

# Дифференциальная экспрессия микроРНК и их генов-мишеней при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях разной степени тяжести

Т.А. Димитриади<sup>1</sup>, Д.В. Бурцев<sup>1</sup>, Е.А. Дженкова<sup>2</sup>, Д.С. Кутилин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГАОУ РО «Областной консультативно-диагностический центр»; Россия, 344010 Ростов-на-Дону, ул. Пушкинская, 127;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63

Контакты: Денис Сергеевич Кутилин [k.denees@yandex.ru](mailto:k.denees@yandex.ru)

**Введение.** В настоящее время недостаточно известно о специфических микроРНК (мкРНК), задействованных в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии I, II, III степеней тяжести (CIN1, 2, 3) и переходе к карциноме *in situ* (CIS). Проведенный нами ранее метаанализ позволил выделить 8 мкРНК (*hsa-miR-1246*, *hsa-miR-145-5p*, *hsa-miR-196b-5p*, *hsa-miR-34a-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-375-5p*, *hsa-miR-96-5p*), обладающих потенциальной значимостью в прогрессировании предраковых заболеваний в рак шейки матки.

**Цель исследования** – анализ особенностей экспрессии *hsa-miR-1246*, *hsa-miR-145-5p*, *hsa-miR-196b-5p*, *hsa-miR-34a-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-375-5p*, *hsa-miR-96-5p* и их генов-мишеней, а также генов, ассоциированных с ними в общих сигнальных путях, в тканях шейки матки у пациенток с CIN1–3 и CIS.

**Материалы и методы.** Для оценки уровня экспрессии мкРНК и матричной РНК использовали метод количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Анализ данных проводили на языке программирования Python с использованием библиотеки SciPy. Поиск генов-мишеней осуществляли с помощью алгоритма TarPmiR и анализировали избыточную представленность мкРНК в сигнальных путях (Over-Representation Analysis). Для выявления генов, ассоциированных с генами-мишенями в общих сигнальных путях, использовали алгоритмы GIANT (Genome-scale Integrated Analysis of gene Networks in Tissues) и «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями».

**Результаты.** Для мкРНК *miR-145*, *miR-196b*, *miR-34a*, *miR-20a*, *miR-21*, *miR-375* и *miR-96* обнаружено снижение экспрессии в подгруппе пациенток с CIS, при этом для 4 мкРНК (*miR-145*, *miR-34a*, *miR-20a* и *miR-375*) выявлено увеличение уровня экспрессии при CIN1, 2. Обнаруженные особенности экспрессии мкРНК в подгруппах пациенток с CIN1–3 и CIS были ассоциированы с экспрессией их генов-мишеней (*CDKN2A*, *MKI67*, *TOP2A* и *CD82*), а также генов, связанных с ними в общих сигнальных путях (*PGK1*, *THBS4* (*TSP4*) и *ECM1*).

**Заключение.** Результаты исследования позволили установить, что каждая степень CIN характеризуется особым молекулярным профилем – дифференциальной экспрессией мкРНК, их генов-мишеней и генов, ассоциированных с ними в общих сигнальных путях.

**Ключевые слова:** микроРНК, экспрессия генов, цервикальная интраэпителиальная неоплазия, рак шейки матки

**Для цитирования:** Димитриади Т.А., Бурцев Д.В., Дженкова Е.А., Кутилин Д.С. Дифференциальная экспрессия микроРНК и их генов-мишеней при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях разной степени тяжести. *Успехи молекулярной онкологии* 2020;7(2):47–61.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-47-61



## Differential expression of microRNAs and their target genes in cervical intraepithelial neoplasias of varying severity

T.A. Dimitriadis<sup>1</sup>, D.V. Burtsev<sup>1</sup>, E.A. Dzhenkova<sup>2</sup>, D.S. Kutilin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Regional Consultative and Diagnostic Center; 127 Pushkinskaya St., Rostov-on-Don 344010, Russia;

<sup>2</sup>National Medical Research Center for Oncology; 63 14<sup>th</sup> liniya, Rostov-on-Don 344037, Russia

**Background.** Currently, little is known about the specific microRNAs involved in the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN1, 2, 3) and the transition to cancer *in situ* (CIS). Our meta-analysis allowed us to isolate 8 microRNAs (*hsa-miR-1246*, *hsa-miR-145-5p*, *hsa-miR-196b-5p*, *hsa-miR-34a-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-375-5p*, *hsa-miR-96-5p*) with potential significance in the progression of precancerous diseases to cervical cancer.

**Objective:** to analyze the expression features of *hsa-miR-1246*, *hsa-miR-145-5p*, *hsa-miR-196b-5p*, *hsa-miR-34a-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-375-5p*, *hsa-miR-96-5p* and their target genes, as well as genes associated with them in common signaling pathways in the tissues of the cervix in patients with CIN1–3 and CIS.

**Materials and methods.** To assess the expression level of microRNA and matrixRNA, the quantitative polymerase chain reaction in real time method was used. Data analysis was carried out in the Python programming language using the SciPy library. Search for target genes was performed using the TarPmiR algorithm and the overrepresentation of microRNAs in signaling pathways (Over-Representation Analysis) was

analyzed. To identify genes associated with target genes in common signaling pathways, *GIANT* (Genome-scale Integrated Analysis of gene Networks in Tissues) and network integration with several associations algorithms were used.

**Results.** For microRNAs miR-145, miR-196b, miR-34a, miR-20a, miR-21, miR-375 and miR-96 a decrease in expression was found in the subgroup of patients with CIS, while for 4 microRNAs (miR-145, miR-34a, miR-20a and miR-375), an increase in the expression level was found for CIN1, 2. The detected features of microRNA expression in subgroups of patients with CIN1–3 and CIS also affected the expression of their target genes (CDKN2A, MKI67, TOP2A and CD82), as well as the genes associated with them in common signaling pathways (PGK1, THBS4 (TSP4) and ECM1).

**Conclusion.** Thus, the study revealed that each degree of CIN is characterized by its own specific molecular profile – the differential expression of microRNAs, their target genes and the genes associated with them in the general signaling pathways.

**Key words:** microRNA, gene expression, cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer

**For citation:** Dimitriadi T.A., Burtsev D.V., Dzhenkova E.A., Kutilin D.S. Differential expression of microRNAs and their target genes in cervical intraepithelial neoplasias of varying severity. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2020;7(2):47–61. (In Russ.).

## Введение

Ежегодно в мире регистрируют более 528 тыс. новых случаев заболеваемости раком шейки матки (РШМ) и 266 тыс. случаев летального исхода от этой патологии [1]. Одним из основных этиологических факторов РШМ является инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска [2]. Персистенция ВПЧ-инфекции может приводить к цервикальной интраэпителиальной неоплазии I, II, III степеней тяжести (CIN1, 2, 3). Около трети CIN3 прогрессирует до инвазии в течение 30 лет [3]. CIN1 (легкая дисплазия) характеризуется морфологическими признаками папилломавирусной инфекции и невыраженными изменениями строения эпителия (наличие атипичных клеток с признаками дискариоза, фрагментация хроматина, нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения, патологических митозов) с умеренной пролиферацией клеток базального слоя (изменения охватывают не более 1/3 толщины эпителиального слоя). CIN2 (умеренная дисплазия) имеет более выраженные изменения, затрагивающие 1/2 эпителиального слоя. CIN3 (тяжелая дисплазия) характеризуется поражением более 2/3 эпителиального слоя и появлением патологических митозов, а также наличием огромных гиперхромных ядер клеток [4]. Прогрессирование до интраэпителиальных предраковых заболеваний происходит из-за множественных нарушений в сигнальных путях, регулирующих клеточный цикл, вызванных избыточной экспрессией вирусных белков E6 и E7, которые функционально инактивируют продукты генов *RB* и *TP53*. Данный процесс является многоэтапным и включает ряд генетических и эпигенетических изменений, в том числе изменения транскрипционной активности генов и микроРНК (мкРНК) [5].

МикроРНК – короткие некодирующие РНК, являющиеся эпигенетическими регуляторами, специфичными для определенных тканей, которые модулируют экспрессию генов путем взаимодействия с комплементарными нуклеотидными последовательностями мишеней матричной РНК (мРНК), что либо катализирует разрушение мРНК, либо ингибирует трансляцию мРНК в белок [5].

В настоящее время недостаточно известно о специфических мкРНК, задействованных в развитии CIN (в переходе от CIN1 к CIN2 и CIN3), и механизмах их регуляции [6]. Вероятно, aberrantная экспрессия мкРНК при развитии CIN является результатом инфицирования ВПЧ [5].

Проведенный нами ранее метаанализ позволил выделить 8 мкРНК (hsa-miR-1246, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-375-5p, hsa-miR-96-5p), обладающих потенциальной значимостью в прогрессировании предраковых заболеваний в РШМ [5].

