

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Максимов Р.А., Колесников Е.Н., Демидов С.И., Тимошкина Н.Н., Власов С.Н.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК У БОЛЬНЫХ ЗАБРЮШИННЫМИ ЛИПОСАРКОМАМИ ДЛЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО МОНИТОРИНГА ТЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения России, 344019, Ростов-на-Дону, Россия

*Цель работы - сравнить экспрессионную активность дифференциально экспрессированных микроРНК (миРНК) в ткани липосарком различного гистологического типа с их экспрессией в сыворотке крови для разработки системы послеоперационного мониторинга течения болезни. Исследование проведено на 87 пациентах с забрюшинными неорганными липосаркомами. Высокодифференцированные липосаркомы установлены у 51 (58,6%) больного, дедифференцированные у 26 (29,9%), плеоморфные у 7 (8,1%) и миксоидная у 3 (3,4%) пациентов. В течение 40 месяцев после операции фиксировали рецидивы заболевания и формировали две подгруппы пациентов в зависимости от течения болезни. Результаты экспрессии миРНК в опухолевых клетках операционных образцов, сыворотки крови как до, так и через 6 месяцев после операции ретроспективно сравнивали в подгруппах больных с наличием и отсутствием рецидивов. Формировали комплексную модель оценки риска развития рецидивов заболевания. В результате исследования идентифицированы специфические миРНК (миРНК-34, -619-5p, -1246, -4532), которые дифференцированно экспрессировались одновременно в сыворотке и опухолевой ткани у больных с забрюшинными липосаркомами. Для миРНК-34 и миРНК-1246 установлена статистически значимая связь между уровнями их содержания в ткани опухоли и сыворотки крови независимо от гистологического типа опухоли. миРНК-1246 показала самый высокий коэффициент корреляции. Анализ экспрессии миРНК-34 и миРНК-1246 в сыворотке крови через 6 месяцев после операции повышал прогностическую информативность оценки риска развития рецидива заболевания у больных с забрюшинными липосаркомами наряду с учетом степени злокачественности опухоли, состояния края хирургической резекции. Установлены разделительные уровни экспрессии для молекул в сыворотке крови через 6 месяцев после операции для формирования прогноза развития рецидивов. Идентифицированные циркулирующие миРНК-34 и миРНК-1246 представляют ценность в качестве биомаркеров при прогнозе течения забрюшинных липосарком.*

**Ключевые слова:** забрюшинные липосаркомы; прогноз рецидивов; биологические маркеры; микроРНК; дифференцированная экспрессия молекул

**Для цитирования:** Максимов Р.А., Колесников Е.Н., Демидов С.И., Тимошкина Н.Н., Власов С.Н. Перспективы применения циркулирующих некодирующих РНК у больных забрюшинными липосаркомами для послеоперационного мониторинга течения болезни. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (9): 439-444.  
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-9-439-444>

**Для корреспонденции:** Максимов Роман Алексеевич, аспирант; e-mail: [alald@inbox.ru](mailto:alald@inbox.ru)

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

Поступила 10.06.2024

Принята к печати 22.07.2024

Опубликовано 00.09.2024

*Maksimov R.A., Kolesnikov E.N., Demidov S.I., Timoshkina N.N., Vlasov S.N.*

## PROSPECTS FOR THE USE OF CIRCULATING NON-CODING RNAs IN PATIENTS WITH RETROPERITONEAL LIPOSARCOMAS FOR POSTOPERATIVE MONITORING OF THE COURSE OF THE DISEASE

National Medical Research Center of Oncology» of Ministry of Health of the Russian Federation, 344019, Rostov-on-Don, Russia

