

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ ДИСПАЗИЙ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА КОЖИ

Сустретов В. А., Вереникина Е. В., Максимов А. Ю., Зварич А. М.,  
Захарова Н. А., Озеркова Е. А., Кутилин Д. С.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, Ростов-на-Дону, Российская Федерация, e-mail: k.denees@yandex.ru*

Плоскоклеточный рак кожи занимает второе место по распространённости среди немеланомных злокачественных новообразований кожи и демонстрирует неуклонный рост заболеваемости во всём мире. Предшественником этого заболевания в большинстве случаев является эпидермальная дисплазия, которая в зависимости от степени атипии имеет различный потенциал малигнизации. Дифференциальная диагностика между дисплазией тяжёлой степени и инвазивным раком кожи, а также отграничение начальных форм дисплазии от здоровой кожи остаются актуальной клинической задачей. Поэтому целью исследования стало выявление молекулярных маркеров эпидермальных дисплазий разной степени и плоскоклеточного рака кожи для улучшения малоинвазивной дифференциальной диагностики данных заболеваний. Проведён биоинформационный анализ открытых баз данных (TCGA, DisGeNET, cBioPortal, GTEx) для выявления ключевых генов и микроРНК. Валидация выполнена на выборке из 230 пациентов: 100 больных раком кожи, 90 пациентов с эпидермальными дисплазиями 1-3 степени и 40 условно здоровых доноров. Определение уровня экспрессии микроРНК проводили методом Real-Time qPCR в тканях и плазме крови. Для выявления маркерных микроРНК использовали LASSO-пенализованную логистическую регрессию с оптимизацией при помощи множественных перевыборочных (bootstrap) наборов данных. Выявлены 4 ключевые микроРНК (hsa-miR-423-5p, hsa-miR-937-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-326), экспрессия которых в плазме крови достоверно различается между группами. Разработан алгоритм дифференциальной диагностики с чувствительностью 90-95% и специфичностью 90%. Показано, что микроРНК таргетируют ключевые гены канцерогенеза кожи: *CDKN2A*, *TP53*, *EGFR* и *NOTCH1*. Таким образом, разработанный малоинвазивный алгоритм на основе анализа микроРНК в плазме крови позволяет проводить точную дифференциальную диагностику эпидермальных дисплазий и рака кожи, что даёт возможность персонализировать тактику лечения.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак кожи, эпидермальная дисплазия, актинический кератоз, микроРНК, малоинвазивная диагностика, LASSO-регрессия, биомаркеры.

## MOLECULAR DIAGNOSTICS OF EPIDERMAL DYSPLASIA AND SQUAMOUS CELL SKIN CARCINOMA

Sustretov V. A., Verenikina E. V., Maksimov A. Yu., Zvarich A. M.,  
Zakharova N. A., Ozerkova E. A., Kutilin D. S.

*Federal State Budgetary Institution  
National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation,  
Rostov-on-Don, Russian Federation, e-mail: k.denees@yandex.ru*

Squamous cell skin cancer is the second most common non-melanoma skin cancer and is steadily increasing in incidence worldwide. The precursor to this disease in most cases is epidermal dysplasia, which has varying malignant potential depending on the degree of atypia. Differentiating between high-grade dysplasia and invasive skin cancer, as well as distinguishing early forms of dysplasia from healthy skin, remains a pressing clinical challenge. Therefore, the aim of this study was to identify molecular markers for epidermal dysplasia of varying degrees and squamous cell skin cancer to improve minimally invasive differential diagnosis of these diseases. A bioinformatics analysis of open databases (TCGA, DisGeNET, cBioPortal, GTEx) was conducted to identify key genes and microRNAs. Validation was performed on a sample of 230 patients: 100 patients with skin cancer, 90 patients with grades 1-3 epidermal dysplasia, and 40 conditionally healthy donors. MicroRNA expression levels were determined using Real-Time qPCR in tissues and blood plasma. Marker microRNAs were identified using LASSO-penalized logistic regression with optimization using multiple bootstrapped datasets. Four key microRNAs (hsa-miR-423-5p, hsa-miR-937-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-326) were identified; their expression in blood plasma significantly differed between the groups. A differential diagnostic algorithm with a sensitivity of 90-95% and a specificity of 90% was developed. MicroRNAs have been shown to target key genes

involved in skin carcinogenesis: *CDKN2A*, *TP53*, *EGFR*, and *NOTCH1*. Thus, the developed minimally invasive algorithm based on microRNA analysis in blood plasma enables accurate differential diagnosis of epidermal dysplasias and skin cancer, enabling personalized treatment strategies.

Keywords: squamous cell skin cancer, epidermal dysplasia, actinic keratosis, microRNA, minimally invasive diagnostics, LASSO regression, biomarkers.

**Введение.** Плоскоклеточный рак кожи (ПРК) является вторым по частоте злокачественным новообразованием кожи после базальноклеточного рака. Заболеваемость ПРК продолжает расти во всём мире, что связано со старением населения, увеличением инсоляции и улучшением диагностики [1; 2]. По данным международного агентства по изучению рака (IARC), ежегодный прирост заболеваемости ПРК составляет 2-3% в развитых странах [3]. Актуальной проблемой остаётся ранняя дифференциальная диагностика предраковых состояний кожи (эпидермальных дисплазий, актинического кератоза) и инвазивного ПРК, поскольку тактика ведения пациентов существенно различается в зависимости от степени дисплазии [3]. Неправильная диагностика может привести как к недостаточному лечению с последующей прогрессией заболевания, так и к избыточной терапии с травматизацией пациента.

