таблица 3.25. Данные анализа ROC-кривых (чувствительность при 100% специфичности) больных РПЖ в сравнении с группой ДГПЖ.

Пары микроРНК	СВВ	СМ	Плазма	СВВ-СМ	Плазма-СМ	СВВ-Плазма
19b/92a	100	70	70	100		90
22/19b	100		70	90		70
22/92a	70			70		60
378a/19b	100		60	90		
378a/92a	60			60		60
425/19b	100		70			
425/92a	80					90
22/425	80					
125b/30e	100			100		100
125b/31	100				70	
200b/125b	100					
200b/30e	100			100		100
205/200b		70				
205/30e	100			80		
31/30e	100			100		60
375a/200b				70		100
375a/30e				80		
660/125b				80		
660/200b	100	80				
660/30e	100	70		100		100
660/31	100			80		
660/375a			60	90		

СВВ: dCt значений уровня микроРНК во фракции СВВ

СМ: dCt значений уровня микроРНК в супернатанте мочи

Плазма: dCt значений уровня микроРНК в плазме

СВВ-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракциях СВВ и СМ

Плазма-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК в СМ и плазме

СВВ-Плазма: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракции СВВ и плазме

Соотношения с наибольшей чувствительностью выделены жирным шрифтом.

Обнаружено, что четыре дополнительных соотношения могут дифференцировать пациентов с РПЖ и контрольную группу с чувствительностью от 80% до 100% при абсолютной специфичности: микроРНК-375/-30e, микроРНК-22/-19b, микроРНК-378a/-19b и микроРНК-425/-92a со значениями площади под кривой (AUC) = 0,90, 0,86, 0,98, 0,99, соответственно (таблица 3.23.). Анализ распределения между различными фракциями может повысить чувствительность диагностической системы, как показано, например, для пар микроРНК-22/-19b, микроРНК-378a/-19b и микроРНК-425/-92a (таблица 3.23.). В ряде случаев классификация, выполненная на основе распределения соотношений микроРНК, достигла абсолютной чувствительности и специфичности, например, для пар микроРНК-30e/-31, микроРНК-19b/-92a и микроРНК-125b/-30e, однако во всех этих случаях анализ изменений

экспрессии пар микроРНК только во фракции СВВ мочи дает такую же эффективность диагностики (таблица 3.23).

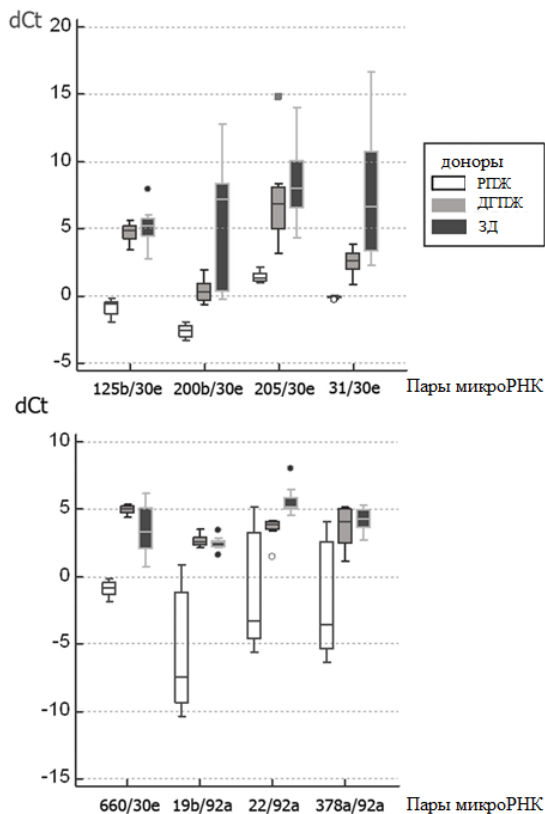


Рисунок 3.23. Значения dCt соотношений микроРНК, выделенных из фракции СВВ мочи с наивысшей диагностической ценностью.

Разделение групп пациентов с РПЖ и здоровых доноров со 100% чувствительностью при 100% специфичности может быть достигнута с помощью анализа изменений уровней экспрессии следующих пар микроРНК: во фракции СВВ мочи dCt микроРНК-125b/-30e, микроРНК-200b/-30e, микроРНК-205/-30e, микроРНК-31/-30e и микроРНК-19b/-92a и ddCt в группе СВВ – плазма для микроРНК-22/-92a (таблица 3.24.). Еще три пары микроРНК дискриминировали больных РПЖ и ЗД со 100%-ной специфичностью и чувствительностью 80% или 90%: микроРНК-378a/-19b, микроРНК-425/-92a (AUC=0,97, 0,99, соответственно; dCt для СВВ мочи) и микроРНК-22/-19b (AUC=0,92, ddCt для СМ - плазма) (таблица 3.24.).

Следующие соотношения микроРНК со 100% чувствительностью при 100% специфичности позволяют разделить между собой группы РПЖ и ДГПЖ: микроРНК-125b/-30e, микроРНК-125b/-31, микроРНК-200b/-125b, микроРНК-200b/-30e, микроРНК-205/-30e, микроРНК-31/-30e, микроРНК-660/-200b, микроРНК-660/-30e, микроРНК-660/-31, микроРНК-19b/-92a, микроРНК-22/-19b, микроРНК-378a/-19b и микроРНК-425/-19b в составе СВВ мочи и микроРНК-375/-200b при анализе ddCt СВВ-плазма (таблица 3.25.). Анализ изменений пяти дополнительных соотношений с более низкой чувствительностью (80–100%) дискриминировал пациентов с РПЖ и ДГПЖ: микроРНК-22/-425 (AUC=0,91; СВВ мочи), микроРНК-425/-92a

(AUC=0,94; ddCt СВВ – плазма), микроРНК-375/-30е, микроРНК-660/-375 и микроРНК-660/-125b (AUC=0,84, 0,98, 0,89, соответственно; ddCt СВВ – СМ) (таблица 3.25.).

Только пара микроРНК-22/-92а во фракции СВВ мочи разделяла пациентов с ДГПЖ от здоровых доноров со 100% чувствительностью при 100% специфичности (таблица 3.26.). Три пары микроРНК обладали более низкой чувствительностью (80–100%): микроРНК-125b/-30е, микроРНК-200b/-125b (AUC=0,89 и 0,91; СМ) и микроРНК-200b/-30е (AUC=0,99; ddCt СВВ – плазма) (таблица 3.26).

Таблица 3.26. Чувствительность (при 100% специфичности) селекции больных ДГПЖ от здоровых доноров

Пары микроРНК	СВВ	СМ	Плазма	СВВ-СМ	Плазма-СМ	СВВ-Плазма
22/19b		75				
22/378a	62					
22/92a	100					100
22/425	75					
425/92a						62
125b/30e		87				
125b/31		62				
200b/30e		75				87
200b/125b		87				
205/30e			62			
375/205			75			

СВВ: dCt значений уровня микроРНК во фракции СВВ

СМ: dCt значений уровня микроРНК в супернатанте мочи

Плазма: dCt значений уровня микроРНК в плазме

СВВ-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракциях СВВ и СМ

Плазма-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК в СМ и плазме

СВВ-Плазма: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракции СВВ и плазме

Соотношения с наибольшей чувствительностью выделены жирным шрифтом.

Для выбора наиболее диагностически эффективных пар микроРНК использовалась модификация алгоритма, описанного в главе 3.2.6.2. В данном случае были выполнены только первые два шага для пар микроРНК с самой высокой чувствительностью (50% и выше) для получения перекрывающейся диагностической панели с максимальной стабильностью.

В нашем случае нормальность распределения была подтверждена для всех отношений микроРНК – кандидатов в биомаркеры, поэтому для выбора пороговых значений использовались средние значения и значения SD. В таблицах 3.27.–3.30. показан процент случаев правильно классифицированных по сравнению с контрольной группой по каждой паре микроРНК с использованием описанного подхода. Каждого из пациентов с РПЖ можно было отличить от контрольной группы (ЗД+ДГПЖ) на основании анализа от 7-ми до 21-ого

соотношения dCt или ddCt микроРНК. В целом, для полного разделения всех групп доноров достаточно использования 11-ти микроРНК (таблица 3.27.).

С обратной стороны каждый из доноров в комбинированной неонкологической группе (ЗД+ДГПЖ) отличался от контрольной группы (пациенты с РПЖ) на основании соотношения 14–23 dCt или ddCt микроРНК. Для разделения групп, таким образом, использовали 12 микроРНК (таблица 3.28.).

Таблица 3.27. Процент правильно диагностированных больных РПЖ относительно контрольной группы (ЗД+ДГПЖ)

Пары микроРНК	СВВ	СВВ-СМ	СВВ-Плазма	Все фракции
19b/92a	100%	90%	70%	100%
22/92a	70%	60%	60%	70%
378a/92a	60%	60%	60%	60%
425/92a	80%	70%	80%	90%
125/30e	100%	100%	100%	100%
200b/30e			60%	50%
205/30e	60%			60%
375/30e	50%		70%	60%
660/30e	100%	70%	70%	100%
Все отношения	100%	100%	100%	100%

СВВ: dCt значений уровня микроРНК во фракции СВВ

СВВ-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракциях СВВ и СМ

СВВ-Плазма: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракции СВВ и плазме

Таблица 3.28. Процент правильно диагностированных доноров без признаков РПЖ относительно контрольной группы (РПЖ)

Пары микроРНК	СВВ	СВВ-СМ	СВВ-Плазма	Все фракции
19b/92a		63%		63%
22/425	58%			58%
378a/425	74%			74%
125b/30e	100%	100%	100%	100%
200b/30e	100%		68%	100%
205/30e	100%	53%	89%	100%
31/30e	100%	100%		100%
375/30e	84%			58%
660/30e	100%	84%	89%	100%
205/31	74%			74%
660/125b			53%	53%
205/200b	53%			53%
660/200b			53%	53%
660/205			53%	63%
Все отношения	100%	100%	100%	100%

СВВ: dCt значений уровня микроРНК во фракции СВВ

СВВ-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракциях СВВ и СМ

СВВ-Плазма: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракции СВВ и плазме

Таким образом, нам удалось отделить всех пациентов с РПЖ и всех, кроме одного пациента с ДГПЖ, от здоровых доноров на основании анализа соотношений 2–14 dCt или ddCt микроРНК. Оставшийся пациент с ДГПЖ был дискриминирован только с использованием ddCt микроРНК-22/-92a между фракцией СВВ мочи и плазмой крови. Для полного разделения этих групп использовали 10 микроРНК (таблица 3.29.).

Таблица 3.29. Процент правильно диагностированных всех больных (ДГПЖ и РПЖ) относительно контрольной группы (ЗД)

Пары микроРНК	СВВ	СМ	СВВ-СМ	СВВ-Плазма	Все фракции
22/19b		50%			50%
22/92a	50%			72%	72%
378a/92a	50%				50%
425/92a	55%			61%	61%
125b/30e	55%		55%	55%	55%
200/b30e				83%	83%
205/30e				66%	66%
660/30e	55%				55%
19b/92a	55%		55%		55%
Все отношения	55%	50%	55%	100%	100%

СВВ: dCt значений уровня микроРНК во фракции СВВ

СМ: dCt значений уровня микроРНК в супернатанте мочи

СВВ-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракциях СВВ и СМ

СВВ-Плазма: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракции СВВ и плазме

В завершении, здоровых доноров можно было отделить от контрольной группы пациентов с РПЖ и ДГПЖ на основании анализа соотношения 5–9 dCt или ddCt микроРНК. К сожалению, нам не удалось правильно дискриминировать одного здорового донора ни по одному из соотношений ни в одном типе выборки. Однако, при включении в диагностический алгоритм анализа значений ddCt микроРНК-375/-30e между фракциями СВВ и плазмой крови этот донор был верно отнесён к группе здоровых (таблица 3.30.).

Далее мы выполнили исследование корреляции уровней экспрессии соотношений микроРНК с клинико-демографическими параметрами (размером опухоли (TNM), оценкой по шкале Глисона, уровнем ПСА в крови и возрастом). Нами не обнаружено корреляций ($k \geq 0,6$) между характеристиками донора и уровнем соотношения микроРНК в супернатанте мочи или плазме крови. Однако были обнаружены корреляции между уровнями микроРНК-19b/-92a ($k = -0,76$), микроРНК-22/-92a ($k = -0,73$), микроРНК-378a/-92a ($k = -0,76$), микроРНК-425/-92a ($k = -0,77$), микроРНК-30e/-125b ($k = 0,78$) и микроРНК-205/-30e ($k = -0,70$) во фракции СВВ и концентрацией ПСА. Анализ именно этих соотношений с использованием диагностического алгоритма оказался эффективным при классификации пациентов с РПЖ (таблица 3.27.).

Таблица 3.30. Процент правильно диагностированных здоровых доноров относительно контрольной группы (ДГПЖ+РПЖ)

Пары микроРНК	СВВ	СВВ-СМ	СВВ-Плазма	Все фракции
31/30е	63%			63%
200b/30е	63%		81%	91%
375/31		54%	63%	73%
660/31	63%		72%	91%
200b/125b	63%		63%	91%
660/125b	54%		82%	91%
375/200b	54%		63%	82%
660/200b	63%	63%	91%	91%
Все отношения			91%	91%

СВВ: dCt значений уровня микроРНК во фракции СВВ

СМ: dCt значений уровня микроРНК в супернатанте мочи

СВВ-СМ: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракциях СВВ и СМ

СВВ-Плазма: ddCt между отношениями пар микроРНК во фракции СВВ и плазме

Это можно рассматривать как подтверждение их диагностического потенциала, но на самом деле является ограничением их использования совместно с ПСА. Тем не менее, их использование вместе с ПСА следует дополнительно изучить в группах пациентов без признаков заболевания РПЖ. Аберрантные изменения ещё пяти соотношений микроРНК (микроРНК-200b/-30е, микроРНК-205/-30е, микроРНК-31/-30е, микроРНК-660/-30е и микроРНК-22/-378а) не были связаны с уровнем ПСА при выявлении РПЖ со 100% чувствительностью и специфичностью. Именно эти отношения могут оказаться более подходящими кандидатами на роль биомаркеров в сочетании с имеющимися в клинической диагностике маркерами РПЖ. Конечно, необходимо принимать во внимание, что выявленные корреляции во многом были искажены тем, что в качестве одного из критериев при формировании групп доноров использовался ПСА крови. Поэтому, у пациентов с РПЖ и ДГПЖ были повышенные значения ПСА, что не обязательно имеет место в общей популяции больных, страдающих онкологическими заболеваниями предстательной железы.

Нами также была обнаружена положительная корреляция размера опухоли (Т) с аберрантным значением соотношения пары микроРНК-205/-200b во фракции СВВ мочи ($k=0,79$). Никакой значимой корреляции с оценкой Глисона выявлено не было ни для одного из соотношений. Это частично согласуется с более ранними результатами, описанными в литературе [643], в которых показана не только связь аберрантной экспрессии микроРНК-125b, -205 и -222 со стадией опухоли, но и значительная корреляция между стадией Глисона и экспрессией микроРНК-205. Все эти данные могут указывать на немаловажную роль микроРНК-205 и микроРНК-200b в опухолевой прогрессии [644]. Стоит отметить, что анализируемая нами выборка состояла из пациентов с ранней стадией РПЖ (Т1-2, оценка по шкале Глисона 5-7), что благоприятствует поиску биомаркеров для дифференциальной

диагностики, но ограничивает клиническую применимость выбранных маркеров для других целей, например, отслеживания опухолевой прогрессии и стратификации риска.

Несмотря на межгрупповые различия в возрасте доноров (здоровые 50–60 лет, пациенты с РПЖ 54–71 год и пациенты с ДППЖ 63–81 год), мы не обнаружили значимой связи между соотношением микроРНК и возрастом. Это является важным открытием, поскольку в тканях предстательной железы наблюдаются множественные возрастные изменения, которые имеющимися на сегодняшний день в клинике диагностическими тестами, часто ошибочно идентифицируются как новообразования, в том числе и РПЖ, что приводит к ненужным дополнительным тестам и ложноположительным диагнозам. Отсутствие корреляции между экспрессией микроРНК и возрастом дополнительно подтверждает потенциал отдельных пар микроРНК в качестве онкомаркеров для диагностики РПЖ.

Дифференциальная экспрессия микроРНК-19b, -30e, -92a, -125b, -200b, -205, -378a и микроРНК-660 между группами здоровых доноров и больных РПЖ в биологических жидкостях и/или тканях была обнаружена в ряде исследований [273, 572, 593, 645–657]. Как было описано выше, эти микроРНК связаны со специфическими аспектами онкогенеза РПЖ, включая передачу сигналов рецептора андрогена (AR) [296, 658], регуляцию клеточного цикла [296], пролиферацию и дифференцировку клеток [646, 659], эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [643, 660–662], рост клеток, апоптоз [289, 663, 664], адгезию и инвазию [644], внепростатическое распространение опухоли [652], метастазирование [657, 660], биохимический сбой [273, 659] и гормональную резистентность [650, 653]. Большинство идентифицированных микроРНК имеют известные мишени, участвующие в онкогенезе РПЖ. Так, известно, что все эти микроРНК имеют мишени, связанные с путями развития рака, такими как TGF- β , FoxO, p53, ErbB, TNF, HIF, MAPK и Wnt, а 11 микроРНК связаны с работой сигнального пути mTOR (DIANA-mirPath v.3, <http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>). Например, микроРНК-125b участвует в регуляции пути АКТ/mTOR и влияет на работу таких генов-кандидатов, как *BAK1* и *EIF4EBP1*, связанные в свою очередь с путем АКТ/mTOR [643, 647, 651]. МикроРНК-19b непосредственно регулирует работу генов *PTEN* и *TP53* и, следовательно, снижает уровни их нижестоящих мишеней, таких как Bax и p21 [665]. Снижение микроРНК-200 в клетках PC3, запускаемое фактором роста PDGFD, приводит к положительной регуляции репрессоров транскрипции *ZEB1*, *ZEB2* и *SNAI2*, которые затем регулируют потерю эпителиальных маркеров — характерному процессу эпителиально-мезенхимального перехода [644]. Присутствие микроРНК-205 является важным фактором ингибирующего действия p63 (супрессора метастазирования) на маркеры EMT, *ZEB1* и виментин в клетках РПЖ [660]. МикроРНК-660 влияет на работу таких генов, связанных с развитием РПЖ, как *AMACR* и *PSMA* [656]. Участие в онкогенезе косвенно подтверждает статус выбранных микроРНК-биомаркеров

и предполагает, что они могут иметь более широкое клиническое применение. Более того, выбранные микроРНК регулируют различные сигнальные пути, что гарантирует более высокую чувствительность и стабильность диагностической панели. Ранее некоторые исследователи (после проверки 45 микроРНК-кандидатов) также пытались создать диагностическую панель для дифференциальной диагностики пациентов с РПЖ и ДГПЖ на основе анализа трех микроРНК в бесклеточной фракции мочи (микроРНК-222-3р * микроРНК-24-3р/-30с-5р [666]) и двух микроРНК (микроРНК-100/-200b) в клеточном осадке мочи [635]. Авторы показали, что такие тесты могут быть полезны в качестве дополнительных к оценке уровня ПСА (у пациентов с уровнем ПСА в «серой зоне» (4–10 нг/мл)) для подтверждения необходимости выполнения биопсии простаты, но их нельзя использовать в качестве самостоятельных тестов для диагностики РПЖ. Несмотря на большое количество публикаций, описывающих экспрессию и роль микроРНК в развитии РПЖ, наши данные относительно диагностического потенциала микроРНК внеклеточных везикул мочи были получены впервые и в комбинации с анализом пар микроРНК и разработанных диагностических подходов позволяют эффективно диагностировать РПЖ.

В настоящей работе мы использовали несколько подходов для анализа данных об aberrантной экспрессии микроРНК и выбора наиболее подходящих соотношений микроРНК для диагностики РПЖ (рис. 3.24.).

На рисунке 3.24. представлена общая схема выбора пар микроРНК для диагностики РПЖ и выделены пары микроРНК выбранные по результатам выполнения этапа исследования. По результатам исследования наиболее перспективными парами микроРНК для диагностики РПЖ оказались пары микроРНК-125b/-30е, микроРНК-200b/-30е, микроРНК-205/-30е, микроРНК-31/-30е, микроРНК-660/-30е и микроРНК-19b/-92а. Анализ экспрессии выбранных пар микроРНК позволяет выявить пациентов с РПЖ со 100% чувствительностью при абсолютной специфичности. Такой анализ может быть дополнен четырьмя другими микроРНК (микроРНК-375, -378а, -22, -425) которые можно собрать в четыре диагностические пары, которые хоть и обладают меньшей чувствительностью (80%–90%), но могут позволить повысить устойчивость диагностической системы. Наиболее эффективными для разделения пациентов с РПЖ от контрольной группы (ЗД+ДГПЖ) являются пары микроРНК-125b/-30е, микроРНК-660/-30е и микроРНК-19b/-92а.

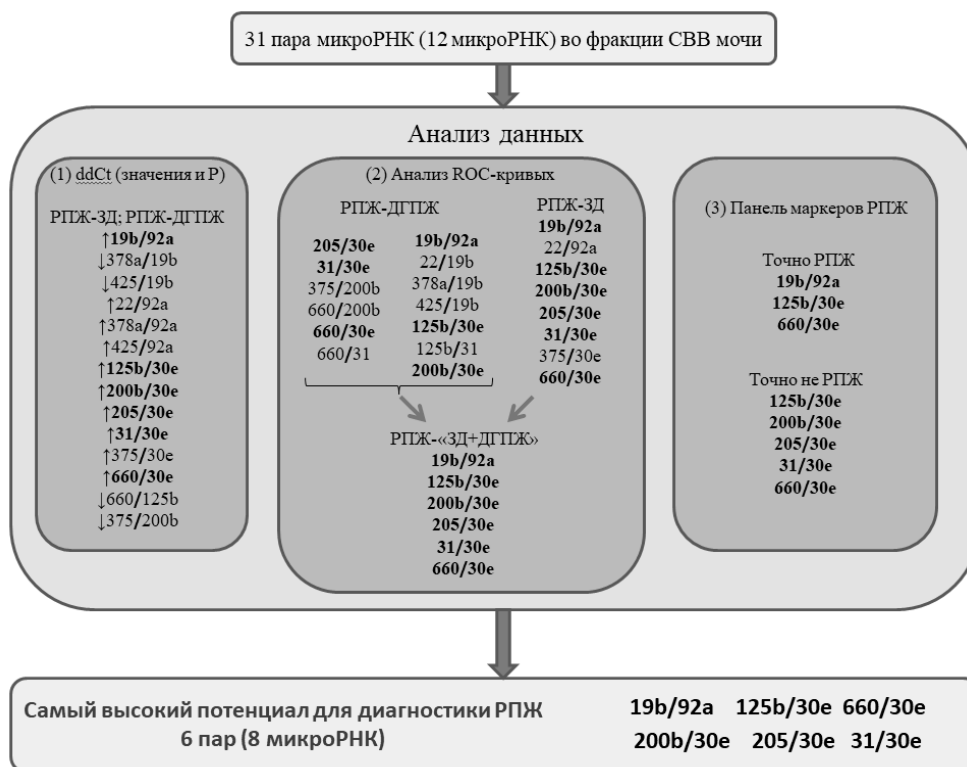


Рисунок 3.24. Итоговая схема выбора пар микроРНК для диагностики РПЖ. Жирным шрифтом выделены пары микроРНК, обладающие самым высоким диагностическим потенциалом и вошедшие в итоговую панель для диагностики РПЖ.

Таким образом, создана устойчивая панель микроРНК – онкомаркеров, позволяющая классифицировать пациентов с РПЖ, ДГПЖ и ЗД со 100% специфичностью, 100% чувствительностью и с высокой степенью надежности для большинства доноров.

3.3. Аберрантные изменения внеклеточных ДНК

ДНК опухолевых клеток, как и микроРНК, может попадать в циркулирующую кровь, причем такая внДНК, может содержать генетические мутации, модификации и перестройки, характерные для опухолевых клеток [667]. Разнообразие профилей метилирования, обнаруженное во внДНК крови здоровых и онкологических больных с помощью метода локус-специфичного массового параллельного бисульфитного пиросеквенирования, заставило серьезно задуматься о механизмах метилирования ДНК в норме и патологии, механизмах генерации и циркуляции метилированной внДНК [318].

3.3.1. Особенности метилирования внеклеточной ДНК в культуре первичных и трансформированных клеток

Чтобы выяснить влияет ли функциональное состояние клеток (фаза клеточного цикла) на метилирование, было выполнено сравнительное исследование статуса метилирования CpG-динуклеотидов геномной ДНК (генДНК) и внДНК с помощью методов MS-qPCR и пиросеквенирования. В качестве исследуемого локуса был выбран фрагмент гена *RARbeta2* (X56849.1, 924-1117), содержащий 13 сайтов CpG.

За уровень метилирования (ML) было принято отношение концентрации метилированной формы гена *RARbeta2* к его суммарной концентрации $\times 100\%$.

Данные MS-qPCR показали, что внДНК и генДНК из клеток линии HeLa имеют в целом сходный уровень метилирования (100%), за исключением клеток после 24 часов культивирования, когда метилирование внДНК снижалось до 37% (рис. 3.25. А).

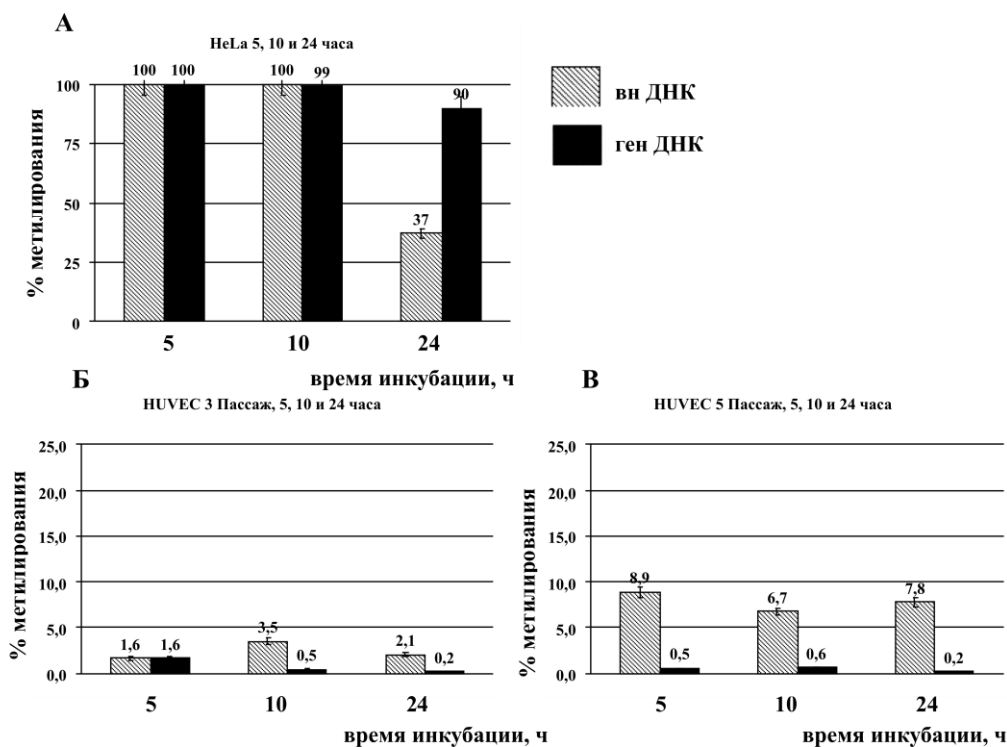


Рисунок 3.25. Распределение метилирования в гене *RARbeta2* в составе внДНК и генДНК трансформированных (А) и первичных (Б и В) клеток

Относительное метилирование гена *RARbeta2* в составе внДНК первичных клеток линии HUVEC зачастую было выше (8,9%), чем в генДНК (1,6%). Необходимо отметить, что ML гена *RARbeta2* повышался при увеличении клеточных пассажей и варьировал в зависимости от линии первичных клеток (донора) (рис. 3.25. Б и В). Отличие в уровне метилирования внДНК от геномной трудно объяснить. Оно может быть связано с нарушением метилирования при апоптозе, поскольку именно апоптоз является основным источником внДНК по современным

данным [668, 669]. Кроме того, использование MS-qPCR не давало полной картины о метилировании исследуемого локуса, а позволяло детектировать исключительно последовательности комплементарные праймерам и зонду для MS-qPCR.

Данные CpG-метилирования гена *RARbeta2* в составе ДНК из клеток линии HeLa, полученные методом пиросеквенирования, показали сходный профиль метилирования внДНК и генДНК. Однако пониженное содержание метилированной ДНК в клетках, культивируемых в течение 24 ч, определенное методом MS-qPCR, пиросеквенированием не подтвердилось.

В клетках линии HUVEC ML практически всех сайтов составлял $3 \pm 0,25\%$, как в составе внДНК, так и в генДНК, однако периодически зависел от номера пассажа и отличался между внДНК и генДНК. Полученные данные о метилировании внДНК и генДНК первичных клеток показывают, что абберрантно метилированные формы ДНК присутствуют и в нормальных клетках.

Принципиальным фактом, обнаруженным при помощи пиросеквенирования, являлся различный уровень метилирования индивидуальных цитозинов в составе внДНК и генДНК. А именно, во-первых, во внеклеточной и геномной ДНК могут быть метилированы разные цитозины; во-вторых, неравномерное метилирование отдельных цитозинов в составе CpG динуклеотидов локуса свидетельствует о том, что «распространение» метилирования и наличие полностью метилированных и полностью неметилированных локусов не является абсолютной истиной. При этом, метод пиросеквенирования дает информацию о соотношении метилированного и неметилированного цитозина в определенной позиции. Учитывая, что уровень метилирования разных цитозинов отличается, возникает закономерный вопрос о том, какая комбинация молекул его обеспечивает. Действительно, расхождение между данными, полученными с использованием методов пиросеквенирования и MS-qPCR может быть связано с тем, что методы представляют данные о метилировании конкретных CpG, причем в суммарном виде (для пиросеквенирования) или метилирования отдельных молекул, которые являются комплементарными мишенями для праймеров (зонда). Следует отметить, что эти результаты были получены тогда, когда уже были опубликованы данные о неклассическом CpG-метилировании цитозинов в эмбриональных стволовых клетках [670].

Таким образом, данные MS-qPCR и пиросеквенирования демонстрируют, что пул циркулирующих внДНК может быть сформирован из множества молекул с разным профилем метилирования отдельных цитозинов, как это и было обнаружено Коршуновой с соавт [318]. При этом свой вклад в формирование такого пула абберрантно-метилированных внДНК могут вносить как клетки нормальных тканей, так и клетки опухолей. По-видимому, эта особенность метилирования ДНК сильно осложняет поиск маркеров, детектируемых при помощи метил-специфичной ПЦР. Действительно, анализ пула молекул с разным профилем метилирования

цитозинов и поиск aberrантно-метилованных молекул, которые были бы характерны для опухолевых клеток, возможен исключительно при помощи методов предоставляющих информацию о профиле метилирования каждой молекулы ДНК – т.е. метил-специфичное полногеномное секвенирование ДНК после бисульфитной конверсии.

3.3.2. Особенности метилирования внеклеточной ДНК, циркулирующей в крови при онкологических заболеваниях предстательной железы

Особенности генерации и циркуляции внДНК делает ее удобным источником диагностического материала, в частности, небольшой период полураспада, который составляет около 1,5 часов, позволяет отслеживать рецидив опухоли, оценивать действия лекарственных препаратов в режиме реального времени [671]. Уже в ранних работах при РПЖ были обнаружены aberrантно-метилованные гены, такие как *GSTP1* и *SFRP2* [672, 673]. В исследовании с использованием микрочипов в лаборатории А. Petronis было идентифицировано несколько новых маркеров aberrантного метилирования ДНК [313]. Данные о том, что метилированные ДНК более стабильны в крови, чем неметилованные, дольше циркулируют в крови [50], более эффективно связываются с клетками крови [184], делают этот тип молекул ещё более привлекательным источником диагностического материала. При этом, как уже было сказано выше, профиль метилирования цитозинов в составе отдельных молекул ДНК может существенно отличаться, т.е. необходим анализ aberrантно-метилитрованных ДНК с одонуклеотидным разрешением. Принимая во внимание концентрацию внДНК [57, 674] и содержание опухолеспецифичных молекул в пуле внДНК крови [71, 204–206], наиболее разумным вариантом анализа такого метилирования может служить локус-специфичное полногеномное секвенирование ДНК после бисульфитной конверсии.

В этом исследовании мы проанализировали метилирование на уровне разрешения отдельных динуклеотидов CpG, используя метод локус-специфичного секвенирования NGS, с целью поиска циркулирующей в крови aberrантно-метилованной внДНК, специфичной для опухолей предстательной железы. В исследование были включены локусы трех генов, а именно *GSTP1* (NG_012075.1, 4998-5139), *RNF219* (NC_000013.11, 125-285) и *KIAA1539* (chr9: 35103583-35103671), которые, как было показано ранее, изменяют статус метилирования у пациентов с опухолями предстательной железы [313, 458, 675]. Метилирование промоторной области гена *GSTP1* в геномной ДНК, выделенной из ткани опухоли предстательной железы обнаруживали в 86% - 100% образцов злокачественных опухолей ПЖ [676]. Анализ aberrантного метилирования гена *RNF219*, как уже упоминалось в главе 1.2.2., в плазме крови больных позволил отличить больных РПЖ от больных ДГПЖ с чувствительностью 61% и

специфичностью 71% [313]; хороший диагностический потенциал гена *KIAA1539* также был продемонстрирован в работе [313].

3.3.2.1. Количественная оценка внеклеточных ДНК, циркулирующих в крови

Однако прежде чем исследовать циркулирующие внДНК при помощи NGS, необходимо было оценить их количество в крови здоровых доноров и больных пациентов.

Известно, что в среднем 1 мл плазмы крови онкологического больного содержит примерно 1500 эквивалентов диплоидного генома (ГЭ) (~10 нг ДНК), при этом значительно большее количество часто наблюдается у пациентов с метастатическим раком. Типичный забор крови объемом 10 мл позволяет получить в среднем 4 мл плазмы, содержащей 6000 ГЭ (12×10^3 молекул на область или ген) [71]. Концентрация опухолеспецифической ДНК в плазме крови колеблется от 1% до 10%, что соответствует 60 - 600 ГЭ, доступных для анализа. Таким образом, теоретический предел чувствительности составляет ~0,01% (то есть способность обнаруживать 1 фрагмент из 12000 копий).

Учитывая неоднородную представленность геномной ДНК в циркуляции [677, 678], отмеченные выше сложности с метилированной ДНК, а также специфичность и чувствительность ПЦР, обнаружение таких маркеров представляет собой непростую задачу.

Одним из подходов к преодолению этих осложнений является увеличение количества внДНК. Ранее нами была обнаружена внДНК, связанная с поверхностью клеток крови, в количествах, как минимум сравнимых с внДНК в плазме [679], и в этой фракции были обнаружены аберрантно-метилованные ДНК, пригодные для секвенирования [261, 458, 463].

Для дальнейшего исследования внДНК при помощи метода NGS, её количество в плазме крови и в виде, связанном с поверхностью клеток крови оценивали с помощью флуоресцентного красителя Hoechst 33258. Было показано, что критериям, удовлетворяющим распределению Гаусса, соответствуют значения концентраций во всех группах доноров (данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{SE}$) за исключением концентрации внДНК на поверхности клеток у здоровых мужчин (данные представлены в виде медианы и разброса значений). Концентрации внДНК у здоровых доноров составили в плазме – $11,8 \pm 2,04$ нг/мл крови и на поверхности клеток – 712,5 (193-2435 нг/мл). У пациентов с ДГПЖ и РПЖ значения концентраций практически не отличались и составляли в плазме – $85,4 \pm 26,1$ нг/мл и $46,1 \pm 21$ нг/мл, а на поверхности клеток крови – $57,5 \pm 6$ нг/мл и $60,6 \pm 9,9$ нг/мл, соответственно.

Одной из причин такого изменения в концентрациях ДНК в крови при развитии онкологических заболеваний предстательной железы может служить перераспределение ДНК между фракциями крови. Нами было показано, что как при развитии ДГПЖ, так и при развитии

РПЖ происходит уменьшение доли внДНК, связанной с клеточной поверхностью, и увеличение доли свободной внДНК в плазме крови (рис. 3.26.).



Рисунок 3.26. Перераспределение количества внДНК в крови при развитии онкологических заболеваний предстательной железы.

Такое перераспределение количества внДНК в крови при развитии онкологических заболеваний предстательной железы может быть следствием изменений в работе различных ферментов (протеаз, нуклеаз и их ингибиторов) [185, 680–683], включая повышение у больных концентрации ПСА (сериновая протеаза kallikrein 3) [684].

Ещё одной причиной уменьшения доли внДНК, связанных с поверхностью клеток крови, при развитии онкологических заболеваний могут быть нарушения в строении цитоплазматических мембран различных клеток крови, связанные с изменением соотношения липидов, что способствует не только увеличению вязкости липидного бислоя, но и изменению межмолекулярных белок-липидных взаимодействий. Все эти изменения приводят к нарушениям, как белкового состава, так и работы катион-транспортирующих мембранных систем, что в свою очередь влияет на организацию поверхностной архитектуры клеток [685].

Как уже было описано выше, пул внДНК, связанных с поверхностью клеток крови, является дополнительным и очень ценным источником диагностических молекул ДНК [463]. Данные о возможности обмена (хотя механизмы этого процесса пока не изучены) свободной внДНК и связанной с клеточной поверхностью внДНК позволили нам предположить, что наиболее точная диагностическая информация может быть получена при анализе суммарной (свободной + связанной с поверхностью клеток крови) внДНК.

3.3.2.2. Анализ локус-специфичного метилирования генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* в составе внДНК крови здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями предстательной железы

Блок-схема исследования представлена на рисунке 3.27.

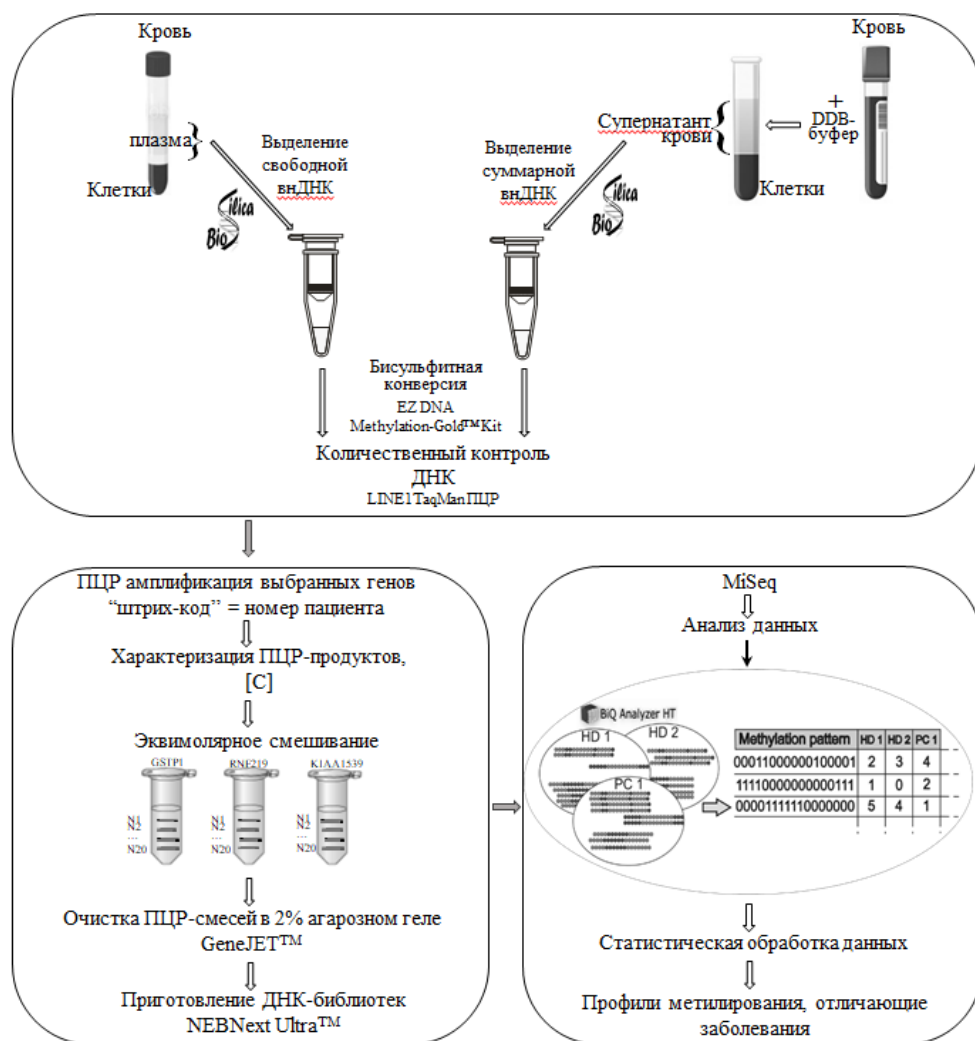


Рисунок 3.27. Блок-схема исследования абerrантного метилирования цитозинов в составе свободных и суммарных (свободные + связанные с поверхностью клеток крови) внДНК крови.

После выделения, бисульфитной конверсии и количественного определения свободной и суммарной внДНК, её использовали для локус-специфичной амплификации, подготовки ДНК-библиотек для секвенирования, секвенирования NGS с последующей обработкой полученных данных.

Поскольку протокол получения, как свободной, так и суммарной внДНК до выполнения локус-специфичного секвенирования включает много этапов, необходимо было оценивать потери ДНК на каждом шаге. Для контроля количества ДНК до и после проведения бисульфитной конверсии мы использовали количественную TaqMan ПЦР в режиме реального времени нацеленную на *LINE 1* элементы с использованием праймеров не зависящих от

метилирования. Аналитические характеристики систем описаны в главе 3.1.2. Каждый исследуемый образец содержал ДНК в количестве не менее 3,3 нг/мл исходной крови, стандартный выход суммарной вДНК после бисульфитной конверсии колеблется в пределах 70-80%. После выполнения локус-специфичной амплификации с метил-независимыми праймерами получали не менее 50 нг ДНК для каждого локуса.

После эквимольного смешивания продуктов ПЦР и очистки методом гель-электрофореза, не менее 100 нг (по данным Agilent 2100) всей смеси продуктов ПЦР использовали для приготовления библиотек. При выполнении локус-специфичной ПЦР продукты ПЦР были штрих-кодированы парой уникальных индексов (таблица 2.5.) размером 8 п.н. (кодирующие каждого пациента), предложенные J. Carroasco [508], для того, чтобы избежать ошибок при секвенировании и анализе данных.

Для исключения появления химерной ДНК между молекулами больных РПЖ и здоровых доноров, продукты ПЦР кодировали с помощью восьми 5'-прямых (X_n) и двенадцати обратных праймеров (Y_n), так чтобы группы образцов от больных РПЖ и здоровых доноров не содержали общих штрих-кодов. Последовательности, полученные методом NGS, имеющие комбинации праймеров, отсутствовавших при приготовлении библиотек, считались химерными и исключались из анализа данных.

Учитывая долю опухолеспецифической ДНК в циркуляции [204], даже 10^4 прочтений на локус на образец обеспечивают не менее 100-кратного охвата вДНК и надежное обнаружение одной опухолеспецифической молекулы.

Всего нами было получено 6,3, 9,0 и 9,2 миллиона прочтений для исследуемых областей генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539*, соответственно, путем секвенирования парных концов длиной 250 п.н. Качество всех библиотек было высоким, процент однозначно картированных прочтений варьировал в пределах 80-85%. Выбранные локусы были секвенированы с охватом от 23509 до 143953.

После анализа первичных данных был выполнен подсчёт количества молекул с аналогичным профилем метилирования для каждого гена у каждого пациента.

3.3.2.2.1. Аберрантное метилирование генов в составе свободной вДНК плазмы крови

Доли последовательностей с метилированным цитозином в каждом из положений молекулы в группах ЗД, больных РПЖ и ДППЖ представлены на диаграммах (рис. 3.28.).

Из этих данных видно, что метилирование C9 в исследуемом локусе гена *GSTP1* является наиболее характерным событием, связанным с развитием опухолей предстательной железы, по сравнению с метилированием в других одиночных положениях этого локуса. Метилирование 3-го и 13-го цитозинов одного и того же локуса достоверно различается у

здоровых доноров и больных с опухолями предстательной железы. Больные ДГПЖ и РПЖ наиболее различаются по метилированию 2-го и 16-го цитозина одного и того же локуса гена *GSTP1*. Суммарный уровень метилирования отдельных позиций цитозина в генах *RNF219* и *KIAA1539* в исследованных группах доноров достоверно не различался.

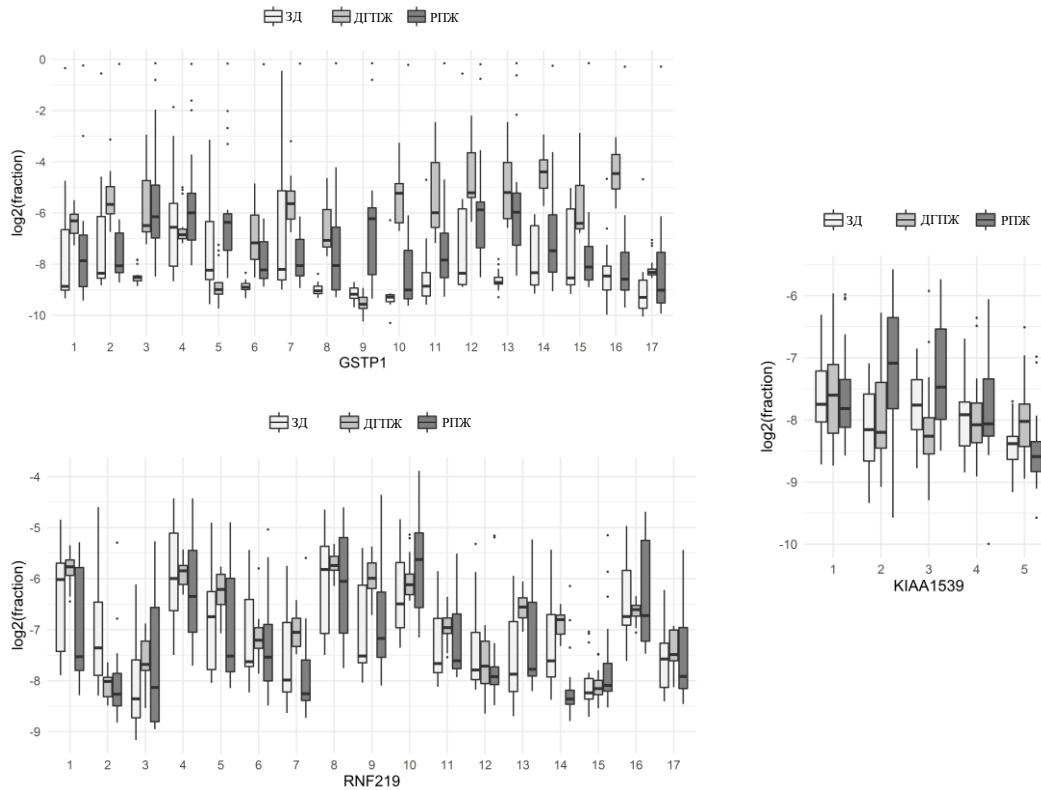


Рисунок 3.28. Сравнение уровня метилирования отдельных CpG - динуклеотидов в разных положениях изучаемых локусов в составе свободной вДНК плазмы крови у здоровых доноров и больных ДГПЖ и РПЖ. Данные представлены в виде прямоугольников с указанием медианы и с первым и третьим квартилями.

Анализ корреляции между метилированием отдельных CpG - динуклеотидов для гена *GSTP1* (рис. 3.29.) показал, что метилирование отдельных цитозина коррелирует в группах ЗД и ДГПЖ (а именно, C7-C12 у ЗД и C3-C15 у пациентов с ДГПЖ; $r > 0,9$), тогда как у больных РПЖ высокая корреляция ($r > 0,9$) наблюдалась для aberrantного метилирования C2 со статусом метилирования цитозина в положениях C6, -7, -10, -15 и -17; C6 со статусом C2, -7, -10, -11, -15, -16 и -17; и C10 со статусом C15, -16 и -17.

Помимо метилирования отдельных цитозина в пределах исследованных локусов, мы рассматривали попарное метилирование молекул или, точнее, вводили переменные, отражающие одновременное метилирование, метилирование одного и отсутствие метилирования второго или отсутствие метилирования обоих цитозина в одной молекуле ДНК.



Рисунок 3.29. Корреляция между метилированием отдельных цитозинов изучаемого локуса гена *GSTP1* и составом ДНК в циркулирующей крови исследуемых больных. Двоичные логарифмы переменных использовались для всех графиков. В диагональных ячейках представлены графики плотности для групп РПЖ (красный), ДГПЖ (зеленый) и ЗД (синий) для каждой из переменных. Каждая диагональная ячейка имеет собственную шкалу оси Y, которая не обозначена. «ЗД», «ДГПЖ» и «РПЖ» обозначают соответствующие корреляции Пирсона для каждой из групп. «Корр» обозначает корреляцию Пирсона для всех объединенных групп; корреляции рассчитаны для двоичных логарифмов переменных. В ячейках под диагональю представлены диаграммы рассеяния для каждой пары переменных.

Результаты сравнения между больными РПЖ и группой доноров ЗД и ДГПЖ представлены в таблице 3.31. Перечислены только переменные с $p \times 3 \times 1167 < 0.005$ и чувствительностью (для 100% специфичности) $> 70\%$ (общие данные для $p < 0.005$ приведены в Приложении 5). Кроме того, в качестве примеров приведены результаты для моделей с несколькими переменными-предикторами.

Таблица 3.31. Сравнение статуса метилирования цитозинов в составе свободной вДНК плазмы крови у пациентов с РПЖ с объединенной группой, включающей ЗД и пациентов с ДГПЖ.

Ген, Позиция, Статус (С или Т после конверсии)	Р-значение ×3×1167	Среднее, %	Чувствительность для 100% специфичности, %	Специфичность для 100% чувствительности, %	Пороговое значение, %	CV точность, %	CV чувствительность, %	CV специфичность, %	CV AUC, % (De Long's CI)
PCA	,016		10,0	55,6		75,0	65,0	80,6	83,9 (73,5, 94,2)
GSTP1.C9 + RNF219.C2 + GSTP1.C2			100	100		100	100	100	100
GSTP1.C9 + RNF219.C2 + GSTP1.C16			100	100		100	100	100	100
GSTP1.C9 + RNF219.C2.T10			95,0	97,1		94,5	90,0	97,1	92,4 (83,2, 100)
GSTP1.C3.C9	,00000073	8,03/ ,0394	80,0	54,3	,101	87,3	80,0	91,4	93,0 (85,1, 100)
GSTP1.C9	,00000090	8,35/ ,160	80,0	48,6	,215	90,9	80,0	97,1	92,6 (83,2, 100)
GSTP1.C9.T17	,0000011	4,04/ ,143	80,0	37,1	,198	89,1	80,0	94,3	93,1 (83,5, 100)
GSTP1.T2.C9	,0000011	3,71/ ,142	75,0	45,7	,177	87,3	80,0	91,4	93,0 (84,7, 100)
GSTP1.T1.C9	,0000024	3,94/ ,142	75,0	34,3	,199	89,1	80,0	94,3	92,1 (82,2, 100)
GSTP1.T6.C9	,0000024	3,71/ ,142	70,0	51,4	,177	87,3	80,0	91,4	92,6 (84,4, 100)
GSTP1.T4.C9	,0000029	3,71/ ,142	75,0	51,4	,179	87,3	80,0	91,4	92,1 (83,1, 100)
GSTP1.C9.T16	,0000050	4,01/ ,140	70,0	48,6	,190	89,1	85,0	91,4	92,0 (83,4, 100)
GSTP1.C9.T14	,0000070	3,90/ ,138	70,0	34,3	,190	87,3	85,0	88,6	91,9 (82,3, 100)
GSTP1.T5.C9	,0000084	3,67/ ,143	75,0	42,9	,188	87,3	80,0	91,4	91,7 (82,9, 100)
GSTP1.C9.C13	,0044	4,76/ ,0197	70,0	40,0	,0512	85,5	70,0	94,3	85,0 (73,0, 97,0)

Средние значения представлены как среднее в группе РПЖ/среднее в группе ЗД+ДГПЖ. Пороговое значение является оценкой порога, который может быть полезен для разделения сравниваемых групп. Чувствительность — это доля пациентов с РПЖ, правильно идентифицированных как таковые, а специфичность — это доля доноров ЗД+ДГПЖ, правильно идентифицированных как таковые. Сокращения: CV = перекрестная проверка, AUC = площадь под кривой ROC, CI = доверительный интервал.

Существуют десятки других моделей с тремя предикторами, дающими полное разделение групп сравнения (100% чувствительность при 100% специфичности). Например, анализ следующих переменных вместе с GSTP1.C9 и RNF219.C2 показал полное разделение групп сравнения: GSTP.C2, GSTP.C16, GSTP.T2.T7, GSTP.T2.T9, GSTP.T2.T10, GSTP.T2.T11, GSTP.T2.T15, GSTP.T2.T16, GSTP.T7.T16, GSTP.T9.T16, GSTP.T10.T16, GSTP.T15.T16, GSTP.T1.C2, GSTP.T1.C16, GSTP.T2.C16, GSTP.T3.C16, GSTP.T4.C16, GSTP.T5.C16, GSTP.T6.C16, GSTP.T7.C16, GSTP.T8.C16, GSTP.T9.C16, GSTP.T10.C16, GSTP.T11.C16, GSTP.T12.C16, GSTP.T13.C16, GSTP.T14.C16, GSTP.T15.C16, GSTP.C2.T3, GSTP.C2.T4, GSTP.C2.T5, GSTP.C2.T6, GSTP.C2.T7, GSTP.C2.T8, GSTP.C2.T9, GSTP.C2.T10, GSTP.C2.T11, GSTP.C2.T12, GSTP.C2.T13, GSTP.C2.T14, GSTP.C2.T15, GSTP.C2.T16, GSTP.C2.T17, GSTP.C16.T17, RNF.T7.T9, RNF.C5.C6, RNF.C4.C13, KIAA.C2, KIAA.T2.T3, KIAA.T2.T4, KIAA.T1.C2, KIAA.C2.T3, KIAA.C2.T4 и KIAA.C2.T5.

Однако мы не уверены, была ли повышенная частота предсказаний результатом переобучения или она отражала истинную природу ассоциации. Поэтому мы упомянули лишь несколько моделей с несколькими предикторами. Более того, многие переменные имели хорошие диагностические характеристики, например, каждая из переменных GSTP1.C3.C9, GSTP1.C9 и GSTP1.C9.T17 демонстрировала 80% чувствительность при 100% специфичности. Необходимо отметить, что переменные, описывающие статус метилирования гена *GSTP1*, имеют наибольшую диагностическую значимость.

Чувствительность (при 100% специфичности) других позиций CpG в пределах локуса гена *GSTP1* была несколько ниже; однако одновременное использование данных по статусу метилирования нескольких динуклеотидов CpG позволило построить диагностические системы со 100% чувствительностью и 100% специфичностью. Отметим, что последовательности, aberrантно-метилированные в диагностически значимых позициях, были хорошо представлены (3–8%), а уровень порогового значения варьировал в диапазоне 0,1–0,2%. На рисунке 3.30. представлена диаграмма рассеяния для GSTP1.C3 и GSTP1.C9, которая показывает, что группа больных ДГПЖ характеризуется повышенными значениями GSTP1.C3 (значения GSTP1.C9 в норме), в то время как группа пациентов с РПЖ характеризуется повышенными значениями обоих GSTP1.C3 и GSTP1.C9.

Значение cut off являлось оценкой порога, который может быть полезен для разделения групп сравнения. Чувствительность представляла собой долю пациентов с РПЖ, правильно идентифицированных как таковые, а специфичность представляла собой долю доноров ЗД+ДГПЖ, правильно идентифицированных как таковые.

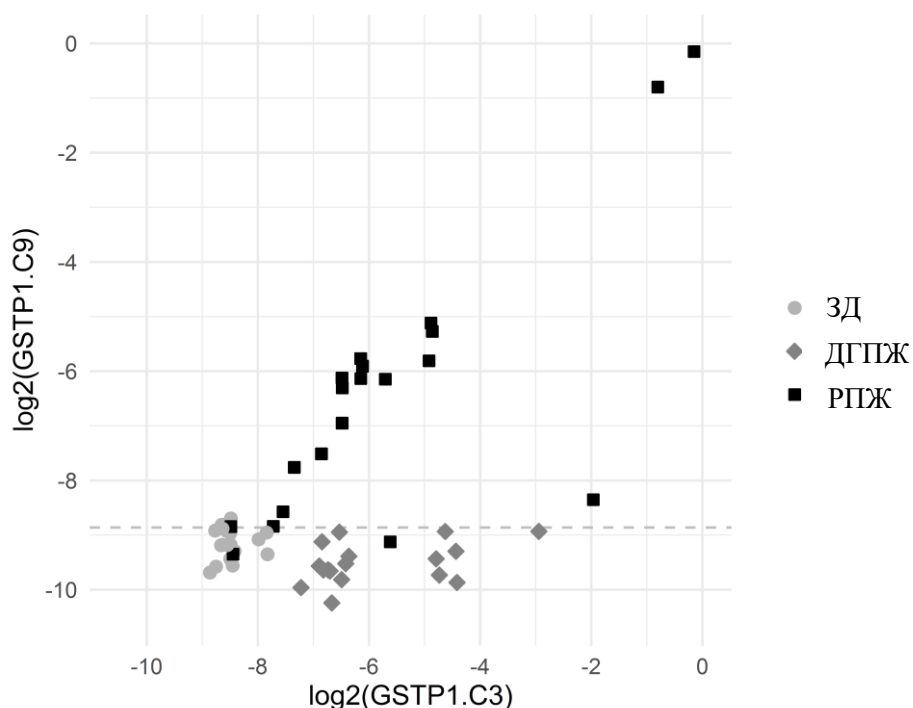


Рисунок 3.30. Диаграмма рассеяния для GSTP1.C3 и GSTP1.C9. Горизонтальная пунктирная линия изображает пороговое значение $\log_2(0,00215)$, соответствующее специфичности 94,3% и чувствительности 90,0% при сравнении больных РПЖ с группой 3Д+ДГПЖ.

Некоторые результаты сравнения больных ДГПЖ с группой 3Д+РПЖ представлены в таблице 3.32. Перечислены переменные с $p \times 3 \times 1167 < 0,0000000001$ и 100% чувствительностью для 100% специфичности (суммарные данные для $p < 0,005$ перечислены в приложении 6).

В результате выполненного исследования было выявлено 80 переменных (соответствующих двум одновременно метилированным цитозинам в каждом локусе гена), которые позволили полностью различить пациентов с ДГПЖ с $p < 0,0000000001$. Из этих переменных 77 были получены для гена *RNF219*, а 3 — для гена *GSTP1*. Кроме того, 46 переменных отличали группы сравнения при 100% чувствительности со специфичностью в 94% и $p < 0,00001$.

На рисунке 3.31. показано разделение группы больных ДГПЖ от остальных доноров с использованием анализа статуса метилирования цитозинов в положениях GSTP1.C4.C5 и GSTP1.T11.C16. Результаты показали статистически значимую связь между многими введенными переменными с диагнозом ДГПЖ.

Пороговое значение было необходимо для разделения групп сравнения. Соответствующее соотношение использовалось только в случае полного разделения рассматриваемой группы, которое представляло собой отношение минимума в группе сравнения с более высокими значениями к максимуму в группе сравнения с более низкими значениями.

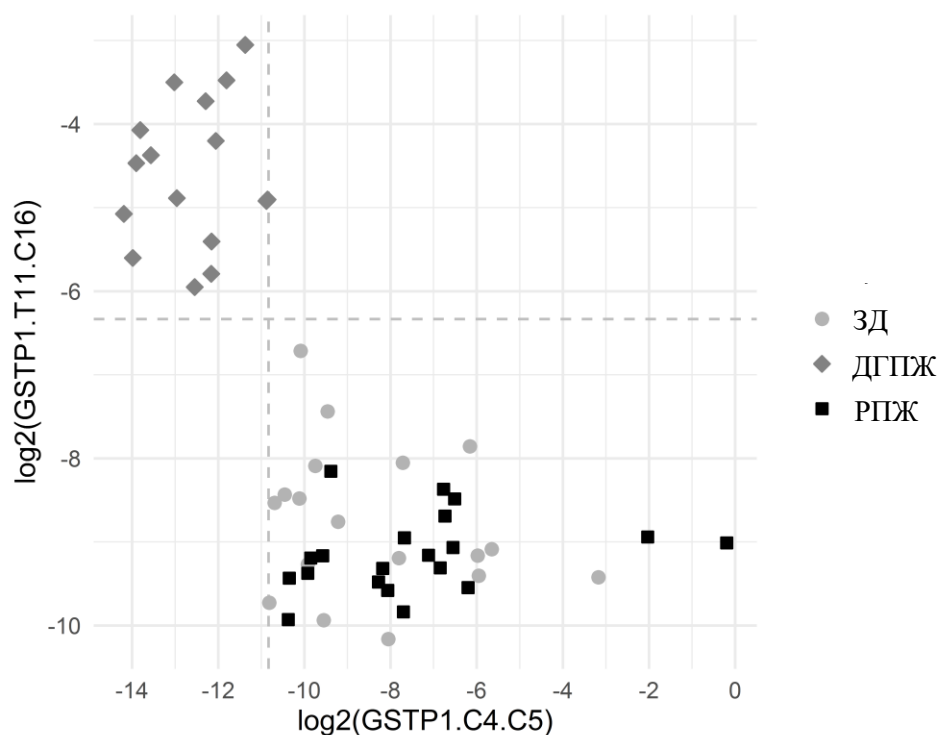


Рисунок 3.31. Графическое представление разделения группы больных ДГПЖ. Горизонтальное значение отсечки $\log_2(0,0214)$. Вертикальная пунктирная линия изображает пороговое значение $\log_2(0,000548)$. Оба пороговых значения соответствуют полному разделению больных ДГПЖ по сравнению с другими донорами для соответствующих переменных. Одно наблюдение из группы больных ДГПЖ с $\text{GSTP1.C4.C5} = 0$ и $\log_2(\text{GSTP1.T11.C16}) = -3,1$ не отображено, так как $\log_2(\text{GSTP1.C4.C5})$ бесконечен для этой точки.

Чувствительность представляла собой долю пациентов с ДГПЖ, правильно идентифицированных как таковые, а специфичность представляла собой долю пациентов ЗД+РПЖ, правильно идентифицированных как таковые.

Результаты сравнения группы ЗД с больными ДГПЖ и РПЖ представлены в таблице 3.33. Перечислены переменные с $p \times 3 \times 1167 < 0,000000035$ (суммарные данные для $p < 0,005$ приведены в приложении 7). Только переменная GSTP1.T3.T13 позволила полностью разделить группу ЗД от пациентов с опухолями предстательной железы. Однако было обнаружено семь переменных обладающих чувствительностью 77–89% при 100% специфичности.

Частота встречаемости молекул с диагностически значимыми сайтами в плазме крови ЗД составила 0,2–1%, а для остальных групп – 1–11%. Диагностический уровень составляет 0,5-1%; следовательно, обнаружение таких различий не требовало специальных подходов или использования высокочувствительных аналитических систем.

Таблица 3.32. Сравнение статуса метилирования цитозинов в составе свободной внДНК плазмы крови у пациентов с ДГПЖ с объединенной группой, включающей ЗД и пациентов с РПЖ.

Номер	Ген, Позиция, Статус (С или Т после конверсии)	P-значение ×3×10 ⁶	Среднее, %	Чувствительность для 100% специфичности, %	Специфичность для 100% чувствительности, %	Пороговое значение, %	CV точность, %	CV чувствительность, %	CV специфичность, %	CV AUC, % (De Long's CI)
	PCA	> 1		0	12,8		55,4	23,5	69,2	54,9 (38,8, 71,0)
1	RNF219.C1.C2	,000000000071	,00500/ ,133	100	100	,0526 (1,03)	100	100	100	100
2	RNF219.C2.C4	,000000000071	,0101/ ,206	100	100	,0567 (1,20)	100	100	100	100
3	RNF219.C1.C5	,000000000071	,00986/ ,136	100	100	,0526 (1,03)	100	100	100	100
4	RNF219.C2.C5	,000000000071	,00528/ ,160	100	100	,0481 (1,24)	100	100	100	100
5	RNF219.C4.C5	,000000000071	,0199/ ,144	100	100	,0561 (1,31)	100	100	100	100
.....										
76	RNF219.C12.C17	,000000000071	,00464/ ,135	100	100	,0508 (1,38)	100	100	100	100
77	RNF219.C13.C17	,000000000071	,00650/ ,139	100	100	0,0557 (1,15)	100	100	100	100
78	GSTP1.T7.C16	,000000000010	4,10/ ,26	100	100	1,32 (1,20)	100	100	100	100
79	GSTP1.T11.C16	,000000000010	5,33/ ,231	100	100	1,24 (1,70)	100	100	100	100
80	GSTP1.C4.C5	,000000000010	,0197/ 3,72	100	100	,0548 (1,03)	100	100	100	100

Средние значения представлены как среднее в группе ДГПЖ/среднее в группе ЗД+РПЖ. Пороговое значение является оценкой порога, который может быть полезен для разделения сравниваемых групп. Соответствующее отношение принимается во внимание в случае полного разделения, которое представляет собой отношение минимума в группе сравнения с более высокими значениями к максимуму в группе сравнения с более низкими значениями. Чувствительность — это доля пациентов с ДГПЖ, правильно идентифицированных как таковые, а специфичность — это доля доноров ЗД+РПЖ, правильно идентифицированных как таковые. Сокращения: CV = перекрестная проверка, AUC = площадь под кривой ROC, CI = доверительный интервал.

Таблица 3.33. Сравнение статуса метилирования цитозинов в составе свободной внДНК плазмы крови у здоровых доноров с объединенной группой, включающей пациентов с ДГПЖ и РПЖ.

Ген, Позиция, Статус (С или Т после конверсии)	P-значение × 10 ⁶	Среднее, %	Чувствительность для 100% специфичности, %	Специфичность для 100% чувствительности, %	Пороговое значение, %	CV точность, %	CV чувствительность, %	CV специфичность, %	CV AUC, % (De Long's CI)
ПСА	,0000000076		26,3	97,3		98,2	100	97,3	97,3 (92,0, 100)
GSTP1.T3.T13	,000000000049	99,5/88,5	100	100	99,3 (1,00)	100	100	100	100
GSTP1.T8.T13	,000000000019	99,6/91,7	88,9	97,3	99,4	96,4	94,4	97,3	94,1 (86,1, 100)
GSTP1.T9.T13	,00000000068	99,6/90,5	77,8	91,9	99,3	92,7	94,4	91,9	97,6 (94,3, 100)
GSTP1.C13	,0000000018	,260/7,48	77,8	89,2	,506	90,9	94,4	89,2	96,8 (93,2, 100)
GSTP1.T6.T13	,0000000018	99,5/ 91,9	77,8	89,2	99,2	90,9	94,4	89,2	97,7 (94,8, 100)
GSTP1.T1.C13	,0000000025	,238/ 5,09	77,8	89,2	,497	90,9	94,4	89,2	96,4 (92,4, 100)
GSTP1.T1.C6	,0000000078	,188/ ,780	77,8	64,9	,242	89,1	88,9	89,2	95,5 (89,8, 100)
GSTP1.C13.T17	,0000000078	,241/ 5,15	77,8	83,8	,496	87,3	94,4	83,8	96,7 (92,7, 100)

Средние значения представлены как среднее в группе ЗД/среднее в группе ДГПЖ+РПЖ.

Пороговое значение является оценкой порога, который может быть полезен для разделения сравниваемых групп. Соответствующее отношение принимается во внимание в случае полного разделения, которое представляет собой отношение минимума в группе сравнения с более высокими значениями к максимуму в группе сравнения с более низкими значениями. Чувствительность — это доля ЗД, правильно идентифицированных как таковые, а специфичность — это доля пациентов ДГПЖ+РПЖ, правильно идентифицированных как таковые. Сокращения: CV = перекрестная проверка, AUC = площадь под кривой ROC, CI = доверительный интервал.

На рисунке 3.32. показано разделение группы ЗД по переменным *GSTP1.T3.T13* и *GSTP1.C3*. Результаты продемонстрировали статистически значимую связь между многими введенными переменными и статусом ЗД.

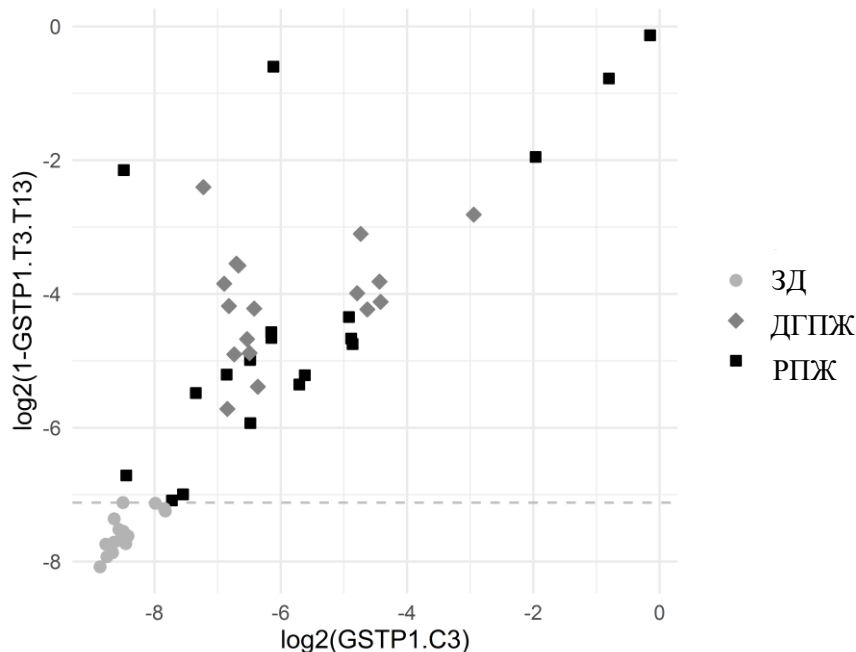


Рисунок 3.32. Графическое представление разделения группы ЗД при анализе *GSTP1.T3.T13*. Горизонтальная пунктирная линия нанесена для значения отсечки $\log_2(1-0.99281)$, которое соответствует полному разделению ЗД от остальных пациентов.

Пороговое значение необходимо для разделения групп сравнения. Соответствующее соотношение использовалось в случае полного разделения исследуемой группы и представляло собой отношение минимума в группе сравнения с более высокими значениями к максимуму в группе сравнения с более низкими значениями. Чувствительность представляла собой долю ЗД, правильно идентифицированных как таковые, а специфичность представляла собой долю пациентов с ДГПЖ+РПЖ, правильно идентифицированных как таковые.

Таким образом, описанный подход способствовал выявлению потенциальных маркеров, позволяющих различать группы сравнения со 100% чувствительностью и специфичностью. Для эффективной дискриминации группы ЗД можно было использовать анализ единственного профиля метилирования гена *GSTP1*, тогда как для абсолютного выявления больных РПЖ требовалось одновременное выявление не менее трех профилей из локусов генов *GSTP1* или *RNF219*. Следует отметить, что для диагностики РПЖ участки ДНК в основном были метилированы, тогда как у здоровых доноров они неметилированы. Однако не было уверенности в том, была ли высокая скорость предсказания результатом переобучения или она отражала истинную природу ассоциации. Поэтому в этой работе упомянуто лишь несколько моделей с несколькими предикторами. Тем не менее, результаты показали статистически

значимую связь между многими введенными переменными, соответствующими метилированию, и исходом РПЖ.

При анализе данных о частоте представленности молекул в циркуляции с маркерным профилем метилирования и уровне cut off (таблица 3.31.) показано, что представленность молекул с такими последовательностями в целом близка к проценту опухолеспецифической ДНК в циркуляции [71]. Диагностический уровень позволяет достоверно выявить различия между онкологическими больными и здоровыми донорами с использованием стандартных подходов. Действительно, метод NGS с охватом в одном локусе от 10000 и более уже должен позволять надежно обнаруживать разницу между болезнью и здоровьем, в дополнение к ПЦР с однонуклеотидным удлинением праймера с последующим обнаружением продуктов ПЦР с помощью масс-спектрометрии (например, фирма Agena Bioscience может определять частоту вариантного аллеля в 1%, начиная с 10–15 нг ДНК (<https://agenabio.com/products/panels/cancer-solutions/>, по состоянию на 3 июля 2021 г.).

Для обнаружения ДГПЖ анализ метилирования гена *RNF219* оказался наиболее подходящим подходом. Действительно, наличие 79 переменных (соответствующих двум одновременно метилированным цитозинам в одной молекуле) именно для пациентов с ДГПЖ, со скорректированным $p < 0,0000000001$, позволяет предположить, что увеличение размера выборки не изменит ситуацию и, по крайней мере, некоторые из переменных сохраняют свою диагностическую эффективность при анализе одиночных молекул или при анализе набора диагностических молекул, близких к описанным ранее для микроРНК (п.3.2.6.2.). Как уже было отмечено ранее, на сегодняшний день абсолютная дискриминация больных ДГПЖ остается одной из самых сложных проблем. Практически у всех больных РПЖ имеются участки ткани предстательной железы с гиперплазией. Явление метилирования локуса гена *RNF219*, характерное для ДГПЖ, является неожиданным фактом для дифференциальной диагностики РПЖ, а также демонстрирует принципиальное значение этого гена при переходе от незлокачественных опухолей к злокачественным. Учитывая его более или менее равномерную экспрессию в большинстве тканей (с более высоким уровнем в семенниках; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000152193-RNF219/tissue>, по состоянию на 3 июля 2021 г.), выяснить роль этого белка при переходе в злокачественную опухоль представляется очень интересной задачей.

В группе больных ДГПЖ мы практически не наблюдали метилирования позиций гена *RNF219*, т.е. уровень их метилирования не превышал 0,02%. Диагностический порог составляет около 0,06%. Таким образом, для выявления пациентов с ДГПЖ необходима более чувствительная аналитическая система, чем система, используемая для выявления пациентов с РПЖ. Тем не менее, большой массив данных, позволяющих отличить больных от здоровых

людей со 100% чувствительностью и специфичностью, дает большие возможности для выбора лучших аналитических систем.

Например, на сегодняшний день доступны несколько платформ для обнаружения aberrантно-метилованной ДНК, такие как Illumina HumanMethylation 450 BeadChip array, DREAMing и Illumina HumanMethylation27 Bead-Chip [459, 686–690], но только метод NGS предоставляет точную информацию о статусе метилирования каждого цитозина в каждой молекуле ДНК. Для выявления одновременного метилирования двух цитозинов в одном локусе ДНК в клинической диагностике можно использовать, например, метод МПС нового поколения в сочетании с протоколами целевого обогащения [691], а также платформы на основе масс-спектрометрии, такие как MassARRAY от Agena Bioscience Inc. На самом деле последняя платформа позволяет быстро и экономично визуализировать цитозины в заданных положениях и может быть модифицирована для анализа одновременно нескольких цитозинов. Принимая во внимание тенденцию к снижению цен на образцы и расширение применимости обоих протоколов в клиниках, кажется вполне вероятным анализ aberrантно-метилованных профилей конкретных локусов. Например, Illumina объявила о разработке протокола мультиплексного анализа метилирования ДНК, позволяющего одновременно количественно оценивать метилирование цитозина с разрешением по отдельным нуклеотидам в 48 ампликонах ПЦР и 48 образцах с использованием микрожидкостной системы, созданной фирмой Fluidigm [692]. После бисульфитной конверсии ДНК-мишени проводят ПЦР с использованием матрицы доступа 48.48, которая позволяет проводить параллельную амплификацию 48 образцов с помощью 48 пар праймеров. Продукты каждой реакции помечают индивидуальными метками для конкретных образцов, а затем объединяют в единую библиотеку и секвенируют.