*The aim of the work was to compare the expression activity of differentially expressed microRNAs (miRNAs) in liposarcoma tissue of various histological types with their expression in blood serum to develop a system for postoperative monitoring of the disease. The study was conducted on 87 patients with retroperitoneal nonorgan liposarcomas. Well-differentiated liposarcomas were identified in 51 (58,6%) patients, dedifferentiated in 26 (29,9%), pleomorphic in 7 (8,1%) and myxoid in 3 (3,4%) patients. For 40 months after surgery, relapses of the disease were recorded and two subgroups of patients were formed depending on the course of the disease. Results of miRNA expression in tumor cells of surgical samples and blood serum both before and after 6 months. After surgery were retrospectively compared in subgroups of patients with and without relapses. We formed a comprehensive model for assessing the risk of disease relapse. As a result of the study, specific miRNAs were identified (miRNA-34, -619-5p, -1246, -4532), which were differentially expressed simultaneously in the serum and tumor tissue of patients with retroperitoneal liposarcomas. For miRNA-34 and miRNA-1246, a statistically significant relationship was established between the levels of their content in tumor tissue and blood serum, regardless of the histological type of tumor. miRNA-1246 showed the highest correlation coefficient. Analysis of the expression of miRNA-34 and miRNA-1246 in blood serum 6 months after surgery increased the prognostic information value of assessing the risk of disease relapse in patients with retroperitoneal liposarcomas, along with taking into account the degree of malignancy of the tumor and the state of the surgical resection margin. The separation expression levels for molecules in the blood serum 6 months after surgery were established to predict the development of relapses. The identified circulating miRNA-34 and miRNA-1246 are valuable as biomarkers in predicting the course of retroperitoneal liposarcomas.*

**Key words:** retroperitoneal liposarcomas; relapse prognosis; biological markers; microRNA; differentiated expression of molecules

**For citation:** Maksimov R.A., Kolesnikov E.N., Demidov S.I., Timoshkina N.N., Vlasov S.N. Prospects for the use of circulating non-coding RNAs in patients with retroperitoneal liposarcomas for postoperative monitoring of the course of the disease. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (9): 439-444 (in Russ.). DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-9-439-444

**For correspondence:** Maksimov R.A., graduate student; e-mail: alald@inbox.ru.

**Information about authors:**

Maksimov R.A., <https://orcid.org/0000-0003-1278-2700>;

Kolesnikov E.N., <https://orcid.org/0000-0001-9749-709X>;

Demidov S.I., <https://orcid.org/0009-0007-3046-9669>;

Timoshkina N.N., <https://orcid.org/0000-0001-6358-7361>;

Vlasov S.N., <https://orcid.org/0000-0003-3289-8436>.

**Acknowledgments.** The study had no sponsor support.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflicts of interests.

Received 10.06.2024

Accepted 22.07.2024

Published 00.09.2024

**Введение.** Липосаркома представляет собой самый распространенный тип сарком мягких тканей с удельной долей 20% [1]. Липосаркомы имеют множество гистологических подтипов и обычно развиваются в относительно молодом возрасте по сравнению с другими видами рака [1]. Липосаркомы подразделяются на 4 категории: высокодифференцированная (ВДЛС), дедифференцированная (ДДЛС), миксоидная (МЛС) и плеоморфная липосаркома (ПЛС) [2]. Гистологический тип опухоли определяет степень злокачественности опухолевых клеток и агрессивность течения заболевания [3].

МикроРНК (миРНК) представляют собой некодирующие РНК длиной 17-25 нуклеотидов и способны регулировать экспрессию генов на транскрипционном уровне путем связывания с матричными РНК-мишенями [4]. За последние десять лет исследований выявлены многочисленные доказательства, позволяющие подтвердить участие миРНК в развитии рака [5]. Циркулирующие миРНК привлекают особое внимание в качестве биомаркеров, поскольку открывают перспективы для многократного определения их содержания в сыворотке при послеоперационном мониторинге состояния больных [6].