**Цель исследования** – анализ особенностей экспрессии hsa-miR-1246, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-375-5p, hsa-miR-96-5p и их генов-мишеней, а также ассоциированных с ними в общих сигнальных путях генов в тканях шейки матки у пациенток с CIN разной степени тяжести.

## Материалы и методы

В исследование включены 85 пациенток, которые были разделены на 2 группы: основную ( $n = 57$ ) – пациентки с различной степенью диспластических повреждений эпителия: CIN1 ( $n = 15$ ), CIN2 ( $n = 17$ ), CIN3 ( $n = 15$ ), карцинома *in situ* (CIS;  $n = 10$ ); контрольную ( $n = 28$ ) – пациентки, у которых по данным гистологического исследования дисплазия не выявлена. У всех пациенток, участвующих в исследовании, обнаружено инфицирование ВПЧ высокого канцерогенного риска (типы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68).

Использовали образцы ткани, полученной во время эксцизионной биопсии шейки матки. Подгруппу CIN1 и контрольную группу (без CIN и CIS) составили пациентки, у которых выявлен H-SIL в цитологическом мазке и/или была неудовлетворительная кольпоскопическая картина при персистенции L-SIL (показание к эксцизии). Верификацию CIN1 и условной нормы осуществляли после эксцизии гистологическим методом. Образцы ткани сразу после биопсии помещали в раствор RNA later (Ambion, США).

**Выделение суммарной РНК.** Изолированные измельченные одноразовым стерильным скальпелем фрагменты ткани (размером около 2 мм в диаметре) помещали в 600 мкл лизирующего раствора (4 М гуанидин изотиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,3 % саркозил, 3 % ДТТ). Пробирки помещали в MagNa Lyser (Roche, Швейцария) и подвергали механической гомогенизации. Дальнейшее выделение РНК проводили методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции [7]. Для очистки от примесей геномной ДНК образцы суммарной РНК обрабатывали препаратами ДНКазы 1. Концентрацию полученных препаратов РНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0® (Invitrogen, США). Для оценки качества препарата РНК проводили электрофорез в 2 % агарозном геле (интенсивность полос 18S и 28S в соотношении 1:1 свидетельствовала о приемлемом для дальнейшей работы качестве РНК) (рис. 1) [8].

**Оценка экспрессии мкРНК.** Для выявления зрелых мкРНК и малой РНК U6 применяли метод, предложенный I. Balcells и соавт. [9]. Выделенную суммарную РНК использовали в реакции обратной транскрипции, которую проводили одновременно с полиаденилированием РНК с применением специфичных RT-праймеров. Далее выполняли детекцию полученной комплементарной ДНК (кДНК) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров осуществляли с использованием алгоритма I. Balcells и соавт. [9]. Для каждой мкРНК отдельно проводили реакцию обратной транскрипции в 1 повторе. Для обратной транскрипции использовали реакционную смесь, содержащую 1x Poly(A)-буфер (BioLabs, США), 10 U/мкл Reverse Transcriptase MMLV (Синтол, Россия), 0,1 мМ dNTPs (Синтол, Россия), 0,1 мМ аденозинтрифосфата (АТФ) (BioLabs, США), 1 мкМ RT-праймера, 0,5 U/мкл Poly(A)-полимеразы (BioLabs, США) и 1 мкг тотальной РНК. Реакцию проводили в течение 15 мин при температуре 16 °С, 15 мин при 42 °С, затем обратную транскриптазу инактивировали 2 мин при 95 °С.

Изменение относительной экспрессии мкРНК оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию выполняли в 20 мкл PCR-смеси,

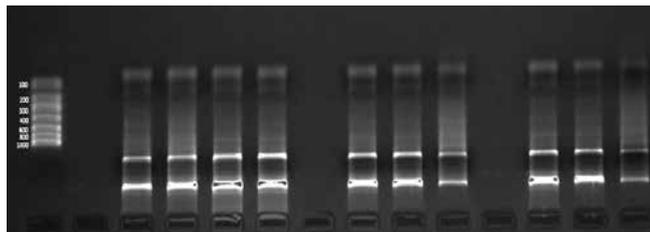


Рис. 1. Электрофореграмма РНК, выделенной из тканей шейки матки (визуализация на GelDoc XR PLUS)

Fig. 1. Electropherogram of RNA extracted from cervical tissues (visualization with GelDoc XR PLUS)

содержащей 1x PCR-буфер, 0,25 мМ dNTPs, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 единицу активности (ед. акт.) Taq-DNA-полимеразы, по 500 нМ прямого и обратного праймеров. Постановку количественной ПЦР в режиме реального времени каждого образца проводили в 3 повторах. Полученные смеси инкубировали в амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 2 мин при 94 °С, 50 циклов: денатурация при 95 °С 10 с, отжиг и элонгация при 64 °С 20 с. Результаты, соответствующие значениям пороговых циклов (Ct) >40, были признаны отрицательными. Полученные данные подвергали статистической обработке (критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони).

**Оценка экспрессии мРНК.** Для наработки кДНК готовили реакционную смесь, содержащую 5 мкМ рандомных праймеров, 1x RT-буфер, 0,5 мМ dNTP микс, 0,5 ед. акт/мкл RNase Inhibitor (Thermo Scientific, США), 5 U/мкл Reverse Transcriptase MMLV (Синтол, Россия) и выделенную суммарную РНК в качестве матрицы. Полученную смесь инкубировали при температуре 44 °С в течение 1 ч, обратную транскриптазу инактивировали при 92 °С в течение 10 мин.

Методом количественной ПЦР в режиме реального времени определяли величины относительной экспрессии 7 генетических локусов (*ECM1*, *CDKN2A*, *THBS4*, *MKI67*, *TOP2A*, *CD82*, *PGK1*). В качестве референсных генов использовали *GAPDH*, *ACTB* и *HMBS* (Hydroxymethylbilane Synthase). Постановку каждого локуса проводили в 3 технических повторах. Для амплификации использовали реакционную смесь, содержащую 1x PCR-буфер, 0,2 мМ dNTP микс, 1,5–2,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 400 нМ праймеров, 0,05 U/мкл Taq-полимеразы, 10 нг кДНК. Полученные смеси амплифицировали в термоджеле CFX 96 (Bio-Rad, США) в соответствии с температурным режимом: первичная денатурация при 95 °С в течение 240 с; 40 циклов: 95 °С в течение 10 с, 58 °С в течение 30 с, 72 °С в течение 30 с.

**Олигонуклеотидные праймеры, эффективность амплификации и стабильность референсных генов.** Все олигонуклеотиды были синтезированы в компании «Вектор-Бест» (Россия). Олигонуклеотиды для оценки экспрессии мРНК выбирали с использованием онлайн-сервиса PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/>). Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров для мкРНК осуществляли с помощью алгоритма I. Balcells и соавт. [9] (табл. 1). Для каждой мкРНК и мРНК подбирали несколько комплектов олигонуклеотидов, из которых выбирали те, которые характеризовались наиболее высокой эффективностью обратной транскрипции и ПЦР. Эффективность обратной транскрипции оценивали по значениям пороговых циклов (Ct), полученных при анализе синтетических аналогов мкРНК и мРНК (Биосан, Россия), взятых в известной концентрации. Эффективность амплификации (E) для каждой системы оценивали с помощью построения калибровочной кривой с использованием для анализа разведения соответствующих РНК,

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры для микроРНК и их генов-мишеней

Table 1. Oligonucleotide primers for microRNAs and their target genes

Локус Locus	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primer	RT-праймер RT primer
<i>miR-21-5p</i>	TCAGTAGCTTATCAGACTGATG	CGTCCAGTTTTTTTT TTTTTTTCAAC	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTTTCA
<i>miR-145-5p</i>	AGGTCCAGTTTTCCCAGGAA	GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTTAGGGA	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTTAG
<i>miR-1246</i>	CGCAGAATGGATTTTTGGAG	GTCCAGTTTTTTTTTTTT TCCTG	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTCC
<i>miR-196b-5p</i>	GCAGTAGGTAGTTTCTGTGT	GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCCCA	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTCC
<i>miR-34a-5p</i>	GCAGTGGCAGTGTCTTAG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTACAAC	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTAC
<i>miR-20a-5p</i>	ACAGTAAAGTGCTTATAGTGCA	GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCTACCT	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTCT
<i>miR-375-5p</i>	GAGCCCCTCGCACA	GGTCCAGTTTTTTTTTT TTTTGGT	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTTGG
<i>miR-96-5p</i>	CAGTTTGCACTAGCACA	GGTCCAGTTTTTTTTTT TTTTTAGCA	CAGGTCCAGTTTTTTTT TTTTTTTAG
<i>U6 snRNA</i>	CGATAAAATTGGAACGATACAGA	ATTTGGACCATTCTCGATTTGT	ATTTGGACCATTCT CGATTTGT
<i>GAPDH</i>	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	TCGCCCCACTTGATTTTGGAA	5'-NNNNNN-3'*
<i>ACTB</i>	AACCGCGAGAAGATGACCC	AGCACAGCCTGGTAGCAAC	
<i>HMBS</i>	ACAGCCTACTTTCCAAGCGG	GGCTGTTTTCTCCGCCGTT	
<i>MKI67</i>	TGAGCCTGTACGGCTAAAACA	TCAGTTGACTTCCTTCCATTCTGA	
<i>CDKN2A</i>	CCGGGGTTCGGGTAGAGG	CCATCATCATGACCTGGATCG	
<i>TOP2A</i>	CTGGTGCTAGTAGTGAACCTGT	TGTCTGGGCGGAGCAAATA	
<i>CD82</i>	AAGCAGAACCCGCAGAGTC	GTCTGGAGCTTCCTTCCAC	
<i>PGK1</i>	CCACTGTGGCTTCTGGCATA	ATGAGAGCTTTGGTTCCCCG	
<i>TSP4</i>	AGCCTGTGGAGTTTCTTTGAC	ACCGAAGATGGTGGCTGAAC	
<i>ECM1</i>	GGACAGAGTCAAGTGCAGCC	TTGGGCAGGTAGCAGCTTTT	

