

На правах рукописи

КИСЕЛЕВА
Елена Владимировна

РОЛЬ МИКРОРНК-21
В ДИАГНОСТИКЕ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Захаренко Александр Анатольевич

Официальные оппоненты:

Кащенко Виктор Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Западный окружной научно-клинический центр имени Л.Г. Соколова Федерального медико-биологического агентства», заместитель Генерального директора по научно-образовательной работе, главный хирург (Санкт-Петербург)

Раскин Григорий Александрович – доктор медицинских наук, доцент, Общество с ограниченной ответственностью «Лечебно-диагностический центр Международного института биологических систем им. Сергея Березина», заведующий патологоанатомическим отделением (Санкт-Петербург)

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Ростов-на-Дону)

Защита состоится «___» _____ 2023 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.1.033.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу: 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68, на сайте: <http://www.niioncologii.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Филатова Лариса Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Несмотря на развитие медицинских технологий и разработанные методы диагностики, колоректальный рак (КРР) остается одной из серьезных проблем в онкологии, занимая ведущие позиции по показателям заболеваемости и смертности. За последние десятилетия число больных с КРР прогрессивно увеличивается. В мире ежегодно регистрируется более 1,2 млн. первичных случаев КРР и 700 тыс. летальных исходов (Bray F., Ferlay J., 2020).

В России опухоли толстой кишки в структуре общей онкологической заболеваемости до сих пор удерживают третье место после рака легких и желудка у мужчин и второе место после рака молочной железы у женщин (Каприн А.Д., Старинский В.В., 2020).

Пятилетняя выживаемость при КРР приблизительно равна 50-60% (Verdecchia A, Francisci S., 2007). Тогда как на ранних стадиях заболевания этот показатель значительно выше (75-90%) (Gupta S., 2022). Таким образом, раннее выявление КРР имеет большое значение для улучшения долгосрочного прогноза.

В настоящее время золотым стандартом диагностики КРР является фиброколоноскопия. Но вследствие своего инвазивного характера, риска осложнений и высокой себестоимости, данное исследование не может широко использоваться в профилактических целях для массовых обследований (Jain S., Maque J., 2022).

Используемые в настоящее время менее инвазивные методы диагностики, такие как анализ кала на скрытую кровь Fecal Occult Blood Test (FOBT) (Bretthauer M., 2011) и скрининг на онкомаркеры (раковоэмбриональный антиген (РЭА)+СА-19.9) при достаточной специфичности (РЭА+СА-19.9: 78%, FOBT 85-97%) обладают низкой чувствительностью (РЭА+СА-19.9: 49,46%, FOBT 50-80%) (Knudsen A.B., Zauber A.G., 2016; Ransohoff D.F., Sox H.C., 2016).

Таким образом, поиск новых, надежных и неинвазивных маркеров, пригодных для ранней диагностики КРР, которые позволяли бы выявить заболевание с высокой чувствительностью и специфичностью, является актуальной задачей.

В последнее время появилось большое количество исследований, посвященных роли малых, не кодирующих белок молекул РНК (микроРНК) в канцерогенезе. Семейство генов микроРНК насчитывает немногим более 1% от всего генома человека, но регулирует экспрессию почти трети всех генов на посттранскрипционном уровне, при этом являясь наиболее консервативным по последовательностям и механизмам экспрессии (Tang J.T., Fang J.Y., 2009).

Известно, что микроРНК способны секретироваться во внеклеточное пространство и затем транспортироваться в циркулирующие жидкости организма в удивительно стабильной форме, что делает их идеальными кандидатами на роль биомаркеров для обнаружения рака с помощью жидкостной биопсии.

Инкапсулированные во внеклеточные везикулы или связанные со специальными липидными белками, они устойчивы к расщеплению РНКазами (Shen J., Stass S.A., 2013). В этой связи, помимо периферической крови они могут быть обнаружены в различных жидкостях организма, включая слюну, спинномозговую жидкость, асцитическую жидкость, мочу, грудное молоко и сперму (Vanni I., Alama A., 2012).

В процессах канцерогенеза опухолей толстой кишки описано как усиление, так и подавление или полное прекращение экспрессии различных микроРНК (Fukushima Y., Linuma H., 2015).

МикроРНК-21 является одной из наиболее известных микроРНК, вовлеченных в развитие рака человека.

Было высказано предположение, что микроРНК-21 действует как потенциальный онкоген. Так же отмечено, что микроРНК-21 активируется при широком спектре злокачественных новообразований, включая рак легкого (Wei J., Gao W., 2011), рак желудка (Tsujiura M., Ichikawa D., 2010), рак поджелудочной железы (Ali S., Almhanna K., 2010), рак печени (Bihrer V., Waidmann O., 2011) и рак пищевода (Komatsu S., Ichikawa D., 2011), но диагностическая роль микроРНК-21 при КРР все еще остается неопределенной (Xu F., Xu L., 2015) Однако известно, что экспрессия микроРНК-21 в тканях колоректальной опухоли увеличивается при ее прогрессировании и связана с низкой выживаемостью и плохим ответом на химиотерапию (Mitchell P.S., Parkin R.K., 2008).

Благодаря своим свойствам циркулирующие микроРНК способны эффективно выделяться из биологических жидкостей, а их количество возможно измерить с высокой точностью при помощи ПЦР диагностики в реальном времени, ДНК-микрочипов и метода РНК секвенирования (Pritchard C.C., Cheng H.H., 2012).

В попытке найти новый подход к ранней диагностике колоректального рака мы исследовали концентрации микроРНК-21 в слюне и плазме крови, как наиболее простых в получении и не требующих специальной подготовки средах.

Степень разработанности темы исследования

Благодаря способности микроРНК определяться за пределами опухоли в различных биологических жидкостях организма секрет слюнных желез является привлекательным источником потенциально новых опухолевых маркеров для диагностики и мониторинга рака. Изучение уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне, как маркера неинвазивной диагностики колоректального рака, является перспективным направлением. Несмотря на появляющиеся публикации, посвященные изучению уровня экспрессии микроРНК-21, в слюне при различных онкологических заболеваниях остаются не до конца разработанными алгоритмы диагностики отдельных онкологических патологий. А учитывая тот факт, что выявление опухолевого процесса на ранней стадии заболевания способствует увеличению

выживаемости пациентов в 75-90% случаев, поиск маркеров, способствующих своевременно заподозрить патологический процесс и произвести более детальное обследование пациента, остается актуальной задачей.

Цель исследования

Разработать диагностический алгоритм прогнозирования колоректального рака, основанный на определении уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови.

Задачи исследования

1. Определить, проанализировать и сравнить уровни экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови у пациентов с колоректальным раком и здоровых добровольцев.

2. Оценить уровень экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови как метода диагностики и произвести анализ факторов, влияющих на прогнозирование колоректального рака.

3. Разработать оптимальный диагностический алгоритм прогнозирования колоректального рака.

4. Произвести сравнительный анализ и оценить эффективность предложенного диагностического алгоритма с используемым в настоящее время методом неинвазивной диагностики колоректального рака (FOB).

Научная новизна исследования

На достаточном клиническом материале продемонстрированы результаты неинвазивной диагностики колоректального рака, не требующей специальной подготовки. Впервые определен уровень экспрессии микроРНК-21 в слюне у пациентов с колоректальным раком и здоровых добровольцев, а также произведено сравнение уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови. Методика определения экспрессии микроРНК-21 с использованием реагентов российского производства в образцах слюны и периферической крови у пациентов с колоректальным раком адаптирована для жителей РФ. На основании полученных данных разработан алгоритм прогнозирования колоректального рака, основанный на неинвазивном исследовании уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови. Выполнен сравнительный анализ предложенного диагностического алгоритма на основе микроРНК-21 в слюне и плазме крови с используемым в настоящее время иммунохроматографическим тестом на определение скрытой крови в стуле (FOB). Показана эффективность предложенной модели прогнозирования колоректального рака, основанной на экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме, которая может быть применена в клинической практике. А исследование экспрессии микроРНК-21 в слюне, ввиду доступности биоматериала, является перспективным в ранней диагностике

колоректального рака, а также может использоваться в качестве мониторинга неограниченное количество раз.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Разработанный метод неинвазивной диагностики, основанный на определении уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови, в качестве доступного и быстрого инструмента выявления колоректального рака в клинической практике, обладает достаточной чувствительностью и специфичностью. Изучение уровня экспрессии микро РНК-21 в слюне и плазме крови, а также комплексная модель прогнозирования колоректального рака, в дополнение к общепринятым методам, позволят диагностировать заболевание до наступления клинических проявлений, на ранних стадиях, тем самым обеспечив высокий уровень пятилетней выживаемости после проведенного лечения. А также позволит уменьшить объем проводимого хирургического лечения.