Забрюшинные липосаркомы часто обнаруживают, когда объем опухоли и ее распространение не позволяют провести радикальную операцию [7], что значительно ухудшает течение болезни. Установлено, что высокая экспрессия миРНК-155 и -26a-2 в опухолевых клетках коррелирует с плохим прогнозом при ДДЛС [8,9]. миРНК-25-3p и -92a-3p гиперэкспрессируются в везикулах плазмы периферической крови, полученных от пациентов с липосаркомой [10]. Циркулирующие миРНК сыворотки рассматривают как биомаркеры определенных типов рака, таких как саркома [11], рак мочевого пузыря [12] и рак яичников [13]. Циркулируя в крови, высвобождаются ли идентифицированные миРНК из ткани липосаркомы? Зависит ли экспрессия миРНК в опухоли и сыворотке крови от гистологического типа забрюшинных липосарком? Обладает ли мониторинг циркулирующих миРНК информативностью для прогноза прогрессирования липосаркомы? Поставленные вопросы не являются решенными до настоящего времени. В связи с вышесказанным, целью

нашего исследования явилось сравнить экспрессионную активность дифференциально экспрессированных миРНК в ткани липосаркомы различного гистологического типа с их экспрессией в сыворотке крови для разработки системы послеоперационного мониторинга течения болезни.

**Материал и методы.** Исследование проведено на 87 пациентах с забрюшинными неорганными липосаркомой. Среди пациентов клинической группы женщин было 51 (58,6%), мужчин 36 (41,4%). Средний возраст пациентов составлял 52,7±1,49 года с преобладающим числом больных до 60 лет (87,4%). По результатам гистологического заключения высокодифференцированные липосаркомы установлены у 51 (58,6%) больного, дедифференцированные у 26 (29,9%), плеоморфные у 7 (8,1%) и миксоидная у 3 (3,4%) пациентов.

Образцы сыворотки отбирали перед операцией или предоперационным лечением, а также через полгода после операции и хранили при температуре -20 °С для дальнейшего использования. Образцы тканей были получены из хирургических образцов пациентов, прооперированных в центре, и хранились при температуре -80 °С для дальнейшего использования. Образцы тканей были получены из хирургических образцов пациентов, прооперированных в центре, и хранились при температуре -80 °С. Настоящее исследование было одобрено Локальным независимым этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Письменное информированное согласие было получено от каждого пациента при госпитализации в центр.

Сывороточную РНК выделяли из 300 мкл сыворотки с использованием реагента для извлечения РНК 3D-Gene® (Toray Industries, Inc.). Свежезамороженные ткани измельчали в порошок в среде жидкого азота (-196 °С). Общую РНК выделяли из порошка замороженной опухолевой ткани с использованием набора miRNeasy® Mini kit (Qiagen, Германия). Комплементарную ДНК (кДНК) получали с помощью реагентов miScript II RT kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы кДНК подвергали количественной ПЦР с использованием набора для ПЦР miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen, Германия). Реакции ПЦР проводили в режиме реального вре-

мени Step One Plus (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). При этом использовали специфические коммерческие праймеры для миРНК: Hs miR-155\_1, Hs miR-26a-2\_1, Hs miR-25-3p\_1, Hs miR-92a-3p\_1, Hs miR-619-5p\_1, Hs miR-1246\_1, Hs miR-4454\_1, Hs miR-4532\_1, Hs miR-6126\_1 фирмы Qiagen (Германия). Уровни экспрессии изучаемых миРНК в ткани и сыворотке крови были нормализованы относительно экспрессионной активности миРНК-103 [14]. При этом, относительную экспрессию миРНК мишени по отношению к референсной молекуле рассчитывали в условных единицах RQ по методу  $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ . С помощью корреляционного анализа оценивали связь между уровнями экспрессии миРНК в ткани и сыворотке крови.

В течение 40 месяцев после операции фиксировали рецидивы заболевания и формировали две подгруппы пациентов в зависимости от течения болезни. Результаты экспрессии миРНК в опухолевых клетках операционных образцов, сыворотки крови как до, так и через 6 месяцев после операции ретроспективно сравнивали в подгруппах больных с наличием и отсутствием рецидивов. С помощью ROC-анализа находили разделительный уровень циркулирующих миРНК, позволяю-

щий оценивать риск развития рецидива опухоли.