\*Случайные гексонуклеотиды представляют собой олигонуклеотидные последовательности из 6 оснований, которые синтезируются случайным образом, что дает целый ряд последовательностей, которые могут действовать в качестве праймера для начала синтеза первой цепи комплементарной ДНК.

\*Random hexamer nucleotides are randomly synthesized 6-base oligonucleotide sequences producing a number of sequences which can serve as a primer for synthesis of the first complementary DNA chain.

выделенных из клинических проб согласно описанному выше протоколу (эффективность амплификации 2,0).

Стабильность экспрессии для подбора референсных генов оценивали с помощью алгоритма geNorm [10]. Первоначальный список предлагаемых нормализаторов для мкРНК включал miR-191 (экспрессия этой мкРНК была наиболее стабильной в 13 сравниваемых тканях [11]), miR-23a (в качестве нормализатора, подходящего для анализа образцов шейки матки [12]) и U6 (традиционно используется в качестве отдельного эталона для нормализации данных экспрессии мкРНК);

для мРНК – *GAPDH*, *ACTB*, *B2M* и *HMBS*. С помощью алгоритма geNorm для нормализации данных экспрессии мкРНК был выбран U6, для нормализации данных экспрессии мРНК – *GAPDH*, *ACTB* и *HMBS*.

**Расчет относительной экспрессии генов и мкРНК.** Относительную экспрессию (RE) рассчитывали по формуле  $RE = E^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $E$  – эффективность амплификации,  $E = 2,0$ ). Нормализацию результатов проводили по референсным локусам и уровню экспрессии соответствующих генов и мкРНК мишеней в образцах контрольной группы последовательно по схеме, приведенной ниже.

- Нормализация по среднему референсных генов:

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{target}} - C(t)_{\text{g\_reference}}$$

где  $C(t)_{\text{g\_reference}}$  – среднее геометрическое ( $C(t)$ ) референсных генов (для мРНК);  $C(t)_{\text{target}} - C(t)$  генов-мишеней.

- Расчет  $E^{-\Delta C(t)}$  по каждому гену или мкРНК для каждой пациентки контрольной группы и подгрупп основной группы.
- Расчет медианы  $E^{-\Delta C(t)}$  по каждому гену для каждой пациентки контрольной группы и подгрупп основной группы.
- Нормализация по контрольной группе и окончательный результат как кратность изменения [13]:

$$RE = \frac{E^{-\Delta C(t)} \text{ медиана подгруппы основной группы}}{E^{-\Delta C(t)} \text{ медиана контрольной группы}},$$

что тождественно  $RE = E^{-\Delta \Delta C(t)}$ .

**Статистический и биоинформационный анализ.** Анализ данных проводили на языке программирования Python с использованием библиотеки SciPy [14]. Различия между группами оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни, для корректировки множественного сравнения применяли поправку Бонферрони.

Поиск генов-мишеней осуществляли с использованием алгоритма TarPmiR по базам данных TargetScan, miRDB и miRTarBase. TarPmiR использует подход на основе метода Random forest («случайный лес») для прогнозирования сайта-мишени мкРНК. «Случайный лес» – алгоритм машинного обучения, заключающийся в использовании ансамбля решающих деревьев, сочетает в себе 2 основные идеи: метод бэггинга Бреймана и метод случайных подпространств. Результат модели «случайный лес» – предсказанная вероятность того, что целевой сайт-кандидат является истинным целевым сайтом [15].

Также проводили анализ избыточной представленности мкРНК в сигнальных путях (Over-Representation Analysis, ORA). Этот метод измеряет процент мкРНК в сигнальном пути, которые имеют дифференциальную экспрессию. Целью ORA является получение списка наиболее важных сигнальных путей, упорядоченных в соответствии с уровнем значимости различий (от  $p_{\min}$  к  $p_{\max}$ ). Статистическую значимость перекрытия между генами из сигнального пути и списка дифференциально экспрессируемых генов рассчитывали путем применения точного критерия Фишера [16].

Для выявления генов, ассоциированных с генами-мишенями в общих сигнальных путях, использовали 2 алгоритма:

- GIANT (Genome-scale Integrated Analysis of gene Networks in Tissues), который на основе байесовского классификатора обеспечивает интеграцию специфических для процесса функциональных сетей взаимосвязей между генами, а также позволяет оценить силу этих взаимодействий [17];

- «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями», который также позволяет установить взаимодействия между генами. Данный алгоритм предсказывает функцию гена в составе сложной сети из множества генов, используя один из методов машинного обучения, основанный на распределении меток гауссовых полей. Алгоритм присваивает оценку каждому узлу-точке построенной сети, отражающую вычисленную силу связи [18].

### Результаты

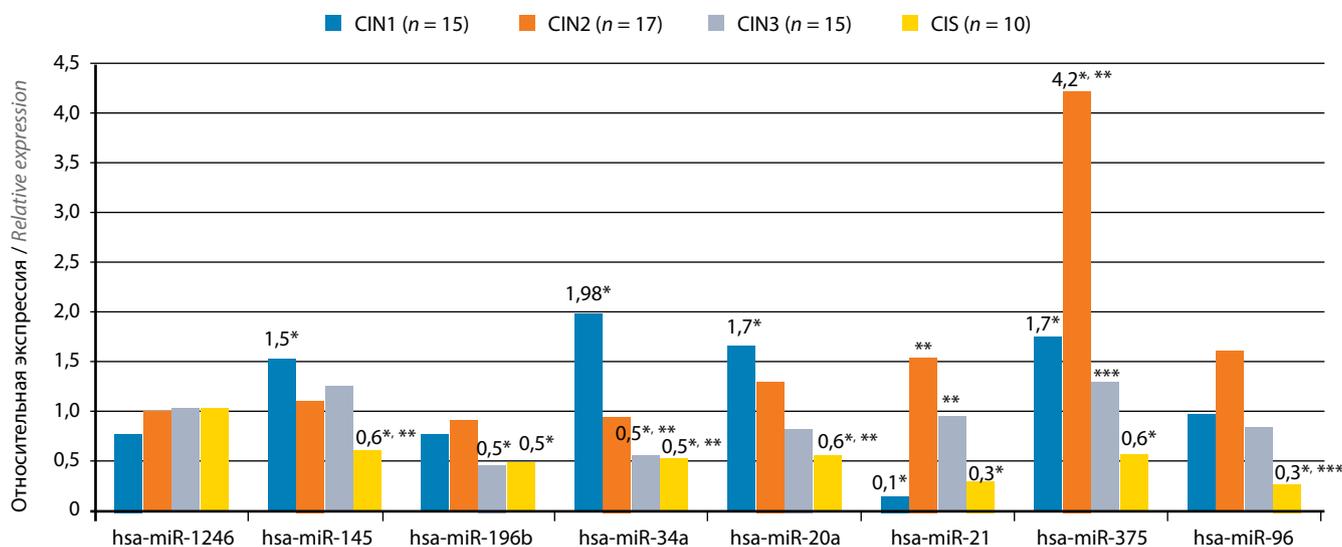
В ходе исследования экспрессии мкРНК в тканях шейки матки с различной степенью диспластических повреждений эпителия обнаружено статистически значимое ( $p < 0,005$ ) увеличение экспрессии hsa-miR-145-5p, hsa-miR-34a-5p и hsa-miR-20a-5p в подгруппе пациенток с CIN1 в 1,5; 2,0 и 1,7 раза соответственно и hsa-miR-375-5p в подгруппе пациенток с CIN1 и CIN2 в 1,7 и 4,2 раза соответственно относительно контрольной группы. При этом обнаружено статистически значимое снижение ( $p < 0,005$ ) экспрессии hsa-miR-145-5p в подгруппе пациенток с CIS в 1,7 раза, hsa-miR-196b-5p и hsa-miR-34a-5p в подгруппе пациенток с CIN3 и CIS в 2,0 раза, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-375-5p и hsa-miR-96-5p в подгруппе пациенток с CIS в 1,7; 1,7 и 3,3 раза соответственно и hsa-miR-21-5p в подгруппе пациенток с CIN1 и CIS в 10,0 и 3,3 раза соответственно относительно контрольной группы (рис. 2).

