

## Оценка экспрессии 4 микроРНК в цитологических препаратах в качестве дополнительного метода диагностики рака шейки матки

П.А. Архангельская<sup>1,5</sup>, Р.Б. Самсонов<sup>1,2</sup>, Т.А. Штам<sup>1,2</sup>, М.С. Князева<sup>1,2</sup>, М.К. Иванов<sup>3,4</sup>, С.Е. Титов<sup>3,4</sup>,  
Н.Н. Колесников<sup>3</sup>, Е.В. Бахидзе<sup>1,5</sup>, И.В. Берлев<sup>1,5</sup>, А.А. Михетько<sup>1</sup>, С.Л. Воробьев<sup>6</sup>, А.В. Малек<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России;  
Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

<sup>2</sup>ООО «Онкосистема»; Россия, 143026 Москва, территория инновационного центра «Сколково», ул. Луговая, 4, стр. 9, пом. 16;

<sup>3</sup>ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» СО РАН; Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8/2;

<sup>4</sup>АО «Вектор-Бест»; Россия, 630559 Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Кольцово, зона АБК;

<sup>5</sup>ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России;  
Россия, 191015 Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41;

<sup>6</sup>ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики»;  
Россия, 192283 Санкт-Петербург, ул. Олеко Дундича, 8, корп. 2, лит. А

**Контакты:** Роман Борисович Самсонов Rom\_207@mail.ru

**Введение.** Рак шейки матки (РШМ) занимает 4-е место в структуре женской онкологической заболеваемости. Основным методом скрининга РШМ остается цитологическое исследование цервикального эпителия. Этот метод позволяет оценить степень цервикальной дисплазии (потенциал малигнизации), однако он имеет ряд ограничений и недостатков. Разработка и внедрение в клиническую практику новых методов молекулярно-генетического анализа может повысить информативность традиционного цитологического исследования и, следовательно, объективность выбора лечебной тактики.

**Цель исследования** — разработка и апробация нового метода дифференциальной диагностики тяжелой внутриэпителиальной дисплазии и инвазивной карциномы шейки матки.

**Материалы и методы.** Метод основан на анализе малых некодирующих молекул РНК (микроРНК), изолированных из материала традиционных цитологических мазков. По результатам исследования литературных данных выбраны 18 «маркерных» молекул микроРНК, уровень экспрессии которых оценен в 166 препаратах мазков из цервикального канала с различными цитологическими диагнозами. Анализ проведен методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией.

**Результаты.** Оценка соотношения экспрессионной активности пар микроРНК: 126/375; 20а/375; 126/145 позволяет дифференцировать пограничные состояния тяжелой внутриэпителиальной дисплазии и инвазивной карциномы шейки матки с высокой достоверностью (показатели количественной интерпретации кривой ошибок: 0,8; 0,75; 0,72 соответственно).

**Выводы.** Анализ микроРНК в препаратах цитологических мазков представляется перспективным методом дополнительной диагностики РШМ. Метод является объективным и может быть предложен в качестве вспомогательного в случаях, когда цитологическое исследование не позволяет уверенно дифференцировать пограничные патологические состояния цервикального эпителия. Внедрение метода в клиническую практику требует методологической оптимизации и дополнительной валидации на большем клиническом материале.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, диагностика, микроРНК, обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР)

DOI: 10.17650/1994-4098-2017-13-3-63-72

### Evaluation of expression of 4 mirnas in cytological samples as an additional method of cervical cancer diagnosis

P.A. Arkhangel'skaya<sup>1,5</sup>, R.B. Samsonov<sup>1,2</sup>, T.A. Shtam<sup>1,2</sup>, M.S. Knyazeva<sup>1,2</sup>, M.K. Ivanov<sup>3,4</sup>, S.E. Titov<sup>3,4</sup>,  
N.N. Kolesnikov<sup>3</sup>, E.V. Bakhidze<sup>1,5</sup>, I.V. Berlev<sup>1,5</sup>, A.A. Mikhetchko<sup>1</sup>, S.L. Vorobyev<sup>6</sup>, A.V. Malek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center, Ministry of Health of Russia;  
68 Leningradskaya St., Pesochnyi Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;

<sup>2</sup>Oncosystem; room 16, 4–9 Lugovaya St., Skolkovo Innovation Center, Moscow 143026, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences;  
Acad. Lavrentiev Ave. 8/2 Novosibirsk 630090 Russia;