Статистический анализ результатов проводили с помощью компьютерной программы Statistica (StatSoft, США) и модулей описательной статистики, корреляционного и регрессионного анализа, ROC-анализа.

**Результаты и обсуждение.** У пациентов с липосаркомами независимо от гистологического типа опухоли в опухолевых образцах по отношению к референсной миРНК экспрессия миРНК-155, -21, -26a-2, -25-3p, -92a-3p, -619-5p, -1246, -4454, -4532, -6126 статистически значимо была повышена ( $p < 0,05$ ), экспрессионная активность миРНК-15a, -34 и -143 снижена (рис. 1). При множественном сравнении экспрессии миРНК в опухолевой ткани исключали больных с высокодифференцированными липосаркомами, имеющими благоприятный прогноз, в отличие от других гистологических типов. С помощью дисперсионного анализа установлено, что у пациентов с дедифференцированными, плеоморфными и миксоидной липосаркомами экспрессия миРНК-155, -21, 26a-2, -619-5p, -1246, -4454 различалась. Таким образом, выявлена дифференцированная экспрессия отдельных миРНК в зависимости от гистологического типа опухоли.

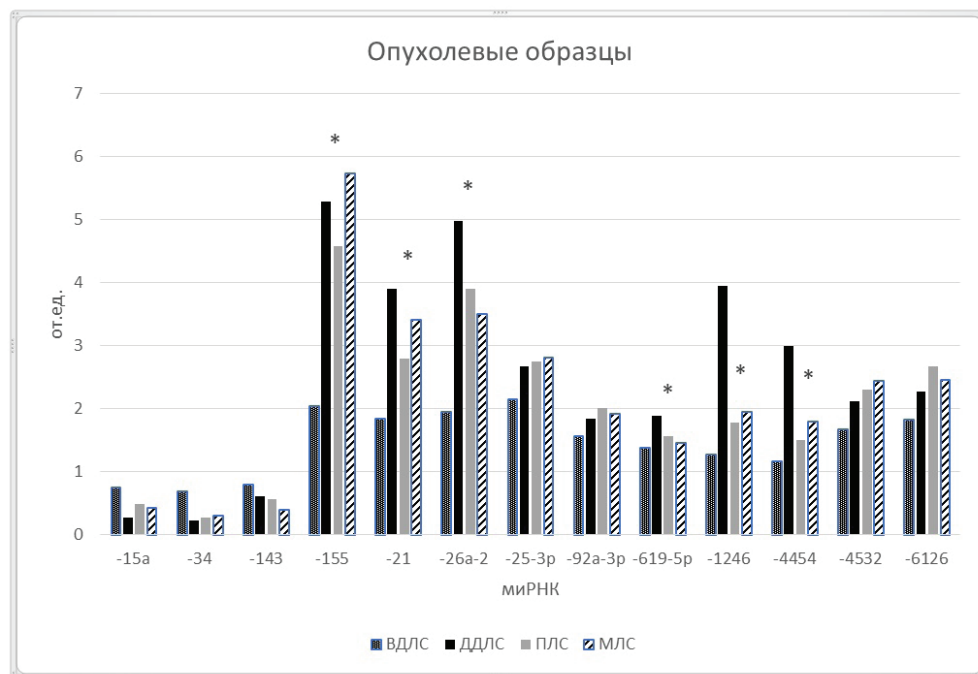


Рис. 1. Экспрессия миРНК в опухолевой ткани у больных липосаркомами.  
 \* - статистически значимое различие показателя у больных с ДДЛС, ПЛС, МЛС.

В сыворотке крови у пациентов с липосаркомами до операции высоко экспрессировались миРНК-619-5p, -1246, -4454, -4532, -6126, а экспрессия миРНК-34 была снижена. Экспрессия миРНК в ткани в целом была выше, чем в сыворотке. В табл. 1 представлены коэффициенты корреляции экспрессии миРНК в ткани и сыворотке с учетом гистологического типа опухоли.