Есть несколько дополнительных преимуществ использования оценки статуса метилирования ДНК в качестве биомаркера рака, поскольку явление метилирования ДНК в опухолях широко распространено [693, 694]. В отличие от микроРНК, aberrантно-метилованная ДНК является гораздо более «точным» маркером, так как напрямую регулирует только один ген, а не участвует в регуляции генных сетей [695]. Кроме того, работа с ДНК более выгодна по сравнению с РНК не только из-за важности статуса метилирования ДНК в регуляции генома, но и в связи с большей стабильностью ДНК, что упрощает сбор, обработку, транспортировку и хранение образцов. Еще одним преимуществом является то, что при выполнении анализов в гетерогенных клеточных популяциях количество экстрагированной ДНК пропорционально количеству клеток. Напротив, для РНК небольшая субпопуляция клеток с высокой скоростью транскрипции может маскировать профили других [696]. Далее, даже если на первый взгляд данные о локус-специфичном метилировании, полученные с помощью NGS, могут показаться сверхинформативными, корреляция данных ДНК с данными о развитии

опухоли, эффективности терапии и рецидиве опухоли может быть использована для повышения эффективности лечения опухоли.

Следует отметить, что количество профилей, полученных в этом исследовании, превысило уровень расчетных данных, полученных по расчетам концентрации внДНК, что может быть связано с используемой технологией секвенирования. Иными словами, полученные данные нуждаются в верификации эталонными методами. Тем не менее, большой набор данных для верификации позволяет предположить, что, по крайней мере, некоторые из обнаруженных маркеров будут обладать заявленными характеристиками и, таким образом, повышать точность диагностики РПЖ.

Перспективность использования метилированной внДНК в качестве источника онкомаркеров обусловлена также ее повышенной стабильностью по сравнению с неметилованной ДНК, что позволяет метилированной ДНК циркулировать в крови гораздо дольше [50]. Это, в свою очередь, должно привести к увеличению количества искомого онкомаркера в крови по мере роста опухоли и, соответственно, к повышению точности выявления заболевания. Ввиду всё большего распространения NGS-секвенирования в медицинской практике, разработки соответствующих устройств и появления секвенаторов, ориентированных на клиническое применение, представляется реальной в ближайшем будущем доступность данного вида тестов в клиниках. Тесты могут найти применение для дифференциальной диагностики опухолей предстательной железы, а также для наблюдения за больными РПЖ после терапии. Однако для достижения этой высокой цели необходимо провести ряд экспериментов, в том числе по расширению числа больных с опухолью предстательной железы, а также с привлечением больных с воспалительными заболеваниями предстательной железы. Поскольку обнаруженные нами характерные особенности метилирования маркерных последовательностей (одновременное метилирование цитозинов изучаемых локусов) могут отражать как особенности регуляции экспрессии генов, так и особенности метилирования ДНК у больных РПЖ (рис. 3.29.), в дальнейшем необходимо изучить влияние профиля метилирования на экспрессию генов. Например, метилирование 7-го и 12-го, а также 3-го и 15-го цитозинов может быть несущественным для ингибирования экспрессии гена *GSTP1*. С другой стороны, метилирование в положениях, перечисленных для больных РПЖ, может приводить к ингибированию экспрессии генов, что было показано для злокачественных опухолей ПЖ [672, 697], а также может отражать как особенности упаковки ДНК, так и работу, осуществляемую метилазами опухолевых клеток.

Одни из последних результатов по этой теме были представлены на конгрессе ESMO Oxnard et al. и, в случае использования именно метилирования для раннего выявления нескольких типов онкологических заболеваний, оказались многообещающими

(https://grail.com/wp-content/uploads/ESMO_2019_Oxnard_CCGA2_Training_Final.pdf, по состоянию на 3 июля 2021 г.). Данные, полученные от 4500 пациентов доказали свою полезность при анализе именно наиболее информативных областей генома. Эти данные были использованы в алгоритмах машинного обучения для выявления наличия рака и определения ткани происхождения опухоли. Результаты нашего исследования, полученные на сравнительно небольшой выборке и ориентированные на отдельные регионы генов, совпадают с описанными данными крупномасштабных и полногеномных исследований. Это говорит о том, что анализ метилирования ДНК является мощным диагностическим инструментом и увеличивает потребность в дальнейших исследованиях в этой области.

3.3.2.2.2. Аберрантное метилирование генов в составе суммарной внДНК (свободной внДНК плазмы + внДНК, связанной с клеточной поверхностью) крови

Поскольку мы показали возможность использования NGS-локус-специфичного секвенирования внДНК для выявления опухолеспецифического метилирования, мы задались вопросом, будет ли пул суммарной внеклеточной ДНК (сумм-внДНК) также применим для идентификации опухолеспецифичных аберрантно-метилованных молекул ДНК с использованием локус-специфичного NGS.

Следует напомнить, что, исходя из теоретических соображений, касающихся упомянутых выше особенностей внДНК и сумм-внДНК, и принимая во внимание долю опухолеспецифической ДНК в общем пуле сумм-внДНК, циркулирующих в крови [71], можно сказать, что даже количество в 10^4 прочтений на изучаемый локус на образец обеспечивает по крайней мере 100-кратное покрытие сумм-внДНК и надежное обнаружение одной опухолеспецифической молекулы, тогда как стандартное бисульфитное секвенирование не может обеспечить требуемый охват.

Полученные нами данные демонстрируют более высокую долю метилированной ДНК в пуле сумм-внДНК (рис. 3.33.) и значительно более высокий диагностический потенциал сумм-внДНК по сравнению со свободной внДНК плазмы крови. Это утверждение верно для генов *GSTP1* и *RNF219*.

Действительно, при изучении внДНК плазмы крови для больных РПЖ было характерно повышение уровня метилирования только для положения C9 локуса гена *GSTP1* (рис. 3.28. и 3.33.). В пуле сумм-внДНК ряд метилированных цитозинов (например, C3–C9, C11 и др.) резко различался у больных РПЖ и здоровых доноров. Уровни суммарного метилирования отдельных цитозинов генов *RNF219* и *KIAA1539* в обеих фракциях внДНК крови в исследуемых группах пациентов достоверно не различались, за исключением C4, C6, C7 и C14 в сумм-внДНК гена *RNF219*.

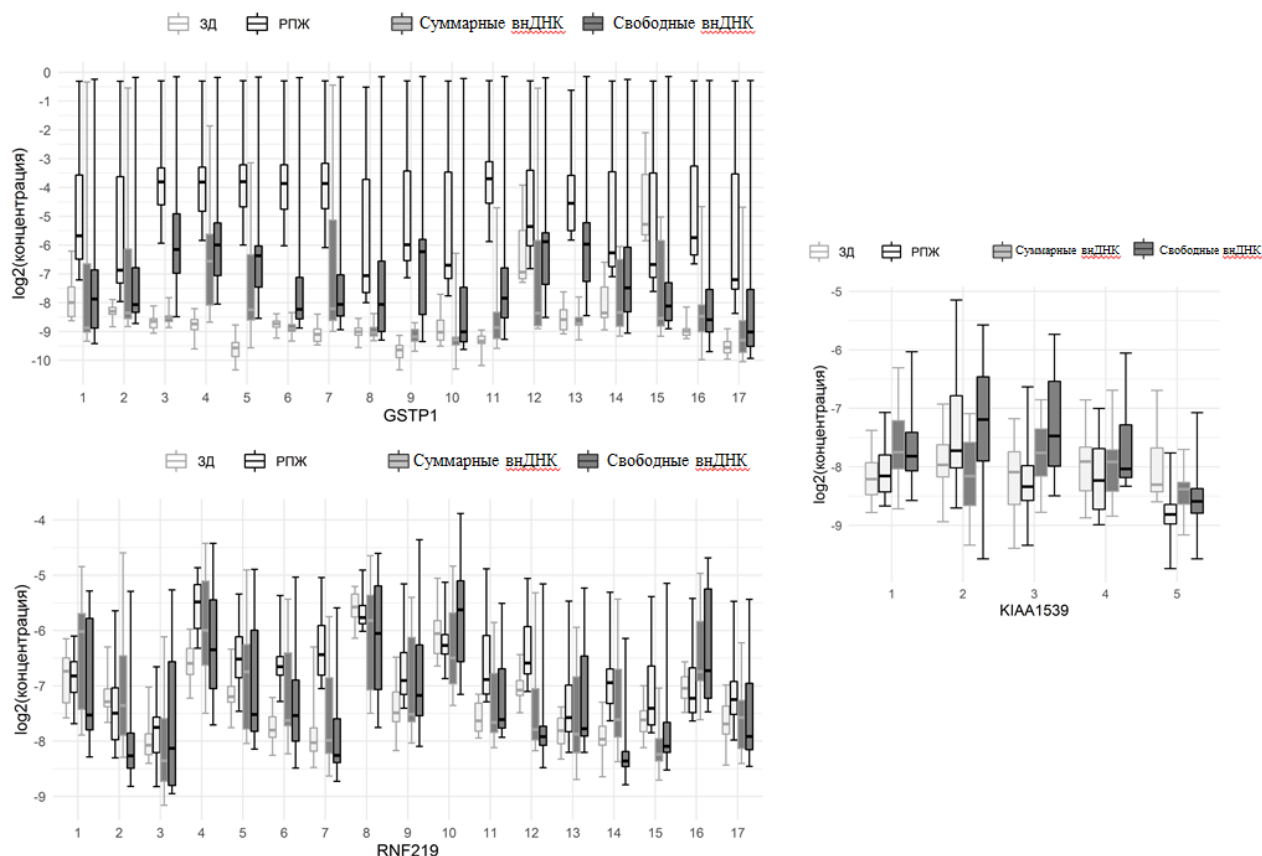


Рисунок 3.33. Сравнение уровня метилирования отдельных CpG - динуклеотидов в разных положениях изучаемых локусов в составе суммарной и свободной вДНК крови у здоровых доноров и больных РПЖ. Данные представлены в виде прямоугольников с указанием медианы с первым и третьим квартилями. Усы отражают минимумы и максимумы.

Анализ корреляций между статусом метилирования отдельных цитозинов гена *GSTP1* в сумм-вДНК (рис. 3.34., рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона для логарифмов концентраций) показывает, что у больных РПЖ наблюдается корреляция между метилированием отдельных цитозинов (а именно, C1–C2, 8–10,12,14–17; C2–C8–10,12–17; C3–C4–7,11,12; C4–C5–7,11,12; C5–C6,7,11,12; C6–C7,11,12; C7–C11,12; C8–C9,10,12,14–17; C9–C10,12,14–17; C10–C11,14–17; C11–C12; C12–C14–17; C14–C15–17; C15–C16,17; $r > 0.9$).

При этом у больных РПЖ для C6–C5 и C8–C15 коэффициент корреляции составил $r = 0.999$, а для комбинации C7–C6 $r = 1.000$, тогда как для группы ЗД высокая корреляция ($r > 0.8$) наблюдалась только для метилирования C12 с C1 и C10.

Сравнение статуса метилирования цитозина или одновременного метилирования двух цитозинов между пациентами с РПЖ и группой ЗД в сумм-вДНК представлено в таблице 3.34.

Необходимо обратить внимание, что последовательности, метилированные в диагностически значимых позициях, хорошо представлены, а пороговое значение варьирует в

диапазоне 0,17–1%. Кроме того, представленность молекул с такими последовательностями в целом близка к проценту опухолеспецифической ДНК в циркуляции [71].

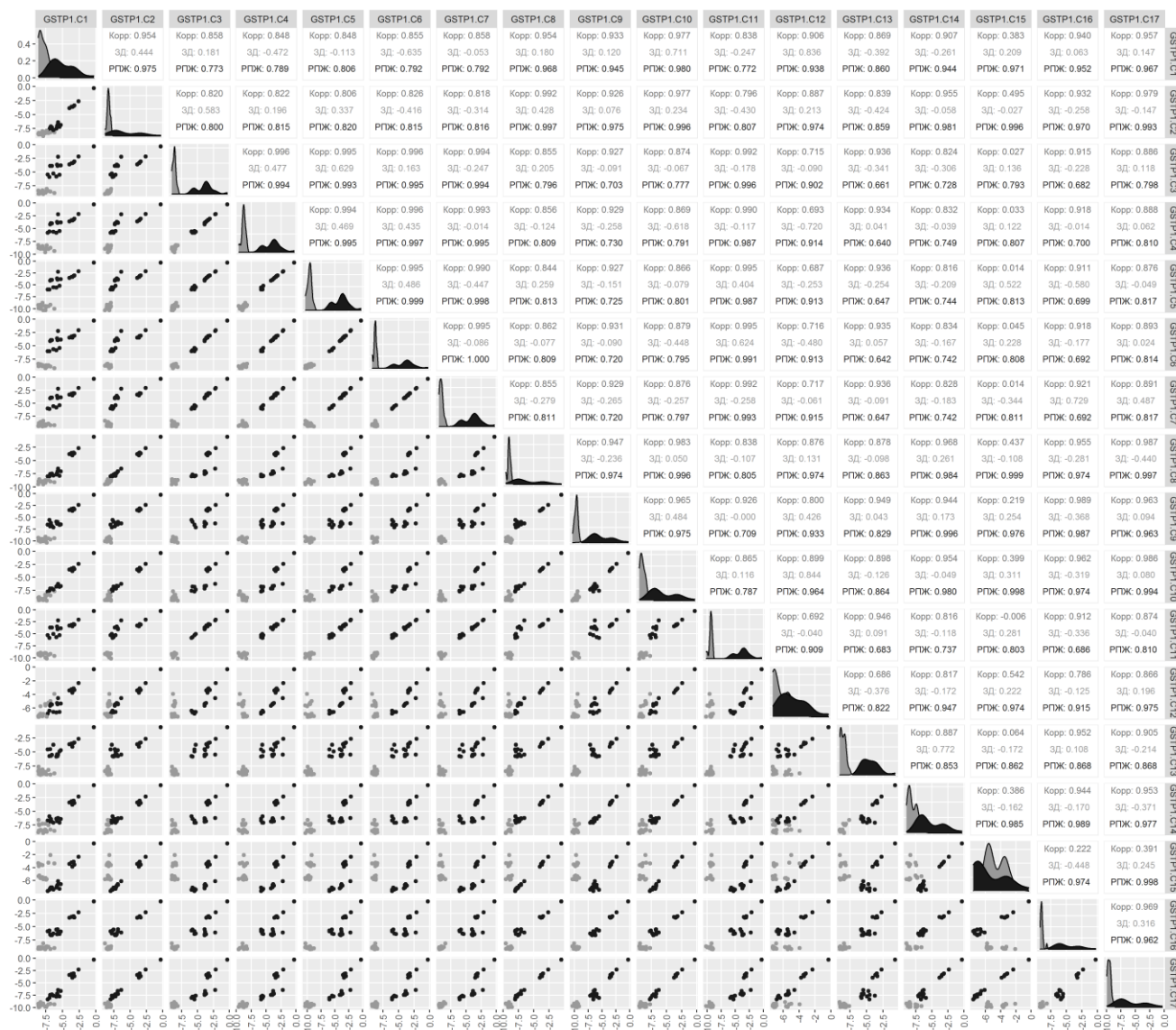


Рисунок 3.34. Корреляция между метилированием отдельных цитозинов исследуемого локуса гена *GSTP1* в пуле сумм-внДНК больных РПЖ. Двоичные логарифмы переменных использовались для всех графиков. В диагональных ячейках представлены графики плотности для групп РПЖ (тёмный) и ЗД (светлый) для каждой из переменных. Каждая диагональная ячейка имеет собственную шкалу оси Y, которая не обозначена. «ЗД» и «РПЖ» обозначают соответствующие корреляции Пирсона для каждой из групп. «Корр» обозначает корреляцию Пирсона для всех объединенных групп; корреляции рассчитаны для двоичных логарифмов переменных. В ячейках под диагональю представлены диаграммы рассеяния для каждой пары переменных.

Таблица 3.34. Сравнение статуса метилирования цитозинов (индивидуального или попарного) в составе сумм-внДНК крови у здоровых доноров и больных РПЖ.

Номер варианта	Ген, Позиция, Статус (С или Т после конверсии)	Р-значение ×3×10 ⁷	Среднее, %	Чувствительность для 100% специфичности, %	Специфичность для 100% чувствительности, %	Пороговое значение, %	CV точность, %	CV чувствительность, %	CV специфичность, %	CV AUC, % (De Long's CI)
	PCA	> 1		0	12,8		55,4	23,5	69,2	54,9 (38,8, 71,0)
1	GSTP1.C3	,0000000001	12,0/ ,247	100	100	,768	100	100	100	100
2	GSTP1.C11	,0000000001	12,6/ ,155	100	100	,586	100	100	100	100
3	GSTP1.T3.T5	,0000000001	87,5/ 99,7	100	100	98,8	100	100	100	100
4	GSTP1.T1.C6	,0000000001	4,69/ ,232	100	100	,607	100	100	100	100
5	GSTP1.C2.C3	,0000000001	7,51/ ,0478	100	100	,174	100	100	100	100
.....										
474	RNF219.C2.C4	,0000000001	,301/ ,0017	100	100	,022	100	100	100	100
475	RNF219.C3.C12	,0000000001	,157/ ,0013	100	100	,019	100	100	100	100
476	RNF219.C10.C1	,0000000001	,483/ ,0049	100	100	,057	100	100	100	100

Средние значения представлены как среднее в группе РПЖ/среднее в группе ЗД.

Пороговое значение является оценкой порога, который может быть полезен для разделения сравниваемых групп. Соответствующее отношение сообщается в случае полного разделения, которое представляет собой отношение минимума в группе сравнения с более высокими значениями к максимуму в группе сравнения с более низкими значениями.

Чувствительность — это доля пациентов с ДГПЖ, правильно идентифицированных как таковые, а специфичность — это доля пациентов с РПЖ + ЗД, правильно идентифицированных как таковые.

Анализ метилирования гена *GSTP1*, по-видимому, является наиболее подходящим подходом для выявления РПЖ. Действительно, наличие 147 переменных (11 из которых соответствуют одному и 136 одновременно двум метилированным цитозинам в одной молекуле) для гена *GSTP1* и 110 переменных (соответствующих двум одновременным метилированным цитозинам в одной молекуле) для гена *RNF219*, что исключительное выделение больных раком предстательной железы, при скорректированном $p=0,00000000011$, свидетельствует о том, что увеличение размера выборки не изменит ситуацию, и, по крайней мере, некоторые переменные сохраняют свою диагностическую эффективность при анализе одиночных молекул или при анализе набора диагностических молекул. Для гена *KIAA1539* наилучшие показатели чувствительности и специфичности при разделении исследуемых групп больных были достигнуты только для двух вариантов и составили 89,5% и 61,1%, соответственно (Приложение 8.).

На основании полученных данных мы попытались рассчитать возможность создания праймеров и TaqMan зонда для ПЦР. В анализ были включены только те комбинации последовательностей, которые позволили разделить изучаемые группы доноров со 100% чувствительностью при 100% специфичности.

Наилучшие результаты были получены для гена *GSTP1*. Изучаемый участок гена *GSTP1* был условно разделен на три части (рис. 3.35.) из-за необходимости использования при создании системы для TaqMan ПЦР двух праймеров (участки подчеркнуты: прямой С1–С6, обратный С11–С17) и зонда (область написана контуром С6–С15). Потенциальные области частично перекрываются.

ACCTGGGAAAGAGGGAAAGGCTTCCC¹CGGCCAGCTG²CG³CG
⁴G⁵CG⁶CG⁷CG⁸CG⁹CG¹⁰CG¹¹CG¹²CG¹³CG¹⁴CG¹⁵CG¹⁶CG¹⁷CG
 G⁴CGACTC⁵CGGGGACTCCAGGG⁶CGCCCCTCTG⁷CGGC⁸CGA⁹CGCC¹⁰CGGGGTGCAG¹¹CGGC¹²CGC¹³CGGGGCTGGGGC¹⁴CGG¹⁵CGGGAG
 TC¹⁶CG¹⁷CGGGACCCTCCAGAAGAG

Рисунок 3.35. Последовательность промоторной области гена *GSTP1*. Исследуемые CpG динуклеотиды выделены серым цветом и пронумерованы.

Вначале были отобраны лучшие комбинации для каждой из частей по отдельности (таблица 3.35.). Жирным шрифтом выделены комбинации цитозинов, используемые для дальнейшего выбора ПЦР-зонда и праймеров (таблица 3.36.).

Таблица 3.35. Сравнение здоровых доноров и больных РПЖ.

	Среднее в группе ЗД, %	Среднее в группе РПЖ, %	Пороговое значение, % (отношение)
Область прямого праймера			
GSTP1.C5.C6	0,002	11,448	0,0909 (180,63)
GSTP1.C4.C5.C6	0,002	11,361	0,0896 (175,54)
GSTP1.C1.C2.C3	0,001	7,237	0,0299 (43,88)
GSTP1.C1.C2.C3.C4	0,001	7,221	0,0295 (42,85)
GSTP1.C1.C2.C3.C4.C5	0,001	7,211	0,0288 (40,65)
Область TaqMan-зонда			
GSTP1.C6.C7	0,002	11,608	0,104 (145,99)
GSTP1.C7.C8.C9.C10	0,001	6,724	0,0293 (50,48)
GSTP1.C8.C9.C10.C11.C12	0,001	6,718	0,0293 (50,48)
GSTP1.C7.C8.C9.C10.C11	0,001	6,698	0,0289 (49,27)
GSTP1.C7.C8.C9.C10.C11.C12	0,001	6,683	0,0289 (49,27)
GSTP1.C6.C7.C8	0,001	6,608	0,0282 (46,87)
GSTP1.C6.C7.C8.C9	0,001	6,592	0,0282 (46,87)
GSTP1.C6.C7.C8.C9.C10	0,001	6,579	0,0282 (46,87)
Область обратного праймера			
GSTP1.C14.C15.C16	0,001	7,881	0,0289 (49,27)
GSTP1.C15.C16.C17	0,001	7,878	0,0289 (49,27)
GSTP1.C14.C15.C16.C17	0,001	7,870	0,0289 (49,27)

Таблица 3.36. Лучшие комбинации цитозинов в составе промоторной области гена *GSTP1* для дизайна TaqMan ПЦР

	Среднее в группе ЗД, %	Среднее в группе РПЖ, %	Пороговое значение, % (отношение)
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8.C9.C10.C11.C15.C16.C17	0,001	6,231	0,024 (35,5)
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8.C9.C10.C11.C12.C15.C16.C17	0,001	6,227	0,024 (35,5)
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8.C9.C10.C11.C14.C15.C16.C17	0,001	6,227	0,024 (35,5)
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8.C9.C10.C11.C12.C14.C15.C16.C17	0,001	6,223	0,024 (35,5)

Как видно из таблицы 3.36., количество молекул сумм-внДНК с необходимой комбинацией цитозинов в среднем немного превышает 6%, что в пересчете на количество ДНК в крови недостаточно для обнаружения их методом TaqMan ПЦР. Теоретически, если бы

внесение «ошибок» (выделено жирным шрифтом и подчеркнуто (таблица 3.37.)) в центр праймеров и зонда не снижало эффективности ПЦР, то количество детектируемых молекул, возможно, могло бы увеличиться.

Однако молекулы с комбинациями цитозинов, представленными в таблице 3.37., вообще не были обнаружены в пуле сумм-внДНК.

К сожалению, для генов *RNF219* и *KIAA1539* не было найдено комбинаций молекул в пуле сумм-внДНК, подходящих для создания ПЦР-праймеров или их количество не превышало 0,5% (данные не представлены).

Таким образом, несмотря на все достоинства выполненного исследования, есть один недостаток, мешающий созданию относительно недорогих TaqMan ПЦР-наборов для диагностики РПЖ в клиниках. Это связано с небольшим количеством молекул со специфическим профилем метилирования, необходимым для отжига праймеров и зонда. Однако независимая от метилирования амплификация локусов *GSTP1* в сочетании с последующим однонуклеотидным удлинением нескольких праймеров, масс-спектрометрией и оценкой уровня cut off может обладать потенциалом.

Повышенное содержание метилированной формы ДНК в пуле сумм-внДНК [463, 698] также может привести к увеличению точности диагностического теста. В пользу этого факта свидетельствуют данные о том, что длинные фрагменты ДНК (более 10 т.п.н.) в основном связаны с поверхностью клеток крови, а также данные о сверхпредставленности метилированной ДНК в пуле ДНК, связанной с клеточной поверхностью [699].

Таблица 3.37. Список возможных дополнительных комбинаций цитозинов для «создания» ПЦР-систем

	Среднее в группе ЗД, %	Среднее в группе РПЖ, %
Потенциальная область прямого праймера		
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6	,000630	,0100
Потенциальная область TaqMan-зонда		
GSTP1.C7.C8. <u>T9</u> .C10.C11	0	,00281
GSTP1.C7.C8.C9. <u>T10</u> .C11	0	,00657
GSTP1.C7.C8. <u>T9.T10</u> .C11	0	,0118
GSTP1.C7.C8. <u>T9</u> .C10.C11.C12	0	,00281
GSTP1.C7.C8.C9. <u>T10</u> .C11.C12	0	,00594
GSTP1.C7.C8. <u>T9.T10</u> .C11.C12	0	0
Молекулы с потенциальными ошибками в составе сумм-внДНК		
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6.C7.C8. <u>T9</u> .C10.C11.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6.C7.C8.C9. <u>T10</u> .C11.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6.C7.C8. <u>T9.T10</u> .C11.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6.C7.C8. <u>T9</u> .C10.C11.C12.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6.C7.C8.C9. <u>T10</u> .C11.C12.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6.C7.C8. <u>T9.T10</u> .C11.C12.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6.C7.C8. <u>T9</u> .C10.C11.C14.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6.C7.C8.C9. <u>T10</u> .C11.C14.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6.C7.C8. <u>T9.T10</u> .C11.C14.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6.C7.C8. <u>T9</u> .C10.C11.C12.C14.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6.C7.C8.C9. <u>T10</u> .C11.C12.C14.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4. <u>T5</u> .C6.C7.C8. <u>T9.T10</u> .C11.C12.C14.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8. <u>T9</u> .C10.C11.C15.C16.C17	0	,00281
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8.C9. <u>T10</u> .C11.C15.C16.C17	0	,00575
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8. <u>T9.T10</u> .C11.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8. <u>T9</u> .C10.C11.C12.C15.C16.C17	0	,00281
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8.C9. <u>T10</u> .C11.C12.C15.C16.C17	0	,00575
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8. <u>T9.T10</u> .C11.C12.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8. <u>T9</u> .C10.C11.C14.C15.C16.C17	0	,00281
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8.C9. <u>T10</u> .C11.C14.C15.C16.C17	0	,00575
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8. <u>T9.T10</u> .C11.C14.C15.C16.C17	0	0
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8. <u>T9</u> .C10.C11.C12.C14.C15.C16.C17	0	,00281
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8.C9. <u>T10</u> .C11.C12.C14.C15.C16.C17	0	,00575
GSTP1.C4.C5.C6.C7.C8. <u>T9.T10</u> .C11.C12.C14.C15.C16.C17	0	0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По последним рекомендациям в клинической онкологии, диагностика РПЖ должна быть направлена не только на раннее выявление заболевания, но и на выявление клинически значимого заболевания. Именно поэтому поиск новых биомаркеров для скрининга онкологических заболеваний предстательной железы должен выполняться тщательно. По последним данным, использование «жидкостной биопсии» может стать основным ключевым моментом к повышению эффективности скрининга РПЖ при минимальной инвазивности подхода для получения биоматериала (порой являющимся наиболее важной составляющей для пациента). Это заключение основывается на показателях исследования, в котором приняли участие 172 пациента с раком кишечника. Скрининговую колоноскопию согласились пройти лишь 37% пациентов, однако, 97% испытуемых, отказавшихся от этого метода, согласились на неинвазивную альтернативу (83% из них выбрали анализ крови SEPT9me и только 15% - анализ кала). Основной причиной такого выбора стало именно удобство процедуры взятия биоматериала [312]. Таким образом, даже это небольшое исследование ясно демонстрирует необходимость удобного минимально инвазивного варианта получения биоматериала для диагностики онкологических заболеваний (возможно и не только онкологических).

Несмотря на повышенный интерес исследователей к использованию жидкостной биопсии в качестве нового революционного метода диагностики опухолей в связи с её уникальными преимуществами (неинвазивность, чувствительность, преодоление неоднородности опухоли по сравнению с биопсией ткани и возможность наблюдения за пациентом в режиме реального времени), эта область биологии и медицины все ещё находится в зачаточном состоянии. Это связано с необходимостью иметь под рукой высокопроизводительные, высокочувствительные, простые в использовании и контролируемые методы обнаружения специфических биомаркеров в жидких биоптатах. В представленной работе выполнялось исследование двух видов потенциальных онкомаркеров - аберрантных изменений нуклеиновых кислот в составе биологических жидкостей при развитии онкологических заболеваний предстательной железы, а именно: 1) изменений уровней внеклеточных микроРНК в моче и плазме крови и 2) изменений статуса метилирования молекул в составе вДНК крови. Путь от забора биоматериала до анализа аберрантных изменений нуклеиновых кислот включал в себя стадии разделения, очистки и обнаружения, что привело к необходимости иметь готовые или разработать новые высокоточные методы для выполнения каждого из указанных шагов.

Для анализа aberrантных изменений микроРНК были разработаны и охарактеризованы все необходимые методы, не уступающие существующим стандартам, включающие получение внеклеточных везикул из биологических жидкостей, выделение из супернатантов и фракций внеклеточных везикул микроРНК, а также системы для выполнения TaqMan ОТ-ПЦР.

Благодаря анализу литературы и информации, имеющейся в доступных on-line базах данных, были выбраны микроРНК-потенциальные онкомаркеры и, в дальнейшем их уровень в различных фракциях мочи был проанализирован с использованием микрочиповых технологий. После биоинформационной обработки полученных результатов был предложен вариант создания алгоритма анализа данных («диагностического алгоритма»), способного с высокой точностью дискриминировать онкологических больных и здоровых доноров изучаемых групп. Однако, поскольку одной из задач исследования было создание диагностикума с возможностью использования в клиниках различного уровня оснащённости, для оценки уровня микроРНК, продемонстрировавших наилучшие показатели чувствительности и специфичности, были разработаны системы TaqMan ОТ-ПЦР и предложена оптимизация диагностической системы. В выполненном исследовании при разработке алгоритма анализа данных за счёт сочетания попарных показателей «сигнатур» микроРНК был также учтён факт о неспецифичности микроРНК для клетки и связанных с этим трудностей определения вклада каждой клетки, ткани или органа в пул микроРНК крови или других жидкостей организма.

Для анализа изменений статуса метилирования промоторных областей генов *GSTP1*, *RNF219* и *KIAA1539* в составе индивидуальных молекул вДНК крови также были отработаны все стадии пробоподготовки для выполнения локус-специфичного массового параллельного секвенирования и предложен вариант статистического анализа полученных данных, способного дискриминировать все исследуемые группы доноров. Кроме того, была доказана способность нормальных клеток генерировать метилированные формы ДНК во внеклеточную среду, что может частично объяснять наличие «фона» метилированной ДНК в кровотоке здоровых доноров.

В заключении, результаты исследований, описанные в диссертационной работе, доказывают перспективность использования вн-микроРНК и вДНК в составе различных биологических жидкостей (что представляет собой минимально инвазивный подход не требующий госпитализации, с возможностью использования в периферийных медицинских центрах и потенциальным увеличением заинтересованности людей с высоким риском к программам скрининга рака) для выявления и дискриминации онкологических заболеваний предстательной железы. Кроме того, анализ aberrантных изменений вн-микроРНК и вДНК, описанных выше, может не только дополнять современные методы скрининга, но и помогать в стратификации больных раком в соответствии с риском рецидива и реакцией на проводимую

терапию (в том числе и благодаря возможности сбора нескольких образцов от одних и тех же пациентов в течение длительного времени).

Несмотря на огромный потенциал практического использования всех полученных результатов, они нуждаются в подтверждении в более масштабных многоцентровых исследованиях. Такое подтверждение необходимо для подготовки регистрационного досье и регистрации диагностических наборов, предназначенных для своевременного выявления рака предстательной железы с последующим внедрением их в клиническую практику.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны высокоэффективные, надёжные, быстрые протоколы выделения РНК из различных биологических жидкостей на основе аналога раствора Фолча (хлороформ/этанол/вода + гуанидинизотиоцианат) и октановой кислоты. Протоколы превосходят имеющиеся аналоги по таким параметрам, как эффективность выделения, скорость, трудоёмкость, простота использования и удаление ингибиторов ПЦР. Полученные препараты РНК содержат микроРНК и подходят для дальнейшего исследования с использованием микрочипов или количественной ОТ-ПЦР.

2. В моче здоровых доноров и больных раком предстательной железы обнаружены внеклеточные везикулы различного размера и белкового состава, содержащие в себе ДНК, РНК и микроРНК. Показано, что внеклеточные везикулы мочи пациентов с РПЖ, содержат онкоспецифичные микроРНК.

3. При помощи микрочипов miRCURY LNA miRNA qPCR определены концентрации 84-х микроРНК в составе внеклеточных везикул и в супернатанте мочи здоровых доноров и пациентов с ДГПЖ и РПЖ (наибольшее количество достоверных различий в уровнях микроРНК между фракциями мочи наблюдалось в группе больных РПЖ (38 микроРНК), наименьшее – в группе ЗД (15 микроРНК)). С использованием парной нормализации и построения логистических регрессионных моделей с перебором всех возможных соотношений микроРНК, выбраны микроРНК пары, являющиеся наиболее информативными маркерами РПЖ. Показано, что dCt этих пар микроРНК не зависят от возраста пациентов. Определены мишени отобранных микроРНК и участие в регуляции сигнальных путей, в том числе связанных с патогенезом РПЖ.

4. На основании анализа данных микрочипового исследования и биоинформационного анализа предложен подход к формированию диагностической панели микроРНК для дифференциальной диагностики опухолей ПЖ. Панель включает 24 микроРНК, входящих в состав 17-ти аналитических пар, и позволяет классифицировать пациентов исследуемых групп с диагнозами РПЖ и ДГПЖ, а также здоровых доноров со 100% специфичностью и 90% чувствительностью.

5. При помощи TaqMan ОТ-ПЦР на независимых группах пациентов и доноров верифицированы данные об экспрессии 12-ти выбранных микроРНК (-19b, -22, -92a, -378, -425, -30e, -31, -125b, -200b, -205, -375, -660) во фракциях мочи и плазме крови больных РПЖ, ДГПЖ и здоровых доноров. Показано, что TaqMan ОТ-ПЦР восемью микроРНК внеклеточных везикул

мочи (-19b, -30e, -31, -92a, -125, -200, -205, -660) в составе шести пар идентифицирует больных РПЖ и здоровых доноров исследуемых групп вне зависимости от возраста с абсолютной чувствительностью и специфичностью.

6. С помощью локус-специфичного массового параллельного секвенирования впервые получены данные о метилировании промоторных областей генов *RNF219*, *KIAA1539* и *GSTP1* в пуле свободных вДНК плазмы крови и суммарном пуле вДНК (свободных + связанных с поверхностью клеток крови) у здоровых доноров и больных РПЖ и ДГПЖ. Показано, что в суммарном пуле вДНК крови доля молекул с онкоспецифичным профилем метилирования ДНК выше, чем в пуле свободных вДНК крови, и ДНК этого пула представляют собой более удобный источник диагностического материала. Показана принципиальная возможность использования локус-специфичного массового параллельного секвенирования для классификации пациентов исследуемых групп с онкологическими заболеваниями предстательной железы и здоровых доноров вне зависимости от их возраста со 100% чувствительностью и специфичностью.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БД-ЗПЖ - База данных учета биологических образцов и описания клинико-патологических характеристик пациентов с заболеваниями предстательной железы

ВВ - внеклеточные везикулы

внДНК – внеклеточная ДНК

внНК – внеклеточные нуклеиновые кислоты

генДНК – геномная ДНК

ГЭ - геном-эквивалент

ДГПЖ - доброкачественная гиперплазия предстательной железы

ЗД - здоровые доноры

КР-РПЖ – кастрационнорезистентный РПЖ

КТ - компьютерная томография

МВ - микровезикулы

НК – нуклеиновые кислоты

НМРЛ – немелкоклеточный рак лёгкого

окДНК - ДНК опухолевых клеток

ОТ - обратная транскрипция

ПЖ - предстательная железа

ПРИ - пальцевое ректальное исследование

ПСА - простатспецифический антиген

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПЭТ - позитронно-эмиссионная томография

РМЖ – рак молочной железы

РПЖ - рак предстательной железы

СВВ – суммарные внеклеточные везикулы

скп-цирДНК – цирДНК, связанные с поверхностью клеток крови

СЛО – синдром лизиса опухоли

ТРУЗИ - трансректальное ультразвуковое исследование

ТЭМ - трансмиссионная электронная микроскопия

УЕК – условные единицы концентрации

ФОЭ - фракция внеклеточных везикул, обогащенная экзосомами

цирДНК – циркулирующая ДНК

ЭМП - эпителиально-мезенхимальный переход

BLM-PCR - blunt-ended ligation-mediated PCR - ПЦР, опосредованная лигированием тупых концов ДНК

Ct – значение порогового цикла в реакциях ПЦР в режиме реального времени

Gu – guanidinium thiocyanate- гуанидин тиоцианат

HPLC - high performance liquid chromatography - высокоэффективная жидкостная хроматография

MALDI-TOF MS - matrix-assisted laser desorption/ionization, time-f-flight mass spectrometry - матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, времяпролетная масс-спектрометрия

MEDIP - methylated DNA immunoprecipitation - иммунопреципитация метилированной ДНК

MIRA - methylated CpG island recovery assay - выделение метилированных CpG-островков с использованием белков MBD2

ML – methylation level – уровень метилирования

MPS – massive parallel sequencing - массовое параллельное секвенирование (МПС)

MSP - methylation specific PCR - ПЦР, специфичная к метилированию

MS-qPCR – methyl-specific quantitative PCR – количественная ПЦР, специфичная к метилированию

Ms-SNuPE - methylation-sensitive single nucleotide primer extension - однонуклеотидное удлинение праймера, чувствительное к метилированию

NGS – next generation sequencing - секвенирование нового поколения

OctA – octanoic acid - октановая кислота

qMAMBA - quantitative methylation analysis of minute DNA amounts after whole bisulfite amplification - количественный анализ метилирования малых (следовых) количеств ДНК после полногеномной амплификации

RPKM - reads per kb of exon model per million mapped reads - количество прочтений на кб модели экзона на миллион картированных прочтений

SMRT - single molecule real-time sequencing - секвенирование ДНК, основанное на наблюдении за работой единичной молекулы ДНК-полимеразы

tSMS - true single molecule sequencing - одномолекулярное секвенирование

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. American Cancer Society Cancer Facts & Figures 2022. Atlanta, Ga: American Cancer Society // – 2022.
2. Dunn J. It Is Time to Close the Gap in Cancer Care / Dunn J. // JCO Global Oncology – 2023. – № 9 – C.e2200429.
3. Старцев, В. Ю. Выявление рака предстательной железы у мужчин молодого и среднего возрастов / Старцев, В. Ю., Шпоть, Е. В., Караев, Д. К., Кривоносов, Д. И. // Вестник урологии – 2022. – Т. 10 – № 1 – С.110–120.
4. Мусаелян, А. А. Диагностическая значимость PCA3, TMPRSS2:ERG и производных простатического специфического антигена в выявлении рака предстательной железы / Мусаелян, А. А., Назаров, В. Д., Лапин, С. В., Борискин, А. Г., Рева, С. А., Лебедев, Д. Г., Яковлев, В. Д., Викторов, Д. А., Тороповский, А. Н., Эмануэль, В. Л., Аль-Шукри, С. Х., Петров, С. Б. // Онкоурология – 2020. – Т. 16 – № 2 – С.65–73.
5. Anker P. Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by human blood lymphocytes / Anker P., Stroun M., Maurice P.A. // Cancer Research – 1976. – Т. 36 – № 8 – С.2832–2839.
6. Aaronson, S. A. The Challenge of Biotechnology: from laboratory diagnosis to clinical therapy / Aaronson, S. A., Shamoo, A. E., Verna, R. – , 1993.
7. Mader S. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives / Mader S., Pantel K. // Oncology Research and Treatment – 2017. – Т. 40 – № 7–8 – С.404–408.
8. Bianchi D.W. Unusual Prenatal Genomic Results Provide Proof-of-Principle of the Liquid Biopsy for Cancer Screening / Bianchi D.W. // Clinical Chemistry – 2018. – Т. 64 – № 2 – С.254–256.
9. Connal S. Liquid biopsies: the future of cancer early detection / Connal S., Cameron J.M., Sala A., Brennan P.M., Palmer D.S., Palmer J.D., Perlow H., Baker M.J. // Journal of Translational Medicine – 2023. – Т. 21 – № 1 – С.118.
10. Sorenson G.D. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood / Sorenson G.D., Pribish D.M., Valone F.H., Memoli V.A., Bzik D.J., Yao S.L. // Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology – 1994. – Т. 3 – № 1 – С.67–71.
11. Vasioukhin V. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia / Vasioukhin V., Anker P., Maurice P., Lyautey J., Lederrey C., Stroun M. // British Journal of Haematology – 1994. – Т. 86 – № 4 – С.774–779.
12. Mayall F. Mutations of p53 gene can be detected in the plasma of patients with large bowel carcinoma / Mayall F., Jacobson G., Wilkins R., Chang B. // Journal of Clinical Pathology – 1998. – Т. 51 – № 8 – С.611–613.
13. Esteller M. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients / Esteller M., Sanchez-Cespedes M., Rosell R., Sidransky D., Baylin S.B., Herman J.G. // Cancer Research – 1999. – Т. 59 – № 1 – С.67–70.
14. Kopreski M.S. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma / Kopreski M.S., Benko F.A., Kwak L.W., Gocke C.D. // Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research – 1999. – Т. 5 – № 8 – С.1961–1965.

15. Chen X. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases / Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., Yin Y., Wang K., Guo J., Zhang Y., Chen J., Guo X., Li Q., Li X., Wang W., Zhang Y., Wang J., Jiang X., Xiang Y., Xu C., Zheng P., Zhang J., Li R., Zhang H., Shang X., Gong T., Ning G., Wang J., Zen K., Zhang J., Zhang C.-Y. // *Cell Research* – 2008. – T. 18 – № 10 – C.997–1006.
16. Kemmer T.P. Serum ribonuclease activity in the diagnosis of pancreatic disease / Kemmer T.P., Malfertheiner P., Büchler M., Kemmer M.L., Ditschuneit H. // *International Journal of Pancreatology: Official Journal of the International Association of Pancreatology* – 1991. – T. 8 – № 1 – C.23–33.
17. Mizuta K. New detection method for ribonuclease 2 (RNase 2) using immunoblotting with specific antibody / Mizuta K., Yasuda T., Ikehara Y., Sato W., Kishi K. // *Zeitschrift Fur Rechtsmedizin. Journal of Legal Medicine* – 1990. – T. 103 – № 5 – C.315–322.
18. Mizuta K. Purification and characterization of three ribonucleases from human kidney: comparison with urine ribonucleases / Mizuta K., Awazu S., Yasuda T., Kishi K. // *Archives of Biochemistry and Biophysics* – 1990. – T. 281 – № 1 – C.144–151.
19. Sun D. The role of human ribonuclease A family in health and diseases: A systematic review / Sun D., Han C., Sheng J. // *iScience* – 2022. – T. 25 – № 11 – C.105284.
20. Matuszczak M. Prostate Cancer Liquid Biopsy Biomarkers' Clinical Utility in Diagnosis and Prognosis / Matuszczak M., Schalken J.A., Salagierski M. // *Cancers* – 2021. – T. 13 – № 13 – C.3373.
21. McKiernan J. A Novel Urine Exosome Gene Expression Assay to Predict High-grade Prostate Cancer at Initial Biopsy / McKiernan J., Donovan M.J., O'Neill V., Bentink S., Noerholm M., Belzer S., Skog J., Kattan M.W., Partin A., Andriole G., Brown G., Wei J.T., Thompson I.M., Carroll P. // *JAMA oncology* – 2016. – T. 2 – № 7 – C.882–889.
22. Гареев, И. Ф. Циркулирующие микроРНК как биомаркеры: какие перспективы? / Гареев, И. Ф., Бейлерли, О. А. // *Профилактическая медицина* – 2018. – Т. 6 – С.142–150.
23. Li Z. mRNA and microRNA stability validation of blood samples under different environmental conditions / Li Z., Chen D., Wang Q., Tian H., Tan M., Peng D., Tan Y., Zhu J., Liang W., Zhang L. // *Forensic Science International: Genetics* – 2021. – T. 55 – C.102567.
24. O'Brien J. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation / O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. // *Frontiers in Endocrinology* – 2018. – T. 9 – C.402.
25. Florijn B.W. Diabetic Nephropathy Alters the Distribution of Circulating Angiogenic MicroRNAs Among Extracellular Vesicles, HDL, and Ago-2 / Florijn B.W., Duijs J.M.G.J., Levels J.H., Dallinga-Thie G.M., Wang Y., Boing A.N., Yuana Y., Stam W., Limpens R.W.A.L., Au Y.W., Nieuwland R., Rabelink T.J., Reinders M.E.J., Zonneveld A.J. van, Bijkerk R. // *Diabetes* – 2019. – T. 68 – № 12 – C.2287–2300.
26. Turchinovich A. Characterization of extracellular circulating microRNA / Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B. // *Nucleic Acids Research* – 2011. – T. 39 – № 16 – C.7223–7233.
27. Arroyo J.D. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma / Arroyo J.D., Chevillet J.R., Kroh E.M., Ruf I.K., Pritchard C.C., Gibson D.F., Mitchell P.S., Bennett C.F., Pogosova-Agadjanyan E.L., Stirewalt D.L., Tait J.F., Tewari M. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2011. – T. 108 – № 12 – C.5003–5008.
28. Turchinovich A. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma / Turchinovich A., Burwinkel B. // *RNA biology* – 2012. – T. 9 – № 8 – C.1066–1075.
29. Martino F. Circulating microRNAs are not eliminated by hemodialysis / Martino F., Lorenzen J., Schmidt J., Schmidt M., Broll M., Görzig Y., Kielstein J.T., Thum T. // *PloS One* – 2012. – T. 7 – № 6 – C.e38269.

30. Geekiyanage H. Extracellular microRNAs in human circulation are associated with miRISC complexes that are accessible to anti-AGO2 antibody and can bind target mimic oligonucleotides / Geekiyanage H., Rayatpisheh S., Wohlschlegel J.A., Brown R., Ambros V. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2020. – Т. 117 – № 39 – С.24213–24223.
31. Panshin D.D. [The Efficiency of Immunoprecipitation of microRNA/Ago2 Complexes from Human Blood Plasma Is Protocol Dependent] / Panshin D.D., Kondratov K.A. // *Molekuliarnaia Biologiya* – 2020. – Т. 54 – № 2 – С.244–251.
32. Wang K. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells / Wang K., Zhang S., Weber J., Baxter D., Galas D.J. // *Nucleic Acids Research* – 2010. – Т. 38 – № 20 – С.7248–7259.
33. Montani F. Circulating Cancer Biomarkers: The Macro-revolution of the Micro-RNA / Montani F., Bianchi F. // *EBioMedicine* – 2016. – Т. 5 – С.4–6.
34. Ghafouri-Fard S. Emerging functions and clinical applications of exosomal microRNAs in diseases / Ghafouri-Fard S., Shoorei H., Dong P., Poornajaf Y., Hussen B.M., Taheri M., Akbari Dilmaghani N. // *Non-coding RNA research* – 2023. – Т. 8 – № 3 – С.350–362.
35. Li X. Identifying miRNA biomarkers for breast cancer and ovarian cancer: a text mining perspective / Li X., Dai A., Tran R., Wang J. // *Breast Cancer Research and Treatment* – 2023. – Т. 201 – № 1 – С.5–14.
36. Aryani A. In vitro application of ribonucleases: comparison of the effects on mRNA and miRNA stability / Aryani A., Denecke B. // *BMC Research Notes* – 2015. – Т. 8 – № 1 – С.164.
37. Azani A. MicroRNAs as biomarkers for early diagnosis, targeting and prognosis of prostate cancer / Azani A., Omran S.P., Ghasrsaz H., Idani A., Eliaderani M. kakhodaie, Peirovi N., Dokhani N., Lotfalizadeh M. hassan, Rezaei M. mohammadzadeh, Ghahfarokhi M. shahgholian, KarkonShayan S., Hanjani P. najari, Kardaani Z., Navashenagh J.G., Yousefi M., Abdolahi M., Salmaninejad A. // *Pathology - Research and Practice* – 2023. – Т. 248 – С.154618.
38. Запорожченко, И. А. Основы биологии микроРНК: строение, биогенез и регуляторные функции / Запорожченко, И. А., Рыкова, Е. Ю., Лактионов, П. П. // *Биоорганическая химия* – 2020. – Т. 46 – С.3–17.
39. Amir S. Oncomir miR-125b Suppresses p14ARF to Modulate p53-Dependent and p53-Independent Apoptosis in Prostate Cancer / Amir S., Ma A.-H., Shi X.-B., Xue L., Kung H.-J., White R.W. deVere // *PLoS ONE* – 2013. – Т. 8 – № 4 – С.e61064.
40. Bhatnagar N. Downregulation of miR-205 and miR-31 confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis in prostate cancer cells / Bhatnagar N., Li X., Padi S.K.R., Zhang Q., Tang M., Guo B. // *Cell Death & Disease* – 2010. – Т. 1 – № 12 – С.e105–e105.
41. Bi D. miR-1301 promotes prostate cancer proliferation through directly targeting PPP2R2C / Bi D., Ning H., Liu S., Que X., Ding K. // *Biomedicine & Pharmacotherapy* – 2016. – Т. 81 – С.25–30.
42. Chi Y. microRNA-503 suppresses the migration, proliferation and colony formation of prostate cancer cells by targeting tumor protein D52 like 2 / Chi Y., Ding F., Zhang W., Du L. // *Experimental and Therapeutic Medicine* – 2017.
43. Coppola V. BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial–mesenchymal transition / Coppola V., Musumeci M., Patrizii M., Cannistraci A., Addario A., Maugeri-Saccà M., Biffoni M., Francescangeli F., Cordenonsi M., Piccolo S., Memeo L., Pagliuca A., Muto G., Zeuner A., De Maria R., Bonci D. // *Oncogene* – 2013. – Т. 32 – № 14 – С.1843–1853.
44. Chung J. Recent Technologies towards Diagnostic and Therapeutic Applications of Circulating Nucleic Acids in Colorectal Cancers / Chung J., Xiao S., Gao Y., Soung Y.H. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2024. – Т. 25 – № 16 – С.8703.

45. Han M.T.T. Small RNA Deep Sequencing of Circulating Small RNAs Discovers a Unique Panel of microRNAs as Feasible and Reliable Biomarkers of Non-Small Cell Lung Cancers in Northern Thailand / Han M.T.T., Pornprasert S., Saeteng S., Tantraworasin A., Siwachat S., Thuropathum P., Chewaskulyong B., Cressey R. // *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* – 2023. – Т. 24 – № 10 – С.3585–3598.
46. Martinez-Dominguez M.V. Current Technologies for RNA-Directed Liquid Diagnostics / Martinez-Dominguez M.V., Zottel A., Šamec N., Jovčevska I., Dincer C., Kahlert U.D., Nickel A.-C. // *Cancers* – 2021. – Т. 13 – № 20 – С.5060.
47. Orekhova A.S. Bidirectional promoters in the transcription of mammalian genomes / Orekhova A.S., Rubtsov P.M. // *Biochemistry. Biokhimiia* – 2013. – Т. 78 – № 4 – С.335–341.
48. Kaplun D.S. DNA Methylation: Genomewide Distribution, Regulatory Mechanism and Therapy Target / Kaplun D.S., Kaluzhny D.N., Prokhortchouk E.B., Zhenilo S.V. // *Acta Naturae* – 2022. – Т. 14 – № 4 – С.4–19.
49. Mendoza A. de Large-scale manipulation of promoter DNA methylation reveals context-specific transcriptional responses and stability / Mendoza A. de, Nguyen T.V., Ford E., Poppe D., Buckberry S., Pflueger J., Grimmer M.R., Stolzenburg S., Bogdanovic O., Oshlack A., Farnham P.J., Blancafort P., Lister R. // *Genome Biology* – 2022. – Т. 23 – № 1 – С.163.
50. Брызгунова, О. Е. Исследование стабильности и циркуляции метилированных ДНК — потенциальных онкомаркеров *in vivo* и *in vitro* / Брызгунова, О. Е., Мак, В. В., Власов, В. В. В.В., Лактионов, П. П. // *Молекулярная медицина* – 2010. – Т. 5 – С.42–47.
51. Vaissière T. Quantitative analysis of DNA methylation after whole bisulfite amplification of a minute amount of DNA from body fluids / Vaissière T., Cuenin C., Paliwal A., Vineis P., Hoek G., Krzyzanowski M., Airolidi L., Dunning A., Garte S., Hainaut P., Malaveille C., Overvad K., Clavel-Chapelon F., Linseisen J., Boeing H., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Kaladidi A., Palli D., Krogh V., Tumino R., Panico S., Bueno-De-Mesquita H.B., Peeters P.H., Kumle M., Gonzalez C.A., Martinez C., Dorronsoro M., Barricarte A., Navarro C., Quiros J.R., Berglund G., Janzon L., Jarvholm B., Day N.E., Key T.J., Saracci R., Kaaks R., Riboli E., Hainaut P., Herceg Z. // *Epigenetics* – 2009. – Т. 4 – № 4 – С.221–230.
52. Susan J.Ci. High sensitivity mapping of methylated cytosines / Susan J.Ci., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. // *Nucleic Acids Research* – 1994. – Т. 22 – № 15 – С.2990–2997.
53. Bibikova M. DNAmethylation profiling using Illumina BeadArray platform / под ред. K. Appasani. Cambridge University Press, 2012. Вып. 1 – 235–248с.
54. Li M. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples / Li M., Chen W.-D., Papadopoulos N., Goodman S.N., Bjerregaard N.C., Laurberg S., Levin B., Juhl H., Arber N., Moinova H., Durkee K., Schmidt K., He Y., Diehl F., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A., Kinzler K.W., Markowitz S.D., Vogelstein B. // *Nature Biotechnology* – 2009. – Т. 27 – № 9 – С.858–863.
55. Feinberg A.P. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers / Feinberg A.P., Vogelstein B. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 1983. – Т. 111 – № 1 – С.47–54.
56. Zhai P. DNMT1-mediated NR3C1 DNA methylation enables transcription activation of connexin40 and augments angiogenesis during colorectal cancer progression / Zhai P., Zhang H., Li Q., Yang M., Guo Y., Xing C. // *Gene* – 2024. – Т. 892 – С.147887.
57. Aucamp J. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature / Aucamp J., Bronkhorst A.J., Badenhorst C.P.S., Pretorius P.J. // *Biological Reviews* – 2018. – Т. 93 – № 3 – С.1649–1683.
58. Mandel P. [Nuclear Acids In Human Blood Plasma] / Mandel P., Metais P. // *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales* – 1948. – Т. 142 – № 3–4 – С.241–243.

59. Tan E.M. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus / Tan E.M., Schur P.H., Carr R.I., Kunkel H.G. // *The Journal of Clinical Investigation* – 1966. – T. 45 – № 11 – C.1732–1740.
60. Leon S.A. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy / Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J. // *Cancer Research* – 1977. – T. 37 – № 3 – C.646–650.
61. Malkin E.Z. Bioactive DNA from extracellular vesicles and particles / Malkin E.Z., Bratman S.V. // *Cell Death & Disease* – 2020. – T. 11 – № 7 – C.584.
62. Igder S. Circulating Nucleic Acids in Colorectal Cancer: Diagnostic and Prognostic Value / Igder S., Zamani M., Fakher S., Siri M., Ashktorab H., Azarpira N., Mokarram P. // *Disease Markers* – 2024. – T. 2024 – C.1–25.
63. Anitha K. Liquid biopsy for precision diagnostics and therapeutics / Anitha K., Posinasetty B., Naveen Kumari K., Chenchula S., Padmavathi R., Prakash S., Radhika C. // *Clinica Chimica Acta* – 2024. – T. 554 – C.117746.
64. Kloten V. Multicenter Evaluation of Circulating Plasma MicroRNA Extraction Technologies for the Development of Clinically Feasible Reverse Transcription Quantitative PCR and Next-Generation Sequencing Analytical Work Flows / Kloten V., Neumann M.H.D., Di Pasquale F., Sprenger-Haussels M., Shaffer J.M., Schlumpberger M., Herdean A., Betsou F., Ammerlaan W., Af Hällström T., Serkkola E., Forsman T., Lianidou E., Sjöback R., Kubista M., Bender S., Lampignano R., Krahn T., Schlange T., CANCER-ID consortium // *Clinical Chemistry* – 2019. – T. 65 – № 9 – C.1132–1140.
65. Tutanov O. The Influence of Proteins on Fate and Biological Role of Circulating DNA / Tutanov O., Tamkovich S. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2022. – T. 23 – № 13 – C.7224.
66. Nikanjam M. Liquid biopsy: current technology and clinical applications / Nikanjam M., Kato S., Kurzrock R. // *Journal of Hematology & Oncology* – 2022. – T. 15 – № 1 – C.131.
67. Vorperian S.K. Cell types of origin of the cell-free transcriptome / Vorperian S.K., Moufarrej M.N., Tabula Sapiens Consortium, Quake S.R. // *Nature Biotechnology* – 2022. – T. 40 – № 6 – C.855–861.
68. Yang L. Extracellular DNA in blood products and its potential effects on transfusion / Yang L., Yang D., Yang Q., Cheng F., Huang Y. // *Bioscience Reports* – 2020. – T. 40 – № 3 – C.BSR20192770.
69. Pös O. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications / Pös O., Biró O., Szemes T., Nagy B. // *European Journal of Human Genetics* – 2018. – T. 26 – № 7 – C.937–945.
70. Tamkovich S.N. Features of Circulating DNA Fragmentation in Blood of Healthy Females and Breast Cancer Patients / Tamkovich S.N., Kirushina N.A., Voytsitskiy V.E., Tkachuk V.A., Laktionov P.P. // *Advances in Experimental Medicine and Biology* – 2016. – T. 924 – C.47–51.
71. Heitzer E. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology / Heitzer E., Haque I.S., Roberts C.E.S., Speicher M.R. // *Nature Reviews Genetics* – 2019. – T. 20 – № 2 – C.71–88.
72. Kustanovich A. Life and death of circulating cell-free DNA / Kustanovich A., Schwartz R., Peretz T., Grinshpun A. // *Cancer Biology & Therapy* – 2019. – T. 20 – № 8 – C.1057–1067.
73. Lee S.Y. Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis / Lee S.Y., Ju M.K., Jeon H.M., Jeong E.K., Lee Y.J., Kim C.H., Park H.G., Han S.I., Kang H.S. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* – 2018. – T. 2018 – № 1 – C.3537471.
74. Tang P.S. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? / Tang P.S., Mura M., Seth R., Liu M. // *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* – 2008. – T. 294 – № 4 – C.L632–641.

75. Rogers J.C. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen / Rogers J.C., Boldt D., Kornfeld S., Skinner A., Valeri C.R. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1972. – Т. 69 – № 7 – С.1685–1689.
76. Anker P. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system / Anker P., Stroun M., Maurice P.A. // *Cancer Research* – 1975. – Т. 35 – № 9 – С.2375–2382.
77. Anker P. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients / Anker P., Mulcahy H., Qi Chen X., Stroun M. // *Cancer and Metastasis Reviews* – 1999. – Т. 18 – № 1 – С.65–73.
78. Larson M.H. A comprehensive characterization of the cell-free transcriptome reveals tissue- and subtype-specific biomarkers for cancer detection / Larson M.H., Pan W., Kim H.J., Mauntz R.E., Stuart S.M., Pimentel M., Zhou Y., Knudsgaard P., Demas V., Aravanis A.M., Jamshidi A. // *Nature Communications* – 2021. – Т. 12 – № 1 – С.2357.
79. Тамкович, С. Н. Экзосомы: механизмы возникновения, состав, транспорт, биологическая активность, использование в диагностике / Тамкович, С. Н., Тутанов, О. С., Лактионов, П. П. // *Биологические мембраны* – 2016. – Т. 33 – № 3 – С.163–175.
80. Leung F. Circulating Tumor DNA as a Cancer Biomarker: Fact or Fiction? / Leung F., Kulasingam V., Diamandis E.P., Hoon D.S.B., Kinzler K., Pantel K., Alix-Panabières C. // *Clinical Chemistry* – 2016. – Т. 62 – № 8 – С.1054–1060.
81. Connolly I.D. A pilot study on the use of cerebrospinal fluid cell-free DNA in intramedullary spinal ependymoma / Connolly I.D., Li Y., Pan W., Johnson E., You L., Vogel H., Ratliff J., Hayden Gephart M. // *Journal of Neuro-Oncology* – 2017. – Т. 135 – № 1 – С.29–36.
82. Bronkhorst A.J. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management / Bronkhorst A.J., Ungerer V., Holdenrieder S. // *Biomolecular Detection and Quantification* – 2019. – Т. 17 – С.100087.
83. Grange C. Exploring the role of urinary extracellular vesicles in kidney physiology, aging, and disease progression / Grange C., Dalmaso A., Cortez J.J., Spokeviciute B., Bussolati B. // *American Journal of Physiology-Cell Physiology* – 2023. – Т. 325 – № 6 – С.C1439–C1450.
84. Chen B. Extracellular Vesicles as Biomarkers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: From Diagnosis to Disease-Free Survival / Chen B., Leung L.L., Qu X., Chan J.Y.-K. // *Cancers* – 2023. – Т. 15 – № 6 – С.1826.
85. Oshi M. Urine as a Source of Liquid Biopsy for Cancer / Oshi M., Murthy V., Takahashi H., Huyser M., Okano M., Tokumaru Y., Rashid O.M., Matsuyama R., Endo I., Takabe K. // *Cancers* – 2021. – Т. 13 – № 11 – С.2652.
86. Mlcochova H. Urinary MicroRNAs as a New Class of Noninvasive Biomarkers in Oncology, Nephrology, and Cardiology Methods in Molecular Biology // под ред. М. Sioud. New York, NY: Springer New York, 2015. – 439–463с.
87. Bosson A.D. Endogenous miRNA and Target Concentrations Determine Susceptibility to Potential ceRNA Competition / Bosson A.D., Zamudio J.R., Sharp P.A. // *Molecular Cell* – 2014. – Т. 56 – № 3 – С.347–359.
88. Iacomino G. miRNAs: The Road from Bench to Bedside / Iacomino G. // *Genes* – 2023. – Т. 14 – № 2 – С.314.
89. Guo L. A challenge for miRNA: multiple isomiRs in miRNAomics / Guo L., Chen F. // *Gene* – 2014. – Т. 544 – № 1 – С.1–7.

90. Li S.-C. MicroRNA 3' end nucleotide modification patterns and arm selection preference in liver tissues / Li S.-C., Tsai K.-W., Pan H.-W., Jeng Y.-M., Ho M.-R., Li W.-H. // *BMC systems biology* – 2012. – T. 6 Suppl 2 – № Suppl 2 – C.S14.
91. Kim B. Genome-wide Mapping of DROSHA Cleavage Sites on Primary MicroRNAs and Noncanonical Substrates / Kim B., Jeong K., Kim V.N. // *Molecular Cell* – 2017. – T. 66 – № 2 – C.258- 269.e5.
92. Ha M. Regulation of microRNA biogenesis / Ha M., Kim V.N. // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* – 2014. – T. 15 – № 8 – C.509–524.
93. Chiang H.R. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes / Chiang H.R., Schoenfeld L.W., Ruby J.G., Auyeung V.C., Spies N., Baek D., Johnston W.K., Russ C., Luo S., Babiarz J.E., Bilelloch R., Schroth G.P., Nusbaum C., Bartel D.P. // *Genes & Development* – 2010. – T. 24 – № 10 – C.992–1009.
94. Heale B.S.E. The effect of RNA editing and ADARs on miRNA biogenesis and function / Heale B.S.E., Keegan L.P., O'Connell M.A. // *Advances in Experimental Medicine and Biology* – 2010. – T. 700 – C.76–84.
95. Xie W. Structure-function analysis of microRNA 3'-end trimming by Nibbler / Xie W., Sowemimo I., Hayashi R., Wang J., Burkard T.R., Brennecke J., Ameres S.L., Patel D.J. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2020. – T. 117 – № 48 – C.30370–30379.
96. Liu X. A MicroRNA precursor surveillance system in quality control of MicroRNA synthesis / Liu X., Zheng Q., Vrettos N., Maragkakis M., Alexiou P., Gregory B.D., Mourelatos Z. // *Molecular Cell* – 2014. – T. 55 – № 6 – C.868–879.
97. Wulff B.-E. Modulation of microRNA expression and function by ADARs / Wulff B.-E., Nishikura K. // *Current Topics in Microbiology and Immunology* – 2012. – T. 353 – C.91–109.
98. Morin R.D. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells / Morin R.D., O'Connor M.D., Griffith M., Kuchenbauer F., Delaney A., Prabhu A.-L., Zhao Y., McDonald H., Zeng T., Hirst M., Eaves C.J., Marra M.A. // *Genome Research* – 2008. – T. 18 – № 4 – C.610–621.
99. Lee L.W. Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing / Lee L.W., Zhang S., Etheridge A., Ma L., Martin D., Galas D., Wang K. // *RNA (New York, N.Y.)* – 2010. – T. 16 – № 11 – C.2170–2180.
100. Torsin L.I. Editing and Chemical Modifications on Non-Coding RNAs in Cancer: A New Tale with Clinical Significance / Torsin L.I., Petrescu G.E.D., Sabo A.A., Chen B., Brehar F.M., Dragomir M.P., Calin G.A. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2021. – T. 22 – № 2 – C.581.
101. Zhang X.-Q. Decoding the Atlas of RNA Modifications from Epitranscriptome Sequencing Data / Zhang X.-Q., Yang J.-H. // *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* – 2019. – T. 1870 – C.107–124.
102. Tusup M. Epitranscriptomics of cancer / Tusup M., Kundig T., Pascolo S. // *World Journal of Clinical Oncology* – 2018. – T. 9 – № 3 – C.42–55.
103. Chen K. Nucleic Acid Modifications in Regulation of Gene Expression / Chen K., Zhao B.S., He C. // *Cell Chemical Biology* – 2016. – T. 23 – № 1 – C.74–85.
104. Liang H. 3'-Terminal 2'-O-methylation of lung cancer miR-21-5p enhances its stability and association with Argonaute 2 / Liang H., Jiao Z., Rong W., Qu S., Liao Z., Sun X., Wei Y., Zhao Q., Wang J., Liu Y., Chen X., Wang T., Zhang C.-Y., Zen K. // *Nucleic Acids Research* – 2020. – T. 48 – № 13 – C.7027–7040.
105. Trixl L. The dynamic RNA modification 5-methylcytosine and its emerging role as an epitranscriptomic mark / Trixl L., Lusser A. // *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* – 2019. – T. 10 – № 1 – C.e1510.

106. Kwast R.V.C.T. van der Adenosine-to-Inosine Editing of MicroRNA-487b Alters Target Gene Selection After Ischemia and Promotes Neovascularization / Kwast R.V.C.T. van der, Ingen E. van, Parma L., Peters H.A.B., Quax P.H.A., Nossent A.Y. // *Circulation Research* – 2018. – T. 122 – № 3 – C.444–456.
107. Tsui N.B.Y. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma / Tsui N.B.Y., Ng E.K.O., Lo Y.M.D. // *Clinical Chemistry* – 2002. – T. 48 – № 10 – C.1647–1653.
108. Danilevich V.N. Preparation and Properties of Nanoparticles, tRNA–Bivalent Metal Cation (Me²⁺) Complexes, and Prospects of Their Practical Use / Danilevich V.N., Sorokin V.V., Moiseev Ya.P., Sizova S.V. // *Doklady Biochemistry and Biophysics* – 2018. – T. 479 – № 1 – C.118–122.
109. Etheridge A. The complexity, function and applications of RNA in circulation / Etheridge A., Gomes C.P.C., Pereira R.W., Galas D., Wang K. // *Frontiers in Genetics* – 2013. – T. 4 – C.115.
110. Houck J.C. Serum ribonuclease activity / Houck J.C., Berman L.B. // *Journal of Applied Physiology* – 1958. – T. 12 – № 3 – C.473–476.
111. Reddi K.K. Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer / Reddi K.K., Holland J.F. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1976. – T. 73 – № 7 – C.2308–2310.
112. Koczera P. The Ribonuclease A Superfamily in Humans: Canonical RNases as the Buttress of Innate Immunity / Koczera P., Martin L., Marx G., Schuerholz T. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2016. – T. 17 – № 8 – C.1278.
113. Hynie I. Determination of phosphodiesterase I activity in human blood serum / Hynie I., Meuffels M., Poznanski W.J. // *Clinical Chemistry* – 1975. – T. 21 – № 10 – C.1383–1387.
114. Lüthje J. 5'-Nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in human serum: quantitative measurement and some biochemical properties / Lüthje J., Ogilvie A. // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* – 1987. – T. 164 – № 3 – C.275–284.
115. Wright K. Comparison of methods for miRNA isolation and quantification from ovine plasma / Wright K., Silva K. de, Purdie A.C., Plain K.M. // *Scientific Reports* – 2020. – T. 10 – № 1 – C.825.
116. Fleischhacker M. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey / Fleischhacker M., Schmidt B. // *Biochimica Et Biophysica Acta* – 2007. – T. 1775 – № 1 – C.181–232.
117. Weber J.A. The microRNA spectrum in 12 body fluids / Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J., Galas D.J., Wang K. // *Clinical Chemistry* – 2010. – T. 56 – № 11 – C.1733–1741.
118. Sohel M.M.H. Circulating microRNAs as biomarkers in cancer diagnosis / Sohel M.M.H. // *Life Sciences* – 2020. – T. 248 – C.117473.
119. Crescitelli R. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes / Crescitelli R., Lässer C., Szabó T.G., Kittel A., Eldh M., Dianzani I., Buzás E.I., Lötvall J. // *Journal of Extracellular Vesicles* – 2013. – T. 2 – № 1 – C.20677.
120. Zerneck A. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection / Zerneck A., Bidzhekov K., Noels H., Shagdarsuren E., Gan L., Denecke B., Hristov M., Köppel T., Jahantigh M.N., Lutgens E., Wang S., Olson E.N., Schober A., Weber C. // *Science Signaling* – 2009. – T. 2 – № 100 – C.ra81.
121. Karin-Kujundzic V. Novel Epigenetic Biomarkers in Pregnancy-Related Disorders and Cancers / Karin-Kujundzic V., Sola I.M., Predavec N., Potkonjak A., Somen E., Mioc P., Serman A., Vranic S., Serman L. // *Cells* – 2019. – T. 8 – № 11 – C.1459.

122. Hunter M.P. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles / Hunter M.P., Ismail N., Zhang X., Aguda B.D., Lee E.J., Yu L., Xiao T., Schafer J., Lee M.-L.T., Schmittgen T.D., Nana-Sinkam S.P., Jarjoura D., Marsh C.B. // *PloS One* – 2008. – T. 3 – № 11 – C.e3694.
123. Colombo M. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles / Colombo M., Raposo G., Théry C. // *Annual Review of Cell and Developmental Biology* – 2014. – T. 30 – № 1 – C.255–289.
124. Qian Z. The Role of Extracellular Vesicles: An Epigenetic View of the Cancer Microenvironment / Qian Z., Shen Q., Yang X., Qiu Y., Zhang W. // *BioMed Research International* – 2015. – T. 2015 – C.649161.
125. Meldolesi J. Extracellular vesicles, news about their role in immune cells: physiology, pathology and diseases / Meldolesi J. // *Clinical and Experimental Immunology* – 2019. – T. 196 – № 3 – C.318–327.
126. Morello M. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA / Morello M., Minciocchi V.R., Candia P. de, Yang J., Posadas E., Kim H., Griffiths D., Bhowmick N., Chung L.W.K., Gandellini P., Freeman M.R., Demichelis F., Di Vizio D. // *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* – 2013. – T. 12 – № 22 – C.3526–3536.
127. Choi D. Extracellular vesicle communication pathways as regulatory targets of oncogenic transformation / Choi D., Lee T.H., Spinelli C., Chennakrishnaiah S., D'Asti E., Rak J. // *Seminars in Cell & Developmental Biology* – 2017. – T. 67 – C.11–22.
128. Konoshenko M. Total Blood Exosomes in Breast Cancer: Potential Role in Crucial Steps of Tumorigenesis / Konoshenko M., Sagaradze G., Orlova E., Shtam T., Proskura K., Kamyshinsky R., Yunusova N., Alexandrova A., Efimenko A., Tamkovich S. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2020. – T. 21 – № 19 – C.7341.
129. Valadi H. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells / Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. // *Nature Cell Biology* – 2007. – T. 9 – № 6 – C.654–659.
130. Mitchell P.S. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection / Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogosova-Agadjanyan E.L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K.C., Allen A., Lin D.W., Urban N., Drescher C.W., Knudsen B.S., Stirewalt D.L., Gentleman R., Vessella R.L., Nelson P.S., Martin D.B., Tewari M. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2008. – T. 105 – № 30 – C.10513–10518.
131. Gallo A. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes / Gallo A., Tandon M., Alevizos I., Illei G.G. // *PloS One* – 2012. – T. 7 – № 3 – C.e30679.
132. Tamkovich S. Blood Circulating Exosomes Contain Distinguishable Fractions of Free and Cell-Surface-Associated Vesicles / Tamkovich S., Tutanov O., Efimenko A., Grigor'eva A., Ryabchikova E., Kirushina N., Vlassov V., Tkachuk V., Laktionov P. // *Current Molecular Medicine* – 2019. – T. 19 – № 4 – C.273–285.
133. Xu R. Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care / Xu R., Rai A., Chen M., Suwakulsiri W., Greening D.W., Simpson R.J. // *Nature Reviews. Clinical Oncology* – 2018. – T. 15 – № 10 – C.617–638.
134. Zijlstra C. Prostatomes as a source of diagnostic biomarkers for prostate cancer / Zijlstra C., Stoorvogel W. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2016. – T. 126 – № 4 – C.1144–1151.
135. Serre C. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation / Serre C., Busuttill V., Botto J.-M. // *International Journal of Cosmetic Science* – 2018. – T. 40 – № 4 – C.328–347.
136. Mannavola F. Extracellular Vesicles and Epigenetic Modifications Are Hallmarks of Melanoma Progression / Mannavola F., D'Oronzo S., Cives M., Stucci L.S., Ranieri G., Silvestris F., Tucci M. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2019. – T. 21 – № 1 – C.52.