<sup>4</sup>Vector-Best Ltd.; ABK zone, Koltsovo Settlement, Novosibirsk District 630559, Russia;

<sup>5</sup>North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Ministry of Health of Russia;  
41 Kirochnaya St., Saint Petersburg 191015, Russia;

<sup>6</sup>National Centre of Clinical and Morphological Diagnostics; 8/2 (A) Oleko Dundich St., Saint Petersburg 192283, Russia

**Introduction.** Cervical cancer is the 4th most common cancer among women. The main screening method for cervical cancer is cytological examination of the cervical epithelium. This method allows to evaluate the level of cervical dysplasia (malignant potential) but it has several limitations and flaws. Development and implementation of new methods of molecular and genetic analysis in clinical practice can increase informational value of the traditional cytological examination and therefore objectivity in choosing treatment options.

**Objective** is to develop and verify a new method of differential diagnosis of severe intraepithelial dysplasia and invasive cervical cancer.

**Materials and methods.** The method is based on analysis of small non-coding RNA molecules (miRNAs) extracted from the material of traditional Pap smears. Based on literature search, 18 "marker" microRNA molecules were chosen and their expression levels were estimated in 166 samples of Pap smears from cervical canals with different cytological diagnoses. The analysis was performed using reverse transcription polymerase chain reaction.

**Results.** Estimation of ratios between expression levels of miRNA pairs: 126/375; 20a/375; 126/145 allows to differentiate with high confidence borderline states of severe intraepithelial dysplasia and invasive cervical carcinoma (coefficients of quantitative interpretation of the error curve were 0.8, 0.75, 0.72, respectively).

**Conclusions.** Analysis of miRNAs in Pap smear samples is a promising additional method of cervical cancer diagnosis. The method is objective and can be proposed as a supporting technique in cases when cytological examination doesn't allow to differentiate between borderline pathological states of the cervical epithelium. Implementation of the method in clinical practice requires methodological optimization and additional validation using more clinical material.

**Key words:** cervical cancer, diagnosis, miRNA, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

## Введение

Рак шейки матки (РШМ) занимает четвертое место в структуре женской онкологической заболеваемости. По данным Всемирной организации здравоохранения в 2012 г. диагноз РШМ был установлен в 528 тыс. случаев, заболевание стало причиной смерти 266 тыс. женщин [1, 2]. Наблюдается существенная разница между статистическими показателями смертности между странами Западной Европы (2 на 100 тыс. населения) и Средней и Восточной Африки (более 20 на 100 тыс.). Показатель летальности РШМ, рассчитанный на 100 тыс. и усредненный за период 2008–2012 гг., составил 2,3 для США [3] и 8,1 для России [4]. Связь между показателями смертности от РШМ и социальным уровнем указывает на значимость проблемы доступности для населения методов скрининга и диагностики этого заболевания.

Основным методом скрининга (так называемой вторичной профилактики) РШМ остается цитологическое исследование цервикального эпителия, который позволяет оценить степень цервикальной дисплазии, т. е. изменения плоского эпителия, соответствующие различному потенциалу малигнизации. До 2001 г. цитологическая классификация предполагала 4 степени дисплазии цервикального эпителия: слабую (cervical intraepithelial neoplasia – CIN I), умеренную (CIN II), тяжелую (CIN III) и внутриэпителиальный рак (carcinoma *in situ*, CIS). С целью оптимизации клинической интерпретации данных цитологического анализа в 2001 г. была разработана, а в 2014 г. модифицирована система классификации Бетесда (The Bethesda System), которая в настоящее время включает 2 варианта изменений плоскоклеточного цервикального эпителия (Squamous Intraepithelial Lesions, SIL) – низкой (Low-SIL, LSIL) и высокой (High-SIL, HSIL) степеней, а также группы с неопределенными (Atypical Squamous Cells