Дисплазия кожи и ПРК характеризуются специфическими молекулярными изменениями, в первую очередь затрагивающими гены, участвующие в росте клеток, дифференцировке и репарации ДНК. Эти изменения включают мутации в генах - супрессорах опухолей, таких как *TP53* и *CDKN2A*, а также активацию онкогенов, таких как *EGFR* и *CCND1* [3-5]. Выделяют несколько степеней эпидермальной дисплазии (актинического кератоза): 1-я степень (лёгкая, KIN 1) - атипия кератиноцитов ограничена нижней 1/3 эпидермиса, низкий риск малигнизации ( $\leq 5\%$ ), 2-я степень (умеренная, KIN 2) - атипичные клетки распространяются до 2/3 толщи эпидермиса, средний риск малигнизации (15-20%), 3-я степень (тяжёлая, KIN 3) - атипия во всех слоях эпидермиса, высокий риск малигнизации ( $\geq 60\%$ ) [6; 7].

Актинический кератоз (АК) считается предшественником ПРК и характеризуется молекулярными изменениями, в том числе мутациями *TP53* и инактивацией *CDKN2A* [4; 6]. ПРК имеет схожие молекулярные характеристики с АК, но при инвазивном ПРК генетические изменения часто более многочисленны и выражены тяжелее [6-8].

В последние годы уровень экспрессии определённых микроРНК стал рассматриваться в качестве прогностических и диагностических молекулярных маркеров [9; 10]. МикроРНК - это короткие некодирующие РНК (18-25 нуклеотидов), которые регулируют экспрессию генов, катализируя разрушение мРНК либо ингибируя трансляцию мРНК в белок. Одна микроРНК может таргетировать сотни генов-мишеней, что делает их мощными регуляторами клеточных процессов [11].

МикроРНК вносят значительный вклад в инициацию и развитие различных молекулярных событий, включая инициацию онкогенеза и прогрессирование опухолей [12; 13]. Важным преимуществом микроРНК как биомаркеров является их стабильность в биологических жидкостях, включая плазму крови, что открывает возможности для малоинвазивной диагностики [14]. Поэтому **целью настоящей работы стало** выявление молекулярных маркеров эпидермальных дисплазий разной степени и плоскоклеточного рака кожи для улучшения малоинвазивной дифференциальной диагностики данных заболеваний.

### Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на выборке из 230 участников в период с 2021 по 2025 год (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика участников исследования

Группа	Кол-во человек	Средний возраст (лет)	Мужчины/женщины	Материал
ПРК	100	68,5 ± 9,2	58/42	Замороженная ткань, плазма крови
Дисплазия 1-й степени (KIN 1)	30	62,3 ± 8,7	16/14	Замороженная ткань, плазма крови
Дисплазия 2-й степени (KIN 2)	30	64,1 ± 9,1	18/12	Замороженная ткань, плазма крови
Дисплазия 3-й степени (KIN 3)	30	67,8 ± 8,9	19/11	Замороженная ткань, плазма крови
Условно здоровые доноры	40	59,4 ± 7,5	22/18	Плазма крови

Примечание: составлено авторами на основе анализа клинических данных.

Критериями включения в исследование были следующие: возраст >18 лет; гистологически подтверждённый диагноз; подписанное информированное согласие; общее удовлетворительное состояние; отсутствие других злокачественных опухолей в анамнезе. Критериями невключения были: наличие других злокачественных опухолей; сопутствующая патология в стадии декомпенсации; отсутствие морфологической верификации; возраст <18 лет; проведение системной терапии в течение последних 6 месяцев.

На первом этапе работы проведён биоинформационный анализ открытых баз данных, включая TCGA (The Cancer Genome Atlas), DisGeNET, cBioPortal и GTEx. Анализ позволил установить ключевые гены, участвующие в развитии дисплазий и ПРК: *CDKN2A*, *TP53*, *EGFR* и *NOTCH1*. Поиск микроРНК таргетирующих гены-мишени, осуществляли с использованием метода машинного обучения Random forest. Результатом модели Random forest является предсказанная вероятность того, что микроРНК является истинным регулятором конкретного гена [15]. Критерии отбора микроРНК-кандидатов были следующие: вероятность связывания

(binding probability)  $\geq 0,95$ , энергия связывания  $\leq -19,0$  ккал/моль, наличие консервативного seed-региона и подтверждение в минимум двух базах данных (TargetScan, miRDB).

Препараты РНК плазмы крови получали при помощи модифицированного протокола Chomczynski и Sacchi [16]. К 300 мкл плазмы последовательно прибавляли 400 мкл денатурирующего буфера (6М гуанидин-изотиоцианат, 15 мМ Трис-ацетат, рН 6,5, 1% Sarkosyl, 2% 2-меркаптоэтанол) и 70 мкл 2М ацетата натрия, рН 4,0. К полученной смеси добавляют 700 мкл насыщенного водой фенола и перемешивают. Для разделения водной и органической фаз прибавляют 200 мкл смеси «хлороформ : изоамиловый спирт» (49 : 1), перемешивают в течение 10 сек. и инкубируют в течение 15 мин. при 4 °С. Затем полученную смесь центрифугируют при 10 000 g в течение 15 мин. при 2 °С. Верхнюю водную фазу отбирают и переносят в новую пробирку. К водной фазе прибавляют равный объем этанола и наносят на колонку с фильтром из диоксида кремния (использовали колонки из набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия), РНК эффективно связывается с мембраной из диоксида кремния). Колонку дважды промывают буфером (4М гуанидин-изотиоцианат, 10 мМ трис-ацетат, 50% этанол, 1% 2-меркаптоэтанол) и центрифугируют. Затем колонку дважды промывают буфером (10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,1 М NaCl, 75% этанол), центрифугируют при 400 g, 1 мин. Для элюции РНК в колонку добавляют 120 мкл деионизированной воды с ингибитором РНКаз. Элюат собирают центрифугированием при 400 g, 10 мин. [17].

Для выявления зрелых микроРНК выделенную суммарную РНК подвергали реакции обратной транскрипции, которая проводилась одновременно с полиаденилированием РНК, с использованием специфичных RT-праймеров (обратный праймер, содержащий олиго(dT)-последовательность и адаптерную последовательность на 5'-конце). Реакцию проводили в течение 30 мин. при 22 °С, 15 мин. при 40 °С, затем обратную транскриптазу инактивировали в течение 5 минут при 85 °С.