Уровни экспрессии определенных миРНК, таких как миРНК-34, -619-5p, -1246, -4532, статистически значимо коррелировали между образцами сыворотки и опухолевой ткани. Данное обстоятельство позволи-

ло предположить, что уровень этих циркулирующих миРНК определялся экспрессией их в опухоли. Однако, только для двух молекул – миРНК-34 и миРНК-1246 установлена статистически значимая связь между уровнями их содержания в ткани опухоли и сыворотки независимо от гистологического типа опухоли. Причем миРНК-1246 показала самый высокий коэффициент корреляции. Следовательно, определение содержания миРНК-34 и -1246 может быть использовано для мониторинга течения развития липосарком вне зависимости от гистологии опухоли.

**Коэффициенты корреляции между экспрессией миРНК в ткани опухоли и сыворотке крови у больных с забрюшинными неорганными липосаркомками**

миРНК-	Коэффициенты корреляции (R, p)			
	ВДЛС	ДДЛС	ПЛС	МЛС
-34	<b>R=0,40, p=0,049</b>	<b>R=0,52, p=0,007</b>	<b>R=0,53, p=0,005</b>	<b>R=0,48, p=0,009</b>
-619-5p	R=0,34, p=0,076	<b>R=0,48, p=0,036</b>	<b>R=0,43, p=0,047</b>	R=0,32, p=0,215
-1246	<b>R=0,48, p=0,041</b>	<b>R=0,74, p=0,005</b>	<b>R=0,65, p=0,002</b>	<b>R=0,68, p=0,001</b>
-4454	R=0,29, p=0,193	R=0,30, p=0,095	R=0,24, p=0,281	R=0,22, p=0,176
-4532	R=0,24, p=0,205	<b>R=0,47, p=0,046</b>	<b>R=0,48, p=0,039</b>	R=0,32, p=0,095
-6126	R=0,14, p=0,281	R=0,40, p=0,172	R=0,17, p=0,461	R=0,28, p=0,353

Примечание. *p* – уровень значимости. Жирным шрифтом обозначены статистически значимые связи.

За 40 месяцев наблюдения рецидивы заболевания развились у 44 (50,6%) человек. У больных с забрюшинными липосаркомками рецидив опухоли проявляется множественными, отдельно расположенными узлами. Причем количество узлов нарастает с каждым новым рецидивом, что может указывать на имплантационный механизм возникновения рецидива забрюшинной неорганный липосаркомки. Наиболее важными факторами прогноза являются размер опухоли, радикальность хирургического вмешательства, гистологический тип липосаркомки, степень злокачественности [15]. Однако, гематогенный механизм распространения опухолевых клеток может вносить свою весомую лепту в рецидивирование болезни. Циркулирующие опухолевые клетки, сама опухолевая ткань могут быть источником сывороточных миРНК [16]. В исследовании было изучено сопряжение до- и послеоперационных (через 6 месяцев) уровней сывороточных миРНК-34 и миРНК-1246 с развитием рецидива забрюшинной ли-

посаркомки. Основанием для такого подхода явилось то, что у больных с забрюшинными липосаркомками данные миРНК дифференциально экспрессированы одновременно в опухолевой ткани и сыворотке крови и вне зависимости от гистологического типа опухоли установлена выраженная корреляция между экспрессией опухолевых и циркулирующих молекул.

В подгруппах пациентов в зависимости от рецидива болезни исходные уровни миРНК-34 и -1246 в сыворотке крови не различались. Однако через 6 месяцев после операции у пациентов с последующим развитием рецидива установлено повышение экспрессии миРНК-1246 и снижение содержания миРНК-34 в сыворотке крови по сравнению с больными с безрецидивным течением болезни (рис. 2). Разделительный уровень экспрессии молекул через 6 месяцев после операции для оценки риска развития рецидива по результатам ROC-анализа составил для миРНК-1246 - 1,84 ( $p=0,031$ ), а для миРНК-34 - 0,37 ( $p=0,018$ ).