Методология и методы исследования

Методологическая часть исследования включала в себя анализ литературных данных отечественных и зарубежных авторов, посвященных ранней диагностике колоректального рака. На основании полученных данных определены основные факторы, указывающие на наличие колоректального рака, разработан план диссертационного исследования, определены цели, задачи и сформулирована гипотеза. Материалом настоящего проспективного исследования послужили данные 166 пациентов, которые проходили обследование и лечение в НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России. Всем пациентам дополнительно производился забор слюны и плазмы крови для определения уровня экспрессии микроРНК-21 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). На основании анализа полученных данных предложен диагностический алгоритм, который позволяет заподозрить у человека наличие колоректального рака. Оценена его диагностическая значимость. При сравнении данного алгоритма с используемым в настоящее время методом неинвазивной диагностики колоректального рака он ничуть ему не уступает, а даже превосходит по простоте выполнения.

Положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с колоректальным раком уровень экспрессии микроРНК-21 в плазме крови и в слюне выше, чем у здоровых добровольцев контрольной группы.
2. Оценка уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне представляется более специфичным методом для диагностики колоректального рака, чем для немелкоклеточного рака легкого и глиальных церебральных опухолей.

3. Максимальные уровни экспрессии микроРНК-21 в слюне наблюдались у пациентов с начальными (T_{in situ}+T₂) стадиями колоректального рака, что позволяет рассматривать возможное применение данного метода неинвазивной диагностики в качестве скрининга.

4. Разработанный алгоритм прогнозирования наличия колоректального рака на основании трех легко определяемых маркеров (возраста, уровня экспрессии микроРНК-21 в плазме крови и в слюне) обладает достаточно высокими чувствительностью и специфичностью и высоким прогнозным качеством и может быть использован как дополнительный метод неинвазивной диагностики колоректального рака.

Статистическая достоверность результатов исследования

Достаточный объем выборок (65 пациентов с колоректальным раком, 66 здоровых добровольцев (контрольная группа), 14 пациентов с немелкоклеточным раком легкого, 21 пациент с глиальными церебральными опухолями) и полученные результаты подтверждаются статистической достоверностью проведенного исследования. В работе применены современные методы математического анализа и использовано современное программное обеспечение.

Апробация результатов исследования

Основные результаты исследования доложены на: Русско-Японский симпозиум «Russian Week 2021 in Kanazawa University» Kanazawa (30.09.2021 года); IX Международной конференции «Современные биотехнологии для науки и практики» посвященной Международному Дню ДНК (28-29.04.2022 года, Санкт-Петербург, Россия); VI Конгрессе Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное (12-17 июля 2022 года, Санкт-Петербург, Россия); V Юбилейный международный форум онкологии и радиотерапии (19-23.09.2022 года, Москва, Россия).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, из которых 2 входят в международную реферативную базу данных и систему цитирования Scopus. Получено 1 свидетельство о регистрации базы данных «Расчет уровней экспрессии микроРНК-21 и клинические характеристики пациентов с колоректальным раком и здоровых добровольцев» № 2023620485 от 06.02.2023 г.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования отражены в научных статьях, внедрены и активно используются в научной и лечебной работе онкологических отделений НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России

(197022, Россия, СанктПетербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8) (акт внедрения от 13.03.2023г.).

Связь работы с научными программами, планами

Тема диссертационной работы утверждена на заседании Ученого совета лечебного факультета ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России «27» мая 2022 года, протокол № 4.

Работа была одобрена на заседании локального этического комитета (выписка из протокола № 185 заседания Этического комитета ПСПбГМУ им. И.П. Павлова от 30.06.2016 г.) и выполнена в соответствии с темой государственного задания ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России «Значение феномена коэкспрессии генов микроРНК и факторов транскрипции сигнальных путей NFκB и KLF в реализации патологических процессов» (2021-2023гг. 121060800166-9).

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автором самостоятельно разработаны дизайн, цели и задачи, а также сформулированы выводы проспективного исследования. Автор лично осуществлял сбор информации по теме диссертации, подборе, лабораторном и клиническом обследовании пациентов исследуемых групп. Под руководством д.м.н., профессора М.И. Зарайского автор лично участвовал в проведении молекулярно-генетического исследования: осуществлял забор и подготовку клинических образцов, выделение тотальной рибонуклеиновой кислоты, проводил реакцию обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Автором лично осуществлялась обработка и систематизация полученных результатов обследования пациентов с последующим составлением электронной базы данных. Автор самостоятельно осуществлял статистическую обработку полученных данных с последующим оформлением результатов исследования. Автором лично разработан и внедрен в клиническую практику на онкологических отделениях НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России алгоритм диагностики колоректального рака, основанный на трех наиболее значимых факторах (возраста, уровне экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови).

Соответствие паспорту специальности

Основные научные положения и выводы диссертации «Роль микроРНК-21 в диагностике колоректального рака» соответствуют паспорту специальности 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: Введение, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендации, списка литературы. Диссертационная работа изложена на 139 страницах машинописного текста и написана по традиционной форме, включающей введения, результатов собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций, списка литературы и списка сокращений. Список литературы включает 32 отечественных и 170 зарубежных авторов и содержит 32 таблицы, 15 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Дизайн исследования

Ниже на рисунке 1 представлен дизайн данного исследования.