137. Edelstein L.C. The role of platelet microvesicles in intercellular communication / Edelstein L.C. // *Platelets* – 2017. – T. 28 – № 3 – C.222–227.
138. Vickers K.C. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins / Vickers K.C., Palmisano B.T., Shoucri B.M., Shamburek R.D., Remaley A.T. // *Nature Cell Biology* – 2011. – T. 13 – № 4 – C.423–433.
139. Wagner J. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs / Wagner J., Riwanto M., Besler C., Knau A., Fichtlscherer S., Röxe T., Zeiher A.M., Landmesser U., Dimmeler S. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* – 2013. – T. 33 – № 6 – C.1392–1400.
140. Niculescu L.S. MiR-486 and miR-92a Identified in Circulating HDL Discriminate between Stable and Vulnerable Coronary Artery Disease Patients / Niculescu L.S., Simionescu N., Sanda G.M., Carnuta M.G., Stancu C.S., Popescu A.C., Popescu M.R., Vlad A., Dimulescu D.R., Simionescu M., Sima A.V. // *PloS One* – 2015. – T. 10 – № 10 – C.e0140958.
141. Sedgeman L.R. Beta cell secretion of miR-375 to HDL is inversely associated with insulin secretion / Sedgeman L.R., Beysen C., Ramirez Solano M.A., Michell D.L., Sheng Q., Zhao S., Turner S., Linton M.F., Vickers K.C. // *Scientific Reports* – 2019. – T. 9 – № 1 – C.3803.
142. Nik Mohamed Kamal N.N.S.B. Non-Exosomal and Exosomal Circulatory MicroRNAs: Which Are More Valid as Biomarkers? / Nik Mohamed Kamal N.N.S.B., Shahidan W.N.S. // *Frontiers in Pharmacology* – 2020. – T. 10 – C.1500.
143. Michell D.L. Lipoprotein carriers of microRNAs / Michell D.L., Vickers K.C. // *Biochimica Et Biophysica Acta* – 2016. – T. 1861 – № 12 Pt B – C.2069–2074.
144. Zhang Q. Transfer of Functional Cargo in Exomeres / Zhang Q., Higginbotham J.N., Jeppesen D.K., Yang Y.-P., Li W., McKinley E.T., Graves-Deal R., Ping J., Britain C.M., Dorsett K.A., Hartman C.L., Ford D.A., Allen R.M., Vickers K.C., Liu Q., Franklin J.L., Bellis S.L., Coffey R.J. // *Cell Reports* – 2019. – T. 27 – № 3 – C.940- 954.e6.
145. Beltrami C. Stabilization of Urinary MicroRNAs by Association with Exosomes and Argonaute 2 Protein / Beltrami C., Clayton A., Newbury L., Corish P., Jenkins R., Phillips A., Fraser D., Bowen T. // *Non-Coding RNA* – 2015. – T. 1 – № 2 – C.151–166.
146. Beltrami C. Human Pericardial Fluid Contains Exosomes Enriched with Cardiovascular-Expressed MicroRNAs and Promotes Therapeutic Angiogenesis / Beltrami C., Besnier M., Shantikumar S., Shearn A.I.U., Rajakaruna C., Laftah A., Sessa F., Spinetti G., Petretto E., Angelini G.D., Emanuelli C. // *Molecular Therapy* – 2017. – T. 25 – № 3 – C.679–693.
147. Tan G.S. Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2 / Tan G.S., Garchow B.G., Liu X., Yeung J., Morris J.P., Cuellar T.L., McManus M.T., Kiriakidou M. // *Nucleic Acids Research* – 2009. – T. 37 – № 22 – C.7533–7545.
148. Lima W.F. Binding and cleavage specificities of human Argonaute2 / Lima W.F., Wu H., Nichols J.G., Sun H., Murray H.M., Crooke S.T. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2009. – T. 284 – № 38 – C.26017–26028.
149. Zealy R.W. microRNA-binding proteins: specificity and function / Zealy R.W., Wrenn S.P., Davila S., Min K.-W., Yoon J.-H. // *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* – 2017. – T. 8 – № 5.
150. Janas M.M. Alternative RISC assembly: binding and repression of microRNA-mRNA duplexes by human Ago proteins / Janas M.M., Wang B., Harris A.S., Aguiar M., Shaffer J.M., Subrahmanyam Y.V.B.K., Behlke M.A., Wucherpennig K.W., Gygi S.P., Gagnon E., Novina C.D. // *RNA (New York, N.Y.)* – 2012. – T. 18 – № 11 – C.2041–2055.

151. Stalder L. The rough endoplasmatic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing / Stalder L., Heusermann W., Sokol L., Trojer D., Wirz J., Hean J., Fritzsche A., Aeschmann F., Pfanzagl V., Basselet P., Weiler J., Hintersteiner M., Morrissey D.V., Meisner-Kober N.C. // *The EMBO journal* – 2013. – T. 32 – № 8 – C.1115–1127.
152. Flores O. Differential RISC association of endogenous human microRNAs predicts their inhibitory potential / Flores O., Kennedy E.M., Skalsky R.L., Cullen B.R. // *Nucleic Acids Research* – 2014. – T. 42 – № 7 – C.4629–4639.
153. Mukherjee K. Reversible HuR-microRNA binding controls extracellular export of miR-122 and augments stress response / Mukherjee K., Ghoshal B., Ghosh S., Chakrabarty Y., Shwetha S., Das S., Bhattacharyya S.N. // *EMBO reports* – 2016. – T. 17 – № 8 – C.1184–1203.
154. Yoon J.-H. AUF1 promotes let-7b loading on Argonaute 2 / Yoon J.-H., Jo M.H., White E.J.F., De S., Hafner M., Zucconi B.E., Abdelmohsen K., Martindale J.L., Yang X., Wood W.H., Shin Y.M., Song J.-J., Tuschl T., Becker K.G., Wilson G.M., Hohn S., Gorospe M. // *Genes & Development* – 2015. – T. 29 – № 15 – C.1599–1604.
155. Wachalska M. Protein Complexes in Urine Interfere with Extracellular Vesicle Biomarker Studies / Wachalska M., Koppers-Lalic D., Eijndhoven M. van, Pegtel M., Geldof A.A., Lipinska A.D., Moorselaar R.J. van, Bijnsdorp I.V. // *Journal of Circulating Biomarkers* – 2016. – T. 5 – C.4.
156. Gracia T. Urinary Exosomes Contain MicroRNAs Capable of Paracrine Modulation of Tubular Transporters in Kidney / Gracia T., Wang X., Su Y., Norgett E.E., Williams T.L., Moreno P., Micklem G., Karet Frankl F.E. // *Scientific Reports* – 2017. – T. 7 – № 1 – C.40601.
157. Skipski V.P. Lipid composition of human serum lipoproteins / Skipski V.P., Barclay M., Barclay R.K., Fetzter V.A., Good J.J., Archibald F.M. // *The Biochemical Journal* – 1967. – T. 104 – № 2 – C.340–352.
158. Kontush A. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components / Kontush A., Lindahl M., Lhomme M., Calabresi L., Chapman M.J., Davidson W.S. // *Handbook of Experimental Pharmacology* – 2015. – T. 224 – C.3–51.
159. Yu S. Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure / Yu S., Cao H., Shen B., Feng J. // *Oncotarget* – 2015. – T. 6 – № 35 – C.37151–37168.
160. Caby M.-P. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma / Caby M.-P., Lankar D., Vincendeau-Scherrer C., Raposo G., Bonnerot C. // *International Immunology* – 2005. – T. 17 – № 7 – C.879–887.
161. Vella L.J. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing / Vella L.J., Sharples R.A., Lawson V.A., Masters C.L., Cappai R., Hill A.F. // *The Journal of Pathology* – 2007. – T. 211 – № 5 – C.582–590.
162. Tamkovich S. What information can be obtained from the tears of a patient with primary open angle glaucoma? / Tamkovich S., Grigor'eva A., Eremina A., Tupikin A., Kabilov M., Chernykh V., Vlassov V., Ryabchikova E. // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* – 2019. – T. 495 – C.529–537.
163. Pisitkun T. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine / Pisitkun T., Shen R.-F., Knepper M.A. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2004. – T. 101 – № 36 – C.13368–13373.
164. Sedgwick A.E. The biology of extracellular microvesicles / Sedgwick A.E., D'Souza-Schorey C. // *Traffic (Copenhagen, Denmark)* – 2018. – T. 19 – № 5 – C.319–327.
165. Li M. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers / Li M., Zeringer E., Barta T., Schageman J., Cheng A., Vlassov A.V. // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* – 2014. – T. 369 – № 1652 – C.20130502.

166. Fernando M.R. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes / Fernando M.R., Jiang C., Krzyzanowski G.D., Ryan W.L. // *PloS One* – 2017. – T. 12 – № 8 – C.e0183915.
167. Tosar J.P. Detection and Analysis of Non-vesicular Extracellular RNA / Tosar J.P., Cayota A. // *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) – 2018. – T. 1740 – C.125–137.
168. Li L. Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles / Li L., Zhu D., Huang L., Zhang J., Bian Z., Chen X., Liu Y., Zhang C.-Y., Zen K. // *PloS One* – 2012. – T. 7 – № 10 – C.e46957.
169. Muhsin-Sharafaldine M.-R. Tumor-Derived Apoptotic Vesicles: With Death They Do Part / Muhsin-Sharafaldine M.-R., McLellan A.D. // *Frontiers in Immunology* – 2018. – T. 9 – C.957.
170. Channavajjhala S.K. Optimizing the purification and analysis of miRNAs from urinary exosomes / Channavajjhala S.K., Rossato M., Morandini F., Castagna A., Pizzolo F., Bazzoni F., Olivieri O. // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* – 2014. – T. 52 – № 3 – C.345–354.
171. Turchinovich A. Check and mate to exosomal extracellular miRNA: new lesson from a new approach / Turchinovich A., Tonevitsky A.G., Cho W.C., Burwinkel B. // *Frontiers in Molecular Biosciences* – 2015. – T. 2 – C.11.
172. Rahat B. Circulating Cell-Free Nucleic Acids as Epigenetic Biomarkers in Precision Medicine / Rahat B., Ali T., Sapehia D., Mahajan A., Kaur J. // *Frontiers in Genetics* – 2020. – T. 11 – C.844.
173. Hu X. Emerging frontiers of cell-free DNA fragmentomics / Hu X., Ding S., Jiang P. // *Extracellular Vesicles and Circulating Nucleic Acids* – 2022. – T. 3 – № 4 – C.363–75.
174. Thierry A.R. Circulating DNA fragmentomics and cancer screening / Thierry A.R. // *Cell Genomics* – 2023. – T. 3 – № 1 – C.100242.
175. Ma X. Cell-Free DNA Provides a Good Representation of the Tumor Genome Despite Its Biased Fragmentation Patterns / Ma X., Zhu L., Wu X., Bao H., Wang X., Chang Z., Shao Y.W., Wang Z. // *PloS One* – 2017. – T. 12 – № 1 – C.e0169231.
176. Pepys M.B. Serum amyloid P component is the major calcium-dependent specific DNA binding protein of the serum / Pepys M.B., Butler P.J. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 1987. – T. 148 – № 1 – C.308–313.
177. Butler P.J. Pentraxin-chromatin interactions: serum amyloid P component specifically displaces H1-type histones and solubilizes native long chromatin. / Butler P.J., Tennent G.A., Pepys M.B. // *The Journal of experimental medicine* – 1990. – T. 172 – № 1 – C.13–18.
178. Bottazzi B. The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling / Bottazzi B., Inforzato A., Messa M., Barbagallo M., Magrini E., Garlanda C., Mantovani A. // *Journal of Hepatology* – 2016. – T. 64 – № 6 – C.1416–1427.
179. Yakubov L.A. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? / Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V.V. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1989. – T. 86 – № 17 – C.6454–6458.
180. Kimura Y. Binding of oligoguanylate to scavenger receptors is required for oligonucleotides to augment NK cell activity and induce IFN / Kimura Y., Sonehara K., Kuramoto E., Makino T., Yamamoto S., Yamamoto T., Kataoka T., Tokunaga T. // *Journal of Biochemistry* – 1994. – T. 116 – № 5 – C.991–994.
181. Chelobanov B.P. Proteins involved in binding and cellular uptake of nucleic acids / Chelobanov B.P., Laktionov P.P., Vlasov V.V. // *Biochemistry (Moscow)* – 2006. – T. 71 – № 6 – C.583–596.

182. Tamkovich S.N. Protein Content of Circulating Nucleoprotein Complexes / Tamkovich S.N., Tutanov O.S., Serdukov D.S., Belenikin M.S., Shlikht A.G., Kirushina N.A., Voytsitskiy V.E., Tsentalovich Y.P., Tkachuk V.A., Laktionov P.P. // *Advances in Experimental Medicine and Biology* – 2016. – T. 924 – C.133–136.
183. Aucamp J. A historical and evolutionary perspective on the biological significance of circulating DNA and extracellular vesicles / Aucamp J., Bronkhorst A.J., Badenhorst C.P.S., Pretorius P.J. // *Cellular and Molecular Life Sciences* – 2016. – T. 73 – № 23 – C.4355–4381.
184. Tamkovich S. Cell-surface-bound circulating DNA in the blood: Biology and clinical application / Tamkovich S., Laktionov P. // *IUBMB Life* – 2019. – T. 71 – № 9 – C.1201–1210.
185. Cherepanova A.V. Deoxyribonuclease Activity and Circulating DNA Concentration in Blood Plasma of Patients with Prostate Tumors / Cherepanova A.V., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2008. – T. 1137 – № 1 – C.218–221.
186. Laktionov P.P. Cell-surface-bound nucleic acids: Free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients / Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2004. – T. 1022 – C.221–227.
187. Catarino R. Quantification of Free Circulating Tumor DNA as a Diagnostic Marker for Breast Cancer / Catarino R., Ferreira M.M., Rodrigues H., Coelho A., Nogal A., Sousa A., Medeiros R. // *DNA and Cell Biology* – 2008. – T. 27 – № 8 – C.415–421.
188. Sozzi G. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients / Sozzi G., Conte D., Mariani L., Lo Vullo S., Roz L., Lombardo C., Pierotti M.A., Tavecchio L. // *Cancer Research* – 2001. – T. 61 – № 12 – C.4675–4678.
189. Catarino R. Circulating DNA: Diagnostic Tool and Predictive Marker for Overall Survival of NSCLC Patients / Catarino R., Coelho A., Araújo A., Gomes M., Nogueira A., Lopes C., Medeiros R. // *PLoS ONE* – 2012. – T. 7 – № 6 – C.e38559.
190. Altimari A. Diagnostic Role of Circulating Free Plasma DNA Detection in Patients With Localized Prostate Cancer / Altimari A., Grigioni A.D., Benedettini E., Gabusi E., Schiavina R., Martinell A., Morselli-Labate A.M., Martorana G., Grigioni W.F., Fiorentino M. // *American Journal of Clinical Pathology* – 2008. – T. 129 – № 5 – C.756–762.
191. Yoon K.-A. Comparison of circulating plasma DNA levels between lung cancer patients and healthy controls / Yoon K.-A., Park S., Lee S.H., Kim J.H., Lee J.S. // *The Journal of molecular diagnostics: JMD* – 2009. – T. 11 – № 3 – C.182–185.
192. Cicchillitti L. Circulating cell-free DNA content as blood based biomarker in endometrial cancer / Cicchillitti L., Corrado G., De Angeli M., Mancini E., Baiocco E., Patrizi L., Zampa A., Merola R., Martayan A., Conti L., Piaggio G., Vizza E. // *Oncotarget* – 2017. – T. 8 – № 70 – C.115230–115243.
193. Hyun M.H. Clinical implications of circulating cell-free DNA quantification and metabolic tumor burden in advanced non-small cell lung cancer / Hyun M.H., Lee E.S., Eo J.S., Kim S., Kang E.J., Sung J.S., Choi Y.J., Park K.H., Shin S.W., Lee S.Y., Kim Y.H. // *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* – 2019. – T. 134 – C.158–166.
194. Valpione S. Plasma total cell-free DNA (cfDNA) is a surrogate biomarker for tumour burden and a prognostic biomarker for survival in metastatic melanoma patients / Valpione S., Gremel G., Mundra P., Middlehurst P., Galvani E., Girotti M.R., Lee R.J., Garner G., Dhomen N., Lorigan P.C., Marais R. // *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* – 2018. – T. 88 – C.1–9.

195. Lee J.-H. Liquid biopsy prediction of axillary lymph node metastasis, cancer recurrence, and patient survival in breast cancer: A meta-analysis / Lee J.-H., Jeong H., Choi J.-W., Oh H.E., Kim Y.-S. // *Medicine* – 2018. – T. 97 – № 42 – C.e12862.
196. Fernandez-Garcia D. Plasma cell-free DNA (cfDNA) as a predictive and prognostic marker in patients with metastatic breast cancer / Fernandez-Garcia D., Hills A., Page K., Hastings R.K., Toghill B., Goddard K.S., Ion C., Ogle O., Boydell A.R., Gleason K., Rutherford M., Lim A., Guttery D.S., Coombes R.C., Shaw J.A. // *Breast cancer research: BCR* – 2019. – T. 21 – № 1 – C.149.
197. Kohler C. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors / Kohler C., Radpour R., Barekati Z., Asadollahi R., Bitzer J., Wight E., Bürki N., Diesch C., Holzgreve W., Zhong X.Y. // *Molecular Cancer* – 2009. – T. 8 – C.105.
198. Casadio V. Urine Cell-Free DNA integrity as a marker for early bladder cancer diagnosis: Preliminary data / Casadio V., Calistri D., Tebaldi M., Bravaccini S., Gunelli R., Martorana G., Bertaccini A., Serra L., Scarpi E., Amadori D., Silvestrini R., Zoli W. // *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* – 2013. – T. 31 – № 8 – C.1744–1750.
199. Kim K. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection / Kim K., Shin D.G., Park M.K., Baik S.H., Kim T.H., Kim S., Lee S. // *Annals of Surgical Treatment and Research* – 2014. – T. 86 – № 3 – C.136–142.
200. Faria G. Circulating Cell-Free DNA as a Prognostic and Molecular Marker for Patients with Brain Tumors under Perilyl Alcohol-Based Therapy / Faria G., Silva E., Da Fonseca C., Quirico-Santos T. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2018. – T. 19 – № 6 – C.1610.
201. Mouliere F. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer / Mouliere F., El Messaoudi S., Pang D., Dritschilo A., Thierry A.R. // *Molecular Oncology* – 2014. – T. 8 – № 5 – C.927–941.
202. Tamkovich S.N. Circulating DNA and DNase activity in human blood / Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Kolesnikova E.V., Rykova E.Y., Pyshnyi D.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2006. – T. 1075 – C.191–196.
203. Moss J. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease / Moss J., Magenheimer J., Neiman D., Zemmour H., Loyfer N., Korach A., Samet Y., Maoz M., Druid H., Arner P., Fu K.-Y., Kiss E., Spalding K.L., Landesberg G., Zick A., Grinshpun A., Shapiro A.M.J., Grompe M., Wittenberg A.D., Glaser B., Shemer R., Kaplan T., Dor Y. // *Nature Communications* – 2018. – T. 9 – № 1 – C.5068.
204. Ellinger J. Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators / Ellinger J., Bastian P.J., Haan K.I., Heukamp L.C., Buettner R., Fimmers R., Mueller S.C., Ruecker A. von // *International Journal of Cancer* – 2008. – T. 122 – № 1 – C.138–143.
205. Diaz L.A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA / Diaz L.A., Bardelli A. // *Journal of Clinical Oncology* – 2014. – T. 32 – № 6 – C.579–586.
206. Schwarzenbach H. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients / Schwarzenbach H., Hoon D.S.B., Pantel K. // *Nature Reviews. Cancer* – 2011. – T. 11 – № 6 – C.426–437.
207. Dawson S.-J. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer / Dawson S.-J., Tsui D.W.Y., Murtaza M., Biggs H., Rueda O.M., Chin S.-F., Dunning M.J., Gale D., Forshew T., Mahler-Araujo B., Rajan S., Humphray S., Becq J., Halsall D., Wallis M., Bentley D., Caldas C., Rosenfeld N. // *New England Journal of Medicine* – 2013. – T. 368 – № 13 – C.1199–1209.

208. Diehl F. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics / Diehl F., Schmidt K., Choti M.A., Romans K., Goodman S., Li M., Thornton K., Agrawal N., Sokoll L., Szabo S.A., Kinzler K.W., Vogelstein B., Diaz Jr L.A. // *Nature Medicine* – 2008. – T. 14 – № 9 – C.985–990.
209. Leary R.J. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing / Leary R.J., Sausen M., Kinde I., Papadopoulos N., Carpten J.D., Craig D., O'Shaughnessy J., Kinzler K.W., Parmigiani G., Vogelstein B., Diaz L.A., Velculescu V.E. // *Science Translational Medicine* – 2012. – T. 4 – № 162 – C.162ra154.
210. Jahr S. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells / Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., Knippers R. // *Cancer Research* – 2001. – T. 61 – № 4 – C.1659–1665.
211. Papadopoulos N. Pathophysiology of ctDNA Release into the Circulation and Its Characteristics: What Is Important for Clinical Applications / Papadopoulos N. // *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer* – 2020. – T. 215 – C.163–180.
212. Khier S. Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature / Khier S., Lohan L. // *Future science OA* – 2018. – T. 4 – № 4 – C.FSO295.
213. Laktionov P.P. [Pharmacokinetics and stability in the blood in vivo of phosphodiester and modified oligonucleotide derivatives] / Laktionov P.P., Bryksin A.V., Rykova E.I., Amirkhanov N.V., Vlasov V.V. // *Voprosy Meditsinskoi Khimii* – 1999. – T. 45 – № 3 – C.206–215.
214. Ivanov M. Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation / Ivanov M., Baranova A., Butler T., Spellman P., Mileyko V. // *BMC genomics* – 2015. – T. 16 Suppl 13 – № Suppl 13 – C.S1.
215. Underhill H.R. Fragment Length of Circulating Tumor DNA / Underhill H.R., Kitzman J.O., Hellwig S., Welker N.C., Daza R., Baker D.N., Gligorich K.M., Rostomily R.C., Bronner M.P., Shendure J. // *PLoS genetics* – 2016. – T. 12 – № 7 – C.e1006162.
216. Pisetsky D.S. The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP / Pisetsky D.S. // *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* – 2012. – T. 144 – № 1 – C.32–40.
217. Wang B.G. Increased plasma DNA integrity in cancer patients / Wang B.G., Huang H.-Y., Chen Y.-C., Bristow R.E., Kassaei K., Cheng C.-C., Roden R., Sokoll L.J., Chan D.W., Shih I.-M. // *Cancer Research* – 2003. – T. 63 – № 14 – C.3966–3968.
218. Umetani N. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum / Umetani N., Giuliano A.E., Hiramatsu S.H., Amersi F., Nakagawa T., Martino S., Hoon D.S.B. // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* – 2006. – T. 24 – № 26 – C.4270–4276.
219. Hussein N.A. Plasma ALU-247, ALU-115, and cfDNA Integrity as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Breast Cancer / Hussein N.A., Mohamed S.N., Ahmed M.A. // *Applied Biochemistry and Biotechnology* – 2019. – T. 187 – № 3 – C.1028–1045.
220. Arko-Boham B. Circulating cell-free DNA integrity as a diagnostic and prognostic marker for breast and prostate cancers / Arko-Boham B., Aryee N.A., Blay R.M., Owusu E.D.A., Tagoe E.A., Doris Shackie E.-S., Debrah A.B., Adu-Aryee N.A. // *Cancer Genetics* – 2019. – T. 235–236 – C.65–71.
221. Holdenrieder S. DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases / Holdenrieder S., Burges A., Reich O., Spelsberg F.W., Stieber P. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2008. – T. 1137 – C.162–170.

222. Mouliere F. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA / Mouliere F., Robert B., Arnau Peyrotte E., Del Rio M., Ychou M., Molina F., Gongora C., Thierry A.R. // *PloS One* – 2011. – T. 6 – № 9 – C.e23418.
223. Zhu J. Molecular characterization of cell-free eccDNAs in human plasma / Zhu J., Zhang F., Du M., Zhang P., Fu S., Wang L. // *Scientific Reports* – 2017. – T. 7 – № 1 – C.10968.
224. Suzuki N. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma / Suzuki N., Kamataki A., Yamaki J., Homma Y. // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* – 2008. – T. 387 – № 1–2 – C.55–58.
225. Vaart M. van der Characterization of circulating DNA in healthy human plasma / Vaart M. van der, Pretorius P.J. // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* – 2008. – T. 395 – № 1–2 – C.186.
226. Peters D.L. Continuous adaptation through genetic communication - a putative role for cell-free DNA / Peters D.L., Pretorius P.J. // *Expert Opinion on Biological Therapy* – 2012. – T. 12 Suppl 1 – C.S127-132.
227. Ivanov M. Utility of cfDNA Fragmentation Patterns in Designing the Liquid Biopsy Profiling Panels to Improve Their Sensitivity / Ivanov M., Chernenko P., Breder V., Laktionov K., Rozhavskaia E., Musienko S., Baranova A., Mileiko V. // *Frontiers in Genetics* – 2019. – T. 10 – C.194.
228. Veiko N.N. Blood serum DNA in patients with rheumatoid arthritis is considerably enriched with fragments of ribosomal repeats containing immunostimulatory CpG-motifs / Veiko N.N., Shubaeva N.O., Ivanova S.M., Speranskii A.I., Lyapunova N.A., Spitkovskii D.M. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* – 2006. – T. 142 – № 3 – C.313–316.
229. Ermakov A.V. Oxidized Extracellular DNA as a Stress Signal in Human Cells / Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Izevskaya V.L., Baranova A., Veiko N.N. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* – 2013. – T. 2013 – C.1–12.
230. Stoddard S. The Detection of 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine in Circulating Cell-Free DNA: A Step Towards Longitudinal Monitoring of Health / Stoddard S., Riggelman A., Carpenter A., Baranova A. // *Advances in Experimental Medicine and Biology* – 2020. – T. 1241 – C.125–138.
231. Prokhortchouk E. Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs? / Prokhortchouk E., Hendrich B. // *Oncogene* – 2002. – T. 21 – № 35 – C.5394–5399.
232. Li L.-C. Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment / Li L.-C., Carroll P.R., Dahiya R. // *Journal of the National Cancer Institute* – 2005. – T. 97 – № 2 – C.103–115.
233. Davie J.R. DNase I sensitive chromatin is enriched in the acetylated species of histone H4 / Davie J.R., Candido E.P.M. // *FEBS Letters* – 1980. – T. 110 – № 2 – C.164–168.
234. Skrypkina I. Concentration and Methylation of Cell-Free DNA from Blood Plasma as Diagnostic Markers of Renal Cancer / Skrypkina I., Tsyba L., Onyshchenko K., Morderer D., Kashparova O., Nikolaienko O., Panasenko G., Vozianov S., Romanenko A., Rynditch A. // *Disease Markers* – 2016. – T. 2016 – C.3693096.
235. Herman J.G. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands / Herman J.G., Graff J.R., Myöhänen S., Nelkin B.D., Baylin S.B. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1996. – T. 93 – № 18 – C.9821–9826.
236. Stastny I. Aberrantly Methylated cfDNA in Body Fluids as a Promising Diagnostic Tool for Early Detection of Breast Cancer / Stastny I., Zubor P., Kajo K., Kubatka P., Golubnitschaja O., Dankova Z. // *Clinical Breast Cancer* – 2020. – T. 20 – № 6 – C.e711–e722.

237. Nadano D. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method / Nadano D., Yasuda T., Kishi K. // *Clinical Chemistry* – 1993. – T. 39 – № 3 – C.448–452.
238. Yoon J. Plasma cell alloantigen ENPP1 is expressed by a subset of human B cells with potential regulatory functions / Yoon J., Wang H., Kim Y.C., Yoshimoto M., Abbasi S., Morse Iii H.C. // *Immunology and Cell Biology* – 2016. – T. 94 – № 8 – C.719–728.
239. Haugen H.F. Usefulness of serum nucleotide pyrophosphatase and phosphodiesterase I activities in classifying liver disease / Haugen H.F., Ritland S., Blomhoff J.P., Solberg H.E., Skrede S. // *Clinical Chemistry* – 1981. – T. 27 – № 8 – C.1392–1396.
240. Baranovskii A.G. Catalytic heterogeneity of polyclonal DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis / Baranovskii A.G., Ershova N.A., Buneva V.N., Kanyshkova T.G., Mogelnitskii A.S., Doronin B.M., Boiko A.N., Gusev E.I., Favorova O.O., Nevinsky G.A. // *Immunology Letters* – 2001. – T. 76 – № 3 – C.163–167.
241. Shuster A.M. DNA hydrolyzing autoantibodies / Shuster A.M., Gololobov G.V., Kvashuk O.A., Bogomolova A.E., Smirnov I.V., Gabibov A.G. // *Science (New York, N.Y.)* – 1992. – T. 256 – № 5057 – C.665–667.
242. Zhao X.Y. Proposed mechanisms for the involvement of lactoferrin in the hydrolysis of nucleic acids / Zhao X.Y., Hutchens T.W. // *Advances in Experimental Medicine and Biology* – 1994. – T. 357 – C.271–278.
243. Thuijls G. A pilot study on potential new plasma markers for diagnosis of acute appendicitis / Thuijls G., Derikx J.P.M., Prakken F.J., Huisman B., Bijnen Ing A.A. van, Heurn E.L.W.E. van, Buurman W.A., Heineman E. // *The American Journal of Emergency Medicine* – 2011. – T. 29 – № 3 – C.256–260.
244. Lim R. Investigation of human cationic antimicrobial protein-18 (hCAP-18), lactoferrin and CD163 as potential biomarkers for ovarian cancer / Lim R., Lappas M., Riley C., Borregaard N., Moller H.J., Ahmed N., Rice G.E. // *Journal of Ovarian Research* – 2013. – T. 6 – № 1 – C.5.
245. Lazarides E. Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I / Lazarides E., Lindberg U. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1974. – T. 71 – № 12 – C.4742–4746.
246. Pan C.Q. Engineered properties and assays for human DNase I mutants / Pan C.Q., Sinicropi D.V., Lazarus R.A. // *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* – 2001. – T. 160 – C.309–321.
247. Gibson U.E. An antibody capture bioassay (ACB) for DNase in human serum samples / Gibson U.E., Chen A.B., Baker D.L., Sinicropi D.V. // *Journal of Immunological Methods* – 1992. – T. 155 – № 2 – C.249–256.
248. Martinez-Valle F. DNase 1 activity in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with epidemiological, clinical, immunological and therapeutical features / Martinez-Valle F., Balada E., Ordi-Ros J., Bujan-Rivas S., Sellas-Fernandez A., Vilardell-Tarres M. // *Lupus* – 2009. – T. 18 – № 5 – C.418–423.
249. Ershova E. Circulating cell-free DNA concentration and DNase I activity of peripheral blood plasma change in case of pregnancy with intrauterine growth restriction compared to normal pregnancy / Ershova E., Sergeeva V., Klimenko M., Avetisova K., Klimenko P., Kostyuk E., Veiko N., Veiko R., Izevskaya V., Kutsev S., Kostyuk S. // *Biomedical Reports* – 2017. – T. 7 – № 4 – C.319–324.
250. Stevenson R.P. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance / Stevenson R.P., Veltman D., Machesky L.M. // *Journal of Cell Science* – 2012. – T. 125 – № Pt 5 – C.1073–1079.
251. Vittori L.N. Circulating Cell-Free DNA in Physical Activities / Vittori L.N., Tarozzi A., Latessa P.M. // *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* – 2019. – T. 1909 – C.183–197.

252. García Moreira V. Increase in and clearance of cell-free plasma DNA in hemodialysis quantified by real-time PCR / García Moreira V., Cera Martínez T. de la, Gago González E., Prieto García B., Alvarez Menéndez F.V. // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* – 2006. – T. 44 – № 12 – C.1410–1415.
253. Burnham P. Myriad Applications of Circulating Cell-Free DNA in Precision Organ Transplant Monitoring / Burnham P., Khush K., De Vlaminck I. // *Annals of the American Thoracic Society* – 2017. – T. 14 – № Supplement_3 – C.S237–S241.
254. Butt A.N. Overview of Circulating Nucleic Acids in Plasma/Serum: Update on Potential Prognostic and Diagnostic Value in Diseases Excluding Fetal Medicine and Oncology / Butt A.N., Swaminathan R. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2008. – T. 1137 – № 1 – C.236–242.
255. Haller N. Circulating, cell-free DNA as a marker for exercise load in intermittent sports / Haller N., Helmig S., Taenny P., Petry J., Schmidt S., Simon P. // *PloS One* – 2018. – T. 13 – № 1 – C.e0191915.
256. Jylhävä J. Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: the Vitality 90+ study / Jylhävä J., Kotipelto T., Raitala A., Jylhä M., Hervonen A., Hurme M. // *Mechanisms of Ageing and Development* – 2011. – T. 132 – № 1–2 – C.20–26.
257. O'Connell G.C. Circulating extracellular DNA levels are acutely elevated in ischaemic stroke and associated with innate immune system activation / O'Connell G.C., Petrone A.B., Tennant C.S., Lucke-Wold N., Kabbani Y., Tarabishy A.R., Chantler P.D., Barr T.L. // *Brain Injury* – 2017. – T. 31 – № 10 – C.1369–1375.
258. Gupta A. Tumor Lysis Syndrome / Gupta A., Moore J.A. // *JAMA oncology* – 2018. – T. 4 – № 6 – C.895.
259. Omokawa A. Urine Xanthine Crystals in Tumor Lysis Syndrome / Omokawa A., Oguma M., Ueki S., Saga T., Hirokawa M. // *Urology* – 2018. – T. 120 – C.e9–e10.
260. Tamkovich S.N. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors / Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Rykova E.Y., Permyakova V.I., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // *Clinical Chemistry* – 2005. – T. 51 – № 7 – C.1317–1319.
261. Kolesnikova E.V. Circulating DNA in the Blood of Gastric Cancer Patients / Kolesnikova E.V., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Shelestyuk P.I., Permyakova V.I., Vlassov V.V., Tuzikov A.S., Laktionov P.P., Rykova E.Y. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2008. – T. 1137 – № 1 – C.226–231.
262. Tug S. Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients / Tug S., Helmig S., Menke J., Zahn D., Kubiak T., Schwarting A., Simon P. // *Cellular Immunology* – 2014. – T. 292 – № 1–2 – C.32–39.
263. Vlassov V.V. Penetration of oligonucleotides into mouse organism through mucosa and skin / Vlassov V.V., Karamyshev V.N., Yakubov L.A. // *FEBS letters* – 1993. – T. 327 – № 3 – C.271–274.
264. Lo Y.M.D. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies / Lo Y.M.D., Han D.S.C., Jiang P., Chiu R.W.K. // *Science (New York, N.Y.)* – 2021. – T. 372 – № 6538 – C.eaaw3616.
265. Crigna A.T. Cell-free nucleic acid patterns in disease prediction and monitoring—hype or hope? / Crigna A.T., Samec M., Koklesova L., Liskova A., Giordano F.A., Kubatka P., Golubnitschaja O. // *EPMA Journal* – 2020. – T. 11 – № 4 – C.603–627.
266. Chaddha M. Integrated analysis of circulating cell free nucleic acids for cancer genotyping and immune phenotyping of tumor microenvironment / Chaddha M., Rai H., Gupta R., Thakral D. // *Frontiers in Genetics* – 2023. – T. 14 – C.1138625.
267. Chen H. Cell-Free DNA, MicroRNAs, Proteins, and Peptides as Liquid Biopsy Biomarkers in Prostate Cancer and Bladder Cancer Methods in Molecular Biology // под ред. T. Huang, J. Yang, G. Tian. New York, NY: Springer US, 2023. – 165–179c.

268. Friedman R.C. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs / Friedman R.C., Farh K.K.-H., Burge C.B., Bartel D.P. // *Genome Research* – 2009. – Т. 19 – № 1 – С.92–105.
269. Patil P.A. MicroRNA in prostate cancer: Practical aspects / Patil P.A., Magi-Galluzzi C. // *Histology and Histopathology* – 2015. – Т. 30 – № 12 – С.1379–1396.
270. Li X. Suppression of CX43 expression by miR-20a in the progression of human prostate cancer / Li X., Pan J.-H., Song B., Xiong E.-Q., Chen Z.-W., Zhou Z.-S., Su Y.-P. // *Cancer Biology & Therapy* – 2012. – Т. 13 – № 10 – С.890–898.
271. Shi X.-B. Tumor suppressive miR-124 targets androgen receptor and inhibits proliferation of prostate cancer cells / Shi X.-B., Xue L., Ma A.-H., Tepper C.G., Gandour-Edwards R., Kung H.-J., White R.W. deVere // *Oncogene* – 2013. – Т. 32 – № 35 – С.4130–4138.
272. Kachakova D. Combinations of serum prostate-specific antigen and plasma expression levels of let-7c, miR-30c, miR-141, and miR-375 as potential better diagnostic biomarkers for prostate cancer / Kachakova D., Mitkova A., Popov E., Popov I., Vlahova A., Dikov T., Christova S., Mitev V., Slavov C., Kaneva R. // *DNA and cell biology* – 2015. – Т. 34 – № 3 – С.189–200.
273. Stuopelytė K. Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients / Stuopelytė K., Daniūnaitė K., Jankevičius F., Jarmalaitė S. // *Medicina (Kaunas, Lithuania)* – 2016. – Т. 52 – № 2 – С.116–124.
274. Widschwendter M. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology / Widschwendter M., Jiang G., Woods C., Müller H.M., Fiegl H., Goebel G., Marth C., Müller-Holzner E., Zeimet A.G., Laird P.W., Ehrlich M. // *Cancer Research* – 2004. – Т. 64 – № 13 – С.4472–4480.
275. Chan A.O.-O. CpG Island Methylation in Aberrant Crypt Foci of the Colorectum / Chan A.O.-O., Broaddus R.R., Houlihan P.S., Issa J.-P.J., Hamilton S.R., Rashid A. // *The American Journal of Pathology* – 2002. – Т. 160 – № 5 – С.1823–1830.
276. Plass C. Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer / Plass C., Pfister S.M., Lindroth A.M., Bogatyrova O., Claus R., Lichter P. // *Nature Reviews. Genetics* – 2013. – Т. 14 – № 11 – С.765–780.
277. Shen S.Y. Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes / Shen S.Y., Singhanian R., Fehringer G., Chakravarthy A., Roehrl M.H.A., Chadwick D., Zuzarte P.C., Borgida A., Wang T.T., Li T., Kis O., Zhao Z., Spreafico A., Medina T. da S., Wang Y., Roulois D., Ettayebi I., Chen Z., Chow S., Murphy T., Arruda A., O’Kane G.M., Liu J., Mansour M., McPherson J.D., O’Brien C., Leighl N., Bedard P.L., Fleshner N., Liu G., Minden M.D., Gallinger S., Goldenberg A., Pugh T.J., Hoffman M.M., Bratman S.V., Hung R.J., De Carvalho D.D. // *Nature* – 2018. – Т. 563 – № 7732 – С.579–583.
278. Максимова, В. П. Нарушение метилирования ДНК при злокачественных новообразованиях / Максимова, В. П., Усалка, О. Г., Макусь, Ю. В., Попова, В. Г., Трапезникова, Е. С., Хайриева, Г. И., Сагитова, Г. Р., Жидкова, Е. М., Прус, А. Ю., Якубовская, М. Г., Кирсанов, К. И. // *Успехи молекулярной онкологии* – 2022. – Т. 9 – № 4 – С.24–40.
279. Munteanu V.C. MiRNA-Based Inspired Approach in Diagnosis of Prostate Cancer / Munteanu V.C., Munteanu R.A., Onaciu A., Berindan-Neagoe I., Petrut B., Coman I. // *Medicina* – 2020. – Т. 56 – № 2 – С.94.
280. Brase J.C. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer / Brase J.C., Johannes M., Schlomm T., Fälth M., Haese A., Steuber T., Beissbarth T., Kuner R., Sültmann H. // *International Journal of Cancer* – 2011. – Т. 128 – № 3 – С.608–616.
281. Bryant R.J. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer / Bryant R.J., Pawlowski T., Catto J.W.F., Marsden G., Vessella R.L., Rhee B., Kuslich C., Visakorpi T., Hamdy F.C. // *British Journal of Cancer* – 2012. – Т. 106 – № 4 – С.768–774.

282. Mengual L. Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer / Mengual L., Lozano J.J., Ingelmo-Torres M., Gazquez C., Ribal M.J., Alcaraz A. // *International Journal of Cancer* – 2013. – T. 133 – № 11 – C.2631–2641.
283. Peter M.E. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step / Peter M.E. // *Oncogene* – 2010. – T. 29 – № 15 – C.2161–2164.
284. Kosaka N. Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: «exocure» is another choice for cancer treatment / Kosaka N., Takeshita F., Yoshioka Y., Hagiwara K., Katsuda T., Ono M., Ochiya T. // *Advanced Drug Delivery Reviews* – 2013. – T. 65 – № 3 – C.376–382.
285. Xiao Y.-F. microRNA detection in feces, sputum, pleural effusion and urine: novel tools for cancer screening (Review) / Xiao Y.-F., Yong X., Fan Y.-H., Lü M.-H., Yang S.-M., Hu C.-J. // *Oncology Reports* – 2013. – T. 30 – № 2 – C.535–544.
286. Li M. Genome-wide analysis of microRNA and mRNA expression signatures in cancer / Li M., Fu S., Xiao H. // *Acta Pharmacologica Sinica* – 2015. – T. 36 – № 10 – C.1200–1211.
287. Sharma S. Prostate cancer diagnostics: Clinical challenges and the ongoing need for disruptive and effective diagnostic tools / Sharma S., Zapatero-Rodríguez J., O’Kennedy R. // *Biotechnology Advances* – 2017. – T. 35 – № 2 – C.135–149.
288. Coffey R.N.T. SIGNALING FOR THE CASPASES: THEIR ROLE IN PROSTATE CELL APOPTOSIS / Coffey R.N.T., Watson R.W.G., Fitzpatrick J.M. // *Journal of Urology* – 2001. – T. 165 – № 1 – C.5–14.
289. Shi X.-B. miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes / Shi X.-B., Xue L., Ma A.-H., Tepper C.G., Kung H.-J., White R.W. deVere // *The Prostate* – 2011. – T. 71 – № 5 – C.538–549.
290. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death / Elmore S. // *Toxicologic Pathology* – 2007. – T. 35 – № 4 – C.495–516.
291. Hakimi J.M. Androgen-receptor gene structure and function in prostate cancer / Hakimi J.M., Rondinelli R.H., Schoenberg M.P., Barrack E.R. // *World Journal of Urology* – 1996. – T. 14 – № 5 – C.329–337.
292. Yuan X. Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis / Yuan X., Cai C., Chen S., Chen S., Yu Z., Balk S.P. // *Oncogene* – 2014. – T. 33 – № 22 – C.2815–2825.
293. Huggins C. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate / Huggins C., Hodges C.V. // *CA: a cancer journal for clinicians* – 1972. – T. 22 – № 4 – C.232–240.
294. Kimura K. Androgen blocks apoptosis of hormone-dependent prostate cancer cells / Kimura K., Markowski M., Bowen C., Gelmann E.P. // *Cancer Research* – 2001. – T. 61 – № 14 – C.5611–5618.
295. Kashat M. Inactivation of AR and Notch-1 signaling by miR-34a attenuates prostate cancer aggressiveness / Kashat M., Azzouz L., Sarkar S.H., Kong D., Li Y., Sarkar F.H. // *American Journal of Translational Research* – 2012. – T. 4 – № 4 – C.432–442.
296. Lin P.-C. Epigenetic repression of miR-31 disrupts androgen receptor homeostasis and contributes to prostate cancer progression / Lin P.-C., Chiu Y.-L., Banerjee S., Park K., Mosquera J.M., Giannopoulou E., Alves P., Tewari A.K., Gerstein M.B., Beltran H., Melnick A.M., Elemento O., Demichelis F., Rubin M.A. // *Cancer Research* – 2013. – T. 73 – № 3 – C.1232–1244.
297. Nadiminty N. MicroRNA let-7c suppresses androgen receptor expression and activity via regulation of Myc expression in prostate cancer cells / Nadiminty N., Tummala R., Lou W., Zhu Y., Zhang J., Chen X.,

- White R.W. eVere, Kung H.-J., Evans C.P., Gao A.C. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2012. – T. 287 – № 2 – C.1527–1537.
298. Sikand K. miR 488* inhibits androgen receptor expression in prostate carcinoma cells / Sikand K., Slaibi J.E., Singh R., Slane S.D., Shukla G.C. // *International Journal of Cancer* – 2011. – T. 129 – № 4 – C.810–819.
299. Wang C. Tumor-suppressive microRNA-145 induces growth arrest by targeting SENP1 in human prostate cancer cells / Wang C., Tao W., Ni S., Chen Q., Zhao Z., Ma L., Fu Y., Jiao Z. // *Cancer Science* – 2015. – T. 106 – № 4 – C.375–382.
300. Lukacs R.U. Bmi-1 is a crucial regulator of prostate stem cell self-renewal and malignant transformation / Lukacs R.U., Memarzadeh S., Wu H., Witte O.N. // *Cell Stem Cell* – 2010. – T. 7 – № 6 – C.682–693.
301. Jin M. miRNA-128 suppresses prostate cancer by inhibiting BMI-1 to inhibit tumor-initiating cells / Jin M., Zhang T., Liu C., Badeaux M.A., Liu B., Liu R., Jeter C., Chen X., Vlassov A.V., Tang D.G. // *Cancer Research* – 2014. – T. 74 – № 15 – C.4183–4195.
302. Cao Q. Coordinated Regulation of Polycomb Group Complexes through microRNAs in Cancer / Cao Q., Mani R.-S., Ateeq B., Dhanasekaran S.M., Asangani I.A., Prensner J.R., Kim J.H., Brenner J.C., Jing X., Cao X., Wang R., Li Y., Dahiya A., Wang L., Pandhi M., Lonigro R.J., Wu Y.-M., Tomlins S.A., Palanisamy N., Qin Z., Yu J., Maher C.A., Varambally S., Chinnaiyan A.M. // *Cancer Cell* – 2011. – T. 20 – № 2 – C.187–199.
303. Crea F. BMI1 silencing enhances docetaxel activity and impairs antioxidant response in prostate cancer / Crea F., Duhagon Serrat M.A., Hurt E.M., Thomas S.B., Danesi R., Farrar W.L. // *International Journal of Cancer* – 2011. – T. 128 – № 8 – C.1946–1954.
304. Zarif J.C. The importance of non-nuclear AR signaling in prostate cancer progression and therapeutic resistance / Zarif J.C., Miranti C.K. // *Cellular Signalling* – 2016. – T. 28 – № 5 – C.348–356.
305. Misso G. Mir-34: a new weapon against cancer? / Misso G., Di Martino M.T., De Rosa G., Farooqi A.A., Lombardi A., Campani V., Zarone M.R., Gullà A., Tagliaferri P., Tassone P., Caraglia M. // *Molecular Therapy. Nucleic Acids* – 2014. – T. 3 – № 9 – C.e194.
306. Östling P. Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells / Östling P., Leivonen S.-K., Aakula A., Kohonen P., Mäkelä R., Hagman Z., Edsjö A., Kangaspeska S., Edgren H., Nicorici D., Bjartell A., Ceder Y., Perälä M., Kallioniemi O. // *Cancer Research* – 2011. – T. 71 – № 5 – C.1956–1967.
307. Corcoran C. miR-34a is an intracellular and exosomal predictive biomarker for response to docetaxel with clinical relevance to prostate cancer progression / Corcoran C., Rani S., O'Driscoll L. // *The Prostate* – 2014. – T. 74 – № 13 – C.1320–1334.
308. Samsonov R. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic / Samsonov R., Shtam T., Burdakov V., Glotov A., Tsyrlina E., Bernstein L., Nosov A., Evtushenko V., Filatov M., Malek A. // *The Prostate* – 2016. – T. 76 – № 1 – C.68–79.
309. Shin H.J. Recent advances in understanding DNA methylation of prostate cancer / Shin H.J., Hua J.T., Li H. // *Frontiers in Oncology* – 2023. – T. 13 – C.1182727.
310. Wu T. Measurement of GSTP1 promoter methylation in body fluids may complement PSA screening: a meta-analysis / Wu T., Giovannucci E., Welge J., Mallick P., Tang W.-Y., Ho S.-M. // *British Journal of Cancer* – 2011. – T. 105 – № 1 – C.65–73.
311. Ye J. Glutathione-S-Transferase p 1 Gene Promoter Methylation in Cell-Free DNA as a Diagnostic and Prognostic Tool for Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / Ye J., Wu M., He L., Chen P., Liu H., Yang H. // *International Journal of Endocrinology* – 2023. – T. 2023 – C.1–9.

312. Constâncio V. DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types / Constâncio V., Nunes S.P., Henrique R., Jerónimo C. // *Cells* – 2020. – T. 9 – № 3 – C.624.
313. Cortese R. Epigenetic markers of prostate cancer in plasma circulating DNA / Cortese R., Kwan A., Lalonde E., Bryzgunova O., Bondar A., Wu Y., Gordevicius J., Park M., Oh G., Kaminsky Z., Tverkuviene J., Laurinavicius A., Jankevicius F., Sendorek D.H.S., Haider S., Wang S.-C., Jarmalaite S., Laktionov P., Boutros P.C., Petronis A. // *Human Molecular Genetics* – 2012. – T. 21 – № 16 – C.3619–3631.
314. Warren J.D. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer / Warren J.D., Xiong W., Bunker A.M., Vaughn C.P., Furtado L.V., Roberts W.L., Fang J.C., Samowitz W.S., Heichman K.A. // *BMC medicine* – 2011. – T. 9 – C.133.
315. Schmidt B. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates / Schmidt B., Liebenberg V., Dietrich D., Schlegel T., Kneip C., Seegebarth A., Flemming N., Seemann S., Distler J., Lewin J., Tetzner R., Weickmann S., Wille U., Liloglou T., Raji O., Walshaw M., Fleischhacker M., Witt C., Field J.K. // *BMC cancer* – 2010. – T. 10 – C.600.
316. Krausewitz P. Early Dynamics of Quantitative SEPT9 and SHOX2 Methylation in Circulating Cell-Free Plasma DNA during Prostate Biopsy for Prostate Cancer Diagnosis / Krausewitz P., Kluemper N., Richter A.-P., Büttner T., Kristiansen G., Ritter M., Ellinger J. // *Cancers* – 2022. – T. 14 – № 18 – C.4355.
317. Sun K. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments / Sun K., Jiang P., Chan K.C.A., Wong J., Cheng Y.K.Y., Liang R.H.S., Chan W., Ma E.S.K., Chan S.L., Cheng S.H., Chan R.W.Y., Tong Y.K., Ng S.S.M., Wong R.S.M., Hui D.S.C., Leung T.N., Leung T.Y., Lai P.B.S., Chiu R.W.K., Lo Y.M.D. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2015. – T. 112 – № 40 – C.E5503-5512.
318. Korshunova Y. Massively parallel bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA / Korshunova Y., Maloney R.K., Lakey N., Citek R.W., Bacher B., Budiman A., Ordway J.M., McCombie W.R., Leon J., Jeddeloh J.A., McPherson J.D. // *Genome Research* – 2008. – T. 18 – № 1 – C.19–29.
319. Mikeska T. The implications of heterogeneous DNA methylation for the accurate quantification of methylation / Mikeska T., Candiloro I.L., Dobrovic A. // *Epigenomics* – 2010. – T. 2 – № 4 – C.561–573.
320. Affinito O. Modeling DNA methylation by analyzing the individual configurations of single molecules / Affinito O., Scala G., Palumbo D., Florio E., Monticelli A., Miele G., Avvedimento V.E., Usiello A., Chiariotti L., Coccozza S. // *Epigenetics* – 2016. – T. 11 – № 12 – C.881–888.
321. Ricketts C.J. Intratumoral heterogeneity in kidney cancer / Ricketts C.J., Linehan W.M. // *Nature Genetics* – 2014. – T. 46 – № 3 – C.214–215.
322. Gerashchenko T.S. Intratumor heterogeneity: Nature and biological significance / Gerashchenko T.S., Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova M.V., Vtorushin S.V., Tsyganov M.M., Perelmuter V.M., Cherdyntseva N.V. // *Biochemistry (Moscow)* – 2013. – T. 78 – № 11 – C.1201–1215.
323. Cheow L.F. Single-cell multimodal profiling reveals cellular epigenetic heterogeneity / Cheow L.F., Courtois E.T., Tan Y., Viswanathan R., Xing Q., Tan R.Z., Tan D.S.W., Robson P., Loh Y.-H., Quake S.R., Burkholder W.F. // *Nature Methods* – 2016. – T. 13 – № 10 – C.833–836.
324. Sheffield N.C. DNA methylation heterogeneity defines a disease spectrum in Ewing sarcoma / Sheffield N.C., Pierron G., Klughammer J., Datlinger P., Schönegger A., Schuster M., Hadler J., Surdez D., Guillemot D., Lapouble E., Freneaux P., Champigneulle J., Bouvier R., Walder D., Ambros I.M., Hutter C., Sorz E., Amaral A.T., Álava E. de, Schallmoser K., Strunk D., Rinner B., Liegl-Atzwanger B., Huppertz B., Leithner A., Pinieux G. de, Terrier P., Laurence V., Michon J., Ladenstein R., Holter W., Windhager R., Dirksen U., Ambros P.F., Delattre O., Kovar H., Bock C., Tomazou E.M. // *Nature Medicine* – 2017. – T. 23 – № 3 – C.386–395.

325. Kerjean A. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis / Kerjean A., Dupont J.M., Vasseur C., Le Tessier D., Cuisset L., Paldi A., Jouannet P., Jeanpierre M. // *Human Molecular Genetics* – 2000. – T. 9 – № 14 – C.2183–2187.
326. Liu M.C. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA / Liu M.C., Oxnard G.R., Klein E.A., Swanton C., Seiden M.V., CCGA Consortium // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* – 2020. – T. 31 – № 6 – C.745–759.
327. Zuo T. Methods In Dna Methylation Profiling / Zuo T., Tycko B., Liu T.-M., Lin H.-J.L., Huang T.H.-M. // *Epigenomics* – 2009. – T. 1 – № 2 – C.331–345.
328. Vaart M. van der Is the role of circulating DNA as a biomarker of cancer being prematurely overrated? / Vaart M. van der, Pretorius P.J. // *Clinical Biochemistry* – 2010. – T. 43 – № 1–2 – C.26–36.
329. Diehl F. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors / Diehl F., Li M., Dressman D., He Y., Shen D., Szabo S., Diaz L.A., Goodman S.N., David K.A., Juhl H., Kinzler K.W., Vogelstein B. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2005. – T. 102 – № 45 – C.16368–16373.
330. Warnecke P.M. Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing / Warnecke P.M., Stirzaker C., Song J., Grunau C., Melki J.R., Clark S.J. // *Methods (San Diego, Calif.)* – 2002. – T. 27 – № 2 – C.101–107.
331. Sohel M.H. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges / Sohel M.H. // *Achievements in the Life Sciences* – 2016. – T. 10 – № 2 – C.175–186.
332. Zhao C. Biogenesis and function of extracellular miRNAs / Zhao C., Sun X., Li L. // *ExRNA* – 2019. – T. 1 – № 1 – C.38.
333. Silva S.S. Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? / Silva S.S., Lopes C., Teixeira A.L., Carneiro de Sousa M.J., Medeiros R. // *Forensic Science International. Genetics* – 2015. – T. 14 – C.1–10.
334. Pritchard C.C. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies / Pritchard C.C., Kroh E., Wood B., Arroyo J.D., Dougherty K.J., Miyaji M.M., Tait J.F., Tewari M. // *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)* – 2012. – T. 5 – № 3 – C.492–497.
335. Landoni E. Proposal of supervised data analysis strategy of plasma miRNAs from hybridisation array data with an application to assess hemolysis-related deregulation / Landoni E., Miceli R., Callari M., Tiberio P., Appierto V., Angeloni V., Mariani L., Daidone M.G. // *BMC Bioinformatics* – 2015. – T. 16 – № 1 – C.388.
336. Kirschner M.B. The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers / Kirschner M.B., Edelman J.J.B., Kao S.C.-H., Vallety M.P., Zandwijk N. van, Reid G. // *Frontiers in Genetics* – 2013. – T. 4 – C.94.
337. Blondal T. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids / Blondal T., Jensby Nielsen S., Baker A., Andreasen D., Mouritzen P., Wrang Teilum M., Dahlsveen I.K. // *Methods* – 2013. – T. 59 – № 1 – C.S1–S6.
338. Skoberne A. Glomerular epithelial cells in the urine: what has to be done to make them worthwhile? / Skoberne A., Konieczny A., Schiffer M. // *American Journal of Physiology. Renal Physiology* – 2009. – T. 296 – № 2 – C.F230–241.
339. Theda C. Quantitation of the cellular content of saliva and buccal swab samples / Theda C., Hwang S.H., Czajko A., Loke Y.J., Leong P., Craig J.M. // *Scientific Reports* – 2018. – T. 8 – № 1 – C.6944.
340. The Common Cell Types of Cerebrospinal Fluid Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. – 9–23c.

341. Tiberio P. Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers / Tiberio P., Callari M., Angeloni V., Daidone M.G., Appierto V. // *BioMed Research International* – 2015. – T. 2015 – C.731479.
342. Cheng H.H. Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels / Cheng H.H., Yi H.S., Kim Y., Kroh E.M., Chien J.W., Eaton K.D., Goodman M.T., Tait J.F., Tewari M., Pritchard C.C. // *PLoS ONE* – 2013. – T. 8 – № 6 – C.e64795.
343. Becker N. Pre-analytical variables in miRNA analysis / Becker N., Lockwood C.M. // *Clinical Biochemistry* – 2013. – T. 46 – № 10–11 – C.861–868.
344. Martínez-Fernández M. RNA Detection in Urine: From RNA Extraction to Good Normalizer Molecules / Martínez-Fernández M., Paramio J.M., Dueñas M. // *The Journal of molecular diagnostics: JMD* – 2016. – T. 18 – № 1 – C.15–22.
345. Mall C. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential / Mall C., Rocke D.M., Durbin-Johnson B., Weiss R.H. // *Biomarkers in Medicine* – 2013. – T. 7 – № 4 – C.623–631.
346. Ge Q. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions / Ge Q., Zhou Y., Lu J., Bai Y., Xie X., Lu Z. // *Molecules (Basel, Switzerland)* – 2014. – T. 19 – № 2 – C.1568–1575.
347. Blanco, A. Blood plasma proteins / Blanco, A., Blanco, G. // *Medical Biochemistry* – 2017. – C.21–71.
348. Rose C. The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology / Rose C., Parker A., Jefferson B., Cartmell E. // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* – 2015. – T. 45 – № 17 – C.1827–1879.
349. Zhang N. Protocols for the Analysis of microRNA Expression, Biogenesis, and Function in Immune Cells / Zhang N., Hu G., Myers T.G., Williamson P.R. // *Current Protocols in Immunology* – 2019. – T. 126 – № 1 – C.e78.
350. Monleau M. Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells / Monleau M., Bonnel S., Gostan T., Blanchard D., Courgnaud V., Lecellier C.-H. // *BMC genomics* – 2014. – T. 15 – № 1 – C.395.
351. Record M. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiology / Record M., Carayon K., Poirot M., Silvente-Poirot S. // *Biochimica Et Biophysica Acta* – 2014. – T. 1841 – № 1 – C.108–120.
352. Niel G. van Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles / Niel G. van, D'Angelo G., Raposo G. // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* – 2018. – T. 19 – № 4 – C.213–228.
353. Frey B. The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles / Frey B., Gaip U.S. // *Seminars in Immunopathology* – 2011. – T. 33 – № 5 – C.497–516.
354. Kastelowitz N. Exosomes and microvesicles: identification and targeting by particle size and lipid chemical probes / Kastelowitz N., Yin H. // *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* – 2014. – T. 15 – № 7 – C.923–928.
355. Moldovan L. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers / Moldovan L., Batte K.E., Trgovcich J., Wisler J., Marsh C.B., Piper M. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine* – 2014. – T. 18 – № 3 – C.371–390.
356. Chomczynski P. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on / Chomczynski P., Sacchi N. // *Nature Protocols* – 2006. – T. 1 – № 2 – C.581–585.
357. Chomzynski P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction / Chomzynski P. // *Analytical Biochemistry* – 1987. – T. 162 – № 1 – C.156–159.

358. McAlexander M.A. Comparison of Methods for miRNA Extraction from Plasma and Quantitative Recovery of RNA from Cerebrospinal Fluid / McAlexander M.A., Phillips M.J., Witwer K.W. // *Frontiers in Genetics* – 2013. – T. 4.
359. Hu W.-P. Improve sample preparation process for miRNA isolation from the culture cells by using silica fiber membrane / Hu W.-P., Chen Y.-C., Chen W.-Y. // *Scientific Reports* – 2020. – T. 10 – № 1 – C.21132.
360. El-Khoury V. Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material / El-Khoury V., Pierson S., Kaoma T., Bernardin F., Berchem G. // *Scientific Reports* – 2016. – T. 6 – № 1 – C.19529.
361. Kim Y.-K. Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells / Kim Y.-K., Yeo J., Kim B., Ha M., Kim V.N. // *Molecular Cell* – 2012. – T. 46 – № 6 – C.893–895.
362. Vlasov V.V. [Circulating microRNAs in lung cancer: prospects for diagnostics, prognosis and prediction of antitumor treatment efficiency] / Vlasov V.V., Rykova E.I., Ponomareva A.A., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Cherdynseva N.V., Laktionov P.P. // *Molekuliarnaiia Biologiia* – 2015. – T. 49 – № 1 – C.55–66.
363. Laurent L.C. Meeting report: discussions and preliminary findings on extracellular RNA measurement methods from laboratories in the NIH Extracellular RNA Communication Consortium / Laurent L.C., Abdel-Mageed A.B., Adelson P.D., Arango J., Balaj L., Breakefield X., Carlson E., Carter B.S., Majem B., Chen C.C., Cocucci E., Danielson K., Courtright A., Das S., Abd Elmageed Z.Y., Enderle D., Ezrin A., Ferrer M., Freedman J., Galas D., Gandhi R., Huentelman M.J., Van Keuren-Jensen K., Kalani Y., Kim Y., Krichevsky A.M., Lai C., Lal-Nag M., Laurent C.D., Leonardo T., Li F., Malenica I., Mondal D., Nejad P., Patel T., Raffai R.L., Rubio R., Skog J., Spetzler R., Sun J., Tanriverdi K., Vickers K., Wang L., Wang Y., Wei Z., Weiner H.L., Wong D., Yan I.K., Yeri A., Gould S. // *Journal of Extracellular Vesicles* – 2015. – T. 4 – C.26533.
364. Turchinovich A. Isolation of circulating microRNA associated with RNA-binding protein / Turchinovich A., Weiz L., Burwinkel B. // *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) – 2013. – T. 1024 – C.97–107.
365. Kroh E.M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) / Kroh E.M., Parkin R.K., Mitchell P.S., Tewari M. // *Methods* (San Diego, Calif.) – 2010. – T. 50 – № 4 – C.298–301.
366. Fichtlscherer S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease / Fichtlscherer S., De Rosa S., Fox H., Schwietz T., Fischer A., Liebetrau C., Weber M., Hamm C.W., Röxe T., Müller-Ardogan M., Bonauer A., Zeiher A.M., Dimmeler S. // *Circulation Research* – 2010. – T. 107 – № 5 – C.677–684.
367. Page K. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids / Page K., Guttery D.S., Zahra N., Primrose L., Elshaw S.R., Pringle J.H., Blighe K., Marchese S.D., Hills A., Woodley L., Stebbing J., Coombes R.C., Shaw J.A. // *PloS One* – 2013. – T. 8 – № 10 – C.e77963.
368. Moret I. Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction / Moret I., Sánchez-Izquierdo D., Iborra M., Tortosa L., Navarro-Puche A., Nos P., Cervera J., Beltrán B. // *PloS One* – 2013. – T. 8 – № 12 – C.e82753.
369. Sourvinou I.S. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability / Sourvinou I.S., Markou A., Lianidou E.S. // *The Journal of molecular diagnostics: JMD* – 2013. – T. 15 – № 6 – C.827–834.
370. Häntzsch M. Comparison of whole blood RNA preservation tubes and novel generation RNA extraction kits for analysis of mRNA and MiRNA profiles / Häntzsch M., Tolios A., Beutner F., Nagel D., Thiery J., Teupser D., Holdt L.M. // *PloS One* – 2014. – T. 9 – № 12 – C.e113298.
371. Brunet-Vega A. Variability in microRNA recovery from plasma: Comparison of five commercial kits / Brunet-Vega A., Pericay C., Quílez M.E., Ramírez-Lázaro M.J., Calvet X., Lario S. // *Analytical Biochemistry* – 2015. – T. 488 – C.28–35.

372. Tan G.W. Evaluation of extraction kits and RT-qPCR systems adapted to high-throughput platform for circulating miRNAs / Tan G.W., Khoo A.S.B., Tan L.P. // *Scientific Reports* – 2015. – T. 5 – C.9430.
373. Meerson A. Assessment of six commercial plasma small RNA isolation kits using qRT-PCR and electrophoretic separation: higher recovery of microRNA following ultracentrifugation / Meerson A., Ploug T. // *Biology Methods & Protocols* – 2016. – T. 1 – № 1 – C.bpw003.
374. Guo Y. Comprehensive evaluation of extracellular small RNA isolation methods from serum in high throughput sequencing / Guo Y., Vickers K., Xiong Y., Zhao S., Sheng Q., Zhang P., Zhou W., Flynn C.R. // *BMC genomics* – 2017. – T. 18 – № 1 – C.50.
375. Ramón-Núñez L.A. Comparison of protocols and RNA carriers for plasma miRNA isolation. Unraveling RNA carrier influence on miRNA isolation / Ramón-Núñez L.A., Martos L., Fernández-Pardo Á., Oto J., Medina P., España F., Navarro S. // *PloS One* – 2017. – T. 12 – № 10 – C.e0187005.
376. Jimenez L.A. Extraction of microRNAs from biological matrices with titanium dioxide nanofibers / Jimenez L.A., Gionet-Gonzales M.A., Sedano S., Carballo J.G., Mendez Y., Zhong W. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry* – 2018. – T. 410 – № 3 – C.1053–1060.
377. Wong R.K.Y. A comparison of RNA extraction and sequencing protocols for detection of small RNAs in plasma / Wong R.K.Y., MacMahon M., Woodside J.V., Simpson D.A. // *BMC genomics* – 2019. – T. 20 – № 1 – C.446.
378. Trakunram K. MicroRNA Isolation by Trizol-Based Method and Its Stability in Stored Serum and cDNA Derivatives / Trakunram K., Champoochana N., Chaniad P., Thongsuksai P., Raungrut P. // *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* – 2019. – T. 20 – № 6 – C.1641–1647.
379. Srinivasan S. Small RNA Sequencing across Diverse Biofluids Identifies Optimal Methods for exRNA Isolation / Srinivasan S., Yeri A., Cheah P.S., Chung A., Danielson K., De Hoff P., Filant J., Laurent C.D., Laurent L.D., Magee R., Moeller C., Murthy V.L., Nejad P., Paul A., Rigoutsos I., Rodosthenous R., Shah R.V., Simonson B., To C., Wong D., Yan I.K., Zhang X., Balaj L., Breakefield X.O., Daaboul G., Gandhi R., Lapidus J., Londin E., Patel T., Raffai R.L., Sood A.K., Alexander R.P., Das S., Laurent L.C. // *Cell* – 2019. – T. 177 – № 2 – C.446–462.e16.
380. Li K. Isolation of Plasma Lipoproteins as a Source of Extracellular RNA / Li K., Wong D.K., Luk F.S., Kim R.Y., Raffai R.L. // *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* – 2018. – T. 1740 – C.139–153.
381. Bryzgunova O. A reliable method to concentrate circulating DNA / Bryzgunova O., Bondar A., Morozkin E., Mileyko V., Vlassov V., Laktionov P. // *Analytical Biochemistry* – 2011. – T. 408 – № 2 – C.354–356.
382. Parker V.L. Comparison and optimisation of microRNA extraction from the plasma of healthy pregnant women / Parker V.L., Cushen B.F., Gavriil E., Marshall B., Waite S., Pacey A., Heath P.R. // *Molecular Medicine Reports* – 2021. – T. 23 – № 4 – C.1.
383. Rice J. Assay reproducibility in clinical studies of plasma miRNA / Rice J., Roberts H., Burton J., Pan J., States V., Rai S.N., Galandiuk S. // *PloS One* – 2015. – T. 10 – № 4 – C.e0121948.
384. Ban E. An improvement of miRNA extraction efficiency in human plasma / Ban E., Chae D.-K., Yoo Y.S., Song E.J. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry* – 2017. – T. 409 – № 27 – C.6397–6404.
385. He M. Microfluidic Exosome Analysis toward Liquid Biopsy for Cancer / He M., Zeng Y. // *Journal of Laboratory Automation* – 2016. – T. 21 – № 4 – C.599–608.
386. Salim B. Microfluidic device for novel breast cancer screening by blood test using miRNA beacon probe / Salim B., Athira M.V., Kandaswamy A., Vijayakumar M., Saravanan T., Sairam T. // *Biomedical Microdevices* – 2017. – T. 19 – № 4 – C.89.
387. Extracellular RNA // под ред. Т. Patel. – New York, NY: Springer New York, 2018.

388. Mestdagh P. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study / Mestdagh P., Hartmann N., Baeriswyl L., Andreasen D., Bernard N., Chen C., Cheo D., D'Andrade P., DeMayo M., Dennis L., Derveaux S., Feng Y., Fulmer-Smentek S., Gerstmayer B., Gouffon J., Grimley C., Lader E., Lee K.Y., Luo S., Mouritzen P., Narayanan A., Patel S., Peiffer S., Rüberg S., Schroth G., Schuster D., Shaffer J.M., Shelton E.J., Silveria S., Ulmanella U., Veeramachaneni V., Staedtler F., Peters T., Guettouche T., Wong L., Vandesompele J. // *Nature Methods* – 2014. – Т. 11 – № 8 – С.809–815.
389. Pritchard C.C. MicroRNA profiling: approaches and considerations / Pritchard C.C., Cheng H.H., Tewari M. // *Nature Reviews. Genetics* – 2012. – Т. 13 – № 5 – С.358–369.
390. Castoldi M. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA) / Castoldi M., Schmidt S., Benes V., Noerholm M., Kulozik A.E., Hentze M.W., Muckenthaler M.U. // *RNA* – 2006. – Т. 12 – № 5 – С.913–920.
391. miRCURY LNA miRNA SYBR® Green PCR Handbook / – QIAGEN, 2019.
392. GeneChip miRNA 2.0 Array / – Thermo Fisher Scientific Inc.
393. The Agilent Human miRNA Microarray / – , 2015. Вып. Agilent Technologies.
394. miScript® miRNA PCR Array Handbook / – QIAGEN, 2018.
395. Hafner M. RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries / Hafner M., Renwick N., Brown M., Mihailović A., Holoch D., Lin C., Pena J.T.G., Nusbaum J.D., Morozov P., Ludwig J., Ojo T., Luo S., Schroth G., Tuschl T. // *RNA (New York, N.Y.)* – 2011. – Т. 17 – № 9 – С.1697–1712.
396. Jensen S.G. Evaluation of two commercial global miRNA expression profiling platforms for detection of less abundant miRNAs / Jensen S.G., Lamy P., Rasmussen M.H., Ostenfeld M.S., Dyrskjød L., Orntoft T.F., Andersen C.L. // *BMC genomics* – 2011. – Т. 12 – С.435.
397. Forero D.A. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs / Forero D.A., González-Giraldo Y., Castro-Vega L.J., Barreto G.E. // *BioTechniques* – 2019. – Т. 67 – № 4 – С.192–199.
398. Коробкина, Е. А. Сравнительный анализ методов детекции микроРНК с помощью метода обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) / Коробкина, Е. А., Князева, М. С., Киль, Ю. В., Титов, С. Е., Малек, А. В. // *Клиническая лабораторная диагностика* – 2018. – Т. 63 – С.722–728.
399. Chen C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR / Chen C. // *Nucleic Acids Research* – 2005. – Т. 33 – № 20 – С.e179–e179.
400. Kutuyavin I.V. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures / Kutuyavin I.V. // *Nucleic Acids Research* – 2000. – Т. 28 – № 2 – С.655–661.
401. Yao Y. Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification / Yao Y., Nellåker C., Karlsson H. // *Molecular and Cellular Probes* – 2006. – Т. 20 – № 5 – С.311–316.
402. Lao K. Real time PCR profiling of 330 human micro-RNAs / Lao K., Xu N.L., Sun Y.A., Livak K.J., Straus N.A. // *Biotechnology Journal* – 2007. – Т. 2 – № 1 – С.33–35.
403. Dellett M. Considerations for optimization of microRNA PCR assays for molecular diagnosis / Dellett M., Simpson D.A. // *Expert Review of Molecular Diagnostics* – 2016. – Т. 16 – № 4 – С.407–414.
404. D'haene B. miRNA Expression Profiling: From Reference Genes to Global Mean Normalization Methods in Molecular Biology // под ред. J.-B. Fan. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. – 261–272с.

405. Livak K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods* (San Diego, Calif.) – 2001. – T. 25 – № 4 – C.402–408.
406. Shen Q. Different Normalization Strategies Might Cause Inconsistent Variation in Circulating microRNAs in Patients with Hepatocellular Carcinoma / Shen Q. // *Medical Science Monitor* – 2015. – T. 21 – C.617–624.
407. Madadi S. MicroRNA expression studies: challenge of selecting reliable reference controls for data normalization / Madadi S., Schwarzenbach H., Lorenzen J., Soleimani M. // *Cellular and Molecular Life Sciences* – 2019. – T. 76 – № 18 – C.3497–3514.
408. Li Y. Identification of Endogenous Controls for Analyzing Serum Exosomal miRNA in Patients with Hepatitis B or Hepatocellular Carcinoma / Li Y., Zhang L., Liu F., Xiang G., Jiang D., Pu X. // *Disease Markers* – 2015. – T. 2015 – C.1–12.
409. Montani F. miR-Test: A Blood Test for Lung Cancer Early Detection / Montani F., Marzi M.J., Dezi F., Dama E., Carletti R.M., Bonizzi G., Bertolotti R., Bellomi M., Rampinelli C., Maisonneuve P., Spaggiari L., Veronesi G., Nicassio F., Di Fiore P.P., Bianchi F. // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* – 2015. – T. 107 – № 6.
410. Ni Q. Different signatures of miR-16, miR-30b and miR-93 in exosomes from breast cancer and DCIS patients / Ni Q., Stevic I., Pan C., Müller V., Oliveira-Ferrer L., Pantel K., Schwarzenbach H. // *Scientific Reports* – 2018. – T. 8 – № 1 – C.12974.
411. Zandberga E. Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer / Zandberga E., Kozirovskis V., Ābols A., Andrējeva D., Purkalne G., Linē A. // *Genes, Chromosomes and Cancer* – 2013. – T. 52 – № 4 – C.356–369.
412. Boeri M. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer / Boeri M., Verri C., Conte D., Roz L., Modena P., Facchinetti F., Calabrò E., Croce C.M., Pastorino U., Sozzi G. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2011. – T. 108 – № 9 – C.3713–3718.
413. Qin D. Predict Colon Cancer by Pairing Plasma miRNAs: Establishment of a Normalizer-Free, Cross-Platform Model / Qin D., Guo Q., Wei R., Liu S., Zhu S., Zhang S., Min L. // *Frontiers in Oncology* – 2021. – T. 11 – C.561763.
414. Deng Y. Ratio-Based Method To Identify True Biomarkers by Normalizing Circulating ncRNA Sequencing and Quantitative PCR Data / Deng Y., Zhu Y., Wang H., Khadka V.S., Hu L., Ai J., Dou Y., Li Y., Dai S., Mason C.E., Wang Y., Jia W., Zhang J., Huang G., Jiang B. // *Analytical Chemistry* – 2019. – T. 91 – № 10 – C.6746–6753.
415. Davis G.L. Detection of circulating dna by counterimmunoelectrophoresis (cie) / Davis G.L., Davis Iv J.S. // *Arthritis & Rheumatism* – 1973. – T. 16 – № 1 – C.52–58.
416. Shapiro B. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease / Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E.M., Leon S.A. // *Cancer* – 1983. – T. 51 – № 11 – C.2116–2120.
417. Killeen A.A. Quantification of nucleic acids / Killeen A.A. // *Clinics in Laboratory Medicine* – 1997. – T. 17 – № 1 – C.1–19.
418. Stroun M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients / Stroun M., Anker P., Maurice P., Lyautey J., Lederrey C., Beljanski M. // *Oncology* – 1989. – T. 46 – № 5 – C.318–322.
419. Boom R. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., Noordaa J. van der // *Journal of Clinical Microbiology* – 1990. – T. 28 – № 3 – C.495–503.

