



Экспрессия циркулирующих микроРНК в плазме у пациентов с акромегалией

© А.С. Луценко^{1*}, Ж.Е. Белая¹, Е.Г. Пржиялковская¹, А.Г. Никитин², Ф.А. Кошкин³, А.М. Лапшина¹, П.М. Хандаева¹, Г.А. Мельниченко¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Россия;

²Научно-исследовательский институт пульмонологии, Москва, Россия;

³Медико-генетический центр «Геномед», Москва, Россия.

Обоснование. МикроРНК – класс малых некодирующих молекул РНК, участвующих в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Они также обнаруживаются в крови в стабильных концентрациях, что делает их перспективными биомаркерами различных заболеваний.

Цель. Определить циркулирующие микроРНК, различно экспрессирующиеся у пациентов с акромегалией по сравнению со здоровым контролем.

Методы: проведено одноцентровое, одномоментное, выборочное исследование случай–контроль: оценка экспрессии микроРНК в плазме крови у пациентов с акромегалией по сравнению со здоровым контролем. Забор крови проводился натощак, в течение 30 мин после забора крови образцы цельной крови однократно центрифугировались при температуре +5 °С на скорости вращения 3000 об/мин в течение 20 мин. Далее образцы плазмы замораживались и хранились при температуре –80 °С. Выделение РНК и подготовка адаптеров и библиотек для секвенирования выполнялись согласно протоколам производителей. Анализ экспрессии произведен на секвенаторе NextSeq. Биоинформатический анализ проводился с помощью программного обеспечения atropos (удаление адаптеров), STAR (выравнивание), FastQC (контроль качества), seqbuster/seqcluster/miRge2 (аннотация микроРНК, поиск isomiR, поиск новых микроРНК, анализ экспрессии). Первичная конечная точка исследования – показатели экспрессии микроРНК плазмы у пациентов с акромегалией в сравнении со здоровым контролем.

Результаты. В исследование включены 12 пациентов с акромегалией – возраст 33,1 года [20; 47], ИМТ 29,3 кг/м² [24,0; 39,6], ИРФ-1 686,10 нг/мл [405,90; 1186,00] и 12 здоровых добровольцев – возраст 36,2 года [26; 44], ИМТ 26,7 кг/м² [19,5; 42,5], ИРФ-1 210,40 нг/мл [89,76; 281,90]; соотношение по полу в обеих группах – 4 мужчин, 8 женщин. Группы не различались по полу, возрасту и индексу массы тела ($p>0,05$). У пациентов с акромегалией выявлено снижение экспрессии четырех микроРНК в плазме крови: miR-4446-3p –1,317 ($p=0,001$), miR-215-5p –3,040 ($p=0,005$), miR-342-5p –1,875 ($p=0,013$) и miR-191-5p –0,549 ($p=0,039$). Однако, после поправки на множественность сравнений ни одно из различий не достигло статистической достоверности ($q > 0,1$).

Заключение. В ходе исследования методом высокопроизводительного секвенирования определены четыре микроРНК, экспрессия которых может отличаться у пациентов с активной акромегалией по сравнению со здоровым контролем. Для подтверждения полученных результатов необходима валидизация другим методом оценки экспрессии на большей выборке.

Ключевые слова: акромегалия, аденома гипофиза, МикроРНК, высокопроизводительное секвенирование, биомаркеры.

Expression of plasma microRNA in patients with acromegaly

© Alexander S. Lutsenko^{1*}, Zhanna E. Belaya¹, Elena G. Przhivalkovskaya¹, Alexey G. Nikitin², Philipp A. Koshkin³, Anastasia M. Lapshina¹, Patimat M. Khandaeva¹, Galina A. Mel'nichenko¹

¹Endocrinology Research Centre. Moscow, Russia;

²Pulmonology Scientific Research Institute under FMBA of Russia. Moscow, Russia;

³Center of medical genetics «Genomed». Moscow, Russia

BACKGROUND: microRNA is a class of small non-coding RNA molecules involved in posttranscriptional regulation of gene expression. MicroRNAs are detectable in blood in stable concentrations, which makes them promising biomarkers for various diseases.

AIM: to assess plasma microRNA expression in patients with active acromegaly compared with healthy controls.

MATERIAL AND METHODS: single-center, case-control study: assessment of plasma microRNA in patients with acromegaly compared with healthy controls. Fasting blood samples were drawn and centrifuged at +5°C temperature and 3000 rpm for 20 minutes, then aliquoted and frozen at –80°C until further analysis. MicroRNA extraction and library preparation was done according to manufacturer's instructions. Expression analysis was performed on NextSeq sequencer. Bioinformatic analysis using atropos (adapted deletion), STAR (aligning), FastQC (quality control), seqbuster/seqcluster/miRge2 (microRNA annotation, isomiR and new microRNA search, expression analysis). Primary endpoint of the study – differential expression of plasma microRNA in patients with acromegaly compared with healthy controls.