Также статистически значимое ( $p < 0,005$ ) снижение уровня экспрессии мкРНК наблюдалось в подгруппе пациенток с CIS относительно CIN1: для hsa-miR-145-5p – в 2,5 раза, для hsa-miR-34a-5p – в 4,0 раза, для hsa-miR-20a-5p – в 2,8 раза и для hsa-miR-96-5p – в 3,7 раза.

Для hsa-miR-34a-5p обнаружено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение экспрессии в подгруппе CIN3 в 4,0 раза относительно CIN1. Для hsa-miR-21-5p выявлено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение экспрессии в подгруппах CIN2 и CIN3 в 11,0 и 6,7 раза относительно CIN1. Для hsa-miR-375-5p обнаружено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение экспрессии в 2,5 раза в подгруппе CIN2 относительно CIN1 и снижение экспрессии в 3,3 раза в подгруппе CIN3 относительно CIN2.

Таким образом, для 7 исследованных мкРНК (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-375-5p, hsa-miR-96-5p) обнаружено снижение экспрессии в подгруппе пациенток с CIS по сравнению с подгруппой пациенток без диспластических повреждений в эпителии шейки матки. При этом для 4 исследованных мкРНК (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p и hsa-miR-375-5p) выявлено увеличение уровня экспрессии при CIN низкой степени тяжести (CIN1, CIN2).

Обнаруженные особенности экспрессии 7 мкРНК в подгруппах пациенток с CIN1–3 и CIS, вероятно, должны отразиться и на транскрипционной активности их генов-мишеней.



**Рис. 2.** Относительные уровни экспрессии микроРНК в тканях шейки матки с различной степенью диспластических повреждений эпителия. Статистически значимые различия показателей для тканей шейки матки с различной степенью диспластических повреждений эпителия выявлены с помощью критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони: \*относительно показателей эпителия без диспластических повреждений,  $p < 0,005$ ; \*\*относительно показателей CIN1,  $p < 0,05$ ; \*\*\*относительно показателей CIN2,  $p < 0,05$ . CIN – цервикальная интраэпителиальная неоплазия; CIS – карцинома in situ

**Fig. 2.** Relative microRNA expression levels in cervical tissues with varying severity of dysplastic changes in the epithelium. Statistically significant differences in characteristics of cervical tissues with varying severity of dysplastic changes in the epithelium were identified using the Mann–Whitney test with Bonferroni correction: \*relative to the epithelium without dysplastic changes,  $p < 0.005$ ; \*\*relative to CIN1,  $p < 0.05$ ; \*\*\*relative to CIN2,  $p < 0.05$ . CIN – cervical intraepithelial neoplasia; CIS – carcinoma in situ

Для мкРНК, дифференциально экспрессирующихся при CIN разной степени тяжести, проведен поиск целевых генов с использованием алгоритма TarPmiR. Для 7 мкРНК, статистически значимо изменяющих экспрессию, предсказано 7597 генов-мишеней, из них подтверждено в базах данных TargetScan, miRDB и miRTarBase взаимодействие мкРНК–мРНК для 59 генов-мишеней, в том числе 4 генов-мишеней с минимальной свободной энергией взаимодействия мкРНК–мРНК: *CDKN2A*, *MKI67*, *TOP2A* и *CD82* (рис. 3).

Для оценки биологической значимости дифференциально экспрессирующихся мкРНК и построения списка наиболее важных сигнальных путей, в которых они участвуют, был применен метод ORA. Данные, полученные в ходе реализации алгоритма ORA, приведены в табл. 2, 3.

Аннотации, представленные в табл. 2, получены с помощью баз данных miRTarBase (Gene Ontology) и miRWalk (Gene Ontology). С использованием первой выделены 45 сигнальных каскадов, с использованием второй – 154 сигнальных каскада, в которых участвуют исследуемые мкРНК.

Аннотации, представленные в табл. 3, получены с использованием баз MNDR (Mammalian ncRNA-disease repository) и miRWalk.

Следующим этапом исследования стал анализ экспрессии генов-мишеней мкРНК, дифференциально экспрессирующихся в эпителии шейки матки с различной степенью диспластических повреждений. Генов-мишеней (с высокой устойчивостью образуемого комплекса мкРНК–мРНК) на основании алгоритма

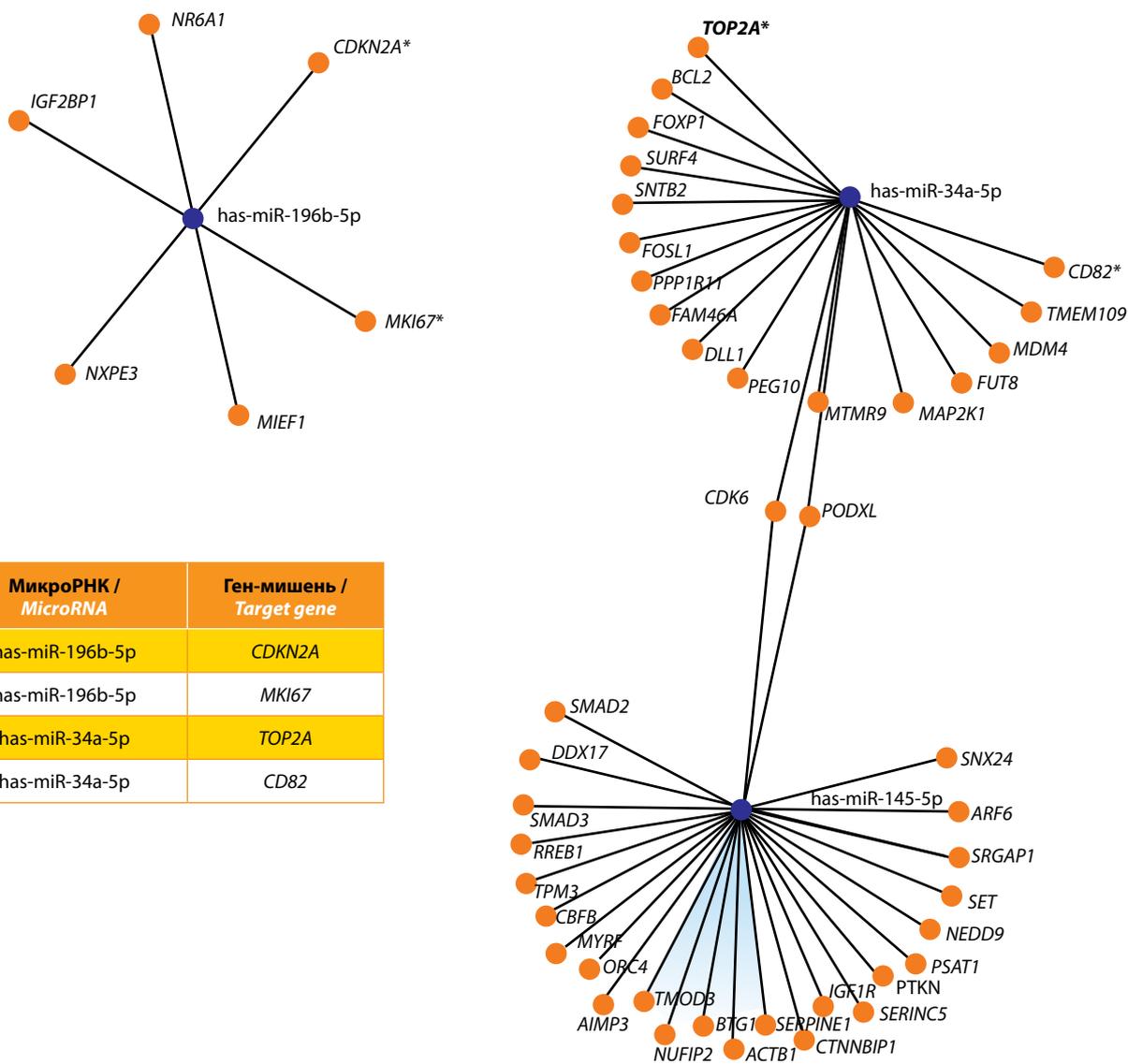
TarPmiR выявлено только 4 (*CDKN2A*, *MKI67*, *TOP2A* и *CD82*). Поэтому для этих локусов осуществлен поиск ассоциированных с ними в общих сигнальных путях генов. Для этого использовали алгоритмы GIANT и «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями» (рис. 4, табл. 4).