Полученную комплементарную ДНК (кДНК) использовали в реакциях RT-qPCR. Амплификацию проводили в 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей 1x ПЦР-буфер, 0,25 мМ dNTPs, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1x EvaGreen, 1 ед. акт. Taq-DNA-полимеразы, по 400 нМ прямого и обратного праймеров. Постановку RT-qPCR каждого образца проводили в трёх повторах на амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, США) по следующей программе: 2 минуты 95 °С, 50 циклов: денатурация при 95 °С 10 с, отжиг и элонгация – 64 °С 20 с. Относительную экспрессию микроРНК вычисляли следующим образом: рассчитывали среднее геометрическое C<sub>t</sub> по трём повторам для целевой и референсной микроРНК, далее рассчитывали величину  $\Delta C_t = C_t(\text{целевая микроРНК}) - C_t(\text{hsa-miR-7-5p})$  и коэффициент относительной экспрессии (eK) по формуле  $1.9^{-\Delta C_t}$  [18].

Нормальность распределения оценивали с помощью теста Шапиро - Уилка. Поскольку распределение уровней экспрессии микроРНК отличалось от нормального, для описания данных использовали медиану (Me) и интерквартильный размах (Q1-Q3). Статистическую значимость различий между группами оценивали с помощью критерия Краскела - Уоллиса с последующим попарным сравнением по методу Дунна с поправкой на множественные сравнения (пост-хок-тест). Уровень статистической значимости принимали при  $p < 0,05$ . Все статистические расчёты выполняли в программной среде R версии 4.2.0 с использованием пакетов *glmnet*, *pROC* и *ggplot2*. Для получения надёжной диагностической модели использовали LASSO-пенализованную логистическую регрессию, оптимизированную при помощи множественных переВыборочных (bootstrap) наборов данных. LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator) позволяет одновременно выполнять отбор переменных и регуляризацию модели, что особенно важно при работе с высокоразмерными данными [19].

Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП НМИЦ онкологии МЗ РФ (регистрационный номер 3554742, <https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>).

### Результаты исследования и их обсуждение

**Биоинформатический анализ взаимодействия микроРНК и генов-мишеней.** На основании анализа баз данных TCGA и DisGeNET, а также литературы были установлены ключевые гены, участвующие в развитии дисплазий и ПРК. Поиск микроРНК, таргетирующих гены-мишени, позволил составить первоначальный перечень из 13 кандидатов. После применения критериев отбора и валидации методом Random Forest были выделены 4 наиболее перспективные микроРНК (табл. 2).

Таблица 2

Основные микроРНК и их гены-мишени, участвующие в патогенезе ПРК  
(результаты биоинформационного скрининга)

МикроРНК	Ген-мишень	Энергия связывания (ккал/моль)	Вероятность связывания	Позиция связывания	Seed-регион	Подтверждение в базах
miR-296-3p	<i>CDKN2A</i>	-26,8	1,0	3'UTR (900-917)	Да	TargetScan
miR-423-5p	<i>CDKN2A</i>	-19,8	1,0	3'UTR (1064-1079)	Да	TargetScan, miRDB
miR-937-5p	<i>TP53</i>	-30,4	0,95	3'UTR (1550-1571)	Да	TargetScan
miR-155-5p	<i>EGFR</i>	-19,0	1,0	3'UTR (2781-2801)	Да	TargetScan, miRDB

miR-326	<i>NOTCH1</i>	-29,4	1,0	3'UTR (9083-9134)	Да	TargetScan
---------	---------------	-------	-----	----------------------	----	------------

Примечание: составлено авторами на основе полученных данных в ходе исследования.

Биоинформатический анализ показал, что все отобранные микроРНК имеют высокую вероятность связывания с 3'UTR регионами целевых генов. Энергия связывания варьирует от -19,0 до -30,4 ккал/моль, что указывает на стабильность комплексов микроРНК-мРНК. Особенно сильное связывание наблюдается для hsa-miR-937-5p с *TP53* (-30,4 ккал/моль) и hsa-miR-326 с *NOTCH1* (-29,4 ккал/моль). Анализ консервативности seed-регионов показал, что все выбранные микроРНК имеют консервативные seed-последовательности, что подтверждает их эволюционную значимость и функциональную важность в регуляции экспрессии генов-мишеней.

**Экспрессия микроРНК в тканях и плазме крови.** Валидация выбранных микроРНК методом RT-PCR в образцах тканей и в плазме крови показала значимые различия между группами пациентов. Статистически значимые различия наблюдались по всем четырём микроРНК как в ткани, так и в плазме ( $p < 0,001$  по критерию Краскела - Уоллиса, табл. 3).

Таблица 3

Уровни экспрессии микроРНК в тканях и плазме крови у пациентов с дисплазиями и ПРК