RESULTS: we included 12 patients with acromegaly – age 33.1 [20; 47], BMI 29.3 kg/m² [24.0; 39.6], IGF-1 686.1 ng/mL [405.9; 1186.0] and 12 healthy subjects – age 36.2 [26; 44], BMI 26.7 kg/m² [19.5; 42.5], IGF-1 210.4 ng/mL [89.76; 281.90]; gender ratio for both groups – 4 males, 8 females. The groups did not differ in gender ($p=0.666$), age ($p=0.551$) and BMI ($p=0.378$). We found decreased expression of four microRNAs in patients with acromegaly: miR-4446-3p –1.317 ($p=0.001$), miR-215-5p –3.040 ($p=0.005$), miR-342-5p –1.875 ($p=0.013$) and miR-191-5p –0.549 ($p=0.039$). However, none of these changes were statistically significant after adjustment for multiple comparisons ($q > 0.1$).

CONCLUSION: we found four microRNAs, which could potentially be downregulated in plasma of patients with acromegaly. The result need to be validated using different measurement method with larger sample size.

Keywords: acromegaly, pituitary adenoma, microRNA, next-generation sequencing, biomarkers.

Обоснование

Акромегалия (АМ) – эндокринное заболевание, причиной которого является избыточная продукция соматотропного гормона (СТГ). В подавляющем большинстве случаев источником гиперсекреции СТГ является аденома гипофиза. Распространенность АМ, по разным оценкам, составляет около 28–137 случаев на 1 млн населения [1]. Заболевание характеризуется длительным и в большинстве случаев малосимптомным течением, что способствует развитию осложнений со стороны органов и систем, росту аденомы гипофиза и увеличению смертности [2]. Методом первой линии в лечении АМ является оперативное вмешательство: трансфеноидальная аденомэктомия. Частота ремиссий после операции зависит от размера образования и от его анатомического расположения. В случае неэффективности хирургического лечения возможно проведение повторной операции или назначение медикаментозной терапии.

Существует несколько классов препаратов для медикаментозного лечения АМ: агонисты рецепторов дофамина, аналоги соматостатина, антагонисты рецептора СТГ [3]. К основным нерешенным проблемам медикаментозного лечения относятся высокая стоимость препаратов, а также сложность в определении категорий пациентов, которые будут чувствительны к такому лечению [4]. Данные проблемы диктуют необходимость поиска новых биомаркеров активности заболевания и предикторов ответа на консервативную терапию.

МикроРНК – класс малых некодирующих молекул РНК, участвующих в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. В настоящее время микроРНК активно изучаются, поскольку участвуют в патогенезе многих заболеваний. Кроме того, они определяются во всех биологических жидкостях человека в относительно стабильных концентрациях, в связи с чем их можно рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров эндокринных заболеваний [5].

Изменения экспрессии микроРНК в аденомах гипофиза – предмет интереса и активного изучения в научном сообществе. Со времен первой публикации А. Bottoni и соавт. [6], которые обнаружили снижение экспрессии miR-15a и miR-16-1 в аденомах по сравнению с нормальной тканью гипофиза, было проведено большое количество исследований, в которых соматотропиномы сравнивались с аденомами, секретирующими другие тропные гормоны, и с гормонально-неактивными аденомами. Также анализировались различия тканевой экспрессии микроРНК в зависимости от размера соматотропиномы, их агрессивности, гистотипа, экспрессии рецепторов соматостатина и чувствительности к лечению аналогами соматостати-

на. Стоит отметить, что, несмотря на полученные различия, согласованные изменения в различных публикациях достаточно редки [7]. В циркуляции микроРНК анализировались как маркеры костного метаболизма у пациентов с активной акромегалией [8] и на фоне ремиссии акромегалии [9]. В обоих исследованиях изучалось содержание предварительно выбранного списка микроРНК методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Также экспрессия микроРНК исследовалась в образцах костной ткани при акромегалии [10].

Существуют различные способы оценки экспрессии циркулирующих микроРНК. В настоящее время основными являются Northern blotting, полимеразная цепная реакция (ПЦР), количественная ПЦР с обратной транскрипцией (qRT-PCR), микроРНК-микрочипы и высокопроизводительное секвенирование (или next-generation sequencing, NGS). Для нашего исследования мы выбрали метод высокопроизводительного секвенирования. Достоинствами данного метода являются большая пропускная способность, низкие требования к количеству РНК для анализа, возможность получения корректных и качественных данных при более широком диапазоне определения микроРНК, а также обнаружения изомеров микроРНК (isomiR) и новых микроРНК. К недостаткам данного метода относятся высокая стоимость и необходимость многокомпонентного биоинформатического анализа получаемых данных. Кроме того, данные, полученные при помощи NGS, необходимо подтверждать дополнительным методом оценки экспрессии, в качестве которого наиболее часто используется qRT-PCR [8].

Цель

Определить циркулирующие микроРНК, различно экспрессирующиеся у пациентов с акромегалией по сравнению со здоровым контролем.

Методы

Дизайн исследования

Проведено одноцентровое, одномоментное, выборочное исследование случай-контроль.