420. Diefenbach R.J. Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA / Diefenbach R.J., Lee J.H., Kefford R.F., Rizos H. // *Cancer Genetics* – 2018. – T. 228–229 – C.21–27.
421. Malentacchi F. Influence of storage conditions and extraction methods on the quantity and quality of circulating cell-free DNA (ccfDNA): the SPIDIA-DNAplas External Quality Assessment experience / Malentacchi F., Pizzamiglio S., Verderio P., Pazzagli M., Orlando C., Ciniselli C.M., Günther K., Gelmini S. // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* – 2015. – T. 53 – № 12 – C.1935–1942.
422. Malentacchi F. Second SPIDIA-DNA External Quality Assessment (EQA): Influence of pre-analytical phase of blood samples on genomic DNA quality / Malentacchi F., Pizzamiglio S., Ibrahim-Gawel H., Pazzagli M., Verderio P., Ciniselli C.M., Wyrich R., Gelmini S. // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* – 2016. – T. 454 – C.10–14.
423. Vu B.V. Recovery of Small DNA Fragments from Serum Using Compaction Precipitation / Vu B.V., Anthony K.L., Strych U., Willson R.C. // *PLoS ONE* – 2012. – T. 7 – № 12 – C.e51863.
424. Thijssen M.A.M.A. Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases / Thijssen M.A.M.A., Swinkels D.W., Ruers T.J.M., Kok J.B. de // *Anticancer Research* – 2002. – T. 22 – № 1A – C.421–425.
425. Silva J.M. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations / Silva J.M., Dominguez G., Garcia J.M., Gonzalez R., Villanueva M.J., Navarro F., Provencio M., San Martin S., España P., Bonilla F. // *Cancer Research* – 1999. – T. 59 – № 13 – C.3251–3256.
426. Xue X. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum / Xue X., Teare M.D., Holen I., Zhu Y.M., Woll P.J. // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* – 2009. – T. 404 – № 2 – C.100–104.
427. Yuan H. A modified extraction method of circulating free DNA for epidermal growth factor receptor mutation analysis / Yuan H., Zhu Z.-Z., Lu Y., Liu F., Zhang W., Huang G., Zhu G., Jiang B. // *Yonsei Medical Journal* – 2012. – T. 53 – № 1 – C.132–137.
428. Breadmore M.C. Microchip-Based Purification of DNA from Biological Samples / Breadmore M.C., Wolfe K.A., Arcibal I.G., Leung W.K., Dickson D., Giordano B.C., Power M.E., Ferrance J.P., Feldman S.H., Norris P.M., Landers J.P. // *Analytical Chemistry* – 2003. – T. 75 – № 8 – C.1880–1886.
429. Enko D. Plasma free DNA: Evaluation of temperature-associated storage effects observed for Roche Cell-Free DNA collection tubes / Enko D., Halwachs-Baumann G., Kriegshäuser G. // *Biochemia medica* – 2019. – T. 29 – № 1 – C.153–156.
430. Sozzi G. Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays / Sozzi G., Roz L., Conte D., Mariani L., Andriani F., Verderio P., Pastorino U. // *Journal of the National Cancer Institute* – 2005. – T. 97 – № 24 – C.1848–1850.
431. Wu T.-L. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range / Wu T.-L., Zhang D., Chia J.-H., Tsao K., Sun C.-F., Wu J.T. // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* – 2002. – T. 321 – № 1–2 – C.77–87.
432. Raptis L. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus / Raptis L., Menard H.A. // *The Journal of Clinical Investigation* – 1980. – T. 66 – № 6 – C.1391–1399.
433. Wong T.-S. Quantitative plasma hypermethylated DNA markers of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma / Wong T.-S., Kwong D.L.-W., Sham J.S.-T., Wei W.I., Kwong Y.-L., Yuen A.P.-W. // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* – 2004. – T. 10 – № 7 – C.2401–2406.

434. Khetan D. Comparison of UV spectrometry and fluorometry-based methods for quantification of cell-free DNA in red cell components / Khetan D., Gupta N., Chaudhary R., Shukla J.S. // Asian Journal of Transfusion Science – 2019. – T. 13 – № 2 – C.95–99.
435. Rengarajan K. Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores / Rengarajan K., Cristol S.M., Mehta M., Nickerson J.M. // Molecular Vision – 2002. – T. 8 – C.416–421.
436. Bronkhorst A.J. Comparison of methods for the quantification of cell-free DNA isolated from cell culture supernatant / Bronkhorst A.J., Ungerer V., Holdenrieder S. // Tumor Biology – 2019. – T. 41 – № 8 – C.101042831986636.
437. Holdenrieder S. Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR / Holdenrieder S., Stieber P., Chan L.Y.S., Geiger S., Kremer A., Nagel D., Lo Y.M.D. // Clinical Chemistry – 2005. – T. 51 – № 8 – C.1544–1546.
438. Bronkhorst A.J. Sequence analysis of cell-free DNA derived from cultured human bone osteosarcoma (143B) cells / Bronkhorst A.J., Wentzel J.F., Ungerer V., Peters D.L., Aucamp J., Villiers E.P. de, Holdenrieder S., Pretorius P.J. // Tumor Biology – 2018. – T. 40 – № 9 – C.101042831880119.
439. Stroun M. Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cells? / Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., Mulcahy H.E., Anker P. // Annals of the New York Academy of Sciences – 2001. – T. 945 – C.258–264.
440. Beck J. Profile of the Circulating DNA in Apparently Healthy Individuals / Beck J., Urnovitz H.B., Riggert J., Clerici M., Schütz E. // Clinical Chemistry – 2009. – T. 55 – № 4 – C.730–738.
441. Schwarzenbach H. Copy Number Variation Analysis on Cell-Free Serum DNA / Schwarzenbach H. // Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.) – 2019. – T. 1909 – C.85–93.
442. Li J.Z. Plasma DNA in systemic lupus erythematosus. Characterization of cloned base sequences / Li J.Z., Steinman C.R. // Arthritis and Rheumatism – 1989. – T. 32 – № 6 – C.726–733.
443. Morozkin E.S. A comparative study of cell-free apoptotic and genomic DNA using FISH and massive parallel sequencing / Morozkin E.S., Loseva E.M., Morozov I.V., Kurilshikov A.M., Bondar A.A., Rykova E.Y., Rubtsov N.B., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // Expert Opinion on Biological Therapy – 2012. – T. 12 Suppl 1 – C.S11-17.
444. Helman E. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing Prediction of Response and Resistance to Third-Generation EGFR Inhibitor / Helman E., Nguyen M., Karlovich C.A., Despain D., Choquette A.K., Spira A.I., Yu H.A., Camidge D.R., Harding T.C., Lanman R.B., Simmons A.D. // Clinical Lung Cancer – 2018. – T. 19 – № 6 – C.518- 530.e7.
445. Jiang P. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics / Jiang P., Lo Y.M.D. // Trends in genetics: TIG – 2016. – T. 32 – № 6 – C.360–371.
446. Jorgez C.J. Quantity versus quality: optimal methods for cell-free DNA isolation from plasma of pregnant women / Jorgez C.J., Dang D.D., Simpson J.L., Lewis D.E., Bischoff F.Z. // Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics – 2006. – T. 8 – № 10 – C.615–619.
447. Sorber L. A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma / Sorber L., Zwaenepoel K., Deschoolmeester V., Roeyen G., Lardon F., Rolfo C., Pauwels P. // The Journal of molecular diagnostics: JMD – 2017. – T. 19 – № 1 – C.162–168.
448. Lianidou E. Detection and relevance of epigenetic markers on ctDNA: recent advances and future outlook / Lianidou E. // Molecular Oncology – 2021. – T. 15 – № 6 – C.1683–1700.
449. Li L. Applying circulating tumor DNA methylation in the diagnosis of lung cancer / Li L., Fu K., Zhou W., Snyder M. // Precision Clinical Medicine – 2019. – T. 2 – № 1 – C.45–56.

450. Leal A. Tissue and Cell-Free DNA-Based Epigenomic Approaches for Cancer Detection / Leal A., Sidransky D., Brait M. // *Clinical Chemistry* – 2020. – T. 66 – № 1 – C.105–116.
451. Ibanez de Caceres I. Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients / Ibanez de Caceres I., Battagli C., Esteller M., Herman J.G., Dulaimi E., Edelson M.I., Bergman C., Ehya H., Eisenberg B.L., Cairns P. // *Cancer Research* – 2004. – T. 64 – № 18 – C.6476–6481.
452. Dulaimi E. Tumor Suppressor Gene Promoter Hypermethylation in Serum of Breast Cancer Patients / Dulaimi E., Hillinck J., Caceres I.I. de, Al-Saleem T., Cairns P. // *Clinical Cancer Research* – 2004. – T. 10 – № 18 – C.6189–6193.
453. Devonshire A.S. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification / Devonshire A.S., Whale A.S., Gutteridge A., Jones G., Cowen S., Foy C.A., Huggett J.F. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry* – 2014. – T. 406 – № 26 – C.6499–6512.
454. Lun F.M.F. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma / Lun F.M.F., Chiu R.W.K., Chan K.C.A., Leung T.Y., Lau T.K., Lo Y.M.D. // *Clinical Chemistry* – 2008. – T. 54 – № 10 – C.1664–1672.
455. Frommer M. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands / Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L., Paul C.L. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1992. – T. 89 – № 5 – C.1827–1831.
456. Bryzgunova O. Efficacy of Bisulfite Modification and DNA Recovery Using Commercial Kits from Samples of Genomic and Circulating DNA / Bryzgunova O. // *Computational Biology and Bioinformatics* – 2013. – T. 1 – № 6 – C.28.
457. Millar D.S. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer / Millar D.S., Ow K.K., Paul C.L., Russell P.J., Molloy P.L., Clark S.J. // *Oncogene* – 1999. – T. 18 – № 6 – C.1313–1324.
458. Bryzgunova O.E. Methylation-Specific Sequencing of GSTP1 Gene Promoter in Circulating/Extracellular DNA from Blood and Urine of Healthy Donors and Prostate Cancer Patients / Bryzgunova O.E., Morozkin E.S., Yarmoschuk S.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2008. – T. 1137 – № 1 – C.222–225.
459. Fackler M.J. Novel Methylated Biomarkers and a Robust Assay to Detect Circulating Tumor DNA in Metastatic Breast Cancer / Fackler M.J., Lopez Bujanda Z., Umbricht C., Teo W.W., Cho S., Zhang Z., Visvanathan K., Jeter S., Argani P., Wang C., Lyman J.P., Brot M. de, Ingle J.N., Boughey J., McGuire K., King T.A., Carey L.A., Cope L., Wolff A.C., Sukumar S. // *Cancer Research* – 2014. – T. 74 – № 8 – C.2160–2170.
460. Warton K. Methylation-capture and Next-Generation Sequencing of free circulating DNA from human plasma / Warton K., Lin V., Navin T., Armstrong N.J., Kaplan W., Ying K., Gloss B., Mangs H., Nair S.S., Hacker N.F., Sutherland R.L., Clark S.J., Samimi G. // *BMC genomics* – 2014. – T. 15 – № 1 – C.476.
461. Akey D.T. Assaying DNA Methylation Based on High-Throughput Melting Curve Approaches / Akey D.T., Akey J.M., Zhang K., Jin L. // *Genomics* – 2002. – T. 80 – № 4 – C.376–384.
462. Estécio M.R.H. LHX6 is a sensitive methylation marker in head and neck carcinomas / Estécio M.R.H., Youssef E.M., Rahal P., Fukuyama E.E., Góis-Filho J.F., Maniglia J.V., Goloni-Bertollo E.M., Issa J.-P.J., Tajara E.H. // *Oncogene* – 2006. – T. 25 – № 36 – C.5018–5026.
463. Skvortsova T.E. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation / Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N., Bryzgunova

O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // *British Journal of Cancer* – 2006. – T. 94 – № 10 – C.1492–1495.

464. Tangkijvanich P. Serum LINE-1 hypomethylation as a potential prognostic marker for hepatocellular carcinoma / Tangkijvanich P., Hourpai N., Rattanatanyong P., Wisedopas N., Mahachai V., Mutirangura A. // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* – 2007. – T. 379 – № 1–2 – C.127–133.

465. Ponomaryova A.A. Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients / Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Skvortsova T.E., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Bryzgalov L.O., Tuzikov S.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* – 2013. – T. 81 – № 3 – C.397–403.

466. Papadopoulou E. Cell-free DNA and RNA in plasma as a new molecular marker for prostate and breast cancer / Papadopoulou E., Davilas E., Sotiriou V., Georgakopoulos E., Georgakopoulou S., Koliopoulos A., Aggelakis F., Dardoufas K., Agnanti N.J., Karydas I., Nasioulas G. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2006. – T. 1075 – C.235–243.

467. Zhang Z. A High-Through Technique to Measure DNA Methylation / Zhang Z., Gao J., Qin C., Liu L., Lin H., Shen Y., Gao S., Zhao M., Ding H., Pan G. // *Genetics & Epigenetics* – 2010. – T. 3 – C.GEG.S5035.

468. Cottrell S.E. A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers / Cottrell S.E. // *Nucleic Acids Research* – 2004. – T. 32 – № 1 – C.10e–110.

469. Tierling S. A combined HM-PCR/SNuPE method for high sensitive detection of rare DNA methylation / Tierling S., Schuster M., Tetzner R., Walter J. // *Epigenetics & Chromatin* – 2010. – T. 3 – № 1 – C.12.

470. Gonzalgo M.L. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE) / Gonzalgo M.L., Jones P.A. // *Nucleic Acids Research* – 1997. – T. 25 – № 12 – C.2529–2531.

471. El-Maarri O. A rapid, quantitative, non-radioactive bisulfite-SNuPE- IP RP HPLC assay for methylation analysis at specific CpG sites / El-Maarri O. // *Nucleic Acids Research* – 2002. – T. 30 – № 6 – C.25e–225.

472. Ragoussis J. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry in genomics research / Ragoussis J., Elvidge G.P., Kaur K., Colella S. // *PLoS genetics* – 2006. – T. 2 – № 7 – C.e100.

473. Mass spectrometry and genomic analysis // под ред. J.N. Housby. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. – 149c.

474. Tanas A.S. [Reduced representation bisulfite sequencing design for assessing the methylation of human CpG islands in large samples] / Tanas A.S., Kuznetsova E.B., Borisova M.E., Rudenko V.V., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. // *Molekuliarnaia Biologiya* – 2015. – T. 49 – № 4 – C.689–699.

475. Butkus V. Cleavage of methylated CCCGGG sequences containing either N4-methylcytosine or 5-methylcytosine with MspI, HpaII, SmaI, XmaI and Cfr9I restriction endonucleases / Butkus V., Petrauskiene L., Maneliene Z., Klimašauskas S., Laučys V., Janulaitis A. // *Nucleic Acids Research* – 1987. – T. 15 – № 17 – C.7091–7102.

476. Ellinger J. CpG Island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer / Ellinger J., Haan K., Heukamp L.C., Kahl P., Büttner R., Müller S.C., Ruecker A. von, Bastian P.J. // *The Prostate* – 2008. – T. 68 – № 1 – C.42–49.

477. Kneip C. A novel method for sensitive and specific detection of DNA methylation biomarkers based on DNA restriction during PCR cycling / Kneip C., Schmidt B., Fleischhacker M., Seegebarth A., Lewin J., Flemming N., Seemann S., Schlegel T., Witt C., Liebenberg V., Dietrich D. // *BioTechniques* – 2009. – T. 47 – № 3 – C.737–744.

478. Lee M.G. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma / Lee M.G., Kim H.Y., Byun D.S., Lee S.J., Lee C.H., Kim J.I., Chang S.G., Chi S.G. // *Cancer Research* – 2001. – Т. 61 – № 18 – С.6688–6692.
479. Чернухин, В. Новая метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза MteI расщепляет последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN(5mC)G(5mC)G-5' / Чернухин, В., Гончар, Д., Килёва, Е., Соколова, В., Голикова, Л., Дедков, В., Михненко, Н., Дегтярёв, С. // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова* – 2012. – Т. 8 – С.16–26.
480. Чернухин, В. Новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК эндонуклеаза PkrI узнает и расщепляет метилированную последовательность 5'-GCN[^]GC-3'/3'-CG[^]NCG-5', содержащую не менее 3-х 5-метилцитозинов / Чернухин, В., Наякшина, Т., Гончар, Д., Томилова, Ю., Тарасова, М., Дедков, В., Михненко, Н., Дегтярёв, С. // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова* – 2011. – Т. 7 – С.35–42.
481. Singer-Sam J. Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the Pcg-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation / Singer-Sam J., Grant M., LeBon J.M., Okuyama K., Chapman V., Monk M., Riggs A.D. // *Molecular and Cellular Biology* – 1990. – Т. 10 – № 9 – С.4987–4989.
482. Mamon H. Preferential amplification of apoptotic DNA from plasma: potential for enhancing detection of minor DNA alterations in circulating DNA / Mamon H., Hader C., Li J., Wang L., Kulke M., Amicarelli G., Shehi E., Adlerstein D., Roper K., Killion L., Hooshmand S., Makrigiorgos G.M. // *Clinical Chemistry* – 2008. – Т. 54 – № 9 – С.1582–1584.
483. Пальцев, М. Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний / Пальцев, М., Залетаев, Д. – Москва, 2009. Вып. Медицина.
484. Филина, Ю. Методы анализа метилирования ДНК / Филина, Ю., Габдулхакова, А., Арлеевская, М. // *Клиническая лабораторная диагностика* – 2012. – Т. 8 – С.15–18.
485. NimbleGen Arrays User's Guide: Epigenetics Arrays v1.0 / – Roche NimbleGen, 2011.– 58с.
486. Бородинов А.Г. Поколения методов секвенирования ДНК (обзор) / Бородинов А.Г., Манойлов, В. В., Заруцкий, И. В., Петров, А. И., Курочкин, В. Е. // *НАУЧНОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ* – 2020. – Т. 30 – № 4 – С.3–20.
487. Hirst M. Next generation sequencing based approaches to epigenomics / Hirst M., Marra M.A. // *Briefings in Functional Genomics* – 2010. – Т. 9 – № 5–6 – С.455–465.
488. Орлов, Ю. Компьютерное исследование регуляции транскрипции генов эукариот с помощью данных экспериментов секвенирования и иммунопреципитации хроматина / Орлов, Ю. // *Вавиловский журнал генетики и селекции* – 2014. – Т. 18 – С.193–206.
489. Mardis E.R. A decade's perspective on DNA sequencing technology / Mardis E.R. // *Nature* – 2011. – Т. 470 – № 7333 – С.198–203.
490. Choy L.Y.L. Single-Molecule Sequencing Enables Long Cell-Free DNA Detection and Direct Methylation Analysis for Cancer Patients / Choy L.Y.L., Peng W., Jiang P., Cheng S.H., Yu S.C.Y., Shang H., Olivia Tse O.Y., Wong J., Wong V.W.S., Wong G.L.H., Lam W.K.J., Chan S.L., Chiu R.W.K., Chan K.C.A., Lo Y.M.D. // *Clinical Chemistry* – 2022. – Т. 68 – № 9 – С.1151–1163.
491. Eid J. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules / Eid J., Fehr A., Gray J., Turner S. // *Science* – 2009. – Т. 323 – № 5910 – С.133–138.
492. Song S. qpure: A tool to estimate tumor cellularity from genome-wide single-nucleotide polymorphism profiles / Song S., Nones K., Miller D., Harliwong I., Kassahn K.S., Pinese M., Pajic M., Gill A.J., Johns A.L.,

- Anderson M., Holmes O., Leonard C., Taylor D., Wood S., Xu Q., Newell F., Cowley M.J., Wu J., Wilson P., Fink L., Biankin A.V., Waddell N., Grimmond S.M., Pearson J.V. // *PloS One* – 2012. – Т. 7 – № 9 – C.e45835.
493. Holmila R. Targeted deep sequencing of plasma circulating cell-free DNA reveals Vimentin and Fibulin 1 as potential epigenetic biomarkers for hepatocellular carcinoma / Holmila R., Sklias A., Muller D.C., Degli Esposti D., Guilloureaux P., McKay J., Sangrajang S., Srivatanakul P., Hainaut P., Merle P., Herceg Z., Nogueira da Costa A. // *PloS One* – 2017. – Т. 12 – № 3 – C.e0174265.
494. Chatterton Z. Bisulfite Amplicon Sequencing Can Detect Glia and Neuron Cell-Free DNA in Blood Plasma / Chatterton Z., Mendelev N., Chen S., Carr W., Kamimori G.H., Ge Y., Dwork A.J., Haghighi F. // *Frontiers in Molecular Neuroscience* – 2021. – Т. 14 – C.672614.
495. Katsman E. Detecting cell-of-origin and cancer-specific methylation features of cell-free DNA from Nanopore sequencing / Katsman E., Orlanski S., Martignano F., Fox-Fisher I., Shemer R., Dor Y., Zick A., Eden A., Petrini I., Conticello S.G., Berman B.P. // *Genome Biology* – 2022. – Т. 23 – № 1 – C.158.
496. Clarke J. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing / Clarke J., Wu H.-C., Jayasinghe L., Patel A., Reid S., Bayley H. // *Nature Nanotechnology* – 2009. – Т. 4 – № 4 – C.265–270.
497. Mal'shakova V.S. Intracellular localization of natural and modified oligonucleotides in primary human endothelial cells / Mal'shakova V.S., Laktionov P.P., Pyshnyi D.V., Vlasov V.V. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* – 2007. – Т. 143 – № 2 – C.204–206.
498. Morozkin E.S. Extracellular nucleic acids in cultures of long-term cultivated eukaryotic cells / Morozkin E.S., Laktionov P.P., Rykova E.Y., Vlassov V.V. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2004. – Т. 1022 – C.244–249.
499. Shen C. Antileukaemia immunity: effect of exosomes against NB4 acute promyelocytic leukaemia cells / Shen C., Hao S.G., Zhao C.X., Zhu J., Wang C. // *The Journal of International Medical Research* – 2011. – Т. 39 – № 3 – C.740–747.
500. Alvarez-Erviti L. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission / Alvarez-Erviti L., Seow Y., Schapira A.H., Gardiner C., Sargent I.L., Wood M.J.A., Cooper J.M. // *Neurobiology of Disease* – 2011. – Т. 42 – № 3 – C.360–367.
501. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / Laemmli U.K. // *Nature* – 1970. – Т. 227 – № 5259 – C.680–685.
502. Towbin H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979 / Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // *Biotechnology (Reading, Mass.)* – 1992. – Т. 24 – C.145–149.
503. Lekchnov E.A. Protocol for miRNA isolation from biofluids / Lekchnov E.A., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Bryzgunova O.E., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // *Analytical Biochemistry* – 2016. – Т. 499 – C.78–84.
504. Green, M.R. *Molecular Cloning* / Green, M.R., Sambrook, J. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. Вып. 4.
505. Morozkin E.S. Fluorometric quantification of RNA and DNA in solutions containing both nucleic acids / Morozkin E.S., Laktionov P.P., Rykova E.Y., Vlassov V.V. // *Analytical Biochemistry* – 2003. – Т. 322 – № 1 – C.48–50.
506. Zaporozhchenko I.A. A phenol-free method for isolation of microRNA from biological fluids / Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Skvortsova T.E., Bryzgunova O.E., Bondar A.A., Loseva E.M., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // *Analytical Biochemistry* – 2015. – Т. 479 – C.43–47.

507. Лактионов, П. П. Способ выделения дезоксирибонуклеиновых кислот / Лактионов, П. П., Тамкович, С. Н., Симонов, П., Рыкова, Е. Ю., Власов, В. В. – 2004.
508. Caporaso J.G. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms / Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., Owens S.M., Betley J., Fraser L., Bauer M., Gormley N., Gilbert J.A., Smith G., Knight R. // *The ISME Journal* – 2012. – Т. 6 – № 8 – С.1621–1624.
509. Andersen C.L. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets / Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. // *Cancer Research* – 2004. – Т. 64 – № 15 – С.5245–5250.
510. Mestdagh P. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA / Mestdagh P., Feys T., Bernard N., Guenther S., Chen C., Speleman F., Vandesompele J. // *Nucleic Acids Research* – 2008. – Т. 36 – № 21 – С.e143.
511. Efron B. An Introduction to the Bootstrap / B. Efron, R. J. Tibshirani – Chapman and Hall/CRC, 1994. Вып. 0.
512. Fendler A. The translational potential of microRNAs as biofluid markers of urological tumours / Fendler A., Stephan C., Yousef G.M., Kristiansen G., Jung K. // *Nature Reviews. Urology* – 2016. – Т. 13 – № 12 – С.734–752.
513. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. // *The Journal of Biological Chemistry* – 1957. – Т. 226 – № 1 – С.497–509.
514. Griбанов O.G. [A simple method for RNA isolation and purification] / Griбанов O.G., Shcherbakov A.V., Perevozchikova N.A., Drygin V.V., Gusev A.A. // *Bioorganicheskaya Khimiya* – 1997. – Т. 23 – № 9 – С.763–765.
515. Lunavat T.R. Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells – Evidence of unique microRNA cargos / Lunavat T.R., Cheng L., Kim D.-K., Bhadury J., Jang S.C., Lässer C., Sharples R.A., López M.D., Nilsson J., Gho Y.S., Hill A.F., Lötvall J. // *RNA Biology* – 2015. – Т. 12 – № 8 – С.810–823.
516. Hu J. Human miR-1228 as a stable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs in cancer patients / Hu J., Wang Z., Liao B.-Y., Yu L., Gao X., Lu S., Wang S., Dai Z., Zhang X., Chen Q., Qiu S.-J., Wu Y., Zhu H., Fan J., Zhou J., Wang J. // *International Journal of Cancer* – 2014. – Т. 135 – № 5 – С.1187–1194.
517. Sanfiorenzo C. Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC / Sanfiorenzo C., Ilie M.I., Belaid A., Barlési F., Mouroux J., Marquette C.-H., Brest P., Hofman P. // *PloS One* – 2013. – Т. 8 – № 1 – С.e54596.
518. Liu J. Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients / Liu J., Mao Q., Liu Y., Hao X., Zhang S., Zhang J. // *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu* – 2013. – Т. 25 – № 1 – С.46–54.
519. Shen J. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer / Shen J., Todd N.W., Zhang H., Yu L., Lingxiao X., Mei Y., Guarnera M., Liao J., Chou A., Lu C.L., Jiang Z., Fang H., Katz R.L., Jiang F. // *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* – 2011. – Т. 91 – № 4 – С.579–587.
520. Markou A. Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer / Markou A., Sourvinou I., Vorkas P.A., Yousef G.M., Lianidou E. // *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* – 2013. – Т. 81 – № 3 – С.388–396.

521. Chanutin A. The precipitation of plasma proteins by short-chain fatty acids / Chanutin A., Curnish R.R. // Archives of Biochemistry and Biophysics – 1960. – T. 89 – № 2 – C.218–220.
522. Steinbuch M. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid / Steinbuch M., Audran R. // Archives of Biochemistry and Biophysics – 1969. – T. 134 – № 2 – C.279–284.
523. Habeeb A.F. Preparation of human immunoglobulin by caprylic acid precipitation / Habeeb A.F., Francis R.D. // Preparative Biochemistry – 1984. – T. 14 – № 1 – C.1–17.
524. McKinney M.M. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid / McKinney M.M., Parkinson A. // Journal of Immunological Methods – 1987. – T. 96 – № 2 – C.271–278.
525. Bull H.B. Binding of fatty acids by proteins / Bull H.B., Breese K. // Archives of Biochemistry and Biophysics – 1967. – T. 120 – № 2 – C.303–308.
526. Zakrzewski K. Human serum albumin. Tyrosyl residues and strongly binding sites / Zakrzewski K., Goch H. // Biochemistry – 1968. – T. 7 – № 5 – C.1835–1842.
527. Eldh M. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods / Eldh M., Lötvall J., Malmhäll C., Ekström K. // Molecular Immunology – 2012. – T. 50 – № 4 – C.278–286.
528. Gautam P. Analysis of Human Blood Plasma Proteome from Ten Healthy Volunteers from Indian Population / Gautam P., Nair S.C., Ramamoorthy K., Swamy C.V.B., Nagaraj R. // PLoS ONE – 2013. – T. 8 – № 8 – C.e72584.
529. Jung W. Analysis of low molecular weight plasma proteins using ultrafiltration and large gel two-dimensional electrophoresis / Jung W., Phark S., Oh S., Khim J., Lee J., Nam M.H., Seo J.B., Park S., Jo E., Choi S., Zheng Z., Lee J.Y., Lee M., Lee E., Sul D. // PROTEOMICS – 2009. – T. 9 – № 7 – C.1827–1840.
530. Harita Y. Urinary extracellular vesicles in childhood kidney diseases / Harita Y. // Pediatric Nephrology (Berlin, Germany) – 2024. – T. 39 – № 8 – C.2293–2300.
531. Duijvesz D. Exosomes as Biomarker Treasure Chests for Prostate Cancer / Duijvesz D., Luider T., Bangma C.H., Jenster G. // European Urology – 2011. – T. 59 – № 5 – C.823–831.
532. Raimondo F. Differential protein profiling of renal cell carcinoma urinary exosomes / Raimondo F., Morosi L., Corbetta S., Chinello C., Brambilla P., Della Mina P., Villa A., Albo G., Battaglia C., Bosari S., Magni F., Pitto M. // Molecular bioSystems – 2013. – T. 9 – № 6 – C.1220–1233.
533. Cheruvanky A. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator / Cheruvanky A., Zhou H., Pisitkun T., Kopp J.B., Knepper M.A., Yuen P.S.T., Star R.A. // American Journal of Physiology-Renal Physiology – 2007. – T. 292 – № 5 – C.F1657–F1661.
534. Vlassov A.V. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials / Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects – 2012. – T. 1820 – № 7 – C.940–948.
535. Conde-Vancells J. Isolation of Urinary Exosomes from Animal Models to Unravel Noninvasive Disease Biomarkers Methods in Molecular Biology // под ред. D. Josic, D.C. Hixson. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. – 321–340c.
536. Fang D.Y. Exosomes and the kidney: blaming the messenger / Fang D.Y., King H.W., Li J.Y., Gleadle J.M. // Nephrology (Carlton, Vic.) – 2013. – T. 18 – № 1 – C.1–10.

537. Musante L. Biochemical and Physical Characterisation of Urinary Nanovesicles following CHAPS Treatment / Musante L., Saraswat M., Duriez E., Byrne B., Ravidà A., Domon B., Holthofer H. // PLoS ONE – 2012. – T. 7 – № 7 – C.e37279.
538. Burden H.P. Prostatosomes—their effects on human male reproduction and fertility / Burden H.P., Holmes C.H., Persad R., Whittington K. // Human Reproduction Update – 2006. – T. 12 – № 3 – C.283–292.
539. Erdbrügger U. Urinary extracellular vesicles: A position paper by the Urine Task Force of the International Society for Extracellular Vesicles / Erdbrügger U., Blijdorp C.J., Bijnsdorp I.V., Borràs F.E., Burger D., Bussolati B., Byrd J.B., Clayton A., Dear J.W., Falcón-Pérez J.M., Grange C., Hill A.F., Holthöfer H., Hoorn E.J., Jenster G., Jimenez C.R., Junker K., Klein J., Knepper M.A., Koritzinsky E.H., Luther J.M., Lenassi M., Leivo J., Mertens I., Musante L., Oeyen E., Puhka M., Royen M.E. van, Sánchez C., Soekmadji C., Thongboonkerd V., Steijn V. van, Verhaegh G., Webber J.P., Witwer K., Yuen P.S.T., Zheng L., Llorente A., Martens-Uzunova E.S. // Journal of Extracellular Vesicles – 2021. – T. 10 – № 7 – C.e12093.
540. Lässer C. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages / Lässer C., Seyed Alikhani V., Ekström K., Eldh M., Torregrosa Paredes P., Bossios A., Sjöstrand M., Gabrielsson S., Lötvall J., Valadi H. // Journal of Translational Medicine – 2011. – T. 9 – № 1 – C.9.
541. Pols M.S. Trafficking and function of the tetraspanin CD63 / Pols M.S., Klumperman J. // Experimental Cell Research – 2009. – T. 315 – № 9 – C.1584–1592.
542. King J.B. CD24 can be used to isolate Lgr5⁺ putative colonic epithelial stem cells in mice / King J.B., Furstenberg R.J. von, Smith B.J., McNaughton K.K., Galanko J.A., Henning S.J. // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology – 2012. – T. 303 – № 4 – C.G443–G452.
543. Ye P. Expression patterns of tight junction components induced by CD 24 in an oral epithelial cell-culture model correlated to affected periodontal tissues / Ye P., Yu H., Simonian M., Hunter N. // Journal of Periodontal Research – 2014. – T. 49 – № 2 – C.253–259.
544. Cheng L. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine / Cheng L., Sun X., Scicluna B.J., Coleman B.M., Hill A.F. // Kidney International – 2014. – T. 86 – № 2 – C.433–444.
545. Murakami T. Development of Glomerulus-, Tubule-, and Collecting Duct-Specific mRNA Assay in Human Urinary Exosomes and Microvesicles / Murakami T., Oakes M., Ogura M., Tovar V., Yamamoto C., Mitsuhashi M. // PLoS ONE – 2014. – T. 9 – № 10 – C.e109074.
546. Lv L.-L. Isolation and Quantification of MicroRNAs from Urinary Exosomes/Microvesicles for Biomarker Discovery / Lv L.-L., Cao Y., Liu D., Xu M., Liu H., Tang R.-N., Ma K.-L., Liu B.-C. // International Journal of Biological Sciences – 2013. – T. 9 – № 10 – C.1021–1031.
547. Royo F. Transcriptomic profiling of urine extracellular vesicles reveals alterations of CDH3 in prostate cancer / Royo F., Zuñiga-Garcia P., Torrano V., Loizaga A., Sanchez-Mosquera P., Ugalde-Olano A., González E., Cortazar A.R., Palomo L., Fernández-Ruiz S., Lacasa-Viscasillas I., Berdasco M., Sutherland J.D., Barrio R., Zabala-Letona A., Martín-Martín N., Arruabarrena-Aristorena A., Valcarcel-Jimenez L., Caro-Maldonado A., Gonzalez-Tampan J., Cachi-Fuentes G., Esteller M., Aransay A.M., Unda M., Falcón-Pérez J.M., Carracedo A. // Oncotarget – 2016. – T. 7 – № 6 – C.6835–6846.
548. Oosthuyzen W. Quantification of human urinary exosomes by nanoparticle tracking analysis / Oosthuyzen W., Sime N.E.L., Ivy J.R., Turtle E.J., Street J.M., Pound J., Bath L.E., Webb D.J., Gregory C.D., Bailey M.A., Dear J.W. // The Journal of Physiology – 2013. – T. 591 – № 23 – C.5833–5842.
549. Pisitkun T. Discovery of Urinary Biomarkers / Pisitkun T., Johnstone R., Knepper M.A. // Molecular & Cellular Proteomics – 2006. – T. 5 – № 10 – C.1760–1771.

550. Zhou H. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery / Zhou H., Yuen P.S.T., Pisitkun T., Gonzales P.A., Yasuda H., Dear J.W., Gross P., Knepper M.A., Star R.A. // *Kidney International* – 2006. – T. 69 – № 8 – C.1471–1476.
551. Merchant M.L. Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS / Merchant M.L., Powell D.W., Wilkey D.W., Cummins T.D., Deegens J.K., Rood I.M., McAfee K.J., Fleischer C., Klein E., Klein J.B. // *PROTEOMICS – Clinical Applications* – 2010. – T. 4 – № 1 – C.84–96.
552. Moon P. Urinary exosomes and proteomics / Moon P., You S., Lee J., Hwang D., Baek M. // *Mass Spectrometry Reviews* – 2011. – T. 30 – № 6 – C.1185–1202.
553. Dimov I. Urinary Exosomes / Dimov I., Jankovic Velickovic L., Stefanovic V. // *The Scientific World JOURNAL* – 2009. – T. 9 – C.1107–1118.
554. Wang D. Urinary extracellular microvesicles: Isolation methods and prospects for urinary proteome / Wang D., Sun W. // *PROTEOMICS* – 2014. – T. 14 – № 16 – C.1922–1932.
555. Øverbye A. Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes / Øverbye A., Skotland T., Koehler C.J., Thiede B., Seierstad T., Berge V., Sandvig K., Llorente A. // *Oncotarget* – 2015. – T. 6 – № 30 – C.30357–30376.
556. Wang Z. Proteomic analysis of urine exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT) / Wang Z., Hill S., Luther J.M., Hachey D.L., Schey K.L. // *PROTEOMICS* – 2012. – T. 12 – № 2 – C.329–338.
557. Yang X. Circulating extracellular vesicles as a potential source of new biomarkers of drug-induced liver injury / Yang X., Weng Z., Mendrick D.L., Shi Q. // *Toxicology Letters* – 2014. – T. 225 – № 3 – C.401–406.
558. Dijkstra S. Clinical use of novel urine and blood based prostate cancer biomarkers: A review / Dijkstra S., Mulders P.F.A., Schalken J.A. // *Clinical Biochemistry* – 2014. – T. 47 – № 10–11 – C.889–896.
559. Rolfo C. Liquid biopsies in lung cancer: The new ambrosia of researchers / Rolfo C., Castiglia M., Hong D., Alessandro R., Mertens I., Baggerman G., Zwaenepoel K., Gil-Bazo I., Passiglia F., Carreca A.P., Taverna S., Vento R., Peeters M., Russo A., Pauwels P. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* – 2014. – T. 1846 – № 2 – C.539–546.
560. György B. Therapeutic Applications of Extracellular Vesicles: Clinical Promise and Open Questions / György B., Hung M.E., Breakefield X.O., Leonard J.N. // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* – 2015. – T. 55 – № 1 – C.439–464.
561. Sluijter J.P.G. Microvesicles and exosomes for intracardiac communication / Sluijter J.P.G., Verhage V., Deddens J.C., Akker F. van den, Doevendans P.A. // *Cardiovascular Research* – 2014. – T. 102 – № 2 – C.302–311.
562. Bryzgunova O.E. Isolation and Comparative Study of Cell-Free Nucleic Acids from Human Urine / Bryzgunova O.E., Skvortsova T.E., Kolesnikova E.V., Starikov A.V., Rykova E.Y., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2006. – T. 1075 – № 1 – C.334–340.
563. Miranda K.C. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease / Miranda K.C., Bond D.T., McKee M., Skog J., Păunescu T.G., Da Silva N., Brown D., Russo L.M. // *Kidney International* – 2010. – T. 78 – № 2 – C.191–199.
564. Kahlert C. Identification of Double-stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated KRAS and p53 DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer / Kahlert C., Melo S.A., Protopopov A., Tang J., Seth S., Koch M., Zhang J., Weitz J., Chin L., Futreal A., Kalluri R. // *Journal of Biological Chemistry* – 2014. – T. 289 – № 7 – C.3869–3875.

565. Balaj L. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences / Balaj L., Lessard R., Dai L., Cho Y.-J., Pomeroy S.L., Breakefield X.O., Skog J. // *Nature Communications* – 2011. – T. 2 – № 1 – C.180.
566. Guescini M. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction / Guescini M., Guidolin D., Vallorani L., Casadei L., Gioacchini A.M., Tibollo P., Battistelli M., Falcieri E., Battistin L., Agnati L.F., Stocchi V. // *Experimental Cell Research* – 2010. – T. 316 – № 12 – C.1977–1984.
567. Guescini M. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA / Guescini M., Genedani S., Stocchi V., Agnati L.F. // *Journal of Neural Transmission* – 2010. – T. 117 – № 1 – C.1–4.
568. Rykova E.Y. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content / Rykova E.Y., Morozkin E.S., Ponomaryova A.A., Loseva E.M., Zaporozhchenko I.A., Cherdyntseva N.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. // *Expert Opinion on Biological Therapy* – 2012. – T. 12 – № sup1 – C.S141–S153.
569. Askenase P.W. Exosomes provide unappreciated carrier effects that assist transfers of their miRNAs to targeted cells; I. They are ‘The Elephant in the Room’ / Askenase P.W. // *RNA Biology* – 2021. – T. 18 – № 11 – C.2038–2053.
570. Fabris L. The Potential of MicroRNAs as Prostate Cancer Biomarkers / Fabris L., Ceder Y., Chinnaiyan A.M., Jenster G.W., Sorensen K.D., Tomlins S., Visakorpi T., Calin G.A. // *European Urology* – 2016. – T. 70 – № 2 – C.312–322.
571. Tian L. Four MicroRNAs Promote Prostate Cell Proliferation with Regulation of PTEN and Its Downstream Signals In Vitro / Tian L., Fang Y., Xue J., Chen J. // *PLoS ONE* – 2013. – T. 8 – № 9 – C.e75885.
572. Srivastava A. MicroRNA profiling in prostate cancer--the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214 / Srivastava A., Goldberger H., Dimtchev A., Ramalinga M., Chijioke J., Marian C., Oermann E.K., Uhm S., Kim J.S., Chen L.N., Li X., Berry D.L., Kallakury B.V.S., Chauhan S.C., Collins S.P., Suy S., Kumar D. // *PloS One* – 2013. – T. 8 – № 10 – C.e76994.
573. Leite K.R.M. MicroRNA expression profiles in the progression of prostate cancer—from high-grade prostate intraepithelial neoplasia to metastasis / Leite K.R.M., Tomiyama A., Reis S.T., Sousa-Canavez J.M., Sañudo A., Camara-Lopes L.H., Srougi M. // *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* – 2013. – T. 31 – № 6 – C.796–801.
574. Wang G. Expression of MicroRNAs in the Urinary Sediment of Patients with IgA Nephropathy / Wang G., Kwan B.C.-H., Lai F.M.-M., Chow K.-M., Kam-Tao Li P., Szeto C.-C. // *Disease Markers* – 2010. – T. 28 – № 2 – C.79–86.
575. Williams Z. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations / Williams Z., Ben-Dov I.Z., Elias R., Mihailovic A., Brown M., Rosenwaks Z., Tuschl T. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2013. – T. 110 – № 11 – C.4255–4260.
576. Naskalski J.W. Determining of actual activities of acid and alkaline ribonuclease in human serum and urine / Naskalski J.W., Celiński A. // *Materia Medica Polona. Polish Journal of Medicine and Pharmacy* – 1991. – T. 23 – № 2 – C.107–110.
577. Osipov I.D. Cell-Free miRNA-141 and miRNA-205 as Prostate Cancer Biomarkers Advances in Experimental Medicine and Biology // под ред. P.B. Gahan, M. Fleischhacker, B. Schmidt. Cham: Springer International Publishing, 2016. – 9–12c.
578. Mukherjee R. Raf-1 expression may influence progression to androgen insensitive prostate cancer / Mukherjee R., Bartlett J.M.S., Krishna N.S., Underwood M.A., Edwards J. // *The Prostate* – 2005. – T. 64 – № 1 – C.101–107.

579. Palanisamy N. Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma / Palanisamy N., Ateeq B., Kalyana-Sundaram S., Pflueger D., Ramnarayanan K., Shankar S., Han B., Cao Q., Cao X., Suleman K., Kumar-Sinha C., Dhanasekaran S.M., Chen Y., Esgueva R., Banerjee S., LaFargue C.J., Siddiqui J., Demichelis F., Moeller P., Bismar T.A., Kuefer R., Fullen D.R., Johnson T.M., Greenson J.K., Giordano T.J., Tan P., Tomlins S.A., Varambally S., Rubin M.A., Maher C.A., Chinnaiyan A.M. // *Nature Medicine* – 2010. – T. 16 – № 7 – C.793–798.
580. Poulain F.E. Heparan sulfate proteoglycans: a sugar code for vertebrate development? / Poulain F.E., Yost H.J. // *Development* – 2015. – T. 142 – № 20 – C.3456–3467.
581. Iozzo R.V. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans / Iozzo R.V., Schaefer L. // *Matrix Biology* – 2015. – T. 42 – C.11–55.
582. Afratis N. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment / Afratis N., Gialeli C., Nikitovic D., Tsegenidis T., Karousou E., Theocharis A.D., Pavão M.S., Tzanakakis G.N., Karamanos N.K. // *The FEBS Journal* – 2012. – T. 279 – № 7 – C.1177–1197.
583. Edwards I.J. Proteoglycans in prostate cancer / Edwards I.J. // *Nature Reviews Urology* – 2012. – T. 9 – № 4 – C.196–206.
584. Theocharis A.D. Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms / Theocharis A.D., Karamanos N.K. // *Matrix Biology* – 2019. – T. 75–76 – C.220–259.
585. Knelson E.H. Heparan sulfate signaling in cancer / Knelson E.H., Nee J.C., Blobel G.C. // *Trends in Biochemical Sciences* – 2014. – T. 39 – № 6 – C.277–288.
586. Martini M. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review / Martini M., De Santis M.C., Braccini L., Gulluni F., Hirsch E. // *Annals of Medicine* – 2014. – T. 46 – № 6 – C.372–383.
587. Gallagher D.J. Germline BRCA mutations denote a clinicopathologic subset of prostate cancer / Gallagher D.J., Gaudet M.M., Pal P., Kirchhoff T., Balistreri L., Vora K., Bhatia J., Stadler Z., Fine S.W., Reuter V., Zelefsky M., Morris M.J., Scher H.I., Klein R.J., Norton L., Eastham J.A., Scardino P.T., Robson M.E., Offit K. // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* – 2010. – T. 16 – № 7 – C.2115–2121.
588. Balacescu O. Urinary MICRORNAs for prostate cancer diagnosis, prognosis, and treatment response: are we there yet? / Balacescu O., Petrut B., Tudoran O., Feflea D., Balacescu L., Anghel A., Sirbu I.O., Seclaman E., Marian C. // *WIREs RNA* – 2017. – T. 8 – № 6 – C.e1438.
589. Taguchi Y. Principal Component Analysis Based Feature Extraction Approach to Identify Circulating microRNA Biomarkers / Taguchi Y., Murakami Y. // *PLoS ONE* – 2013. – T. 8 – № 6 – C.e66714.
590. Zhang N. MicroRNA expression profiles in benign prostatic hyperplasia / Zhang N., Li Z., Bai F., Ji N., Zheng Y., Li Y., Chen J., Mao X. // *Molecular Medicine Reports* – 2017.
591. Sapre N. Curated microRNAs in urine and blood fail to validate as predictive biomarkers for high-risk prostate cancer / Sapre N., Hong M.K.H., Macintyre G., Lewis H., Kowalczyk A., Costello A.J., Corcoran N.M., Hovens C.M. // *PloS One* – 2014. – T. 9 – № 4 – C.e91729.
592. Koppers-Lalic D. Non-invasive prostate cancer detection by measuring miRNA variants (isomiRs) in urine extracellular vesicles / Koppers-Lalic D., Hackenberg M., Menezes R. de, Misovic B., Wachalska M., Geldof A., Zini N., Reijke T. de, Wurdinger T., Vis A., Moorselaar J. van, Pegtel M., Bijnsdorp I. // *Oncotarget* – 2016. – T. 7 – № 16 – C.22566–22578.
593. Cheng H.H. Circulating microRNA Profiling Identifies a Subset of Metastatic Prostate Cancer Patients with Evidence of Cancer-Associated Hypoxia / Cheng H.H., Mitchell P.S., Kroh E.M., Dowell A.E., Chéry L., Siddiqui J., Nelson P.S., Vessella R.L., Knudsen B.S., Chinnaiyan A.M., Pienta K.J., Morrissey C., Tewari M. // *PLoS ONE* – 2013. – T. 8 – № 7 – C.e69239.

594. Souza M.F. de Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer / Souza M.F. de, Kuasne H., Barros-Filho M. de C., Cilião H.L., Marchi F.A., Fuganti P.E., Paschoal A.R., Rogatto S.R., Cólus I.M. de S. // PLOS ONE – 2017. – T. 12 – № 9 – C.e0184094.
595. Lichner Z. miRNAs dysregulated in association with Gleason grade regulate extracellular matrix, cytoskeleton and androgen receptor pathways / Lichner Z., Ding Q., Samaan S., Saleh C., Nasser A., Al-Haddad S., Samuel J.N., Fleshner N.E., Stephan C., Jung K., Yousef G.M. // The Journal of Pathology – 2015. – T. 237 – № 2 – C.226–237.
596. Xu Y. MiR-145 detection in urinary extracellular vesicles increase diagnostic efficiency of prostate cancer based on hydrostatic filtration dialysis method / Xu Y., Qin S., An T., Tang Y., Huang Y., Zheng L. // The Prostate – 2017. – T. 77 – № 10 – C.1167–1175.
597. Kumar B. MicroRNA expression and function in prostate cancer: a review of current knowledge and opportunities for discovery / Kumar B., Lupold S. // Asian Journal of Andrology – 2016. – T. 18 – № 4 – C.559.
598. Fredsøe J. Diagnostic and Prognostic MicroRNA Biomarkers for Prostate Cancer in Cell-free Urine / Fredsøe J., Rasmussen A.K.I., Thomsen A.R., Mouritzen P., Høyer S., Borre M., Ørntoft T.F., Sørensen K.D. // European Urology Focus – 2018. – T. 4 – № 6 – C.825–833.
599. Goto Y. The microRNA-23b/27b/24-1 cluster is a disease progression marker and tumor suppressor in prostate cancer / Goto Y., Kojima S., Nishikawa R., Enokida H., Chiyomaru T., Kinoshita T., Nakagawa M., Naya Y., Ichikawa T., Seki N. // Oncotarget – 2014. – T. 5 – № 17 – C.7748–7759.
600. Dhar S. Resveratrol and pterostilbene epigenetically restore PTEN expression by targeting oncomiRs of the miR-17 family in prostate cancer / Dhar S., Kumar A., Rimando A.M., Zhang X., Levenson A.S. // Oncotarget – 2015. – T. 6 – № 29 – C.27214–27226.
601. Maeno A. Up-regulation of miR-582-5p regulates cellular proliferation of prostate cancer cells under androgen-deprived conditions: miR-582-5p and Prostate Cancer / Maeno A., Terada N., Uegaki M., Goto T., Okada Y., Kobayashi T., Kamba T., Ogawa O., Inoue T. // The Prostate – 2014. – T. 74 – № 16 – C.1604–1612.
602. Walter B.A. Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer / Walter B.A., Valera V.A., Pinto P.A., Merino M.J. // Journal of Cancer – 2013. – T. 4 – № 5 – C.350–357.
603. Ramberg H. Regulation of PBX3 expression by androgen and Let-7d in prostate cancer / Ramberg H., Alshbib A., Berge V., Svindland A., Taskén K.A. // Molecular Cancer – 2011. – T. 10 – C.50.
604. Yin Y. [Expressions of 6 microRNAs in prostate cancer] / Yin Y., Li M., Li H., Jiang Y., Cao L.-Y., Zhang H.-F., Xu X.-C. // Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology – 2010. – T. 16 – № 7 – C.599–605.
605. Zhu J. Screening key microRNAs for castration-resistant prostate cancer based on miRNA/mRNA functional synergistic network / Zhu J., Wang S., Zhang W., Qiu J., Shan Y., Yang D., Shen B. // Oncotarget – 2015. – T. 6 – № 41 – C.43819–43830.
606. Egan S.M. miR-30e* is overexpressed in prostate cancer and promotes NF-κB-mediated proliferation and tumor growth / Egan S.M., Karasik E., Ellis L., Gollnick S.O. // Oncotarget – 2017. – T. 8 – № 40 – C.67626–67638.
607. Chiyomaru T. Genistein Suppresses Prostate Cancer Growth through Inhibition of Oncogenic MicroRNA-151 / Chiyomaru T., Yamamura S., Zaman M.S., Majid S., Deng G., Shahryari V., Saini S., Hirata H., Ueno K., Chang I., Tanaka Y., Tabatabai Z.L., Enokida H., Nakagawa M., Dahiya R. // PLoS ONE – 2012. – T. 7 – № 8 – C.e43812.
608. Luu H.N. miRNAs associated with prostate cancer risk and progression / Luu H.N., Lin H.-Y., Sørensen K.D., Ogunwobi O.O., Kumar N., Chornokur G., Phelan C., Jones D., Kidd L., Batra J., Yamoah K., Berglund A., Rounbehler R.J., Yang M., Lee S.H., Kang N., Kim S.J., Park J.Y., Di Pietro G. // BMC Urology – 2017. – T. 17 – № 1 – C.18.

609. Li D. MicroRNA-let-7f-1 is induced by lycopene and inhibits cell proliferation and triggers apoptosis in prostate cancer / Li D., Chen L., Zhao W., Hao J., An R. // *Molecular Medicine Reports* – 2016. – T. 13 – № 3 – C.2708–2714.
610. Endzeliņš E. Detection of circulating miRNAs: comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients / Endzeliņš E., Berger A., Melne V., Bajo-Santos C., Sobolevska K., Ābols A., Rodriguez M., Šantare D., Rudņickiha A., Lietuvietis V., Llorente A., Linē A. // *BMC Cancer* – 2017. – T. 17 – № 1 – C.730.
611. Cochetti G. Different levels of serum microRNAs in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: evaluation of potential diagnostic and prognostic role / Cochetti G., Poli G., Guelfi G., Boni A., Egidi M.G., Mearini E. // *OncoTargets and Therapy* – 2016. – T. Volume 9 – C.7545–7553.
612. Chen Z. A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer / Chen Z., Zhang G., Li H., Luo J., Li Z., Chen G., Yang J. // *The Prostate* – 2012. – T. 72 – № 13 – C.1443–1452.
613. Epis M.R. miR-331-3p Regulates ERBB-2 Expression and Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer / Epis M.R., Giles K.M., Barker A., Kendrick T.S., Leedman P.J. // *Journal of Biological Chemistry* – 2009. – T. 284 – № 37 – C.24696–24704.
614. Karatas O.F. miR-33a is a tumor suppressor microRNA that is decreased in prostate cancer / Karatas O.F., Wang J., Shao L., Ozen M., Zhang Y., Creighton C.J., Ittmann M. // *Oncotarget* – 2017. – T. 8 – № 36 – C.60243–60256.
615. Kirschner M.B. Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma / Kirschner M.B., Kao S.C., Edelman J.J., Armstrong N.J., Vallety M.P., Zandwijk N. van, Reid G. // *PLoS ONE* – 2011. – T. 6 – № 9 – C.e24145.
616. Покровский, В. Физиология человека / Покровский, В., Коротко, Г. – Москва, 1997. Вып. Медицина– 277–280с.
617. Givens R.C. Micro-RNA-451 and Measures of Hemolysis Associated with Left Ventricular Assist Device Implantation / Givens R.C., Moore D., Akashi H., Kato T., Naka Y., Takayama H., Mancini D.M., Schulze P.C. // *The Journal of Heart and Lung Transplantation* – 2013. – T. 32 – № 4 – C.S279.
618. Duijvesz D. Proteomic Profiling of Exosomes Leads to the Identification of Novel Biomarkers for Prostate Cancer / Duijvesz D., Burnum-Johnson K.E., Gritsenko M.A., Hoogland A.M., Vredenburg-van den Berg M.S., Willemsen R., Luidert T., Paša-Tolić L., Jenster G. // *PLoS ONE* – 2013. – T. 8 – № 12 – C.e82589.
619. Kharaziha P. Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel / Kharaziha P., Chioureas D., Rutishauser D., Baltatzis G., Lennartsson L., Fonseca P., Azimi A., Hultenby K., Zubarev R., Ullén A., Yachnin J., Nilsson S., Panaretakis T. // *Oncotarget* – 2015. – T. 6 – № 25 – C.21740–21754.
620. Fusté N.P. Characterization of cytoplasmic cyclin D1 as a marker of invasiveness in cancer / Fusté N.P., Castelblanco E., Felipe I., Santacana M., Fernández-Hernández R., Gatus S., Pedraza N., Pallarés J., Cemeli T., Valls J., Tarres M., Ferrezuelo F., Dolcet X., Matias-Guiu X., Garí E. // *Oncotarget* – 2016. – T. 7 – № 19 – C.26979–26991.
621. Leite K.R. Abnormal expression of MDM2 in prostate carcinoma / Leite K.R., Franco M.F., Srougi M., Nesrallah L.J., Nesrallah A., Bevilacqua R.G., Darini E., Carvalho C.M., Meirelles M.I., Santana I., Camara-Lopes L.H. // *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* – 2001. – T. 14 – № 5 – C.428–436.
622. Erdmann K. Induction of alpha-methylacyl-CoA racemase by miR-138 via up-regulation of β -catenin in prostate cancer cells / Erdmann K., Kaulke K., Rieger C., Wirth M.P., Fuessel S. // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* – 2017. – T. 143 – № 11 – C.2201–2210.

623. Tian B. let-7a and its target, insulin-like growth factor 1 receptor, are differentially expressed in recurrent prostate cancer / Tian B., Huo N., Li M., Li Y., He Z. // *International Journal of Molecular Medicine* – 2015. – T. 36 – № 5 – C.1409–1416.
624. Bostwick D.G. The association of benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate / Bostwick D.G., Cooner W.H., Denis L., Jones G.W., Scardino P.T., Murphy G.P. // *Cancer* – 1992. – T. 70 – № S1 – C.291–301.
625. Khazaei S. Global Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates According to the Human Development Index / Khazaei S., Rezaeian S., Ayubi E., Gholamalilee B., Pishkuhi M.A., Khazaei S., Mansori K., Nematollahi S., Sani M., Hanis S.M. // *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* – 2016. – T. 17 – № 8 – C.3793–3796.
626. Karube K. Study of Latent Carcinoma of the Prostate in the Japanese Based on Necropsy Material / Karube K. // *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* – 1961. – T. 74 – № 3 – C.265–285.
627. Guess H.A. Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer / Guess H.A. // *Epidemiologic Reviews* – 2001. – T. 23 – № 1 – C.152–158.
628. Bepalov V.G. [Relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: new opportunities for prostate cancer chemoprevention] / Bepalov V.G., Kuzhanov A.A., Vasilieva I.N., Semenov A.L., Alexandrov V.A. // *Voprosy Onkologii* – 2016. – T. 62 – № 2 – C.360–371.
629. Casanova-Salas I. Identification of miR-187 and miR-182 as Biomarkers of Early Diagnosis and Prognosis in Patients with Prostate Cancer Treated with Radical Prostatectomy / Casanova-Salas I., Rubio-Briones J., Calatrava A., Mancarella C., Masiá E., Casanova J., Fernández-Serra A., Rubio L., Ramírez-Backhaus M., Armiñán A., Domínguez-Escrig J., Martínez F., García-Casado Z., Scotlandi K., Vicent M.J., López-Guerrero J.A. // *Journal of Urology* – 2014. – T. 192 – № 1 – C.252–259.
630. Lewis H. miR-888 is an expressed prostatic secretions-derived microRNA that promotes prostate cell growth and migration / Lewis H., Lance R., Troyer D., Beydoun H., Hadley M., Orians J., Benzine T., Madric K., Semmes O.J., Drake R., Esquela-Kerscher A. // *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* – 2014. – T. 13 – № 2 – C.227–239.
631. Stephan C. Prostate-specific antigen and other serum and urine markers in prostate cancer / Stephan C., Ralla B., Jung K. // *Biochimica Et Biophysica Acta* – 2014. – T. 1846 – № 1 – C.99–112.
632. Egidi M.G. Stability Assessment of Candidate Reference Genes in Urine Sediment of Prostate Cancer Patients for miRNA Applications / Egidi M.G., Cochetti G., Guelfi G., Zampini D., Diverio S., Poli G., Mearini E. // *Disease Markers* – 2015. – T. 2015 – C.1–6.
633. Korzeniewski N. Identification of cell-free microRNAs in the urine of patients with prostate cancer / Korzeniewski N., Tosev G., Pahernik S., Hadaschik B., Hohenfellner M., Duensing S. // *Urologic Oncology* – 2015. – T. 33 – № 1 – C.16.e17–16.e22.
634. Haj-Ahmad T.A. Potential Urinary miRNA Biomarker Candidates for the Accurate Detection of Prostate Cancer among Benign Prostatic Hyperplasia Patients / Haj-Ahmad T.A., Abdalla M.A., Haj-Ahmad Y. // *Journal of Cancer* – 2014. – T. 5 – № 3 – C.182–191.
635. Salido-Guadarrama A.I. Urinary microRNA-based signature improves accuracy of detection of clinically relevant prostate cancer within the prostate-specific antigen grey zone / Salido-Guadarrama A.I., Morales-Montor J.G., Rangel-Escareño C., Langley E., Peralta-Zaragoza O., Cruz Colin J.L., Rodríguez-Dorantes M. // *Molecular Medicine Reports* – 2016. – T. 13 – № 6 – C.4549–4560.
636. Stuopelyte K. The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer / Stuopelyte K., Daniunaite K., Bakavicius A., Lazutka J.R., Jankevicius F., Jarmalaite S. // *British Journal of Cancer* – 2016. – T. 115 – № 6 – C.707–715.

637. Foj L. Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis / Foj L., Ferrer F., Serra M., Arévalo A., Gavagnach M., Giménez N., Filella X. // *The Prostate* – 2017. – T. 77 – № 6 – C.573–583.
638. Blume-Jensen P. Oncogenic kinase signalling / Blume-Jensen P., Hunter T. // *Nature* – 2001. – T. 411 – № 6835 – C.355–365.
639. Salomon D.S. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies / Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N. // *Critical Reviews in Oncology/Hematology* – 1995. – T. 19 – № 3 – C.183–232.
640. Yarden Y. Untangling the ErbB signalling network / Yarden Y., Sliwkowski M.X. // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* – 2001. – T. 2 – № 2 – C.127–137.
641. Brizzolara A. The ErbB family and androgen receptor signaling are targets of Celecoxib in prostate cancer / Brizzolara A., Benelli R., Venè R., Barboro P., Poggi A., Tosetti F., Ferrari N. // *Cancer Letters* – 2017. – T. 400 – C.9–17.
642. Sanguedolce F. Urine TMPRSS2: ERG Fusion Transcript as a Biomarker for Prostate Cancer: Literature Review / Sanguedolce F., Cormio A., Brunelli M., D'Amuri A., Carrieri G., Bufo P., Cormio L. // *Clinical Genitourinary Cancer* – 2016. – T. 14 – № 2 – C.117–121.
643. Schaefer A. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of microRNAs in urologic tumors / Schaefer A., Stephan C., Busch J., Yousef G.M., Jung K. // *Nature Reviews. Urology* – 2010. – T. 7 – № 5 – C.286–297.
644. Kong D. miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells / Kong D., Li Y., Wang Z., Banerjee S., Ahmad A., Kim H.-R.C., Sarkar F.H. // *Stem Cells (Dayton, Ohio)* – 2009. – T. 27 – № 8 – C.1712–1721.
645. Hao Y. Improvement of prostate cancer detection by integrating the PSA test with miRNA expression profiling / Hao Y., Zhao Y., Zhao X., He C., Pang X., Wu T.C., Califano J.A., Gu X. // *Cancer Investigation* – 2011. – T. 29 – № 4 – C.318–324.
646. Wang S.-Y. miR-19, miR-345, miR-519c-5p serum levels predict adverse pathology in prostate cancer patients eligible for active surveillance / Wang S.-Y., Shiboski S., Belair C.D., Cooperberg M.R., Simko J.P., Stoppler H., Cowan J., Carroll P.R., Blleloch R. // *PloS One* – 2014. – T. 9 – № 6 – C.e98597.
647. Schaefer A. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma / Schaefer A., Jung M., Mollenkopf H.-J., Wagner I., Stephan C., Jentzmik F., Miller K., Lein M., Kristiansen G., Jung K. // *International Journal of Cancer* – 2010. – T. 126 – № 5 – C.1166–1176.
648. Tong A.W. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers / Tong A.W., Fulgham P., Jay C., Chen P., Khalil I., Liu S., Senzer N., Eklund A.C., Han J., Nemunaitis J. // *Cancer Gene Therapy* – 2009. – T. 16 – № 3 – C.206–216.
649. Volinia S. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets / Volinia S., Calin G.A., Liu C.-G., Ambs S., Cimmino A., Petrocca F., Visone R., Iorio M., Roldo C., Ferracin M., Prueitt R.L., Yanaihara N., Lanza G., Scarpa A., Vecchione A., Negrini M., Harris C.C., Croce C.M. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2006. – T. 103 – № 7 – C.2257–2261.
650. Porkka K.P. MicroRNA expression profiling in prostate cancer / Porkka K.P., Pfeiffer M.J., Waltering K.K., Vessella R.L., Tammela T.L.J., Visakorpi T. // *Cancer Research* – 2007. – T. 67 – № 13 – C.6130–6135.
651. Ozen M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer / Ozen M., Creighton C.J., Ozdemir M., Ittmann M. // *Oncogene* – 2008. – T. 27 – № 12 – C.1788–1793.

652. Ambs S. Genomic Profiling of MicroRNA and Messenger RNA Reveals Dereglated MicroRNA Expression in Prostate Cancer / Ambs S., Prueitt R.L., Yi M., Hudson R.S., Howe T.M., Petrocca F., Wallace T.A., Liu C.-G., Volinia S., Calin G.A., Yfantis H.G., Stephens R.M., Croce C.M. // *Cancer Research* – 2008. – T. 68 – № 15 – C.6162–6170.
653. Nguyen H.C.N. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer / Nguyen H.C.N., Xie W., Yang M., Hsieh C.-L., Drouin S., Lee G.-S.M., Kantoff P.W. // *The Prostate* – 2013. – T. 73 – № 4 – C.346–354.
654. Hühn D. miR-19, a component of the oncogenic miR-17~92 cluster, targets the DNA-end resection factor CtIP / Hühn D., Kousholt A.N., Sørensen C.S., Sartori A.A. // *Oncogene* – 2015. – T. 34 – № 30 – C.3977–3984.
655. Kristensen H. Novel diagnostic and prognostic classifiers for prostate cancer identified by genome-wide microRNA profiling / Kristensen H., Thomsen A.R., Haldrup C., Dyrskjød L., Høyer S., Borre M., Mouritzen P., Ørntoft T.F., Sørensen K.D. // *Oncotarget* – 2016. – T. 7 – № 21 – C.30760–30771.
656. Erdmann K. Elevated expression of prostate cancer-associated genes is linked to down-regulation of microRNAs / Erdmann K., Kaulke K., Thomae C., Huebner D., Seron M., Froehner M., Wirth M.P., Fuessel S. // *BMC Cancer* – 2014. – T. 14 – № 1 – C.82.
657. Watahiki A. MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer / Watahiki A., Wang Y., Morris J., Dennis K., O'Dwyer H.M., Gleave M., Gout P.W., Wang Y. // *PloS One* – 2011. – T. 6 – № 9 – C.e24950.
658. Pasqualini L. miR-22 and miR-29a Are Members of the Androgen Receptor Cistrome Modulating LAMC1 and Mcl-1 in Prostate Cancer / Pasqualini L., Bu H., Puhr M., Narisu N., Rainer J., Schlick B., Schäfer G., Angelova M., Trajanoski Z., Börno S.T., Schweiger M.R., Fuchsberger C., Klocker H. // *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* – 2015. – T. 29 – № 7 – C.1037–1054.
659. Selth L.A. A ZEB1-miR-375-YAP1 pathway regulates epithelial plasticity in prostate cancer / Selth L.A., Das R., Townley S.L., Coutinho I., Hanson A.R., Centenera M.M., Stylianou N., Sweeney K., Soekmadji C., Jovanovic L., Nelson C.C., Zoubeydi A., Butler L.M., Goodall G.J., Hollier B.G., Gregory P.A., Tilley W.D. // *Oncogene* – 2017. – T. 36 – № 1 – C.24–34.
660. Tucci P. Loss of p63 and its microRNA-205 target results in enhanced cell migration and metastasis in prostate cancer / Tucci P., Agostini M., Grespi F., Markert E.K., Terrinoni A., Vousden K.H., Muller P.A.J., Dötsch V., Kehrloesser S., Sayan B.S., Giaccone G., Lowe S.W., Takahashi N., Vandenabeele P., Knight R.A., Levine A.J., Melino G. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2012. – T. 109 – № 38 – C.15312–15317.
661. Gandellini P. miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon / Gandellini P., Folini M., Longoni N., Pennati M., Binda M., Colecchia M., Salvioni R., Supino R., Moretti R., Limonta P., Valdagni R., Daidone M.G., Zaffaroni N. // *Cancer Research* – 2009. – T. 69 – № 6 – C.2287–2295.
662. Szczyrba J. Downregulation of Sec23A protein by miRNA-375 in prostate carcinoma / Szczyrba J., Nolte E., Wach S., Kremmer E., Stöhr R., Hartmann A., Wieland W., Wullich B., Grässer F.A. // *Molecular cancer research: MCR* – 2011. – T. 9 – № 6 – C.791–800.
663. White R.W. deVere MicroRNAs and their potential for translation in prostate cancer / White R.W. deVere, Vinall R.L., Tepper C.G., Shi X.-B. // *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* – 2009. – T. 27 – № 3 – C.307–311.
664. Verdoodt B. MicroRNA-205, a novel regulator of the anti-apoptotic protein Bcl2, is downregulated in prostate cancer / Verdoodt B., Neid M., Vogt M., Kuhn V., Liffers S.-T., Palisaar R.-J., Noldus J., Tannapfel A., Mirmohammadsadegh A. // *International Journal of Oncology* – 2013. – T. 43 – № 1 – C.307–314.

665. Fan Y. miR-19b promotes tumor growth and metastasis via targeting TP53 / Fan Y., Yin S., Hao Y., Yang J., Zhang H., Sun C., Ma M., Chang Q., Xi J.J. // *RNA* (New York, N.Y.) – 2014. – T. 20 – № 6 – C.765–772.
666. Fredsøe J. Independent Validation of a Diagnostic Noninvasive 3-MicroRNA Ratio Model (uCaP) for Prostate Cancer in Cell-Free Urine / Fredsøe J., Rasmussen A.K.I., Laursen E.B., Cai Y., Howard K.A., Pedersen B.G., Borre M., Mouritzen P., Ørntoft T., Sørensen K.D. // *Clinical Chemistry* – 2019. – T. 65 – № 4 – C.540–548.
667. Andersson D. Ultrasensitive circulating tumor DNA analysis enables precision medicine: experimental workflow considerations / Andersson D., Kristiansson H., Kubista M., Ståhlberg A. // *Expert Review of Molecular Diagnostics* – 2021. – T. 21 – № 3 – C.299–310.
668. Martins-Ferreira R. The Potential of Circulating Cell-Free DNA Methylation as an Epilepsy Biomarker / Martins-Ferreira R., Leal B.G., Costa P.P. // *Frontiers in Cellular Neuroscience* – 2022. – T. 16 – C.852151.
669. Hu Z. The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion / Hu Z., Chen H., Long Y., Li P., Gu Y. // *Critical Reviews in Oncology/Hematology* – 2021. – T. 157 – C.103166.
670. Lister R. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences / Lister R., Pelizzola M., Dowen R.H., Hawkins R.D., Hon G., Tonti-Filippini J., Nery J.R., Lee L., Ye Z., Ngo Q.-M., Edsall L., Antosiewicz-Bourget J., Stewart R., Ruotti V., Millar A.H., Thomson J.A., Ren B., Ecker J.R. // *Nature* – 2009. – T. 462 – № 7271 – C.315–322.
671. Lu L. Genetic profiling of cancer with circulating tumor DNA analysis / Lu L., Bi J., Bao L. // *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* – 2018. – T. 45 – № 2 – C.79–85.
672. Martignano F. GSTP1 Methylation and Protein Expression in Prostate Cancer: Diagnostic Implications / Martignano F., Gurioli G., Salvi S., Calistri D., Costantini M., Gunelli R., De Giorgi U., Foca F., Casadio V. // *Disease Markers* – 2016. – T. 2016 – C.4358292.
673. Liu R. A systematic review and quantitative assessment of methylation biomarkers in fecal DNA and colorectal cancer and its precursor, colorectal adenoma / Liu R., Su X., Long Y., Zhou D., Zhang X., Ye Z., Ma J., Tang T., Wang F., He C. // *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* – 2019. – T. 779 – C.45–57.
674. Sherwood K. Characteristics, properties, and potential applications of circulating cell-free dna in clinical diagnostics: a focus on transplantation / Sherwood K., Weimer E.T. // *Journal of Immunological Methods* – 2018. – T. 463 – C.27–38.
675. Gurioli G. GSTP1 methylation in cancer: a liquid biopsy biomarker? / Gurioli G., Martignano F., Salvi S., Costantini M., Gunelli R., Casadio V. // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* – 2018. – T. 56 – № 5 – C.702–717.
676. Kim J.H. Deep sequencing reveals distinct patterns of DNA methylation in prostate cancer / Kim J.H., Dhanasekaran S.M., Prensner J.R., Cao X., Robinson D., Kalyana-Sundaram S., Huang C., Shankar S., Jing X., Iyer M., Hu M., Sam L., Grasso C., Maher C.A., Palanisamy N., Mehra R., Kominsky H.D., Siddiqui J., Yu J., Qin Z.S., Chinnaiyan A.M. // *Genome Research* – 2011. – T. 21 – № 7 – C.1028–1041.
677. Bryzgunova O.E. Concentration of cell-free DNA in different tumor types / Bryzgunova O.E., Konoshenko M.Y., Laktionov P.P. // *Expert Review of Molecular Diagnostics* – 2021. – T. 21 – № 1 – C.63–75.
678. Volik S. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies / Volik S., Alcaide M., Morin R.D., Collins C. // *Molecular Cancer Research* – 2016. – T. 14 – № 10 – C.898–908.
679. Bryzgunova O.E. Redistribution of Free- and Cell-Surface-Bound DNA in Blood of Benign and Malignant Prostate Tumor Patients / Bryzgunova O.E., Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Yarmoshchuk S.V., Permyakova V.I., Anykeeva O.Y., Laktionov P.P. // *Acta Naturae* – 2015. – T. 7 – № 2 – C.115–118.