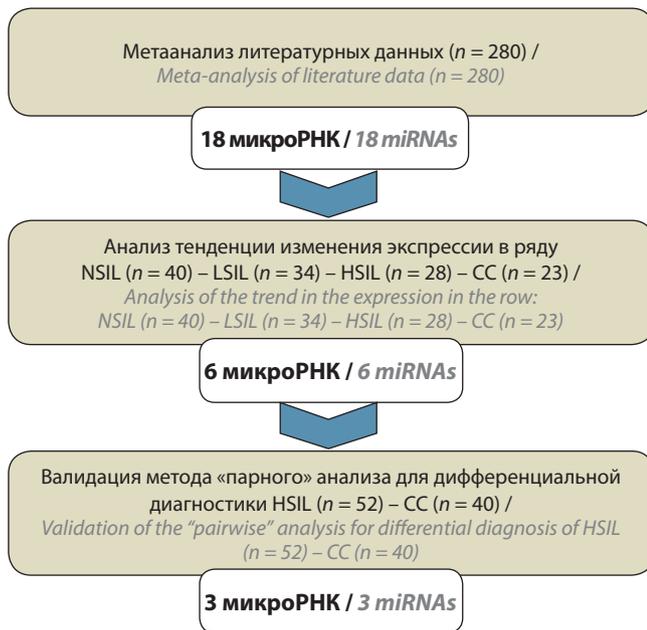
of Undetermined Significance, ASC-US) и подозрительными на тяжелую дисплазию (Atypical Squamous Cells, cannot exclude HSIL, ASC-H) изменениями [5, 6]. Российские цитологии руководствуются отечественной системой оценки изменений эпителия шейки матки (учетная форма № 446у-02, приложение № 4 к приказу Минздрава России от 24.04.2003 г. № 174), предполагающей формирование стандартного заключения, соответствующего в целом международным правилам.

В отечественной классификации выделяется группа интраэпителиальных изменений плоского эпителия высокой степени тяжести (что соответствует HSIL по системе классификации Бетесда [6]) и включает CIN II, CIN III, CIN и случаи, подозрительные на наличие инвазии. Как показывает практика консультативных и повторных исследований, цитологические заключения по материалам шейки матки отличаются невысокой воспроизводимостью и нередко не позволяют врачу-гинекологу (онкологу) однозначно определить лечебную тактику. Это объективно отражает имеющиеся ограничения рутинного цитологического исследования и требует проведения дополнительных клинических и лабораторных исследований. В выборе диагностической и/или лечебной тактики для пациенток этой группы (HSIL) имеют значение некоторые дополнительные критерии:

- результаты лабораторных исследований (инфицированность вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска, экспрессия онкопротеина p16/INK4a),

- клинические данные (возраст пациентки, анамнез, длительность/динамика наблюдаемой патологии) [7, 8].

Но эти критерии не являются абсолютными. В таких условиях решающее значение приобретают клинический опыт и квалификация специалистов – ци-



**Рис. 1.** Дизайн исследования. *n* – число образцов, включенных в анализ; микроРНК – малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты; NILM (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy) – отсутствие интраэпителиального поражения или злокачественности; LSIL и HSIL – изменения плоскоклеточного цервикального эпителия (Squamous Intraepithelial Lesions, SIL) низкой (Low-SIL) и высокой (High-SIL) степеней соответственно; CC (Cervical Cancer) – рак шейки матки

**Fig. 1.** Study design. *n* – number of samples included in the study; miRNAs – small non-coding ribonucleic acid molecules; NILM – negative for intraepithelial lesion or malignancy; LSIL and HSIL – squamous intraepithelial lesions low and high degrees, respectively; CC – cervical cancer

толога и гинеколога, что в определенных ситуациях не служит гарантией одинаково высокого качества медицинской помощи пациенткам.

Разработка и внедрение в клиническую практику новых методов молекулярно-генетического анализа может повысить информативность морфологических исследований и объективизировать выбор лечебной тактики. Молекулы-регуляторы синтеза белков на посттранскрипционном уровне, одна из форм малых некодирующих молекул рибонуклеиновой кислоты – микроРНК (microRNA, miRNA), активно участвуют в процессе малигнизации клеток, в том числе клеток цервикального эпителия [9, 10]. Характерные изменения экспрессии отдельных микроРНК могут иметь диагностическое значение наряду с традиционными методами [11, 12]. Большинство исследований в данной области, опубликованных к настоящему времени, было выполнено с использованием гистологического материала. Возможность выделения и анализа микроРНК из соскоба клеток цервикального эпителия показали авторы лишь нескольких работ [13]. Очевидно, практическое значение могла бы иметь разработка метода анализа микроРНК в материале цитологиче-

ских мазков из шейки матки после их первичного анализа, что позволило бы адаптировать этот метод к схемам традиционной морфологической диагностики. Этот подход активно внедряется для диагностики узловых заболеваний щитовидной железы [14]. Недавно мы показали целесообразность его применения в случае анализа материала тонкоигольной биопсии образований молочной железы [15].