Критерии соответствия

Критерии включения: активная стадия АМ, подтвержденная типичными клиническими проявлениями, повышением ИРФ-1 (согласно возрастному референсному диапазону) и отсутствием подавления секреции СТГ до концентрации <1,0 нг/мл в ходе перорального глюкозотолератного теста (ПГТТ).

Критерии исключения: прием аналогов соматостатина в анамнезе или на момент включения в исследова-

дования; лучевая терапия в анамнезе; акромегалия вследствие генетических синдромов.

В качестве контрольной группы выбраны здоровые добровольцы без клинических проявлений эндокринных заболеваний.

Условия проведения

Набор пациентов и забор биологического материала проводились на базе отделения нейроэндокринологии и остеопатий ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Выделение микроРНК и биоинформатический анализ результатов секвенирования проводились на базе ФГБУ «НИИпульмонологии» ФМБА России. Высокопроизводительное секвенирование проводилось на базе лаборатории «Геномед».

Продолжительность исследования

Набор пациентов и материала для биобанка проведен в период с декабря 2016 г. по декабрь 2017 г.

Описание медицинского вмешательства

Пациентам проводился забор цельной крови утром натощак. В течение 30 мин после забора крови образцы цельной крови однократно центрифугировались (лабораторная центрифуга Eppendorf 5810R с комплектом роторов (A-4-81, Ф-4-81-МТР/Flex, FA-45-30-11 и F-45-48-PCR) при температуре +5 °С на скорости вращения 3000 об/мин в течение 20 мин. Далее образцы плазмы раскапывались в криопровирки, замораживались и хранились при температуре –80 °С.

Основной исход исследования

В качестве конечных точек исследования фиксировали показатели экспрессии циркулирующих микроРНК.

Анализ в подгруппах

Сравнение показателей проведено между двумя основными группами — пациентов с акромегалией и здоровыми добровольцами. Разделение на подгруппы не проводилось.

Методы регистрации исходов

Выделение микроРНК из 200 мкл плазмы проводили с помощью miRNeasy Serum/Plasma Kit («Qiagen», Германия) согласно инструкции компании-производителя, на автоматической станции QIAcube («Qiagen», Германия). Для предотвращения деградации в выделенную РНК добавляли 1 ед. RiboLock RNase Inhibitor («Thermo Fisher Scientific», США) на 1 мкл раствора нуклеиновых кислот. Концентрацию суммарной РНК в водном растворе оценивали на спектрофотометре NanoVue Plus («GE Healthcare», Великобритания).

Полногеномный анализ экспрессии микроРНК был выполнен на высокопроизводительном секвенаторе

NextSeq с помощью TruSeq Small RNA Library Prep Kit. Биоинформатический анализ выполнялся с помощью программного обеспечения atropos (удаление адаптеров), STAR (выравнивание), FastQC (контроль качества), seqbuster/seqcluster/miRge2 (аннотация микроРНК, поиск isomiR, поиск новых микроРНК, анализ экспрессии).

Концентрацию ИФР-1 измеряли с помощью иммунохемилюминесценции (Liaison). Возрастные референсные диапазоны:

- 18–20 лет: 127–584 нг/мл;
- 21–25 лет: 116–358 нг/мл;
- 26–30 лет: 117–329 нг/мл;
- 31–35 лет: 115–307 нг/мл;
- 36–40 лет: 109–284 нг/мл;
- 41–45 лет: 101–267 нг/мл;
- 46–50 лет: 94–252 нг/мл;
- 51–55 лет: 87–238 нг/мл;
- 56–60 лет: 81–225 нг/мл;
- 61–65 лет: 75–212 нг/мл.

Этическая экспертиза

Исследование одобрено локальным этическим комитетом при ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России. Протокол заседания № 20 от 14 декабря 2016 г.

Статистический анализ

Размер выборки предварительно не рассчитывался ввиду редкости заболевания и пилотного характера исследования. Сравнение описательных параметров пациентов с АМ и группы контроля с использованием непарных двусторонних *t*-тестов. Для сравнения качественных параметров двух независимых групп использован точный критерий Фишера. Значение $p < 0,05$ считалось статистически достоверным. Вся аналитическая статистика выполнена с использованием базового пакета «stats».

Биоинформатический анализ данных секвенирования выполнен при помощи пакета DESeq2. Поправка на множественную проверку гипотез выполнена методом Бенджамини–Хохберга [9].

Результаты

Объекты (участники) исследования

В исследование включены 12 пациентов с АМ и 12 здоровых добровольцев. Исходные характеристики участников исследования представлены в **табл. 1**.