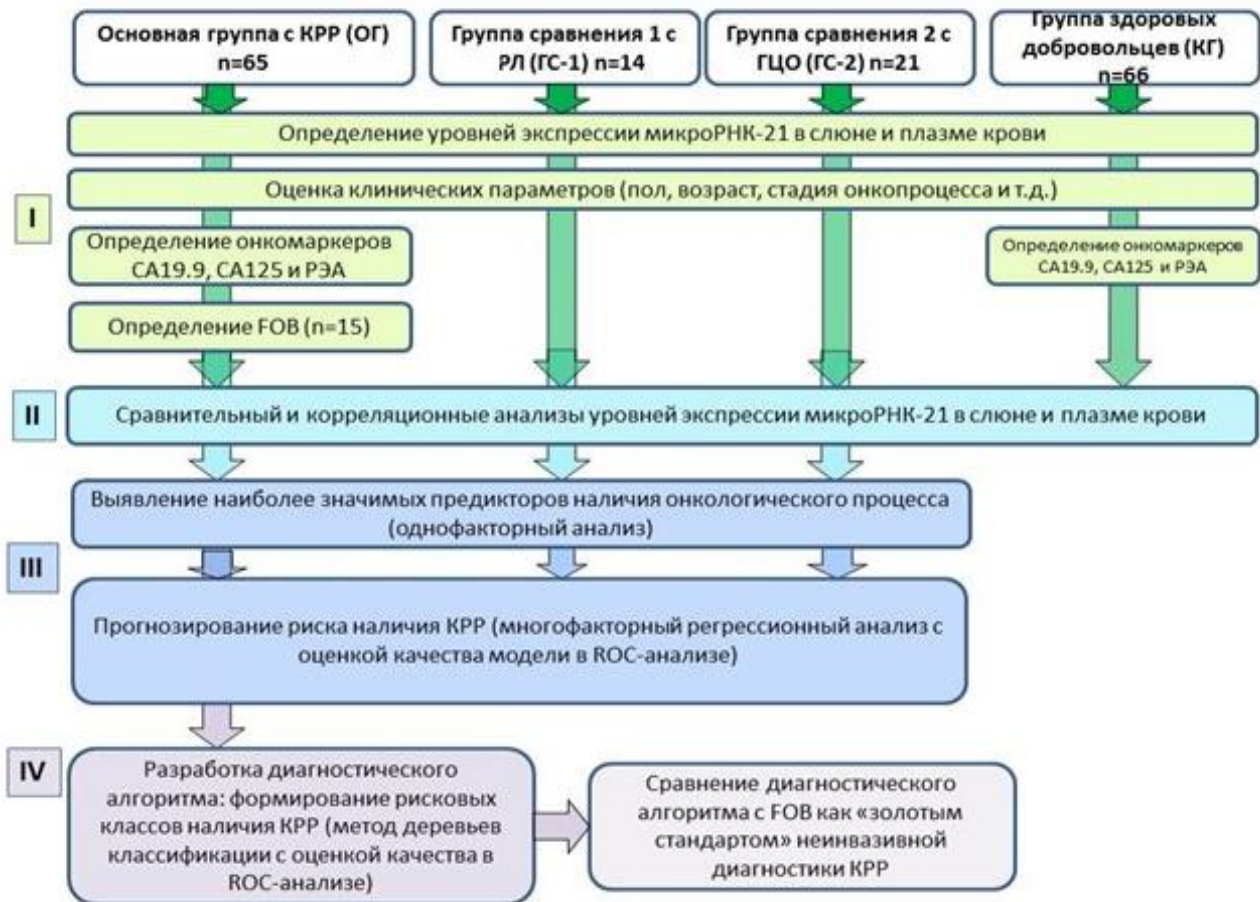


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Материал и методы исследования

Критериями включения в исследование были:

- возраст пациентов старше 18 лет;
- первичный патоморфологически верифицированный колоректальный рак или немелкоклеточный рак легкого или глиальные церебральные опухоли;

- добровольно подписанное пациентом информированное согласие на участие в научном исследовании.

Критериями исключения из исследования были:

- наличие хронических воспалительных заболеваний толстой кишки, органов ЖКТ, грудной клетки и гематологических патологий;
- хирургическое вмешательство по поводу онкологической патологии, химиотерапии и лучевой терапии в анамнезе;
- наличие заболеваний ротоглотки;
- наличие декомпенсации сопутствующей хронической патологии (гипертонической болезни, сахарного диабета, подагры, хронической болезни почек и т.д.).

Всего в исследование включено 166 человек, проходивших обследование и лечение в НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России в период с 2016 по 2022 гг.. Из них 65 пациентов с колоректальным раком (КРР) и 66 здоровых добровольцев – контрольная группа (КГ). Дополнительно в исследование были включены 14 пациентов с немелкоклеточным раком легкого (РЛ) и 21 пациент с глиальными церебральными опухолями (ГЦО). Все исследуемые были в возрасте от 20 до 88 лет. Средний возраст пациентов исследуемой выборки составил $58,66 \pm 16,14$ лет. Демографические характеристики представлены в таблице 1.

Всем пациентам производился забор плазмы крови и слюны для определения уровня экспрессии микроРНК-21, а также выполнялись инструментальные исследования (фиброколоноскопия, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, ультразвуковое исследование, рентгенография, биопсия образований) с целью выявления и подтверждения онкологического процесса.

Таблица 1 – Распределение пациентов исследуемых групп по возрасту и полу

Показатель		КРР (n=65)	КГ (n=66)	РЛ (n=14)	ГЦО (n=21)	р
Пол	женский	34 (52,31%)	41 (62,12%)	7 (50,00%)	9 (42,86%)	p=0,4024
	мужской	31 (47,69%)	25 (37,88%)	7 (50,00%)	12 (57,14%)	
Возраст, лет	M±S	66,55±12,19	52,61±16,66	65,57±10,70	48,67±15,37	p<0,0001

Пациентам с КРР и КГ дополнительно производился забор крови на определение онкомаркеров, таких как РЭА, СА-19-9 и СА-125. Также рандомизировано из группы пациентов, страдающих КРР были выбраны 15 человек, которым был произведен анализ кала на определение скрытой крови в стуле методом иммунохроматографического анализа при помощи экспресс-теста «FOB».

Исследование уровня экспрессии генов микроРНК в слюне (С-21) и плазме крови (П-21) выполнялось методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Тотальная

рибонуклеиновая кислота (РНК) выделялась из слюны и плазмы крови стандартным фенол хлороформным методом, с использованием фенольного реактива ExtractRNA (Евроген, Москва), согласно прилагаемой инструкции.

Реакция обратной транскрипции со специфическими праймерами для микроРНК-21 (таблица 2) выполнялась по технологии StemLoop.

Таблица 2 – Праймеры для обратной транскрипции

Праймер	Последовательность
микроРНК-21	5-gtcgtatccagtgacgggtccgaggtattcgactggatacgaactcaac-3
РНК U-6	5-gtcgtatccagtgacgggtccgaggtattcgactggatacgaacaaaatag-3

В качестве реактива использовали набор ОТ-1 фирмы Синтол (Москва). Для каждой пробы РНК, выделенной из крови и слюны, готовились по 2 отдельные реакционные смеси для детекции генов микроРНК и референц-гена. Каждая реакционная смесь состояла из буфера для обратной транскрипции 5 мкл., 1 мкл. праймера (U6 или МикроРНК-21) в концентрации 1 пмоль, 0,5 мкл. фермента обратной транскриптазы фирмы Синтол (Москва) и 3 мкл. раствора тотальной РНК, полученном на предыдущем этапе. Температурный профиль реакции: 30 минут при температуре +16 °С, 30 минут при температуре +42 °С, 5 минут при температуре +85 °С с последующим охлаждением. Данный этап проводили на амплификаторе ДТ-Lite (ДНК-Технология, Москва). Амплификацию проводили на приборе ДТ-Lite (ДНК-Технология, Москва) в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen с использованием набора М-439 (Синтол, Москва) для реализации протокола учета результатов в режиме реального времени. Для каждой пробы крови и слюны готовились по 2 отдельные реакционные смеси для детекции гена интереса микроРНК-21 и референц-гена U6. Каждая реакционная смесь состояла из 10 мкл. воды, 10 мкл. буфера (Синтол, Москва), 1 мкл. прямого праймера (U6 или МикроРНК-21) в концентрации 1 пмоль и 1 мкл. общего обратного праймера в концентрации 1 пмоль. Праймеры для ПЦР представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Последовательности праймеров для ПЦР

Праймер	Последовательность
микроРНК-21(прямой)	5-gcccgctagcttatcagactgatg-3
РНК U-6(прямой)	5-gcgcgctcgtgaagcgcttc-3
Общий обратный	gtgcaggggtccgaggt

Температурный профиль реакции: 10 минут при температуре +95 °С и 45 циклов, состоящих из 15 сек при температуре +95 °С и 1 минуте при температуре

+60 °С. Данный этап проводили на амплификаторе ДТ-Lite (ДНК-Технология, Москва).

При расчётах использовали полуколичественную оценку уровней экспрессии микроРНК, которую выражали в условных единицах экспрессии (УЕ), по протоколу 2 – $\Delta\Delta Ct$.

Методы статистического анализа

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10 и SASJMP (Реброва О., 2002). Сравнения двух групп по числовым переменным проводилось с помощью непараметрического метода Манна-Уитни. Статистическая значимость различий групп для бинарных и категориальных показателей определялась с использованием метода Хи-квадрат Пирсона. Анализ взаимосвязей проводился на основе непараметрической ранговой корреляции по Спирмену. Для выявления предикторов колоректального рака применялся однофакторный анализ. С целью моделирования бинарных целевых показателей использовали деревья классификации, а для анализа качества полученной прогностической модели использовали ROC-анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические характеристики и уровень экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови в исследуемых группах.