680. Dudani J.S. Classification of prostate cancer using a protease activity nanosensor library / Dudani J.S., Ibrahim M., Kirkpatrick J., Warren A.D., Bhatia S.N. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2018. – Т. 115 – № 36 – С.8954–8959.
681. Dekker L.J.M. Differential expression of protease activity in serum samples of prostate carcinoma patients with metastases / Dekker L.J.M., Burgers P.C., Charif H., Rijswijk A.L.C.T. van, Titulaer M.K., Jenster G., Bischoff R., Bangma C.H., Luider T.M. // *PROTEOMICS* – 2010. – Т. 10 – № 12 – С.2348–2358.
682. Balian A. Nucleases as molecular targets for cancer diagnosis / Balian A., Hernandez F.J. // *Biomarker Research* – 2021. – Т. 9 – № 1 – С.86.
683. Prince W.S. Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum / Prince W.S., Baker D.L., Dodge A.H., Ahmed A.E., Chestnut R.W., Sinicropi D.V. // *Clinical and Experimental Immunology* – 1998. – Т. 113 – № 2 – С.289–296.
684. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects / Turk B. // *Nature Reviews. Drug Discovery* – 2006. – Т. 5 – № 9 – С.785–799.
685. Новицкий, В. В. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы / Новицкий, В. В., Рязанцева, Н. В., Степовая, Е. А., Федорова, Т. С., Кравец, Е. Б., Иванов, В. В., Жаворонок, Т. В., Часовских, Н. Ю., Чудакова, О. М., Бутусова, В. Н., Яковлева, Н. М. // *Бюл. сиб. медицины*. – 2006. – Т. 2 – С.62–69.
686. Kitchen M.O. HumanMethylation450K Array–Identified Biomarkers Predict Tumour Recurrence/Progression at Initial Diagnosis of High-risk Non-muscle Invasive Bladder Cancer / Kitchen M.O., Bryan R.T., Emes R.D., Luscombe C.J., Cheng K., Zeegers M.P., James N.D., Gommersall L.M., Fryer A.A. // *Biomarkers in Cancer* – 2018. – Т. 10 – С.1179299X1775192.
687. Pisanic T.R. DREAMing: a simple and ultrasensitive method for assessing intratumor epigenetic heterogeneity directly from liquid biopsies / Pisanic T.R., Athamanolap P., Poh W., Chen C., Hulbert A., Brock M.V., Herman J.G., Wang T.-H. // *Nucleic Acids Research* – 2015. – Т. 43 – № 22 – С.e154–e154.
688. Vinci G. Gestational age-related patterns of AMOT methylation are revealed in preterm infant endothelial progenitors / Vinci G., Buffat C., Simoncini S., Boubred F., Ligi I., Dumont F., Le Bonniec B., Fournier T., Vaiman D., Dignat-George F., Simeoni U. // *PLOS ONE* – 2017. – Т. 12 – № 10 – С.e0186321.
689. Jeon J.-P. Differential DNA methylation of MSI2 and its correlation with diabetic traits / Jeon J.-P., Koh I.-U., Choi N.-H., Kim B.-J., Han B.-G., Lee S. // *PLOS ONE* – 2017. – Т. 12 – № 5 – С.e0177406.
690. Giarraputo J. Medical morbidities and DNA methylation of NR3C1 in preterm infants / Giarraputo J., DeLoach J., Padbury J., Uzun A., Marsit C., Hawes K., Lester B. // *Pediatric Research* – 2017. – Т. 81 – № 1 – С.68–74.
691. Warr A. Exome Sequencing: Current and Future Perspectives / Warr A., Robert C., Hume D., Archibald A., Deeb N., Watson M. // *G3 Genes|Genomes|Genetics* – 2015. – Т. 5 – № 8 – С.1543–1550.
692. Adamowicz M. Multiplexed DNA Methylation Analysis of Target Regions Using Microfluidics (Fluidigm) *Methods in Molecular Biology* // под ред. J. Tost. New York, NY: Springer New York, 2018. – 349–363с.
693. How Kit A. DNA methylation based biomarkers: Practical considerations and applications / How Kit A., Nielsen H.M., Tost J. // *Biochimie* – 2012. – Т. 94 – № 11 – С.2314–2337.
694. Levenson V.V. DNA methylation as a universal biomarker / Levenson V.V. // *Expert Review of Molecular Diagnostics* – 2010. – Т. 10 – № 4 – С.481–488.
695. Koochekpour S. Genetic and epigenetic changes in human prostate cancer / Koochekpour S. // *Iranian Red Crescent Medical Journal* – 2011. – Т. 13 – № 2 – С.80–98.

696. Tirado-Magallanes R. Whole genome DNA methylation: beyond genes silencing / Tirado-Magallanes R., Rebbani K., Lim R., Pradhan S., Benoukraf T. // *Oncotarget* – 2017. – T. 8 – № 3 – C.5629–5637.
697. Lin X. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells / Lin X., Tascilar M., Lee W.H., Vles W.J., Lee B.H., Veeraswamy R., Asgari K., Freije D., Rees B. van, Gage W.R., Bova G.S., Isaacs W.B., Brooks J.D., DeWeese T.L., De Marzo A.M., Nelson W.G. // *The American Journal of Pathology* – 2001. – T. 159 – № 5 – C.1815–1826.
698. Ponomaryova A.A. [Dynamics of LINE-1 Retrotransposon Methylation Levels in Circulating DNA from Lung Cancer Patients Undergoing Antitumor Therapy] / Ponomaryova A.A., Cherdyntseva N.V., Bondar A.A., Dobrodeev A.Y., Zavyalov A.A., Tuzikov S.A., Vlassov V.V., Choinzonov E.L., Laktionov P.P., Rykova E.Y. // *Molekuliarnaia Biologiya* – 2017. – T. 51 – № 4 – C.622–628.
699. Tamkovich S. Size and Methylation Index of Cell-Free and Cell-Surface-Bound DNA in Blood of Breast Cancer Patients in the Contest of Liquid Biopsy / Tamkovich S., Tupikin A., Kozyakov A., Laktionov P. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2022. – T. 23 – № 16 – C.8919.
700. Meddeb R. Quantifying circulating cell-free DNA in humans / Meddeb R., Dache Z.A.A., Thezenas S., Otandault A., Tanos R., Pastor B., Sanchez C., Azzi J., Tusch G., Azan S., Mollevi C., Adenis A., El Messaoudi S., Blache P., Thierry A.R. // *Scientific Reports* – 2019. – T. 9 – № 1 – C.5220.
701. Hohaus S. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas / Hohaus S., Giachelia M., Massini G., Mansueto G., Vannata B., Bozzoli V., Criscuolo M., D'Alò F., Martini M., Larocca L.M., Voso M.T., Leone G. // *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* – 2009. – T. 20 – № 8 – C.1408–1413.
702. Drift M.A. van der Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer / Drift M.A. van der, Hol B.E.A., Klaassen C.H.W., Prinsen C.F.M., Aarssen Y.A.W.G. van, Donders R., Stappen J.W.J. van der, Dekhuijzen P.N.R., Heijden H.F.M. van der, Thunnissen F.B.J.M. // *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* – 2010. – T. 68 – № 2 – C.283–287.
703. Lin L.-H. Increased Plasma Circulating Cell-Free DNA Could Be a Potential Marker for Oral Cancer / Lin L.-H., Chang K.-W., Kao S.-Y., Cheng H.-W., Liu C.-J. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2018. – T. 19 – № 11 – C.3303.
704. Shao X. Quantitative analysis of cell-free DNA in ovarian cancer / Shao X., He Y., Ji M., Chen X., Qi J., Shi W., Hao T., Ju S. // *Oncology Letters* – 2015. – T. 10 – № 6 – C.3478–3482.
705. Tomita H. Quantification of circulating plasma DNA fragments as tumor markers in patients with esophageal cancer / Tomita H., Ichikawa D., Ikoma D., Sai S., Tani N., Ikoma H., Fujiwara H., Kikuchi S., Okamoto K., Ochiai T., Otsuji E. // *Anticancer Research* – 2007. – T. 27 – № 4C – C.2737–2741.
706. Salvianti F. Multiparametric analysis of cell-free DNA in melanoma patients / Salvianti F., Pinzani P., Verderio P., Ciniselli C.M., Massi D., De Giorgi V., Grazzini M., Pazzagli M., Orlando C. // *PloS One* – 2012. – T. 7 – № 11 – C.e49843.
707. Shin C. Increased cell-free DNA concentrations in patients with obstructive sleep apnea / Shin C., Kim J.K., Kim J.H., Jung K.H., Cho K.J., Lee C.K., Lee S.G. // *Psychiatry and Clinical Neurosciences* – 2008. – T. 62 – № 6 – C.721–727.
708. Chun F.K. -H. Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer / Chun F.K. -H., Müller I., Lange I., Friedrich M.G., Erbersdobler A., Karakiewicz P.I., Graefen M., Pantel K., Huland H., Schwarzenbach H. // *BJU International* – 2006. – T. 98 – № 3 – C.544–548.
709. Taback B. Quantification of circulating DNA in the plasma and serum of cancer patients / Taback B., O'Day S.J., Hoon D.S.B. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2004. – T. 1022 – C.17–24.

710. Jung K. Increased cell-free DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer / Jung K., Stephan C., Lewandowski M., Klotzek S., Jung M., Kristiansen G., Lein M., Loening S.A., Schnorr D. // *Cancer Letters* – 2004. – T. 205 – № 2 – C.173–180.
711. Boddy J.L. Prospective Study of Quantitation of Plasma DNA Levels in the Diagnosis of Malignant versus Benign Prostate Disease / Boddy J.L., Gal S., Malone P.R., Harris A.L., Wainscoat J.S. // *Clinical Cancer Research* – 2005. – T. 11 – № 4 – C.1394–1399.
712. Laktionov P.P. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease / Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Sumarokov S.V., Kolomiets S.A., Sevostianova N.V., Vlassov V.V. // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* – 2004. – T. 23 – № 6–7 – C.879–883.
713. Tamkovich S.N. Plasma content of extracellular nucleic acids in donors and patients with mammary tumors / Tamkovich S.N., Laktionov P.P., Rykova E.Y., Starikov A.V., Skvortsova T.E., Kuznetsova N.P., Permyakova V.I., Vlasov V.V. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* – 2005. – T. 139 – № 4 – C.465–467.
714. Tamkovich S.N. [Circulating nucleic acids in blood of patients with stomach and colon neoplasms] / Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Rykova E.I., Kolesnikova E.V., Shelestiuk P.I., Laktionov P.P., Vlasov V.V. // *Biomeditsinskaia Khimiia* – 2005. – T. 51 – № 3 – C.321–328.
715. Allen D. Role of Cell-Free Plasma DNA as a Diagnostic Marker for Prostate Cancer / Allen D., Butt A., Cahill D., Wheeler M., Popert R., Swaminathan R. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2004. – T. 1022 – № 1 – C.76–80.
716. Steinman C.R. Appearance of circulating DNA during hemodialysis / Steinman C.R., Ackad A. // *The American Journal of Medicine* – 1977. – T. 62 – № 5 – C.693–697.
717. Liang X. MicroRNA-1297 inhibits prostate cancer cell proliferation and invasion by targeting the AEG-1/Wnt signaling pathway / Liang X., Li H., Fu D., Chong T., Wang Z., Li Z. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2016. – T. 480 – № 2 – C.208–214.
718. Majid S. miRNA-34b inhibits prostate cancer through demethylation, active chromatin modifications, and AKT pathways / Majid S., Dar A.A., Saini S., Shahryari V., Arora S., Zaman M.S., Chang I., Yamamura S., Tanaka Y., Chiyomaru T., Deng G., Dahiya R. // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* – 2013. – T. 19 – № 1 – C.73–84.
719. Zhang G.-M. MicroRNA-302a Suppresses Tumor Cell Proliferation by Inhibiting AKT in Prostate Cancer / Zhang G.-M., Bao C.-Y., Wan F.-N., Cao D.-L., Qin X.-J., Zhang H.-L., Zhu Y., Dai B., Shi G.-H., Ye D.-W. // *PloS One* – 2015. – T. 10 – № 4 – C.e0124410.
720. Li J.-Z. MicroRNA-495 Regulates Migration and Invasion in Prostate Cancer Cells Via Targeting Akt and mTOR Signaling / Li J.-Z., Wang Z.-L., Xu W.-H., Li Q., Gao L., Wang Z.-M. // *Cancer Investigation* – 2016. – T. 34 – № 4 – C.181–188.
721. Kaulke K. 302 MicroRNA-26a targets the prostate cancer-associated genes AMACR and TRPM8 / Kaulke K., Erdmann K., Füssel S., Wirth M.P. // *European Urology Supplements* – 2014. – T. 13 – № 1 – C.e302.
722. Xie H. Infiltrated pre-adipocytes increase prostate cancer metastasis via modulation of the miR-301a/androgen receptor (AR)/TGF- β 1/Smad/MMP9 signals / Xie H., Li L., Zhu G., Dang Q., Ma Z., He D., Chang L., Song W., Chang H.-C., Krolewski J.J., Nastiuk K.L., Yeh S., Chang C. // *Oncotarget* – 2015. – T. 6 – № 14 – C.12326–12339.
723. Wang C. [miR-141-3p regulates the expression of androgen receptor by targeting its 3'UTR in prostate cancer LNCaP cells] / Wang C., Ouyang Y., Lu M., Wei J., Zhang H. // *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* = Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology – 2015. – T. 31 – № 6 – C.736–739.

724. Leite K.R.M. The role of microRNAs 371 and 34a in androgen receptor control influencing prostate cancer behavior / Leite K.R.M., Morais D.R., Florez M.G., Reis S.T., Iscaife A., Viana N., Moura C.M., Silva I.A., Katz B.S., Pontes J., Nesrallah A., Srougi M. // *Urologic Oncology* – 2015. – T. 33 – № 6 – C.267.e15–22.
725. Hu S. Infiltrating T cells promote prostate cancer metastasis via modulation of FGF11→miRNA-541→androgen receptor (AR)→MMP9 signaling / Hu S., Li L., Yeh S., Cui Y., Li X., Chang H.-C., Jin J., Chang C. // *Molecular Oncology* – 2015. – T. 9 – № 1 – C.44–57.
726. Takeshita F. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes / Takeshita F., Patrawala L., Osaki M., Takahashi R., Yamamoto Y., Kosaka N., Kawamata M., Kelnar K., Bader A.G., Brown D., Ochiya T. // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* – 2010. – T. 18 – № 1 – C.181–187.
727. Bonci D. The miR-15a–miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities / Bonci D., Coppola V., Musumeci M., Addario A., Giuffrida R., Memeo L., D’Urso L., Pagliuca A., Biffoni M., Labbaye C., Bartucci M., Muto G., Peschle C., De Maria R. // *Nature Medicine* – 2008. – T. 14 – № 11 – C.1271–1277.
728. Hagman Z. miR-34c is downregulated in prostate cancer and exerts tumor suppressive functions / Hagman Z., Larne O., Edsjö A., Bjartell A., Ehrnström R.A., Ulmert D., Lilja H., Ceder Y. // *International Journal of Cancer* – 2010. – T. 127 – № 12 – C.2768–2776.
729. Kojima K. MiR-34a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory prostate cancer PC3 cells through direct and indirect mechanisms / Kojima K., Fujita Y., Nozawa Y., Deguchi T., Ito M. // *The Prostate* – 2010. – T. 70 – № 14 – C.1501–1512.
730. Musumeci M. Control of tumor and microenvironment cross-talk by miR-15a and miR-16 in prostate cancer / Musumeci M., Coppola V., Addario A., Patrizii M., Maugeri-Saccà M., Memeo L., Colarossi C., Francescangeli F., Biffoni M., Collura D., Giacobbe A., D’Urso L., Falchi M., Venneri M.A., Muto G., De Maria R., Bonci D. // *Oncogene* – 2011. – T. 30 – № 41 – C.4231–4242.
731. Lin Y.-C. Tumor suppressor miRNA-204-5p promotes apoptosis by targeting BCL2 in prostate cancer cells / Lin Y.-C., Lin J.-F., Tsai T.-F., Chou K.-Y., Chen H.-E., Hwang T.I.-S. // *Asian Journal of Surgery* – 2017. – T. 40 – № 5 – C.396–406.
732. Chiyomaru T. Genistein Up-Regulates Tumor Suppressor MicroRNA-574-3p in Prostate Cancer / Chiyomaru T., Yamamura S., Fukuhara S., Hidaka H., Majid S., Saini S., Arora S., Deng G., Shahryari V., Chang I., Tanaka Y., Tabatabai Z.L., Enokida H., Seki N., Nakagawa M., Dahiya R. // *PLoS ONE* – 2013. – T. 8 – № 3 – C.e58929.
733. Guo J. MicroRNA-195 suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting BCOX1 in prostate carcinoma / Guo J., Wang M., Liu X. // *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* – 2015. – T. 34 – № 1 – C.91.
734. Viticchiè G. MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines / Viticchiè G., Lena A.M., Latina A., Formosa A., Gregersen L.H., Lund A.H., Bernardini S., Mauriello A., Miano R., Spagnoli L.G., Knight R.A., Candi E., Melino G. // *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* – 2011. – T. 10 – № 7 – C.1121–1131.
735. Saini S. Regulatory Role of mir-203 in Prostate Cancer Progression and Metastasis / Saini S., Majid S., Yamamura S., Tabatabai L., Suh S.O., Shahryari V., Chen Y., Deng G., Tanaka Y., Dahiya R. // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* – 2011. – T. 17 – № 16 – C.5287–5298.
736. Zhang C. Phenethyl isothiocyanate (PEITC) suppresses prostate cancer cell invasion epigenetically through regulating microRNA-194 / Zhang C., Shu L., Kim H., Khor T.O., Wu R., Li W., Kong A.-N.T. // *Molecular Nutrition & Food Research* – 2016. – T. 60 – № 6 – C.1427–1436.

737. Jiang C.-Y. MiR-185 attenuates androgen receptor function in prostate cancer indirectly by targeting bromodomain containing 8 isoform 2, an androgen receptor co-activator / Jiang C.-Y., Ruan Y., Wang X.-H., Zhao W., Jiang Q., Jing Y.-F., Han B.-M., Xia S.-J., Zhao F.-J. // *Molecular and Cellular Endocrinology* – 2016. – T. 427 – C.13–20.
738. Murata T. miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression / Murata T., Takayama K., Katayama S., Urano T., Horie-Inoue K., Ikeda K., Takahashi S., Kawazu C., Hasegawa A., Ouchi Y., Homma Y., Hayashizaki Y., Inoue S. // *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* – 2010. – T. 13 – № 4 – C.356–361.
739. Noonan E.J. miR-449a causes Rb-dependent cell cycle arrest and senescence in prostate cancer cells / Noonan E.J., Place R.F., Basak S., Pookot D., Li L.-C. // *Oncotarget* – 2010. – T. 1 – № 5 – C.349–358.
740. Kaukonen K.M. Epigenetically altered miR-193b targets cyclin D1 in prostate cancer / Kaukonen K.M., Rauhalta H.E., Scaravilli M., Latonen L., Annala M., Vessella R.L., Nykter M., Tammela T.L.J., Visakorpi T. // *Cancer Medicine* – 2015. – T. 4 – № 9 – C.1417–1425.
741. Dong Q. MicroRNA Let-7a Inhibits Proliferation of Human Prostate Cancer Cells In Vitro and In Vivo by Targeting E2F2 and CCND2 / Dong Q., Meng P., Wang T., Qin W., Qin W., Wang F., Yuan J., Chen Z., Yang A., Wang H. // *PLoS ONE* – 2010. – T. 5 – № 4 – C.e10147.
742. Lodygin D. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer / Lodygin D., Tarasov V., Epanchintsev A., Berking C., Knyazeva T., Körner H., Knyazev P., Diebold J., Hermeking H. // *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* – 2008. – T. 7 – № 16 – C.2591–2600.
743. Liu C. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44 / Liu C., Kelnar K., Liu B., Chen X., Calhoun-Davis T., Li H., Patrawala L., Yan H., Jeter C., Honorio S., Wiggins J.F., Bader A.G., Fagin R., Brown D., Tang D.G. // *Nature Medicine* – 2011. – T. 17 – № 2 – C.211–215.
744. Huang S. miR-143 and miR-145 inhibit stem cell characteristics of PC-3 prostate cancer cells / Huang S., Guo W., Tang Y., Ren D., Zou X., Peng X. // *Oncology Reports* – 2012. – T. 28 – № 5 – C.1831–1837.
745. Yang K. MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro / Yang K., Handorean A.M., Iczkowski K.A. // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* – 2009. – T. 2 – № 4 – C.361–369.
746. Ru P. miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition signaling / Ru P., Steele R., Newhall P., Phillips N.J., Toth K., Ray R.B. // *Molecular Cancer Therapeutics* – 2012. – T. 11 – № 5 – C.1166–1173.
747. Yamamura S. MicroRNA-34a modulates c-Myc transcriptional complexes to suppress malignancy in human prostate cancer cells / Yamamura S., Saini S., Majid S., Hirata H., Ueno K., Deng G., Dahiya R. // *PloS One* – 2012. – T. 7 – № 1 – C.e29722.
748. Zhang W. MicroRNA-382 inhibits prostate cancer cell proliferation and metastasis through targeting COUP-TFII / Zhang W., Liu J., Qiu J., Fu X., Tang Q., Yang F., Zhao Z., Wang H. // *Oncology Reports* – 2016. – T. 36 – № 6 – C.3707–3715.
749. Hao Y. Enforced expression of miR-101 inhibits prostate cancer cell growth by modulating the COX-2 pathway in vivo / Hao Y., Gu X., Zhao Y., Greene S., Sha W., Smoot D.T., Califano J., Wu T.-C., Pang X. // *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)* – 2011. – T. 4 – № 7 – C.1073–1083.
750. Zhang J. Downregulated microRNA-26a modulates prostate cancer cell proliferation and apoptosis by targeting COX-2 / Zhang J., Liang J., Huang J. // *Oncology Letters* – 2016. – T. 12 – № 5 – C.3397–3402.

751. Wang N. miR-205 is frequently downregulated in prostate cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting tumor growth / Wang N., Li Q., Feng N.-H., Cheng G., Guan Z.-L., Wang Y., Qin C., Yin C.-J., Hua L.-X. // *Asian Journal of Andrology* – 2013. – T. 15 – № 6 – C.735–741.
752. Ramalho-Carvalho J. Epigenetic disruption of miR-130a promotes prostate cancer by targeting SEC23B and DEPDC1 / Ramalho-Carvalho J., Martins J.B., Cekaite L., Sveen A., Torres-Ferreira J., Graça I., Costa-Pinheiro P., Eilertsen I.A., Antunes L., Oliveira J., Lothe R.A., Henrique R., Jerónimo C. // *Cancer Letters* – 2017. – T. 385 – C.150–159.
753. Zhong J. Inhibition of DIXDC1 by microRNA-1271 suppresses the proliferation and invasion of prostate cancer cells / Zhong J., Liu Y., Xu Q., Yu J., Zhang M. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2017. – T. 484 – № 4 – C.794–800.
754. Theodore S.C. MicroRNA profiling of novel African American and Caucasian Prostate Cancer cell lines reveals a reciprocal regulatory relationship of miR-152 and DNA methyltransferase 1 / Theodore S.C., Davis M., Zhao F., Wang H., Chen D., Rhim J., Dean-Colomb W., Turner T., Ji W., Zeng G., Grizzle W., Yates C. // *Oncotarget* – 2014. – T. 5 – № 11 – C.3512–3525.
755. Xue G. A feedback regulation between miR-145 and DNA methyltransferase 3b in prostate cancer cell and their responses to irradiation / Xue G., Ren Z., Chen Y., Zhu J., Du Y., Pan D., Li X., Hu B. // *Cancer Letters* – 2015. – T. 361 – № 1 – C.121–127.
756. Lee K.-H. MicroRNA-330 acts as tumor suppressor and induces apoptosis of prostate cancer cells through E2F1-mediated suppression of Akt phosphorylation / Lee K.-H., Chen Y.-L., Yeh S.-D., Hsiao M., Lin J.-T., Goan Y.-G., Lu P.-J. // *Oncogene* – 2009. – T. 28 – № 38 – C.3360–3370.
757. Tao T. Autoregulatory feedback loop of EZH2/miR-200c/E2F3 as a driving force for prostate cancer development / Tao T., Liu D., Liu C., Xu B., Chen S., Yin Y., Ang L., Huang Y., Zhang X., Chen M. // *Biochimica Et Biophysica Acta* – 2014. – T. 1839 – № 9 – C.858–865.
758. Xu B. MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer / Xu B., Wang N., Wang X., Tong N., Shao N., Tao J., Li P., Niu X., Feng N., Zhang L., Hua L., Wang Z., Chen M. // *The Prostate* – 2012. – T. 72 – № 11 – C.1171–1178.
759. Tao J. microRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells by targeting the epidermal growth factor receptor / Tao J., Wu D., Xu B., Qian W., Li P., Lu Q., Yin C., Zhang W. // *Oncology Reports* – 2012. – T. 27 – № 6 – C.1967–1975.
760. Giles K.M. MicroRNA regulation of growth factor receptor signaling in human cancer cells / Giles K.M., Barker A., Zhang P.M., Epis M.R., Leedman P.J. // *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* – 2011. – T. 676 – C.147–163.
761. El Bezawy R. miR-875-5p counteracts epithelial-to-mesenchymal transition and enhances radiation response in prostate cancer through repression of the EGFR-ZEB1 axis / El Bezawy R., Cominetti D., Fenderico N., Zuco V., Beretta G.L., Dugo M., Arrighetti N., Stucchi C., Rancati T., Valdagni R., Zaffaroni N., Gandellini P. // *Cancer Letters* – 2017. – T. 395 – C.53–62.
762. Clapé C. miR-143 Interferes with ERK5 Signaling, and Abrogates Prostate Cancer Progression in Mice / Clapé C., Fritz V., Henriquet C., Apparailly F., Fernandez P.L., Iborra F., Avancès C., Villalba M., Culine S., Fajas L. // *PLoS ONE* – 2009. – T. 4 – № 10 – C.e7542.
763. Tribollet V. miR-135a Inhibits the Invasion of Cancer Cells via Suppression of $ERR\alpha$ / Tribollet V., Barenton B., Kroiss A., Vincent S., Zhang L., Forcet C., Cerutti C., Périan S., Alloli N., Samarut J., Vanacker J.-M. // *PloS One* – 2016. – T. 11 – № 5 – C.e0156445.
764. Varambally S. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer / Varambally S., Cao Q., Mani R.-S., Shankar S., Wang X., Ateeq B., Laxman B., Cao X., Jing X.,

- Ramnarayanan K., Brenner J.C., Yu J., Kim J.H., Han B., Tan P., Kumar-Sinha C., Lonigro R.J., Palanisamy N., Maher C.A., Chinnaiyan A.M. // *Science* (New York, N.Y.) – 2008. – T. 322 – № 5908 – C.1695–1699.
765. Kong D. Loss of let-7 up-regulates EZH2 in prostate cancer consistent with the acquisition of cancer stem cell signatures that are attenuated by BR-DIM / Kong D., Heath E., Chen W., Cher M.L., Powell I., Heilbrun L., Li Y., Ali S., Sethi S., Hassan O., Hwang C., Gupta N., Chitale D., Sakr W.A., Menon M., Sarkar F.H. // *PloS One* – 2012. – T. 7 – № 3 – C.e33729.
766. Hudson R.S. MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer / Hudson R.S., Yi M., Esposito D., Watkins S.K., Hurwitz A.A., Yfantis H.G., Lee D.H., Borin J.F., Naslund M.J., Alexander R.B., Dorsey T.H., Stephens R.M., Croce C.M., Ambis S. // *Nucleic Acids Research* – 2012. – T. 40 – № 8 – C.3689–3703.
767. Das D.K. miR-1207-3p regulates the androgen receptor in prostate cancer via FNDC1/fibronectin / Das D.K., Naidoo M., Ilboudo A., Park J.Y., Ali T., Krampis K., Robinson B.D., Osborne J.R., Ogunwobi O.O. // *Experimental Cell Research* – 2016. – T. 348 – № 2 – C.190–200.
768. Wu J. MicroRNA-195-5p, a new regulator of Fra-1, suppresses the migration and invasion of prostate cancer cells / Wu J., Ji A., Wang X., Zhu Y., Yu Y., Lin Y., Liu Y., Li S., Liang Z., Xu X., Zheng X., Xie L. // *Journal of Translational Medicine* – 2015. – T. 13 – C.289.
769. Ren W. MicroRNA-613 represses prostate cancer cell proliferation and invasion through targeting Frizzled7 / Ren W., Li C., Duan W., Du S., Yang F., Zhou J., Xing J. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2016. – T. 469 – № 3 – C.633–638.
770. Fuse M. Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1 / Fuse M., Nohata N., Kojima S., Sakamoto S., Chiyomaru T., Kawakami K., Enokida H., Nakagawa M., Naya Y., Ichikawa T., Seki N. // *International Journal of Oncology* – 2011. – T. 38 – № 4 – C.1093–1101.
771. Liu C. miR-195 Inhibits EMT by Targeting FGF2 in Prostate Cancer Cells / Liu C., Guan H., Wang Y., Chen M., Xu B., Zhang L., Lu K., Tao T., Zhang X., Huang Y. // *PloS One* – 2015. – T. 10 – № 12 – C.e0144073.
772. Boll K. MiR-130a, miR-203 and miR-205 jointly repress key oncogenic pathways and are downregulated in prostate carcinoma / Boll K., Reiche K., Kasack K., Mörbt N., Kretzschmar A.K., Tamm J.M., Verhaegh G., Schalken J., Bergen M. von, Horn F., Hackermüller J. // *Oncogene* – 2013. – T. 32 – № 3 – C.277–285.
773. Gao P. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism / Gao P., Tchernyshyov I., Chang T.-C., Lee Y.-S., Kita K., Ochi T., Zeller K.I., De Marzo A.M., Van Eyk J.E., Mendell J.T., Dang C.V. // *Nature* – 2009. – T. 458 – № 7239 – C.762–765.
774. Kojima S. The tumor-suppressive microRNA-143/145 cluster inhibits cell migration and invasion by targeting GOLM1 in prostate cancer / Kojima S., Enokida H., Yoshino H., Itesako T., Chiyomaru T., Kinoshita T., Fuse M., Nishikawa R., Goto Y., Naya Y., Nakagawa M., Seki N. // *Journal of Human Genetics* – 2014. – T. 59 – № 2 – C.78–87.
775. Wang W.-X. Dysregulation of the mitogen granulin in human cancer through the miR-15/107 microRNA gene group / Wang W.-X., Kyprianou N., Wang X., Nelson P.T. // *Cancer Research* – 2010. – T. 70 – № 22 – C.9137–9142.
776. Formosa A. DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer / Formosa A., Lena A.M., Markert E.K., Cortelli S., Miano R., Mauriello A., Croce N., Vandesompele J., Mestdagh P., Finazzi-Agrò E., Levine A.J., Melino G., Bernardini S., Candi E. // *Oncogene* – 2013. – T. 32 – № 1 – C.127–134.
777. Noonan E.J. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer / Noonan E.J., Place R.F., Pookot D., Basak S., Whitson J.M., Hirata H., Giardina C., Dahiya R. // *Oncogene* – 2009. – T. 28 – № 14 – C.1714–1724.

778. Guo W. HEF1 promotes epithelial mesenchymal transition and bone invasion in prostate cancer under the regulation of microRNA-145 / Guo W., Ren D., Chen X., Tu X., Huang S., Wang M., Song L., Zou X., Peng X. // *Journal of Cellular Biochemistry* – 2013. – T. 114 – № 7 – C.1606–1615.
779. Wei J.-J. Regulation of HMGA1 expression by microRNA-296 affects prostate cancer growth and invasion / Wei J.-J., Wu X., Peng Y., Shi G., Basturk O., Yang X., Daniels G., Osman I., Ouyang J., Hernando E., Pellicer A., Rhim J.S., Melamed J., Lee P. // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* – 2011. – T. 17 – № 6 – C.1297–1305.
780. Zhang X. Downregulation of miR-195 promotes prostate cancer progression by targeting HMGA1 / Zhang X., Tao T., Liu C., Guan H., Huang Y., Xu B., Chen M. // *Oncology Reports* – 2016. – T. 36 – № 1 – C.376–382.
781. Wang L.-N. The miRNA let-7a1 inhibits the expression of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) in prostate cancer PC-3 cells / Wang L.-N., Chen W.-W., Zhang J., Li C.-Y., Liu C.-Y., Xue J., Zhang P.-J., Jiang A.-L. // *Asian Journal of Andrology* – 2013. – T. 15 – № 6 – C.753–758.
782. Kurozumi A. Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer / Kurozumi A., Goto Y., Matsushita R., Fukumoto I., Kato M., Nishikawa R., Sakamoto S., Enokida H., Nakagawa M., Ichikawa T., Seki N. // *Cancer Science* – 2016. – T. 107 – № 1 – C.84–94.
783. Xu B. miR-143 decreases prostate cancer cells proliferation and migration and enhances their sensitivity to docetaxel through suppression of KRAS / Xu B., Niu X., Zhang X., Tao J., Wu D., Wang Z., Li P., Zhang W., Wu H., Feng N., Wang Z., Hua L., Wang X. // *Molecular and Cellular Biochemistry* – 2011. – T. 350 – № 1–2 – C.207–213.
784. Nishikawa R. Tumor-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion via targeting LAMC1 in prostate cancer / Nishikawa R., Goto Y., Kojima S., Enokida H., Chiyomaru T., Kinoshita T., Sakamoto S., Fuse M., Nakagawa M., Naya Y., Ichikawa T., Seki N. // *International Journal of Oncology* – 2014. – T. 45 – № 1 – C.401–410.
785. Zhang H. miR-188-5p inhibits tumour growth and metastasis in prostate cancer by repressing LAPT4B expression / Zhang H., Qi S., Zhang T., Wang A., Liu R., Guo J., Wang Y., Xu Y. // *Oncotarget* – 2015. – T. 6 – № 8 – C.6092–6104.
786. Liang J. LEF1 Targeting EMT in Prostate Cancer Invasion Is Regulated by miR-34a / Liang J., Li Y., Daniels G., Sfanos K., De Marzo A., Wei J., Li X., Chen W., Wang J., Zhong X., Melamed J., Zhao J., Lee P. // *Molecular cancer research: MCR* – 2015. – T. 13 – № 4 – C.681–688.
787. Ngalame N.N.O. Mitigation of arsenic-induced acquired cancer phenotype in prostate cancer stem cells by miR-143 restoration / Ngalame N.N.O., Makia N.L., Waalkes M.P., Tokar E.J. // *Toxicology and Applied Pharmacology* – 2016. – T. 312 – C.11–18.
788. Wan X. Androgen-induced miR-27A acted as a tumor suppressor by targeting MAP2K4 and mediated prostate cancer progression / Wan X., Huang W., Yang S., Zhang Y., Zhang P., Kong Z., Li T., Wu H., Jing F., Li Y. // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* – 2016. – T. 79 – C.249–260.
789. Majid S. Regulation of minichromosome maintenance gene family by microRNA-1296 and genistein in prostate cancer / Majid S., Dar A.A., Saini S., Chen Y., Shahryari V., Liu J., Zaman M.S., Hirata H., Yamamura S., Ueno K., Tanaka Y., Dahiya R. // *Cancer Research* – 2010. – T. 70 – № 7 – C.2809–2818.
790. Tian X.M. Inhibition of invasion and migration of prostate cancer cells by miRNA-509-5p via targeting MDM2 / Tian X.M., Luo Y.Z., He P., Li J., Ma Z.W., An Y. // *Genetics and Molecular Research* – 2017. – T. 16 – № 1.

791. Chen Q. MiR-130b suppresses prostate cancer metastasis through down-regulation of MMP2 / Chen Q., Zhao X., Zhang H., Yuan H., Zhu M., Sun Q., Lai X., Wang Y., Huang J., Yan J., Yu J. // *Molecular Carcinogenesis* – 2015. – T. 54 – № 11 – C.1292–1300.
792. Chen P.-C. Thrombospondin-2 promotes prostate cancer bone metastasis by the up-regulation of matrix metalloproteinase-2 through down-regulating miR-376c expression / Chen P.-C., Tang C.-H., Lin L.-W., Tsai C.-H., Chu C.-Y., Lin T.-H., Huang Y.-L. // *Journal of Hematology & Oncology* – 2017. – T. 10 – № 1 – C.33.
793. Fujita Y. MiR-148a attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression / Fujita Y., Kojima K., Ohhashi R., Hamada N., Nozawa Y., Kitamoto A., Sato A., Kondo S., Kojima T., Deguchi T., Ito M. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2010. – T. 285 – № 25 – C.19076–19084.
794. Szczyrba J. The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing / Szczyrba J., Löprich E., Wach S., Jung V., Unteregger G., Barth S., Grobholz R., Wieland W., Stöhr R., Hartmann A., Wullich B., Grässer F. // *Molecular cancer research: MCR* – 2010. – T. 8 – № 4 – C.529–538.
795. Kong D. Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells / Kong D., Banerjee S., Ahmad A., Li Y., Wang Z., Sethi S., Sarkar F.H. // *PloS One* – 2010. – T. 5 – № 8 – C.e12445.
796. Chakravarthi B.V.S.K. The miR-124-Prolyl Hydroxylase P4HA1-MMP1 axis plays a critical role in prostate cancer progression / Chakravarthi B.V.S.K., Pathi S.S., Goswami M.T., Cieřlik M., Zheng H., Nallasivam S., Arekapudi S.R., Jing X., Siddiqui J., Athanikar J., Carskadon S.L., Lonigro R.J., Kunju L.P., Chinnaiyan A.M., Palanisamy N., Varambally S. // *Oncotarget* – 2014. – T. 5 – № 16 – C.6654–6669.
797. Gong A.-Y. miR-17-5p targets the p300/CBP-associated factor and modulates androgen receptor transcriptional activity in cultured prostate cancer cells / Gong A.-Y., Eischeid A.N., Xiao J., Zhao J., Chen D., Wang Z.-Y., Young C.Y., Chen X.-M. // *BMC cancer* – 2012. – T. 12 – C.492.
798. Musiyenko A. Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates protein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells / Musiyenko A., Bitko V., Barik S. // *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* – 2008. – T. 86 – № 3 – C.313–322.
799. Lee K.-H. MicroRNA-296-5p (miR-296-5p) functions as a tumor suppressor in prostate cancer by directly targeting Pin1 / Lee K.-H., Lin F.-C., Hsu T.-I., Lin J.-T., Guo J.-H., Tsai C.-H., Lee Y.-C., Lee Y.-C., Chen C.-L., Hsiao M., Lu P.-J. // *Biochimica Et Biophysica Acta* – 2014. – T. 1843 – № 9 – C.2055–2066.
800. Kojima S. Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer / Kojima S., Chiyomaru T., Kawakami K., Yoshino H., Enokida H., Nohata N., Fuse M., Ichikawa T., Naya Y., Nakagawa M., Seki N. // *British Journal of Cancer* – 2012. – T. 106 – № 2 – C.405–413.
801. Yang J. RLIP76-dependent suppression of PI3K/AKT/Bcl-2 pathway by miR-101 induces apoptosis in prostate cancer / Yang J., Song Q., Cai Y., Wang P., Wang M., Zhang D. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2015. – T. 463 – № 4 – C.900–906.
802. Guo J. miR-503 suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting RNF31 in prostate cancer / Guo J., Liu X., Wang M. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2015. – T. 464 – № 4 – C.1302–1308.
803. Lin S.-L. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer / Lin S.-L., Chiang A., Chang D., Ying S.-Y. // *RNA (New York, N.Y.)* – 2008. – T. 14 – № 3 – C.417–424.
804. Cai C. miR-195 Inhibits Tumor Progression by Targeting RPS6KB1 in Human Prostate Cancer / Cai C., Chen Q.-B., Han Z.-D., Zhang Y.-Q., He H.-C., Chen J.-H., Chen Y.-R., Yang S.-B., Wu Y.-D., Zeng Y.-R., Qin G.-Q., Liang Y.-X., Dai Q.-S., Jiang F.-N., Wu S., Zeng G.-H., Zhong W.-D., Wu C.-L. // *Clinical Cancer Research* – 2015. – T. 21 – № 21 – C.4922–4934.

805. Fujita Y. Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells / Fujita Y., Kojima K., Hamada N., Ohhashi R., Akao Y., Nozawa Y., Deguchi T., Ito M. // Biochemical and Biophysical Research Communications – 2008. – T. 377 – № 1 – C.114–119.
806. Yamakuchi M. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis / Yamakuchi M., Ferlito M., Lowenstein C.J. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2008. – T. 105 – № 36 – C.13421–13426.
807. Shu Y. MiR-204 enhances mitochondrial apoptosis in doxorubicin-treated prostate cancer cells by targeting SIRT1/p53 pathway / Shu Y., Ren L., Xie B., Liang Z., Chen J. // Oncotarget – 2017. – T. 8 – № 57 – C.97313–97322.
808. Liu Y.-N. MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms / Liu Y.-N., Yin J.J., Abou-Kheir W., Hynes P.G., Casey O.M., Fang L., Yi M., Stephens R.M., Seng V., Sheppard-Tillman H., Martin P., Kelly K. // Oncogene – 2013. – T. 32 – № 3 – C.296–306.
809. Li X. MicroRNA-185 and 342 inhibit tumorigenicity and induce apoptosis through blockade of the SREBP metabolic pathway in prostate cancer cells / Li X., Chen Y.-T., Jossion S., Mukhopadhyay N.K., Kim J., Freeman M.R., Huang W.-C. // PloS One – 2013. – T. 8 – № 8 – C.e70987.
810. Liu D. MiR-361-5p acts as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting signal transducer and activator of transcription-6(STAT6) / Liu D., Tao T., Xu B., Chen S., Liu C., Zhang L., Lu K., Huang Y., Jiang L., Zhang X., Huang X., Zhang L., Han C., Chen M. // Biochemical and Biophysical Research Communications – 2014. – T. 445 – № 1 – C.151–156.
811. Chakravarthi B.V.S.K. MicroRNA-101 regulated transcriptional modulator SUB1 plays a role in prostate cancer / Chakravarthi B.V.S.K., Goswami M.T., Pathi S.S., Robinson A.D., Cieřlik M., Chandrashekar D.S., Agarwal S., Siddiqui J., Daignault S., Carskadon S.L., Jing X., Chinnaiyan A.M., Kunju L.P., Palanisamy N., Varambally S. // Oncogene – 2016. – T. 35 – № 49 – C.6330–6340.
812. Chiyomaru T. SWAP70, actin-binding protein, function as an oncogene targeting tumor-suppressive *miR-145* in prostate cancer / Chiyomaru T., Tatarano S., Kawakami K., Enokida H., Yoshino H., Nohata N., Fuse M., Seki N., Nakagawa M. // The Prostate – 2011. – T. 71 – № 14 – C.1559–1567.
813. Han G. microRNA-218 inhibits prostate cancer cell growth and promotes apoptosis by repressing TPD52 expression / Han G., Fan M., Zhang X. // Biochemical and Biophysical Research Communications – 2015. – T. 456 – № 3 – C.804–809.
814. Goto Y. Tumour-suppressive microRNA-224 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting oncogenic TPD52 in prostate cancer / Goto Y., Nishikawa R., Kojima S., Chiyomaru T., Enokida H., Inoguchi S., Kinoshita T., Fuse M., Sakamoto S., Nakagawa M., Naya Y., Ichikawa T., Seki N. // FEBS letters – 2014. – T. 588 – № 10 – C.1973–1982.
815. Wang B. MicroRNA-1301 suppresses tumor cell migration and invasion by targeting the p53/UBE4B pathway in multiple human cancer cells / Wang B., Wu H., Chai C., Lewis J., Pichiorri F., Eisenstat D.D., Pomeroy S.L., Leng R.P. // Cancer Letters – 2017. – T. 401 – C.20–32.
816. John Clotaire D.Z. miR-26b inhibits autophagy by targeting ULK2 in prostate cancer cells / John Clotaire D.Z., Zhang B., Wei N., Gao R., Zhao F., Wang Y., Lei M., Huang W. // Biochemical and Biophysical Research Communications – 2016. – T. 472 – № 1 – C.194–200.
817. Zhang X. MicroRNA-17-3p is a prostate tumor suppressor in vitro and in vivo, and is decreased in high grade prostate tumors analyzed by laser capture microdissection / Zhang X., Ladd A., Dragoescu E., Budd W.T., Ware J.L., Zehner Z.E. // Clinical & Experimental Metastasis – 2009. – T. 26 – № 8 – C.965–979.
818. Zhao S. MiR-26a inhibits prostate cancer progression by repression of Wnt5a / Zhao S., Ye X., Xiao L., Lian X., Feng Y., Li F., Li L. // Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine – 2014. – T. 35 – № 10 – C.9725–9733.

819. Chen W.-Y. Inhibition of the androgen receptor induces a novel tumor promoter, ZBTB46, for prostate cancer metastasis / Chen W.-Y., Tsai Y.-C., Siu M.K., Yeh H.-L., Chen C.-L., Yin J.J., Huang J., Liu Y.-N. // *Oncogene* – 2017. – T. 36 – № 45 – C.6213–6224.
820. Ren D. Double-negative feedback loop between ZEB2 and miR-145 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in prostate cancer cells / Ren D., Wang M., Guo W., Huang S., Wang Z., Zhao X., Du H., Song L., Peng X. // *Cell and Tissue Research* – 2014. – T. 358 – № 3 – C.763–778.
821. Jiang X. GATA3-driven expression of miR-503 inhibits prostate cancer progression by repressing ZNF217 expression / Jiang X., Chen Y., Du E., Yang K., Zhang Z., Qi S., Xu Y. // *Cellular Signalling* – 2016. – T. 28 – № 9 – C.1216–1224.
822. Qiang X.-F. miR-20a promotes prostate cancer invasion and migration through targeting ABL2 / Qiang X.-F., Zhang Z.-W., Liu Q., Sun N., Pan L.-L., Shen J., Li T., Yun C., Li H., Shi L.-H. // *Journal of Cellular Biochemistry* – 2014. – T. 115 – № 7 – C.1269–1276.
823. Schramedei K. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4 / Schramedei K., Mörbt N., Pfeifer G., Läter J., Rosolowski M., Tömm J.M., Bergen M. von, Horn F., Brocke-Heidrich K. // *Oncogene* – 2011. – T. 30 – № 26 – C.2975–2985.
824. Chen Y. MicroRNAs 221/222 and Genistein-Mediated Regulation of ARHI Tumor Suppressor Gene in Prostate Cancer / Chen Y., Zaman M.S., Deng G., Majid S., Saini S., Liu J., Tanaka Y., Dahiya R. // *Cancer Prevention Research* – 2011. – T. 4 – № 1 – C.76–86.
825. Lin D. The expression and clinical significance of GTP-binding RAS-like 3 (ARHI) and microRNA 221 and 222 in prostate cancer / Lin D., Cui F., Bu Q., Yan C. // *The Journal of International Medical Research* – 2011. – T. 39 – № 5 – C.1870–1875.
826. Yao J. Androgen receptor regulated microRNA miR-182-5p promotes prostate cancer progression by targeting the ARDC3/ITGB4 pathway / Yao J., Xu C., Fang Z., Li Y., Liu H., Wang Y., Xu C., Sun Y. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2016. – T. 474 – № 1 – C.213–219.
827. Shi X.-B. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells / Shi X.-B., Xue L., Yang J., Ma A.-H., Zhao J., Xu M., Tepper C.G., Evans C.P., Kung H.-J., White R.W. deVere // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2007. – T. 104 – № 50 – C.19983–19988.
828. Lu K. MicroRNA-19a regulates proliferation and apoptosis of castration-resistant prostate cancer cells by targeting BTG1 / Lu K., Liu C., Tao T., Zhang X., Zhang L., Sun C., Wang Y., Chen S., Xu B., Chen M. // *FEBS letters* – 2015. – T. 589 – № 13 – C.1485–1490.
829. Jalava S.E. Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer / Jalava S.E., Urbanucci A., Latonen L., Waltering K.K., Sahu B., Jänne O.A., Seppälä J., Lähdesmäki H., Tammela T.L.J., Visakorpi T. // *Oncogene* – 2012. – T. 31 – № 41 – C.4460–4471.
830. Zuo Z.-H. Oncogenic Activity of miR-650 in Prostate Cancer Is Mediated by Suppression of CSR1 Expression / Zuo Z.-H., Yu Y.P., Ding Y., Liu S., Martin A., Tseng G., Luo J.-H. // *The American Journal of Pathology* – 2015. – T. 185 – № 7 – C.1991–1999.
831. Zheng C. MiR-221 expression affects invasion potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting DVL2 / Zheng C., Yinghao S., Li J. // *Medical Oncology (Northwood, London, England)* – 2012. – T. 29 – № 2 – C.815–822.
832. Sylvestre Y. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop / Sylvestre Y., De Guire V., Querido E., Mukhopadhyay U.K., Bourdeau V., Major F., Ferbeyre G., Chartrand P. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2007. – T. 282 – № 4 – C.2135–2143.

833. Qin W. miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells / Qin W., Shi Y., Zhao B., Yao C., Jin L., Ma J., Jin Y. // *PloS One* – 2010. – T. 5 – № 2 – C.e9429.
834. Li Y. Hypoxia-inducible miR-182 enhances HIF1 α signaling via targeting PHD2 and FIH1 in prostate cancer / Li Y., Zhang D., Wang X., Yao X., Ye C., Zhang S., Wang H., Chang C., Xia H., Wang Y.-C., Fang J., Yan J., Ying H. // *Scientific Reports* – 2015. – T. 5 – C.12495.
835. Fan X. Up-regulated microRNA-143 in cancer stem cells differentiation promotes prostate cancer cells metastasis by modulating FNDC3B expression / Fan X., Chen X., Deng W., Zhong G., Cai Q., Lin T. // *BMC cancer* – 2013. – T. 13 – C.61.
836. Wu Z. Upregulation of miR-153 promotes cell proliferation via downregulation of the PTEN tumor suppressor gene in human prostate cancer / Wu Z., He B., He J., Mao X. // *The Prostate* – 2013. – T. 73 – № 6 – C.596–604.
837. Wallis C.J.D. MiR-182 Is Associated with Growth, Migration and Invasion in Prostate Cancer via Suppression of FOXO1 / Wallis C.J.D., Gordanpour A., Bendavid J.S., Sugar L., Nam R.K., Seth A. // *Journal of Cancer* – 2015. – T. 6 – № 12 – C.1295–1305.
838. Qiu X. miR-1307 promotes the proliferation of prostate cancer by targeting FOXO3A / Qiu X., Dou Y. // *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* – 2017. – T. 88 – C.430–435.
839. Sun T. MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of HECTD2 and RAB1A / Sun T., Wang X., He H.H., Sweeney C.J., Liu S.X., Brown M., Balk S., Lee G.-S., Kantoff P.W. // *Oncogene* – 2014. – T. 33 – № 21 – C.2790–2800.
840. Mihelich B.L. miR-183-96-182 cluster is overexpressed in prostate tissue and regulates zinc homeostasis in prostate cells / Mihelich B.L., Khramtsova E.A., Arva N., Vaishnav A., Johnson D.N., Giangreco A.A., Martens-Uzunova E., Bagasra O., Kajdacsy-Balla A., Nonn L. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2011. – T. 286 – № 52 – C.44503–44511.
841. Majid S. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer / Majid S., Dar A.A., Saini S., Yamamura S., Hirata H., Tanaka Y., Deng G., Dahiya R. // *Cancer* – 2010. – T. 116 – № 24 – C.5637–5649.
842. Li J.-Z. MiR-141-3p promotes prostate cancer cell proliferation through inhibiting kruppel-like factor-9 expression / Li J.-Z., Li J., Wang H.-Q., Li X., Wen B., Wang Y.-J. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2017. – T. 482 – № 4 – C.1381–1386.
843. Li T. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells / Li T., Li D., Sha J., Sun P., Huang Y. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2009. – T. 383 – № 3 – C.280–285.
844. Gansmo L.B. MDM4 SNP34091 (rs4245739) and its effect on breast-, colon-, lung-, and prostate cancer risk / Gansmo L.B., Romundstad P., Birkeland E., Hveem K., Vatten L., Knappskog S., Lønning P.E. // *Cancer Medicine* – 2015. – T. 4 – № 12 – C.1901–1907.
845. Xu L. miR-96 promotes the growth of prostate carcinoma cells by suppressing MTSS1 / Xu L., Zhong J., Guo B., Zhu Q., Liang H., Wen N., Yun W., Zhang L. // *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* – 2016. – T. 37 – № 9 – C.12023–12032.
846. Scaravilli M. MiR-1247-5p is overexpressed in castration resistant prostate cancer and targets MYCBP2 / Scaravilli M., Porkka K.P., Brofeldt A., Annala M., Tammela T.L.J., Jenster G.W., Nykter M., Visakorpi T. // *The Prostate* – 2015. – T. 75 – № 8 – C.798–805.
847. Fujii T. Syndecan-1 responsive microRNA-126 and 149 regulate cell proliferation in prostate cancer / Fujii T., Shimada K., Tatsumi Y., Fujimoto K., Konishi N. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2015. – T. 456 – № 1 – C.183–189.

848. Li B. Down-regulation of microRNA 106b is involved in p21-mediated cell cycle arrest in response to radiation in prostate cancer cells / Li B., Shi X.-B., Nori D., Chao C.K.S., Chen A.M., Valicenti R., White R. de V. // *The Prostate* – 2011. – T. 71 – № 6 – C.567–574.
849. Ivanovska I. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression / Ivanovska I., Ball A.S., Diaz R.L., Magnus J.F., Kibukawa M., Schelter J.M., Kobayashi S.V., Lim L., Burchard J., Jackson A.L., Linsley P.S., Cleary M.A. // *Molecular and Cellular Biology* – 2008. – T. 28 – № 7 – C.2167–2174.
850. Galardi S. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1 / Galardi S., Mercatelli N., Giorda E., Massalini S., Frajese G.V., Ciafrè S.A., Farace M.G. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2007. – T. 282 – № 32 – C.23716–23724.
851. Sun T. The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines / Sun T., Wang Q., Balk S., Brown M., Lee G.-S.M., Kantoff P. // *Cancer Research* – 2009. – T. 69 – № 8 – C.3356–3363.
852. Mercatelli N. The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice / Mercatelli N., Coppola V., Bonci D., Miele F., Costantini A., Guadagnoli M., Bonanno E., Muto G., Frajese G.V., De Maria R., Spagnoli L.G., Farace M.G., Ciafrè S.A. // *PloS One* – 2008. – T. 3 – № 12 – C.e4029.
853. Zennami K. MP99-14 PDCD4 IS A CHECK POINT OF MIR-21 INDUCED CASTRATION RESISTANCE IN HUMAN PROSTATE CANCER / Zennami K., Hatano K., Liao R., Rafiqi F., Choi S.M., Lupold S. // *Journal of Urology* – 2017. – T. 197 – № 4S.
854. Fletcher C.E. Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer / Fletcher C.E., Dart D.A., Sita-Lumsden A., Cheng H., Rennie P.S., Bevan C.L. // *Human Molecular Genetics* – 2012. – T. 21 – № 14 – C.3112–3127.
855. Zhao W. Upregulation of miR-556-5p promoted prostate cancer cell proliferation by suppressing PPP2R2A expression / Zhao W., Cao L., Zeng S., Qin H., Men T. // *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* – 2015. – T. 75 – C.142–147.
856. Nip H. Oncogenic microRNA-4534 regulates PTEN pathway in prostate cancer / Nip H., Dar A.A., Saini S., Colden M., Varahram S., Chowdhary H., Yamamura S., Mitsui Y., Tanaka Y., Kato T., Hashimoto Y., Shiina M., Kulkarni P., Dasgupta P., Imai-Sumida M., Tabatabai Z.L., Greene K., Deng G., Dahiya R., Majid S. // *Oncotarget* – 2016. – T. 7 – № 42 – C.68371–68384.
857. Poliseno L. Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation / Poliseno L., Salmena L., Riccardi L., Fornari A., Song M.S., Hobbs R.M., Sportoletti P., Varmeh S., Egia A., Fedele G., Rameh L., Loda M., Pandolfi P.P. // *Science Signaling* – 2010. – T. 3 – № 117 – C.ra29.
858. Yang Y. miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion: An experimental study / Yang Y., Guo J.-X., Shao Z.-Q. // *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* – 2017. – T. 10 – № 1 – C.87–91.
859. Liu L.-Z. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression / Liu L.-Z., Li C., Chen Q., Jing Y., Carpenter R., Jiang Y., Kung H.-F., Lai L., Jiang B.-H. // *PloS One* – 2011. – T. 6 – № 4 – C.e19139.
860. Reis S.T. miR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer / Reis S.T., Pontes-Junior J., Antunes A.A., Dall'Oglio M.F., Dip N., Passerotti C.C., Rossini G.A., Morais D.R., Nesrallah A.J., Piantino C., Srougi M., Leite K.R. // *BMC urology* – 2012. – T. 12 – C.14.
861. Jossion S. Stromal fibroblast-derived miR-409 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and prostate tumorigenesis / Jossion S., Gururajan M., Sung S.Y., Hu P., Shao C., Zhau H.E., Liu C., Lichterman J., Duan P.,

Li Q., Rogatko A., Posadas E.M., Haga C.L., Chung L.W.K. // *Oncogene* – 2015. – T. 34 – № 21 – C.2690–2699.

862. Wei Y. MiR-223-3p targeting SEPT6 promotes the biological behavior of prostate cancer / Wei Y., Yang J., Yi L., Wang Y., Dong Z., Liu Z., Ou-yang S., Wu H., Zhong Z., Yin Z., Zhou K., Gao Y., Yan B., Wang Z. // *Scientific Reports* – 2014. – T. 4 – C.7546.

863. Ma S. MicroRNA-616 induces androgen-independent growth of prostate cancer cells by suppressing expression of tissue factor pathway inhibitor TFPI-2 / Ma S., Chan Y.P., Kwan P.S., Lee T.K., Yan M., Tang K.H., Ling M.T., Vielkind J.R., Guan X.-Y., Chan K.W. // *Cancer Research* – 2011. – T. 71 – № 2 – C.583–592.

864. Zaman M.S. The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer / Zaman M.S., Chen Y., Deng G., Shahryari V., Suh S.O., Saini S., Majid S., Liu J., Khatri G., Tanaka Y., Dahiya R. // *British Journal of Cancer* – 2010. – T. 103 – № 2 – C.256–264.

865. Nam R.K. MiR-301a regulates E-cadherin expression and is predictive of prostate cancer recurrence / Nam R.K., Benatar T., Wallis C.J.D., Amemiya Y., Yang W., Garbens A., Naeim M., Sherman C., Sugar L., Seth A. // *The Prostate* – 2016. – T. 76 – № 10 – C.869–884.

866. Kim K. Induction of the transcriptional repressor ZBTB4 in prostate cancer cells by drug-induced targeting of microRNA-17-92/106b-25 clusters / Kim K., Chadalapaka G., Pathi S.S., Jin U.-H., Lee J.-S., Park Y.-Y., Cho S.-G., Chintharlapalli S., Safe S. // *Molecular Cancer Therapeutics* – 2012. – T. 11 – № 9 – C.1852–1862.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Номер рисунка	Название рисунка	Номер страницы
1.1.	Пример анализа данных относительной взаимосвязи 20 генов, экспрессия которых изменяется при прогрессировании рака предстательной железы (данные базы STRING).	29
1.2.	Пример анализа данных распределения генов по их функциям при помощи базы PANTHER. (А) Молекулярные функции; (Б) Биологические процессы; (В) Клеточные компоненты; (Г) Классы белков.	30
1.3.	Факторы, влияющие на генерацию внеклеточных микроРНК биологических жидкостей, этапы пробоподготовки и анализа вн микроРНК.	35
1.4.	Основные факторы, влияющие на оценку концентрации циркулирующей внеклеточной ДНК в крови.	53
2.1.	Схема получения различных фракций супернатантов и внеклеточных везикул крови (А) и мочи (Б).	79
3.1.	(А) Эффективность выделения микроРНК-21 из плазмы крови здоровых доноров при помощи однофазного метода и кислой экстракции фенол-хлороформом. (Б) Кривая разбавления микроРНК-матрицы на стадии обратной транскрипции.	97
3.2.	Сравнение эффективности выделения микроРНК из плазмы крови в зависимости от концентрации GuSCN и pH при постоянном значении концентрации ОсА = 0,5%.	100
3.3.	Сравнение эффективности выделения микроРНК из мочи в зависимости от концентрации GuSCN и pH при постоянном значении концентрации ОсА = 1,5%.	102
3.4.	Данные Bioanalyzer Agilent 2100 образцов внеклеточных микроРНК, выделенных из плазмы крови (А) и мочи (Б).	104
3.5.	SDS-PAGE супернатанта плазмы крови человека после осаждения белков разными методами.	106
3.6.	Внешний вид и размер внеклеточных везикул мочи. (А) Ультроструктура отдельных экзосомоподобных микрочастиц мочи. (Б) ТЭМ-изображения ВВ мочи здоровых доноров и больных РПЖ до и после фильтрации сквозь фильтры с диаметром пор 0,1 мкм, меченые антителами к CD9, CD24 и CD63.	110
3.7.	Распределение по размеру внеклеточных везикул мочи здоровых доноров и больных РПЖ до (А) и после (Б) фильтрации сквозь фильтры с диаметром пор 0,1 мкм.	111
3.8.	Распределение по размерам ВВ мочи, выделенных ультрацентрифугированием и визуализированных с помощью NanoSight LM10.	111

3.9.	Распределение по размерам ВВ мочи, выделенных ультрацентрифугированием и визуализированных с помощью Zetasizer Nano ZS.	112
3.10.	Концентрация белка в составе ВВ мочи больных РПЖ и здоровых доноров, представленные в мг на мл препарата (А) или нг на мл мочи (Б).	113
3.11.	Концентрация ДНК в препаратах ВВ мочи здоровых доноров и больных РПЖ, определенная с помощью мультиплексной TaqMan ПЦР нацеленной на LINE1 элементы и α -сателлитные повторы ДНК человека.	115
3.12.	Данные Bioanalyzer Agilent 2100 образцов внеклеточных РНК, выделенных из ФОЭ мочи здоровых доноров (А) и больных РПЖ (Б).	116
3.13.	Уровень относительной экспрессии микроРНК в моче.	117
3.14.	Пример графиков корреляции Спирмена для микроРНК-19b во фракциях СВВ и ФОЭ у здоровых доноров (А) и больных раком предстательной железы (Б).	119
3.15.	Данные PANTHER: биологические процессы, в которых принимают участие 34 гена при развитии рака предстательной железы.	122
3.16.	Данные STRING: сеть взаимодействий пяти генов из категории процессов репродукции PANTHER.	123
3.17.	Данные DIANA: тепловая карта и кластерный анализ общих мишеней микроРНК (в терминах категорий KEGG), экспрессия которых отличается между фракциями мочи во всех изучаемых группах доноров (Группа 1).	130
3.18.	Данные DIANA: тепловая карта и кластерный анализ общих мишеней микроРНК (в терминах классификации KEGG), экспрессия которых отличается между фракциями мочи в зависимости от группы доноров (Группа 2).	131
3.19.	Диаграмма разделения некоторых пар микроРНК в составе супернатанта (А) и фракции суммарных внеклеточных везикул мочи (Б)	138
3.20.	Общая схема алгоритма анализа данных для выявления и мониторинга больных раком предстательной железы. (А) Определение диапазона для каждой пары маркерных микроРНК; (Б) Общая схема алгоритма анализа данных для постановки диагноза «точно РПЖ».	142
3.21.	Блок-схема алгоритма анализа данных для выявления больных раком предстательной железы. (А) Блок для выявления больных с онкологическими заболеваниями предстательной железы (ДГПЖ+РПЖ); (Б) Блок для выявления больных РПЖ; (В) Блок для выявления доноров, не имеющих признаков РПЖ; (Г) Блок для выявления здоровых доноров.	143

3.22.	Данные STRING: сеть взаимодействий 10-ти генов, обнаруженных одновременно в 3-х блоках диагностического алгоритма, относящихся к категории «больных» («точно болен», «точно РПЖ», «точно не РПЖ»), но отсутствующих в блоке, отнесённого к категории «здоровый» и одного гена (HRAS), нацеленного исключительно на микроРНК, входящую в состав блока «здоровый».	150
3.23.	Значения dCt соотношений микроРНК, выделенных из фракции СВВ мочи с наивысшей диагностической ценностью.	157
3.24.	Итоговая схема выбора пар микроРНК для диагностики РПЖ. Жирным шрифтом выделены пары микроРНК, обладающие самым высоким диагностическим потенциалом и вошедшие в итоговую панель для диагностики РПЖ.	164
3.25.	Распределение метилирования в гене RARbeta2 в составе внДНК и генДНК трансформированных (А) и первичных (Б и В) клеток	166
3.26.	Перераспределение количества внДНК в крови при развитии онкологических заболеваний предстательной железы.	169
3.27.	Блок-схема исследования аберрантного метилирования цитозинов в составе свободных и суммарных (свободные + связанные с поверхностью клеток крови) внДНК крови.	171
3.28.	Сравнение уровня метилирования отдельных CpG - динуклеотидов в разных положениях изучаемых локусов в составе свободной внДНК плазмы крови у здоровых доноров и больных ДГПЖ и РПЖ.	172
3.29.	Корреляция между метилированием отдельных цитозинов изучаемого локуса гена GSTP1 и составом ДНК в циркулирующей крови исследуемых больных.	174
3.30.	Диаграмма рассеяния для GSTP1.C3 и GSTP1.C9.	175
3.31.	Графическое представление разделения группы больных ДГПЖ.	177
3.32.	Графическое представление разделения группы ЗД при анализе GSTP1.T3.T13.	179
3.33.	Сравнение уровня метилирования отдельных CpG - динуклеотидов в разных положениях изучаемых локусов в составе суммарной и свободной внДНК крови у здоровых доноров и больных РПЖ.	185
3.34.	Корреляция между метилированием отдельных цитозинов исследуемого локуса гена GSTP1 в пуле сумм-внДНК больных РПЖ.	186
3.35.	Последовательность промоторной области гена GSTP1. Исследуемые CpG динуклеотиды выделены серым цветом и пронумерованы.	189

ПЕРЕЧЕНЬ ТАБЛИЦ

Номер таблицы	Название таблицы	Номер страницы
1.1.	Особенности строения внеклеточных микроРНК (возможные варианты химических модификаций)	16
1.2.	Надмолекулярные комплексы внеклеточных микроРНК	17
1.3.	Андрогенонезависимые и андрогензависимые клеточные линии РПЖ	26
1.4.	Сравнительные характеристики различных методов выделения микроРНК.	41
1.5.	Метилчувствительные эндонуклеазы рестрикции	61
2.1.	Последовательности праймеров и зондов для анализа уровня микроРНК, используемых для обратной транскрипции и TaqMan ПЦР в режиме «реального времени»	69
2.2.	Последовательности праймеров для оценки уровня метилирования фрагмента гена RARbeta2 используемых для количественной MS-qPCR	71
2.3.	Последовательности праймеров для оценки уровня метилирования индивидуальных CpG в составе фрагмента гена RARbeta2, используемых для пиросеквенирования	72
2.4.	Олигонуклеотиды и условия ПЦР используемые в работе при анализе статуса метилирования цитозинов в составе циркулирующей ДНК крови	73
2.5.	Информация об уникальных штрих-кодах	74
2.6.	Характеристика группы здоровых доноров и больных РПЖ, образцы которых использовали в экспериментах по изучению размера внеклеточных везикул мочи	75
2.7.	Характеристика группы здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями предстательной железы, участвующих в исследовании уровня внеклеточных микроРНК в моче с использованием микрочиповых технологий	76
2.8.	Характеристика группы здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями предстательной железы, участвующих в верификации выбранной панели микроРНК	76
2.9.	Характеристика группы здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями предстательной железы, участвующих в анализе статуса метилирования вДНК крови.	77
2.10.	Состав панели для определения экспрессии микроРНК	86
3.1.	Остаточная радиоактивность различных фракций при выделении микроРНК	96

3.2.	Значения порогового цикла (Cq) для эндогенных микроРНК, выделенных из плазмы крови двумя методами.	98
3.3.	Значения порогового цикла (Cq, Среднее $\pm$ SD) для внеклеточных микроРНК, выделенных из плазмы крови и мочи при помощи однофазного протокола.	98
3.4.	Временные характеристики однофазного метода и кислой фенол-хлороформной экстракции.	99
3.5.	Сравнение эффективности выделения микроРНК из плазмы крови в зависимости от концентрации ОсА, GuSCN и рН.	101
3.6.	Сравнение эффективности выделения микроРНК из мочи в зависимости от концентрации ОсА, GuSCN и рН.	103
3.7.	Эффективность выделения микроРНК из плазмы крови и мочи	105
3.8.	Корреляция Спирмена для оценки изменений экспрессии микроРНК между различными фракциями мочи	118
3.9.	Экспрессия и диагностические характеристики микроРНК в образцах мочи здоровых доноров и больных РПЖ	120
3.10.	Функции генов, участвующих в процессах репродукции (данные STRING)	123
3.11.	Результаты парного сравнения экспрессии микроРНК между фракциями мочи, полученные с помощью микрочипового анализа.	128
3.12.	Значимые пары микроРНК для разделения групп здоровых доноров и больных ДГПЖ и РПЖ.	134
3.13.	Встречаемость отдельных микроРНК в различных парах среди всех групп сравнений.	136
3.14.	Встречаемость некоторых микроРНК внутри групп сравнений.	137
3.15.	Статистические показатели наилучших пар микроРНК-потенциальных диагностических предикторов.	139
3.16.	Пример использования алгоритма анализа данных для выявления больных с онкологическими заболеваниями предстательной железы.	145
3.17.	Пример использования алгоритма анализа данных для выявления больных раком предстательной железы.	146
3.18.	Пример использования алгоритма анализа данных для выявления доноров, не имеющих признаков РПЖ	146
3.19.	Пример использования алгоритма анализа данных для выявления группы здоровых доноров	147
3.20.	Функции генов, согласно базе данных STRING, обнаруженных одновременно в 3-х блоках диагностического алгоритма, относящихся к категории «больных» («точно болен», «точно РПЖ», «точно не РПЖ»), но отсутствующих в блоке, отнесённого к категории «здоровый» и одного гена (HRAS), нацеленного исключительно на микроРНК, входящую в состав блока «здоровый».	149
3.21.	Значения ddCt для дифференциально экспрессируемых пар микроРНК в следующих группах сравнения: РПЖ-ЗД, РПЖ-ДГПЖ, ДГПЖ-ЗД.	152

3.22.	Значения dddCt для дифференциально экспрессируемых пар микроРНК в следующих группах сравнения: РПЖ-ЗД, РПЖ-ДГПЖ, ДГПЖ-ЗД.	153
3.23.	Данные анализа ROC-кривых (чувствительность при 100% специфичности) больных РПЖ в сравнении с группой «ЗД+ДГПЖ».	155
3.24.	Данные анализа ROC-кривых (чувствительность при 100% специфичности) больных РПЖ в сравнении с группой ЗД.	156
3.25.	Данные анализа ROC-кривых (чувствительность при 100% специфичности) больных РПЖ в сравнении с группой ДГПЖ.	156
3.26.	Чувствительность (при 100% специфичности) селекции больных ДГПЖ от здоровых доноров.	159
3.27.	Процент правильно диагностированных больных РПЖ относительно контрольной группы (ЗД+ДГПЖ).	160
3.28.	Процент правильно диагностированных доноров без признаков РПЖ относительно контрольной группы (РПЖ).	160
3.29.	Процент правильно диагностированных всех больных (ДГПЖ и РПЖ) относительно контрольной группы (ЗД).	161
3.30.	Процент правильно диагностированных здоровых доноров относительно контрольной группы (ДГПЖ+РПЖ).	161
3.31.	Сравнение статуса метилирования цитозинов в составе свободной внДНК плазмы крови у пациентов с РПЖ с объединенной группой, включающей ЗД и пациентов с ДГПЖ.	176
3.32.	Сравнение статуса метилирования цитозинов в составе свободной внДНК плазмы крови у пациентов с ДГПЖ с объединенной группой, включающей ЗД и пациентов с РПЖ.	178
3.33.	Сравнение статуса метилирования цитозинов в составе свободной внДНК плазмы крови у здоровых доноров с объединенной группой, включающей пациентов с ДГПЖ и РПЖ.	180
3.34.	Сравнение статуса метилирования цитозинов (индивидуального или попарного) в составе сумм-внДНК крови у здоровых доноров и больных РПЖ.	188
3.35.	Сравнение здоровых доноров и больных РПЖ.	189
3.36.	Лучшие комбинации цитозинов для дизайна TaqMan ПЦР	190
3.37.	Список возможных дополнительных комбинаций цитозинов для «создания» ПЦР-систем	191

*Приложение 1. Список научных трудов, вошедших в диссертацию.***Свидетельство о регистрации и патенты:**

1. **Брызгунова О.Е.**, Морозкин Е.С., Попов А.В., Бондарь А.А., Тамкович С.Н., Зарипов М.М., Покушалов Е.А., Лактионов П.П. База данных учета биологических образцов и описания клинико-патологических характеристик пациентов с заболеваниями предстательной железы (БД-ЗПЖ)/ Database for registration of biological samples and clinico-pathological characteristics of prostate tumor and non-tumor patients (DRBS-PSiP). Внесена в Реестр баз данных РФ 28.03.2014 №2014620509.
2. Запорожченко И.А., Лактионов П.П., Морозкин Е.С., Скворцова Т.Э., **Брызгунова О.Е.**, Власов В.В. Способ выделения коротких РНК из биологических жидкостей. Патент на изобретение РФ № 2558292 от 01.07.2015.
3. **Брызгунова О.Е.**, Рузанкин П.С., Тарасенко А.С., Лактионов П.П. Способ ранней диагностики опухолей предстательной железы. Патент на изобретение РФ № 2756643 от 21.01.2021.

Статьи в научных журналах:

1. Tamkovich S.N., **Bryzgunova O.E.**, Rykova E.Yu., Permyakova V.I., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors // Clin. Chem. - 2005. -V. 51. -P. 1317-1319. DOI: 10.1373/clinchem.2004.045062.
2. Skvortsova T.E., **Bryzgunova O.E.**, Lebedeva A.O., Mak V.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Methylated Cell-free DNA in Vitro and in Vivo // «Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum». Ed P.B. Gahan, Springer. -2011. -P. 185-194. DOI 10.1007/978-90-481-9382-0_25.
3. **Bryzgunova O.E.**, Laktionov P.P. Generation of Blood Circulating DNAs: Sources, Features of Struction and Circulation // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. -2014. -V. 8(3). -P. 203-219. DOI: 10.1134/S1990750814030020. Обзор.
- Брызгунова О.Е.**, Лактионов П.П. Формирование пула циркулирующих ДНК крови: источники, особенности строения и циркуляции // Биомедицинская химия. -2015. – Т. 61(4): -С. 409-426. DOI: 10.18097/PBMC20156104409. Обзор.
4. Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Skvortsova T.E., **Bryzgunova O.E.**, Bondar A.A., Loseva E.M., Vlassov V.V., Laktionov P.P. A phenol-free method for isolation of microRNA from biological fluids // Anal Biochem. -2015. -V. 479. –P. 43-47. DOI: 10.1016/j.ab.2015.03.028.
5. **Брызгунова О.Е.**, Тамкович С.Н., Черепанова А.В., Ярмощук С.В., Пермякова В.И., Аникеева О.Ю., Лактионов П.П. Перераспределение свободных и связанных с форменными элементами циркулирующих ДНК при доброкачественных и злокачественных заболеваниях предстательной железы // Acta Naturae. -2015. –V. 7(2). –P. 125-128.
- Bryzgunova O.E.**, Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Yarmoshchuk S.V., Permyakova V.I., Anykeeva O.Y., Laktionov P.P. Redistribution of Free- and Cell-Surface-Bound DNA in Blood of Benign and Malignant Prostate Tumor Patients // Acta Naturae. -2015. –V. 7(2). –P. 115-118.