Основные результаты исследования

По результатам биоинформатического анализа выявлены четыре микроРНК, экспрессия которых снижена в плазме крови у пациентов с АМ по сравнению со здоровыми добровольцами: miR-4446-3p, miR-215-5p, miR-342-5p и miR-191-5p (**табл. 2**). Од-

Таблица 1. Сравнительная характеристика участников исследования

Параметры	Акромегалия (n=12)	Контроль (n=12)	p
Возраст	33,1 [20; 47]	36,2 [26; 44]	0,551
Пол (м/ж)	4/8	4/8	0,666
ИМТ, кг/м ²	29,3 [24,0; 39,6]	26,7 [19,5; 42,5]	0,378
ИФР-1, нг/мл	686,10 [405,90; 1186,00]	210,40 [89,76; 281,90]	<0,01

Таблица 2. МикроРНК, различно экспрессирующиеся в плазме крови пациентов с акромегалией по сравнению со здоровыми добровольцами

микроРНК	Изменение экспрессии	p	q*
miR-4446-3p	-1,317	0,001	0,372
miR-215-5p	-3,040	0,005	0,800
miR-342-5p	-1,875	0,013	0,989
miR-191-5p	-0,549	0,039	0,989

Примечание.* – поправка на множественную проверку гипотез методом Бенджамини–Хохберга.

нако после поправки на множественную проверку гипотез экспрессия представленных микроРНК не достигла достоверных различий.

Нежелательные явления

В ходе исследования нежелательные явления не фиксировались.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

В представленном исследовании впервые проведен анализ экспрессии циркулирующих микроРНК плазмы крови у пациентов с АМ методом высокопроизводительного секвенирования. Полученные данные позволяют установить гипотезу о том, что miR-4446-3p, miR-215-5p и miR-342-5p, miR-191-5p различно экспрессируются у пациентов с АМ по сравнению со здоровым контролем.

Обсуждение основного результата исследования

Настоящее исследование является первой работой по оценке профиля экспрессии микроРНК в периферической крови пациентов с активной АМ методом высокопроизводительного секвенирования. Ранее методом qRT-PCR был проведен анализ экспрессии микроРНК, которые предположительно участвуют в регуляции костного метаболизма [8–10]. Так, в исследовании Т.А. Гребенниковой и соавт. [10], было обнаружено снижение экспрессии miR-100-5p, miR-550a-5p, miR-7b-5p, miR-96-5p в плазме крови у пациентов с активной АМ по сравнению со здоровым контролем. Однако авторам этого исследования не удалось выявить связей между экспрессией микроРНК в костной ткани и плазме у пациентов с АМ [8,10]. Эти микроРНК не отличались у пациен-

тов с АМ и здорового контроля и в нашем исследовании, возможно, из-за снижения чувствительности при анализе большого количества микроРНК. E. Vallasi и соавт. [11] изучали экспрессию циркулирующих микроРНК сыворотки, предположительно участвующих в метаболизме кости, у пациентов с компенсированной АМ по сравнению со здоровым контролем. Обнаружены различия в экспрессии miR-103a-3p, miR-191-5p, miR-660-5p, при этом изменения в экспрессии коррелировали с показателями минерально-костного обмена и МПК, что позволяет предположить участие микроРНК в патогенезе костных нарушений и возможность их использования в качестве биомаркеров. Интересно, что miR-191-5p была понижена в плазме пациентов с активной АМ в нашем исследовании, но стала повышенной у пациентов с ремиссией АМ [9]. Возможно, изменения в экспрессии данной микроРНК отражают активность заболевания. Мы не обнаружили различий по miR-103a-3p и miR-660-5p.

На момент подачи рукописи нам не удалось найти данных по измененной экспрессии miR-4446-3p, miR-215-5p, miR-342-5p и miR-191-5p в аденомах гипофиза [12]. Вместе с тем, согласно данным литературы [13], экспрессия miR-4446-3p повышена в сыворотке при раке молочной железы. Кроме того, В. Kim и соавт. [14] отметили повышение экспрессии miR-4446-3p после компрессии клеток из линии агрессивного низкодифференцированного рака молочной железы – MDA-MB-231. В исследовании J. Wang и соавт. [15] отмечено снижение экспрессии miR-4446-3p в сыворотке у пациентов с резистентной к лечению эпилепсией по сравнению с пациентами, чувствительными к терапии. Экспрессия miR-215-5p повышена в сыворотке пациентов с остеосаркомой по сравнению со здоровым контролем [16]. По данным Vychytilova-Faltejskova P. и соавт. [17], экспрессия miR-215-5p повышена в тканях опухоли при колоректальном раке, а ее экспериментально подтвержденными мишенями являются различные звенья EGFR – канонического сигнального пути патогенеза колоректального рака.