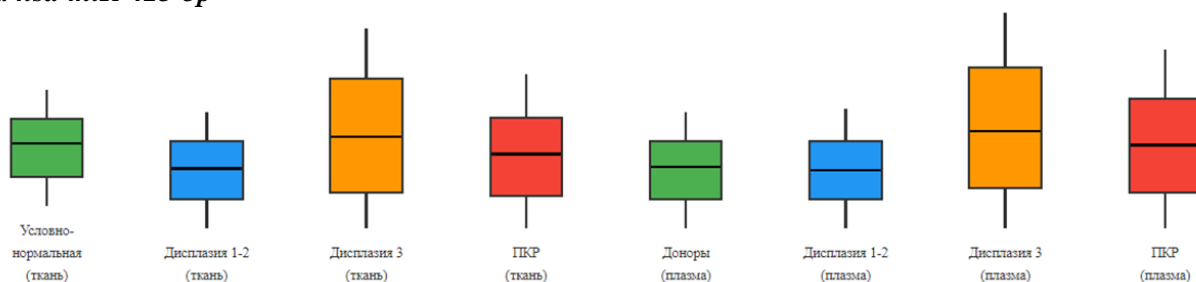
МикроРНК	Экспрессия в ткани (Ме [Q1-Q3])				Экспрессия в плазме (Ме [Q1-Q3])			
	Условно нормальная ткань	Дисплазия 1-2 ст.	Дисплазия 3 ст.	ПРК	Доноры	Дисплазия 1-2 ст.	Дисплазия 3 ст.	ПРК
hsa-miR-423-5p	0,0005 [0,0004-0,0006]	0,0008 [0,0006-0,0010]	0,0047 [0,0036-0,0058] *	0,0027 [0,0019-0,0035] *	0,0006 [0,0004-0,0008]	0,0009 [0,0006-0,0012]	0,0030 [0,0021-0,0039] *	0,0040 [0,0028-0,0052] *
hsa-miR-937-5p	0,0035 [0,0026-0,0044]	0,0045 [0,0033-0,0057]	0,0060 [0,0045-0,0075] *	0,0098 [0,0077-0,0119] *	0,0050 [0,0037-0,0063]	0,0070 [0,0052-0,0088]	0,0080 [0,0060-0,0100] *	0,0100 [0,0075-0,0125] *
hsa-miR-155-5p	0,00120 [0,00080-0,00160]	0,00096 [0,00066-0,00126]	0,000079 [0,000059-0,000099] *	0,000042 [0,000032-0,000052] *	0,00018 [0,00013-0,00023]	0,00014 [0,00010-0,00018]	0,000068 [0,000048-0,000088] *	0,000025 [0,000015-0,000035]
hsa-miR-326	0,072 [0,054-0,090]	0,059 [0,044-0,074]	0,041 [0,030-0,052] *	0,0022 [0,0016-0,0028] *	0,068 [0,051-0,085]	0,056 [0,042-0,070]	0,026 [0,019-0,033] *	0,0015 [0,0011-0,0019] *

Примечание: \* - статистически значимые отличия от контроля (условно нормальной ткани или плазмы доноров,  $p < 0,001$ ). Таблица составлена авторами на основе полученных данных в ходе исследования,

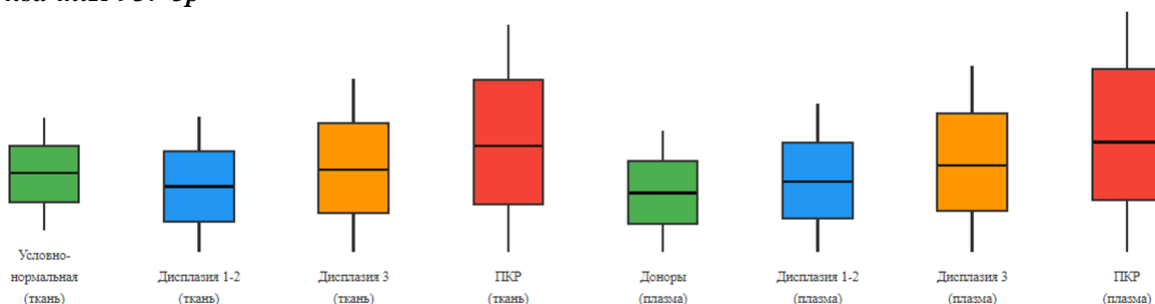
Анализ данных показал, что экспрессия hsa-miR-423-5p постепенно возрастает от дисплазии 1-2 степени к ПРК. В плазме крови наблюдается более выраженная динамика по сравнению с тканью, что может быть связано с активной секрецией экзосомальных микроРНК опухолевыми клетками. Различия между группами статистически значимы ( $p < 0,001$ ). Для hsa-miR-937-5p наблюдается аналогичная тенденция к повышению экспрессии при прогрессировании заболевания. Наибольшие значения наблюдаются при ПРК. Коэффициент вариации в группе ПРК составил 25,5%, что указывает на гетерогенность опухоли. Значения в нормальной ткани были в 2,8 раза ниже, чем в ткани ПРК ( $p < 0,0001$ ).

Экспрессия hsa-miR-155-5p снижается при переходе от дисплазии к ПРК. Данная микроРНК известна как онкосупрессор в контексте ПРК, и её снижение может способствовать активации сигнального пути EGFR. При ПРК наблюдается снижение экспрессии более чем в 5 раз по сравнению с дисплазией 1-2 степени (Ме 0,000025 против 0,00014 в плазме,  $p < 0,001$ ). Наиболее выраженное снижение экспрессии hsa-miR-326 выявлено при ПРК по сравнению с дисплазиями (в 38 раз в ткани и в 37 раз в плазме,  $p < 0,001$ ). Эта микроРНК таргетирует *NOTCH1*, и её снижение может приводить к активации сигнального пути NOTCH, что способствует прогрессии опухоли. Корреляционный анализ Спирмена показал сильную положительную корреляцию между уровнями экспрессии микроРНК в ткани и плазме крови ( $r = 0,82-0,89$ ,  $p < 0,001$ ), что подтверждает возможность использования плазмы крови для малоинвазивной диагностики.