6. **Брызгунова О.Е.**, Лактионов П.П. Внеклеточные нуклеиновые кислоты мочи: источники, состав, использование в диагностике // *Acta Naturae*. -2015. –V. 7(3). –P. 54-60. Обзор.

Bryzgunova O.E., Laktionov P.P. Extracellular nucleic acids in urine: sources, structure, diagnostic potential. *Acta Naturae*. -2015. –V. 7(3). –P. 48-54. Обзор.

7. **Bryzgunova O.E.**, Zaripov M.M., Skvortsova T.E., Lekchnov E.A., Grigor'eva A.E., Morozkin E.S., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., Ryabchikova E.I., Yurchenko Yu.B., Voitsitskiy V.E., Laktionov P.P. Comparative Study of Extracellular Vesicles from the Urine of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients // *PLoS One*. -2016. –V. 11. –P. e0157566. DOI: 10.1371/journal.pone.0157566.

8. Lekchnov E.A., Zaporozhchenko I.A., Morozkin E.S., **Bryzgunova O.E.**, Vlassov V.V., Laktionov P.P. Protocol for miRNA isolation from biofluids // *Anal Biochem*. -2016. –V. 499. –P. 78-84. DOI: 10.1016/j.ab.2016.01.025.

9. Григорьева А., Дырхеева Н., **Брызгунова О.**, Тамкович С., Челобанов Б., Рябчикова Е. Контаминация препаратов экзосом, выделенных из биологических жидкостей // *Биомедицинская химия*. -2017. –Т. 63. –С. 91-96. DOI: 10.18097/PBMC20176301091

Grigor'eva A., Dyrkheeva N., **Bryzgunova O.**, Tamkovich S., Chelobanov B., Ryabchikova E. Contamination of exosome preparations, isolated from biological fluids // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. -2017. –N. 11. –P. 265-271. DOI: 10.1134/S1990750817030040.

10. **Брызгунова О.Е.**, Лактионов П.П. Современные методы исследования метилирования внеклеточных ДНК // *Молекулярная биология*. -2017. –Т. 51(2). –P. 195–214. DOI: 10.7868/S0026898417010074. Обзор.

Bryzgunova O.E., Laktionov P.P. Current Methods of Extracellular DNA Methylation Analysis // *Molecular Biology (Russian)*. -2017. –N. 51(2). –P. 167–183. DOI: 10.1134/S0026893317010071.

11. **Bryzgunova O.E.**, Lekchnov E.A., Zaripov M.M., Yurchenko Yu.B., Yarmoschuk S.V., Pashkovskaya O.A., Rykova E.Yu., Zheravin A.A., Laktionov P.P. Bioinformatics analysis for evaluation of the diagnostic potentialities of miR-19b, -125b and -205 as liquid biopsy markers of prostate cancer // *AIP Conference Proceedings*. -2017. –V. 1882. –P. 020009. DOI: 10.1063/1.5001588.

12. Запороженко И.А., **Брызгунова О.Е.**, Лехнов Е.А., Осипов И.Д., Зарипов М.М., Юрченко Ю.Б., Ярмошук С.В., Пашковская О.А., Рыкова Е.Ю., Жеравин А.А., Лактионов П.П. Анализ представленности микроРНК в микровезикулах мочи и бесклеточной моче при заболеваниях предстательной железы // *Биомедицинская химия*, -2018. –Т. 64. –С. 38-45. DOI: 10.18097/PBMC20186401038.

Zaporozhchenko I.A., **Bryzgunova O.E.**, Lekchnov E.A., Osipov I.D., Zaripov M.M., Yurchenko Y.B., Yarmoschuk S.V., Pashkovskaya O.A., Rykova E.Y., Zheravin A.A., Laktionov P.P. Representation analysis of miRNA from clarified urine and urine microvesicles in prostate malignancies and non-malignant neoplasms // *Biomed Khim*. -2018. –V. 64(1). –P. 38-45. DOI: 10.1134/S1990750818020142.

13. **Bryzgunova O.E.**, Konoshenko M.Y., Laktionov P.P. MicroRNA-guided gene expression in prostate cancer: Literature and database overview // *J Gene Med*. -2018. -V. E3016. DOI: 10.1002/jgm.3016. Обзор.

14. Lekchnov E.A., Amelina E.V., **Bryzgunova O.E.**, Zaporozhchenko I.A., Konoshenko M.Yu., Yarmoschuk S.V., Murashov I.S., Pashkovskaya O.A., Gorizkii A.M., Zheravin A.A., Laktionov P.P. Searching for the Novel Specific Predictors of Prostate Cancer in Urine: The Analysis of 84 miRNA Expression // *Int. J. Mol. Sci.* -2018. –V. 19(12). –P. 4088. DOI:10.3390/ijms19124088.
15. **Bryzgunova O.E.**, Zaporozhchenko I.A., Lekchnov E.A., Amelina E.V., Konoshenko M.Yu., Yarmoschuk S.V., Pashkovskaya O.A., Zheravin A.A., Pak S.V., Rykova E.Yu., Laktionov P.P. Data analysis algorithm for the development of extracellular miRNA-based diagnostic systems for prostate cancer // *PLoS ONE*. -2019. –V. 14(4). –P. e0215003. DOI: 10.1371/journal.pone.0215003.
16. Konoshenko M.Yu., Lekchnov E.A., **Bryzgunova O.E.**, Zaporozhchenko I.A., Yarmoschuk S.V., Pashkovskaya O.A., Pak S.V., Laktionov P.P. The Panel of 12 Cell-Free MicroRNAs as Potential Biomarkers in Prostate Neoplasms // *Diagnostics (Basel)*. -2020. –V. 10(1). –P. 38. DOI: 10.3390/diagnostics10010038.
17. **Bryzgunova O.E.**, Konoshenko M.Y., Laktionov P.P. Concentration of cell-free DNA in different tumor types // *Expert Rev Mol Diagn.* -2021. –V. 21(1). –P. 63-75. DOI: 10.1080/14737159.2020.1860021. Обзор.
18. **Bryzgunova O.**, Konoshenko M., Zaporozhchenko I., Yakovlev A., Laktionov P. Isolation of Cell-Free miRNA from Biological Fluids: Influencing Factors and Methods // *Diagnostics*. -2021. –V. 11. –P. 865. DOI: 10.3390/diagnostics11050865. Обзор.
19. **Bryzgunova O.**, Bondar A., Ruzankin P., Laktionov P., Tarasenko A., Kurilshikov A., Epifanov R., Zaripov M., Kabilov M., Laktionov P. Locus-Specific Methylation of GSTP1, RNF219, and KIAA1539 Genes with Single Molecule Resolution in Cell-Free DNA from Healthy Donors and Prostate Tumor Patients: Application in Diagnostics // *Cancers*. -2021. –V. 13(24). –P. 6234. DOI: 10.3390/cancers13246234
20. **Bryzgunova O.**, Bondar A., Ruzankin P., Tarasenko A., Zaripov M., Kabilov M., Laktionov P. Locus-Specific Bisulfate NGS Sequencing of GSTP1, RNF219, and KIAA1539 Genes in the Total Pool of Cell-Free and Cell-Surface-Bound DNA in Prostate Cancer: A Novel Approach for Prostate Cancer Diagnostics // *Cancers*. -2023. –V. 15. –P. 431. DOI: 10.3390/cancers15020431.

Тезисы конференций:

1. **Брызгунова О.Е.**, Дырхеева Н.С., Морозкин Е.С., Зарипов М.М., Чикова Е.Д., Власов В.В., Лактионов П.П. Внеклеточные микровезикулы в моче здоровых доноров и больных раком предстательной железы // VI Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013». Иркутск, 19-23 августа, 2013 г. С. 269-270.
2. **Брызгунова О.Е.**, Дырхеева Н.С., Морозкин Е.С., Зарипов М.М., Чикова Е.Д., Рябчикова Е.И., Власов В.В., Лактионов П.П. Внеклеточные микровезикулы в моче онкологических больных // Ежегодная научная конференция «Фундаментальные науки – медицине». Новосибирск, 16-20 сентября, 2013 г. С. 121.
21. Бондарь А.А., Морозкин Е.С., **Брызгунова О.Е.**, Зарипов М.М., Войцицкий В.Е., Чикова Е.Д., Власов В.В., Лактионов П.П. Поиск эпигенетических маркеров рака предстательной железы в циркулирующей ДНК плазмы крови // Ежегодная научная конференция «Фундаментальные науки – медицине». Новосибирск, 16-20 сентября, 2013 г. С. 117.
22. Бондарь А.А., Cortese R., **Брызгунова О.Е.**, Рыкова Е.Ю., Зарипов М.М., Войцицкий В.Е., Ярмошук С.В., Чикова Е.Д., Пермякова В.И., Пономарева А.А., Юрмазов З.А.,

Усынин Е.А., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В., Petronis A., Власов В.В., Лактионов П.П. Поиск эпигенетических маркеров рака предстательной железы в циркулирующей ДНК плазмы крови // VIII региональная конференция молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии». Томск, 26 апреля, 2013 г. Сибирский онкологический журнал, приложение №1, С. 17-18.

23. **Брызгунова О.Е.**, Григорьева А.Е., Морозкин Е.С., Зарипов М.М., Рябчикова Е.И., Власов В.В., Лактионов П.П. Использование внеклеточных микровезикул мочи в диагностике онкологических заболеваний предстательной железы // VIII съезд онкологов и радиологов СНГ и Евразии. Казань, Россия, 16-18 сентября, 2014 г. Международный научно-практический журнал «Евразийский онкологический журнал». №3 (03), С. 675.

24. **Брызгунова О.Е.**, Григорьева А.Е., Морозкин Е.С., Зарипов М.М., Рябчикова Е.И., Войццкий В.Е., Власов В.В., Лактионов П.П. Морфология и состав микровезикул мочи здоровых доноров и больных раком предстательной железы // Международная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии. Москва, 15-19 сентября, 2014 г. Acta Naturae (спецвыпуск) №1, С. 18-19.

25. **Bryzgunova O.E.**, Lekhnov E.A., Skvortsova T.E., Morozkin E.S., Zaporozhchenko I.A., Grigorieva A.E., Zaripov M.M., Ryabchikova E.I., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Use of extracellular RNA from urine for the diagnosis of prostate cancer // EMBO Workshop «Cellular and molecular mechanism of tumour-microenvironment crosstalk». Tomsk, Russia, July 9-12, 2015. P. 11-12.

26. **Bryzgunova O.**, Lekhnov E., Skvortsova T., Morozkin E., Zaporozhchenko I., Grigorieva A., Zaripov M., Ryabchikova E., Vlassov V., Laktionov P. Microvesicles and miRNA in urine of healthy and prostate cancer patients // CNAPS IX “Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum”. Berlin, Germany, September 10-12, 2015. P. 82-83.

27. **Брызгунова О.Е.**, Лехнов Е.А., Скворцова Т. Е., Морозкин Е.С., Григорьева А.Е., Зарипов М.М., Рябчикова Е.И., Власов В.В., Лактионов П.П. Внеклеточные микрочастицы мочи в диагностике рака предстательной железы // II Петербургский онкологический форум. 22–24 июня, 2016, Санкт-Петербург.

28. Григорьева А.Е., Еремина А.В., Тамкович С.Н., **Брызгунова О.Е.** Электронно-микроскопическое исследование образцов экзосом, выделенных из крови, мочи и слезной жидкости людей методом последовательных центрифугирований // III международная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. Кольцово, 5-6 октября, 2016. С. 226-230.

29. Лехнов Е.А., Запорожченко И.А., Морозкин Е.С., **Брызгунова О.Е.**, Власов В.В., Лактионов П.П. Протокол для выделения микроРНК из биологических жидкостей // V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, конференция ADFLIM. Сочи – Дагомыс, Россия 4–8 октября 2016. Acta Naturae. Спецвыпуск Т.2, С. 134

30. **Брызгунова О.Е.**, Осипов И.Д, Е.А. Лехнов, Скворцова Т.Э., Морозкин Е.С., Григорьева А.Е., Зарипов М.М., Рябчикова Е.И., Власов В.В., Лактионов П.П. Внеклеточные микроРНК крови и мочи в диагностике рака предстательной железы // II Всероссийская конференция по молекулярной онкологии. Москва, Россия, 6-8 декабря 2016. С. 93.

31. **Брызгунова О.Е.**, Лехнов Е.А., Запорожченко И.А., Скворцова Т.Э., Морозкин Е.С., Григорьева А.Е., Рябчикова Е.И., Власов В.В., Лактионов П.П. Микровезикулы и микроРНК микровезикул мочи в диагностике рака предстательной железы // IX

Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, Россия, 20-22 февраля 2017. С. 238-240.

32. **Bryzgunova O.E.**, Zaporozhchenko I.A., Lekchnov E.A., Osipov I.D., Yarmoschuk S.V., Zheravin A.A., Konoshenko M.Yu., Laktionov P.P. Microarray Study of Urine miRNAs: in Quest of Prostate Cancer Markers and Diagnostics // International conference “Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications”. Томск, Россия, 23-26 мая 2017. С. 56.

33. **Брызгунова О.Е.**, Запорожченко И.А., Осипов И.Д., Лехнов Е.А., Коношенко М.Ю., Лактионов П.П. Поиск микроРНК-маркеров и разработка диагностических алгоритмов для выявления больных раком предстательной железы // III Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи». Санкт-Петербург, Россия, 23-25 июня 2017 г. С. 84.

34. **Брызгунова О.Е.**, Запорожченко И.А., Лехнов Е.А., Осипов И.Д., Ярмошук С.В., Пашковская О.А., Зарипов М.М., Коношенко М.Ю., Юрченко Ю.Б., Жеравин А.А., Покушалов Е.А., Лактионов П.П. Поиск микроРНК-маркеров рака предстательной железы в моче при помощи микрочипов: анализ данных и разработка диагностического алгоритма // Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего». Новосибирск, Россия, 24-26 июля 2017 г. С. 28.

35. **Bryzgunova O.E.**, Zaporozhchenko I.A., Osipov I.D., Lekchnov E.A., Yarmoschuk S.V., Pashkovskaya O.A., Konoshenko M.Yu., Zheravin A.A., Zaripov M.M., Yurchenko Yu.B., Pokushalov E.A., Laktionov P.P. Screening for miRNA markers of prostate cancer in urine: microarray, data analysis, verification and development of diagnostic algorithm // CNAPS X “Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum”. Montpellier, France, 2017. September 20-22., P. 31.

36. Зарипов М.М., Кунин И.С., Стрельченко О.В., **Брызгунова О.Е.**, Лехнов Е.А., Осипов И.Д., Скворцова Т.Э., Коношенко М.Ю., Юрченко Ю.В., Лактионов П.П., Войцицкий В.Е. Новые подходы к ранней диагностике рака предстательной железы на основе анализа микроРНК биологических жидкостей // XII Международный Конгресс Российского общества онкоурологов. 5–6 октября 2017 г., Москва. Онкоурология. С. 36

37. **Брызгунова О.Е.**, Запорожченко И.А., Лехнов Е.А., Коношенко М.Ю., Осипов И.Д., Зарипов М.М., Ярмошук С.В., Пашковская О.А., Юрченко Ю.Б., Рыкова Е.Ю., Лактионов П.П. Сравнительный анализ экспрессии 84 микроРНК в различных фракциях мочи здоровых доноров и больных раком предстательной железы // III Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии. 6-8 декабря 2017 г., Москва. Успехи Молекулярной Онкологии. Т.4. N.4 приложение. С. 103-104.

38. Коношенко М.Ю., **Брызгунова О.Е.**, Лехнов Е.А., Запорожченко И.А., Амелина Е.В., Ярмошук С.В., Пашковская О.А., Горицкий А.М., Пак С.В., Рыкова Е.Ю., Лактионов П.П. Внеклеточные микроРНК биологических жидкостей человека как источник потенциальных маркеров рака предстательной железы // “Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты”. Горно-Алтайск, Россия, 27-29 июня 2018. С. 57.

39. Рыкова Е.Ю., Горицкий А.М., Лехнов Е.А., Пак С.В., Лактионов П.П., Пашковская О.А., Ярмошук С.В., Амелина Е.В., Запорожченко И.А., Коношенко М.Ю., **Брызгунова О.Е.** Исследование внеклеточных микроРНК биологических жидкостей человека с целью поиска новых онкомаркеров рака предстательной железы // IV Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи». Санкт-Петербург, Россия, 5-8 июля 2018 г. С. 208.

40. Рыкова Е.Ю., Запорожченко И.А., Пономарева А.А., **Брызгунова О.Е.**, Лехнов Е.А., Коношенко М.Ю., Пашковская О.А., Морозкин Е.С., Чердынцева Н.В., Власов В.В., Ажикина Т.Л., Лактионов П.П. Жидкостная биопсия для диагностики и мониторинга онкологических заболеваний на основе эпигенетических маркеров: поиск, решения и перспективы // Сборник научных трудов V Международной конференции ПОСТГЕНОМ'2018 «В поисках моделей персонализированной медицины», 29 октября-02 ноября 2018г. – Казань, Россия, С. 245.

41. Zaporozhchenko IA, **Bryzgunova OE**, Konoshenko MY, Lekchnov EA, Amelina EV, Pashkovskaya OA, Yarmoschuk SV, Zheravin AA, Rykova EY, Laktionov PP. Urine cell-free and extracellular vesicle cargo miRNAs as biomarkers for prostate cancer diagnosis // *Annals of Oncology*, Volume 30, Issue Supplement_5, October 2019, mdz238.076. DOI: 10.1093/annonc/mdz238.076.

42. Konoshenko M.Y., Lekchnov E., **Bryzgunova O.E.**, Kiseleva E.V., Zaporozhchenko I.A., Rykova E.Y., Yarmoschuk S.V., Pashkovskaya O.A., Goritskiyi A.M., Pak S.V., Laktionov P.P. A novel precipitation-based protocol of extracellular vesicles isolation from biological fluids for routine diagnosis of prostate cancer // «Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS XI)», 23-25.09.2019 Jerusalem, Israel.

43. **Bryzgunova O.E.**, Zaporozhchenko I.A., Lekchnov E., Amelina E.V., Konoshenko M.Y., Rykova E.Y., Yarmoschuk S.V., Pashkovskaya O.A., Goritskiyi A.M., Pak S.V., Laktionov P.P. A rational approach for selection of miRNA-markers suitable for the development of prostate cancer diagnostics // «Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS XI)», 23-25.09.2019, Jerusalem, Israel.

44. Коношенко М.Ю., **Брызгунова О.Е.**, Лехнов Е.А., Запорожченко И.А., Пашковская О.А., Пак С.В., Ярмошук С.В., Рыкова Е.Ю., Лактионов П.П. Исследование внеклеточных микроРНК биологических жидкостей человека при раке предстательной железы // V Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи-2019» 20-23.06.2019, Санкт-Петербург, Россия.

45. Рыкова Е.Ю., Запорожченко И.А., Пономарева А.А., Коношенко М.Ю., **Брызгунова О.Е.**, Лехнов Е.А., Пашковская О.А., Власов В.В., Чердынцева Н.В., Лактионов П.П. Масштабный анализ микроРНК в биологических жидкостях: поиск маркеров рака для «жидкой биопсии» // Всероссийская мультikonференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» 29 июня - 2 июля 2019, С. 85. г. Новосибирск, Россия

46. Рыкова Е.Ю., Запорожченко И.А., Пономарева А.А., **Брызгунова О.Е.**, Лехнов Е.А., Коношенко М.Ю., Пашковская О.А., Морозкин Е.С., Власов В.В., Чердынцева Н.В., Ажикина Т.Л., Лактионов П.П. Внеклеточные информационные молекулы в крови онкологических больных: что они «говорят» о пациенте // Международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» 18-22 июнь 2019, Санкт-Петербург, Россия. Сборник тезисов, С.237.

47. Лехнов Е.А., **Брызгунова О.Е.**, Коношенко М.Ю., Ярмошук С.В., Пашковская О.А., Жеравин А.А., Лактионов П.П. Поиск и формирование панели микроРНК-маркеров для диагностики рака предстательной железы // VI Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи 2020», Санкт-Петербург, Россия, Июнь 25-28, 2020, С. 95.

Приложение 2. Концентрация внДНК в крови здоровых доноров и больных пациентов, выделенная и оцененная различными методами

(внДНК - внеклеточная ДНК, ЯвнДНК - ядерная внДНК, МвнДНК - митохондриальная внДНК)

Тип внДНК	Источник внДНК	Концентрация внДНК	доноры	Метод выделения	Метод количественной оценки ДНК	Ссылки
ЯвнДНК	Плазма	$1,64 \times 10^3$ копий/мл (5,5 нг/мл)	здоровые	Qiagen Blood Mini kit	Количественная ПЦР в режиме реального времени	[700]
МвнДНК		$8,32 \times 10^7$ копий/мл ($2,8 \times 10^5$ нг/мл)				
ЯвнДНК		$4,73 \times 10^3$ копий/мл (15,7 нг/мл)	метастатический рак кишечника			
МвнДНК		$1,44 \times 10^7$ копий/мл ($4,8 \times 10^4$ нг/мл)				
внДНК	Плазма	1,338 ($\pm 0,363$) мкг/мл	девятиностолетние здоровые женщины (рождѐнные до 1917 г.)	Экстракция фенол- хлороформом	High Sensitivity lab-on-a-chip DNA assay и Agilent 2100 Bioanalyzer	[256]
		1,039 ($\pm 0,260$) мкг/мл	здоровые женщины			
		3,840 ($\pm 0,224$) logГЭ/мл (46,1 нг/мл)	девятиностолетние здоровые женщины (рождѐнные до 1917 г.)	NucleoSpin Plasma XS kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co., Du" ren, Germany)	quantitative TaqMan PCR (β - globin)	
		3,435 ($\pm 0,246$) logГЭ/мл (18,0 нг/мл)	здоровые женщины			

		0,606 ($\pm 0,091$) мкг/мл	девятидесятилетние здоровые женщины (рождённые до 1917 г.)		Quant-iT™ and a Qubit fluorometer, High Sensitivity lab-on-a-chip DNA assay и Agilent 2100 Bioanalyzer	
		0,520 ($\pm 0,060$) мкг/мл	здоровые женщины			
внДНК	Плазма	35,39 $\pm$ 0,22 нг/мкл	беременные женщины	Магнитные частицы	спектрофотометр ически	[446]
		4,21 $\pm$ 0,11 нг/мкл		Qiaamp-колонки		
		18,61 $\pm$ 0,29 нг/мкл		Genelute-колонки		
		21,49 $\pm$ 0,32 нг/мкл		Высаливание		
		48,89 $\pm$ 0,56 нг/мкл		Лизис кипячением		
		402,75 $\pm$ 2,65 нг/мкл		Альбумин/ IgG + лизис кипячением		
внДНК	Плазма	56,49 копий/мл (0,2 нг/мл)	пациенты с доброкачественны ми кистами поджелудочной железы, пациенты с аденокарциномой протоков поджелудочной железы, перенесшие операцию, пациенты с PDAC с метастазами	QIAamp circulating nucleic acid kit	Цифровая капельная ПЦР	[447]
		4,06 копий/мл (13,5 пг/мл)		PME free-circulating DNA Extraction Kit		
		62,57 копий/мл (0,2 нг/мл)		Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit		
		0		EpiQuick Circulating Cell- Free DNA Isolation Kit		
		0		NEXTprep-Mag cfDNA Isolation Kit NpMV1		
		6,08 копий/мл (20,3 пг/мл)		NEXTprep-Mag cfDNA Isolation Kit NpMV2		
внДНК	Плазма	13,9 (3,0-34,7) нг/мл	здоровые	QIAamp UltraSens Virus	количественная	[701]

		медиана 24,1 нг/мл, с большой вариабельностью среди пациентов в среднем 63,5 нг/мл, диапазон 4,0–940,5 нг/мл	лимфома	Kit	ПЦР в режиме реального времени	
внДНК	Плазма	79,78±8,12 нг/мл,	здоровые	QIAamp DNA Micro kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)	количественная ПЦР в режиме реального времени	[199]
		106,88±12,40 нг/мл,	ранний рак желудка			
		120,23±10,08 нг/мл	запущенный рак желудка			
внДНК	Плазма	среднее значение 122,7 нг/мл	здоровые	QIAamp DNA Mini kit	количественная ПЦР в режиме реального времени	[189]
		среднее значение 270,0 нг/мл	НМРЛ			
внДНК	Плазма	29 нг/мл (диапазон 0–175)	здоровые	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit-Large Volume (Roche diagnostics)	количественная ПЦР в режиме реального времени	[702]
		77,06 нг/мл	НМРЛ умершие			
		23 нг/мл	НМРЛ выжившие			
внДНК	Плазма	105,2 нг/мл	здоровые	QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)	количественная ПЦР в режиме реального времени	[187]
		77,06 нг/мл	РМЖ			
ЯвнДНК	Плазма	24,0±3,33 нг/мл (диапазон 0,79-76,8)	здоровые	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAamp-Blood Mini Kit, QIAGEN, Chatsworth, CA, USA)	TapeStation 2200 (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)	[703]
		53,1±6,69 нг/мл (диапазон 11,3-646)	рак ротовой полости			
МвнДНК	Плазма	1298 ГЭ/мл (8,65 нг/мл)	здоровые	PCR Template Preparation Kit (Roche Diag nostics, Germany)	Количественная ПЦР (мультиплекс)	[197]
ЯвнДНК		522115 ГЭ/мл ($3,5 \times 10^3$ нг/мл)				
МвнДНК		1359 ГЭ/мл (9,06 нг/мл)	доброкачественно			

ЯвнДНК		73977 ГЭ/мл (493 нг/мл)	е заболевание		референсных генов GAPDH и МТАТР	
МвнДНК		4678 ГЭ/мл (31,16 нг/мл)	РМЖ			
внДНК		205013 ГЭ/мл ($1,4 \times 10^3$ нг/мл)				
внДНК	Сыворотка	5,5±3,5 нг/мл	здоровые	QIAamp Blood Mini Kit, Qiagen, Milan, Italy)	количественная ПЦР в режиме реального времени гена НТЕРТ (ген обратной транскриптазы теломеразы человека)	[190]
		15,4±10,9 нг/мл	РПЖ			
внДНК	Сыворотка	40 нг/мл	здоровые	QIAamp DNA Blood® kit (Qiagen, Hilden, Germany)	флуориметрия	[200]
		286 нг/мл	глиобластома			
		588 нг/мл	метастазы в головной мозг от аденокарциномы IV стадии			
внДНК	Плазма	197,176 мкг/л (диапазон 94,757–303,367)	здоровые	Branched DNA (bDNA) technique	bDNA technique	[704]
		199,943 мкг/л (диапазон 78,730-396,208)	доброкачественная опухоль			
		811,354 мкг/л (диапазон 450,714-1307,185)	рак яичников			
внДНК	Плазма	3,20 нг/мл (диапазон 1,2-15,6)	здоровые	QIAamp blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany).	количественная SYBR Green ПЦР (ген β-актин)	[705]
		13,7 нг/мл (диапазон 1,3-97,3)	рак пищевода			
внДНК	Плазма	0,004 нг/мл (диапазон 0-1,883)	здоровые	Qiamp DNA minikit	SYBR Green	[198]

		0,014 нг/мл (диапазон 0-0,864)	доброкачественные урогенитальные заболевания	(Qiagen, Milan, Italy)		
		0,15 нг/мл (диапазон 0-4,460)	рак мочевого пузыря			
внДНК	Плазма	15,641 нг/мл (диапазон 0,894-208,560)	здоровые	QIAamp DSP Virus Kit (Qiagen, Italy)	ПЦР в режиме реального времени (APF ген)	[706]
		5,260 нг/мл (диапазон 0,990-47,490)	меланома			
внДНК	Плазма	115 нг/мл (диапазон 24-170)	РМЖ	(Qiaamp Blood Kit; Qiagen, Hilden, Germany)	спектрофотометрически	[425]
		0-45 нг/мл	здоровые			
внДНК	Плазма	318 нг/мл (диапазон 0->500)	НМРЛ	QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Italy)	DNA DipStick TM Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)	[188]
		18 нг/мл (диапазон 0-125)	здоровые			
внДНК	Плазма	22,6 нг/мл (диапазон 3,1-730,5)	рак лёгкого	QIAamp DNA Blood Mini Kits (Qiagen, Valencia, CA)	Количественная ПЦР (β-актин)	[191]
		10,4 нг/мл (диапазон 1,6-89,8)	здоровые			
внДНК	Плазма	53,1±75,3 мкг/л	обструктивное апноэ сна	QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany)	количественная ПЦР в режиме реального времени гена b-глобин	[707]
		24,0±32,0 мкг/л	мужчины без ишемической болезни сердца и рака			
внДНК	Плазма	708,5 нг/мл (диапазон 40-7575)	РПЖ	QIAamp DNA Mini Kit and a вакуумная камера (Qiagen QIAvac24, Qiagen, Hilden, Germany)	спектрофотометрически	[708]
		267 нг/мл (диапазон 77-2908)	ДГПЖ			
внДНК	Плазма	259 нг/мл (диапазон 83-604)	метастатическая меланома	QIAamp extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA)	Pico Green	[709]
	Сыворотка	1056 нг/мл (диапазон 411-2821)				

	Ночная сыворотка	4783 нг/мл (диапазон 1709-11054)				
	Сыворотка	9-79 нг/мл	здоровые			
внДНК	Сыворотка	57,1±30,6 нг/мл	здоровые	QIAmp 96 Spin Blood DNA extraction Kit (Qiagene, Santa Clarita, CA)	PicoGreen	[431]
		458±790 нг/мл (для ПСА 4-20)	РПЖ			
		490±471 нг/мл (для ПСА >20)				
		67±36 нг/мл (для СА125<100)	рак яичников			
		49±27 нг/мл (для СА125>100-500)				
		118±125 нг/мл (для СА125 500)				
		74±49 нг/мл (для СА-15-3<100)	РМЖ			
		111±104 нг/мл (для СА-15-3 100-500)				
		307±601 нг/мл (для СА-15-3>500)				
		0-3000 нг/мл	гематологические злокачественные новообразования			
		до 5000 нг/мл	разные опухоли			
внДНК	Плазма	21,9±9,7 нг/мл (диапазон 9,4-43,6)	здоровые мужчины	NucleoSpin Blood Kit (Macherey–Nagel, Duren, Germany)	SYBR Green I	[710]
		20,5±7,4 нг/мл (диапазон 6,7-37,5)	здоровые женщины			
		meadian 28,1 нг/мл	ДГПЖ			
		meadian 20,2 нг/мл (для рN0M0)	РПЖ			
		медиана 25,8 нг/мл (для рN1M0)				
		медиана 41,6 нг/мл (для M1)				
внДНК	Сыворотка	27,1 нг/мл (диапазон 2,9-242,7)	пациенты перед	QIAamp DNA Blood Mini	ПЦР в режиме	[711]

	Плазма после одного центрифуг ирования	2,9 нг/мл (диапазон 0,0-9,9)	биопсией простаты и мужчины в двух отдельных контрольных группах	kit (Qiagen, West Sussex, United Kingdom)	реального времени (APR ген)	
	Плазма после второго центрифуг ирования	2,6 нг/мл (диапазон 0,0-11,8)				
внДНК	Плазма	38 нг/мл цельной крови (диапазон 0-53)	здоровые мужчины	мелкодисперсное активированное стекло	Hoechst 33258	[712]
		0-3143 нг/мл цельной крови	больные с острой травмой			
		35-173 нг/мл цельной крови	рак лёгкого			
		17-280 нг/мл цельной крови	доброкачественно е хроническое заболевание легких			
		0-1444 нг/мл цельной крови	носитель изотопов пневмонии			
		83-1414 нг/мл цельной крови	РМЖ			
внДНК	Плазма	16±7 нг/мл цельной крови	здоровые мужчины	мелкодисперсное активированное стекло	Hoechst 33258	[260]
		15±13 нг/мл цельной крови	здоровые женщины			
внДНК	Плазма	0-590 нг/мл цельной крови	фиброаденома молочной железы	мелкодисперсное активированное стекло	Hoechst 33258	[713]

		0-2160 нг/мл цельной крови	РМЖ			
внДНК	Плазма	0-527 нг/мл цельной крови	рак желудка	мелкодисперсное активированное стекло	Hoechst 33258	[714]
		0-297 нг/мл цельной крови	рак кишечника			
внДНК	Плазма	21 ± 4 нг/мл цельной крови	здоровые мужчины	Blood Plasma DNA Isolation Kit (BioSilica Ltd, Novosibirsk, Russia)	Pico Green	[185]
		13 ± 7 нг/мл цельной крови	хронический простатит			
		90 нг/мл цельной крови (диапазон 10–234)	ДГПЖ			
		115 нг/мл цельной крови (диапазон 13–339)	РПЖ			
внДНК	Сыворотка	13±3 нг/мл (диапазон 0-50)	норма		Радиоиммуноанал из	[60]
		164±44 нг/мл	легочный			
		193±79 нг/мл	грудь			
		182±95 нг/мл	женские гениталии			
		102±37 нг/мл	толстая кишка - прямая кишка			
		104±28 нг/мл	другие заболевания			
		41±11 нг/мл	мочеполовой			
		108±35 нг/мл	голова - шея			
		286±106 нг/мл	ЦНС			
		493±299 нг/мл	лимфома			
		245±89 нг/мл	неизвестный			
		64±39 нг/мл	смешанный			

внДНК	Плазма	1,2-437 мкг/20 мл плазмы	различные запущенные злокачественные новообразования	фенольная экстракция с последующим пересаживанием спиртом	спектрофотометр ически	[418]
внДНК	Плазма	266±57 нг/мл	норма	экстракция фенолом	мечение ДНК с использованием ник-трансляции	[432]
		209+14 нг/мл	хронические воспалительные заболевания			
		293±+57 нг/мл	инактивируемая стероидами системная красная волчанка			
внДНК	Плазма	936 ГЭ/мл (диапазон 633-2074) (6,24 нг/мл, диапазон 4,22-13,7)	ДГПЖ	QIAamp blood kit (Qiagen, Hilden, Germany)	Количественная Taq-man ПЦР в режиме реального времени (ген β- глобин)	[715]
		60 мин после биопсии: 1494 ГЭ/мл (диапазон 613-2522) (9,96 нг/мл, диапазон 4,09-16,65)				
		Две недели после биопсии: 1012 ГЭ/мл (диапазон 425-2751) (6,75 нг/мл, диапазон 2,83-18,16)				
		1734 ГЭ/мл (диапазон 351-3131) (11,44 нг/мл, диапазон 2,34-20,66)	РПЖ			
		60 мин после биопсии: 2758 ГЭ/мл (диапазон 1498-5226) (18,2 нг/мл, диапазон 1,0-34,8)				
		Две недели после биопсии: 1972 ГЭ/мл (диапазон 793-3521) (13,0 нг/мл, диапазон 53-23,2)				

		1780 ГЭ/мл (диапазон 1514-2732) (11,7 нг/мл, диапазон 10,0-18,0)	интраэпителиальн ая неоплазия простаты			
		60 мин после биопсии: 1853 ГЭ/мл (диапазон 448-3647) (12,2 нг/мл, диапазон 3,0-24,1)				
		Две недели после биопсии: 1714 ГЭ/мл (диапазон 977-2831) (11,3 нг/мл, диапазон 6,5-18,7)				
внДНК	Плазма	Перед диализом: 0,024±0,004 мкг/мл (диапазон 0-0,08)	мужчины, находящиеся на длительном гемодиализе		модифицированн ый встречный иммуноэлектрофо рез	[716]
		После диализа: 0,683±0,172 мкг/мл (диапазон 0-5,12)				
внДНК	Сыворотка	187 нг/мл (118±14)	доброкачественно е заболевание желудочно- кишечного тракта		радиоиммуноанал из	[416]
		199 нг/мл (412±63)	злокачественное заболевание желудочно- кишечного тракта			
		88 нг/мл (14±3)	норма			

Приложение 3. Активация различных генов при помощи микроРНК при прогрессировании рака предстательной железы

№	Ген	Основные функции гена	микроРНК (экспрессия снижена)	Клетки/ ткани	Ссылки
1.	AEG-1 (astrocyte elevated gene-1)	Пролиферация, метастазирование, трансформация, ангиогенез и химиорезистентность	-1297	LNCaP, PC3	[717]
2.	AKT1 (murine thymoma viral oncogene homolog 1)	Пролиферация, развитие клеточного цикла, апоптоз, рост клеток, выживание клеток, миграция и ангиогенез	-34b -302 -495	LNCaP, PC3, DU-145, PZ-HPV-7	[718–720]
3.	ALDH1A3 (aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3)	Детоксикация альдегидов, образующихся в результате метаболизма алкоголя и перекисного окисления липидов	-187	LNCaP, PC3, DU-145	[629]
4.	AMACR (alpha-methylacyl-CoA racemase)	Участвует в расщеплении жирной кислоты (пристановой кислоты)	-26a	LNCaP, PC3, DU-145	[721]
5.	AR (androgen receptor)	Пролиферация, дифференцировка клеток и рост клеток	let-7c -31 -34a -124 -141 -301a -371 -488* -541	LNCaP, C4-2B, CWR22rv1, PC3, ткани РПЖ	[271, 295–298, 722–725]
6.	Aurora kinase B	Хромосомная стабильность	-15 -16	PC-3M-luc	[726]

7.	BCL2 (B-cell lymphoma 2)	Антиапоптотический	-15a -16 -34a -34c -204 -205	LNCaP, PC3, DU-145, 22Rv1, ткани РПЖ	[664, 727– 731]
8.	BCL2L2 (BCL2 like 2)	Антиапоптотический	-205	WPE1- NB26	[40]
9.	Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large)	Антиапоптотический	-574	PC3, DU145, RWPE-1	[732]
10.	BCOX1 (breast cancer-overexpressed gene 1)	Прогрессирование РПЖ	-195	LNCaP, PC3	[733]
11.	BIRC5 (baculoviral IAP repeat containing 5)	Антиапоптотический; Прогрессирование РПЖ и метастазирование	-203	PC3, DU145	[734, 735]
12.	BMI1 (B-cell specific Molony leukemia virus insertion region homolog 1)	Онкоген, регуляция клеточного цикла	-30d -128 -200b -200c -203 -221	LNCaP, PC3, DU-145	[301, 302]
13.	BMP1 (bone morphogenetic protein 1)	Подавляет работу онкогенной матриксной металлопротеиназы	-194	PC3	[736]
14.	BRD8 ISO2 (bromodomain containing 8 isoform 2)	Коактиватор во время активации транскрипции ядерными рецепторами, активируемыми гормонами	-185	LNCaP	[737]
15.	BUB1 (budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog)	Хромосомная стабильность	-15 -16	PC-3M-luc	[726]

16.	CAND1 (cullin-associated and neddylation-dissociated 1)	Регуляция клеточного цикла и пролиферации	-148a	LNCaP	[738]
17.	CCND1 (cyclin D1)	Регуляция клеточного цикла и пролиферации	-15 -15a -16 -193b -449a	PC3, DU145, 22Rv1	[727, 730, 739, 740]
18.	CCND2 (cyclin D2)	Пролиферация и клеточный цикл	let-7a	LNCaP, PC3	[741]
19.	CDK1 (cyclin-dependent kinase 1)	Регуляция клеточного цикла	-31	LNCaP	[296]
20.	CDK1, CDK2 (cyclin-dependent kinase 1, 2)	Регуляция клеточного цикла и пролиферации	-15 -16	PC-3M-luc	[726]
21.	CDK6 (cyclin-dependent kinase 6)	Регуляция клеточного цикла	-34	PC3	[742]
22.	CD44	Пролиферация; дифференцировка клеток; миграция клеток; ангиогенез; представление цитокинов, хемокинов и факторов роста соответствующим рецепторам; выживаемость, адгезия и миграция клеток	-34 -143 -145 -373 -520c	LNCaP, CD44+ и CD44– LAPC9, LAPC4, PC3, Du145	[743– 745]
23.	CD133 (PROM1 prominin 1)	Фактор стволовой транскрипции	-143 -145	PC3	[744]
24.	CDH2 (cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal))	Клеточная адгезия	-29b	LNCaP, PC3	[746]
25.	CHN1 (chimerin 1)	Механизмы передачи нейронных сигналов	-205	DU145	[661]
26.	Cks1 (CDC28 protein kinase regulatory subunit 1)	Регуляция клеточного цикла	-15 -16	PC-3M-luc	[726]

27.	c-Myc (Myc protein)	Пролиферация, регуляция клеточного цикла, рост клеток и апоптоз	let-7c -34 семейс тво -143 -145	LNCaP, PC3	[297, 744, 747]
28.	COUP-TFII (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II)	Рост клеток, пролиферация, метастазирование, лекарственная устойчивость	-382	LNCaP, PC3	[748]
29.	COX2 (cytochrome c oxidase assembly homolog 2)	Пролиферация и рост клеток, апоптоз	-26a -101	LNCaP, PC3, BPH1 CmiR101	[749, 750]
30.	c-SRC (v-src sarcoma)	Пролиферация клеток, инвазия, миграция, апоптоз, выживание, адгезия и подвижность; транскрипция генов, иммунный ответ, прогрессирование клеточного цикла и трансформация	-205	PC3, DU145	[751]
31.	Cyclin D3	Контроль клеточного цикла и пролиферации	-15 -16	PC-3M-luc	[726]
32.	Dlx5 (distal-less homeobox)	Фактор транскрипции, метастазирование	-203	PC3	[735]
33.	DEPDC1 (DEP domain containing 1)	Антиапоптотический и транскрипционный корепрессор	-130a	PC3	[752]
34.	DIXDC1 (DIX domain containing 1)	Пролиферация клеток, миграция и инвазия	-1271	PC-3, DU145, ткани РПЖ	[753]
35.	DNMT1 (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1)	Репрессия транскрипции	-34b -152	LNCaP, PC3, MDA-PCa- 2b	[718, 754]
36.	DNMT3b (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta)	Иммунодефицит, нестабильность центромер, метилирование de novo и неметилированная модификация ДНК	-145	PC3, DU145	[755]

37.	DUP (double parked)	Хромосомная стабильность	-15 -16	PC-3M-luc	[726]
38.	EIF4EBP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1)	Регуляция трансляции белков гормонами, факторами роста	-125b	Ткани РПЖ	[651]
39.	E2F1 (E2F transcription factor 1)	Ход клеточного цикла; способствует вступлению покоящихся клеток в S-фазу; проапоптотический	-31 -330	LNCaP, 22RV1, PC3, DU145, ткани РПЖ	[296, 756]
40.	E2F2 (E2F transcription factor 2)	Ход клеточного цикла	let-7a -31	LNCaP, PC3	[296, 741]
41.	E2F3 (E2F transcription factor 3)	Пролиферация и ход клеточного цикла	-34c -128 -200c	PPC-1, PC3, DU145, PPC-1	[301, 728, 757]
42.	E2F5 (E2F transcription factor 5, p130-binding)	Активатор транскрипции; пролиферация клеток	-205	DU145	[661]
43.	E2F6 (E2F transcription factor 6)	Антиапоптотический	-31	WPE1-NB26	[40]
44.	EGFR (epidermal growth factor receptor)	Пролиферация	-7 -15 -16 -128 -133a/b -146a -875	LNCaP, PC3, DU145, ткани КР-РПЖ	[301, 730, 758–761]

45.	ERBB-2/HER2 (epidermal growth factor receptor 2)	Пролиферация, метастазирование, антиапоптоз, ангиогенез, прогрессирование опухоли и плохая выживаемость	-331 -331	LNCaP, PC3, DU145, LNCaP- FGC, CWR- 22RV1, 22RV1	[613, 760]
46.	ERBB3 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3)	Пролиферация или дифференцировка клеток	-205	DU145	[661]
47.	ERK5 (extracellular signal-regulated kinase- 5)	Пролиферация, подвижность, инвазия и метастазирование	-143 -145	LNCaP, C4-2	[762]
48.	ERR α (Estrogen- Related Receptor α)	Плохой прогноз при раке молочной железы и простаты, инвазия клеток	-135a	MDA- MB231 (эпителиа льные клетки молочной железы человека), PC3	[763]
49.	EXPO6 (exportin-6)	Ядерный экспорт	-1	LNCaP, PC3	[652]
50.	EXO1 (exonuclease 1)	Регуляция клеточного цикла	-31	LNCaP	[296]
51.	EZH2 (enhancer of zeste homolog 2)	Выживаемость клеток, метастазирование, инициация и прогрессирование опухоли	let-7 семейс тво - 101	PC3 PDGF- D, DU145, метастатич еские ткани РПЖ	[764, 765]

52.	FGF2 (fibroblast growth factor 2)	Пролиферация клеток, миграция и инвазивность	-15 -16	PC3, DU145	[730]
53.	FN1 (fibronectin)	Адгезия и миграция клеток	-1	LNCaP	[766]
54.	FNDC1 (fibronectin type III domain containing 1)	Адгезия и миграция клеток	-1207	PC3, MDA-PCa-2b	[767]
55.	Fra-1 (Fos-related antigen 1)	Клеточная подвижность, пролиферация, дифференцировка и трансформация	-195	PC3, DU145	[768]
56.	Fzd7 (frizzled family receptor 7)	Развитие и прогрессирование рака	-613	PC3, DU145	[769]
57.	FSCN1 (fascin homolog 1)	Подвижность и миграция клеток	-145	PC3, DU145	[770]
58.	FGF2 (fibroblast growth factor 2)	Ангиогенез	-15a -16 -195	PC3, DU145	[730, 771]
59.	FOXM1 (forkhead box M1)	Регуляция клеточного цикла, пролиферация и репарация разрывов ДНК; фактор транскрипции	-15 -16 -31	LNCaP, PC-3M-luc	[296, 726]
60.	FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1)	Митогенез и дифференцировка	-15a -16 -205	LNCaP, PC3, DU145	[730, 772]
61.	GLS (mitochondrial glutaminase)	Пролиферация клеток	-23a/b	PC3	[773]
62.	GOLM1 (golgi membrane protein 1)	Белок клеточного ответа на вирусную инфекцию	-27b -143 -145	PC3, DU145, ткани РПЖ	[599, 774]
63.	GRN (granulin)	Рост клеток, онкогенез и злокачественность	-107	PC3, CW22	[775]
64.	GTF2H1 (general transcription factor IIH)	Фактор транскрипции, эксцизионная репарация нуклеотидов ДНК и транскрипция РНК	-130a	LNCaP	[772]
65.	HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor)	Выживаемость, клеточная адгезия, ангиогенез, онкогенность и переход в андрогеннезависимое состояние	-132	PC3	[776]

66.	HDAC1 (histone deacetylase 1)	Пролиферация и выживание клеток	-34b -449a	LNCaP, PC3	[718, 777]
67.	HDAC2 (histone deacetylase 2)	Регуляция транскрипции и ход клеточного цикла	-34b	LNCaP, PC3	[718]
68.	HDAC4 (histone deacetylase 4)	Регуляция транскрипции и ход клеточного цикла	-34b	LNCaP, PC3	[718]
69.	HEF1 (human enhancer of filamentation 1, NEDD9 or Cas-L)	Ход клеточного цикла, апоптоз, передача онкогенного сигнала, миграция, инвазия и метастазирование	-145	PC3	[778]
70.	HMGA1 (high mobility group AT-hook 1)	Фактор транскрипции	-195 -296	PC3, DU145, ткани КР-РПЖ	[779, 780]
71.	HRAS (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog)	Деление клеток и передача сигнала	-205	LNCaP	[771]
72.	HUR (human antigen R)	Подвижность и пролиферация	-34a	PC3	[729]
73.	IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor)	Контроль роста и выживания клеток	let-7a	LNCaP, PC3, DU145	[623, 781]
74.	ITGA3 (integrin A3), ITGB1 (integrin B1)	Миграция, инвазия, адгезия и выживание	-223	PC3, PC3-M	[782]
75.	Klf4 (Kruppel-like factor 4)	Фактор транскрипции и дифференцировка клеток	-143 -145	PC3	[744]
76.	KLK2 (kallikrein-related peptidase 2)	Отвечает за расщепление простатспецифического антигена в его ферментативно активную форму; передача сигнала	-205	LNCaP	[772]
77.	KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)	Пролиферация и миграция	-143	PC3, DU145, ткани РПЖ	[783]
78.	LAMC1 (laminin γ 1)	Дифференцировка клеток, миграция, адгезия, фенотип, выживание и инвазия	-29	PC3, DU145	[784]

79.	LAPTM4B (lysosomal-associated transmembrane protein 4B)	Прогрессирование заболевания	-188	LNCaP, PC3, ткани ППЖ	[785]
80.	LASP1 (LIM and SH3 protein 1)	Актин-связывающий белок; предположительно участвует в организации цитоскелета и транспорте ионов	-1	LNCaP, PC3, DU145	[766]
81.	LEF1 (lymphoid enhancer-binding factor-1)	Пролиферация, инвазия и развитие рака предстательной железы	-34a	LNCaP-AI, C4-2B	[786]
82.	LIMK1 (LIM domain kinase 1)	Опухолевая прогрессия и инвазия	-143	As-CSCs	[787]
83.	Lin28 (lin-28 homolog A)	Синтез белка и рост клеток	Let-7c	LNCaP	[297]
84.	MAP2K4 (mitogen-activated protein kinase kinase 4)	Регуляция клеточного цикла; антиапоптотический	-27a	LNCaP, PC3	[788]
85.	MCM2 (minichromosome maintenance complex component 2)	Регуляция клеточного цикла	-31 -1296	LNCaP, PC3	[296, 789]
86.	MDM2 (Proto-Oncogene)	Пролиферация, злокачественное перерождение клеток	-509	HGC-27	[790]
87.	MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)	Пролиферация, миграция, инвазия, метастазирование, ремоделирование тканей, дифференцировка клеток, апоптоз и ангиогенез	-29b -130b -146a -376c	PC3, DU145	[757, 791, 792]
88.	MNAT1 (menage a trois homolog 1, cyclin H assembly factor)	AR-коактиватор; стабилизирует комплекс циклин H-CDK7 с образованием функционального ферментативного комплекса CDK-активирующей киназы (CAK)	-203	LNCaP	[772]
89.	MSK1 (mitogen- and stress-activated kinase 1)	Серин/треонин-протеинкиназа, необходимая для митогенного или стресс-индуцированного фосфорилирования факторов транскрипции; регуляция факторов транскрипции	-148a	PC3, DU145	[793]

90.	MTOR (Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase)	Пролиферация, миграция, инвазия	-495	PZ-HPV-7, LNCaP, PC-3	[720]
91.	MYO6 (myosin 6)	Внутриклеточный транспорт везикул и органелл; миграция	-143 -145	LNCaP, DU145, ткани РПЖ	[794]
92.	NANOG (Nanog homeobox)	Регулятор транскрипции, участвующий в пролиферации и самообновлении внутренней клеточной массы и эмбриональных стволовых клеток	-128	PC3, DU145	[301]
93.	NOTCH1 (Notch 1)	Развитие клеток, дифференцировка, пролиферация и выживание; ангиогенез	-34a -200	PC3 PDGF-D, PC3, C4-2B, CWR22rv1	[295, 795]
94.	OCT4 (octamer-binding transcription factor 4 (POU5F1))	Транскрипционный фактор; клеточная пролиферация, самообновление и плюрипотентность	-143 -145	PC3	[739]
95.	P4HA1 (Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 1)	Распространение, инвазия	-124	DU145, PC3	[796]
96.	PCAF (p300/CBP-associated factor)	Ингибирует процесс клеточного цикла, регуляцию транскрипции	-17	LNCaP, PC3, C4-2B	[797]
97.	PAR2 (protease-activated receptor 2)	Пролиферация, воспалительные реакции и метаболизм	-203	LNCaP	[772]
98.	PARK7 (parkinson protein 7)	Выживание	-20 -203	LNCaP	[772]
99.	PBX (pre-leukemia transcription factor 3)	Дифференциация мочеполовых органов и стероидогенез	Let-7d	C4-2B, ткани РПЖ	[603]
100.	PCANAP6 (prostein, prostate cancer-associated protein 6)	Метастазирование, миграция и инвазия	-126*	LNCaP	[798]
101.	PIM1 (Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase 1)	Выживание клеток	-33a	VCaP, LNCaP	[614]

102.	Pin1 (peptidyl-prolyl isomerase)	Рост клеток, дифференцировка нейронов и выживание	-296	LNCaP, PC3, DU145, 22Rv1, ткани РПЖ	[799]
103.	PNP (purine nucleoside phosphorylase)	Пролиферация, миграция и инвазия	-1 -133a	PC3, DU145; ткани РПЖ	[800]
104.	PLK1 (Polo-like kinase 1)	Регуляция клеточного цикла, хромосомная стабильность	-15 -16	PC-3M-luc	[726]
105.	PRKCE (protein kinase C)	Клеточная адгезия, подвижность и миграция; регуляция клеточного цикла, регуляция ионных каналов, иммунный ответ, инвазия раковых клеток и апоптоз	-205	DU145	[661]
106.	Protein tyrosine kinase 9 (A6/twinfilin)	Регуляция динамики клеточного актина	-1	LNCaP, PC3	[652]
107.	PSAP (prosaposin)	Лизосомальная деградация сфинголипидов; развитие нервной репродуктивной системы	-130a	LNCaP	[772]
108.	PTMA (prothymosin alpha)	Иммунная функция: устойчивость к определенным инфекциям	-1	LNCaP, PC3, DU145	[766]
109.	RING2 (ring finger protein 2, RING1B or RNF2)	Репрессия транскрипции, развитие и пролиферация клеток	-181a -181b -200b -200c	DU-145	[302]
110.	RLIP76 (Ral binding protein 1)	Рост опухоли; антиапоптотический	-101	PC3, DU145	[801]
111.	RNF31 (ring finger protein 31)	Инвазивность и метастазирование	-503	LNCaP, PC3	[802]
112.	ROCK1 (Rho-activated protein kinase)	Миграция опухолевых клеток и метастазирование	-146a	PC3, LNCaP-C4-2B	[803]
113.	RPS6KB1 (Ribosomal Protein S6 Kinase B1)	Прогрессирование и неблагоприятный прогноз при РПЖ	-195	DU145 и LNCaP	[804]

114.	Twist (twist homolog 1)	ЭМП	-29b	LNCaP, PC3	[746]
115.	RAN (GTP-binding nuclear protein Ran)	Член семейства онкогенов RAS; импорт белка в ядро и экспорт РНК; участвует в конденсации хроматина и контроле клеточного цикла	-205	LNCaP	[772]
116.	Runx2 (runt-related transcription factor 2)	Помогает контролировать активность определенных генов; метастазирование; действует как «главный переключатель», регулируя ряд других генов, участвующих в развитии клеток, из которых строятся кости	-203	PC3	[735]
117.	SEC23B (Sec23 homolog B)	Перевозка везикул и ЭР в транспорт, опосредованный везикулами Гольджи	-130a	PC3	[752]
118.	SENPI1 (SUMO1/sentrin specific peptidase 1)	Преобразует нормальный эпителий простаты в дисплазию и модулирует несколько онкогенных путей в клетках простаты, включая AR, c-Jun и циклин D1	-145	PC3	[299]
119.	SMAD4 (SMAD family member 4)	Регулирует транскрипцию; коактиватор и медиатор передачи сигнала; остановка клеточного цикла в фазе G1 и индукция апоптоза	-203	PC3	[735]
120.	SIRT1 (silent mating type information regulation 1)	Апоптоз и резистентность к паклитакселу, онкогенез, рост раковых клеток, метастазирование	-34a	C4-2, LNCaP, PC3	[729, 805–807]
121.	Snail1 (snail homolog 1)	ЭМП, инвазивность, миграция, остановка роста и выживание	-29b	LNCaP, PC3	[746]
122.	Snail2 (snail homolog 2)	Репрессор транскрипции и ЭМП	-1 -200 семейство -205	PC3, PC3 PDGF-D, Pten/TP53-нулевая саркома тоидная карцинома ПЖ	[644, 808]
123.	SREBP (sterol regulatory element-binding protein)	Рост клеток и устойчивость к кастрации	-185 -342	C4-2B	[809]
124.	STAT6 (signal transducer and activator of transcription-6)	Трансдукция сигнала и активация транскрипции	-361	DU145, CR ткани РПЖ	[810]

125.	SUB1 (SUB1 homolog, transcriptional regulator)	Пролиферация, инвазия и миграция, рост опухоли и метастазирование	-101	LnCaP, DU145, PC3, доброкачественные ткани и РПЖ	[811]
126.	SWAP70 (switching B-cell complex 70 kDa subunit)	Адгезия, агрегация и миграция	-143 -145	PC3, DU145	[812]
127.	TACC1, TACC3 (transforming acidic coiled-coil containing protein 1,3)	Регуляция клеточного цикла	-15 -16	PC-3M-luc	[726]
128.	TPD52L2 (tumor protein D52 like 2)	Миграция, пролиферация и образование колоний клеток РПЖ	-503	DU145	[42]
129.	TLN2 (talin 2)	Адгезия и устойчивость к апоптозу	-132	PC3	[776]
130.	TGFBR1 (transforming growth factor, beta receptor I)	Остановка клеточного цикла, пролиферация и дифференцировка клеток, заживление ран, продукция внеклеточного матрикса и иммуносупрессия	-128	PC3, DU145	[301]
131.	TPD52 (tumor protein D52)	Миграция и инвазия	-218 -224	PC3, DU145; ткани РПЖ	[813, 814]
132.	TRPM8 (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8)	Участвует в обнаружении ощущений, таких как прохлада, активируясь при температуре ниже 25°C; ионный канал, деполяризация и генерация потенциала действия	-26a	LNCaP	[721]
133.	TYMS (thymidylate synthetase)	Синтез нуклеотидов	-15 -16	PC-3M-luc	[726]
134.	UBE4B (ubiquitination factor E4B)	Деградация после повреждения ДНК	-1301	LNCaP	[815]
135.	ULK2 (unc-51-like kinase 2)	Серин/треонин-протеинкиназа, участвующая в аутофагии в ответ на голодание	-26b	LNCaP, PC3, C4-2	[816]

136.	VIM (Vimentin)	Poor differentiation and metastasis	-17	M12, the F6 subline	[817]
137.	XPO6 (exportin-6)	Опосредует ядерный экспорт актина и профилин-актиновых комплексов в соматических клетках	-1	LNCaP, PC3, DU145	[765]
138.	WNT3a (wingless-type MMTV integration site family, member 3A)	Выживаемость, пролиферация, инициация и прогрессирование рака	-15a -16	PC3, DU145, клетки РПЖ	[727, 730]
139.	Wnt5a (wingless-type MMTV integration site family, member 5A)	Активирует или ингибирует каноническую передачу сигналов Wnt в зависимости от контекста рецептора; подавляет образование и миграцию опухоли	-26a	PC3	[818]
140.	ZBTB46 (Zinc Finger And BTB Domain Containing 46)	Метастазирование, пролиферация	-1	LNCaP, 22RV1, RasB1, PC3	[819]
141.	ZEB1 (zinc-finger E-box)	Репрессор транскрипции и ЭМП	-200 семейство	PC3, PC3 PDGF-D	[644]
142.	ZEB2 (zinc finger E-box binding homeobox 2, Smad-interacting protein 1 (SIP1))	Репрессор транскрипции; инвазия	-145 -200 семейство -203 -205	PC3, PC3 PDGF-D, DU145, C4-2B	[644, 661, 735, 751, 820]
143.	ZNF217 (zinc-finger protein 217)	Рост клеток, пролиферация, миграция, инвазия и выживание	-503	PC3	[821]

Приложение 4. Сниженная регуляция различных генов при помощи микроРНК при прогрессировании рака предстательной железы

№	Ген	Основные функции гена	микроРНК	Клетки/ткани	Ссылки
144.	ABL2 (Arg) V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2	Пролиферация клеток, рост клеток, выживание, подвижность, адгезия и эндоцитоз	-20a↑	PC3, DU-145	[822]
145.	ANP32A (acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A)	Пролиферация, дифференцировка, апоптоз и опухолевая супрессия	-21↑	LNCaP, клетки карциномы простаты	[823]
146.	ARHI (GTP-binding RAS-like 3)	Пролиферация клеток, инвазия и апоптоз	-221↑ -222↑	PC3, ткани РПЖ	[824, 825]
147.	ARRDC3 (arrestin domain-containing protein 3)	Регуляция экспрессии адренергических рецепторов на клеточной поверхности и, возможно, других рецепторов, связанных с G-белком.	-182↑	LNCaP, DU145	[826]

148.	Bak1 (BCL2-antagonist/killer 1)	Проапоптотические молекулы	-125b↑	Самцам бестимусных мышей подкожно вводили клетки РС-346С; андроген-независимый рост клеток РПЖ	[289, 827]
149.	BIM (BCL2L11 (BCL2-like 11))	Проапоптотический член семейства BCL-2	-32↑	LNCaP, PC3	[652]
150.	BTG1 (B-cell translocation gene 1)	Антипролиферативный; усиленный апоптоз	-19a↑	CRPC	[828]
151.	BTG2 (BTG family, member 2)	Антипролиферативный, контроль клеточного цикла и апоптоз	-21↑ -32↑	LNCaP, RWPE-1	[43, 829]
152.	CASP7 (caspase 7)	Апоптоз	-106b↑	LNCaP, клетки РПЖ	[766]
153.	CSR1 (cellular stress response 1)	Подавление роста клеток и индуцированная гибель клеток	-650↑	PC3, DU145	[830]
154.	Cx43 (connexin 43, Gap junction alpha-1 protein (GJA1))	Гибель клеток, пролиферация и дифференцировка	-20a↑	LNCaP, ткани РПЖ, MDA-PCa-2b	[270]

155.	DVL2 (Dishevelled, dsh homolog 2)	Ключевой внутриклеточный медиатор сигнального пути Wnt	-221↑	LNCaP-AI	[831]
156.	E2F1 (E2F transcription factor 1)	Ход клеточного цикла; проапоптотический и транскрипционный фактор	-20a↑ -106b↑	LNCaP, PC3	[652, 832]
157.	E2F2 (E2F transcription factor 2)	Регуляция клеточного цикла; фактор транскрипции	-20a↑	PC3	[832]
158.	E2F3 (E2F transcription factor 3)	Регуляция клеточного цикла и пролиферация; фактор транскрипции	-20a↑	PC3	[832]
159.	E-cadherin	Кальцийзависимый белок клеточной адгезии; подвижность и пролиферация эпителиальных клеток	-29b↓	LNCaP, PC3	[746]
160.	FAF1 (Fas (TNFRSF6) associated factor 1)	Потенцирует, но не может инициировать апоптоз, индуцированный FAS	-24↑	DU-145	[833]
161.	FIH1 (factor inhibiting HIF-1)	Ангиогенез, адаптация к гипоксии	-182↑	DU145, PC3	[834]
162.	FNDC3B (fibronectin type III domain containing 3B)	Регулирует подвижность клеток и адипогенез	-143↑	LNCaP, PC3, PC3-M	[835]
163.	FOXO1 (forkhead box O1)	Транскрипционный фактор; регулирует метаболический гомеостаз в ответ на окислительный стресс; регулятор клеточного цикла	-153↑ -182↑	LNCaP, 22RV1, DU145	[836, 837]
164.	FOXO3A (forkhead box O3A)	Препятствует метастазированию РПЖ	-1307↑	PC3, DU145	[838]

165.	HECTD2 (HECT domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2)	Рост клеток	-221↑ -222↑	LNCaP, образцы костной метастатической опухоли КР-РПЖ	[839]
166.	HMGA1 (high mobility group AT-hook 1)	Участвует в регуляции транскрипции генов, содержащих или находящихся в непосредственной близости от А + Т-богатых областей	-296↑	LNCaP	[779]
167.	hZIP1	Транспортер цинка	-96↑ -182↑ -183↑	LNCaP, PC3	[840]
168.	IL24 and IL32 (interleukins)	Антипролиферативный, клеточно-дифференцирующий, антиангиогенный и иммуностимулирующий	-205↓	PC3	[841]
169.	KLF9 (Kruppel-like factor 9)	Транскрипционный фактор; подавляет рост опухоли, дифференцировку, развитие и запрограммированную гибель клеток	-141↑	PC3	[842]
170.	MARCKS (myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate)	Форма клеток, подвижность клеток, секреция, трансмембранный транспорт, регуляция клеточного цикла и развитие нервной системы	-21↑	PC3, DU145	[843]
171.	MDM4 (Mdm4 p53 binding protein homolog)	Ингибирует p53/TP53- и TP73/p73-опосредованную остановку клеточного цикла и апоптоз, метастазирование и прогрессирование РПЖ	-191↑ -887↑	Ткани простаты	[844]
172.	MTSS1 (metastasis suppressor protein 1)	Пролиферация, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП)	-96↑	PC3	[845]
173.	MYCBP2 (myc-binding protein 2)	Протеосомная деградация, синаптогенез и регулятор активации транскрипции	-1247↑	LNCaP, PC3	[846]
174.	NANOG (Nanog homeobox)	Самообновление, плюрипотентность и регуляция эпигенетической сети эмбриональных стволовых клеток; фактор транскрипции	-126↑ -149↑	PC3	[847]

175.	OCT4 (octamer-binding transcription factor 4) POU5F1)	Транскрипционный фактор; клеточная пролиферация, самообновление и плюрипотентность	-126↑ -149↑	PC3	[847]
176.	p14ARF (alternate reading frame protein product of the CDKN2A locus)	Регуляция клеточного цикла и пролиферация	-125b↑	LNCaP, 22RV1	[39]
177.	p21 (CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A))	Регуляция клеточного цикла; подавляет пролиферацию клеток и вызывает клеточное старение	-106b↑ -126↑ -149↑	LNCaP MDA-PCa-2b, PC3	[652, 847–849]
178.	p27kip1 (CDKN1B(cyclin-dependent kinase inhibitor 1B))	Ход клеточного цикла	-221↑ -222↑	LNCaP, 22Rv1, PC3, LNCaP-Abl	[850–852]
179.	P53	Апоптоз	-125b↑	PC-346C	[289]
180.	PDCD4 (programmed cell death 4)	Ингибитор неопластической трансформации; ингибирует инициацию трансляции и кэп-зависимую трансляцию, апоптоз; ген-супрессор опухоли	-21↑	LNCaP, LAPC4	[853]
181.	PHB (prohibitin)	Ингибирует синтез ДНК и регулирует пролиферацию	-27a↑	LNCaP, клетки РПЖ	[854]
182.	PHD2 (Prolyl hydroxylase domain enzyme 2)	Ангиогенез, адаптация к гипоксии	-182↑	DU145, PC3	[834]
183.	PPP2R2A (protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha)	Рост клеток и клеточный цикл	-556↑	PC3	[855]

184.	PPP2R2C (protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma)	Супрессор опухоли	-1301↑	PC3, DU145, ткани РПЖ	[41]
185.	PTEN (phosphatase and tensin homolog)	Синтез белка; выживание клеток, пролиферация и инвазия	-17↑ -20a↑ -21↑ -25↑ -93↑ -106b↑ -153↑ -4534↑	LNCaP, PC3, DU145, 22RV1; MDAPCa2b	[600, 836, 856–859]
186.	Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis)	Апоптоз	-125b↑	PC-346C	[289]
187.	RABA (Ras-related protein)	Рост клеток	-221↑ -222↑	LNCaP, образцы костной метастатической опухоли КР-РПЖ	[839]
188.	RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs)	Ингибитор нескольких ММП (матриксных металлопротеиназ); опухолевая инвазия и метастазирование	-21↑	DU-145	[860]

189.	RSU1(Ras suppressor protein 1)	Ингибирование роста	-409	PCa ARCaPE, C4-2B, C4-2 и пары стромаль ных клеток от пациентов	[861]
190.	SEC23A (Sec23 homolog A (S. cerevisiae))	Транспорт белков из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи	-375↑	LNCaP, DU145	[662]
191.	SEPT6 (septin 6)	Необходим для нормальной организации актинового цитоскелета, клеточного деления, полярности и ремоделирования мембран	-223↑	DU145	[862]
192.	SMARCA4 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4)	Регулирует экспрессию генов	-21↑	LNCaP, клетки карциномы простаты	[823]
193.	SOX2 (SRY (sex determining region Y)-box 2)	Транскрипционный фактор; участвует в процессах самообновления, плюрипотентности и пролиферации клеток	-126↑ -149↑	PC3	[847]

194.	STAG2 (stromal antigen 2)	Деление клеток	-409	PCa ARCaPE, C4-2B, C4-2 и пары стромаль ных клеток от пациентов	[861]
195.	TFPI2 (tissue factor pathway inhibitor 2)	Регуляция опосредованного плазмином ремоделирования матрикса; ингибирует ряд сериновых протеаз; супрессор опухоли	-616↑	LNCaP	[863]
196.	TNFSF10 (tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10)	Апоптоз	-145↓	PC3	[864]
197.	TP63 (tumor protein p63)	Супрессор метастазирования	-301a	PC3, LNCaP и ткани	[865]
198.	ZBTB4 (zinc finger and BTB domain containing 4)	Репрессор транскрипции	-17↑ -20a↑ -93↑ -106b↑	PC3, DU145	[866]

Приложение 5. Суммарные данные сравнения статуса метилирования цитозинов в составе свободной внДНК плазмы крови у пациентов с РПЖ с объединенной группой, включающей ЗД и пациентов с ДГПЖ.

Ген, Позиция, Статус (С или Т после конверсии)	Р-значение ×3×1167	Среднее, %	Чувствительность для 100% специфичности, %	Специфичность для 100% чувствительности, %	Пороговое значение, %	CV точность, %	CV чувствительность, %	CV специфичность, %	CV AUC, % (De Long's CI)
ПСА	,016		10,0	55,6		75,0	65,0	80,6	83,9 (73,5, 94,2)
GSTP1.C9 + RNF219.C2 + GSTP1.C2			100	100		100	100	100	100
GSTP1.C9 + RNF219.C2 + GSTP1.C16			100	100		100	100	100	100
GSTP1.C9 + RNF219.C2.T10			95,0	97,1		94,5	90,0	97,1	92,4 (83,2, 100)
GSTP1.C3.C9	,00000073	8,03/ ,0394	80,0	54,3	,101	87,3	80,0	91,4	93,0 (85,1, 100)
GSTP1.C9	,00000090	8,35/ ,160	80,0	48,6	,215	90,9	80,0	97,1	92,6 (83,2, 100)
GSTP1.C9.T17	,0000011	4,04/ ,143	80,0	37,1	,198	89,1	80,0	94,3	93,1 (83,5, 100)
GSTP1.T2.C9	,0000011	3,71/ ,142	75,0	45,7	,177	87,3	80,0	91,4	93,0 (84,7, 100)
GSTP1.T1.C9	,0000024	3,94/ ,142	75,0	34,3	,199	89,1	80,0	94,3	92,1 (82,2, 100)
GSTP1.T6.C9	,0000024	3,71/ ,142	70,0	51,4	,177	87,3	80,0	91,4	92,6 (84,4, 100)
GSTP1.T4.C9	,0000029	3,71/ ,142	75,0	51,4	,179	87,3	80,0	91,4	92,1 (83,1, 100)
GSTP1.C9.T16	,0000050	4,01/ ,140	70,0	48,6	,190	89,1	85,0	91,4	92,0 (83,4, 100)
GSTP1.C9.T14	,0000070	3,90/ ,138	70,0	34,3	,190	87,3	85,0	88,6	91,9 (82,3, 100)
GSTP1.T5.C9	,0000084	3,67/ ,143	75,0	42,9	,188	87,3	80,0	91,4	91,7 (82,9, 100)
GSTP1.T7.C9	,000016	3,62/ ,137	55,0	42,9	,184	87,3	85,0	88,6	90,7 (81,8, 99,6)
GSTP1.C9.T10	,000019	3,78/ ,139	60,0	40,0	,185	85,5	85,0	85,7	90,9 (81,8, 99,9)
GSTP1.C9.T12	,000023	3,72/ ,138	55,0	45,7	,186	81,8	85,0	80,0	91,6 (83,7, 99,4)
GSTP1.C9.T15	,00019	3,57/ ,142	50,0	42,9	,167	80,0	80,0	80,0	88,1 (78,2, 98,1)
GSTP1.C5.T15	,00021	3,01/ ,492	10,0	62,9	,289	70,9	25,0	97,1	85,7 (75,4, 96,0)
RNF219.T2.T14	,00024	99,2/ 98,5	30,0	5,56	99,2	82,1	85,0	80,6	89,3 (78,3, 100)
GSTP1.T5.T9	,00028	88,6/ 99,1	20,0	74,3	99,4	74,5	50,0	88,6	87,7 (78,8, 96,6)
GSTP1.C9.T13	,00063	3,60/ ,141	50,0	42,9	,181	78,2	80,0	77,1	87,9 (78,1, 97,6)

RNF219.C14	,0011	,400/ ,822	45,0	5,56	,354	75,0	85,0	69,4	85,6 (72,9, 98,3)
RNF219.T2.C14	,0014	,335/ ,775	50,0	5,56	,335	75,0	85,0	69,4	85,8 (73,9, 97,8)
RNF219.T3.C14	,0014	,335/ ,776	45,0	5,56	,337	75,0	85,0	69,4	86,2 (74,4, 98,1)
RNF219.T5.C14	,0014	,331/ ,752	50,0	5,56	,331	75,0	85,0	69,4	85,7 (73,5, 97,9)
RNF219.T6.C14	,0014	,333/ ,773	40,0	5,56	,296	75,0	85,0	69,4	86,0 (74,0, 98,0)
RNF219.T8.C14	,0014	,327/ ,755	40,0	5,56	,330	75,0	85,0	69,4	86,1 (74,2, 98,1)
RNF219.T11.C14	,0014	,327/ ,769	50,0	5,56	,329	75,0	85,0	69,4	86,0 (74,1, 97,9)
RNF219.T12.C14	,0014	,328/ ,770	50,0	5,56	,330	75,0	85,0	69,4	86,0 (74,1, 97,8)
GSTP1.C9.T11	,0015	3,57/ ,141	45,0	42,9	,178	81,8	80,0	82,9	86,3 (75,7, 96,9)
RNF219.T7.C14	,0016	,333/ ,774	40,0	5,56	,330	75,0	85,0	69,4	86,2 (74,4, 98,1)
RNF219.T9.C14	,0016	,329/ ,770	40,0	5,56	,333	75,0	85,0	69,4	86,1 (74,2, 98,0)
RNF219.C14.T15	,0016	,325/ ,767	45,0	5,56	,320	75,0	85,0	69,4	85,8 (73,9, 97,7)
RNF219.C14.T17	,0018	,330/ ,770	40,0	5,56	,322	75,0	85,0	69,4	85,8 (73,9, 97,8)
RNF219.T1.C14	,0020	,335/ ,764	40,0	5,56	,335	75,0	85,0	69,4	85,4 (73,2, 97,7)
RNF219.T10.C14	,0020	,323/ ,730	40,0	2,78	,306	75,0	85,0	69,4	85,7 (73,6, 97,8)
RNF219.T13.C14	,0020	,321/ ,717	45,0	2,78	,306	75,0	85,0	69,4	85,8 (73,8, 97,9)
RNF219.T4.C14	,0020	,331/ ,760	40,0	5,56	,332	73,2	85,0	66,7	85,7 (73,7, 97,7)
RNF219.C14.T16	,0023	,326/ ,731	40,0	2,78	,268	75,0	85,0	69,4	85,3 (73,0, 97,6)
GSTP1.T8.C9	,0035	3,56/ ,142	45,0	40,0	,168	76,4	75,0	77,1	84,9 (73,6, 96,1)
GSTP1.T15.C16	,0039	,170/ 2,19	0	60,0	,207	78,2	95,0	68,6	85,6 (74,9, 96,3)
GSTP1.C9.C13	,0044	4,76/ ,0197	70,0	40,0	,0512	85,5	70,0	94,3	85,0 (73,0, 97,0)

Средние значения представлены как среднее в группе РПЖ/среднее в группе ЗД+ДГПЖ. Пороговое значение является оценкой порога, который может быть полезен для разделения сравниваемых групп. Чувствительность — это доля пациентов с РПЖ, правильно идентифицированных как таковые, а специфичность — это доля доноров ЗД+ДГПЖ, правильно идентифицированных как таковые. Сокращения: CV = перекрестная проверка, AUC = площадь под кривой ROC, CI = доверительный интервал.