Экспрессия miR-342-5p повышена в периферических мононуклеарных клетках у пациентов с ишемической болезнью сердца по сравнению со здоровым контролем, кроме того, отмечена прямая корреляция с воспалительными цитокинами. Авторы делают вывод о регулирующей роли miR-342-5p в процес-

Таблица 3. Некоторые мишени микроРНК, представленные в базе TargetScan

МикроРНК	Общее количество генов-мишеней	Ген-мишень	Cumulative weighted context++ score	Описание
miR-4446-3p	4490	<i>SSTR1</i>	-0,25	Рецепторы соматостатина 1–3 подтипов
		<i>SSTR3</i>	-0,10	
		<i>SSTR5</i>	-0,02	
		<i>NOTCH1</i>	-0,01	
		<i>NOTCH2</i>	-0,45	
miR-215-5p	218	<i>PRKARIA</i>	-0,29	Ген регуляторной субъединицы R1A протеинкиназы А – ключевой компонент сигнального пути цАМФ. Мутация в гене ассоциирована с развитием Карни-Комплекса
miR-342-5p	4139	<i>HMGA2</i>	-0,14	Представитель семейства негистоновых хромосомальных белков группы высокой мобильности. Экспрессия повышена в аденомах гипофиза.
		<i>NOTCH3</i>	-0,03	
		<i>SSTR5</i>	-0,11	
miR-191-5p	63	<i>SOX4</i>	-0,37	Представитель семейства транскрипционных факторов, играющих ключевую роль в эмбриональном развитии гипофиза

сах атеросклероза и секреции цитокинов, хотя необходимо больше исследований в данном направлении [18]. Также экспериментально подтверждено, что miR-342-5p является многофункциональным репрессором ангиогенеза в эндотелиоцитах [19]. Согласно исследованию на клеточных линиях колоректального рака SW480 и SW620, мишенью miR-342-5p в этих клетках является мРНК гена N-acetyltransferase 10 protein (*NAA10*). Подавляя его, miR-342-5p осуществляет репрессию туморогенеза. Нарушения регуляции данного гена ассоциированы с различными онкологическими заболеваниями у человека, включая колоректальный рак. Данные результаты были подтверждены исследованиями в тканях при колоректальном раке у человека: обнаружена обратная корреляция между экспрессией miR-342-5p и *NAA10* [20].

По данным Rosignolo F. и соавт., экспрессия miR-191-5p повышена в сыворотке у пациентов с папиллярным раком щитовидной железы по сравнению со здоровым контролем [21]. MiR-191-5p является одним из компонентов панели из семи микроРНК плазмы, которые позволяют отличить пациентов с болезнью Альцгеймера от здоровых с точностью более 95%: между группами экспрессия каждой микроРНК панели отличается более чем в 2 раза [22]. Повышение экспрессии miR-191-5p в клеточных линиях рака молочной железы MCF7 и ZR-75 приводит к ингибированию апоптоза, прямой мишенью miR-191-5p является *SOX4*. [23] Экспрессия miR-191-5p повышена в сыворотке при рассеянном склерозе по сравнению со здоровыми добровольцами [24]. Также экспрессия данной микроРНК повышена в периферических мононуклеарных клетках при синдроме

дефицита внимания по сравнению со здоровыми добровольцами [25].

Прямое действие микроРНК на мишени сложно определить, так как каждая микроРНК может больше количество мишеней. Существуют биоинформатические базы данных, в которых содержится информация о предполагаемых взаимодействиях между микроРНК и мРНК-мишенями на основе их комплементарности – TargetScan [26], miRanda [27], DIANA-microT [28], PicTAR [29] и др. Мы провели поиск взаимодействий выявленных микроРНК при помощи TargetScan. Результаты оцениваются согласно индексу cumulative weighted context++ score, отражающему вклад 14 показателей вероятности связывания – значения в диапазоне от 1 до -3. Чем меньше значение – тем больше вероятность взаимодействия [30].

Результаты поиска в базе TargetScan представлены в табл. 3. Семейство транскрипционных факторов *SOX* – белки, играющие ключевую роль в развитии органов и систем человека [31], в том числе в эмбриональном развитии гипофиза [32]. Сигнальный путь NOTCH регулирует процессы эмбриогенеза и поддержания гомеостаза тканей и органов человека, его влияние на внутриклеточные сигнальные пути определяет судьбу клетки [33]. Описаны различия в экспрессии компонентов данного сигнального пути в аденомах гипофиза различных гистотипов [34]. *PRKARIA* является геном-супрессором опухолевого роста, кодирующим 1-α регуляторную субъединицу цАМФ зависимой протеинкиназы А. Существует взаимосвязь между мутациями в гене *PRKARIA* и возникновением Карни-комплекса – заболеванием, характеризующимся возникновением миксом сердца,

кожи и других тканей, а также новообразований гипофиза, щитовидной железы, надпочечников и других эндокринных органов. Мутация *PRKARIA* обнаруживается приблизительно у 70% пациентов с Карни-комплексом [35]. Уровень экспрессии рецепторов соматостатина 2-го и 5-го подтипов является предиктором чувствительности к аналогам соматостатина первого поколения [36].

Указанные взаимодействия необходимо подтвердить экспериментально, поскольку для того, чтобы взаимодействие между микроРНК и мишенью состоялось, необходимо чтобы они находились в одной клетке в одно и то же время. Кроме того, уровень экспрессии должен быть достаточным для репрессии трансляции [37]. По данным литературы, из представленных взаимодействий экспериментально подтверждались miR-215-5p и *PRKARIA* [38], а также miR-4446-3p и *NOTCH2* [39].