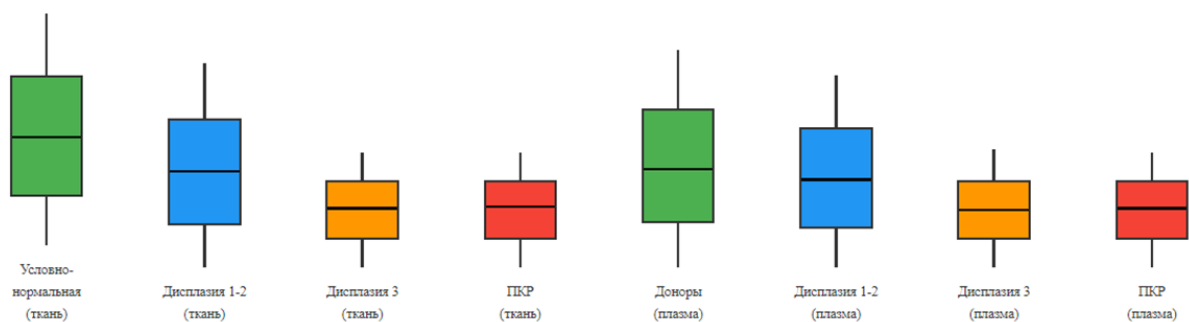
#### A. hsa-miR-423-5p



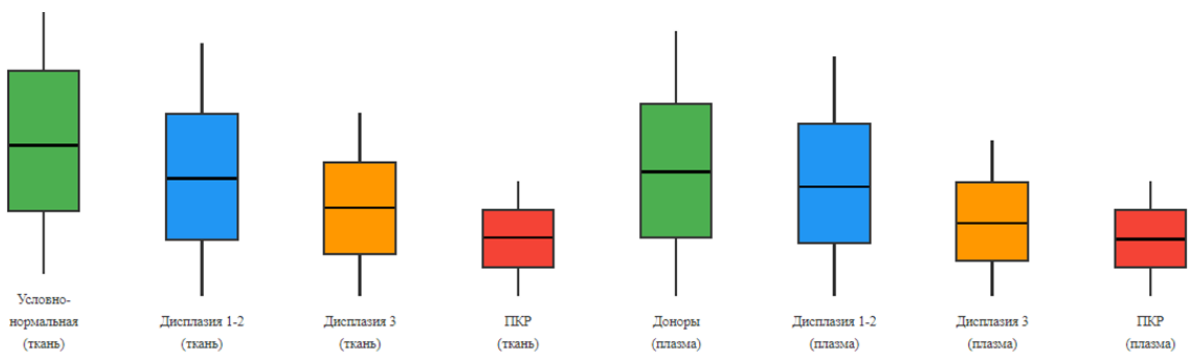
#### B. hsa-miR-937-5p



#### C. hsa-miR-155-5p



**D. hsa-miR-326**



*Рис. 1. Box-plot диаграммы экспрессии микроРНК в ткани и плазме крови у пациентов с дисплазиями разной степени и ПРК*

*(по оси Y - относительная экспрессия (eK), Box показывают 25-75 перцентили, линия внутри box - медиана, whiskers - минимальные и максимальные значения без выбросов).*

*Составлено авторами по результатам данного исследования*

**LASSO-пенализованный регрессионный анализ.** Для выявления наиболее информативных микроРНК-маркеров был проведён LASSO-пенализованный логистический регрессионный анализ. Метод LASSO позволяет одновременно выполнять отбор переменных и регуляризацию модели, что особенно важно при работе с высокоразмерными данными и ограниченным размером выборки [20].

Математическая модель LASSO минимизирует следующую функцию потерь:

$$L(\beta) = -\log\text{-likelihood} + \lambda \times \sum |\beta_j| ,$$

где  $\lambda$  - параметр регуляризации,  $\beta_j$  - коэффициенты регрессии для каждой микроРНК. Оптимальное значение  $\lambda$  подбирали методом кросс-валидации (10-fold).

В результате анализа с использованием множественных перевыборочных (bootstrap) наборов данных (1000 итераций) были отобраны 4 микроРНК с наибольшей прогностической ценностью (табл. 4).

Таблица 4

Результаты LASSO-регрессионного анализа для выявления маркерных микроРНК

МикроРНК	Коэффициент LASSO ( $\beta$ )	Стандартная ошибка	Частота включения	OR (95% CI)	p-значение	VIP score
----------	-------------------------------	--------------------	-------------------	-------------	------------	-----------

			в модель (%)				
miR-423-5p	0,847	0,112	98,5	2,33 (1,89-2,87)	<0,001		1,45
miR-937-5p	0,762	0,098	97,2	2,14 (1,75-2,62)	<0,001		1,38
miR-155-5p	-0,923	0,125	96,8	0,40 (0,31-0,51)	<0,001		1,52
miR-326	-1,156	0,138	99,1	0,31 (0,24-0,41)	<0,001		1,67

Примечание: таблица составлена авторами на основе полученных данных в ходе исследования.

Положительные коэффициенты для hsa-miR-423-5p и hsa-miR-937-5p указывают на то, что повышение их экспрессии ассоциировано с повышенным риском прогрессирования заболевания. Отрицательные коэффициенты для hsa-miR-155-5p и hsa-miR-326 свидетельствуют об обратном: снижение их экспрессии коррелирует с развитием ПРК. VIP score (Variable Importance in Projection) показывает относительную важность каждой переменной в модели. hsa-miR-326 имеет наивысший VIP score (1,67), что делает её наиболее информативным маркером для дифференциации дисплазии 3 степени и ПРК.

Для построения мультимаркерной панели применили LASSO-логистическую регрессию к данным экспрессии четырёх микроРНК в плазме. Поскольку задача состояла в последовательном различении трёх клинически значимых категорий (дисплазия 1–2, дисплазия 3, ПРК), использовали два бинарных классификатора: первый - для отделения дисплазии 1-2 от более тяжёлых поражений (объединённая группа дисплазия 3 + ПРК); второй - для разделения дисплазии 3 и ПРК. При  $\text{optim.lambda} = 0,023$  (первый классификатор) в модель были включены miR-423-5p и miR-937-5p с положительными коэффициентами. Во втором классификаторе ( $\text{lambda} = 0,018$ ) значимыми предикторами оказались miR-155-5p и miR-326 с отрицательными коэффициентами (рис. 2). ROC-анализ подтвердил высокую точность обеих моделей. Для первой модели AUC = 0,98 (95% ДИ 0,96–0,99), чувствительность 95%, специфичность 92% при пороге вероятности 0,5. Для второй модели AUC = 0,97 (95% ДИ 0,94–0,99), чувствительность 94%, специфичность 90% (рис. 2). Комбинированное использование двух этапов позволило достичь общей точности классификации 93%.