Клинические характеристики исследуемых групп представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Клинико-демографические показатели исследуемых групп

Показатель		КРР (n=65)	РЛ (n=14)	ГЦО (n=21)	КГ (n=66)	p
Пол	женский	34	7	9	41	0,4024
	мужской	31	7	12	25	
Возраст, лет (M±S)		66±12	65±10	48±15	52±16	<0,0001
РЭА>N, %		27,69%	–	–	0%	<0,0001
СА-19.9>N, %		20%	–	–	0%	0,0001
СА-125>N, %		6,15%	–	–	9,09%	0,5268
Т	T in situ	4 (6,15%)	0	–	–	<0,0001
	T1	0	5 (35,71%)	–	–	

Продолжение таблицы 4

Показатель	КРР (n=65)	РЛ (n=14)	ГЦО (n=21)	КГ (n=66)	p
------------	------------	-----------	------------	-----------	---

T	T2	8 (12,3%)	6 (42,86%)	–	–	<0,0001
	T3	22 (33,85%)	1 (7,14%)	–	–	
	T4	31 (47,69%)	2 (14,29%)	–	–	
N	N0	29 (44,62%)	6 (42,86%)	–	–	0,1165
	N1	23 (35,38%)	6 (42,86%)	–	–	
	N2	13 (20,0%)	2 (14,28%)	–	–	
M	M0	51 (78,46%)	12 (85,71%)	–	–	0,5402
	M1	14 (21,54%)	2 (14,29%)	–	–	
Стадия	0	4 (6,15%)	0	–	–	0,3067
	I	7 (10,77%)	4 (28,57%)	–	–	
	II	14 (21,54%)	4 (28,57%)	–	–	
	III	26 (40%)	3 (21,43%)	–	–	
	IV	14 (21,54%)	3 (21,43%)	–	–	

Значимых различий по полу в четырех группах выявлено не было, однако отмечалось различие по возрасту. При попарном сравнении по возрасту отличались пациенты с КРР и КГ ($p < 0,001$), пациенты с КРР и РЛ ($p < 0,001$), пациенты с РЛ и ГЦО ($p = 0,017$), пациенты с РЛ и КГ ($p = 0,049$).

Показатели уровней экспрессии микроРНК-21 в слюне (С-21) и плазме крови (П-21) в исследуемых группах рака и контрольной группы представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Уровни экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме в исследуемых группах

Уровень экспрессии	КРР (n=65)	РЛ (n=14)	ГЦО (n=21)	КГ (n=66)	p
С-21, УЕ	9,67±18,52	12,27±14,78	2,51±2,39	1,30±2,45	<0,0001
П-21, УЕ	3,71±7,38	8,69±6,76	2,17±2,05	0,84±0,64	<0,0001

Уровень экспрессии С-21 при КРР, РЛ и ГЦО был выше, чем в КГ ($p < 0,001$). Уровень экспрессии П-21 при КРР, РЛ и ГЦО также был выше, чем в КГ ($p = 0,009$, $p < 0,001$ и $p = 0,022$ соответственно). Не было выявлено различий уровней экспрессии С-21 между группами КРР и РЛ ($p = 0,38$), КРР и ГЦО ($p = 0,08$), РЛ и ГЦО ($p = 0,69$). Уровень экспрессии П-21 был достоверно выше при РЛ, чем при КРР ($p = 0,001$) и ГЦО ($p = 0,001$). Уровень экспрессии П-21 при КРР был сравним с таковыми при ГЦО ($p = 0,82$).

Повышенная экспрессия в ткани опухоли и в плазме крови была показана ранее в ряде исследований (Biscaglia G., Panza A., 2009; Nielsen B.S., Jorgensen S., 2010; Kanaan Z., Rai S.N., 2013; Toiyama Y., Takahashi M., 2013), тогда как анализ экспрессии микроРНК-21 в слюне при данной локализации опухоли и сопоставление его с уровнем экспрессии в плазме, в данном исследовании, проведен впервые. Полученные результаты свидетельствуют о том, что появление молекул микроРНК в кровотоке, вероятнее всего, связано с их секрецией из клеток и/или выходом в кровоток из

разрушенных клеток ткани или крови. Более высокий уровень экспрессии микроРНК в слюне может быть обусловлен не только ее локальным образованием в результате апоптоза или некроза клеток (Yoshizawa J.M., Schafer C.A., 2013), но и попаданием в секрет слюнных желез микроРНК из кровотока, путем активного или пассивного транспорта в виду известного хорошего кровоснабжения железы (Murdock R.C., Shen L., 2013; Johnson N., Ebersole J.L., 2016). Также следует отметить, что высокий уровень экспрессии микроРНК-21 в слюне указывает на огромную ценность слюны как диагностической биожидкости (Lee Y.H., Kim J.H., 2012; Zhang L., Xiao H., 2012; Li F., Yoshizawa J.M., 2018).

Так как глиальные церебральные опухоли не классифицируется по TNM классификации опухолевого процесса, наиболее однородными были группы пациентов с колоректальным раком и немелкоклеточным раком легкого. Эти две группы отличались по степени распространенности опухолевого процесса (критерия T классификации TNM). Различий по критериям N и M классификации TNM, а также стадии опухолевого процесса выявлено не было (таблица 4).

Уровень экспрессии С-21 в группе пациентов с КРР критерия Т у пациентов с Т4 был ниже, чем в Т in situ, Т2 и Т3 (рисунок 2). Уровень экспрессии П-21 при разных критериях Т опухоли значимо не отличался ($p=0,85$). При проведении сравнительного анализа уровней экспрессии С-21 и П-21 в группе пациентов с РЛ по критерию Т классификации TNM значимых отличий выявлено не было ($p=0,36$ и $p=0,6$).

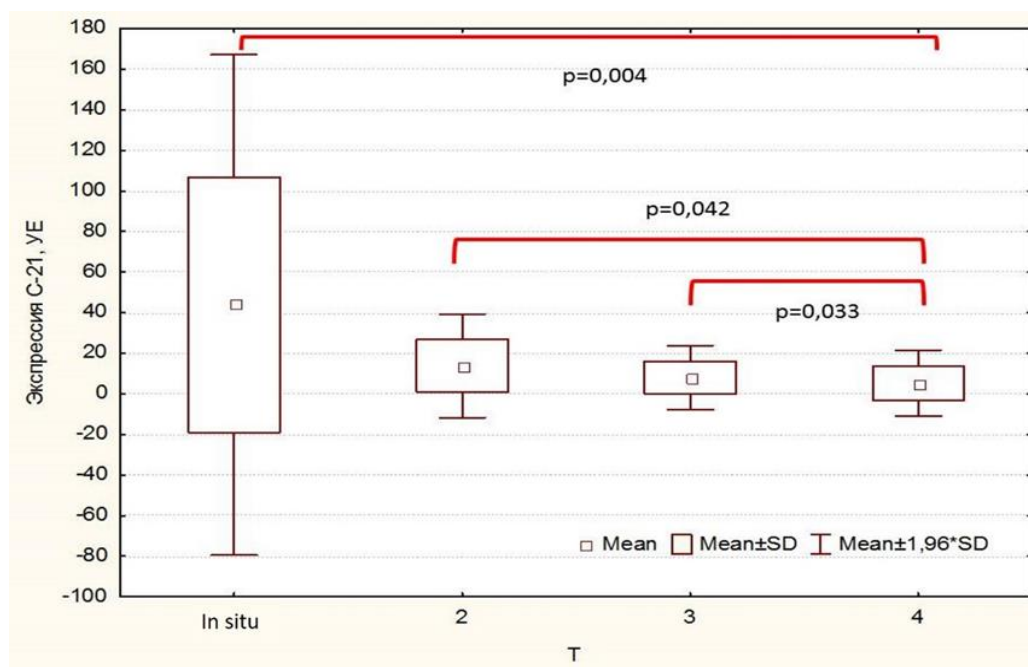


Рисунок 2 – Экспрессия С-21 при различных критериях Т у пациентов с КРР

Подобная особенность экспрессии микроРНК-21 в слюне при КРР, продемонстрирована нами впервые и указывает на возможный потенциал этой молекулы как раннего маркера КРР, что требует дальнейших исследований.

**Анализ взаимосвязи экспрессии микроРНК-21 в плазме крови и слюне
с некоторыми характеристиками исследуемых групп**

Проведенный далее корреляционный анализ показал прямую связь С-21 с П-21 в группе пациентов с КРР и КГ и обратную связь с критерием Т классификации TNM в группе пациентов с КРР ($p \leq 0,05$) (таблица 6).