Исходя из анализа данных литературы, одна и та же микроРНК может участвовать в различных физиологических и патологических процессах. Определение одних и тех же микроРНК в качестве биомаркеров различных заболеваний поднимает вопрос специфичности данных изменений. Представляется перспективным исследование нескольких микроРНК в качестве диагностической панели, что позволит повысить специфичность метода.

Ограничения исследования

Ограничениями представленного исследования являются малый размер выборки и отсутствие валидации полученных результатов другим методом оценки экспрессии циркулирующих микроРНК. Исследование большого количества микроРНК методом высокопроизводительного секвенирования зачастую не позволяет достичь статистически достоверного результата с применением поправки на множественные сравнения, поэтому результат необходимо подтверждать проведением других методов анализа, в частности, qRT-PCR, при этом в литературе встречаются публикации, в которых NGS использовался как единственный метод оценки экспрессии [40–42]. По результатам представленного исследования установлена гипотеза о различиях в экспрессии циркулирующих микроРНК между представленными группами.

Заключение

В представленном исследовании впервые использован метод высокопроизводительного секвенирования для оценки экспрессии микроРНК плазмы у пациентов с АМ. Выявлено снижение экспрессии miR-4446-3p, miR-215-5p и miR-342-5p, miR-191-5p – микроРНК, которые связаны с патогенезом различных онкологических заболеваний: колоректального рака, рака молочной железы и папиллярного рака щитовидной железы, что представляет интерес для дальнейших исследований, учитывая повышенный риск онкологических заболеваний при АМ.

Нам не удалось подтвердить полученные ранее данные по измененной экспрессии микроРНК, участвующих в минерально-костном обмене, что может быть связано с различиями в исходном материале (сыворотка или плазма), с малым размером выборки в представленном исследовании или иными факторами. Учитывая отсутствие достоверности по вышеуказанным изменениям при применении поправки на множественность сравнений, необходимо проведение дальнейших исследований на большей выборке с использованием валидирующего метода. При выявлении достоверных различий перспектива научного применения заключается в изучении прогностической ценности циркулирующих микроРНК в отношении активности АМ, послеоперационного прогноза и чувствительности к консервативному лечению.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00398).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов: Ж.Е. Белая, Г.А. Мельниченко, А.С. Луценко – концепция и научное руководство исследования; А.С. Луценко, П.М. Хандаева – сбор материала; А.Г. Никитин, Ф.А. Кошкин – выделение РНК и анализ экспрессии микроРНК; А.Г. Никитин, А.С. Луценко – статистическая обработка данных; А.С. Луценко – написание основного текста рукописи; Ж.Е. Белая, Е.Г. Пржиялковская, А.Г. Никитин, Г.А. Мельниченко, А.М. Лапшина – редактирование текста рукописи. Все авторы внесли значимый вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

ЛИТЕРАТУРА | REFERENCES

1. Lavrentaki A, Paluzzi A, Wass JA, Karavitaki N. Epidemiology of acromegaly: review of population studies. *Pituitary*. 2017;20(1):4-9. doi: <https://doi.org/10.1007/s11102-016-0754-x>
2. Pivonello R, Auriemma RS, Grasso LF, et al. Complications of acromegaly: cardiovascular, respiratory and metabolic comorbidities. *Pituitary*. 2017;20(1):46-62. doi: <https://doi.org/10.1007/s11102-017-0797-7>
3. Melmed S, Bronstein MD, Chanson P, et al. A consensus statement on acromegaly therapeutic outcomes. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(9):552-561. doi: <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0058-5>.
4. Sherlock M, Woods C, Sheppard MC. Medical therapy in acromegaly. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(5):291300. doi: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.42>