На основании полученных данных разработан диагностический алгоритм с использованием коэффициентов относительной экспрессии микроРНК ( $eK$ ). На основе распределения значений  $eK$  в группах определены оптимальные пороги по индексу Юдена (табл. 5). При  $eK_{\text{miR-423}} \leq 1,11 \times 10^{-3}$  и  $eK_{\text{miR-937}} \leq 7,01 \times 10^{-3}$  диагностируется дисплазия 1–2 степени; при превышении этих порогов показано дополнительное определение miR-155-5p и

miR-326. Значения  $eK_{miR-155} \geq 5,17 \times 10^{-5}$  и  $eK_{miR-326} \geq 8,24 \times 10^{-3}$  соответствуют дисплазии 3 степени, а более низкие - ПРК.

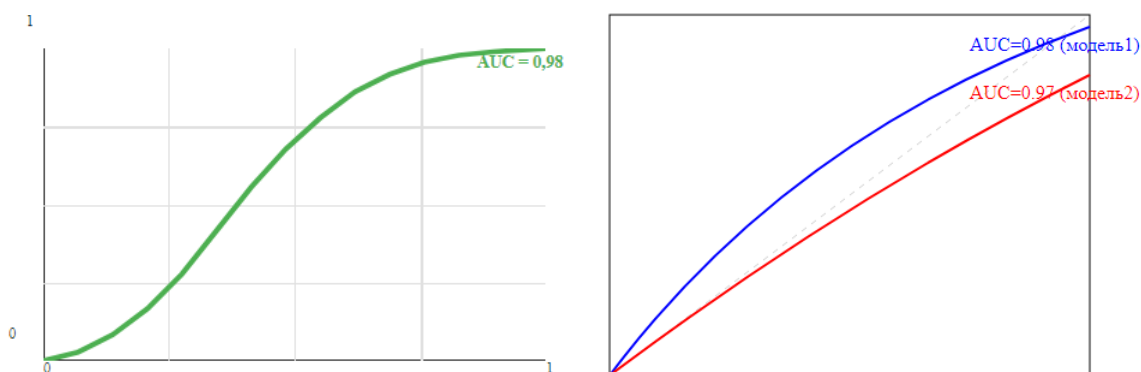


Рис. 2. ROC-кривые для оценки диагностической точности модели на основе микроРНК.

$AUC = 0,98$  (95% CI: 0,96-0,99).

Составлено авторами по результатам данного исследования

Таблица 5

Диагностические пороги и операционные характеристики

Сравнение	Пороги ( $eK \times 10^{-3}$ )	Чувствительность	Специфичность	PPV	NPV
Дисплазия 1-2 vs. Дисплазия 3+ПРК	miR-423 $\leq 1,11$ miR-937 $\leq 7,01$	90%	92%	94%	87%
Дисплазия 3 vs. ПРК	miR-155 $\geq 0,0517$ miR-326 $\geq 8,24$	95%	94%	93%	96%

Примечание: таблица составлена авторами на основе полученных данных в ходе исследования.

Алгоритм включает двухэтапную диагностику. На этапе 1 происходит разделение групп здоровых доноров, пациентов с дисплазией 1-2 степени и пациентов с дисплазией 3 степени/ПРК. При  $eK_{miR-423} \leq 1,11 \times 10^{-3}$  и  $eK_{miR-937} \leq 7,01 \times 10^{-3}$  диагностируют дисплазию 1-2 степени (чувствительность 90%, специфичность 92%). При  $eK_{miR-423} \geq 2,09 \times 10^{-3}$  и  $eK_{miR-937} \geq 7,95 \times 10^{-3}$  - диагностируют дисплазию 3 степени или ПРК (чувствительность 95%, специфичность 91%). На этапе 2 происходит дифференциация дисплазии 3 степени и ПРК. При  $eK_{miR-155} \geq 5,17 \times 10^{-5}$  и  $eK_{miR-326} \geq 8,24 \times 10^{-3}$  - диагностируют дисплазию 3 степени (чувствительность 95%, специфичность 93%). При  $eK_{miR-155} \leq 3,52 \times 10^{-5}$  и  $eK_{miR-326} \leq 6,45 \times 10^{-3}$  - диагностируют ПРК (чувствительность 94%, специфичность 92%). При значениях коэффициента  $eK$  между указанными интервалами результат считают неопределённым и рекомендуют дополнительное обследование (повторный анализ через 4-6 недель или биопсия).

Для оценки воспроизводимости метода был проведён анализ внутрилабораторной вариабельности. Коэффициент вариации (CV) для внутрилабораторных повторностей составил 4,2-6,8%, что соответствует принятым стандартам для молекулярно-диагностических тестов. Полученные данные демонстрируют высокий диагностический потенциал анализа микроРНК в плазме крови для дифференциальной диагностики эпидермальных дисплазий и ПРК. Чувствительность 90-95% и специфичность 90% (AUC 0,98) превосходят показатели традиционных методов диагностики, таких как дерматоскопия (чувствительность 75-85%) и цитологическое исследование (чувствительность 70-80%) [21].