**Целью** данного исследования являлись разработка и оценка метода анализа микроРНК в материале традиционных цитологических мазков для уточняющей (дифференциальной) диагностики пограничных состояний: HSIL и инвазивного РШМ. На рис. 1 представлена схема дизайна исследования, включавшего 3 этапа:

- 1) метаанализ литературных данных и выбор «потенциально маркерных» микроРНК;
- 2) анализ экспрессии выбранных микроРНК в группах пациенток с различной степенью дисплазии цервикального эпителия и выбор «маркерных» микроРНК;
- 3) разработку алгоритма интерпретации результатов анализа экспрессии микроРНК для дифференциальной диагностики состояний HSIL и инвазивного РШМ и валидации метода на расширенной выборке пациенток.

#### Материалы и методы

**Пациенты.** В исследовании, одобренном локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России 13.02.2014 (внутр. № 21), использован материал, полученный от пациенток, проходивших обследование/лечение в отделении онкогинекологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова за период 2010–2016 гг. Перед началом исследования клинический материал и информация были деперсонализированы. В работе использовали образцы соскоба цервикального эпителия, взятые и приготовленные рутинными методами (высушивание на воздухе, окрашивание гематоксилин-эозином). По результатам цитологического исследования образцы были распределены по 4 клиническим группам (согласно системе классифиции Бетесда): 1) отсутствие интраэпителиального поражения или злокачественности (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, NILM), *n* = 40; 2) LSIL, *n* = 34; 3) HSIL, *n* = 52; 4) рак шейки матки (Cervical Cancer, CC), *n* = 40. Все диагнозы HSIL и CC были подтверждены последующим гистологическим исследованием.

**Выделение РНК** проводили с помощью набора «РеалБест экстракция 100» (АО «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo

Scientific, США). Из материала цитологических препаратов удавалось получить от 5 до 50 мкг тотальной РНК удовлетворительного качества (А 260/280: 1,5–1,8) и в достаточной концентрации (120–550 нг/мкл).

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с этапом обратной транскрипции (ОТ).** Для получения комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) ОТ проводили в объеме 30 мкл. Использовали готовые реакционные смеси «РеалБест Мастермикс ОТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). Реакцию выполняли в течение 30 мин при температуре 42 °С, после чего реакционную смесь инкубировали 2 мин при 95 °С для инактивации обратной транскриптазы. Полученную реакционную смесь, содержащую кДНК, использовали в качестве матрицы для ПЦР, которую проводили в объеме 30 мкл с применением готовой реакционной смеси «РеалБест Мастермикс» (АО «Вектор-Бест», Россия) и раствора прямого и обратного праймеров и зонда. ПЦР проводили в режиме «реального времени» (real-time PCR) на амплификаторе CFX96 (BioRad Laboratories, США). Протокол реакции ПЦР: предварительный прогрев (94 °С – 2 мин), 50 основных циклов денатурации (94 °С – 10 с), отжига и элонгации (60 °С – 20 с).

Для анализа полученных данных и построения графиков использовано следующее программное обеспечение: GeNorm, GraphPad Prizm 6.0, Sirma Plot 12.

## Результаты

**«Потенциально маркерные» микроРНК.** Их выбор осуществляли в 2 этапа. Сначала был сделан метаанализ 8 исследований (табл. 1), в которых проводилась широкая сравнительная оценка профиля экспрессии микроРНК в ткани РШМ и в клетках измененного (или нормального) цервикального эпителия. По результатам всех 8 исследований, в которых суммарно анализировались 280 образцов, в цервикальный карциногенез оказались «вовлечены» 102 молекулы микроРНК, причем только 5 из них были упомянуты в 2 и более работах, что может отражать как несовершенство аналитических подходов, так и реальную популяционную разницу.