Таблица 6 – Корреляционный анализ микроРНК-21 в слюне и плазме и некоторых клинических показателей в исследуемых группах

Показатель	С- 21 (УЕ)	П- 21 (УЕ)	Статистическая значимость
КГ			
Возраст, лет	-0,1	-0,06	$p \leq 0,01$
С-21 (УЕ)	1	0,45*	
П-21 (УЕ)	0,45*	1	
КРР			
Возраст, лет	-0,03	-0,15	$p \leq 0,05$
Локализация	-0,24	-0,03	
Стадия	-0,06	-0,11	
Т	-0,41*	-0,2	
СА19.9 >N	-0,21	-0,1	
РЭА >N	-0,16	-0,11	
С-21 (УЕ)	1	0,31*	
П-21 (УЕ)	0,31*	1	
РЛ			
Возраст, лет	0,28	0,09	
Пол	0,11	-0,48	
Стадия	-0,15	-0,47	
Т (TNM)	-0,11	-0,25	
С-21 (УЕ)	1	0,34	
П-21 (УЕ)	0,34	1	
ГЦО			
Возраст, лет	-0,24	-0,15	
Пол	-0,3	-0,11	
С-21 (УЕ)	1	0,12	
П-21 (УЕ)	0,12	1	
Примечание – * – статистическая значимость.			

Выявленная умеренная положительная корреляция между уровнями экспрессии С-21 и П-21 в группе КРР ($p \leq 0,05$) и КГ ($p \leq 0,01$) нам представляется закономерной, так как молекулы микроРНК попадают в слюну не только из крови посредством различных клеточных механизмов, таких как трансцеллюлярные (пассивная внутриклеточная

диффузия и активный транспорт) или парацеллюлярные пути (внеклеточная ультрафильтрация), но и образуются локально в результате апоптоза или некроза клеток. Повышение уровня экспрессии С-21 на начальных стадиях КРР было продемонстрировано нами впервые. В связи с чем мы можем лишь предположить, что С-21 при КРР играет ключевую роль в основном при начальных стадиях онкологического процесса до инвазии и метастазирования, однако это требует дальнейших исследований.

Экспрессия микроРНК-21 в слюне и плазме крови как метод диагностики колоректального рака

С целью оценки качества уровней экспрессии С-21 и П-21 как метода диагностики колоректального рака был выполнен ROC-анализ.

ROC-кривые, характеризующие С-21 и П-21 как диагностический метод колоректального рака, представлены на рисунке 3, а, б.

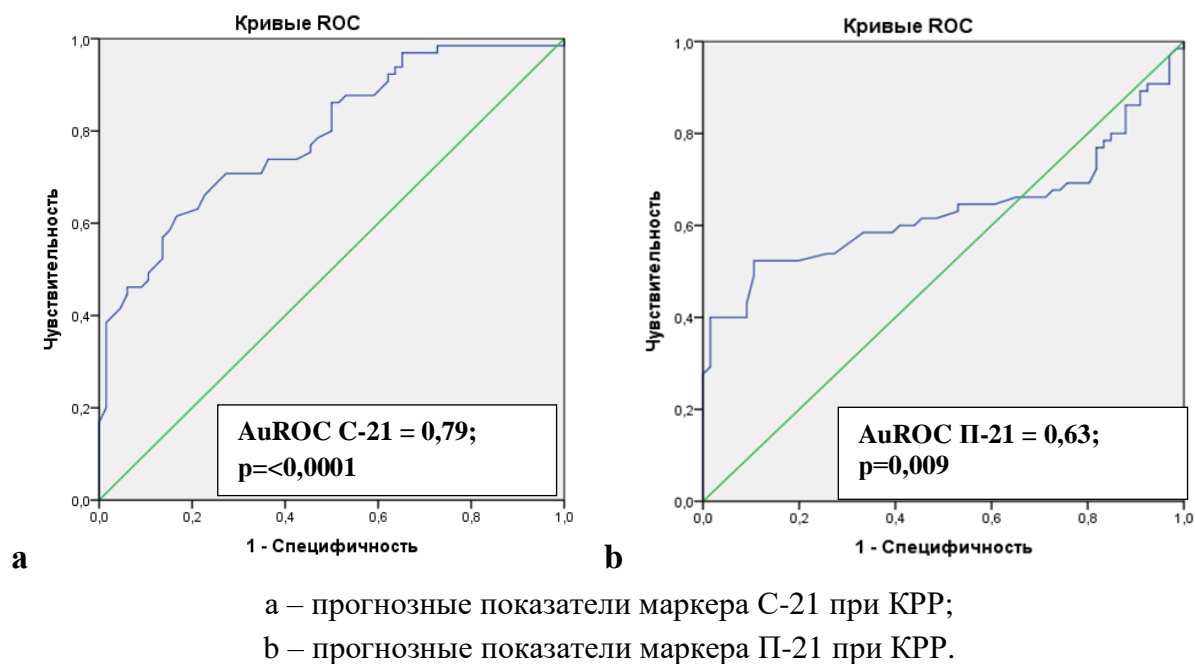


Рисунок 3 – ROC-кривые, характеризующие уровень экспрессии С-21 и П-21 как диагностический метод КРР

Чувствительность и специфичность уровня экспрессии П-21 $\geq 1,6$ УЕ и С-21 ≥ 2 УЕ в качестве маркеров КРР составили 52% и 89% и 61% и 83%.

Таким образом, обладая достаточными чувствительностью и специфичностью, уровни экспрессии С-21 и П-21 могут быть надежными маркерами диагностики КРР.

Однофакторный анализ прогнозирования колоректального рака

Для выделения наиболее значимых предикторов наличия КРР был выполнен однофакторный анализ.

В качестве наиболее значимых предикторов наличия колоректального рака были выявлены С-21, П-21, а также возраст пациентов (таблица 7).

Таблица 7 – Результаты однофакторного анализа при КРР

Предиктор	Относительный риск (95% ДИ)	Уровень Р
	КРР	
С-21 $\geq 2,0$ УЕ	2,51 (1,76; 3,58)	<0,0001
П-21 $\geq 1,6$ УЕ	2,41 (1,75; 3,31)	<0,0001
Возраст, лет $\geq 61,0$	2,65 (1,67; 4,21)	<0,0001
РЭА >N	2,4 (1,93; 2,99)	<0,0001
СА-19.9 >N	2,27 (1,85; 2,78)	0,0001

Следует подчеркнуть, что роль микроРНК-21, в основном в плазме, в качестве предиктора КРР была показана в ряде исследований (Киселева Я.Ю., Радько С.П., 2015; Kanaan Z., Rai S.N., 2013; Wang Y., Gao X., 2014). Тогда как прогностическое значение С-21 для данной онкологической патологии нами продемонстрирована в представленном исследовании впервые.

Регрессионный анализ прогнозирования колоректального рака

Для определения наличия КРР была построена логистическая регрессия, основой которой стал уровень экспрессии С-21.

Результаты регрессионного анализа прогнозирования колоректального рака на основе уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Регрессионный анализ прогнозирования КРР

Фактор	Среднее удельное/ максимальное изменение риска, %	Отношение шансов (ДИ95%)	Коэфф. регрессии	р	Значимость регрессии
Прогнозирование КРР					
Константа			-4,7609	<0,0001	AuROC =0,789, N=131, p<0,0001
С-21УЕ	6,1% / 71,4%	1,30 (1,11; 1,53)	0,2636	0,0014	
Возраст, лет	1,5% / 76,4%	1,07 (1,03; 1,10)	0,0655	<0,0001	
П-21УЕ	21,6% / 90,6%	2,42 (1,43; 4,10)	0,8829	0,0010	

Также нами была определена чувствительность и специфичность уровней экспрессии С-21 и П-21, определены значимые предикторы и построена логистическая регрессия в группах пациентов с РЛ и ГЦО. Несмотря на достаточную чувствительность и специфичность маркеров (П-21 $\geq 3,5$ УЕ и С-21 $\geq 2,5$ УЕ при РЛ –

78% и 100% и 64% и 86%, П-21 $\geq 1,5$ УЕ и С-21 $\geq 1,6$ УЕ при ГЦО – 57% и 71% и 88% и 77% соответственно), одинаковые значимые предикторы онкологического процесса, как и при КРР, качество регрессионной модели прогнозирования РЛ было низким (AuROC =0,70), а при ГЦО – сомнительным (AuROC =0,55).