Приложение 6. Суммарные данные сравнения статуса метилирования цитозинов в составе свободной внДНК плазмы крови у пациентов с ДГПЖ с объединенной группой, включающей ЗД и пациентов с РПЖ.

Ген, Позиция, Статус (С или Т после конверсии)	Р-значение ×3×1167	Среднее, %	Чувствительность для 100% специфичности, %	Специфичность для 100% чувствительности, %	Пороговое значение, % (отношение)	CV чувствительность, %	CV точность, %	CV специфичность, %	CV AUC, % (De Long's CI)
ПСА	> 1		,00	,13		,55	,24	,69	,55 (,39, ,71)
RNF.C1.C2	,000000000071	0,00/ 0,13	1	1	0,0526 (1,03)	1	1	1	1
RNF.C2.C4	,000000000071	0,01/ 0,21	1	1	0,0567 (1,20)	1	1	1	1
RNF.C1.C5	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0526 (1,03)	1	1	1	1
RNF.C2.C5	,000000000071	0,01/ 0,16	1	1	0,0481 (1,24)	1	1	1	1
RNF.C4.C5	,000000000071	0,02/ 0,14	1	1	0,0561 (1,31)	1	1	1	1
RNF.C2.C6	,000000000071	0,00/ 0,16	1	1	0,0567 (1,20)	1	1	1	1
RNF.C5.C6	,000000000071	0,01/ 0,15	1	1	0,0509 (1,39)	1	1	1	1
RNF.C1.C7	,000000000071	0,01/ 0,13	1	1	0,049 (1,29)	1	1	1	1
RNF.C2.C7	,000000000071	0,00/ 0,14	1	1	0,0499 (1,34)	1	1	1	1
RNF.C4.C7	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0612 (1,03)	1	1	1	1
RNF.C6.C7	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0612 (1,03)	1	1	1	1
RNF.C1.C9	,000000000071	0,01/ 0,13	1	1	0,0446 (1,67)	1	1	1	1
RNF.C2.C9	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0518 (1,44)	1	1	1	1
RNF.C4.C9	,000000000071	0,01/ 0,17	1	1	0,0623 (1,06)	1	1	1	1
RNF.C5.C9	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0506 (1,50)	1	1	1	1
RNF.C6.C9	,000000000071	0,01/ 0,17	1	1	0,0518 (1,44)	1	1	1	1
RNF.C7.C9	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0471 (1,86)	1	1	1	1
RNF.C8.C9	,000000000071	0,01/ 0,09	1	1	0,036 (1,08)	1	1	1	1
RNF.C1.C10	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0424 (2,13)	1	1	1	1
RNF.C2.C10	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0499 (1,34)	1	1	1	1
RNF.C4.C10	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0505 (1,54)	1	1	1	1

RNF.C6.C10	,000000000071	0,01/ 0,16	1	1	0,0415 (2,56)	1	1	1	1
RNF.C7.C10	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0394 (2,31)	1	1	1	1
RNF.C9.C10	,000000000071	0,01/ 0,15	1	1	0,0567 (1,20)	1	1	1	1
RNF.C1.C11	,000000000071	0,01/ 0,13	1	1	0,0481 (1,24)	1	1	1	1
RNF.C2.C11	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0481 (1,24)	1	1	1	1
RNF.C6.C11	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0449 (1,69)	1	1	1	1
RNF.C7.C11	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0449 (1,69)	1	1	1	1
RNF.C9.C11	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0526 (1,49)	1	1	1	1
RNF.C2.C12	,000000000071	0,00/ 0,14	1	1	0,038 (2,15)	1	1	1	1
RNF.C4.C12	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0449 (1,69)	1	1	1	1
RNF.C5.C12	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0394 (2,31)	1	1	1	1
RNF.C6.C12	,000000000071	0,00/ 0,14	1	1	0,0449 (1,69)	1	1	1	1
RNF.C7.C12	,000000000071	0,00/ 0,14	1	1	0,0463 (1,79)	1	1	1	1
RNF.C9.C12	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0527 (1,49)	1	1	1	1
RNF.C10.C12	,000000000071	0,01/ 0,15	1	1	0,0586 (1,28)	1	1	1	1
RNF.C2.C13	,000000000071	0,00/ 0,14	1	1	0,0446 (1,67)	1	1	1	1
RNF.C4.C13	,000000000071	0,01/ 0,17	1	1	0,0389 (2,26)	1	1	1	1
RNF.C5.C13	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0394 (2,31)	1	1	1	1
RNF.C6.C13	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0536 (1,07)	1	1	1	1
RNF.C7.C13	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0446 (1,67)	1	1	1	1
RNF.C12.C13	,000000000071	0,00/ 0,14	1	1	0,0577 (1,24)	1	1	1	1
RNF.C2.C14	,000000000071	0,00/ 0,08	1	1	0,0188 (1,19)	1	1	1	1
RNF.C4.C14	,000000000071	0,01/ 0,09	1	1	0,0259 (1,24)	1	1	1	1
RNF.C5.C14	,000000000071	0,01/ 0,10	1	1	0,0219 (1,35)	1	1	1	1
RNF.C1.C15	,000000000071	0,00/ 0,13	1	1	0,0371 (2,05)	1	1	1	1
RNF.C2.C15	,000000000071	0,00/ 0,14	1	1	0,031 (3,22)	1	1	1	1
RNF.C4.C15	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,042 (1,74)	1	1	1	1
RNF.C5.C15	,000000000071	0,00/ 0,14	1	1	0,0321 (3,46)	1	1	1	1
RNF.C6.C15	,000000000071	0,00/ 0,14	1	1	0,0499 (1,33)	1	1	1	1
RNF.C7.C15	,000000000071	0,00/ 0,14	1	1	0,0386 (2,22)	1	1	1	1
RNF.C9.C15	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0455 (1,73)	1	1	1	1
RNF.C10.C15	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0586 (1,28)	1	1	1	1
RNF.C11.C15	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0535 (1,53)	1	1	1	1
RNF.C12.C15	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0623 (1,06)	1	1	1	1
RNF.C13.C15	,000000000071	0,01/ 0,15	1	1	0,0577 (1,24)	1	1	1	1
RNF.C1.C16	,000000000071	0,02/ 0,13	1	1	0,0455 (1,49)	1	1	1	1
RNF.C2.C16	,000000000071	0,00/ 0,13	1	1	0,043 (1,55)	1	1	1	1

RNF.C4.C16	,000000000071	0,01/ 0,15	1	1	0,0449 (1,69)	1	1	1	1
RNF.C5.C16	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0455 (1,73)	1	1	1	1
RNF.C7.C16	,000000000071	0,00/ 0,13	1	1	0,0329 (2,40)	1	1	1	1
RNF.C9.C16	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0396 (1,95)	1	1	1	1
RNF.C10.C16	,000000000071	0,01/ 0,17	1	1	0,0509 (1,59)	1	1	1	1
RNF.C12.C16	,000000000071	0,00/ 0,14	1	1	0,0463 (1,79)	1	1	1	1
RNF.C13.C16	,000000000071	0,01/ 0,17	1	1	0,0541 (1,57)	1	1	1	1
RNF.C15.C16	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0586 (1,28)	1	1	1	1
RNF.C1.C17	,000000000071	0,01/ 0,12	1	1	0,036 (2,03)	1	1	1	1
RNF.C2.C17	,000000000071	0,00/ 0,13	1	1	0,0298 (2,97)	1	1	1	1
RNF.C3.C17	,000000000071	0,00/ 0,07	1	1	0,0188 (1,19)	1	1	1	1
RNF.C4.C17	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,041 (1,41)	1	1	1	1
RNF.C5.C17	,000000000071	0,01/ 0,13	1	1	0,0432 (1,64)	1	1	1	1
RNF.C6.C17	,000000000071	0,00/ 0,13	1	1	0,0371 (2,05)	1	1	1	1
RNF.C7.C17	,000000000071	0,01/ 0,13	1	1	0,0429 (1,54)	1	1	1	1
RNF.C9.C17	,000000000071	0,01/ 0,13	1	1	0,0525 (1,03)	1	1	1	1
RNF.C10.C17	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0447 (1,67)	1	1	1	1
RNF.C12.C17	,000000000071	0,00/ 0,14	1	1	0,0508 (1,38)	1	1	1	1
RNF.C13.C17	,000000000071	0,01/ 0,14	1	1	0,0557 (1,15)	1	1	1	1
GSTP.T7.C16	,000000000010	4,10/ 0,26	1	1	1,32 (1,20)	1	1	1	1
GSTP.T11.C16	,000000000010	5,33/ 0,23	1	1	1,24 (1,70)	1	1	1	1
GSTP.C4.C5	,000000000010	0,02/ 3,72	1	1	0,0548 (1,03)	1	1	1	1
RNF.C5.C7	,000000000014	0,01/ 0,14	,94	,97	0,0623	,96	,94	,97	,97 (,92, 1)
RNF.C4.C11	,000000000014	0,01/ 0,14	,94	,97	0,0634	,96	,94	,97	,93 (,83, 1)
RNF.C11.C12	,000000000014	0,01/ 0,17	,94	,97	0,0711	,96	,94	,97	,92 (,80, 1)
RNF.C9.C13	,000000000014	0,01/ 0,14	,94	,97	0,0625	,96	,94	,97	,96 (,91, 1)
RNF.C10.C13	,000000000014	0,02/ 0,18	,94	,97	0,0691	,96	,94	,97	,93 (,82, 1)
RNF.C11.C13	,000000000014	0,01/ 0,14	,94	,97	0,07	,96	,94	,97	,97 (,91, 1)
RNF.C3.C14	,000000000014	0,00/ 0,07	,94	,97	0,0197	,96	,94	,97	,97 (,92, 1)
RNF.C9.C14	,000000000014	0,01/ 0,08	,94	,97	0,0368	,96	,94	,97	,92 (,80, 1)
RNF.C10.C14	,000000000014	0,01/ 0,12	,94	,97	0,0368	,96	,94	,97	,98 (,94, 1)
RNF.C3.C15	,000000000014	0,00/ 0,07	,94	,97	0,0214	,96	,94	,97	,99 (,97, 1)
RNF.C8.C15	,000000000014	0,01/ 0,08	,94	,97	0,036	,96	,94	,97	,92 (,80, 1)
RNF.C8.C16	,000000000014	0,01/ 0,08	,94	,97	0,0361	,96	,94	,97	,92 (,81, 1)
RNF.C11.C17	,000000000014	0,01/ 0,14	,94	,97	0,0612	,96	,94	,97	,97 (,92, 1)
RNF.C7.C14	,000000000014	0,01/ 0,08	,94	,97	0,0266	,95	,94	,95	,92 (,80, 1)
GSTP.T2.C5	,000000000021	0,09/ 2,23	,94	,97	0,183	,96	,94	,97	,93 (,83, 1)

RNF.C8.C10	,00000000029	0,01/ 0,12	,88	,97	0,036	,95	,94	,95	,97 (,92, 1)
RNF.C3.C12	,00000000029	0,00/ 0,08	,94	,95	0,0284	,95	,94	,95	,94 (,82, 1)
RNF.C3.C13	,00000000029	0,00/ 0,08	,94	,95	0,0312	,95	,94	,95	,94 (,82, 1)
RNF.C8.C17	,00000000029	0,01/ 0,08	,94	,95	0,0355	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
GSTP.T1.C5	,00000000041	0,10/ 2,35	,88	,97	0,19	,96	,94	,97	,95 (,88, 1)
RNF.C6.C8	,00000000050	0,01/ 0,11	,94	,92	0,0269	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
RNF.C3.C10	,00000000050	0,01/ 0,08	,94	,92	0,0156	,95	,94	,95	,94 (,82, 1)
RNF.C3.C11	,00000000050	0,01/ 0,08	,88	,95	0,0312	,95	,94	,95	,99 (,97, 1)
RNF.C6.C14	,00000000050	0,01/ 0,08	,94	,92	0,019	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
RNF.C3.C16	,00000000050	0,01/ 0,07	,88	,95	0,0281	,95	,94	,95	,96 (,88, 1)
GSTP.T3.C5	,00000000072	0,09/ 1,44	,82	,97	0,15	,96	,94	,97	,97 (,92, 1)
RNF.C2.C3	,00000000082	0,00/ 0,10	,94	,90	0,0149	,93	,94	,92	,94 (,83, 1)
RNF.C3.C6	,00000000086	0,01/ 0,08	,94	,90	0,015	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
RNF.C3.C7	,00000000086	0,01/ 0,08	,94	,90	0,0199	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
RNF.C8.C12	,00000000086	0,00/ 0,08	,94	,90	0,0195	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
RNF.C11.C14	,00000000086	0,01/ 0,08	,94	,90	0,0199	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
RNF.C13.C14	,00000000086	0,01/ 0,13	,94	,90	0,033	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
RNF.C1.C3	,00000000086	0,01/ 0,08	,94	,90	0,0161	,93	,94	,92	,94 (,83, 1)
RNF.C2.C8	,00000000086	0,01/ 0,08	,94	,90	0,0203	,93	,94	,92	,94 (,83, 1)
RNF.C8.C11	,00000000086	0,01/ 0,09	,94	,90	0,0233	,93	,94	,92	,94 (,82, 1)
RNF.C12.C14	,00000000086	0,01/ 0,08	,94	,90	0,0231	,93	,94	,92	,94 (,83, 1)
RNF.C3.C5	,00000000014	0,01/ 0,08	,94	,87	0,0152	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
RNF.C8.C13	,00000000014	0,01/ 0,08	,82	,95	0,0388	,95	,94	,95	,98 (,93, 1)
RNF.C4.C8	,00000000014	0,01/ 0,11	,94	,87	0,0376	,93	,94	,92	,94 (,83, 1)
RNF.C1.C14	,00000000014	0,01/ 0,08	,88	,90	0,0233	,91	,94	,90	,94 (,82, 1)
GSTP.T8.C10	,00000000019	3,16/ 0,17	,71	,97	0,7	,98	1	,97	,98 (,93, 1)
GSTP.T9.C10	,00000000019	3,17/ 0,17	,71	,97	0,696	,98	1	,97	,98 (,93, 1)
GSTP.C10.T11	,00000000019	3,16/ 0,17	,71	,97	0,697	,98	1	,97	,98 (,93, 1)
GSTP.C10.T13	,00000000019	3,15/ 0,19	,71	,97	0,857	,98	1	,97	,98 (,93, 1)
RNF.C3.C9	,00000000021	0,01/ 0,14	,94	,85	0,0196	,95	,94	,95	,94 (,82, 1)
RNF.C14.C15	,00000000021	0,01/ 0,09	,94	,85	0,0196	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
RNF.C14.C16	,00000000021	0,01/ 0,12	,94	,85	0,0265	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
RNF.C14.C17	,00000000021	0,01/ 0,08	,94	,85	0,019	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
RNF.C5.C8	,00000000021	0,01/ 0,08	,88	,90	0,044	,93	,94	,92	,99 (,97, 1)
RNF.C6.C16	,00000000048	0,01/ 0,13	,94	,79	0,0439	,98	,94	1	,94 (,83, 1)
RNF.C1.C6	,00000000048	0,01/ 0,15	,94	,79	0,0402	,98	,94	1	,94 (,83, 1)
GSTP.T5.C16	,00000000069	5,39/ 0,39	,53	,97	1,51	,98	1	,97	,97 (,92, 1)

GSTP.T8.C16	,0000000069	5,38/ 0,34	,53	,97	1,36	,98	1	,97	,97 (,92, 1)
GSTP.T9.C16	,0000000069	5,40/ 0,34	,53	,97	1,37	,98	1	,97	,97 (,92, 1)
GSTP.T13.C16	,0000000069	5,37/ 0,35	,53	,97	1,35	,98	1	,97	,97 (,92, 1)
RNF.C4.C6	,0000000069	0,01/ 0,14	,94	,77	0,0356	,98	,94	1	,94 (,83, 1)
RNF.C16.C17	,0000000097	0,01/ 0,18	,94	,74	0,0436	,98	,94	1	,94 (,83, 1)
GSTP.C10.T15	,0000000100	1,85/ 0,18	,47	,97	0,582	,98	1	,97	,97 (,92, 1)
GSTP.T3.C10	,0000000100	1,89/ 0,21	,47	,97	0,711	,96	1	,95	,97 (,92, 1)
GSTP.T1.C16	,0000000100	5,36/ 0,42	,71	,95	1,33	,95	,94	,95	,98 (,95, 1)
GSTP.C3.C9	,0000000100	0,02/ 4,25	,94	,76	0,0338	,89	,94	,87	,95 (,85, 1)
RNF.C7.C8	,000000012	0,01/ 0,10	,94	,72	0,0214	,95	,94	,95	,94 (,83, 1)
GSTP.T3.C16	,000000014	4,27/ 0,37	,41	,97	1,31	,98	1	,97	,97 (,92, 1)
GSTP.T15.C16	,000000014	4,01/ 0,31	,41	,97	1,13	,98	1	,97	,97 (,92, 1)
GSTP.T4.C10	,000000014	3,16/ 0,25	,71	,95	0,795	,96	1	,95	,98 (,94, 1)
GSTP.T5.C10	,000000014	3,17/ 0,23	,71	,95	0,81	,96	1	,95	,98 (,96, 1)
GSTP.T6.C10	,000000020	3,17/ 0,25	,65	,95	0,774	,95	,94	,95	,97 (,93, 1)
GSTP.T4.C16	,000000020	5,37/ 0,40	,53	,95	1,37	,95	,94	,95	,98 (,94, 1)
GSTP.C6.T9	,000000020	1,02/ 0,22	,82	,79	0,304	,93	,88	,95	,97 (,92, 1)
RNF.C15.C17	,000000022	0,01/ 0,14	,94	,67	0,0337	,98	,94	1	,94 (,83, 1)
GSTP.T6.C16	,000000028	5,36/ 0,42	,53	,95	1,36	,95	,94	,95	,98 (,94, 1)
GSTP.C6.T8	,000000028	1,03/ 0,22	,82	,76	0,303	,93	,88	,95	,96 (,90, 1)
GSTP.C6.T11	,000000028	1,01/ 0,22	,82	,76	0,31	,93	,88	,95	,95 (,86, 1)
GSTP.C16.T17	,000000038	5,34/ 0,43	,24	,97	1,29	,96	,94	,97	,97 (,92, 1)
GSTP.T12.C14	,000000038	4,99/ 0,64	,53	,95	1,67	,93	,88	,95	,97 (,94, 1)
GSTP.T12.C16	,000000038	5,36/ 0,40	,53	,95	1,34	,93	,88	,95	,97 (,94, 1)
GSTP.C6.T15	,000000038	1,02/ 0,23	,82	,76	0,315	,91	,88	,92	,97 (,92, 1)
GSTP.T2.C16	,000000070	4,26/ 0,42	,41	,95	1,31	,96	1	,95	,97 (,93, 1)
GSTP.C10.T12	,000000070	3,16/ 0,25	,41	,95	0,711	,95	,94	,95	,97 (,92, 1)
RNF.C3.C4	,000000086	0,01/ 0,08	,94	,54	0,0136	,93	,94	,92	,94 (,83, 1)
GSTP.T3.C6	,00000012	1,02/ 0,24	,82	,74	0,348	,91	,88	,92	,96 (,89, 1)
GSTP.T2.C10	,00000016	1,89/ 0,25	,47	,95	0,72	,95	1	,92	,96 (,91, 1)
GSTP.T7.C10	,00000016	1,73/ 0,20	,47	,95	0,506	,95	,94	,95	,97 (,93, 1)
GSTP.T7.C11	,00000016	3,71/ 0,35	,35	,92	0,566	,95	,94	,95	,96 (,90, 1)
GSTP.C5.T17	,00000016	0,14/ 2,43	,41	,76	0,207	,95	,94	,95	,96 (,91, 1)
GSTP.T10.T16	,00000016	1-7,31/ 1-3,04	,00	,95	1-2,84	,91	,76	,97	,97 (,92, 1)
GSTP.C6.T13	,00000021	1,01/ 0,23	,47	,76	0,302	,93	,88	,95	,95 (,89, 1)
GSTP.T10.C16	,00000028	4,12/ 0,45	,41	,95	1,26	,96	1	,95	,96 (,91, 1)
GSTP.T14.C16	,00000028	5,36/ 0,50	,29	,95	1,36	,93	,88	,95	,96 (,91, 1)

GSTP.T1.C10	,00000028	3,16/ 0,36	,12	,95	0,851	,87	,71	,95	,97 (,91, 1)
GSTP.C10.T14	,00000028	3,14/ 0,35	,12	,95	0,724	,87	,71	,95	,97 (,91, 1)
GSTP.T6.T10	,00000028	1-4,21/ 1-2,92	,00	,89	1-1,91	,80	,41	,97	,97 (,91, 1)
GSTP.C8.T9	,00000036	1,27/ 0,33	,00	,95	0,385	,89	,76	,95	,97 (,91, 1)
GSTP.C10.T17	,00000036	3,16/ 0,42	,06	,95	0,744	,87	,71	,95	,97 (,91, 1)
GSTP.C5.C7	,00000046	0,03/ 2,69	,82	,68	0,0356	,85	,88	,84	,95 (,88, 1)
GSTP.C5.T15	,00000046	0,13/ 1,98	,24	,76	0,182	,93	,94	,92	,95 (,89, 1)
GSTP.T4.C11	,00000046	3,75/ 0,41	,35	,92	0,648	,91	,82	,95	,96 (,90, 1)
GSTP.T3.C8	,00000046	1,26/ 0,36	,00	,95	0,424	,87	,65	,97	,96 (,91, 1)
GSTP.C8.T11	,00000046	1,26/ 0,33	,00	,95	0,387	,87	,71	,95	,96 (,91, 1)
RNF.C10.C11	,00000051	0,01/ 0,15	,94	,38	0,0476	,96	,94	,97	,94 (,83, 1)
GSTP.T11.T16	,00000059	1-9,12/ 1-3,19	,00	,92	1-2,55	,91	,76	,97	,96 (,91, 1)
GSTP.C6.T7	,00000059	1,02/ 0,24	,35	,74	0,305	,91	,82	,95	,95 (,89, 1)
GSTP.T8.C11	,00000059	3,76/ 0,44	,35	,92	0,607	,89	,76	,95	,95 (,89, 1)
GSTP.T9.C11	,00000059	3,77/ 0,43	,35	,92	0,606	,89	,76	,95	,95 (,89, 1)
GSTP.C11.T15	,00000059	3,76/ 0,43	,35	,92	0,593	,89	,76	,95	,95 (,89, 1)
GSTP.C8.T15	,00000059	1,26/ 0,34	,00	,95	0,381	,87	,71	,95	,96 (,91, 1)
GSTP.T6.T16	,00000059	1-6,40/ 1-3,09	,00	,95	1-2,05	,85	,65	,95	,96 (,90, 1)
GSTP.T5.C14	,00000075	5,01/ 0,84	,06	,95	1,68	,91	,82	,95	,96 (,91, 1)
GSTP.T7.C14	,00000075	4,98/ 0,81	,06	,95	1,67	,91	,82	,95	,96 (,91, 1)
GSTP.T8.C14	,00000075	5,01/ 0,79	,06	,95	1,68	,91	,82	,95	,96 (,91, 1)
GSTP.T9.C14	,00000075	5,02/ 0,79	,06	,95	1,69	,91	,82	,95	,96 (,91, 1)
GSTP.T11.C14	,00000075	5,00/ 0,78	,06	,95	1,68	,91	,82	,95	,96 (,91, 1)
GSTP.T13.C14	,00000075	5,00/ 0,80	,06	,95	1,68	,91	,82	,95	,96 (,91, 1)
GSTP.T3.C11	,00000075	3,75/ 0,47	,35	,89	0,627	,89	,76	,95	,95 (,89, 1)
GSTP.C10.T16	,00000094	1,89/ 0,40	,00	,95	0,623	,89	,76	,95	,96 (,90, 1)
GSTP.C16	,00000094	5,42/ 2,64	,00	,95	1,62	,85	,65	,95	,95 (,90, 1)
GSTP.T16.T17	,00000094	1-5,72/ 1-2,98	,00	,95	1-1,81	,84	,59	,95	,95 (,89, 1)
GSTP.T2.C14	,0000012	4,92/ 0,87	,06	,92	1,67	,91	,82	,95	,96 (,90, 1)
GSTP.T3.C14	,0000012	4,36/ 0,82	,06	,95	1,52	,91	,82	,95	,96 (,90, 1)
GSTP.C8.T13	,0000012	1,26/ 0,35	,00	,95	0,446	,85	,65	,95	,96 (,90, 1)
GSTP.T6.C14	,0000015	4,96/ 0,87	,06	,92	1,69	,89	,82	,92	,96 (,90, 1)
GSTP.T5.C6	,0000019	1,02/ 0,26	,35	,68	0,348	,93	,82	,97	,94 (,88, 1)
GSTP.C11.T16	,0000019	3,70/ 0,55	,06	,92	0,586	,82	,53	,95	,95 (,89, 1)
GSTP.C11.T17	,0000019	3,72/ 0,57	,06	,92	0,579	,82	,53	,95	,95 (,89, 1)
GSTP.T14.T16	,0000023	1-10,40/1-3,64	,00	,89	1-3,21	,91	,82	,95	,95 (,89, 1)
GSTP.T4.C14	,0000023	4,37/ 0,86	,06	,92	1,53	,89	,82	,92	,95 (,89, 1)

GSTP.T10.T11	,0000023	1-6,95/ 1-3,13	,00	,92	1-2,02	,85	,59	,97	,95 (.89, 1)
GSTP.C6.T12	,0000023	1,00/ 0,30	,06	,74	0,314	,85	,59	,97	,93 (.85, 1)
GSTP.T11.T14	,0000028	1-8,79/ 1-3,74	,00	,87	1-3,24	,91	,82	,95	,95 (.89, 1)
GSTP.T8.T16	,0000028	1-6,66/ 1-3,20	,00	,92	1-2,49	,85	,71	,92	,95 (.89, 1)
GSTP.T5.C8	,0000028	1,27/ 0,39	,00	,92	0,421	,84	,59	,95	,95 (.89, 1)
GSTP.T10.T14	,0000035	1-8,18/ 1-3,49	,00	,92	1-3,45	,91	,82	,95	,95 (.88, 1)
GSTP.T7.C8	,0000035	1,26/ 0,36	,00	,92	0,388	,85	,65	,95	,95 (.89, 1)
GSTP.T5.C11	,0000035	3,76/ 0,49	,35	,89	0,686	,85	,71	,92	,94 (.88, 1)
GSTP.T10.C14	,0000043	4,99/ 0,90	,06	,92	1,67	,89	,82	,92	,95 (.89, 1)
GSTP.C6.T10	,0000043	1,02/ 0,33	,00	,66	0,32	,85	,59	,97	,93 (.85, 1)
GSTP.T6.C11	,0000053	3,76/ 0,52	,35	,89	0,647	,84	,65	,92	,94 (.88, 1)
GSTP.T1.C14	,0000065	4,97/ 0,97	,06	,92	1,73	,89	,82	,92	,94 (.87, 1)
GSTP.T7.C15	,0000065	1,48/ 0,32	,18	,89	0,674	,89	1	,84	,95 (.89, 1)
GSTP.T15.T16	,0000065	1-6,79/ 1-3,41	,00	,84	1-2,11	,85	,65	,95	,94 (.87, 1)
GSTP.T2.C11	,0000065	3,73/ 0,52	,35	,87	0,665	,84	,65	,92	,94 (.87, 1)
GSTP.T10.C11	,0000065	3,76/ 0,55	,35	,89	0,604	,80	,53	,92	,94 (.87, 1)
GSTP.T8.T10	,0000079	1-4,45/ 1-3,03	,00	,87	1-1,49	,85	,65	,95	,92 (.85, .99)
GSTP.C14.T15	,0000095	4,00/ 0,77	,06	,76	1,3	,91	,82	,95	,94 (.88, 1)
GSTP.T4.C8	,0000095	1,26/ 0,41	,00	,92	0,439	,84	,59	,95	,94 (.87, 1)
GSTP.C11.T14	,0000095	3,75/ 0,60	,24	,89	0,596	,80	,53	,92	,94 (.87, 1)
GSTP.T4.C6	,000012	0,97/ 0,28	,06	,66	0,386	,87	,65	,97	,93 (.86, 1)
GSTP.T6.C8	,000012	1,27/ 0,41	,00	,92	0,402	,84	,59	,95	,94 (.87, 1)
GSTP.C10	,000012	3,19/ 2,59	,00	,87	0,851	,80	,41	,97	,87 (.74, 1,00)
GSTP.T1.C11	,000012	3,73/ 0,61	,29	,84	0,648	,80	,53	,92	,93 (.86, 1)
GSTP.T2.C6	,000014	1,02/ 0,28	,06	,66	0,306	,87	,65	,97	,93 (.84, 1)
GSTP.C6.T14	,000017	0,96/ 0,40	,00	,66	0,377	,85	,59	,97	,90 (.80, 1,00)
GSTP.T2.C8	,000017	1,26/ 0,41	,00	,87	0,409	,84	,59	,95	,94 (.86, 1)
GSTP.C8.T10	,000017	1,26/ 0,44	,00	,92	0,388	,84	,59	,95	,94 (.86, 1)
GSTP.C8.T12	,000017	1,25/ 0,41	,00	,92	0,397	,84	,59	,95	,94 (.86, 1)
GSTP.C6.T16	,000017	0,98/ 0,45	,00	,66	0,397	,84	,53	,97	,89 (.77, 1)
KIAA.C2.C3	,000017	0,00/ 0,02	,00	,85	0,00586	,86	,88	,85	,88 (.78, .98)
GSTP.C14.T16	,000020	4,98/ 1,00	,06	,92	1,67	,89	,82	,92	,94 (.87, 1)
GSTP.C14.T17	,000020	5,01/ 1,02	,06	,92	1,68	,89	,82	,92	,94 (.87, 1)
GSTP.T6.T14	,000024	1-6,00/ 1-3,54	,00	,87	1-1,97	,82	,59	,92	,92 (.85, 1,00)
GSTP.C8.T14	,000024	1,25/ 0,51	,00	,92	0,399	,80	,47	,95	,93 (.86, 1)
GSTP.C14	,000034	5,04/ 3,14	,00	,89	1,86	,80	,53	,92	,92 (.85, 1,00)
GSTP.C8.T16	,000034	1,24/ 0,57	,00	,92	0,409	,80	,47	,95	,93 (.86, 1)

GSTP.C8.T17	,000034	1,27/ 0,58	,00	,87	0,408	,80	,47	,95	,93 (,86, 1)
GSTP.T2.T16	,000041	1-7,16/ 1-5,24	,00	,89	1-3,06	,80	,47	,95	,92 (,85, 1)
GSTP.T8.T14	,000049	1-6,29/ 1-3,65	,00	,89	1-2,97	,85	,76	,89	,93 (,86, 1)
GSTP.C6.T17	,000057	1,02/ 0,46	,00	,63	0,393	,84	,53	,97	,88 (,76, ,99)
GSTP.T6.T8	,000057	1-2,31/ 1-3,08	,00	,82	1-0,879	,25	,76	,03	,96 (,91, 1)
GSTP.T11.C17	,000068	0,31/ 0,16	,18	,63	0,24	,84	,88	,82	,91 (,83, 1,00)
GSTP.T10.T17	,000068	1-3,54/ 1-2,97	,00	,84	1-1,08	,80	,47	,95	,85 (,74, ,97)
GSTP.C12.C13	,000068	3,40/ 2,44	,00	,87	0,44	,80	,41	,97	,60 (,37, ,82)
KIAA.C1.C3	,000078	0,00/ 0,01	,00	,67	0,00664	,82	,88	,79	,88 (,78, ,98)
GSTP.T10.T15	,000080	1-4,63/ 1-3,27	,00	,76	1-1,64	,82	,47	,97	,90 (,82, ,98)
GSTP.C11.C12	,000080	3,43/ 2,46	,00	,87	0,437	,80	,41	,97	,60 (,37, ,82)
GSTP.C11.C13	,000094	3,37/ 2,52	,00	,84	0,417	,78	,35	,97	,59 (,37, ,81)
GSTP.T2.T10	,000094	1-4,79/ 1-5,07	,00	,87	1-2,07	,20	,65	,00	,99 (,97, 1)
GSTP.T1.C6	,00011	1,02/ 0,39	,00	,66	0,319	,85	,59	,97	,90 (,81, ,99)
GSTP.T1.C8	,00011	1,26/ 0,53	,00	,84	0,439	,80	,47	,95	,91 (,84, ,99)
GSTP.T11.T15	,00013	1-6,54/ 1-3,53	,00	,82	1-1,93	,87	,71	,95	,89 (,81, ,98)
GSTP.T7.T16	,00013	1-6,80/ 1-5,38	,00	,79	1-2,39	,80	,47	,95	,90 (,82, ,99)
GSTP.T14.T17	,00013	1-5,39/ 1-3,57	,00	,87	1-2,14	,80	,53	,92	,91 (,83, ,99)
GSTP.T6.T11	,00015	1-4,80/ 1-3,18	,00	,84	1-1,01	,78	,47	,92	,82 (,68, ,97)
GSTP.T8.T11	,00015	1-5,04/ 1-3,29	,00	,82	1-1,31	,75	,41	,89	,89 (,81, ,98)
GSTP.C4.C7	,00018	0,04/ 2,69	,53	,42	0,0616	,85	,94	,82	,91 (,82, ,99)
KIAA.C2.C5	,00019	0,00/ 0,02	,00	,74	0,00612	,80	,82	,79	,89 (,81, ,98)
GSTP.T13.T16	,00021	1-9,80/ 1-5,78	,00	,87	1-3,27	,84	,65	,92	,91 (,82, 1,00)
GSTP.C9.T14	,00021	0,12/ 2,13	,35	,68	0,154	,82	,82	,82	,90 (,82, ,98)
GSTP.T9.T16	,00021	1-5,54/ 1-4,82	,00	,82	1-1,8	,78	,41	,95	,76 (,59, ,94)
GSTP.T5.T9	,00021	1-0,38/ 1-6,67	,18	,61	1-0,374	,76	,82	,74	,90 (,81, ,99)
GSTP.T8.C15	,00024	2,76/ 0,58	,35	,87	0,812	,78	,59	,87	,91 (,82, ,99)
GSTP.C9.T16	,00028	0,12/ 2,18	,53	,61	0,132	,82	,82	,82	,90 (,82, ,98)
GSTP.T9.C15	,00028	2,77/ 0,57	,29	,87	0,816	,78	,59	,87	,91 (,83, ,99)
GSTP.T11.C15	,00028	2,76/ 0,57	,29	,87	0,798	,78	,59	,87	,91 (,83, ,99)
GSTP.T13.C15	,00028	2,75/ 0,58	,29	,87	0,867	,78	,59	,87	,90 (,82, ,99)
GSTP.C3.T9	,00028	2,60/ 1,09	,00	,84	0,638	,75	,35	,92	,90 (,82, ,98)
GSTP.T5.C15	,00033	2,66/ 0,41	,35	,84	0,767	,89	1	,84	,91 (,83, ,99)
GSTP.T12.T16	,00033	1-11,10/1-7,24	,00	,89	1-3,57	,84	,65	,92	,90 (,82, ,99)
GSTP.T14.T15	,00033	1-6,78/ 1-3,87	,00	,76	1-2,33	,82	,53	,95	,89 (,81, ,98)
GSTP.T2.T14	,00033	1-7,83/ 1-5,68	,00	,82	1-2,78	,80	,53	,92	,91 (,82, ,99)
GSTP.T10.T13	,00033	1-7,58/ 1-5,62	,00	,79	1-3,29	,78	,47	,92	,89 (,79, ,99)

KIAA.C2.C4	,00037	0,00/ 0,02	,00	,59	0,00611	,79	,76	,79	,87 (.78, .97)
GSTP.T12.T14	,00038	1-10,74/1-7,47	,00	,89	1-4,58	,82	,65	,89	,91 (.82, 1,00)
GSTP.C3.C15	,00038	1,89/ 2,50	,00	,87	0,367	,20	,65	,00	,96 (.90, 1)
GSTP.T1.T16	,00051	1-6,65/ 1-5,63	,00	,87	1-2,41	,78	,47	,92	,89 (.79, .98)
GSTP.T10.T12	,00051	1-8,90/ 1-7,08	,00	,89	1-3,27	,76	,47	,89	,88 (.78, .98)
GSTP.T11.T17	,00051	1-4,10/ 1-3,12	,00	,84	1-1,03	,76	,41	,92	,79 (.65, .92)
GSTP.T13.C17	,00051	0,36/ 0,28	,00	,82	0,241	,75	,35	,92	,90 (.81, .99)
GSTP.C2.T8	,00051	2,88/ 2,37	,00	,84	0,891	,71	,24	,92	,84 (.71, .97)
GSTP.C2.T9	,00051	2,89/ 2,36	,00	,84	0,894	,71	,24	,92	,85 (.71, .98)
GSTP.C2.T11	,00051	2,85/ 2,37	,00	,84	0,893	,71	,24	,92	,83 (.70, .97)
GSTP.T9.C17	,00058	0,36/ 0,27	,00	,82	0,258	,80	,53	,92	,89 (.81, .98)
KIAA.C3.C4	,00066	0,00/ 0,02	,00	,54	0,00317	,79	,82	,77	,85 (.73, .96)
GSTP.T13.T14	,00067	1-9,42/ 1-6,23	,00	,89	1-4,96	,82	,65	,89	,90 (.81, .99)
GSTP.T7.T14	,00067	1-7,67/ 1-5,93	,00	,76	1-3,91	,80	,53	,92	,88 (.79, .97)
GSTP.T8.C17	,00067	0,36/ 0,27	,00	,82	0,258	,75	,41	,89	,89 (.80, .98)
GSTP.C2.T13	,00067	2,85/ 2,38	,00	,84	0,893	,71	,24	,92	,83 (.69, .96)
KIAA.C4.C5	,00069	0,00/ 0,02	,00	,59	0,00636	,79	,76	,79	,87 (.77, .97)
GSTP.C5.T16	,00077	0,22/ 2,42	,29	,42	0,223	,71	,82	,66	,88 (.77, .99)
KIAA.C3.C5	,00087	0,00/ 0,02	,00	,72	0,00667	,77	,82	,74	,86 (.75, .96)
GSTP.T2.T11	,00089	1-6,64/ 1-5,33	,00	,79	1-1,81	,82	,53	,95	,78 (.62, .95)
GSTP.C5	,00089	0,25/ 4,66	,12	,50	0,243	,73	,82	,68	,89 (.79, .99)
GSTP.C11	,0010	3,79/ 2,96	,00	,79	0,646	,75	,35	,92	,61 (.41, .82)
GSTP.C5.T14	,0010	0,22/ 2,36	,24	,42	0,232	,71	,82	,66	,88 (.77, .99)
GSTP.T7.T10	,0010	1-4,43/ 1-5,32	,00	,79	1-1,93	,25	,82	,00	,96 (.92, 1)
KIAA.C1.C4	,0010	0,00/ 0,01	,00	,56	0,00629	,80	,82	,79	,85 (.74, .96)
GSTP.C2.T4	,0012	2,88/ 2,40	,00	,82	0,896	,71	,24	,92	,82 (.69, .96)
GSTP.T12.C17	,0012	0,35/ 0,33	,00	,79	0,241	,69	,18	,92	,82 (.71, .93)
GSTP.T16.C17	,0012	0,30/ 0,34	,00	,76	0,157	,27	,82	,03	,96 (.90, 1)
GSTP.T6.C15	,0013	2,76/ 0,66	,29	,84	0,814	,73	,47	,84	,89 (.80, .98)
GSTP.C2.T5	,0013	2,75/ 2,38	,00	,79	0,623	,71	,24	,92	,68 (.49, .88)
GSTP.T3.T16	,0015	1-6,89/ 1-5,71	,00	,82	1-2,28	,80	,53	,92	,82 (.68, .96)
GSTP.T12.C15	,0015	2,75/ 0,64	,29	,84	0,799	,71	,41	,84	,89 (.80, .98)
GSTP.C5.T10	,0015	0,23/ 2,30	,18	,42	0,22	,71	,82	,66	,87 (.76, .99)
GSTP.C5.T12	,0015	0,23/ 2,27	,24	,42	0,219	,71	,82	,66	,88 (.76, .99)
GSTP.C5.T13	,0015	0,22/ 2,21	,24	,42	0,22	,71	,82	,66	,87 (.76, .99)
GSTP.T1.T10	,0015	1-4,45/ 1-5,57	,00	,84	1-1,8	,27	,82	,03	,96 (.90, 1)
GSTP.C14.C15	,0015	1,04/ 2,37	,00	,87	0,349	,25	,82	,00	,92 (.85, 1)

GSTP.C5.T6	,0017	0,23/ 2,25	,18	,42	0,223	,71	,82	,66	,87 (.76, .99)
GSTP.T4.C15	,0020	2,12/ 0,42	,35	,82	0,591	,80	,71	,84	,89 (.80, .97)
GSTP.C9.T10	,0020	0,12/ 2,06	,41	,58	0,136	,78	,76	,79	,88 (.79, .97)
GSTP.C5.T11	,0020	0,23/ 2,19	,24	,39	0,215	,69	,82	,63	,87 (.75, .99)
GSTP.T2.T8	,0020	1-4,16/ 1-5,23	,00	,84	1-1,95	,24	,71	,03	,95 (.89, 1)
KIAA.C1.C5	,0021	0,00/ 0,01	,00	,54	0,00612	,77	,76	,77	,86 (.75, .96)
GSTP.T5.C9	,0023	0,12/ 2,01	,47	,55	0,137	,75	,76	,74	,87 (.77, .97)
RNF.C3.C8	,0023	0,04/ 0,09	,29	,59	0,0651	,79	,76	,79	,87 (.78, .97)
GSTP.T5.C7	,0026	2,67/ 2,44	,00	,79	0,672	,75	,24	,97	,59 (.37, .81)
GSTP.T6.C9	,0026	0,12/ 2,03	,35	,61	0,134	,73	,76	,71	,87 (.77, .97)
GSTP.C2.T6	,0026	2,88/ 2,43	,00	,82	0,895	,71	,24	,92	,79 (.65, .93)
GSTP.C15.T17	,0026	2,62/ 0,80	,06	,84	0,794	,69	,35	,84	,88 (.79, .98)
GSTP.T2.T6	,0026	1-3,92/ 1-5,10	,00	,76	1-1,38	,24	,76	,00	,96 (.91, 1)
GSTP.T13.T15	,0029	1-7,18/ 1-6,01	,00	,63	1-3,3	,78	,47	,92	,78 (.62, .94)
GSTP.C9.T17	,0029	0,12/ 2,20	,41	,58	0,141	,75	,76	,74	,87 (.78, .96)
GSTP.C5.T8	,0029	0,23/ 2,19	,18	,39	0,238	,67	,82	,61	,87 (.75, .99)
GSTP.T9.T14	,0029	1-5,16/ 1-5,27	,00	,74	1-2,17	,09	,24	,03	,99 (.97, 1)
GSTP.T1.T14	,0033	1-6,27/ 1-6,18	,00	,84	1-2,63	,11	,24	,05	,98 (.96, 1)
GSTP.T2.C9	,0038	0,12/ 2,03	,00	,63	0,134	,78	,76	,79	,87 (.78, .97)
GSTP.T9.C13	,0038	4,41/ 2,91	,00	,74	0,99	,78	,41	,95	,84 (.73, .95)
GSTP.C13.T15	,0038	4,40/ 2,91	,00	,74	0,993	,78	,41	,95	,84 (.73, .95)
GSTP.T1.C15	,0038	2,66/ 0,75	,12	,82	0,798	,69	,35	,84	,88 (.78, .97)
GSTP.C2.T12	,0038	2,82/ 2,44	,00	,82	0,888	,69	,24	,89	,67 (.48, .87)
GSTP.C5.T9	,0038	0,23/ 2,19	,18	,37	0,233	,67	,82	,61	,87 (.74, .99)
GSTP.T7.T11	,0043	1-6,40/ 1-5,47	,00	,76	1-1,8	,78	,41	,95	,71 (.53, .90)
GSTP.T8.C13	,0043	4,40/ 2,92	,00	,74	1,01	,78	,41	,95	,84 (.73, .95)
RNF.C5.C10	,0043	0,06/ 0,14	,53	,03	0,0699	,80	,88	,77	,87 (.75, 1)
GSTP.C2.T15	,0048	1,64/ 2,37	,00	,82	0,628	,29	,76	,08	,91 (.83, .99)

Средние значения представлены как среднее в группе ДГПЖ/среднее в группе ЗД+РПЖ. Пороговое значение является оценкой порога, который может быть полезен для разделения сравниваемых групп. Чувствительность — это доля пациентов с ДГПЖ, правильно идентифицированных как таковые, а специфичность — это доля доноров ЗД+РПЖ, правильно идентифицированных как таковые. Сокращения: CV = перекрестная проверка, AUC = площадь под кривой ROC, CI = доверительный интервал.

Приложение 7. Суммарные данные сравнения статуса метилирования цитозинов в составе свободной внДНК плазмы крови у здоровых доноров с объединенной группой, включающей пациентов с РПЖ и ДГПЖ.

Ген, Позиция, Статус (С или Т после конверсии)	P-значение ×3×10 ⁶	Среднее, %	Чувствительность для 100% специфичности, %	Специфичность для 100% чувствительности, %	Пороговое значение, % (отношение)	CV точность, %	CV чувствительность, %	CV специфичность, %	CV AUC, % (De Long's CI)
ПСА	,0000000076		26,3	97,3		98,2	100	97,3	97,3 (92,0, 100)
GSTP1.T3.T13	,000000000049	99,5/ 88,5	100	100	99,3 (1,00)	100	100	100	100
GSTP1.T8.T13	,000000000019	99,6/ 91,7	88,9	97,3	99,4	96,4	94,4	97,3	94,1 (86,1, 100)
GSTP1.T3.T6	,000000000015	99,5/ 92,8	72,2	94,6	99,3	96,4	100	94,6	97,0 (91,7, 100)
GSTP1.C3	,000000000047	,287/ 6,55	72,2	94,6	,457	94,5	100	91,9	95,0 (88,4, 100)
GSTP1.T3.T9	,000000000068	99,6/ 93,2	66,7	94,6	99,4	94,5	100	91,9	96,7 (91,6, 100)
GSTP1.T9.T13	,000000000068	99,6/ 90,5	77,8	91,9	99,3	92,7	94,4	91,9	97,6 (94,3, 100)
GSTP1.T6.T9	,000000000013	99,6/ 94,8	72,2	83,8	99,6	90,9	94,4	89,2	97,1 (93,2, 100)
GSTP1.C13	,000000000018	,260/ 7,48	77,8	89,2	,506	90,9	94,4	89,2	96,8 (93,2, 100)
GSTP1.T6.T13	,000000000018	99,5/ 91,9	77,8	89,2	99,2	90,9	94,4	89,2	97,7 (94,8, 100)
GSTP1.T3.T8	,000000000025	99,5/ 92,6	61,1	94,6	99,3	94,5	100	91,9	94,7 (87,6, 100)
GSTP1.T1.C13	,000000000025	,238/ 5,09	77,8	89,2	,497	90,9	94,4	89,2	96,4 (92,4, 100)
GSTP1.C3.T7	,000000000025	,261/ 3,41	66,7	89,2	,436	89,1	88,9	89,2	95,6 (90,6, 100)
GSTP1.C3.T17	,000000000033	,273/ 4,18	55,6	91,9	,443	92,7	94,4	91,9	94,9 (88,7, 100)
GSTP1.T2.C13	,000000000033	,238/ 4,97	72,2	89,2	,489	90,9	94,4	89,2	96,1 (91,8, 100)
GSTP1.C3.T16	,000000000033	,271/ 3,70	61,1	89,2	,450	90,9	88,9	91,9	95,0 (89,1, 100)
GSTP1.C3.T6	,000000000033	,270/ 4,05	61,1	89,2	,435	89,1	88,9	89,2	95,2 (89,7, 100)
GSTP1.T1.C3	,000000000044	,265/ 4,08	44,4	91,9	,436	92,7	94,4	91,9	95,0 (88,6, 100)
GSTP1.C3.T14	,000000000044	,272/ 3,85	55,6	91,9	,430	90,9	88,9	91,9	94,6 (88,2, 100)
GSTP1.C3.T10	,000000000059	,271/ 3,51	61,1	89,2	,433	89,1	88,9	89,2	95,0 (89,2, 100)
GSTP1.T4.C13	,000000000078	,239/ 4,97	72,2	89,2	,460	90,9	94,4	89,2	95,0 (90,0, 100)
GSTP1.T1.C6	,000000000078	,188/ ,780	77,8	64,9	,242	89,1	88,9	89,2	95,5 (89,8, 100)

GSTP1.C13.T17	,000000078	,241/ 5,15	77,8	83,8	,496	87,3	94,4	83,8	96,7 (92,7, 100)
GSTP1.T3.C13	,00000010	,244/ 4,92	66,7	89,2	,481	90,9	94,4	89,2	95,2 (90,2, 100)
GSTP1.T5.C13	,00000010	,243/ 4,96	66,7	89,2	,467	90,9	94,4	89,2	95,2 (90,2, 100)
GSTP1.C6.T17	,00000010	,197/ ,850	44,4	73,0	,242	89,1	94,4	86,5	95,6 (89,6, 100)
GSTP1.T6.C13	,00000013	,241/ 4,98	55,6	86,5	,464	89,1	94,4	86,5	95,3 (90,3, 100)
GSTP1.C6	,00000017	,214/ 3,11	55,6	73,0	,259	87,3	94,4	83,8	95,3 (90,0, 100)
GSTP1.T3.T10	,00000017	99,5/ 92,5	44,4	78,4	99,4	87,3	94,4	83,8	91,4 (81,9, 100)
GSTP1.C3.T8	,00000017	,271/ 3,98	61,1	86,5	,433	87,3	88,9	86,5	95,0 (89,7, 100)
GSTP1.C3.T11	,00000017	,270/ 3,98	66,7	86,5	,433	87,3	88,9	86,5	94,9 (89,5, 100)
GSTP1.T10.T13	,00000017	99,5/ 91,0	72,2	78,4	99,4	85,5	94,4	81,1	88,9 (79,0, 98,8)
GSTP1.T6.T8	,00000028	99,6/ 96,0	38,9	86,5	99,5	87,3	88,9	86,5	95,9 (91,2, 100)
GSTP1.T8.T9	,00000045	99,6/ 94,6	33,3	89,2	99,4	90,9	94,4	89,2	94,7 (88,6, 100)
GSTP1.C3.T13	,00000045	,271/ 3,99	22,2	89,2	,433	89,1	88,9	89,2	94,6 (88,2, 100)
GSTP1.T2.C6	,00000045	,187/ ,666	66,7	62,2	,238	85,5	88,9	83,8	94,7 (88,8, 100)
GSTP1.C3.T15	,00000045	,264/ 3,13	61,1	75,7	,377	85,5	88,9	83,8	94,7 (89,0, 100)
GSTP1.C6.T7	,00000056	,184/ ,629	72,2	54,1	,208	87,3	88,9	86,5	94,3 (87,2, 100)
GSTP1.C6.T14	,00000071	,196/ ,755	55,6	62,2	,240	89,1	94,4	86,5	94,7 (88,4, 100)
GSTP1.T4.C6	,00000071	,189/ ,640	61,1	62,2	,236	85,5	88,9	83,8	93,7 (86,8, 100)
GSTP1.C6.T10	,00000088	,196/ ,714	50,0	62,2	,239	89,1	88,9	89,2	94,4 (87,7, 100)
GSTP1.T7.C13	,0000011	,232/ 4,92	38,9	83,8	,495	87,3	94,4	83,8	93,7 (87,8, 99,6)
GSTP1.C6.T16	,0000011	,197/ ,819	27,8	67,6	,242	85,5	88,9	83,8	94,3 (87,6, 100)
GSTP1.T10.C13	,0000014	,241/ 5,01	33,3	83,8	,496	87,3	94,4	83,8	93,4 (87,1, 99,6)
GSTP1.C3.T12	,0000017	,250/ 3,99	27,8	89,2	,426	90,9	94,4	89,2	92,6 (85,1, 100)
GSTP1.T5.C6	,0000021	,195/ ,641	38,9	62,2	,235	87,3	94,4	83,8	93,2 (85,9, 100)
GSTP1.T8.C13	,0000025	,240/ 4,90	33,3	83,8	,495	87,3	94,4	83,8	92,9 (86,5, 99,4)
GSTP1.T9.C13	,0000025	,240/ 4,90	33,3	83,8	,492	87,3	94,4	83,8	92,8 (86,3, 99,3)
GSTP1.C13.T14	,0000056	,240/ 5,06	33,3	83,8	,496	87,3	94,4	83,8	91,7 (84,4, 99,1)
GSTP1.T2.C3	,0000056	,264/ 3,28	11,1	83,8	,430	85,5	88,9	83,8	92,8 (85,8, 99,8)
GSTP1.C13.T16	,0000067	,241/ 5,12	33,3	83,8	,495	87,3	94,4	83,8	92,2 (85,0, 99,3)
GSTP1.T3.T11	,0000081	99,3/ 91,5	55,6	43,2	98,9	83,6	94,4	78,4	91,0 (80,5, 100)
GSTP1.T3.T14	,0000081	99,1/ 90,9	50,0	81,1	98,2	81,8	83,3	81,1	91,4 (84,0, 98,9)
GSTP1.C6.T12	,0000098	,186/ ,676	5,56	59,5	,224	85,5	88,9	83,8	93,1 (85,3, 100)
GSTP1.T3.T17	,000012	99,3/ 93,2	55,6	18,9	99,3	85,5	94,4	81,1	91,2 (80,0, 100)
GSTP1.T6.T10	,000012	99,6/ 95,3	22,2	56,8	99,6	74,5	94,4	64,9	88,7 (77,0, 100)
GSTP1.T11.T13	,000014	99,3/ 92,1	61,1	29,7	98,8	85,5	94,4	81,1	91,4 (81,2, 100)
GSTP1.T9.T10	,000014	99,6/ 93,9	38,9	62,2	99,6	83,6	94,4	78,4	86,7 (74,5, 98,9)
GSTP1.T12.C13	,000017	,232/ 3,43	33,3	78,4	,464	85,5	94,4	81,1	91,6 (84,3, 98,8)

GSTP1.C6.T15	,000017	,194/ ,607	16,7	54,1	,229	85,5	94,4	81,1	91,9 (83,8, 99,9)
GSTP1.T7.C12	,000033	,302/ 4,59	44,4	73,0	,505	81,8	94,4	75,7	90,1 (81,9, 98,3)
GSTP1.C13.T15	,000039	,237/ 4,89	27,8	83,8	,493	87,3	94,4	83,8	89,6 (81,2, 98,1)
GSTP1.C3.T9	,000046	,228/ 2,20	33,3	75,7	,402	81,8	88,9	78,4	90,4 (82,7, 98,1)
GSTP1.C3.C4	,000055	,0443/ 3,67	22,2	83,8	,198	87,3	94,4	83,8	88,9 (79,5, 98,2)
GSTP1.T3.C6	,000055	,197/ ,614	5,56	59,5	,239	81,8	88,9	78,4	90,1 (81,5, 98,7)
GSTP1.T11.C13	,000064	,237/ 3,36	33,3	78,4	,463	87,3	94,4	83,8	90,4 (82,6, 98,2)
GSTP1.T13.T14	,000064	99,1/ 89,7	55,6	78,4	98,1	81,8	88,9	78,4	91,6 (84,6, 98,6)
GSTP1.T13.T17	,000075	99,4/ 92,2	50,0	27,0	99,4	83,6	94,4	78,4	87,2 (75,4, 99,1)
KIAA1539.C1.C2	,000078	,0183/ ,00614	0	51,4	,00923	82,1	78,9	83,8	90,8 (82,3, 99,2)
GSTP1.C3.C5	,00010	,0407/ 3,36	27,8	48,6	,0539	83,6	94,4	78,4	89,9 (80,7, 99,2)
GSTP1.T9.T14	,00012	99,2/ 92,6	50,0	73,0	98,1	83,6	88,9	81,1	90,4 (82,8, 98,0)
GSTP1.C3.T5	,00014	,246/ 3,19	0	75,7	,512	81,8	94,4	75,7	89,9 (81,6, 98,2)
GSTP1.C2.C3	,00014	,0229/ 3,27	11,1	70,3	,123	78,2	94,4	70,3	87,5 (78,0, 97,1)
RNF219.C14.C16	,00016	,162/ ,0442	42,1	67,6	,0691	82,1	73,7	86,5	89,5 (81,5, 97,4)
RNF219.C4.C14	,00016	,108/ ,0417	15,8	67,6	,0727	82,1	84,2	81,1	89,5 (81,2, 97,8)
GSTP1.C6.T11	,00016	,193/ ,599	0	51,4	,233	85,5	94,4	81,1	90,7 (82,0, 99,4)
GSTP1.C6.T8	,00016	,195/ ,606	0	48,6	,212	81,8	83,3	81,1	90,1 (81,3, 98,9)
GSTP1.T3.T16	,00016	99,2/ 91,4	22,2	40,5	98,7	78,2	94,4	70,3	88,4 (77,4, 99,4)
GSTP1.T9.T11	,00019	99,4/ 93,5	55,6	24,3	99,3	74,5	94,4	64,9	87,2 (75,9, 98,6)
RNF219.C13.C14	,00020	,190/ ,0463	52,6	62,2	,0976	78,6	73,7	81,1	89,6 (81,7, 97,6)
GSTP1.C12.C13	,00029	,0278/ 4,05	27,8	67,6	,0499	78,2	94,4	70,3	86,6 (76,7, 96,5)
RNF219.C6.C8	,00032	,146/ ,0456	36,8	70,3	,0744	78,6	78,9	78,4	89,2 (81,2, 97,2)
GSTP1.C3.C14	,00034	,0149/ 2,69	16,7	78,4	,0372	85,5	94,4	81,1	89,5 (80,9, 98,0)
GSTP1.C3.T4	,00039	,242/ 2,88	0	75,7	,397	81,8	88,9	78,4	88,4 (79,5, 97,4)
GSTP1.C3.C16	,00045	,0155/ 2,85	22,2	73,0	,0541	80,0	94,4	73,0	88,7 (80,0, 97,5)
GSTP1.C3.C15	,00052	,0230/ 3,42	44,4	67,6	,127	80,0	94,4	73,0	85,3 (75,3, 95,3)
RNF219.C10.C14	,00070	,166/ ,0454	42,1	70,3	,0721	76,8	68,4	81,1	88,3 (79,8, 96,8)
GSTP1.T1.C12	,00078	,466/ 4,87	22,2	56,8	1,11	78,2	83,3	75,7	86,5 (76,7, 96,3)
GSTP1.C11.C13	,00089	,0228/ 4,13	22,2	81,1	,0461	87,3	100	81,1	88,4 (79,5, 97,4)
GSTP1.C8	,00089	,200/ 3,43	11,1	78,4	,307	83,6	94,4	78,4	87,2 (77,8, 96,6)
GSTP1.C8.T17	,00089	,181/ 1,09	11,1	70,3	,234	81,8	94,4	75,7	87,8 (78,8, 96,9)
RNF219.C7.C8	,00093	,133/ ,0420	31,6	62,2	,0726	76,8	78,9	75,7	87,6 (78,8, 96,4)
GSTP1.T13.T16	,0010	99,2/ 89,9	22,2	48,6	98,8	80,0	94,4	73,0	86,0 (74,7, 97,4)
GSTP1.C8.T16	,0012	,181/ 1,06	11,1	64,9	,233	83,6	94,4	78,4	87,5 (78,4, 96,7)
GSTP1.C6.T13	,0012	,195/ ,610	0	54,1	,213	76,4	83,3	73,0	87,4 (77,7, 97,0)
RNF219.C8.C10	,0012	,163/ ,0504	31,6	64,9	,0762	73,2	73,7	73,0	87,6 (78,9, 96,4)

GSTP1.C3.C10	,0015	,0153/ 3,04	22,2	78,4	,0329	83,6	100	75,7	87,1 (77,6, 96,6)
GSTP1.T1.C8	,0015	,179/ 1,04	16,7	75,7	,281	81,8	94,4	75,7	87,2 (78,0, 96,4)
RNF219.C1.C14	,0017	,0960/ ,0411	26,3	62,2	,0636	76,8	78,9	75,7	86,6 (77,4, 95,8)
GSTP1.C3.C7	,0017	,0257/ 3,14	38,9	64,9	,0629	80,0	94,4	73,0	84,5 (74,0, 95,1)
GSTP1.C11.T17	,0019	,225/ 2,19	22,2	48,6	,215	70,9	88,9	62,2	85,9 (75,2, 96,6)
KIAA1539.C4.C5	,0020	,0177/ ,0101	0	37,8	,00923	82,1	73,7	86,5	84,2 (71,7, 96,7)
KIAA1539.C2.C3	,0021	,0154/ ,00872	0	62,2	,0125	78,6	78,9	78,4	87,1 (77,6, 96,5)
GSTP1.T2.C8	,0022	,178/ ,916	11,1	75,7	,279	81,8	94,4	75,7	86,3 (76,8, 95,9)
GSTP1.C8.T14	,0022	,181/ 1,01	16,7	64,9	,222	81,8	94,4	75,7	86,0 (76,3, 95,8)
GSTP1.C3.C13	,0022	,0162/ 2,56	16,7	75,7	,0316	80,0	77,8	81,1	87,1 (77,7, 96,5)
GSTP1.C6.T9	,0022	,195/ ,599	0	48,6	,212	78,2	83,3	75,7	87,4 (77,5, 97,2)
KIAA1539.C3.C4	,0023	,0169/ ,00970	0	45,9	,00923	82,1	68,4	89,2	83,9 (71,4, 96,5)
RNF219.C2.C3	,0023	,128/ ,0398	42,1	62,2	,0663	73,2	68,4	75,7	86,1 (76,7, 95,4)
RNF219.C8.C16	,0024	,0960/ ,0461	10,5	70,3	,0700	75,0	78,9	73,0	86,9 (77,6, 96,2)
RNF219.C4.C8	,0024	,145/ ,0491	26,3	59,5	,0987	76,8	84,2	73,0	87,2 (78,0, 96,4)
GSTP1.T6.C8	,0025	,181/ ,919	5,56	75,7	,271	83,6	94,4	78,4	86,5 (77,0, 96,0)
RNF219.C8.C17	,0027	,0932/ ,0417	26,3	59,5	,0740	78,6	84,2	75,7	86,2 (76,9, 95,6)
GSTP1.C10.C15	,0032	,0196/ 3,08	16,7	78,4	,0461	85,5	100	78,4	85,3 (75,1, 95,5)
GSTP1.C10.C16	,0032	,0174/ 2,83	22,2	78,4	,0441	85,5	100	78,4	85,3 (74,9, 95,7)
GSTP1.T5.T13	,0036	98,5/ 90,8	61,1	18,9	99,0	67,3	94,4	54,1	85,4 (73,3, 97,6)
GSTP1.T12.T13	,0036	95,2/ 89,1	55,6	2,70	98,0	54,5	94,4	35,1	77,5 (63,5, 91,4)
GSTP1.T6.T11	,0041	99,3/ 94,8	22,2	24,3	99,5	69,1	94,4	56,8	84,1 (71,6, 96,6)
KIAA1539.C1.C4	,0042	,0158/ ,00598	0	45,9	,00923	82,1	73,7	86,5	86,2 (76,4, 96,0)
RNF219.C5.C14	,0042	,124/ ,0407	36,8	64,9	,0629	75,0	68,4	78,4	85,6 (76,1, 95,2)
GSTP1.C7.C10	,0046	,0258/ 3,11	22,2	67,6	,0417	76,4	94,4	67,6	81,7 (70,1, 93,3)
KIAA1539.C2.C5	,0049	,0157/ ,0153	0	43,2	,00759	62,5	0	94,6	68,7 (50,4, 87,1)

Средние значения представлены как среднее в группе ЗД/среднее в группе РПЖ+ДГПЖ. Пороговое значение является оценкой порога, который может быть полезен для разделения сравниваемых групп. Чувствительность — это доля ЗД, правильно идентифицированных как таковые, а специфичность — это доля пациентов РПЖ+ДГПЖ, правильно идентифицированных как таковые. Сокращения: CV = перекрестная проверка, AUC = площадь под кривой ROC, CI = доверительный интервал.