На следующем этапе результаты, опубликованные по каждой микроРНК, анализировались по базе PubMed с использованием в качестве ключевых слов сочетания «miR-X AND cervical cancer». Таким образом, было выбрано 18 молекул микроРНК, так называемых «потенциально маркерных» микроРНК: miR-106 [21, 24], miR-1246 [25, 26], miR-125b [27–29], miR-126 [30–32], miR-145 [33, 34], miR-146a [35, 36], miR-146b [37], miR-155 [38, 39], miR-192 [40], miR-196b [41], miR-200b [42, 43], miR-203 [44, 45], miR-20a [46], miR-21 [47, 48], miR-31 [49]; miR-34a [27, 50]; miR-375 [51, 52], miR-99a [53]. Их участие в цервикальном канцерогенезе было подтверждено как минимум в 2 независимых исследованиях.

Таблица 1. Список исследований, включенных в метаанализ

Table 1. List of studies included in the meta-analysis

Страна популяции	Материал (число образцов)	Метод анализа	Публикация
Китай China	CC (3) / N (3)	NGS	[16]
Северная и Южная Корея North and South Koreas	CC (9) / CIN I (12) / N (11)	microRNA Array	[17]
Китай China	CC (20) / CIN (30) / N (10)		[18]
Китай China	CC (15) / N (5)		[19]
Нидерланды Netherlands	CC (19) / CIN (18) / N (10)		[20]
Дания Denmark	CC (10) / N (10)		[21]
США USA	CC (29) / N (29)		NGS
Португалия Portugal	CC (4) / CIN (14) / N (19)	microRNA Array	[23]

**Примечание.** CC (cervical cancer) – инвазивный РШМ, CIN (cervical intraepithelial neoplasia) – цервикальная интраэпителиальная неоплазия, N (norma) – нормальный цервикальный эпителий, NGS (next-generation sequencing) – анализ по технологии секвенирования следующего поколения, microRNA Array – анализ по технологии микрочипов на основе реакции гибридизации.

**Note.** CC – cervical cancer, CIN – cervical intraepithelial neoplasia, N – normal cervical epithelium, NGS – next-generation sequencing.