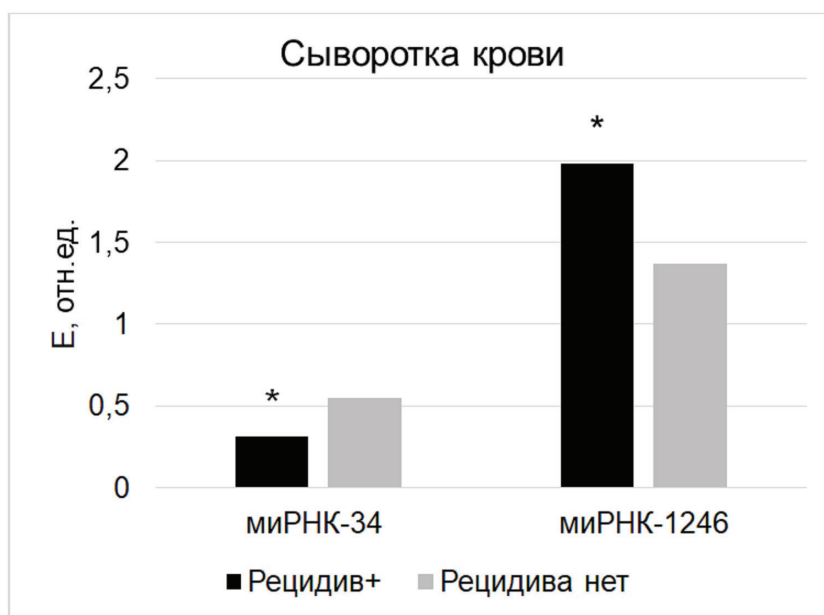


Рис. 2. Уровни экспрессии миРНК-34 и миРНК-1246 в сыворотке крови через 6 месяцев после операции у больных забрюшинными липосаркомками в зависимости от течения заболевания.

Далее с помощью регрессионного анализа Кокса была проведена оценка относительного риска развития рецидива забрюшинных липосарком для раз-

личных факторов риска, включая уровень экспрессии миРНК-34 и миРНК-1246 в крови через 6 месяцев после операции (табл. 2).



Таблица 2

Результаты однофакторного и многофакторного регрессионного анализа относительного риска развития рецидива в течение трех лет после операции у больных забрюшинными липосаркомами

Фактор	Относительный риск рецидива (ДИ, p)
Высокая градация злокачественности (high grade)	2,07 (1,17-3,66), p=0,013
Позитивный край хирургической резекции R1/2	3,12 (1,26-7,72), p=0,014
$E_{\text{миРНК-1246}} > 1,84$	1,62 (1,45-1,89), p=0,018
$E_{\text{миРНК-34}} < 0,37$	1,74 (1,53-1,99), p=0,014
Grade*R	3,79 (2,31-4,76), p=0,011
Grade*R* $E_{\text{миРНК-1246}}$	4,05 (3,25-5,73), p<0,001
Grade*R* $E_{\text{миРНК-34}}$	4,17 (3,04-5,82), p<0,001
Grade*R* $E_{\text{миРНК-1246}}$ * $E_{\text{миРНК-34}}$	4,78 (3,67-6,04), p<0,001

Примечание. Grade - степень злокачественности, R - радикальность операции, ЕмиРНК -экспрессия миРНК в сыворотке крови, ДИ - доверительный интервал.