Для 4 генетических локусов (*CDKN2A*, *MKI67* (*Ki-67*), *TOP2A* и *CD82*) наиболее сильное взаимодействие (оценивали на нескольких уровнях: совместная экспрессия генов (базы NCBI, Gene Expression Omnibus), взаимодействие с белком (базы BioGRID, IntAct, MINT и MIPS), общая регуляция транскрипционными факторами (JASPAR), солокализация) выявлено с генами *PGK1*, *THBS4* (*TSP4*) и *ECM1* (см. табл. 3, рис. 4).

Проведена оценка уровней экспрессии генов *CDKN2A*, *MKI67*, *TOP2A*, *CD82*, *PGK1*, *THBS4* и *ECM1* у пациенток с CIN разной степени тяжести относительно таковых у пациенток без неоплазий.

Обнаружено статистически значимое увеличение (критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони,  $p < 0,005$ ) экспрессии генов *PGK1*, *THBS4* и *CD82* в 1,7; 2,7 и 1,9 раза в подгруппе пациенток с CIN1, генов *PGK1*, *CDKN2A*, *THBS4*, *MKI67*, *TOP2A* и *CD82* в 2,2; 8,0; 2,3; 4,6; 5,2 и 1,8 раза в подгруппе пациенток с CIN2, а также генов *CDKN2A*, *MKI67* и *TOP2A* в 3,9; 2,8 и 3,2 раза соответственно в подгруппе пациенток с CIN3 относительно контрольной группы (рис. 5).

Во всех подгруппах обнаружено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение экспрессии гена *ECM1* для CIN1 и CIN2 в 2 раза, для CIN3 – в 2,5 раза, для CIS – в 5 раз относительно контрольной группы. У па-



МикроРНК / MicroRNA	Ген-мишень / Target gene
has-miR-196b-5p	CDKN2A
has-miR-196b-5p	MKI67
has-miR-34a-5p	TOP2A
has-miR-34a-5p	CD82

Рис. 3. МикроРНК и их гены-мишени (использован алгоритм TarPmiR)  
 Fig. 3. MicroRNAs and their target genes (the TarPmiR algorithm was used)

Таблица 2. Избыточная представленность в основных сигнальных путях дифференциально экспрессирующихся микроРНК

Table 2. Excessive representation in the main signal pathways of differentially expressed microRNAs

Источник аннотации Annotation source	Сигнальный путь Signal pathway	p	Число микроРНК Number of micro-RNAs	МикроРНК MicroRNA
miRTar-Base (Gene Ontology)	Репарация ДНК (GO0006298) DNA repair (GO0006298)	0,0000014	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Сигнальный путь апоптоза (GO0097190) Apoptosis signal pathway (GO0097190)	0,0000945	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p

Продолжение табл. 2

Continuation of table 2

Источник аннотации Annotation source	Сигнальный путь Signal pathway	<i>p</i>	Число микроРНК Number of micro-RNAs	МикроРНК MicroRNA
miRTar-Base (Gene Ontology)	Клеточный ответ на механический стимул (GO0071260) Cell response to mechanical stimulus (GO0071260)	0,0002000	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Активация JUN-киназы (GO0007257) JUN-kinase activation (GO0007257)	0,0002470	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Эпителиально-мезенхимальный переход (GO0001837) Epithelial-to-mesenchymal transition (GO0001837)	0,0002530	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Поддержание длины теломер (GO0000723) Telomere length maintenance (GO0000723)	0,0002820	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Активация MAPKK (GO0000186) MAPKK activation (GO0000186)	0,0003240	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Сигнальный путь Notch (GO0007219) Notch signal pathway (GO0007219)	0,0003910	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Регуляция воспалительного ответа (GO0050728) Inflammatory response regulation (GO0050728)	0,0006810	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Дифференцировка эпителиальных клеток (GO0030855) Epithelial cell differentiation (GO0030855)	0,0007760	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
miRWalk (Gene Ontology)	Регуляция активности транскрипционного фактора NF-κB (GO0032088) Regulation of NF-κB transcription factor activity	0,0009430	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p

Окончание табл. 2

End of table 2

Источник аннотации Annotation source	Сигнальный путь Signal pathway	<i>p</i>	Число микроРНК Number of micro-RNAs	МикроРНК MicroRNA
miRWalk (Gene Ontology)	Связывание рецептора эстрогена (GO0030331) Estrogen receptor binding (GO0030331)	0,0000015	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Метаболический процесс активных форм кислорода (GO0072593) Reactive oxygen species metabolic process (GO0072593)	0,0000040	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Гуморальный иммунный ответ (GO0006959) Humoral immune response (GO0006959)	0,0000112	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Ответная реакция на вирус (GO0051607) Response to viruses (GO0051607)	0,0000167	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Рост клеток (GO0016049) Cell growth (GO0016049)	0,0000508	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Ответ на цитокиновый стимул (GO0034097) Response to cytokine stimulus (GO0034097)	0,0001080	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Старение клеток (GO0007569) Cell senescence (GO0007569)	0,0001620	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Wnt-сигнальный путь (GO0016055) Wnt signaling pathway (GO0016055)	0,0002480	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Взаимодействие с вирусом (GO0019048) Interaction with viruses (GO0019048)	0,0053569	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p

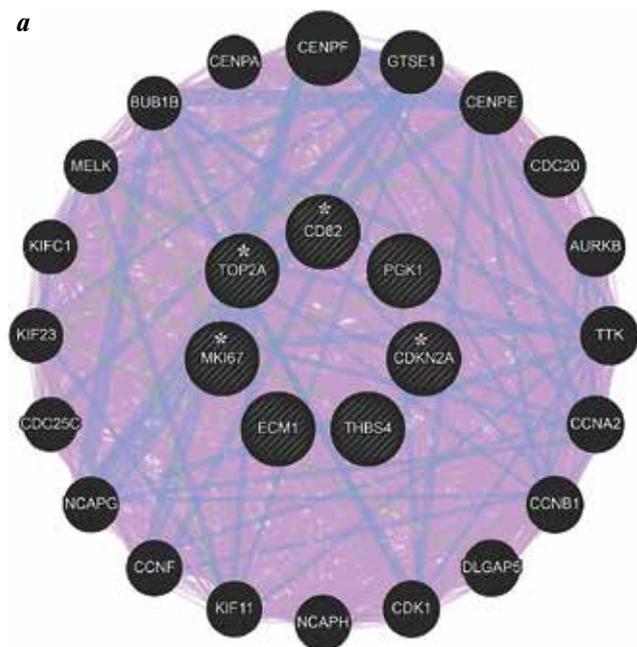
Таблица 3. Заболевания, ассоциированные с изменением экспрессии исследуемых микроРНК

Table 3. Disorders associated with changes in expression of the studied microRNAs

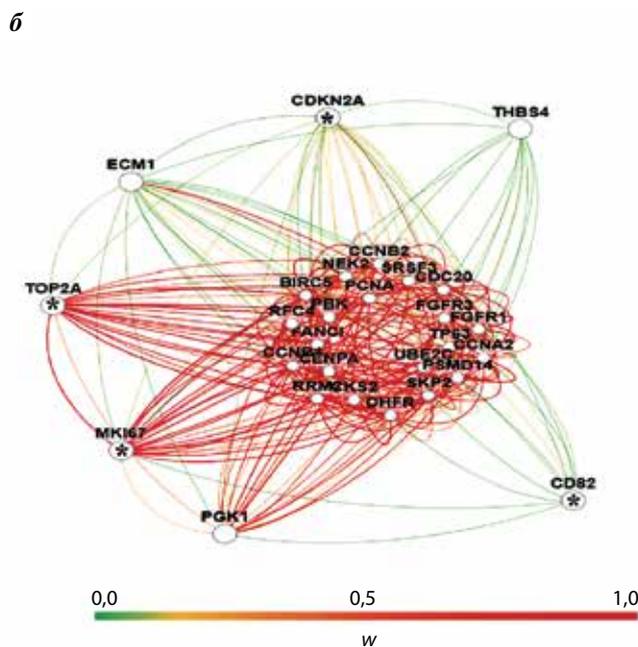
Источник аннотации Annotation source	Заболевание Disorder	<i>p</i>	Число микроРНК Number of microRNAs	МикроРНК MicroRNA
Diseases (miRWalk)	Аденокарцинома Adenocarcinoma	0,0031665	4	hsa-miR-145-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p
	Карцинома <i>in situ</i> Carcinoma <i>in situ</i>	0,0029936	2	hsa-miR-145-5p hsa-miR-21-5p
Diseases (MNR)	Аденовирусные инфекции Adenoviral infections	0,0000000	6	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p
	Инфекция вирусом гепатита С Hepatitis C viral infection	0,0000002	5	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p
	Опухоли Tumors	0,0000001	6	hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Нарушение липидного обмена Lipid metabolism disorders	0,0000001	5	hsa-miR-145-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Новообразования шейки матки Cervical neoplasms	0,0000003	6	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p
	Рак эндометрия Endometrial cancer	0,0000028	5	hsa-miR-145-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p
	Плоскоклеточный рак полости рта Oral squamous cell carcinoma	0,0000069	7	hsa-miR-1246 hsa-miR-145-5p hsa-miR-196b-5p hsa-miR-34a-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-21-5p hsa-miR-96-5p

циенток с CIS выявлено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение экспрессии генов *PGK1*, *THBS4*, *MKI67*, *TOP2A* и *CD82* в 2,0; 2,5; 5,0; 3,3 и 5,0 раза соответственно относительно контрольной группы (см. рис. 5).