5. Sohel MH. Extracellular/circulating microRNAs: release mechanisms, functions and challenges. *Achiev Life Sci.* 2016;10(2): 175-186. doi: <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.11.007>
6. Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, et al. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol.* 2005; 204(1):280-285. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.20282>
7. Луценко А.С., Белая Ж.Е., Пржиялковская Е.Г., Мельниченко Г.А. МикроРНК и их значение в патогенезе СТГ-продуцирующих аденом гипофиза // *Вестник РАМН.* — 2017. — Т.72. — №4. — С. 290–298. [Lutsenko AS, Belaya ZE, Przhivalkovskaya EG, Mel'nichenko GA. MicroRNA: role in GH-secreting pituitary adenoma pathogenesis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2017;72(4):290-298. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.15690/vramn856>
8. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012;13(5):358-369. doi: <https://doi.org/10.1038/nrg3198>
9. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. doi: <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
10. Гребенникова Т.А., Белая Ж.Е., Никитин А.Г., и др. Экспрессия микроРНК, регулирующих костное ремоделирование, в плазме крови у пациентов с акромегалией // *Ожирение и метаболизм.* — 2017 — Т.14 — №3. — С. 32-37. [Grebennikova TA, Belaya ZhE, Nikitin AG, et al. Expression of microRNA related to bone remodeling regulation in plasma in patients with acromegaly. *Obesity and metabolism.* 2017;14(3):32-37. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.14341/omet2017332-37>
11. Valassi E, Garcia-Giralt N, Malouf J, et al. Circulating miR-103a-3p and miR-660-5p are associated with bone parameters in patients with controlled acromegaly. *Endocr Connect.* 2019;8(1):39-49. doi: <https://doi.org/10.1530/EC-18-0482>
12. Feng Y, Mao Z, Wang X, et al. MicroRNAs and target genes in pituitary adenomas. *Horm Metab Res.* 2018;50(3):179-192. doi: <https://doi.org/10.1055/s-0043-123763>
13. Farina NH, Ramsey JE, Cuke ME, et al. Development of a predictive miRNA signature for breast cancer risk among high-risk women. *Oncotarget.* 2017;8(68):112170-112183. doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22750>
14. Kim BG, Kang S, Han HH, et al. Transcriptome-wide analysis of compression-induced microRNA expression alteration in breast cancer for mining therapeutic targets. *Oncotarget.* 2016;7(19): 27468-27478. doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8322>
15. Wang J, Tan L, Tan L, et al. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers for drug-resistant epilepsy. *Sci Rep.* 2015;5:10201. doi: <https://doi.org/10.1038/srep10201>
16. Monderde-Cruz L, Ramírez-Salazar EG, Rico-Martínez G, et al. Circulating miR-215-5p and miR-642a-5p as potential biomarker for diagnosis of osteosarcoma in Mexican population. *Hum Cell.* 2018;31(4):292-299. doi: <https://doi.org/10.1007/s13577-018-0214-1>
17. Vyshytilova-Falteskova P, Merhautova J, Machackova T, et al. MiR-215-5p is a tumor suppressor in colorectal cancer targeting EGFR ligand epiregulin and its transcriptional inducer HOXB9. *Oncogenesis.* 2017;6(11):399. doi: <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0006-6>
18. Ahmadi R, Heidarian E, Fadaei R, et al. miR-342-5p expression levels in coronary artery disease patients and its association with inflammatory cytokines. *Clin Lab.* 2018;64(4):603-609. doi: <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2017.171208>.
19. Yan X, Cao J, Liang L, et al. miR-342-5p is a notch downstream molecule and regulates multiple angiogenic pathways including notch, vascular endothelial growth factor and transforming growth factor β signaling. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(2). pii: e003042. doi: <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.003042>
20. Yang H, Li Q, Niu J, et al. MicroRNA-342-5p and miR-608 inhibit colon cancer tumorigenesis by targeting NAA10. *Oncotarget.* 2016;7(3):2709-2720. doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6458>
21. Rosignolo F, Sponziello M, Giacomelli L, et al. Identification of thyroid-associated serum microRNA profiles and their potential use in thyroid cancer follow-up. *J Endocr Soc.* 2017;1(1):3-13. doi: <https://doi.org/10.1210/js.2016-1032>
22. Kumar P, Dezzo Z, MacKenzie C, et al. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2013;8(7):e69807. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069807>
23. Sharma S, Nagpal N, Ghosh PC, Kulshreshtha R. P53-miR-191-SOX4 regulatory loop affects apoptosis in breast cancer. *RNA.* 2017;23(8):1237-1246. doi: <https://doi.org/10.1261/rna.060657.117>
24. Vistbakka J, Sumelahti ML, Lehtimäki T, et al. Evaluation of serum miR-191-5p, miR-24-3p, miR-128-3p, and miR-376c-3 in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand.* 2018;138(2):130-136. doi: <https://doi.org/10.1111/ane.12921>
25. Sánchez-Mora C, Soler Artigas M, Garcia-Martínez I, et al. Epigenetic signature for attention-deficit/hyperactivity disorder: identification of miR-26b-5p, miR-185-5p, and miR-191-5p as potential biomarkers in peripheral blood mononuclear cells. *Neuropsychopharmacology.* 2019;44(5):890-897. doi: <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0297-0>
26. Nam JW, Rissland OS, Koppstein D, et al. Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting. *Mol Cell.* 2014;53(6):1031-1043. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.013>
27. Betel D, Koppal A, Agius P, et al. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* 2010;11(8):R90. doi: <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-8-r90>.
28. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, et al. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics.* 2012;28(6): 771-776. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts043>
29. Krek A, Grün D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005;37(5):495-500. doi: <https://doi.org/10.1038/ng1536>
30. Riffo-Campos Á, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose? *Int J Mol Sci.* 2016;17(12). pii: E1987. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms17121987>
31. Alatzoglou KS, Kelberman D, Dattani MT. The role of SOX proteins in normal pituitary development. *J Endocrinol.* 2009;200(3): 245-258. doi: <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0447>
32. Ma Y, Qi X, Du J, et al. Identification of candidate genes for human pituitary development by EST analysis. *BMC Genomics.* 2009; 10(1):109. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-109>
33. Новикова М.В., Рыбко В.А., Хромова Н.В., и др. Роль белков Notch в процессах канцерогенеза // *Успехи молекулярной онкологии.* — 2015. — Т.2. — №3. — С. 30–42. [Novikova MV, Rybko VA, Khromova NV, et al. The role of Notch pathway in carcinogenesis. *Advances in molecular oncology.* 2015;2(3):30-42. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2015-2-3-30-42>
34. Perrone S, Zubeldia-Brenner L, Gazza E, et al. Notch system is differentially expressed and activated in pituitary adenomas of distinct histotype, tumor cell lines and normal pituitaries. *Oncotarget.* 2017;8(34):57072–57088. doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19046>
35. Liu Q, Tong D, Liu G, et al. Carney complex with PRKAR1A gene mutation. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(50):e8999. doi: <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000008999>
36. Ezzat S, Caspar-Bell GM, Chik CL, et al. Predictive markers for postsurgical medical management of acromegaly: a system-