Таким образом, по результатам нашего исследования, определение уровня экспрессии С-21 в качестве диагностического маркера хорошо рекомендует себя при КРР (AuROC =0,79).

Группы пациентов с РЛ и ГЦО были небольшими (n=14 и n=21), что является одним из ограничений нашего исследования, в связи с чем валидизация С-21 как метода ранней диагностики и прогнозирования КРР и других онкологических процессов требует дальнейших исследований на большей когорте пациентов.

Формирование рисковых классов и модель прогнозирования колоректального рака, основанная на определении уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови (диагностический алгоритм колоректального рака)

При дальнейшей оценке уровня экспрессии С-21, П-21 и возраста, как основных факторов определяющих наличие КРР был произведен анализ рисков, на основании которого с целью быстрого прогнозирования наличия КРР в клинической практике была построена диаграмма дерева решений с помощью комбинации влияющих факторов с последующим ранжированием классов по уровню риска (рисунок 4). Всего с помощью дерева решений было выделено 4 рисковых класса. Наиболее высокий риск наличия КРР наблюдается у пациентов со следующей комбинацией факторов: «С-21 (УЕ) $\geq 2,0$ » и «П-21 (УЕ) $\geq 2,6$ ». Наименьший уровень риска наличия КРР наблюдается для следующей комбинации факторов: «С-21 (УЕ) $< 2,0$ » и «Возраст, лет $< 62,0$ ». Прогностическая ценность построенной диаграммы принятия решений была проверена при ROC-анализе (рисунок 5). AuROC составила 0,86.

На основе выполненного анализа впервые предложен диагностический алгоритм оценки риска наличия КРР, позволяющий отнести пациента к группе риска по наличию КРР на основании уровня экспрессии С-21 и П-21. Так, к повышенному риску относятся пациенты, у которых уровень экспрессии С-21 более 2,0 УЕ. Группа повышенного риска на основании уровня экспрессии П-21 подразделяется на средний П-21 $< 2,6$ УЕ и высокий риск при П-21 $> 2,6$ УЕ.

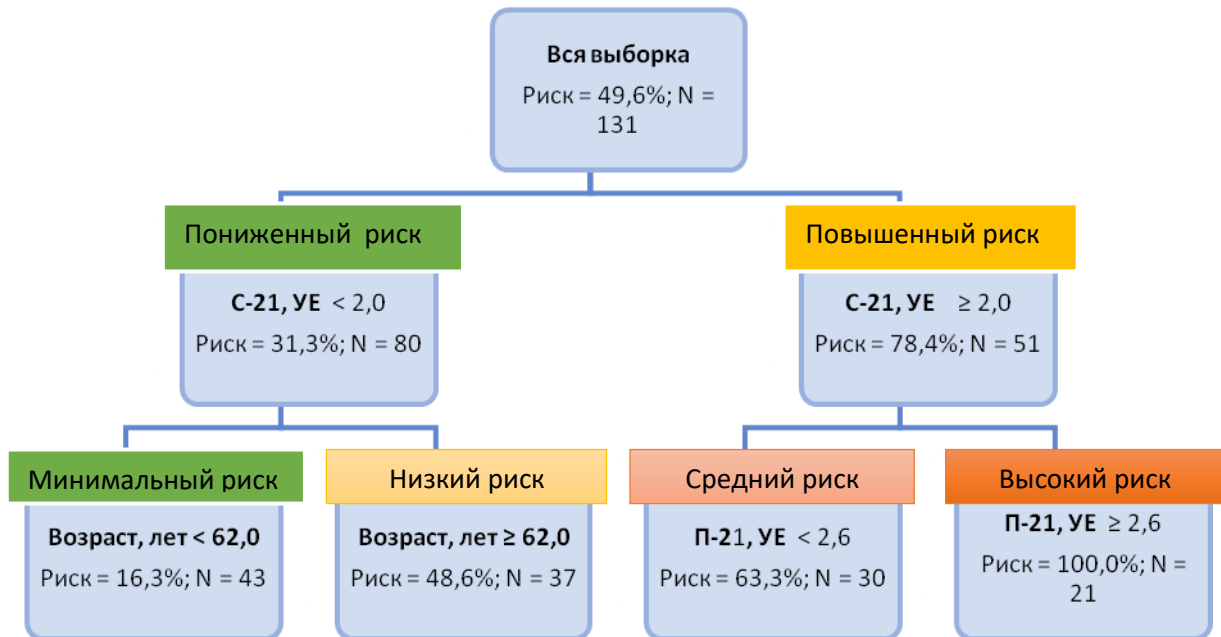


Рисунок 4 – Диаграмма дерева решений для показателя КРР на основе комбинации 3-х влияющих факторов

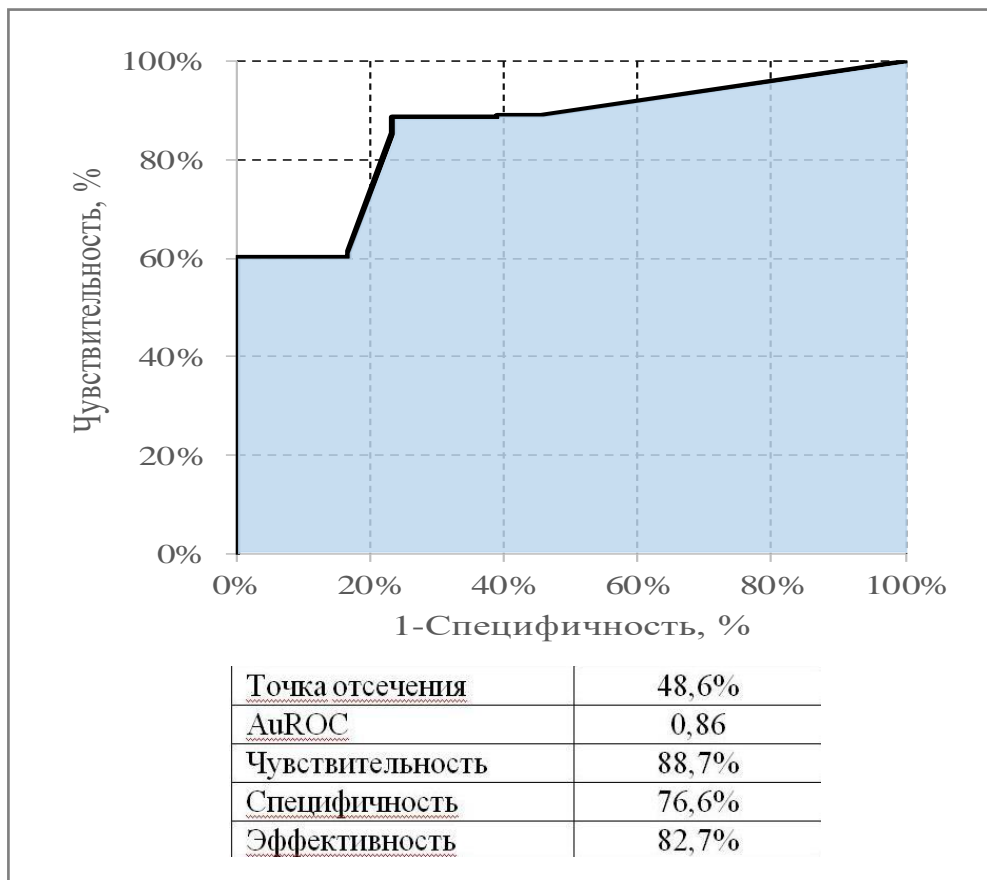


Рисунок 5 – ROC-кривая для дерева решений

Сравнительный анализ предложенного диагностического алгоритма колоректального рака с используемым в практике иммунохроматографическим тестом на определение скрытой крови в стуле (Fecal Occult Blood Test)

Так как настоящее исследование определило, что С-21 ≥ 2 УЕ а П-21 $\geq 1,6$ УЕ обладают достаточными чувствительностью и специфичностью, чтобы использовать их в качестве неинвазивных маркеров диагностики КРР, мы провели сравнительный анализ между тремя маркерами неинвазивной диагностики КРР (FOB, С-21 и П-21). Статистически значимых различий в группах отмечено не было ($p=0,0541$).