Также необходимо отметить следующие статистически значимые (критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони,  $p < 0,05$ ) изменения экспрессии генов: 1) снижение экспрессии гена *PGK1* в 3,4 раза в CIN3



■ Соэкспрессия / Co-expression  
 ■ Солокализация / Co-localization  
 ■ Генетическое взаимодействие / Genetic interaction



**Рис. 4.** Графическое представление функциональных сетей взаимосвязей между генами, а также силы этих взаимосвязей, рассчитанной с помощью алгоритма «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями» (а) и алгоритма GIANT (б). \*Гены-мишени микроРНК

**Fig. 4.** Graphic representation of functional connections between genes and their strength calculated using the network integration with several associations (а) and GIANT (б) algorithms. \*MicroRNA target genes

**Таблица 4.** Сила взаимосвязей между генами, рассчитанная с помощью алгоритмов GIANT и «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями»

**Table 4.** Strength of interactions between genes calculated using the GIANT and network integration with several associations algorithms

Ген 1 Gene 1	Ген 2 Gene 2	W**
CD82*	MKI67*	0,00786
CD82*	PGK1	0,00420
CD82*	CDKN2A*	0,02087
MKI67*	TOP2A*	0,91309
MKI67*	PGK1	0,30838
MKI67*	THBS4	0,01263
MKI67*	CDKN2A*	0,09281
TOP2A*	ECM1	0,04369
TOP2A*	CDKN2A*	0,06414
PGK1	ECM1	0,02685

\*Гены-мишени микроРНК. \*\*Среднее геометрическое значение W, рассчитанное с помощью алгоритмов GIANT и «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями».

\*MicroRNA target genes. \*\*W geometric mean calculated using the GIANT and network integration with several associations algorithms.

относительно CIN1; 2) снижение экспрессии *CDKN2A* в 2,8 и 3,4 раза в CIN1 и CIS относительно CIN3; 3) снижение экспрессии *MKI67* в 14 раз в CIS относительно CIN3; 4) снижение экспрессии *TOP2A* и *CD82* в 17 и 9 раз в CIS относительно CIN2.

Таким образом, каждая степень CIN характеризовалась особым молекулярным профилем (табл. 5).

**Обсуждение**

Результаты проведенного исследования позволили выявить особенности экспрессии 7 мкРНК (miR-145, miR-196b, miR-34a, miR-20a, miR-21, miR-375 и miR-96) в CIN разной степени тяжести. Так, у пациенток с CIN1 экспрессия данных мкРНК носит разнонаправленный характер: повышена экспрессия miR-145, miR-34a, miR-20a и miR-375, снижена экспрессия miR-21 и не изменена экспрессия miR-196b и miR-96 относительно пациенток контрольной группы. У пациенток с CIN2 повышена экспрессия только miR-375, а экспрессия остальных мкРНК не изменена. У пациенток с CIN3 наблюдалось снижение экспрессии miR-196b и miR-34a, при том что экспрессия остальных мкРНК не изменена. У пациенток с CIS наблюдалось подавление экспрессии всех исследованных мкРНК в 2,5–5,0 раза относительно контрольной группы (см. табл. 5).

Результаты биоинформационного анализа показывают, что данные мкРНК вовлечены в регуляцию

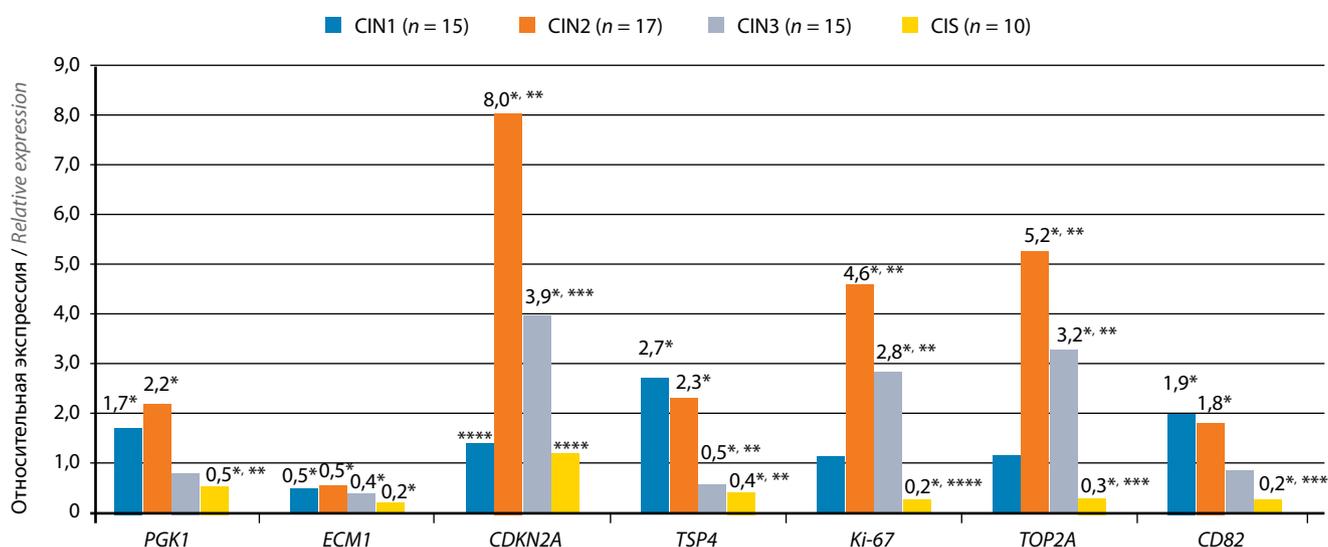


Рис. 5. Относительные уровни экспрессии матричной РНК (экспрессия генов) в тканях шейки матки с различной степенью диспластических повреждений эпителия. Статистически значимые различия показателей тканей шейки матки с различной степенью диспластических повреждений эпителия выявлены с помощью критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони: \*относительно показателей эпителия без диспластических повреждений,  $p < 0,005$ ; \*\*относительно показателей CIN1,  $p < 0,05$ ; \*\*\*относительно показателей CIN2,  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*относительно показателей CIN3,  $p < 0,05$ . CIN – цервикальная интраэпителиальная неоплазия; CIS – карцинома in situ

Fig. 5. Relative matrix RNA expression levels (gene expression) in cervical tissues with varying levels of dysplastic changes in the epithelium. Statistically significant differences in characteristics of cervical tissues with varying severity of dysplastic changes in the epithelium were identified using the Mann–Whitney test with Bonferroni correction: \*relative to the epithelium without dysplastic changes,  $p < 0.005$ ; \*\*relative to CIN1,  $p < 0.05$ ; \*\*\*relative to CIN2,  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*relative to CIN3,  $p < 0.05$ . CIN – cervical intraepithelial neoplasia; CIS – carcinoma in situ

Таблица 5. Молекулярный профиль цервикальных интраэпителиальных неоплазий разной степени тяжести

Table 5. Molecular profile of cervical intraepithelial neoplasias of varying severity

Степень тяжести Severity	miR-145	miR-196b	miR-34a	miR-20a	miR-21	miR-375	miR-96	CDKN2A	Ki-67	TOP2A	CD82	PGK1	TSP4	ECM1
CIN1	+	0	+	+	-	+	0	0	0	0	+	+	+	-
CIN2	0	0	0	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	-
CIN3	0	-	-	0	0	0	0	+	+	+	0	0	-	-
CIS	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-

Примечание. Относительно контрольной группы с эпителием без диспластических повреждений повышение экспрессии (+); отсутствие изменений (0); снижение экспрессии (-).

Note. Relative to the control group with epithelium without dysplastic changes: increased expression (+); no changes (0); decreased expression (-).

репарации ДНК, апоптоза, эпителиально-мезенхимального перехода, сигнальных путей MAPKK и Notch, регуляцию воспалительного ответа и дифференцировки эпителиальных клеток, регуляцию рецепции эстрогена и иммунного ответа, в том числе на вирусную инфекцию (см. табл. 2). Следует отметить, что на начальной стадии диспластических повреждений (CIN1) повышается экспрессия именно мкРНК (miR-145, miR-34a, miR-20a и miR-375), регулирующих иммунный ответ и взаимодействие с вирусом, в данном случае с ВПЧ.