Высокая градация степени злокачественности у больных забрюшинными липосаркомами сопровождалась повышением риска развития рецидива в ближайшие три года после операции в 2,07 ( $p=0,013$ ), а нерадикально выполненная операция с позитивным краем резекции после гистологического исследования (R1) либо по итогам макроскопического осмотра (R2) усиливала риск рецидива в 3,12 раз ( $p=0,014$ ). Превышение экспрессии миРНК-1246 в сыворотке крови через 6 месяцев после операции более 1,84 по отношению к референсной миРНК по итогам однофакторного регрессионного анализа сопровождалось усилением риска развития рецидива болезни в 1,62 раза, а снижение аналогичного показателя для миРНК-34 менее 0,37 - в 1,74 раза. Одновременное выявление нескольких предикторов приводило к повышению риска рецидива болезни и было максимальным при высокой степени злокачественности опухоли, нерадикальности операции, превышении экспрессии миРНК-1246 в сыворотке крови через 6 месяцев после операции более 1,84 по отношению к референсной миРНК и снижении экспрессии миРНК-34 ниже 0,37. Следовательно, оценка экспрессии циркулирующих некодирующих РНК у больных забрюшинными липосаркомами расширяет возможности прогноза послеоперационного течения болезни и дополнительно может быть использована при мониторинге состояния пациентов после операции.

**Заключение.** В настоящем исследовании идентифицированы специфические миРНК (миРНК-34, -619-5p, -1246, -4532), которые дифференцированно экспрессировались одновременно в сыворотке крови и опухолевой ткани у больных с забрюшинными липосаркомами. Для миРНК-34 и миРНК-1246 установлена статистически значимая связь между уровнями их содержания в ткани опухоли и сыворотки крови независимо от гистологического типа опухоли. миРНК-1246 показала самый высокий коэффициент корреляции.

Анализ экспрессии миРНК-34 и миРНК-1246 в сыворотке крови через 6 месяцев после операции повышал прогностическую информативность оценки риска развития рецидива заболевания у больных с забрюшинными липосаркомами наряду с учетом степени злокачественности опухоли, состояния края хирургической резекции. При превышении экспрессии миРНК-1246

в сыворотке крови через 6 месяцев после операции уровня 1,84 относительно референсной миРНК-103 риск развития рецидива забрюшинной липосаркомы возрастал в 1,62 раза ( $p=0,018$ ). При снижении экспрессии миРНК-34 в сыворотке крови через 6 месяцев после операции ниже 0,37 относительно референсной миРНК-103, риск развития рецидива забрюшинной липосаркомы возрастал в 1,74 раза ( $p=0,014$ ).

Идентифицированные циркулирующие миРНК-34 и миРНК-1246 представляют ценность в качестве биомаркеров при прогнозе течения забрюшинных липосарком.

#### ЛИТЕРАТУРА ( П П . 3 - 1 6 С М . REFERENCES )

1. Волков А.Ю., Неред С.Н., Любченко Л.Н. Забрюшинные неорганные липосаркомы: современный взгляд на проблему. *Сибирский онкологический журнал*. 2019;18(5): 86–96.
2. Омельченко Д.В., Васин А.Б. Результаты хирургического лечения больных с диагнозом «неорганный злокачественный опухоль забрюшинного пространства». *Креативная хирургия и онкология*. 2023;13(1): 45-50.

#### REFERENCES

1. Volkov A.Yu., Nered S.N., Lyubchenko L.N. Retroperitoneal non-organ liposarcomas: the modern concept. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal*. 2019; 18(5): 86–96. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-86-96. (in Russian)
2. Omel'chenko D.V., Vasin A.B. Patients with primary malignant retroperitoneal tumor: surgical outcomes. *Kreativnaya khirurgiya i onkologiya*. 2023; 13(1): 45-50. DOI: 10.24060/2076-3093-2023-13-1-45-50. (in Russian)
3. Gamboa A.C., Gronchi A., Cardona K. Soft-tissue sarcoma in adults: An update on the current state of histiotype-specific management in an era of personalized medicine. *CA Cancer J. Clin.* 2020; 70: 200–229. DOI: 10.3322/caac.21605.
4. Chellini L., Palombo R., Riccioni V., Paronetto M.P. Oncogenic Dysregulation of Circulating Noncoding RNAs: Novel Challenges and Opportunities in Sarcoma Diagnosis and Treatment. *Cancers*. 2022; 14(19): 4677. DOI: 10.3390/cancers14194677.
5. Teo A.Y.T., Lim V.Y., Yang V.S. MicroRNAs in the Pathogenesis, Prognostication and prediction of treatment resistance in soft tissue sarcomas. *Cancers*. 2023; 15: 3: 577. DOI: 10.3390/cancers15030577.
6. Tran C., Dinh P. Potential diagnostic value of serum microRNAs