Биоинформатический анализ подтвердил биологическую обоснованность выбора микроРНК-маркеров. Все отобранные микроРНК таргетируют ключевые гены канцерогенеза кожи. Так, hsa-miR-423-5p таргетирует *CDKN2A*- регулятор клеточного цикла, кодирует белки p16<sup>INK4a</sup> и p14<sup>ARF</sup>. Инактивация *CDKN2A* наблюдается в 60-80% случаев ПРК [22]. hsa-miR-937-5p → *TP53* - главный супрессор опухолей, мутации в *TP53* обнаруживаются в 90% случаев ПРК и 50% случаев актинического кератоза [23]. hsa-miR-155-5p → *EGFR* - рецептор эпидермального фактора роста, гиперэкспрессия *EGFR* наблюдается в 70-90% ПРК и ассоциирована с агрессивным течением [24]. А hsa-miR-326 → *NOTCH1* - сигнальный путь дифференцировки кератиноцитов, мутации *NOTCH1* являются ранним событием в канцерогенезе кожи [25]. Изменения экспрессии этих микроРНК в плазме крови отражают молекулярные процессы, происходящие в опухолевой ткани, что делает их надёжными жидкостными биомаркерами. Механизм появления микроРНК в плазме включает активную секрецию через экзосомы, пассивное высвобождение при апоптозе и некрозе клеток, а также связывание с белками (Ago2) и липопротеинами высокой плотности [26]. Известно, что инактивация *CDKN2A* (p16) и мутации *TP53* являются ранними событиями в развитии актинического кератоза [3]. Повышение уровня miR-423-5p и miR-937-5p, нацеленных соответственно на *CDKN2A* и *TP53*, может отражать попытку клеток подавить экспрессию этих супрессоров. Примечательно, что в тканях дисплазии 3 и ПРК наблюдается дальнейший рост этих микроРНК, что согласуется с нарастанием генетической нестабильности. С другой стороны, снижение miR-155-5p (мишень - онкоген *EGFR*) и miR-326 (мишень - *NOTCH1*) при переходе от дисплазии 3-й степени к инвазивному раку может свидетельствовать о переключении сигнальных путей: если на стадии carcinoma in situ сохраняется высокая экспрессия этих микроРНК, сдерживающая пролиферацию, то при инвазии происходит их эпигенетическое сайленсирование, что ведёт к дерепрессии *EGFR* и *NOTCH1* и ускорению опухолевого роста. Аналогичные данные получены для плоскоклеточного рака других локализаций [12].

Таким образом, применение LASSO-регрессии позволило подтвердить значимость выбранных микроРНК и количественно оценить их вклад. Высокие значения AUC свидетельствуют о превосходной дискриминационной способности модели.

### **Заключение**

В ходе исследования впервые комплексно проанализированы молекулярные особенности (транскриптомные) ПРК и эпидермальных дисплазий разной степени. В настоящем исследовании впервые предложена малоинвазивная панель из 4 микроРНК плазмы крови для дифференциальной диагностики различных стадий эпидермальной дисплазии и ПРК. Выбор микроРНК базировался на биоинформатическом предсказании их взаимодействия с ключевыми генами канцерогенеза кожи: *CDKN2A*, *TP53*, *EGFR* и *NOTCH1*. Применение результатов исследования в клинической практике специалистов онкологического профиля позволит повысить эффективность лечения ПРК за счёт ранней диагностики и своевременного вмешательства.

### **Список литературы**

1. Сустретов В. А., Кутилин Д. С., Максимов А. Ю., Шатова Ю. С., Касьяненко В. Н. Генетические и эпигенетические аномалии при злокачественных новообразованиях кожи: базальноклеточный и плоскоклеточный рак // Современные проблемы науки и образования. 2022. № 4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=31793> (дата обращения: 15.05.2026). DOI: 10.17513/spno.31793.
2. Maner B. S., Dupuis L., Su A., Jueng J. J., Harding T. P., Meisenheimer VII J., Siddiqui F. S., Hardack M. R., Aneja S., Solomon J. A. Overview of genetic signaling pathway interactions within cutaneous malignancies // J Cancer Metastasis Treat. 2020. Vol. 6. P.37. DOI: 10.20517/2394-4722.2020.60. URL: <https://www.oaepublish.com/articles/2394-4722.2020.60> (дата обращения: 15.05.2026).
3. Hedberg M. L., Berry C. T., Moshiri A. S., Xiang Y., Yeh C. J., Attilasoy C., Capell B. C., Seykora J. T. Molecular Mechanisms of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma // Int J Mol Sci. 2022. Vol. 23(7). P. 3478. DOI: 10.3390/ijms23073478. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35408839> (дата обращения: 15.05.2026).
4. Piipponen M., Riihilä P., Nissinen L., Kähäri V. M. The Role of p53 in Progression of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma // Cancers (Basel). 2021. Vol. 13(18). P.4507. DOI: 10.3390/cancers13184507. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8466956/> (дата обращения: 15.05.2026).

5. Hosseini T. M., Park S. J., Guo T. The Mutational and Microenvironmental Landscape of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review // *Cancers (Basel)*. 2024. Vol. 16(16). P. 2904. DOI:10.3390/cancers16162904. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11352924/> (дата обращения: 15.05.2026).
6. Thomson J., Bewicke-Copley F., Anene C. A., Gulati A., Nagano A., Purdie K., Inman G. J., Proby C. M., Leigh I. M., Harwood C. A., Wang J. The Genomic Landscape of Actinic Keratosis // *J Invest Dermatol*. 2021. Vol. 141(7). P. 1664-1674.e7. DOI: 10.1016/j.jid.2020.12.024. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8221374/> (дата обращения: 15.05.2026).
7. Li Z., Lu F., Zhou F., Song D., Chang L., Liu W., Yan G., Zhang G. From actinic keratosis to cutaneous squamous cell carcinoma: the key pathogenesis and treatments // *Front Immunol*. 2025. Vol. 16. P. 1518633. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1518633. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39925808/> (дата обращения: 15.05.2026).
8. Cozma E. C., Banciu L. M., Soare C., Cretoiu S. M. Update on the Molecular Pathology of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24(7). P. 6646. DOI: 10.3390/ijms24076646. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37047618> (дата обращения: 15.05.2026).
9. Sobolewski P., Koper M., Wasaznik-Jedras A., Kolos M., Walecka I. Histological and Genetic Markers of Cellular Senescence in Keratinocyte Cancers and Actinic Keratosis: A Systematic Review// *International Journal of Molecular Sciences*. 2026. Vol. 27(3). P.1520. DOI:10.3390/ijms27031520. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41683940> (дата обращения: 15.05.2026).
10. Димитриади Т. А., Бурцев Д. В., Дженкова Е. А., Кутилин Д. С. МикроРНК как маркеры прогрессирования предраковых заболеваний в рак шейки матки // *Современные проблемы науки и образования*. 2020. № 1. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29529> (дата обращения: 15.05.2026). DOI: 10.17513/spno.29529.
11. O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation// *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018. Vol. 9. P. 402. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30123182> (дата обращения: 15.05.2026).
12. Sathasivam H. P., Kist R., Sloan P., Thomson P., Nugent M., Alexander J., Haider S., Robinson M. Predicting the clinical outcome of oral potentially malignant disorders using transcriptomic-based molecular pathology // *Br J Cancer*. 2021. Vol. 125(3). P. 413-421. DOI: 10.1038/s41416-021-01411-z. URL:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33972745> (дата обращения: 15.05.2026).