Из 15 человек с пониженным риском оказалось 5 человек (33,3%), тогда как с повышенным риском было 10 человек (66,7%). Среди пациентов пониженного риска минимальный риск был у 13,3% ($n=2$) и низкий риск у 20% ($n=3$), что соответствовало положительному тесту FOB 18,2% ($n=2$ и $n=2$ соответственно). В группе пациентов повышенного риска средний риск наблюдался у 13,3% ($n=2$), что также соответствовало положительному тесту FOB. При этом группа высокого риска составила 53,4% ($n=8$), из которых только у 45,5% ($n=5$) был положительный тест FOB.

Сравнительный анализ предложенного диагностического алгоритма и теста FOB представлен на рисунке 6.

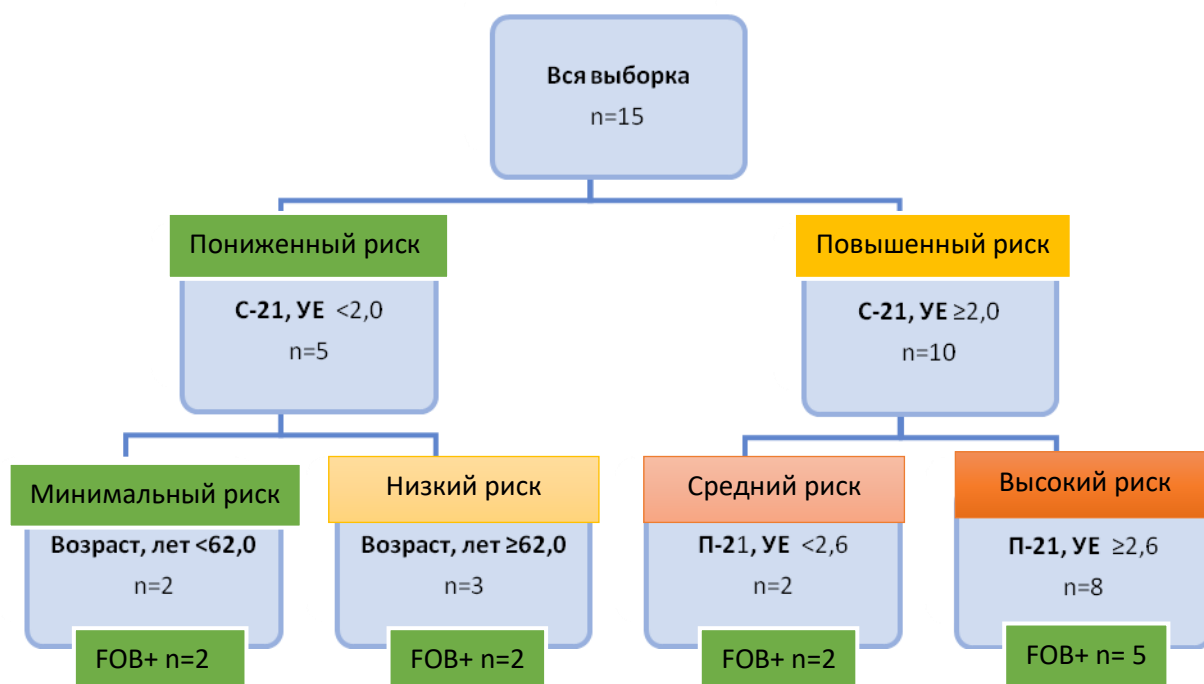


Рисунок 6 – Сравнительный анализ предложенного диагностического алгоритма КРР с тестом FOB

Разработанный нами алгоритм диагностики КРР показал себя более надежным методом, чем FOB. Так, «золотой» стандарт диагностики КРР, тест на определение скрытой крови в стуле методом иммунохроматографического анализа, оказался

отрицательным у трех пациентов с КРР, которые, согласно предложенному нами алгоритму, были отнесены в группу высокого риска.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из главных задач настоящего исследования являлась оценка уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме крови у пациентов с КРР.

При проведении сравнения уровня экспрессии С-21 и П-21 у пациентов с КРР и у здоровых добровольцев (КГ) нам удалось выявить, что уровень экспрессии микроРНК-21 у пациентов с КРР выше, чем у здоровых добровольцев, уровень экспрессии С-21 превышает П-21 у пациентов с КРР, а в сравнении с уровнем экспрессии С-21 у контрольной группы этот показатель у пациентов с КРР значительно выше.

При проведении сравнительного анализа уровня экспрессии С-21 и П-21 в зависимости от стадии онкологического процесса и распространенности опухолевого процесса согласно классификации TNM (8-е издание 2018 г.) было показано, что уровень экспрессии П-21 на разных стадиях и при разной степени инвазии онкологического процесса не отличался. При этом уровень экспрессии С-21 на ранних стадиях онкологического процесса (0-II стадия) и при небольшой глубине инвазии опухоли (T in situ – T2) был значительно выше, чем на более поздних стадиях заболевания и при большей локальной инвазии опухоли (рисунок 2). Повышение уровня экспрессии С-21 на начальных стадиях КРР было подтверждено и корреляционным анализом, который показал обратную взаимосвязь между категорией T и уровнем экспрессии С-21 (таблица 6), что может указывать на возможный потенциал этой молекулы как раннего маркера КРР и требует дальнейших исследований.

При дальнейшем анализе уровней экспрессии С-21 и П-21 как диагностического метода КРР было отмечено, что уровни экспрессии С-21 $\geq 2,0$ УЕ (Прогностическая ценность положительного результата (ПЦП) – 73%; Прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦО) – 31%), и П-21 $\geq 1,6$ УЕ (ПЦП – 83%; ПЦО – 34,5%) обладают хорошими показателями AuROC и могут быть надежными маркерами диагностики данного онкологического процесса, обладая достаточными чувствительностью и специфичностью (рисунок 3, а, б).

При проведении в группе пациентов с КРР, однофакторного анализа (таблица 7) ключевыми, статистически значимыми факторами, которые указывают на наличие КРР, стали уровень экспрессии С-21 $\geq 2,0$ УЕ, П-21 $\geq 1,6$ УЕ, возраст старше 61 года, РЭА и СА-19.9 $>N$. Дальнейшее построение логистической регрессии, которая показывает риск наличия онкологического процесса на основе уровня экспрессии С-21, с пошаговым включением наиболее значимых факторов, выявило, что при КРР добавление к уровню экспрессии С-21 возраста повышает качество модели (AuROC $>0,75$), что явилось наилучшей полученной регрессионной моделью прогнозирования

рака в нашем исследовании с высокой чувствительностью (75,4%) и специфичностью (71,3%) и достаточными ПЦП 62,8% и ПЦО 81,8% для скринингового теста. Следует отметить, что построенные подобные модели для РЛ и ГЦО обладали низким качеством ($AuROC = 0,70$ и $AuROC = 0,55$). Добавление возраста не оказывало влияния на повышение их качества.

Основываясь на трех наиболее значимых и легко определяемых маркерах – возраста, П-21 и С-21, произведено формирование рискованных классов и их ранжирование по уровню риска наличия опухолевого процесса. Построенная диаграмма дерева решений (рисунок 4), в качестве доступного и быстрого метода выявления КРП в клинической практике, обладает высокой чувствительностью и специфичностью (89% и 77%). Прогнозная ценность данной модели проверена ROC-анализом и говорит о ее высоком качестве (рисунок 5).

Далее при сравнении результатов между тремя маркерами диагностики КРП (С-21 ≥ 2 УЕ, П-21 $\geq 1,6$ УЕ и FOB), статистических различий в группах отмечено не было ($p=0,0541$). При проведении сравнительного анализа между тестом «FOB» и предложенным диагностическим алгоритмом последний показал себя более надежным методом, особенно в группе пациентов высокого риска (рисунок 6).