Анализ базы данных MNDR (см. табл. 3) [19] показал, что мкРНК, изменяющие свою экспрессию в нашем исследовании, ассоциированы с новообразованиями шейки матки (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p,

hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p) и вирусными инфекциями (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p). По данным базы miRWalk (см. табл. 3), 4 из исследованных мкРНК ассоциированы с развитием аденокарцином (hsa-miR-145-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p), 2 мкРНК – с развитием CIS (hsa-miR-145-5p и hsa-miR-21-5p).

Полученные результаты согласуются с данными других авторов. Так, В. Li и соавт. исследовали экспрессию miR-34a в нормальном эпителии шейки матки, при CIN3 и РШМ с помощью ПЦР с обратной транскрипцией [20]. По их данным, экспрессия miR-34a была значительно снижена в группах CIN и РШМ по сравнению с нормальным эпителием. Авторы пришли

к выводу о том, что это начальное событие в развитии РШМ и miR-34a можно рассматривать как потенциальный молекулярный маркер для скрининга РШМ.

В ряде исследований также показана дифференциальная экспрессия miR-145, miR-20a, miR-21 [21, 22]. В 2013 г. M. Bierkens и соавт. обнаружили, что miR-375 снижает экспрессию при переходе от нормального эпителия к РШМ как в тканях, так и в клетках цитологических мазков [23].

Особый интерес представляет дифференциальная экспрессия мкРНК miR-21 [24]. Определение функции miR-21 было объектом для многих исследовательских групп в последние 10 лет. Она взаимодействует с большим количеством генов-мишеней и тонко реагирует на внеклеточные сигналы. Несмотря на то что miR-21 была признана ключевым регулятором процессов, вовлеченных в контроль пролиферации клеток, она также связана с ключевыми процессами и при воспалении. В отличие от других мкРНК miR-21 не просто характерна для провоспалительного или иммуносупрессивного статуса, но она действует как ключевой сигнал, опосредующий их баланс [25].

Однако имеющиеся в настоящее время данные (учитываются базы данных, публикации и собственные исследования) не позволяют объяснить биологический смысл обнаруженных нами разнонаправленных флуктуаций экспрессии мкРНК при CIN1–3 и CIS.

МикроРНК hsa-miR-196b-5p и hsa-miR-34a-5p таргетируют гены *CDKN2A*, *MKI67* и *TOP2A*, *CD82* соответственно. При этом общепринято [5], что повышение уровня мкРНК должно приводить к снижению уровня экспрессии гена-мишени и наоборот. МикроРНК hsa-miR-196b-5p снижает свою экспрессию у пациенток с CIN3 и CIS, при этом экспрессия *CDKN2A* и *MKI67* повышается только в подгруппе CIN3, а в CIS не изменяется либо снижается соответственно. Экспрессия мкРНК hsa-miR-34a-5p повышается при CIN1 и снижается у пациенток с CIN3 и CIS, при этом экспрессия *TOP2A* и *CD82* не изменяется и повышается при CIN1 соответственно, снижается у пациенток с CIS, у пациенток с CIN3 экспрессия *TOP2A* повышается, а *CD82* не изменяется, т. е. в полученных данных наблюдается неполное соответствие изменения экспрессии мкРНК и их эффекта на гены-мишени. Данный эффект можно объяснить множеством других молекулярных факторов, влияющих на транскрипционную активность генов, таких как изменение копийности генов, метилирование и изменение уровня длинных некодирующих РНК [5, 26].

Тем не менее у 7 генетических локусов (*CDKN2A*, *MKI67*, *TOP2A*, *CD82*, *PGK1*, *THBS4* и *ECM1*), выбранных на основе биоинформационного анализа, выявлено изменение экспрессии у пациенток с CIN разной степени тяжести относительно пациенток без неоплазий.

Так, для гена *ECM1* обнаружено снижение транскрипционной активности при неоплазиях всех степе-

ней тяжести (CIN1–3 и CIS). *ECM1* (Extracellular Matrix Protein 1) кодирует белок, стимулирующий пролиферацию эндотелиальных клеток и способствующий ангиогенезу. В настоящее время показано, что *ECM1* играет важную роль при РШМ, регулируя активацию эпителиально-мезенхимального перехода [27]. Обнаруженное изменение экспрессии, возможно, отражает компенсаторный ответ ткани, снижающий рост кровеносных сосудов в очаге поражения.

Ген *CDKN2A*, не изменяющий свою экспрессию при CIN1 и CIS, но гиперэкспрессированный при CIN2, 3, кодирует белки p16INK4A и p14ARF. Оба действуют как опухолевые супрессоры, регулируя клеточный цикл: p16INK4A ингибирует циклинзависимые киназы 4 и 6, p14ARF активирует супрессор опухоли p53. Поэтому гиперэкспрессия при CIN2, -3 также может быть компенсаторным механизмом, направленным на подавление развития вирусассоциированной опухоли.

Ген *TSP4*, гиперэкспрессированный при CIN1, 2 и гипоекспрессированный при CIN3 и CIS, кодирует адгезивный гликопротеин, который опосредует межклеточные взаимодействия и участвует в различных процессах, включая клеточную пролиферацию, миграцию, адгезию и прикрепление, воспалительный ответ на повреждение, регуляцию воспаления и ремоделирования. *TSP4* связывается с белками структурного внеклеточного матрикса и модулирует в ответ на повреждение ткани, способствуя адаптивному ремоделированию [28]. Соответственно, при CIN1, 2 повышение экспрессии данного гена может быть адаптивным ответом на повреждение, а снижение при CIN3 и CIS может отражать нарушение межклеточных взаимодействий, происходящих при формировании неоплазий.

Ген *CD82* кодирует мембранный гликопротеин, экспрессия которого подавляется при прогрессии опухолей. Снижение его экспрессии наблюдается при РШМ и в других исследованиях и ассоциировано с плохой выживаемостью больных [29].

Ген *PGK1* кодирует гликолитический фермент (фосфоглицераткиназу), который катализирует превращение 1,3-дифосфоглицерата в 3-фосфоглицерат (образование АТФ при аэробном гликолизе). Помимо регуляции клеточного метаболизма *PGK1* участвует во множестве биологических процессов, включая ангиогенез, аутофагию и репарацию ДНК. Из-за своих многогранных функций роль *PGK1* в развитии рака является неоднозначной. Высокая внутриклеточная экспрессия *PGK1* приводит к пролиферации опухолевых клеток. При этом высокая внеклеточная экспрессия *PGK1* подавляет рост злокачественных опухолей за счет остановки ангиогенеза [30].

Ген *MKI67*, гиперэкспрессированный при CIN2, 3 и гипоекспрессированный при CIS, кодирует белок, который предотвращает коллапс хромосом в единую массу хроматина, образуя барьер стерического и электростатического заряда: белок обладает высоким

суммарным электрическим зарядом и действует, как поверхностно-активное вещество, диспергируя хромосомы и обеспечивая независимую подвижность хромосом. Заболевания, ассоциированные с гиперэкспрессией *MKI67*, включают неоплазии шейки матки. При РШМ показатель экспрессии *MKI67* используется в качестве маркера индекса пролиферации злокачественных клеток, связанного со специфическими характеристиками опухоли, но не в качестве прогностического фактора выживания или рецидива заболевания [31].

*TOP2A* (DNA topoisomerase 2-alpha) кодирует ДНК-топоизомеразу, фермент, который контролирует и изменяет топологические состояния ДНК во время транскрипции, играет важную роль в регулировании продолжительности периода транскрипционных колебаний. Повышенная экспрессия *TOP2A* была выявлена при РШМ с использованием различных высоко-

производительных технологий профилирования экспрессии. Также было показано, что *TOP2A* был гиперэкспрессирован в клетках и тканях шейки матки с повышенной экспрессией белков E6/E7 ВПЧ [32]. Дисбаланс в транскрипционной активности *TOP2A*, наблюдаемый при CIN2, 3 и CIS, может привести к аномальному течению процесса митоза.