Приложение 8. Диагностическая ценность статуса метилирования индивидуального цитозина или парных цитозинов при сравнении пациентов с РПЖ и группы ЗД

Ген, Позиция, Статус (С или Т после конверсии)	Р-значение ×1167	Среднее, %	Чувствительность для 100% специфичности, %	Специфичность для 100% чувствительности, %	Пороговое значение, % (отношение)	СУ точность, %	СУ чувствительность, %	СУ специфичность, %	СУ AUC, % (De Long's CI)
GSTP1.C3	,00000000011	12,0/ ,247	100	100	,768 (4,53)	100	100	100	100
GSTP1.C4	,00000000011	11,8/ ,235	100	100	,768 (5,17)	100	100	100	100
GSTP1.C5	,00000000011	12,1/ ,133	100	100	,598 (6,86)	100	100	100	100
GSTP1.C6	,00000000011	11,9/ ,234	100	100	,678 (5,14)	100	100	100	100
GSTP1.C7	,00000000011	12,0/ ,187	100	100	,660 (4,95)	100	100	100	100
GSTP1.C8	,00000000011	6,95/ ,196	100	100	,324 (1,46)	100	100	100	100
GSTP1.C9	,00000000011	8,62/ ,124	100	100	,356 (4,0)	100	100	100	100
GSTP1.C11	,00000000011	12,6/ ,155	100	100	,586 (8,42)	100	100	100	100
GSTP1.C13	,00000000011	8,42/ ,274	100	100	,945 (3,48)	100	100	100	100
GSTP1.C16	,00000000011	9,12/ ,204	100	100	,592 (2,83)	100	100	100	100
GSTP1.C17	,00000000011	8,11/ ,136	100	100	,251 (1,45)	100	100	100	100
GSTP1.T1.T3	,00000000011	86,9/ 99,3	100	100	98,1 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T2.T3	,00000000011	87,8/ 99,5	100	100	98,7 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T1.T4	,00000000011	87,1/ 99,3	100	100	98,1 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T2.T4	,00000000011	87,9/ 99,5	100	100	98,7 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T3.T4	,00000000011	87,7/ 99,6	100	100	98,7 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T1.T5	,00000000011	86,8/ 99,4	100	100	98,2 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T2.T5	,00000000011	87,7/ 99,6	100	100	98,9 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T3.T5	,00000000011	87,5/ 99,7	100	100	98,8 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T4.T5	,00000000011	87,6/ 99,7	100	100	98,8 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T1.T6	,00000000011	87,0/ 99,3	100	100	98,2 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T2.T6	,00000000011	87,8/ 99,4	100	100	98,8 (1,01)	100	100	100	100

GSTP1.T3.T6	,00000000011	87,5/ 99,5	100	100	98,7 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T4.T6	,00000000011	87,6/ 99,5	100	100	98,7 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T5.T6	,00000000011	87,5/ 99,6	100	100	98,8 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T1.T7	,00000000011	86,8/ 99,3	100	100	98,2 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T2.T7	,00000000011	87,7/ 99,5	100	100	98,8 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T3.T7	,00000000011	87,3/ 99,6	100	100	98,7 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T4.T7	,00000000011	87,4/ 99,6	100	100	98,7 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T5.T7	,00000000011	87,2/ 99,7	100	100	98,9 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T6.T7	,00000000011	87,7/ 99,6	100	100	98,9 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T3.T8	,00000000011	87,5/ 99,6	100	100	98,8 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T4.T8	,00000000011	87,7/ 99,6	100	100	98,7 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T5.T8	,00000000011	87,5/ 99,7	100	100	98,9 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T6.T8	,00000000011	87,8/ 99,6	100	100	98,9 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T7.T8	,00000000011	87,8/ 99,6	100	100	99,0 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T2.T9	,00000000011	91,0/ 99,6	100	100	99,3 (1,00)	100	100	100	100
GSTP1.T3.T9	,00000000011	86,9/ 99,6	100	100	98,3 (1,03)	100	100	100	100
GSTP1.T4.T9	,00000000011	87,0/ 99,6	100	100	98,5 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T5.T9	,00000000011	86,8/ 99,7	100	100	98,6 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T6.T9	,00000000011	87,1/ 99,6	100	100	98,6 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T7.T9	,00000000011	87,2/ 99,7	100	100	98,6 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T8.T9	,00000000011	91,2/ 99,7	100	100	99,4 (1,00)	100	100	100	100
GSTP1.T3.T10	,00000000011	87,3/ 99,5	100	100	98,7 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T4.T10	,00000000011	87,4/ 99,5	100	100	98,7 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T5.T10	,00000000011	87,2/ 99,7	100	100	98,8 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T6.T10	,00000000011	87,5/ 99,6	100	100	98,8 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T7.T10	,00000000011	87,6/ 99,6	100	100	98,8 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T9.T10	,00000000011	91,0/ 99,7	100	100	99,2 (1,00)	100	100	100	100
GSTP1.T1.T11	,00000000011	86,3/ 99,4	100	100	98,1 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T2.T11	,00000000011	87,1/ 99,5	100	100	98,7 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T3.T11	,00000000011	86,5/ 99,6	100	100	98,6 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T4.T11	,00000000011	86,6/ 99,6	100	100	98,5 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T5.T11	,00000000011	86,5/ 99,7	100	100	98,7 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T6.T11	,00000000011	86,9/ 99,6	100	100	98,7 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T7.T11	,00000000011	87,0/ 99,7	100	100	98,8 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T8.T11	,00000000011	87,3/ 99,6	100	100	98,8 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T9.T11	,00000000011	86,7/ 99,7	100	100	98,2 (1,03)	100	100	100	100
GSTP1.T10.T11	,00000000011	87,1/ 99,6	100	100	98,7 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T1.T13	,00000000011	88,8/ 99,2	100	100	97,9 (1,01)	100	100	100	100

GSTP1.T2.T13	,00000000011	89,6/ 99,4	100	100	98,6 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T3.T13	,00000000011	85,4/ 99,5	100	100	98,0 (1,03)	100	100	100	100
GSTP1.T4.T13	,00000000011	85,6/ 99,5	100	100	98,0 (1,03)	100	100	100	100
GSTP1.T5.T13	,00000000011	85,4/ 99,6	100	100	98,0 (1,03)	100	100	100	100
GSTP1.T6.T13	,00000000011	85,6/ 99,5	100	100	98,0 (1,03)	100	100	100	100
GSTP1.T7.T13	,00000000011	85,6/ 99,5	100	100	98,1 (1,03)	100	100	100	100
GSTP1.T8.T13	,00000000011	89,7/ 99,5	100	100	98,6 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T9.T13	,00000000011	89,1/ 99,6	100	100	98,3 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T10.T13	,00000000011	89,5/ 99,5	100	100	98,5 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T11.T13	,00000000011	85,2/ 99,6	100	100	98,0 (1,03)	100	100	100	100
GSTP1.T3.T14	,00000000011	86,9/ 99,3	100	100	98,0 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T4.T14	,00000000011	87,1/ 99,3	100	100	98,1 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T5.T14	,00000000011	86,9/ 99,4	100	100	98,2 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T6.T14	,00000000011	87,2/ 99,3	100	100	98,2 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T7.T14	,00000000011	87,2/ 99,4	100	100	98,3 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T11.T14	,00000000011	86,8/ 99,4	100	100	98,0 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T13.T14	,00000000011	89,2/ 99,3	100	100	97,9 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T1.T16	,00000000011	89,5/ 99,3	100	100	98,4 (1,00)	100	100	100	100
GSTP1.T2.T16	,00000000011	90,4/ 99,5	100	100	99,0 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T3.T16	,00000000011	86,3/ 99,6	100	100	98,1 (1,03)	100	100	100	100
GSTP1.T4.T16	,00000000011	86,4/ 99,6	100	100	98,2 (1,03)	100	100	100	100
GSTP1.T5.T16	,00000000011	86,2/ 99,7	100	100	98,2 (1,03)	100	100	100	100
GSTP1.T6.T16	,00000000011	86,5/ 99,6	100	100	98,2 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T7.T16	,00000000011	86,5/ 99,6	100	100	98,2 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T8.T16	,00000000011	90,5/ 99,6	100	100	99,2 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T9.T16	,00000000011	89,9/ 99,7	100	100	99,0 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T10.T16	,00000000011	90,3/ 99,6	100	100	99,0 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T11.T16	,00000000011	86,1/ 99,6	100	100	98,1 (1,03)	100	100	100	100
GSTP1.T13.T16	,00000000011	88,6/ 99,5	100	100	98,3 (1,02)	100	100	100	100
GSTP1.T14.T16	,00000000011	90,3/ 99,4	100	100	98,7 (1,00)	100	100	100	100
GSTP1.T3.T17	,00000000011	87,3/ 99,6	100	100	98,8 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T4.T17	,00000000011	87,4/ 99,6	100	100	98,8 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T5.T17	,00000000011	87,2/ 99,7	100	100	99,0 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T6.T17	,00000000011	87,5/ 99,6	100	100	98,9 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T7.T17	,00000000011	87,5/ 99,7	100	100	99,0 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T8.T17	,00000000011	91,5/ 99,7	100	100	99,5 (1,00)	100	100	100	100
GSTP1.T9.T17	,00000000011	90,9/ 99,7	100	100	99,4 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T11.T17	,00000000011	87,1/ 99,7	100	100	98,9 (1,02)	100	100	100	100

GSTP1.T13.T17	,00000000011	89,5/ 99,6	100	100	98,7 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T16.T17	,00000000011	90,7/ 99,7	100	100	99,2 (1,01)	100	100	100	100
GSTP1.T1.C3	,00000000011	4,71/ ,243	100	100	,591 (2,81)	100	100	100	100
GSTP1.T2.C3	,00000000011	4,45/ ,199	100	100	,436 (2,11)	100	100	100	100
GSTP1.T1.C4	,00000000011	4,58/ ,233	100	100	,579 (2,94)	100	100	100	100
GSTP1.T2.C4	,00000000011	4,33/ ,196	100	100	,405 (2,47)	100	100	100	100
GSTP1.T1.C5	,00000000011	4,82/ ,132	100	100	,539 (5,75)	100	100	100	100
GSTP1.T2.C5	,00000000011	4,58/ ,0862	100	100	,361 (7,09)	100	100	100	100
GSTP1.T3.C5	,00000000011	,565/ ,0856	100	100	,189 (1,94)	100	100	100	100
GSTP1.T4.C5	,00000000011	,557/ ,0947	100	100	,189 (1,94)	100	100	100	100
GSTP1.T1.C6	,00000000011	4,69/ ,232	100	100	,607 (4,13)	100	100	100	100
GSTP1.T2.C6	,00000000011	4,45/ ,231	100	100	,510 (3,04)	100	100	100	100
GSTP1.T1.C7	,00000000011	4,83/ ,181	100	100	,616 (4,31)	100	100	100	100
GSTP1.T2.C7	,00000000011	4,59/ ,176	100	100	,558 (3,74)	100	100	100	100
GSTP1.T3.C7	,00000000011	,783/ ,176	100	100	,312 (1,10)	100	100	100	100
GSTP1.T4.C7	,00000000011	,778/ ,185	100	100	,309 (1,09)	100	100	100	100
GSTP1.T1.C9	,00000000011	1,47/ ,123	100	100	,274 (2,36)	100	100	100	100
GSTP1.T2.C9	,00000000011	1,23/ ,122	100	100	,259 (2,11)	100	100	100	100
GSTP1.T3.C9	,00000000011	1,13/ ,122	100	100	,240 (1,82)	100	100	100	100
GSTP1.T4.C9	,00000000011	1,13/ ,120	100	100	,238 (1,78)	100	100	100	100
GSTP1.T5.C9	,00000000011	1,09/ ,122	100	100	,238 (1,78)	100	100	100	100
GSTP1.T6.C9	,00000000011	,948/ ,123	100	100	,232 (1,70)	100	100	100	100
GSTP1.T7.C9	,00000000011	,793/ ,122	100	100	,223 (1,57)	100	100	100	100
GSTP1.T8.C9	,00000000011	1,85/ ,123	100	100	,269 (2,28)	100	100	100	100
GSTP1.T1.C11	,00000000011	5,37/ ,153	100	100	,549 (7,61)	100	100	100	100
GSTP1.T2.C11	,00000000011	5,14/ ,154	100	100	,508 (6,44)	100	100	100	100
GSTP1.T3.C11	,00000000011	1,55/ ,153	100	100	,360 (3,25)	100	100	100	100
GSTP1.T4.C11	,00000000011	1,55/ ,153	100	100	,358 (3,21)	100	100	100	100
GSTP1.T5.C11	,00000000011	1,46/ ,153	100	100	,351 (3,08)	100	100	100	100
GSTP1.T6.C11	,00000000011	1,21/ ,153	100	100	,327 (2,67)	100	100	100	100
GSTP1.T7.C11	,00000000011	,961/ ,152	100	100	,269 (1,88)	100	100	100	100
GSTP1.T8.C11	,00000000011	5,80/ ,154	100	100	,547 (7,33)	100	100	100	100
GSTP1.T9.C11	,00000000011	4,70/ ,154	100	100	,374 (3,50)	100	100	100	100
GSTP1.T10.C11	,00000000011	4,69/ ,153	100	100	,377 (3,55)	100	100	100	100
GSTP1.T1.C13	,00000000011	2,88/ ,272	100	100	,759 (2,28)	100	100	100	100
GSTP1.T2.C13	,00000000011	2,70/ ,272	100	100	,656 (1,68)	100	100	100	100
GSTP1.T3.C13	,00000000011	2,59/ ,272	100	100	,615 (1,47)	100	100	100	100
GSTP1.T4.C13	,00000000011	2,59/ ,273	100	100	,617 (1,48)	100	100	100	100

GSTP1.T5.C13	,00000000011	2,56/ ,273	100	100	,583 (1,33)	100	100	100	100
GSTP1.T6.C13	,00000000011	2,45/ ,272	100	100	,539 (1,14)	100	100	100	100
GSTP1.T8.C13	,00000000011	3,39/ ,273	100	100	,883 (3,03)	100	100	100	100
GSTP1.T7.C15	,00000000011	,489/ 5,92	100	100	1,56 (1,23)	100	100	100	100
GSTP1.T9.C15	,00000000011	,531/ 5,91	100	100	1,48 (1,36)	100	100	100	100
GSTP1.T10.C15	,00000000011	,515/ 5,92	100	100	1,44 (1,43)	100	100	100	100
GSTP1.T11.C15	,00000000011	,357/ 5,91	100	100	1,21 (2,01)	100	100	100	100
GSTP1.T12.C15	,00000000011	,420/ 5,91	100	100	1,18 (2,13)	100	100	100	100
GSTP1.T14.C15	,00000000011	,315/ 5,91	100	100	,936 (3,39)	100	100	100	100
GSTP1.T1.C16	,00000000011	2,14/ ,201	100	100	,483 (1,89)	100	100	100	100
GSTP1.T2.C16	,00000000011	1,90/ ,196	100	100	,469 (1,78)	100	100	100	100
GSTP1.T3.C16	,00000000011	1,76/ ,196	100	100	,426 (1,47)	100	100	100	100
GSTP1.T4.C16	,00000000011	1,76/ ,202	100	100	,426 (1,47)	100	100	100	100
GSTP1.T5.C16	,00000000011	1,71/ ,196	100	100	,426 (1,47)	100	100	100	100
GSTP1.T6.C16	,00000000011	1,58/ ,203	100	100	,429 (1,49)	100	100	100	100
GSTP1.T7.C16	,00000000011	1,43/ ,195	100	100	,417 (1,41)	100	100	100	100
GSTP1.T8.C16	,00000000011	2,51/ ,203	100	100	,472 (1,80)	100	100	100	100
GSTP1.T9.C16	,00000000011	1,43/ ,202	100	100	,438 (1,55)	100	100	100	100
GSTP1.T10.C16	,00000000011	1,42/ ,202	100	100	,444 (1,59)	100	100	100	100
GSTP1.T11.C16	,00000000011	1,31/ ,202	100	100	,413 (1,38)	100	100	100	100
GSTP1.T12.C16	,00000000011	1,32/ ,200	100	100	,432 (1,51)	100	100	100	100
GSTP1.T13.C16	,00000000011	3,03/ ,202	100	100	,492 (1,96)	100	100	100	100
GSTP1.T14.C16	,00000000011	1,23/ ,201	100	100	,432 (1,51)	100	100	100	100
GSTP1.T15.C16	,00000000011	1,23/ ,193	100	100	,432 (1,51)	100	100	100	100
GSTP1.C5.T6	,00000000011	,634/ ,131	100	100	,264 (1,40)	100	100	100	100
GSTP1.C5.T7	,00000000011	,745/ ,123	100	100	,282 (1,69)	100	100	100	100
GSTP1.C3.T8	,00000000011	5,51/ ,246	100	100	,718 (3,96)	100	100	100	100
GSTP1.C4.T8	,00000000011	5,38/ ,234	100	100	,714 (4,47)	100	100	100	100
GSTP1.C5.T8	,00000000011	5,59/ ,132	100	100	,553 (6,05)	100	100	100	100
GSTP1.C6.T8	,00000000011	5,30/ ,233	100	100	,633 (4,49)	100	100	100	100
GSTP1.C7.T8	,00000000011	5,28/ ,186	100	100	,608 (4,21)	100	100	100	100
GSTP1.C3.T9	,00000000011	4,47/ ,245	100	100	,504 (1,95)	100	100	100	100
GSTP1.C4.T9	,00000000011	4,34/ ,231	100	100	,479 (2,09)	100	100	100	100
GSTP1.C5.T9	,00000000011	4,54/ ,132	100	100	,455 (4,04)	100	100	100	100
GSTP1.C6.T9	,00000000011	4,24/ ,233	100	100	,418 (1,96)	100	100	100	100
GSTP1.C7.T9	,00000000011	4,20/ ,185	100	100	,401 (1,83)	100	100	100	100
GSTP1.C3.T10	,00000000011	4,49/ ,245	100	100	,520 (2,08)	100	100	100	100
GSTP1.C4.T10	,00000000011	4,36/ ,233	100	100	,500 (2,19)	100	100	100	100

GSTP1.C5.T10	,00000000011	4,56/ ,132	100	100	,467 (4,25)	100	100	100	100
GSTP1.C6.T10	,00000000011	4,25/ ,232	100	100	,431 (2,18)	100	100	100	100
GSTP1.C7.T10	,00000000011	4,21/ ,185	100	100	,421 (2,01)	100	100	100	100
GSTP1.C9.T10	,00000000011	,757/ ,123	100	100	,201 (1,27)	100	100	100	100
GSTP1.C3.T11	,00000000011	,965/ ,245	100	100	,378 (1,10)	100	100	100	100
GSTP1.C4.T11	,00000000011	,829/ ,233	100	100	,360 (1,14)	100	100	100	100
GSTP1.C5.T11	,00000000011	,995/ ,131	100	100	,328 (2,16)	100	100	100	100
GSTP1.C9.T11	,00000000011	,779/ ,123	100	100	,224 (1,58)	100	100	100	100
GSTP1.C3.T12	,00000000011	4,47/ ,242	100	100	,555 (2,36)	100	100	100	100
GSTP1.C4.T12	,00000000011	4,34/ ,230	100	100	,529 (2,55)	100	100	100	100
GSTP1.C5.T12	,00000000011	4,54/ ,131	100	100	,490 (4,69)	100	100	100	100
GSTP1.C6.T12	,00000000011	4,25/ ,229	100	100	,472 (2,50)	100	100	100	100
GSTP1.C7.T12	,00000000011	4,21/ ,180	100	100	,455 (2,36)	100	100	100	100
GSTP1.C9.T12	,00000000011	,795/ ,122	100	100	,240 (1,82)	100	100	100	100
GSTP1.C11.T12	,00000000011	4,62/ ,150	100	100	,368 (3,61)	100	100	100	100
GSTP1.C3.T13	,00000000011	6,14/ ,245	100	100	,734 (4,14)	100	100	100	100
GSTP1.C4.T13	,00000000011	6,00/ ,234	100	100	,723 (4,58)	100	100	100	100
GSTP1.C5.T13	,00000000011	6,22/ ,132	100	100	,568 (6,29)	100	100	100	100
GSTP1.C6.T13	,00000000011	5,94/ ,232	100	100	,644 (4,64)	100	100	100	100
GSTP1.C7.T13	,00000000011	5,95/ ,186	100	100	,620 (4,37)	100	100	100	100
GSTP1.C9.T13	,00000000011	2,52/ ,123	100	100	,261 (2,14)	100	100	100	100
GSTP1.C11.T13	,00000000011	6,37/ ,153	100	100	,549 (7,53)	100	100	100	100
GSTP1.C3.T14	,00000000011	4,57/ ,245	100	100	,603 (2,79)	100	100	100	100
GSTP1.C4.T14	,00000000011	4,44/ ,233	100	100	,580 (2,95)	100	100	100	100
GSTP1.C5.T14	,00000000011	4,64/ ,132	100	100	,523 (5,33)	100	100	100	100
GSTP1.C6.T14	,00000000011	4,34/ ,232	100	100	,519 (3,01)	100	100	100	100
GSTP1.C7.T14	,00000000011	4,30/ ,185	100	100	,504 (2,89)	100	100	100	100
GSTP1.C9.T14	,00000000011	,876/ ,123	100	100	,251 (1,99)	100	100	100	100
GSTP1.C11.T14	,00000000011	4,70/ ,154	100	100	,413 (4,26)	100	100	100	100
GSTP1.C3.T15	,00000000011	4,52/ ,232	100	100	,604 (2,94)	100	100	100	100
GSTP1.C4.T15	,00000000011	4,39/ ,222	100	100	,585 (3,12)	100	100	100	100
GSTP1.C5.T15	,00000000011	4,59/ ,126	100	100	,516 (5,82)	100	100	100	100
GSTP1.C6.T15	,00000000011	4,29/ ,219	100	100	,506 (3,43)	100	100	100	100
GSTP1.C7.T15	,00000000011	4,26/ ,179	100	100	,508 (3,09)	100	100	100	100
GSTP1.C9.T15	,00000000011	,890/ ,113	100	100	,242 (2,22)	100	100	100	100
GSTP1.C11.T15	,00000000011	4,64/ ,143	100	100	,423 (4,47)	100	100	100	100
GSTP1.C3.T16	,00000000011	4,61/ ,239	100	100	,648 (3,22)	100	100	100	100
GSTP1.C4.T16	,00000000011	4,48/ ,234	100	100	,623 (3,40)	100	100	100	100

GSTP1.C5.T16	,00000000011	4,67/ ,126	100	100	,550 (6,09)	100	100	100	100
GSTP1.C6.T16	,00000000011	4,38/ ,233	100	100	,562 (3,54)	100	100	100	100
GSTP1.C7.T16	,00000000011	4,35/ ,178	100	100	,549 (3,43)	100	100	100	100
GSTP1.C9.T16	,00000000011	,939/ ,122	100	100	,264 (2,19)	100	100	100	100
GSTP1.C11.T16	,00000000011	4,75/ ,153	100	100	,447 (5,18)	100	100	100	100
GSTP1.C13.T16	,00000000011	2,33/ ,273	100	100	,546 (1,16)	100	100	100	100
GSTP1.C15.T16	,00000000011	,375/ 5,91	100	100	1,07 (2,61)	100	100	100	100
GSTP1.C3.T17	,00000000011	4,63/ ,246	100	100	,651 (3,25)	100	100	100	100
GSTP1.C4.T17	,00000000011	4,50/ ,234	100	100	,628 (3,46)	100	100	100	100
GSTP1.C5.T17	,00000000011	4,70/ ,132	100	100	,559 (6,09)	100	100	100	100
GSTP1.C6.T17	,00000000011	4,40/ ,232	100	100	,567 (3,60)	100	100	100	100
GSTP1.C7.T17	,00000000011	4,37/ ,185	100	100	,553 (3,48)	100	100	100	100
GSTP1.C9.T17	,00000000011	,949/ ,123	100	100	,266 (2,23)	100	100	100	100
GSTP1.C11.T17	,00000000011	4,75/ ,153	100	100	,451 (5,27)	100	100	100	100
GSTP1.C13.T17	,00000000011	2,35/ ,273	100	100	,546 (1,16)	100	100	100	100
GSTP1.C15.T17	,00000000011	,381/ 5,91	100	100	1,12 (2,39)	100	100	100	100
GSTP1.C16.T17	,00000000011	1,15/ ,202	100	100	,423 (1,45)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C2	,00000000011	7,25/ ,00188	100	100	,0478 (17,9)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C3	,00000000011	7,26/ ,00424	100	100	,0722 (8,18)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C3	,00000000011	7,51/ ,0478	100	100	,174 (1,99)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C4	,00000000011	7,25/ ,00184	100	100	,0334 (35,3)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C4	,00000000011	7,50/ ,0390	100	100	,169 (2,06)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C4	,00000000011	11,5/ ,0395	100	100	,391 (10,4)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C5	,00000000011	7,26/ ,00121	100	100	,0315 (39,7)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C5	,00000000011	7,51/ ,0469	100	100	,172 (2,00)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C5	,00000000011	11,5/ ,0474	100	100	,395 (10,3)	100	100	100	100
GSTP1.C4.C5	,00000000011	11,5/ ,0384	100	100	,386 (10,7)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C6	,00000000011	7,22/ ,00184	100	100	,0320 (34,7)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C6	,00000000011	7,47/ ,00276	100	100	,0447 (27,1)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C6	,00000000011	11,4/ ,00252	100	100	,0903 (17,3)	100	100	100	100
GSTP1.C4.C6	,00000000011	11,4/ ,00254	100	100	,0898 (17,6)	100	100	100	100
GSTP1.C5.C6	,00000000011	11,4/ ,00213	100	100	,0909 (18,3)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C7	,00000000011	7,20/ ,00530	100	100	,0608 (9,59)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C7	,00000000011	7,44/ ,0109	100	100	,104 (4,42)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C7	,00000000011	11,3/ ,0111	100	100	,243 (22,6)	100	100	100	100
GSTP1.C4.C7	,00000000011	11,3/ ,00217	100	100	,0972 (18,3)	100	100	100	100
GSTP1.C5.C7	,00000000011	11,3/ ,0105	100	100	,246 (22,6)	100	100	100	100
GSTP1.C6.C7	,00000000011	11,6/ ,00244	100	100	,104 (14,6)	100	100	100	100

GSTP1.C1.C8	,00000000011	6,16/ ,00256	100	100	,0335 (18,4)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C8	,00000000011	6,37/ ,00151	100	100	,0296 (34,4)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C8	,00000000011	6,46/ ,00131	100	100	,0264 (40,9)	100	100	100	100
GSTP1.C4.C8	,00000000011	6,45/ ,00144	100	100	,0328 (23,4)	100	100	100	100
GSTP1.C5.C8	,00000000011	6,49/ ,000992	100	100	,0264 (40,9)	100	100	100	100
GSTP1.C6.C8	,00000000011	6,62/ ,000736	100	100	,0282 (46,9)	100	100	100	100
GSTP1.C7.C8	,00000000011	6,76/ ,000971	100	100	,0293 (50,5)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C9	,00000000011	7,16/ ,00112	100	100	,0280 (38,5)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C9	,00000000011	7,39/ ,00157	100	100	,0363 (31,3)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C9	,00000000011	7,49/ ,00166	100	100	,0368 (32,0)	100	100	100	100
GSTP1.C4.C9	,00000000011	7,49/ ,00395	100	100	,0639 (9,63)	100	100	100	100
GSTP1.C5.C9	,00000000011	7,54/ ,00147	100	100	,0363 (31,3)	100	100	100	100
GSTP1.C6.C9	,00000000011	7,68/ ,00102	100	100	,0318 (49,6)	100	100	100	100
GSTP1.C7.C9	,00000000011	7,83/ ,00130	100	100	,0349 (47,7)	100	100	100	100
GSTP1.C8.C9	,00000000011	6,77/ ,000736	100	100	,0296 (51,7)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C10	,00000000011	7,14/ ,00273	100	100	,0390 (18,7)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C10	,00000000011	7,38/ ,00267	100	100	,0501 (16,4)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C10	,00000000011	7,48/ ,00224	100	100	,0404 (24,0)	100	100	100	100
GSTP1.C4.C10	,00000000011	7,48/ ,00211	100	100	,0402 (21,9)	100	100	100	100
GSTP1.C5.C10	,00000000011	7,52/ ,00154	100	100	,0316 (39,3)	100	100	100	100
GSTP1.C6.C10	,00000000011	7,66/ ,00172	100	100	,0378 (33,8)	100	100	100	100
GSTP1.C7.C10	,00000000011	7,82/ ,00185	100	100	,0445 (28,6)	100	100	100	100
GSTP1.C8.C10	,00000000011	6,76/ ,000953	100	100	,0326 (42,7)	100	100	100	100
GSTP1.C9.C10	,00000000011	7,87/ ,00111	100	100	,0331 (53,8)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C11	,00000000011	7,18/ ,00223	100	100	,0401 (19,8)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C11	,00000000011	7,41/ ,00142	100	100	,0326 (41,8)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C11	,00000000011	11,0/ ,00183	100	100	,0872 (	100	100	100	100
GSTP1.C4.C11	,00000000011	11,0/ ,00181	100	100	,0754 (192,)	100	100	100	100
GSTP1.C5.C11	,00000000011	11,1/ ,00168	100	100	,0768 (	100	100	100	100
GSTP1.C6.C11	,00000000011	11,3/ ,00210	100	100	,0981 (141,)	100	100	100	100
GSTP1.C7.C11	,00000000011	11,6/ ,00253	100	100	,102 (141,)	100	100	100	100
GSTP1.C8.C11	,00000000011	6,75/ ,000953	100	100	,0322 (41,7)	100	100	100	100
GSTP1.C9.C11	,00000000011	7,85/ ,00102	100	100	,0328 (52,7)	100	100	100	100
GSTP1.C10.C11	,00000000011	7,86/ ,00177	100	100	,0443 (28,8)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C12	,00000000011	7,12/ ,0223	100	100	,140 (1,45)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C12	,00000000011	7,35/ ,00507	100	100	,0709 (8,21)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C12	,00000000011	7,49/ ,00549	100	100	,0581 (14,7)	100	100	100	100
GSTP1.C4.C12	,00000000011	7,49/ ,00455	100	100	,0513 (17,2)	100	100	100	100

GSTP1.C5.C12	,00000000011	7,54/ ,00237	100	100	,0425 (26,6)	100	100	100	100
GSTP1.C6.C12	,00000000011	7,67/ ,00498	100	100	,0691 (11,7)	100	100	100	100
GSTP1.C7.C12	,00000000011	7,82/ ,00678	100	100	,0694 (12,5)	100	100	100	100
GSTP1.C8.C12	,00000000011	6,74/ ,00441	100	100	,0725 (8,25)	100	100	100	100
GSTP1.C9.C12	,00000000011	7,83/ ,00222	100	100	,0583 (16,7)	100	100	100	100
GSTP1.C10.C12	,00000000011	7,85/ ,00442	100	100	,0567 (17,6)	100	100	100	100
GSTP1.C11.C12	,00000000011	7,94/ ,00491	100	100	,0515 (26,0)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C13	,00000000011	5,54/ ,00187	100	100	,0272 (16,1)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C13	,00000000011	5,72/ ,00148	100	100	,0337 (16,7)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C13	,00000000011	5,83/ ,00165	100	100	,0358 (15,7)	100	100	100	100
GSTP1.C4.C13	,00000000011	5,83/ ,00132	100	100	,0295 (19,0)	100	100	100	100
GSTP1.C5.C13	,00000000011	5,86/ ,00103	100	100	,0241 (28,6)	100	100	100	100
GSTP1.C6.C13	,00000000011	5,97/ ,00166	100	100	,0282 (25,3)	100	100	100	100
GSTP1.C7.C13	,00000000011	6,08/ ,00103	100	100	,0267 (35,2)	100	100	100	100
GSTP1.C8.C13	,00000000011	5,03/ ,000643	100	100	,0243 (34,9)	100	100	100	100
GSTP1.C9.C13	,00000000011	6,11/ ,00120	100	100	,0286 (32,8)	100	100	100	100
GSTP1.C10.C13	,00000000011	6,11/ ,00135	100	100	,0361 (21,7)	100	100	100	100
GSTP1.C11.C13	,00000000011	6,18/ ,00201	100	100	,0295 (32,6)	100	100	100	100
GSTP1.C12.C13	,00000000011	6,19/ ,00387	100	100	,0479 (13,1)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C14	,00000000011	7,04/ ,00218	100	100	,0289 (26,5)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C14	,00000000011	7,27/ ,00191	100	100	,0403 (22,0)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C14	,00000000011	7,40/ ,00189	100	100	,0354 (29,8)	100	100	100	100
GSTP1.C4.C14	,00000000011	7,40/ ,00164	100	100	,0355 (26,6)	100	100	100	100
GSTP1.C5.C14	,00000000011	7,45/ ,00124	100	100	,0325 (33,6)	100	100	100	100
GSTP1.C6.C14	,00000000011	7,58/ ,00212	100	100	,0381 (29,9)	100	100	100	100
GSTP1.C7.C14	,00000000011	7,73/ ,00166	100	100	,0389 (34,3)	100	100	100	100
GSTP1.C8.C14	,00000000011	6,66/ ,00134	100	100	,0311 (38,7)	100	100	100	100
GSTP1.C9.C14	,00000000011	7,75/ ,000891	100	100	,0307 (55,3)	100	100	100	100
GSTP1.C10.C14	,00000000011	7,76/ ,00137	100	100	,0424 (26,4)	100	100	100	100
GSTP1.C11.C14	,00000000011	7,85/ ,00133	100	100	,0307 (55,3)	100	100	100	100
GSTP1.C12.C14	,00000000011	7,87/ ,00452	100	100	,0502 (19,8)	100	100	100	100
GSTP1.C13.C14	,00000000011	6,13/ ,00177	100	100	,0342 (22,9)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C15	,00000000011	7,03/ ,0146	100	100	,0789 (3,56)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C15	,00000000011	7,26/ ,0172	100	100	,112 (2,87)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C15	,00000000011	7,44/ ,0150	100	100	,0920 (4,84)	100	100	100	100
GSTP1.C4.C15	,00000000011	7,44/ ,0125	100	100	,0967 (3,99)	100	100	100	100
GSTP1.C5.C15	,00000000011	7,49/ ,00671	100	100	,0700 (8,35)	100	100	100	100
GSTP1.C6.C15	,00000000011	7,62/ ,0148	100	100	,0963 (4,79)	100	100	100	100

GSTP1.C7.C15	,00000000011	7,78/ ,00790	100	100	,0846 (7,54)	100	100	100	100
GSTP1.C8.C15	,00000000011	6,66/ ,00954	100	100	,0875 (4,88)	100	100	100	100
GSTP1.C9.C15	,00000000011	7,73/ ,0103	100	100	,0767 (8,44)	100	100	100	100
GSTP1.C10.C15	,00000000011	7,75/ ,00713	100	100	,0848 (6,61)	100	100	100	100
GSTP1.C11.C15	,00000000011	7,91/ ,0116	100	100	,0895 (7,36)	100	100	100	100
GSTP1.C12.C15	,00000000011	7,85/ ,0127	100	100	,0966 (5,33)	100	100	100	100
GSTP1.C13.C15	,00000000011	6,12/ ,0168	100	100	,0862 (3,60)	100	100	100	100
GSTP1.C14.C15	,00000000011	7,95/ ,0121	100	100	,102 (4,83)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C16	,00000000011	6,98/ ,00215	100	100	,0320 (20,1)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C16	,00000000011	7,21/ ,00770	100	100	,0755 (5,72)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C16	,00000000011	7,36/ ,00768	100	100	,0761 (5,81)	100	100	100	100
GSTP1.C4.C16	,00000000011	7,36/ ,00131	100	100	,0384 (21,6)	100	100	100	100
GSTP1.C5.C16	,00000000011	7,41/ ,00722	100	100	,0761 (5,81)	100	100	100	100
GSTP1.C6.C16	,00000000011	7,53/ ,00111	100	100	,0318 (40,7)	100	100	100	100
GSTP1.C7.C16	,00000000011	7,68/ ,00883	100	100	,0883 (5,30)	100	100	100	100
GSTP1.C8.C16	,00000000011	6,61/ ,000980	100	100	,0273 (43,9)	100	100	100	100
GSTP1.C9.C16	,00000000011	7,69/ ,00129	100	100	,0381 (28,5)	100	100	100	100
GSTP1.C10.C16	,00000000011	7,70/ ,00160	100	100	,0414 (25,2)	100	100	100	100
GSTP1.C11.C16	,00000000011	7,80/ ,00154	100	100	,0386 (29,1)	100	100	100	100
GSTP1.C12.C16	,00000000011	7,79/ ,00335	100	100	,0664 (10,8)	100	100	100	100
GSTP1.C13.C16	,00000000011	6,09/ ,00138	100	100	,0367 (19,8)	100	100	100	100
GSTP1.C14.C16	,00000000011	7,89/ ,00308	100	100	,0507 (16,8)	100	100	100	100
GSTP1.C15.C16	,00000000011	7,89/ ,0103	100	100	,0701 (8,39)	100	100	100	100
GSTP1.C1.C17	,00000000011	6,97/ ,00260	100	100	,0453 (10,1)	100	100	100	100
GSTP1.C2.C17	,00000000011	7,20/ ,00119	100	100	,0270 (42,8)	100	100	100	100
GSTP1.C3.C17	,00000000011	7,34/ ,00158	100	100	,0364 (25,9)	100	100	100	100
GSTP1.C4.C17	,00000000011	7,33/ ,000992	100	100	,0271 (43,3)	100	100	100	100
GSTP1.C5.C17	,00000000011	7,38/ ,000891	100	100	,0275 (44,5)	100	100	100	100
GSTP1.C6.C17	,00000000011	7,51/ ,00125	100	100	,0283 (47,)	100	100	100	100
GSTP1.C7.C17	,00000000011	7,67/ ,00169	100	100	,0414 (24,1)	100	100	100	100
GSTP1.C8.C17	,00000000011	6,60/ ,000736	100	100	,0271 (43,3)	100	100	100	100
GSTP1.C9.C17	,00000000011	7,68/ ,000891	100	100	,0289 (49,3)	100	100	100	100
GSTP1.C10.C17	,00000000011	7,69/ ,00119	100	100	,0289 (49,3)	100	100	100	100
GSTP1.C11.C17	,00000000011	7,80/ ,00154	100	100	,0386 (29,1)	100	100	100	100
GSTP1.C12.C17	,00000000011	7,78/ ,00354	100	100	,0409 (24,6)	100	100	100	100
GSTP1.C13.C17	,00000000011	6,07/ ,00104	100	100	,0248 (36,1)	100	100	100	100
GSTP1.C14.C17	,00000000011	7,89/ ,00119	100	100	,0289 (49,3)	100	100	100	100
GSTP1.C15.C17	,00000000011	7,88/ ,0139	100	100	,126 (2,61)	100	100	100	100

GSTP1.C16.C17	,00000000011	7,97/ ,00154	100	100	,0381 (28,5)	100	100	100	100
RNF219.C2.C4	,00000000011	,301/ ,00174	100	100	,0226 (6,29)	100	100	100	100
RNF219.C2.C5	,00000000011	,297/ ,000870	100	100	,0190 (6,94)	100	100	100	100
RNF219.C3.C5	,00000000011	,158/ ,00148	100	100	,0156 (4,35)	100	100	100	100
RNF219.C4.C5	,00000000011	,312/ ,00323	100	100	,0366 (2,15)	100	100	100	100
RNF219.C2.C6	,00000000011	,297/ ,00264	100	100	,0255 (3,84)	100	100	100	100
RNF219.C3.C6	,00000000011	,156/ ,00106	100	100	,0130 (6,29)	100	100	100	100
RNF219.C4.C6	,00000000011	,314/ ,0144	100	100	,0516 (1,08)	100	100	100	100
RNF219.C5.C6	,00000000011	,483/ ,00133	100	100	,0283 (14,3)	100	100	100	100
RNF219.C3.C7	,00000000011	,156/ ,00235	100	100	,0202 (2,61)	100	100	100	100
RNF219.C4.C7	,00000000011	,324/ ,00178	100	100	,0205 (8,80)	100	100	100	100
RNF219.C5.C7	,00000000011	,481/ ,00204	100	100	,0376 (8,34)	100	100	100	100
RNF219.C6.C7	,00000000011	,486/ ,000671	100	100	,0194 (31,5)	100	100	100	100
RNF219.C2.C8	,00000000011	,298/ ,00464	100	100	,0285 (4,02)	100	100	100	100
RNF219.C4.C8	,00000000011	,340/ ,00893	100	100	,0462 (3,44)	100	100	100	100
RNF219.C5.C8	,00000000011	,487/ ,00554	100	100	,0526 (4,44)	100	100	100	100
RNF219.C7.C8	,00000000011	,492/ ,00138	100	100	,0264 (18,1)	100	100	100	100
RNF219.C2.C9	,00000000011	,297/ ,00318	100	100	,0260 (3,70)	100	100	100	100
RNF219.C3.C9	,00000000011	,157/ ,00159	100	100	,0145 (5,05)	100	100	100	100
RNF219.C4.C9	,00000000011	,312/ ,00880	100	100	,0471 (1,45)	100	100	100	100
RNF219.C5.C9	,00000000011	,481/ ,00192	100	100	,0300 (13,1)	100	100	100	100
RNF219.C6.C9	,00000000011	,485/ ,00214	100	100	,0380 (8,51)	100	100	100	100
RNF219.C7.C9	,00000000011	,491/ ,00155	100	100	,0394 (9,17)	100	100	100	100
RNF219.C8.C9	,00000000011	,495/ ,00592	100	100	,0392 (9,06)	100	100	100	100
RNF219.C2.C10	,00000000011	,293/ ,00519	100	100	,0269 (3,47)	100	100	100	100
RNF219.C3.C10	,00000000011	,158/ ,00283	100	100	,0206 (2,50)	100	100	100	100
RNF219.C5.C10	,00000000011	,477/ ,00617	100	100	,0546 (3,69)	100	100	100	100
RNF219.C6.C10	,00000000011	,489/ ,00228	100	100	,0284 (14,7)	100	100	100	100
RNF219.C7.C10	,00000000011	,490/ ,00565	100	100	,0831 (2,07)	100	100	100	100
RNF219.C8.C10	,00000000011	,490/ ,00888	100	100	,0572 (4,36)	100	100	100	100
RNF219.C9.C10	,00000000011	,496/ ,00445	100	100	,0427 (8,79)	100	100	100	100
RNF219.C2.C11	,00000000011	,291/ ,00204	100	100	,0219 (5,90)	100	100	100	100
RNF219.C3.C11	,00000000011	,157/ ,000568	100	100	,0128 (6,52)	100	100	100	100
RNF219.C4.C11	,00000000011	,307/ ,00448	100	100	,0273 (4,39)	100	100	100	100
RNF219.C5.C11	,00000000011	,476/ ,00192	100	100	,0253 (16,1)	100	100	100	100
RNF219.C6.C11	,00000000011	,480/ ,000702	100	100	,0295 (12,6)	100	100	100	100
RNF219.C7.C11	,00000000011	,487/ ,00177	100	100	,0305 (13,5)	100	100	100	100
RNF219.C8.C11	,00000000011	,490/ ,00529	100	100	,0478 (6,85)	100	100	100	100

RNF219.C9.C11	,00000000011	,492/ ,00294	100	100	,0374 (8,99)	100	100	100	100
RNF219.C10.C11	,00000000011	,498/ ,00431	100	100	,0399 (7,90)	100	100	100	100
RNF219.C2.C12	,00000000011	,291/ ,00259	100	100	,0193 (6,71)	100	100	100	100
RNF219.C3.C12	,00000000011	,157/ ,00132	100	100	,0199 (3,30)	100	100	100	100
RNF219.C4.C12	,00000000011	,314/ ,00523	100	100	,0299 (3,22)	100	100	100	100
RNF219.C5.C12	,00000000011	,476/ ,00551	100	100	,0514 (3,89)	100	100	100	100
RNF219.C6.C12	,00000000011	,481/ ,00171	100	100	,0270 (14,1)	100	100	100	100
RNF219.C7.C12	,00000000011	,486/ ,000984	100	100	,0244 (19,8)	100	100	100	100
RNF219.C8.C12	,00000000011	,507/ ,00877	100	100	,0574 (4,08)	100	100	100	100
RNF219.C9.C12	,00000000011	,490/ ,00283	100	100	,0374 (8,99)	100	100	100	100
RNF219.C10.C12	,00000000011	,499/ ,00479	100	100	,0430 (6,82)	100	100	100	100
RNF219.C11.C12	,00000000011	,635/ ,00780	100	100	,150 (1,69)	100	100	100	100
RNF219.C3.C13	,00000000011	,157/ ,000780	100	100	,0141 (5,35)	100	100	100	100
RNF219.C4.C13	,00000000011	,290/ ,00341	100	100	,0299 (3,22)	100	100	100	100
RNF219.C5.C13	,00000000011	,459/ ,00493	100	100	,0765 (1,75)	100	100	100	100
RNF219.C6.C13	,00000000011	,465/ ,00160	100	100	,0295 (12,6)	100	100	100	100
RNF219.C7.C13	,00000000011	,472/ ,000787	100	100	,0295 (12,6)	100	100	100	100
RNF219.C8.C13	,00000000011	,473/ ,00363	100	100	,0399 (7,90)	100	100	100	100
RNF219.C9.C13	,00000000011	,476/ ,00158	100	100	,0284 (15,6)	100	100	100	100
RNF219.C10.C13	,00000000011	,483/ ,00280	100	100	,0379 (9,32)	100	100	100	100
RNF219.C11.C13	,00000000011	,483/ ,00183	100	100	,0382 (8,62)	100	100	100	100
RNF219.C12.C13	,00000000011	,485/ ,00186	100	100	,0305 (13,5)	100	100	100	100
RNF219.C2.C14	,00000000011	,277/ ,00181	100	100	,0144 (6,93)	100	100	100	100
RNF219.C3.C14	,00000000011	,157/ ,00109	100	100	,0125 (6,78)	100	100	100	100
RNF219.C4.C14	,00000000011	,294/ ,00219	100	100	,0230 (5,35)	100	100	100	100
RNF219.C5.C14	,00000000011	,462/ ,00323	100	100	,0514 (3,89)	100	100	100	100
RNF219.C6.C14	,00000000011	,466/ ,000986	100	100	,0233 (20,3)	100	100	100	100
RNF219.C7.C14	,00000000011	,470/ ,000899	100	100	,0339 (9,57)	100	100	100	100
RNF219.C8.C14	,00000000011	,478/ ,0342	100	100	,110 (1,12)	100	100	100	100
RNF219.C9.C14	,00000000011	,478/ ,00234	100	100	,0396 (8,56)	100	100	100	100
RNF219.C10.C14	,00000000011	,483/ ,00485	100	100	,0574 (4,08)	100	100	100	100
RNF219.C11.C14	,00000000011	,485/ ,00107	100	100	,0237 (22,5)	100	100	100	100
RNF219.C12.C14	,00000000011	,485/ ,00194	100	100	,0318 (12,4)	100	100	100	100
RNF219.C13.C14	,00000000011	,489/ ,000863	100	100	,0262 (19,6)	100	100	100	100
RNF219.C2.C15	,00000000011	,278/ ,00123	100	100	,0191 (5,68)	100	100	100	100
RNF219.C3.C15	,00000000011	,157/ ,00163	100	100	,0206 (2,50)	100	100	100	100
RNF219.C4.C15	,00000000011	,291/ ,00222	100	100	,0199 (7,13)	100	100	100	100
RNF219.C5.C15	,00000000011	,462/ ,00207	100	100	,0281 (14,0)	100	100	100	100

RNF219.C6.C15	,00000000011	,465/ ,00155	100	100	,0290 (12,2)	100	100	100	100
RNF219.C7.C15	,00000000011	,471/ ,00497	100	100	,0779 (1,82)	100	100	100	100
RNF219.C8.C15	,00000000011	,475/ ,00978	100	100	,0805 (1,94)	100	100	100	100
RNF219.C9.C15	,00000000011	,477/ ,000937	100	100	,0298 (16,0)	100	100	100	100
RNF219.C10.C15	,00000000011	,484/ ,00872	100	100	,0818 (2,00)	100	100	100	100
RNF219.C11.C15	,00000000011	,485/ ,00199	100	100	,0310 (13,9)	100	100	100	100
RNF219.C12.C15	,00000000011	,485/ ,00203	100	100	,0399 (7,90)	100	100	100	100
RNF219.C13.C15	,00000000011	,486/ ,00110	100	100	,0264 (18,1)	100	100	100	100
RNF219.C14.C15	,00000000011	,491/ ,000537	100	100	,0244 (24,0)	100	100	100	100
RNF219.C2.C16	,00000000011	,257/ ,00368	100	100	,0236 (2,77)	100	100	100	100
RNF219.C4.C16	,00000000011	,269/ ,00524	100	100	,0240 (2,85)	100	100	100	100
RNF219.C6.C16	,00000000011	,271/ ,00322	100	100	,0244 (3,50)	100	100	100	100
RNF219.C7.C16	,00000000011	,275/ ,00328	100	100	,0255 (3,21)	100	100	100	100
RNF219.C9.C16	,00000000011	,277/ ,00436	100	100	,0274 (2,78)	100	100	100	100
RNF219.C10.C16	,00000000011	,283/ ,00642	100	100	,0255 (3,21)	100	100	100	100
RNF219.C11.C16	,00000000011	,284/ ,00235	100	100	,0287 (2,53)	100	100	100	100
RNF219.C12.C16	,00000000011	,282/ ,00448	100	100	,0345 (1,75)	100	100	100	100
RNF219.C13.C16	,00000000011	,285/ ,00184	100	100	,0236 (3,75)	100	100	100	100
RNF219.C14.C16	,00000000011	,288/ ,00346	100	100	,0239 (3,66)	100	100	100	100
RNF219.C15.C16	,00000000011	,288/ ,00111	100	100	,0154 (8,82)	100	100	100	100
RNF219.C2.C17	,00000000011	,249/ ,00153	100	100	,0174 (3,06)	100	100	100	100
RNF219.C3.C17	,00000000011	,129/ ,000876	100	100	,0154 (3,43)	100	100	100	100
RNF219.C4.C17	,00000000011	,266/ ,00451	100	100	,0247 (3,02)	100	100	100	100
RNF219.C5.C17	,00000000011	,406/ ,0151	100	100	,0683 (1,40)	100	100	100	100
RNF219.C6.C17	,00000000011	,409/ ,00150	100	100	,0260 (9,11)	100	100	100	100
RNF219.C7.C17	,00000000011	,417/ ,00175	100	100	,0248 (11,9)	100	100	100	100
RNF219.C8.C17	,00000000011	,418/ ,00612	100	100	,0377 (5,15)	100	100	100	100
RNF219.C9.C17	,00000000011	,419/ ,00113	100	100	,0223 (16,5)	100	100	100	100
RNF219.C10.C17	,00000000011	,425/ ,00477	100	100	,0344 (7,61)	100	100	100	100
RNF219.C11.C17	,00000000011	,426/ ,00154	100	100	,0237 (16,1)	100	100	100	100
RNF219.C12.C17	,00000000011	,427/ ,00327	100	100	,0344 (7,61)	100	100	100	100
RNF219.C13.C17	,00000000011	,428/ ,000496	100	100	,0176 (29,9)	100	100	100	100
RNF219.C14.C17	,00000000011	,431/ ,00228	100	100	,0354 (7,41)	100	100	100	100
RNF219.C15.C17	,00000000011	,432/ ,00109	100	100	,0248 (16,7)	100	100	100	100
RNF219.C16.C17	,00000000011	,291/ ,00103	100	100	,0203 (5,06)	100	100	100	100
GSTP1.C10	,00000000023	8,23/ ,217	94,7	94,4	,498	94,6	94,7	94,4	91,5
GSTP1.T1.T9	,00000000023	90,2/ 99,4	94,7	94,4	98,5	94,6	94,7	94,4	90,5
GSTP1.T8.T10	,00000000023	91,6/ 99,6	94,7	94,4	99,3	94,6	94,7	94,4	90,6

GSTP1.T9.T14	,00000000023	90,6/ 99,5	94,7	94,4	98,8	94,6	94,7	94,4	92,7
GSTP1.T10.T17	,00000000023	91,3/ 99,6	94,7	94,4	99,3	94,6	94,7	94,4	90,5
GSTP1.T5.C7	,00000000023	,698/ ,176	94,7	94,4	,297	94,6	94,7	94,4	90,2
GSTP1.T7.C13	,00000000023	2,34/ ,273	94,7	94,4	,850	94,6	94,7	94,4	90,4
GSTP1.C13.T14	,00000000023	2,29/ ,272	94,7	94,4	,702	94,6	94,7	94,4	90,6
GSTP1.C13.T15	,00000000023	2,30/ ,257	94,7	94,4	,711	94,6	94,7	94,4	93,6
RNF219.C1.C4	,00000000023	,0938/ ,00458	94,7	94,4	,0297	94,6	94,7	94,4	90,2
RNF219.C2.C7	,00000000023	,298/ ,00492	94,7	94,4	,0593	94,6	94,7	94,4	92,1
GSTP1.C2	,00000000045	7,72/ ,321	94,7	88,9	,435	94,6	94,7	94,4	94,4
GSTP1.T2.T8	,00000000045	91,7/ 99,5	89,5	94,4	99,4	91,9	89,5	94,4	95,0
GSTP1.T2.T17	,00000000045	91,4/ 99,5	94,7	88,9	99,4	97,3	94,7	100	94,7
RNF219.T4.T6	,00000000045	97,0/ 98,5	94,7	88,9	98,0	91,9	89,5	94,4	94,4
RNF219.T6.T11	,00000000045	98,2/ 99,0	94,7	88,9	98,7	94,6	94,7	94,4	93,9
RNF219.T1.C6	,00000000045	1,09/ ,467	89,5	94,4	,637	89,2	89,5	88,9	94,3
RNF219.C6.C8	,00000000045	,487/ ,0335	89,5	94,4	,0898	94,6	94,7	94,4	95,5
GSTP1.T2.T10	,00000000079	91,4/ 99,5	84,2	94,4	99,3	94,6	94,7	94,4	94,0
GSTP1.T1.T14	,00000000079	90,2/ 99,1	84,2	94,4	98,6	91,9	89,5	94,4	95,5
GSTP1.T9.C13	,00000000079	2,31/ ,273	94,7	83,3	,851	94,6	94,7	94,4	91,8
GSTP1.T10.C13	,00000000079	2,31/ ,273	94,7	83,3	,851	94,6	94,7	94,4	93,9
GSTP1.C3.T7	,00000000079	,713/ ,236	84,2	94,4	,303	91,9	89,5	94,4	94,9
GSTP1.C6.T11	,00000000079	,575/ ,232	94,7	83,3	,323	94,6	94,7	94,4	94,7
RNF219.C6	,00000000079	1,10/ ,473	84,2	94,4	,639	91,9	89,5	94,4	94,3
RNF219.T6.T14	,00000000079	98,4/ 99,1	89,5	88,9	98,7	91,9	89,5	94,4	98,2
GSTP1.T10.T14	,00000000014	91,0/ 99,4	78,9	94,4	99,0	94,6	94,7	94,4	95,5
GSTP1.T1.C17	,00000000014	1,14/ ,134	94,7	77,8	,216	94,6	94,7	94,4	93,6
GSTP1.T13.C17	,00000000014	2,04/ ,135	94,7	77,8	,209	94,6	94,7	94,4	94,2
GSTP1.C4.T7	,00000000014	,576/ ,233	84,2	88,9	,323	91,9	94,7	88,9	98,2
RNF219.T4.T7	,00000000014	96,8/ 98,5	78,9	94,4	98,0	94,6	94,7	94,4	93,9
RNF219.C8.C16	,00000000014	,278/ ,00954	78,9	94,4	,0374	97,3	100	94,4	95,5
GSTP1.T12.C13	,00000000022	2,23/ ,270	94,7	72,2	,699	94,6	94,7	94,4	94,7
GSTP1.T6.C15	,00000000022	,643/ 5,91	94,7	72,2	1,71	91,9	89,5	94,4	95,0
RNF219.C2.C13	,00000000022	,276/ ,00672	73,7	94,4	,0281	94,6	94,7	94,4	95,5
GSTP1.C14	,00000000034	8,50/ ,420	68,4	94,4	,694	91,9	89,5	94,4	95,5
GSTP1.T8.T14	,00000000034	91,2/ 99,4	68,4	94,4	99,1	91,9	89,5	94,4	95,5
GSTP1.T14.T17	,00000000034	91,3/ 99,4	68,4	94,4	99,2	91,9	89,5	94,4	95,5
GSTP1.T3.C6	,00000000051	,550/ ,231	89,5	66,7	,302	91,9	89,5	94,4	94,2
GSTP1.C7.T11	,00000000051	,445/ ,184	84,2	72,2	,252	91,9	89,5	94,4	94,7
GSTP1.T2.T14	,00000000076	91,0/ 99,3	68,4	83,3	98,9	94,6	94,7	94,4	95,6

GSTP1.T11.C13	,0000000076	2,24/ ,272	94,7	55,6	,727	97,3	94,7	100	94,7
RNF219.T4.T11	,0000000076	96,9/ 98,4	73,7	83,3	97,9	89,2	89,5	88,9	96,2
RNF219.T7.T14	,0000000076	98,2/ 99,1	57,9	94,4	98,9	94,6	94,7	94,4	94,4
GSTP1.T1.T8	,0000000011	90,9/ 99,3	68,4	83,3	98,9	91,9	89,5	94,4	96,2
GSTP1.T1.T10	,0000000011	90,6/ 99,3	68,4	83,3	98,8	91,9	89,5	94,4	95,6
GSTP1.T1.T17	,0000000011	90,5/ 99,4	68,4	83,3	98,9	91,9	89,5	94,4	96,8
GSTP1.C10.T13	,0000000011	2,12/ ,216	63,2	83,3	,320	91,9	89,5	94,4	95,6
RNF219.T6.T7	,0000000011	98,1/ 99,1	52,6	94,4	98,8	91,9	89,5	94,4	93,9
RNF219.T3.C6	,0000000011	,944/ ,472	68,4	88,9	,595	86,5	84,2	88,9	97,4
RNF219.C13.T14	,0000000011	,251/ ,451	89,5	72,2	,310	86,5	89,5	83,3	96,8
GSTP1.C1	,0000000016	8,36/ ,483	68,4	83,3	,762	86,5	84,2	88,9	95,3
GSTP1.T4.C6	,0000000016	,544/ ,231	84,2	55,6	,285	91,9	89,5	94,4	94,2
KIAA1539.T3.C5	,0000000016	,205/ ,414	89,5	61,1	,256	89,2	89,5	88,9	95,0
KIAA1539.T4.C5	,0000000016	,205/ ,415	89,5	61,1	,256	89,2	89,5	88,9	95,0
RNF219.T10.C13	,0000000016	,256/ ,449	84,2	72,2	,303	86,5	89,5	83,3	96,2
RNF219.T11.C13	,0000000016	,256/ ,450	84,2	72,2	,305	86,5	89,5	83,3	96,5
RNF219.T12.C13	,0000000016	,254/ ,450	84,2	72,2	,305	86,5	89,5	83,3	96,8
RNF219.C13.T15	,0000000016	,253/ ,450	84,2	72,2	,303	86,5	89,5	83,3	96,5
GSTP1.T6.C7	,0000000022	,427/ ,184	57,9	83,3	,252	89,2	89,5	88,9	95,0
RNF219.T4.T14	,0000000022	97,1/ 98,5	73,7	72,2	98,0	89,2	89,5	88,9	95,9
RNF219.C6.T16	,0000000022	,829/ ,470	78,9	83,3	,555	83,8	78,9	88,9	95,6
RNF219.C4.C10	,0000000022	,311/ ,0261	47,4	88,9	,0651	94,6	94,7	94,4	95,9
GSTP1.T11.T12	,0000000031	86,3/ 98,2	73,7	77,8	97,0	83,8	73,7	94,4	92,4
GSTP1.T1.C10	,0000000031	1,09/ ,215	47,4	83,3	,319	94,6	94,7	94,4	94,2
GSTP1.T8.C17	,0000000031	1,51/ ,136	84,2	44,4	,176	89,2	84,2	94,4	93,6
KIAA1539.T2.C5	,0000000031	,207/ ,415	89,5	50,0	,256	89,2	89,5	88,9	95,0
RNF219.C7	,0000000031	1,31/ ,443	36,8	94,4	,658	97,3	100	94,4	94,4
RNF219.T7.T11	,0000000031	98,0/ 99,0	36,8	94,4	98,8	94,6	94,7	94,4	94,4
RNF219.T1.C7	,0000000031	1,31/ ,440	36,8	94,4	,656	97,3	100	94,4	94,4
RNF219.T9.C13	,0000000031	,263/ ,450	84,2	72,2	,310	86,5	89,5	83,3	95,9
RNF219.C2.T4	,0000000031	,347/ ,691	89,5	38,9	,486	94,6	94,7	94,4	94,4
RNF219.C2.T7	,0000000031	,350/ ,688	89,5	38,9	,490	94,6	94,7	94,4	94,2
RNF219.C2.T8	,0000000031	,350/ ,688	89,5	38,9	,490	94,6	94,7	94,4	94,4
RNF219.C5.C16	,0000000031	,271/ ,0181	57,9	88,9	,0370	89,2	89,5	88,9	95,6
GSTP1.T1.T2	,0000000042	91,2/ 99,2	68,4	66,7	98,9	86,5	84,2	88,9	94,2
GSTP1.T1.C8	,0000000042	,784/ ,194	68,4	77,8	,244	86,5	84,2	88,9	95,3
GSTP1.T4.C17	,0000000042	,776/ ,135	78,9	44,4	,175	91,9	89,5	94,4	92,7
RNF219.T7.T15	,0000000042	98,3/ 99,0	31,6	94,4	98,9	86,5	78,9	94,4	94,2

RNF219.T7.C13	,000000042	,268/ ,451	84,2	72,2	,310	81,1	84,2	77,8	95,0
RNF219.C2.T5	,000000042	,351/ ,692	89,5	33,3	,486	94,6	94,7	94,4	94,2
RNF219.C2.T6	,000000042	,351/ ,690	89,5	33,3	,490	94,6	94,7	94,4	94,4
RNF219.C2.T9	,000000042	,351/ ,690	89,5	33,3	,487	94,6	94,7	94,4	93,9
GSTP1.T5.T12	,000000057	86,4/ 98,3	73,7	72,2	97,5	83,8	73,7	94,4	90,9
GSTP1.T2.C17	,000000057	,909/ ,135	84,2	33,3	,185	94,6	94,7	94,4	93,6
RNF219.C4	,000000057	2,22/ 1,08	73,7	72,2	1,41	83,8	78,9	88,9	94,4
RNF219.T4.T12	,000000057	96,8/ 98,2	78,9	66,7	97,6	86,5	84,2	88,9	94,4
RNF219.T3.C4	,000000057	2,21/ 1,08	73,7	72,2	1,40	83,8	78,9	88,9	94,4
RNF219.T4.C6	,000000057	,786/ ,459	73,7	66,7	,549	83,8	78,9	88,9	94,4
RNF219.T2.C7	,000000057	1,02/ ,438	26,3	94,4	,603	94,6	94,7	94,4	94,4
RNF219.T3.C7	,000000057	1,16/ ,440	26,3	94,4	,623	97,3	100	94,4	94,4
RNF219.C2.T10	,000000057	,355/ ,688	84,2	33,3	,525	94,6	94,7	94,4	93,9
RNF219.C2.T11	,000000057	,357/ ,691	84,2	33,3	,533	94,6	94,7	94,4	93,9
RNF219.C2.T12	,000000057	,357/ ,690	84,2	33,3	,531	94,6	94,7	94,4	93,9
GSTP1.T3.T12	,000000077	86,4/ 98,2	73,7	72,2	97,4	83,8	73,7	94,4	91,2
RNF219.T2.C6	,000000077	,803/ ,470	78,9	61,1	,680	83,8	78,9	88,9	93,6
RNF219.T8.C13	,000000077	,266/ ,448	68,4	72,2	,321	86,5	89,5	83,3	94,7
RNF219.C7.T16	,000000077	1,04/ ,440	21,1	94,4	,605	94,6	94,7	94,4	94,4
GSTP1.T12.T13	,00000010	88,7/ 98,1	42,1	77,8	96,5	91,9	89,5	94,4	93,3
GSTP1.T2.C10	,00000010	,856/ ,215	42,1	77,8	,305	89,2	89,5	88,9	94,2
RNF219.C11	,00000010	1,17/ ,535	73,7	77,8	,637	81,1	78,9	83,3	93,9
RNF219.T3.T7	,00000010	98,4/ 99,2	47,4	83,3	99,0	89,2	89,5	88,9	92,7
RNF219.T6.T12	,00000010	98,1/ 98,8	63,2	66,7	98,6	89,2	84,2	94,4	91,5
RNF219.T7.T12	,00000010	97,9/ 98,8	36,8	88,9	98,7	86,5	84,2	88,9	93,0
RNF219.T6.C13	,00000010	,275/ ,450	68,4	72,2	,327	81,1	84,2	77,8	94,7
RNF219.C2.T13	,00000010	,372/ ,686	73,7	33,3	,540	91,9	89,5	94,4	93,9
RNF219.C2.T14	,00000010	,371/ ,691	73,7	33,3	,541	91,9	89,5	94,4	94,2
RNF219.C2.T15	,00000010	,370/ ,692	73,7	33,3	,541	91,9	89,5	94,4	93,9
GSTP1.T4.T12	,00000014	86,6/ 98,2	73,7	72,2	93,1	83,8	73,7	94,4	90,6
GSTP1.T3.C10	,00000014	,755/ ,215	42,1	77,8	,303	86,5	89,5	83,3	93,3
GSTP1.T8.C10	,00000014	1,47/ ,216	52,6	72,2	,311	83,8	73,7	94,4	94,2
GSTP1.T3.C17	,00000014	,773/ ,135	78,9	22,2	,175	91,9	89,5	94,4	93,0
GSTP1.C1.T13	,00000014	2,81/ ,481	68,4	72,2	,633	81,1	73,7	88,9	92,7
RNF219.C14	,00000014	,958/ ,422	73,7	77,8	,495	83,8	78,9	88,9	94,2
RNF219.T7.T17	,00000014	98,3/ 99,0	47,4	72,2	98,7	86,5	84,2	88,9	93,0
RNF219.T4.C7	,00000014	,990/ ,441	10,5	94,4	,601	91,9	89,5	94,4	94,4
RNF219.T9.C10	,00000014	,915/ 1,54	68,4	61,1	1,07	86,5	89,5	83,3	92,1

RNF219.T1.C14	,00000014	,955/ ,420	73,7	77,8	,492	83,8	78,9	88,9	93,6
RNF219.C7.T15	,00000014	,843/ ,438	10,5	94,4	,583	94,6	94,7	94,4	94,4
RNF219.C2.T16	,00000014	,391/ ,689	73,7	27,8	,539	94,6	94,7	94,4	93,6
RNF219.C2.T17	,00000014	,399/ ,691	73,7	27,8	,545	91,9	89,5	94,4	93,6
RNF219.C7.T17	,00000014	,898/ ,441	10,5	94,4	,587	94,6	94,7	94,4	94,4
GSTP1.C4.T6	,00000018	,462/ ,232	63,2	77,8	,287	86,5	84,2	88,9	94,2
RNF219.T3.T4	,00000018	97,3/ 98,5	57,9	77,8	98,4	83,8	84,2	83,3	93,9
RNF219.T7.T13	,00000018	98,4/ 99,1	31,6	66,7	98,9	86,5	78,9	94,4	92,4
RNF219.T5.C7	,00000018	,834/ ,441	5,26	94,4	,577	94,6	94,7	94,4	94,4
RNF219.T6.C7	,00000018	,829/ ,442	5,26	94,4	,575	89,2	84,2	94,4	94,4
RNF219.T1.C11	,00000018	1,16/ ,530	73,7	77,8	,637	81,1	78,9	83,3	93,6
RNF219.C7.T8	,00000018	,823/ ,441	5,26	94,4	,575	89,2	84,2	94,4	94,4
RNF219.C7.T9	,00000018	,824/ ,441	5,26	94,4	,575	89,2	84,2	94,4	94,4
RNF219.C7.T10	,00000018	,825/ ,437	5,26	94,4	,576	89,2	84,2	94,4	94,4
RNF219.C7.T11	,00000018	,828/ ,441	5,26	94,4	,575	91,9	89,5	94,4	94,4
RNF219.C7.T12	,00000018	,829/ ,442	5,26	94,4	,579	91,9	89,5	94,4	94,4
RNF219.C7.T13	,00000018	,843/ ,442	5,26	94,4	,583	94,6	94,7	94,4	94,4
RNF219.C7.T14	,00000018	,844/ ,442	5,26	94,4	,581	91,9	89,5	94,4	94,4
GSTP1.T4.C10	,00000024	,759/ ,215	42,1	77,8	,305	83,8	84,2	83,3	93,3
GSTP1.T5.C17	,00000024	,724/ ,136	63,2	33,3	,174	89,2	84,2	94,4	92,4
GSTP1.C3.T6	,00000024	,600/ ,245	84,2	22,2	,366	89,2	84,2	94,4	92,4
GSTP1.C1.T8	,00000024	2,19/ ,480	63,2	66,7	,624	81,1	73,7	88,9	92,4
GSTP1.C10.T17	,00000024	,547/ ,216	47,4	72,2	,303	81,1	68,4	94,4	90,9
RNF219.T5.T7	,00000024	97,9/ 98,8	73,7	72,2	98,3	81,1	78,9	83,3	93,6
RNF219.T5.C13	,00000024	,280/ ,446	68,4	72,2	,327	81,1	84,2	77,8	93,3
GSTP1.T5.C10	,00000031	,712/ ,216	42,1	72,2	,303	83,8	84,2	83,3	92,7
GSTP1.C8.T13	,00000031	1,92/ ,196	73,7	11,1	,244	91,9	89,5	94,4	93,3
GSTP1.C10.T16	,00000031	,536/ ,216	47,4	72,2	,303	78,4	73,7	83,3	90,9
RNF219.T6.C10	,00000031	,923/ 1,55	68,4	61,1	1,07	86,5	89,5	83,3	92,7
RNF219.T7.C10	,00000031	,921/ 1,54	63,2	61,1	1,07	86,5	89,5	83,3	91,8
RNF219.C10.T11	,00000031	,913/ 1,54	63,2	61,1	1,07	86,5	89,5	83,3	92,1
RNF219.C10.T12	,00000031	,912/ 1,54	63,2	61,1	1,07	86,5	89,5	83,3	92,1
GSTP1.T6.T12	,00000040	86,7/ 98,2	73,7	66,7	93,0	83,8	73,7	94,4	89,2
GSTP1.T7.T12	,00000040	86,7/ 98,2	73,7	66,7	92,9	83,8	73,7	94,4	89,5
RNF219.C10.T15	,00000040	,927/ 1,54	63,2	61,1	1,07	86,5	89,5	83,3	92,1
RNF219.C4.T17	,00000040	1,95/ 1,08	63,2	66,7	1,37	81,1	78,9	83,3	92,4
GSTP1.C1.T16	,00000051	1,37/ ,481	47,4	66,7	,614	81,1	73,7	88,9	91,5
GSTP1.C1.T17	,00000051	1,39/ ,480	47,4	66,7	,614	81,1	73,7	88,9	91,8

RNF219.T4.T13	,00000051	97,3/ 98,5	68,4	61,1	98,3	81,1	78,9	83,3	90,6
RNF219.T4.T15	,00000051	97,2/ 98,4	73,7	55,6	98,0	83,8	78,9	88,9	91,2
RNF219.T8.C10	,00000051	,921/ 1,54	63,2	61,1	1,07	86,5	89,5	83,3	91,8
RNF219.C4.T10	,00000051	1,91/ 1,05	63,2	72,2	1,34	78,4	73,7	83,3	91,8
RNF219.C4.T16	,00000051	1,95/ 1,08	63,2	66,7	1,37	81,1	78,9	83,3	92,1
GSTP1.T5.C6	,00000065	,467/ ,232	78,9	22,2	,303	81,1	78,9	83,3	91,5
GSTP1.C1.T15	,00000065	1,33/ ,468	47,4	61,1	,603	81,1	73,7	88,9	91,8
GSTP1.C10.T15	,00000065	,483/ ,210	42,1	72,2	,267	75,7	68,4	83,3	90,6
RNF219.T4.T9	,00000065	97,0/ 98,3	63,2	61,1	97,9	86,5	84,2	88,9	92,7
RNF219.T7.T9	,00000065	98,1/ 98,9	63,2	77,8	98,8	78,4	73,7	83,3	91,8
RNF219.T5.C10	,00000065	,934/ 1,54	63,2	61,1	1,07	86,5	89,5	83,3	91,8
RNF219.C10.T13	,00000065	,928/ 1,54	57,9	61,1	1,07	86,5	89,5	83,3	91,8
GSTP1.T6.C17	,00000082	,594/ ,135	68,4	11,1	,172	89,2	84,2	94,4	91,2
GSTP1.C1.T12	,00000082	1,24/ ,460	47,4	66,7	,610	81,1	73,7	88,9	90,9
RNF219.T11.T14	,00000082	98,4/ 99,0	52,6	77,8	99,0	81,1	78,9	83,3	91,2
RNF219.C10.T14	,00000082	,928/ 1,54	57,9	61,1	1,07	86,5	89,5	83,3	92,1
RNF219.C4.T15	,00000082	1,92/ 1,08	63,2	66,7	1,37	75,7	73,7	77,8	91,2
GSTP1.C1.T14	,0000010	1,32/ ,481	47,4	61,1	,625	81,1	73,7	88,9	90,6
KIAA1539.C5	,0000010	,234/ ,415	78,9	27,8	,256	83,8	84,2	83,3	90,6
KIAA1539.T1.C5	,0000010	,232/ ,414	78,9	33,3	,256	83,8	84,2	83,3	90,4
RNF219.T6.T15	,0000010	98,5/ 99,0	63,2	61,1	98,8	81,1	78,9	83,3	91,2
RNF219.C4.T6	,0000010	1,90/ 1,07	63,2	61,1	1,36	75,7	73,7	77,8	90,6
GSTP1.T5.C15	,0000013	,775/ 5,92	78,9	61,1	1,21	83,8	78,9	88,9	90,6
RNF219.T4.T17	,0000013	97,2/ 98,4	73,7	61,1	97,9	78,4	78,9	77,8	91,5
RNF219.C4.T9	,0000013	1,90/ 1,07	63,2	61,1	1,30	75,7	73,7	77,8	90,9
RNF219.C4.T11	,0000013	1,91/ 1,08	63,2	61,1	1,30	75,7	73,7	77,8	90,6
RNF219.C4.T13	,0000013	1,93/ 1,08	63,2	66,7	1,31	75,7	73,7	77,8	91,2
RNF219.C4.T14	,0000013	1,92/ 1,08	63,2	66,7	1,31	75,7	73,7	77,8	90,9
GSTP1.C10.T14	,0000016	,475/ ,216	42,1	72,2	,267	75,7	68,4	83,3	90,6
RNF219.T4.T5	,0000016	96,9/ 98,2	57,9	66,7	97,7	81,1	78,9	83,3	90,6
RNF219.C4.T5	,0000016	1,90/ 1,08	63,2	66,7	1,30	75,7	73,7	77,8	90,6
RNF219.C4.T12	,0000016	1,90/ 1,08	63,2	61,1	1,29	75,7	73,7	77,8	90,6
GSTP1.T6.C10	,0000020	,570/ ,216	36,8	72,2	,267	83,8	84,2	83,3	89,5
GSTP1.C1.T10	,0000020	1,21/ ,480	47,4	61,1	,583	78,4	68,4	88,9	88,6
RNF219.T1.T4	,0000020	97,0/ 98,0	68,4	38,9	97,5	81,1	78,9	83,3	89,5
RNF219.T3.T6	,0000020	98,6/ 99,1	73,7	27,8	98,9	86,5	84,2	88,9	88,3
RNF219.T2.C4	,0000020	1,92/ 1,08	63,2	61,1	1,30	75,7	73,7	77,8	90,9
RNF219.C4.T7	,0000020	1,89/ 1,08	63,2	61,1	1,29	75,7	73,7	77,8	90,4

RNF219.T5.T6	,0000025	98,1/ 98,8	47,4	77,8	98,7	75,7	73,7	77,8	89,8
RNF219.T1.C4	,0000025	2,12/ 1,08	68,4	55,6	1,64	81,1	73,7	88,9	90,1
GSTP1.C1.T9	,0000031	1,20/ ,482	47,4	61,1	,585	78,4	68,4	88,9	88,3
RNF219.T3.T14	,0000031	98,7/ 99,2	21,1	83,3	99,1	78,4	73,7	83,3	90,4
RNF219.T6.T17	,0000031	98,5/ 99,0	52,6	55,6	98,8	86,5	84,2	88,9	88,0
RNF219.C8.T12	,0000031	1,52/ 2,11	21,1	72,2	1,79	83,8	84,2	83,3	90,4
RNF219.C10.T17	,0000031	,986/ 1,54	47,4	61,1	1,12	83,8	89,5	77,8	89,5
RNF219.T6.T9	,0000038	98,3/ 98,9	42,1	66,7	98,8	81,1	84,2	77,8	87,1
RNF219.C4.T8	,0000038	1,88/ 1,07	57,9	61,1	1,43	75,7	73,7	77,8	89,5
RNF219.C14.T16	,0000038	,670/ ,419	47,4	72,2	,440	78,4	78,9	77,8	89,5
GSTP1.T4.C15	,0000047	,827/ 5,91	78,9	44,4	1,31	78,4	78,9	77,8	89,5
RNF219.T7.C8	,0000047	1,53/ 2,11	21,1	72,2	1,80	83,8	84,2	83,3	88,6
RNF219.T2.C11	,0000047	,877/ ,533	68,4	61,1	,717	75,7	73,7	77,8	88,9
RNF219.C8.T10	,0000047	1,53/ 2,11	21,1	72,2	1,80	83,8	84,2	83,3	88,6
RNF219.C11.T16	,0000047	,884/ ,533	68,4	66,7	,724	75,7	73,7	77,8	89,8
GSTP1.T3.C15	,0000058	,823/ 5,91	78,9	44,4	1,26	78,4	78,9	77,8	89,5
GSTP1.C1.T11	,0000058	1,18/ ,481	42,1	61,1	,544	78,4	68,4	88,9	87,1
RNF219.T1.T7	,0000058	97,8/ 98,7	36,8	50,0	98,2	86,5	84,2	88,9	89,2
RNF219.T6.T13	,0000058	98,6/ 99,1	78,9	22,2	98,9	83,8	78,9	88,9	88,3
RNF219.T12.T14	,0000058	98,2/ 98,8	57,9	61,1	98,6	78,4	84,2	72,2	89,2
RNF219.T5.C8	,0000058	1,54/ 2,11	21,1	72,2	1,80	83,8	84,2	83,3	88,0
RNF219.C8.T9	,0000058	1,53/ 2,11	21,1	72,2	1,80	83,8	84,2	83,3	88,6
RNF219.C8.T11	,0000058	1,53/ 2,11	15,8	72,2	1,80	83,8	84,2	83,3	88,6
RNF219.C8.T13	,0000058	1,55/ 2,11	15,8	72,2	1,80	83,8	84,2	83,3	88,0
GSTP1.C1.T7	,0000070	1,15/ ,477	42,1	61,1	,540	75,7	68,4	83,3	87,4
RNF219.T2.C14	,0000070	,681/ ,420	47,4	72,2	,432	75,7	73,7	77,8	88,9
RNF219.T3.C14	,0000070	,800/ ,421	47,4	72,2	,434	75,7	73,7	77,8	90,1
RNF219.T5.T11	,0000085	98,1/ 98,7	52,6	33,3	98,6	83,8	78,9	88,9	87,1
RNF219.C8.T14	,0000085	1,55/ 2,08	21,1	61,1	1,74	81,1	84,2	77,8	87,4
RNF219.T4.C14	,000010	,664/ ,420	47,4	72,2	,432	75,7	73,7	77,8	88,3
RNF219.T14.C15	,000010	,351/ ,525	73,7	5,56	,355	81,1	84,2	77,8	88,3
RNF219.C8.T15	,000010	1,55/ 2,11	15,8	66,7	1,80	83,8	84,2	83,3	87,7
RNF219.C6.T17	,000010	,691/ ,472	36,8	55,6	,541	81,1	78,9	83,3	88,0
GSTP1.T10.C17	,000012	,422/ ,135	52,6	5,56	,176	83,8	78,9	88,9	87,1
RNF219.T6.C8	,000012	1,54/ 2,08	15,8	61,1	1,73	81,1	84,2	77,8	87,7
RNF219.T4.C11	,000012	,861/ ,531	68,4	61,1	,716	75,7	73,7	77,8	88,6
GSTP1.T12.T16	,000015	89,6/ 98,2	36,8	61,1	97,4	70,3	57,9	83,3	86,8
GSTP1.C10.T12	,000015	,389/ ,213	31,6	72,2	,220	70,3	63,2	77,8	86,8

RNF219.T4.T16	,000015	97,2/ 98,2	52,6	50,0	97,7	75,7	73,7	77,8	88,0
GSTP1.C1.T6	,000018	1,13/ ,481	31,6	61,1	,544	75,7	68,4	83,3	86,5
RNF219.T13.C15	,000018	,356/ ,524	73,7	5,56	,354	78,4	84,2	72,2	87,1
RNF219.C13.T17	,000018	,311/ ,451	47,4	44,4	,402	75,7	78,9	72,2	87,7
GSTP1.T1.C15	,000021	1,24/ 5,91	78,9	44,4	1,49	64,9	78,9	50,0	88,3
GSTP1.T2.C15	,000021	1,01/ 5,91	78,9	44,4	1,31	73,0	78,9	66,7	88,3
GSTP1.T7.C17	,000021	,441/ ,135	47,4	5,56	,163	83,8	78,9	88,9	85,4
GSTP1.C1.T2	,000021	1,11/ ,481	31,6	55,6	,557	75,7	68,4	83,3	86,5
GSTP1.C1.T3	,000021	1,10/ ,479	31,6	55,6	,545	75,7	68,4	83,3	85,4
GSTP1.C1.T4	,000021	1,11/ ,481	31,6	61,1	,548	75,7	68,4	83,3	86,5
GSTP1.C3.T4	,000021	,444/ ,208	63,2	5,56	,258	81,1	73,7	88,9	86,5
RNF219.C12	,000021	1,29/ ,771	47,4	50,0	,866	81,1	73,7	88,9	85,1
RNF219.T1.T14	,000021	98,1/ 98,7	21,1	50,0	98,4	81,1	78,9	83,3	87,4
RNF219.T7.T16	,000021	98,1/ 98,8	36,8	55,6	98,7	73,0	63,2	83,3	85,1
RNF219.T3.C11	,000021	1,01/ ,535	63,2	61,1	,723	75,7	73,7	77,8	87,4
RNF219.C16.T17	,000021	,549/ ,769	57,9	16,7	,683	81,1	78,9	83,3	86,5
GSTP1.T13.C14	,000026	2,38/ ,418	42,1	61,1	,679	75,7	68,4	83,3	87,7
RNF219.T12.C15	,000026	,357/ ,523	73,7	5,56	,355	78,4	84,2	72,2	85,7
GSTP1.T9.T12	,000030	90,1/ 98,3	36,8	61,1	98,8	73,0	63,2	83,3	84,8
GSTP1.T8.C14	,000030	1,84/ ,418	42,1	61,1	,386	75,7	68,4	83,3	86,3
GSTP1.T9.C17	,000030	,432/ ,136	47,4	5,56	,174	81,1	73,7	88,9	86,0
GSTP1.C3.T5	,000030	,448/ ,200	57,9	5,56	,246	86,5	78,9	94,4	86,3
RNF219.T1.T11	,000030	97,9/ 98,6	68,4	38,9	98,1	75,7	73,7	77,8	84,5
RNF219.T9.C15	,000030	,365/ ,524	68,4	5,56	,379	78,4	84,2	72,2	85,1
RNF219.T11.C15	,000030	,357/ ,523	73,7	5,56	,353	81,1	84,2	77,8	85,1
RNF219.T15.C16	,000030	,553/ ,768	57,9	16,7	,685	81,1	78,9	83,3	86,3
GSTP1.T1.C14	,000036	1,47/ ,418	31,6	61,1	,403	75,7	68,4	83,3	86,0
GSTP1.C1.T5	,000036	1,09/ ,482	31,6	44,4	,546	75,7	68,4	83,3	85,1
RNF219.T1.C12	,000043	1,28/ ,767	42,1	38,9	,863	81,1	73,7	88,9	85,1
RNF219.T12.C16	,000043	,559/ ,765	57,9	16,7	,627	78,4	78,9	77,8	85,7
RNF219.T14.C16	,000043	,553/ ,766	57,9	16,7	,623	81,1	78,9	83,3	86,0
RNF219.C8.T17	,000043	1,60/ 2,11	10,5	55,6	1,77	81,1	84,2	77,8	85,1

Средние значения представлены как среднее в группе РПЖ/среднее в группе ЗД. Пороговое значение является оценкой порога, который может быть полезен для разделения сравниваемых групп. Чувствительность — это доля пациентов с РПЖ, правильно идентифицированных как таковые, а специфичность — это доля ЗД правильно идентифицированных как таковые. Сокращения: CV = перекрестная проверка, AUC = площадь под кривой ROC, CI = доверительный интервал.