Применение разработанного алгоритма, основанного на определении уровня экспрессии С-21 и П-21, в качестве скрининга КРП в клинической практике не уступает используемому во всем мире тесту «FOB». Забор материала не требует подготовки, прост и легок в исполнении.

ВЫВОДЫ

1. Уровень экспрессии С-21 и П-21 в группе пациентов с колоректальным раком ($9,67 \pm 18,52$ УЕ и $3,71 \pm 7,38$ УЕ) был выше, чем в группе здоровых добровольцев ($1,3 \pm 2,4$ УЕ и $0,84 \pm 0,64$ УЕ) и не зависел от пола и возраста. Также отмечалось повышение уровня экспрессии С-21 при ранних стадиях колоректального рака.

2. Уровень экспрессии С-21 $\geq 2,0$ УЕ (чувствительность – 61% и специфичность – 83%, прогностическая ценность положительного результата – 73%; прогностическая ценность отрицательного результата – 31%) и П-21 $\geq 1,6$ УЕ (чувствительность – 52% и специфичность – 89%, прогностическая ценность положительного результата – 83%; прогностическая ценность отрицательного результата – 34,5%) обладают хорошими показателями $AuROC$ (0,75 и 0,63 соответственно), что делает их надежными маркерами диагностики колоректального рака. Значимыми факторами риска наличия колоректального рака, при однофакторном анализе, оказались возраст $>61,0$ лет ($p < 0,0001$), уровень экспрессии С-21 $\geq 2,0$ УЕ и П-21 $\geq 1,6$ УЕ ($p < 0,0001$).

3. Модель прогнозирования наличия онкологического процесса на основе уровня экспрессии С-21 хорошо показала себя при КРП ($AuROC = 0,79$) в отличие от немелкоклеточного рака легкого ($AuROC = 0,70$) и глиальных церебральных опухолей ($AuROC = 0,50$), а предложенный алгоритм диагностики КРП в виде модели

дерева решений, основанный на трех наиболее значимых факторах, С-21, П-21 и возраста, позволяет стратифицировать пациентов по риску наличия КРР и обладает высокими чувствительностью (88,7%) и специфичностью (76,6%) при $AuROC = 0,86$.

4. Сравнительный анализ между предложенным диагностическим алгоритмом ($C-21 \geq 2$ УЕ, $P-21 \geq 1,6$ и возраст $>61,0$) и используемым в настоящее время методом неинвазивной диагностики колоректального рака на основе иммунохроматографического теста определения скрытой крови в стуле (FOB) показал отсутствие статистически значимого различия между сравниваемыми маркерами ($p=0,0541$), что говорит о возможности его применения с целью скрининга.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью повышения эффективности диагностики колоректального рака целесообразно определять уровень экспрессии С-21 и П-21 методом ОТ-ПЦР.
2. Всех пациентов при значениях уровня экспрессии С-21 ≥ 2 УЕ необходимо отнести к группе повышенного риска наличия колоректального рака и рекомендовать выполнение фиброколоноскопии.
3. Разработанный алгоритм неинвазивной диагностики колоректального рака является безопасным, простым в исполнении, не требует предварительной подготовки и стимуляции, что позволяет рекомендовать его для ранней диагностики после валидации.
4. Использование микроРНК-21 в диагностике таких солидных опухолей как немелкоклеточный рак легкого ($P-21 \geq 3,5$ УЕ и $C-21 \geq 2,5$ УЕ) и глиальные церебральные опухоли ($P-21 \geq 1,5$ УЕ и $C-21 \geq 1,6$ УЕ), обладающих низким уровнем доказательности модели ($AuROC$ при $PL=0,70$, при $ГЦО=0,55$), требует дальнейшего изучения на большей выборке пациентов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Оценка эпигенетических биомаркеров – это развивающаяся область в онкологии, которая может помочь в скрининге рака, диагностике, идентификации подтипов опухолей, а также в прогнозировании ответа на терапию. Настоящее исследование продемонстрировало перспективность использования слюны в качестве материала для проведения неинвазивной диагностики колоректального рака, заложив основу для последующего валидационного исследования. В дальнейшем целесообразно оценить потенциальное использование микроРНК-21 слюны для скрининга ранних стадий колоректального рака, определения прогноза и мониторинга заболевания. Также необходимо выявление других специфических для колоректального рака микроРНК слюны, которые могут быть использованы для разработки персонализированного подхода к диагностике и лечению колоректального рака.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ГЦО – глиальные церебральные опухоли
 КГ – контрольная группа (здоровые добровольцы)
 КРР – колоректальный рак
 МикроРНК – малая некодирующая белок молекула РНК
 ОГ – основная группа (пациенты с колоректальным раком)
 ОТ-ПЦР – обратная транскриптазная полимеразная цепная реакция
 П-21 – микроРНК-21 в плазме крови
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 РЛ – немелкоклеточный рак легкого
 РНК – рибонуклеиновая кислота
 РЭА – раковый эмбриональный антиген
 С-21 – микроРНК-21 в слюне
 УЕ – условные единицы экспрессии
 FOBТ (FOB) – Fecal Occult Blood Test – тест на определение скрытой крови в стуле
 TNM – классификация Tumour, Node, Metastasis – Международная классификация злокачественных опухолей

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сазанов, А.А Профилирование экспрессии микроРНК-21 на стадиях II-IV колоректального рака с целью поиска биомаркеров для молекулярно-генетической диагностики / А.А. Сазанов, Е.В. Киселева, А.А.Захаренко, М.И. Зарайский / Современные биотехнологии для науки и практики : III Международный симпозиум, посвященный дню днк-2016. Тезисы. 21 апреля 2016. – Санкт-Петербург: ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, 2016. – С. 33.
2. Киселева, Е.В. Модель прогнозирования колоректального рака, основанная на определении уровня экспрессии микроРНК-21 в слюне и плазме / Е.В. Киселева, Ф.С. Нефедьев, А.А. Захаренко, М.И. Зарайский // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68, № 5. – С. 622-627. doi: 10.37469/0507-3758-2022-68-5-622-627.
3. Киселева, Е.В. Современные подходы к ранней диагностике колоректального рака / Е.В. Киселева, Ф.С. Нефедьев, А.А. Захаренко, М.И. Зарайский // Вестник хирургии. – 2022. – Т. 181, № 5. – С. 83-88. doi: 10.24884/0042-4625-2022-181-5-83-88.
4. Киселева, Е.В. Использование микроРНК-21 слюны и плазмы крови в качестве метода неинвазивной диагностики солидного рака / Е.В. Киселева, Ф.С. Нефедьев, А.А. Захаренко, М.И. Зарайский // XII съезд онкологов России посвященный 95-летию со дня рождения Н.Н. Трапезникова. Тезисы. 18-20 мая 2023. – Самара, 2023. – С. 105.

5. Zارايسкий М. Plasma and saliva expression of miR-21 in colorectal cancer / M. Zارايسкий, A. Sazanov, E. Kiseleva, A. Zakharenko // Modern Trends in Human Leukemia & Cancer : XXI Wilsede Meeting. June 18-21, 2016. – Wilsede: Germany, 2016. – P. 67.
6. **Sazanov, A.A. Plasma and saliva miR-21 expression in colorectal cancer patients. / A.A. Sazanov, E.V. Kiselyova, A.A. Zakharenko, M.N. Romanov, M.I. Zaraysky // J. Appl. Genet. – 2017. – Vol. 58, № 2. – P. 231-237. doi: 10.1007/s13353-016-0379-9.**

Свидетельство о регистрации базы данных

1. **Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2023620485 Российская Федерация. Расчет уровней экспрессии микроРНК-21 и клинические характеристики пациентов с колоректальным раком и здоровых добровольцев : № 2023620189 : заявл. 27.01.2023 : опубл. 06. 02. 2023 / Киселева Е.В., Захаренко А.А., Зарайский М.И.; правообладатель ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова. – Бюл. № 2.**