- atic review and consensus treatment guideline. *Endocr Pract.* 2019;25(4):379-393. doi: <https://doi.org/10.4158/EP-2018-0500>
37. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife.* 2015;4. doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
38. Kameswaran V, Bramswig NC, McKenna LB, et al. Epigenetic regulation of the DLK1-MEG3 microRNA cluster in human type 2 diabetic islets. *Cell Metab.* 2014;19(1):135-145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.016>
39. Gottwein E, Corcoran DL, Mukherjee N, et al. Viral microRNA targetome of KSHV-infected primary effusion lymphoma cell lines. *Cell Host Microbe.* 2011;10(5):515-526. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.012>
40. Yang Q, Lu J, Wang S, et al. Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women. *Clin Chim Acta.* 2011;412(23-24):2167-2173. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.029>
41. Suzuki M, Konno S, Makita H, et al. Altered circulating exosomal RNA profiles detected by next-generation sequencing in patients with severe asthma. *Eur Res J.* 2016;48:PA3410. doi: <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2016.PA3410>
42. Van Laar R, Leigh K, Zielinski A, et al. Small RNA next generation sequencing (NGS) of CD138+ plasma cells from multiple myeloma patients and comparison to the 70-gene mRNA-based prognostic risk score. *Blood.* 2016;128(22):2089. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.v128.22.2089.2089>

Рукопись получена: 01.07.2019

Одобрена к публикации: 18.09.2019

Опубликована online: 14.11.2019.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

*Луценко Александр Сергеевич [Alexander S. Lutsenko, MD]; адрес: Россия, 117036, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11 [address: 11 Dmitriya Ulyanova street, 117036 Moscow, Russia]; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9314-7831>; eLibrary SPIN: 4037-1030; e-mail: some91@mail.ru
Белая Жанна Евгеньевна, д.м.н. [Zhanna E. Belaya, MD, PhD]; <https://orcid.org/0000-0002-6674-6441>; eLibrary SPIN: 4746-7173; e-mail: jannabelaya@gmail.com

Пржиялковская Елена Георгиевна, к.м.н. [Elena G. Przhialkovskaya, MD, PhD] ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9119-2447>; eLibrary SPIN: 9309-3256; e-mail: przhialkovskaya.elena@gmail.com

Никитин Алексей Георгиевич, к.б.н. [Alexey G. Nikitin, PhD]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9762-3383>; eLibrary SPIN: 3367-0680; e-mail: avialn@gmail.com

Кошкин Филипп Александрович, к.б.н. [Philipp A. Koshkin, PhD]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9512-9277>; eLibrary SPIN: 5627-2121; e-mail: philipkoshkin@gmail.com

Лапшина Анастасия Михайловна, к.м.н. [Anastasia M. Lapshina, MD, PhD]; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4353-6705>; eLibrary SPIN: 1582-5033; e-mail: nottoforget@yandex.ru

Хандаева Патимат Магомедовна [Patimat M. Khandaeva, MD]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6993-5096>; eLibrary SPIN: 6950-5200; e-mail: pati_khandaeva@mail.ru

Мельниченко Галина Афанасьевна, д.м.н., профессор, академик РАН [Galina A. Melnichenko, MD, PhD, professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5634-7877>; eLibrary SPIN: 8615-0038; email: teofrast2000@mail.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Луценко А.С., Белая Ж.Е., Пржиялковская Е.Г., Никитин А.Г., Кошкин Ф.А., Лапшина А.М., Хандаева П.М., Мельниченко Г.А. Экспрессия циркулирующих микроРНК в плазме у пациентов с акромегалией. // *Проблемы эндокринологии.* – 2019. – Т. 66. – №5. – С. 311-318. doi: <https://doi.org/10.14341/probl10263>

TO CITE THIS ARTICLE:

Lutsenko A.S., Belaya Zh.E., Przhialkovskaya E.G., Nikitin A.G., Koshkin F.A., Lapshina A.M., Khandaeva P.M., Mel'nichenko G.A. Expression of plasma microRNA in patients with acromegaly. *Problems of Endocrinology.* 2019;65(5):311-318. doi: <https://doi.org/10.14341/probl10263>