### Заключение

Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что каждая степень CIN характеризуется своим особым молекулярным профилем — дифференциальной экспрессией мкРНК, их геномишней и ассоциированных с ними в общих сигнальных путях генов. Это позволяет рассматривать эти гены и мкРНК в качестве потенциальных маркеров как предраковых состояний, так и процесса перехода интраэпителиальных неоплазий в CIS.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019;144(8):1941–53. DOI: 10.1002/ijc.31937.
2. Bosch F.X., Broker T.R., Forman D. et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* 2013;31(7):1–31. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.10.003.
3. McCreddie M.R., Paul C., Sharples K.J. et al. Consequences in women of participating in a study of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia 3. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2010;50(4):363–70. DOI: 10.1111/j.1479-828X.2010.01170.x.
4. Доброхотова Ю.Э., Боровкова Е.И. Международные алгоритмы ведения пациенток с дисплазией шейки матки. *Гинекология* 2018;20(5):27–32. DOI: 10.26442/2079-5696\_2018.5.27-32. [Dobrokhotova Yu.E., Borovkova E.I. International algorithms for the management of patients with uterine cervical dysplasia. *Ginekologiya = Gynecology* 2018;20(5):27–32. (In Russ.)].
5. 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. Доступно по: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29529> (дата обращения 29.05.2020). DOI: 10.17513/spno.29529. [Dimitriadi T.A., Burtsev D.V., Dzenkova E.A., Kutilin D.S. MicroRNA as markers of pre-cancer diseases progression in cervical cancer. *Sovremennye problem nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education* 2020;1. Available at: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29529> (accessed 29.05.2020). (In Russ.)].
6. Wilting S.M., Steenberg R.D., Tijssen M. et al. Chromosomal signatures of a subset of high-grade premalignant cervical lesions closely resemble invasive carcinomas. *Cancer Res* 2009;69(2):647–55. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2478.
7. 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;1(2):581–5. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.
8. Кутилин Д.С., Никитин И.С., Кит О.И. Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки. *Успехи молекулярной онкологии* 2019;6(1):57–62. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-57-62. [Kutilin D.S., Nikitin I.S., Kit O.I. Features of some transcription factors gene expression in the malignancy tissues of the corpus uteri. *Uspekhii molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):57–62. (In Russ.)].
9. Balcells I., Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol* 2011;11(1):70. DOI: 10.1186/1472-6750-11-70.
10. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3(7):research0034. DOI:10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
11. Peltier H.J., Latham G.J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008;14(5):844–52. DOI: 10.1261/rna.939908.
12. Shen Y., Li Y., Ye F. et al. Identification of miR-23a as a novel microRNA normalizer for relative quantification in human uterine cervical tissues. *Exp Mol Med* 2011;43(6):358–66. DOI: 10.3858/emmm.2011.43.6.039.
13. Кутилин Д.С., Димитриади С.Н., Водолажский Д.И. и др. Влияние тепловой ишемии-реперфузии на экспрессию апоптоз-регулирующих генов в почечной ткани больных с почечно-клеточным раком. *Нефрология* 2017;21(1):80–6. DOI:10.24884/1561-6274-2017-21-1-80-86. [Kutilin D.S., Dimitriadi S.N., Vodolazhsky D.I. et al. Effect of thermal ischemia-reperfusion on expression of apoptosis-regulating genes in the renal tissue of patients with renal cell carcinoma. *Nefrologiya = Nephrology* 2017;21(1):80–6. (In Russ.)].
14. Jones E., Oliphant E., Peterson P. SciPy: open source scientific tools for python, 2001. Available at: <http://www.scipy.org/>.
15. Ding J., Li X., Hu H. TarPmiR: a new approach for microRNA target site prediction. *Bioinformatics* 2016;32(18):2768–75. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw318.

16. Backes C., Khaleeq Q.T., Meese E., Keller A. miEAA: microRNA enrichment analysis and annotation. *Nucleic Acids Res* 2016;44(W1):W110–6. DOI: 10.1093/nar/gkw345.
17. Greene C.S., Krishnan A., Wong A.K. et al. Understanding multicellular function and disease with human tissue-specific networks. *Nat Genet* 2015;47(6):569–76. DOI: 10.1038/ng.3259.
18. Кутилин Д.С., Кошелева Н.Г., Гусарева М.А. и др. Копийность генов как фактор радиорезистентности клеток аденокарциномы толстой кишки линии HT-29. Современные проблемы науки и образования 2019;5. Доступно по: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29224> (дата обращения 22.05.2020). DOI: 10.17513/spno.29224. [Kutulin D.S., Kosheleva N.G., Gusareva M.A. et al. Gene copy number variation as a factor of radioresistance of colon adenocarcinoma cells of the line HT-29. *Sovremennye problem nauki i obrazovaniya* = Modern Problems of Science and Education 2019;5. Available at: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29224> (accessed 22.05.2020). (In Russ.)].
19. Wang Y., Chen L., Chen B. et al. Mammalian ncRNA-disease repository: a global view of ncRNA-mediated disease network. *Cell Death Dis* 2013;4(8):e765. DOI: 10.1038/cddis.2013.292.
20. Li B., Hu Y., Ye F. et al. Reduced miR-34a expression in normal cervical tissues and cervical lesions with high-risk human papillomavirus infection. *Int J Gynecol Cancer* 2010;20(4):597–604. DOI: 10.1111/IGC.0b013e3181d63170.
21. Shishodia G., Shukla S., Srivastava Y. et al. Alterations in microRNAs miR-21 and let-7a correlate with aberrant STAT3 signaling and downstream effects during cervical carcinogenesis. *Mol Cancer* 2015; 14:116. DOI: 10.1186/s12943-015-0385-2.
22. Li Y., Wang F., Xu J. et al. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *J Pathol* 2011;224(4):484–95. DOI: 10.1002/path.2873.
23. Bierkens M., Krijgsman O., Wilting S.M. et al. Focal aberrations indicate EYA2 and hsa-miR-375 as oncogene and tumor suppressor in cervical carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 2013;52(1): 56–68. DOI: 10.1002/gcc.22006.
24. Zeng K., Zheng W., Mo X. et al. Dysregulated microRNAs involved in the progression of cervical neoplasm. *Arch Gynecol Obstet* 2015;292(4):905–13. DOI: 10.1007/s00404-015-3702-5.
25. Sheedy F.J. Turning 21: induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. *Front Immunol* 2015;6:19. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00019.
26. Колесников Е.Н., Максимов А.Ю., Кит О.И., Кутилин Д.С. Зависимость общей и безрецидивной выживаемости больных от молекулярно-генетического подтипа плоскоклеточного рака пищевода. *Вопросы онкологии* 2019;65(5):691–700. [Kolesnikov E.N., Maksimov A.Yu., Kit O.I., Kutulin D.S. Dependence of overall and relapse-free patients survival from molecular genetic subtype of esophageal squamous cell cancer. *Voprosy onkologii* = Problems in Oncology 2019;65(5):691–700. (In Russ.)].
27. Gan L., Meng J., Xu M. et al. Extracellular matrix protein 1 promotes cell metastasis and glucose metabolism by inducing integrin  $\beta$ /FAK/SOX2/HIF-1 $\alpha$  signaling pathway in gastric cancer. *Oncogene* 2018;37(6):744–55. DOI: 10.1038/onc.2017.363.
28. Martin C.M., Astbury K., McEvoy L. et al. Gene expression profiling in cervical cancer: identification of novel markers for disease diagnosis and therapy. *Methods Mol Biol* 2009;511:333–59. DOI: 10.1007/978-1-59745-447-6\_15.
29. Zhou X.L., Wang M. Expression levels of survivin, Bcl-2, and KAI1 proteins in cervical cancer and their correlation with metastasis. *Genet Mol Res* 2015;14(4):17059–67. DOI: 10.4238/2015.December.16.6.
30. He Y., Luo Y., Zhang D. et al. PGK1-mediated cancer progression and drug resistance. *Am J Cancer Res* 2019;9(11):2280–302.
31. Li H., Shen H., Xu Q. et al. Expression of Pin1 and Ki67 in cervical cancer and their significance. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2006;26(1):120–2. DOI: 10.1007/BF02828056.
32. Xu Z., Zhou Y., Shi F. et al. Investigation of differentially-expressed microRNAs and genes in cervical cancer using an integrated bioinformatics analysis. *Oncol Lett* 2017;13(4):2784–90. DOI: 10.3892/ol.2017.5766.

#### Вклад авторов

Т.А. Димитриади: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа;

Д.В. Бурцев: обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа;

Е.А. Дженкова: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи;

Д.С. Кутилин: анализ полученных данных (включая статистический), написание текста рукописи.

#### Authors' contributions

T.A. Dimitriadi: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, obtaining data for analysis;

D.V. Burtsev: reviewing of publications of the article's theme, obtaining data for analysis;

E.A. Dzhenkova: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme;

D.S. Kutulin: analysis of the obtained data (including statistical), article writing.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Дженкова / E.A. Dzhenkova: <https://orcid.org/0000-0002-3561-098X>

Д.С. Кутилин / D.S. Kutulin: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>

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

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

#### Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России. Протокол № 4 от 20.03.2019.

Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

#### Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee National Medical Research Center for Oncology. Protocol No 4 dated 20.03.2019.

All patients gave written informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 29.05.2020. **Принята к публикации:** 21.07.2020.

**Article submitted:** 29.05.2020. **Accepted for publication:** 21.07.2020.