- for 19 cancer types: a meta-analysis of bioinformatics data. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2024; 1–14. DOI: 10.1080/07391102.2024.2328744.
7. Vos M., Boeve W.C., van Ginhoven T.M., Sleijfer S., Verhoef C., Grünhagen D.J. Impact of primary tumor location on outcome of liposarcoma patients, a retrospective cohort study. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2019 Dec; 45(12): 2437-42. DOI: 10.1016/j.ejso.2019.08.026.
  8. Kapodistrias N., Mavridis K., Batistatou A., Gogou P., Karavasilis V., Sainis I. et al. Assessing the clinical value of microRNAs in formalin-fixed paraffin-embedded liposarcoma tissues: Overexpressed miR-155 is an indicator of poor prognosis. *Oncotarget*. 2017 Jan 24; 8(4): 6896-6913. DOI: 10.18632/oncotarget.14320.
  9. Lee D.H., Amanat S., Goff C., Weiss L.M., Said J.W., Doan N.B. et al. Overexpression of miR-26a-2 in human liposarcoma is correlated with poor patient survival. *Oncogenesis*. 2013 May 20; 2(5): e47. DOI: 10.1038/oncsis.2013.10.
  10. Casadei L., Calore F., Creighton C.J., Guescini M., Batte K., Iwenofu O.H. et al. Exosome-Derived miR-25-3p and miR-92a-3p Stimulate Liposarcoma Progression. *Cancer Res*. 2017 Jul 15; 77(14): 3846-56. DOI: 10.1158/0008-5472.
  11. Asano N., Matsuzaki J., Ichikawa M., Kawauchi J., Takizawa S., Aoki Y. et al. A serum microRNA classifier for the diagnosis of sarcomas of various histological subtypes. *Nat. Commun.* 2019 Mar 21; 10(1): 1299. DOI: 10.1038/s41467-019-09143-8.
  12. Usuba W., Urabe F., Yamamoto Y., Matsuzaki J., Sasaki H., Ichikawa M. et al. Circulating miRNA panels for specific and early detection in bladder cancer. *Cancer Sci*. 2019 Jan; 110(1): 408-19. DOI: 10.1111/cas.13856.
  13. Yokoi A., Matsuzaki J., Yamamoto Y., Yoneoka Y., Takahashi K., Shimizu H. et al. Integrated extracellular microRNA profiling for ovarian cancer screening. *Nat. Commun.* 2018 Oct 17; 9(1): 4319. DOI: 10.1038/s41467-018-06434-4.
  14. Latham G.J. Normalization of microRNA quantitative RT-PCR data in reduced scale experimental designs. *Methods Mol. Biol.* 2010; 667: 19-31. DOI: 10.1007/978-1-60761-811-9\_2.
  15. Casadei L., de Faria F.C.C., Lopez-Aguir A., Pollock R.E., Grignol V. Targetable pathways in the treatment of retroperitoneal liposarcoma. *Cancers*. 2022; 14(6):1362. DOI: 10.3390/cancers14061362.
  16. Kohama I., Asano N., Matsuzaki J., Yamamoto Y., Yamamoto T., Takahashi R. et al. Comprehensive serum and tissue microRNA profiling in dedifferentiated liposarcoma. *Oncology Letters*. 2021; 22(2): 623. DOI: 10.3892/ol.2021.12884.