13. Ratti M., Lampis A., Ghidini M., Salati M., Mirchev M. B., Valeri N., Hahne J. C. MicroRNAs (miRNAs) and Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) as New Tools for Cancer Therapy: First Steps from Bench to Bedside// *Target Oncol.* 2020. Vol.15(3). P.261-278. DOI: 10.1007/s11523-020-00717-x. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32451752/> (дата обращения: 15.05.2026).
14. Katayama E. S., Hue J. J., Loftus A. W., Ali S. A., Graor H. J., Rothermel L. D., Londin E., Zarei M., Winter J.M. Stability of microRNAs in serum and plasma reveal promise as a circulating biomarker// *Noncoding RNA Res.* 2025. Vol.15. P.132-141. DOI: 10.1016/j.ncrna.2025.08.001. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40926836/> (дата обращения: 15.05.2026).
15. Kutilin D. S., Gusareva M. A., Kosheleva N. G., Kit O. I. Regulatory network of competitively interacting RNAs and effectiveness of rectal tumors radiotherapy// *Klin Onkol* 2022.Vol. 35(4). P. 297-306. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35989087/>. (дата обращения: 15.05.2026). DOI: 10.48095/ccko2022297.
16. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform extraction: twenty-something years on // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1, № 2. P. 581-585. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406285> (дата обращения: 15.05.2026). DOI: 10.1038/nprot.2006.83.
17. Кутилин Д. С., Димитриади С. Н., Пулатова А. А., Франциянц Е. М., Зыкова Т. А., Хван В. К., Розенко А. Д. Способ прогнозирования развития рецидива у больных с вирусом папилломы человека и немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря. Патент РФ RU2800265C1. 2023. URL: <https://patents.google.com/patent/RU2800265C1/ru> (дата обращения: 15.05.2026).
18. Кутилин Д. С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком// *Молекулярная биология.* 2020. Т. 54. № 4. С. 580-595. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=42963750> (дата обращения: 15.05.2026). DOI: 10.31857/S0026898420040096.
19. Friedman J., Hastie T., Tibshirani R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent// *J Stat Softw.* 2010. Vol. 33(1). P. 1-22. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20808728> (дата обращения: 15.05.2026). DOI: 10.18637/jss.v033.i01.
20. Kirpich A., Ainsworth E. A., Wedow J. M., Newman J. R. B., Michailidis G., McIntyre L. M. Variable selection in omics data: A practical evaluation of small sample sizes// *PLoS One.* 2018. Vol. 13(6). P. 0197910. DOI: 10.1371/journal.pone.0197910 (дата обращения: 15.05.2026).
21. Argenziano G., Zalaudek I., Corona R., Sera F., Cicale L., Petrillo G., Ruocco E., Hofmann-Wellenhof R., Soyer H.P. Vascular structures in skin tumors: a dermoscopy study // *Arch Dermatol.* 2004. Vol.140(12). P.1485-9. DOI: 10.1001/archderm.140.12.1485.

22. Tsang D. A., Tam S. Y. C., Oh C. C. Molecular Alterations in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Immunocompetent and Immunosuppressed Hosts-A Systematic Review // *Cancers* (Basel). 2023. Vol. 15(6). P.1832. DOI:10.3390/cancers15061832.
23. Pickering C. R., Zhou J. H., Lee J. J., Drummond J. A., Peng S. A., Saade R. E., Tsai K. Y., Curry J. L., Tetzlaff M. T., Lai S. Y., Yu J., Muzny D. M., Doddapaneni H., Shinbrot E., Covington K. R., Zhang J., Seth S., Caulin C., Clayman G. L., El-Naggar A. K., Gibbs R. A., Weber R. S., Myers J. N., Wheeler D. A., Frederick M. J. Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma// *Clin Cancer Res*. 2014. Vol. 20(24). P. 6582-6592. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1768. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25303977/> (дата обращения: 15.05.2026).
24. Maubec E., Petrow P., Scheer-Senyarich I., Duvillard P., Lacroix L., Gelly J., Certain A., Duval X., Crickx B., Buffard V., Basset-Seguin N., Saez P., Duval-Modeste A.B., Adamski H., Mansard S., Grange F., Domp Martin A., Faivre S., Mentré F., Avril M.F. Phase II study of cetuximab as first-line single-drug therapy in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the skin // *J Clin Oncol*. 2011. Vol. 29(25). P. 3419-3426. DOI: 10.1200/JCO.2010.34.1735. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21810686/> (дата обращения: 15.05.2026).
25. Durinck S., Ho C., Wang N. J., Liao W., Jakkula L. R., Collisson E. A., Pons J., Chan S. W., Lam E. T., Chu C., Park K., Hong S. W., Hur J. S., Huh N., Neuhaus I. M., Yu S. S., Grekin R. C., Mauro T. M., Cleaver J. E., Kwok P. Y., LeBoit P. E., Getz G., Cibulskis K., Aster J. C., Huang H., Purdom E., Li J., Bolund L., Arron S. T., Gray J. W., Spellman P. T., Cho R. J. Temporal dissection of tumorigenesis in primary cancers // *Cancer Discov*. 2011. Vol. 1(2) P. 137-143. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0028. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21984974> (дата обращения: 15.05.2026).
26. 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. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. Vol. 108(12). P. 5003-5008. DOI: 10.1073/pnas.1019055108. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21383194>. (дата обращения: 15.05.2026).

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest:** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Финансирование:** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

**Financing:** The research was performed without external funding.