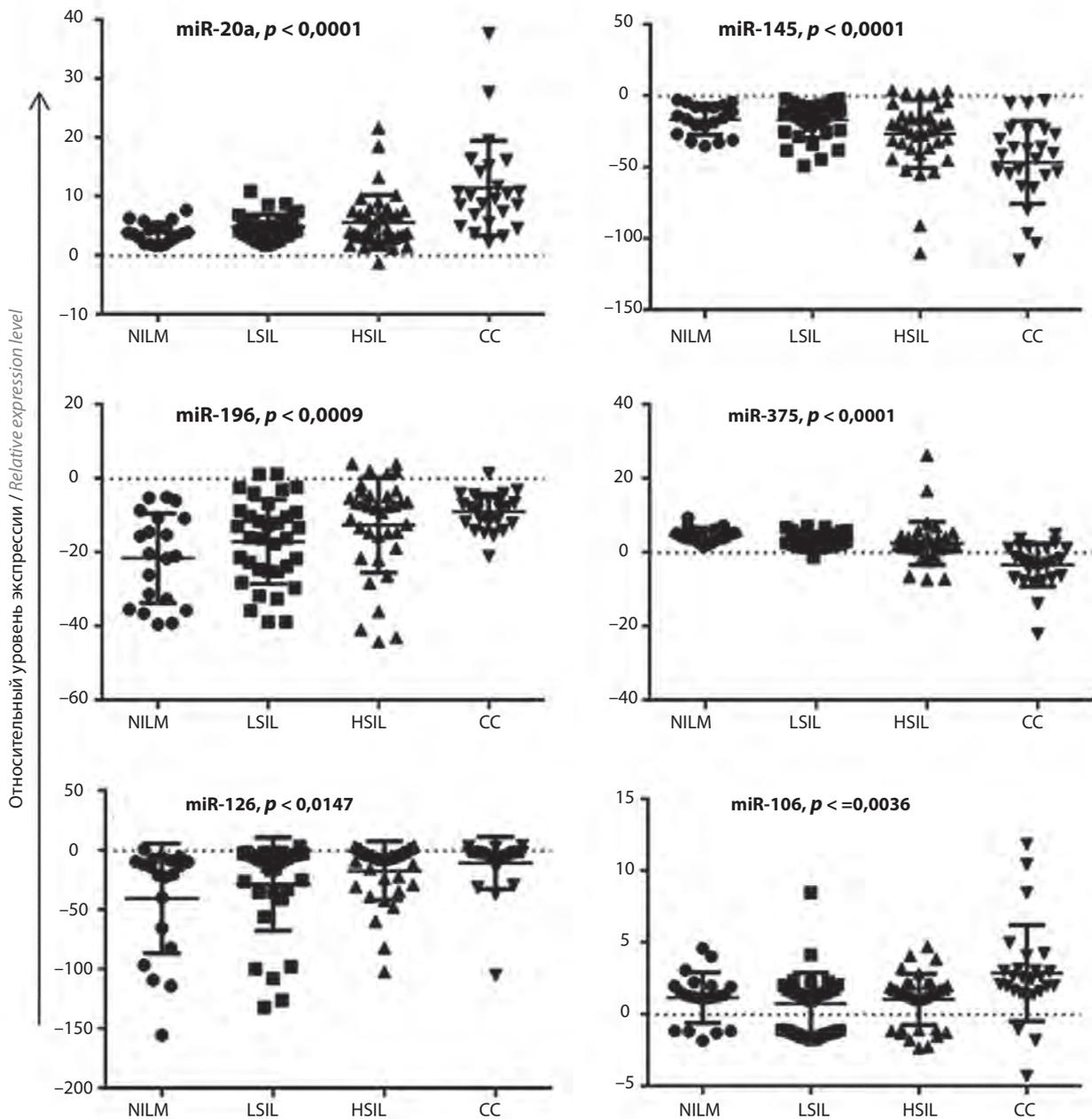


Рис. 2. Экспрессия «маркерных» микроРНК в группах NILM, LSIL, HSIL и CC: активация (miR-126, miR-106, miR-20a и miR-196) и угнетение (miR-145 и miR-375) экспрессии

Fig. 2. Expression of the “marker” miRNAs in the NILM, LSIL, HSIL, and CC groups: activation (miR-126, miR-106, miR-20a, and miR-196) and inhibition (miR-145 and miR-375) of expression

**Анализ экспрессии потенциально «маркерных» молекул в группах NILM, LSIL, HSIL и CC.** Уровень экспрессии 18 «потенциально маркерных» микроРНК был оценен в 125 образцах РНК, выделенной из материала цитологических препаратов (NILM = 40, LSIL = 34, HSIL = 28, CC = 23). Параллельно проводился анализ экспрессии нескольких микроРНК, которые предположительно одинаково активно экспрессируются в различных тканях и могут быть использованы в качестве нормализаторов. С помощью алгоритма geNorm [54]

оценивались индивидуальная экспрессионная изменчивость и ранжирование всех микроРНК, включенных в анализ. Таким образом, мы определили оптимальный нормализатор – среднее значение (Ct) 3 молекул: miR-96, miR-191 и miR-181b. Нормализация данных была проведена стандартным способом: по формуле  $\Delta Ct = 2^{(Ct_{\text{microRNA}} - Ct_{\text{norm}})}$ .

Затем среднее значение  $\Delta Ct$  было определено для каждой «потенциально маркерной» микроРНК в 4 клинических группах: NILM, L-SIL, H-SIL и CC.

При анализе экспрессии большинства микроРНК, включенных в исследование, не было выявлено четкой связи с клиническими данными. Лишь в 6 случаях из 18 была обнаружена корреляция между степенью дисплазии цервикального эпителия и уровнем экспрессии микроРНК (рис. 2). В соответствии с полученными данными степень тяжести дисплазии цервикального эпителия коррелирует с активацией экспрессии miR-126, miR-106, miR-20a и miR-196 и угнетением экспрессии miR-145 и miR-375. На рис. 2 представлены данные о статистической значимости этой корреляции.

**Создание и валидация алгоритма дифференциальной диагностики HSIL и РШМ.** С целью практического применения полученных результатов мы попытались экстраполировать данные, полученные при сравнении разных клинических групп (NILM, L-SIL, H-SIL и CC) на ситуацию анализа данных 1 пациентки. Мы предположили, что соотношение концентраций определенной пары молекул (экспрессия которых прямо и обратно коррелирует с тяжестью дисплазии) может отличаться в различных клинических группах и иметь диагностическое значение. Кроме того, сравнительный анализ определенной пары молекул может быть проведен непосредственно (без нормализации). С учетом отсутствия идеальных методов нормализации этот аспект имеет важное практическое значение.

С помощью стандартного подхода были рассчитаны соотношения уровней экспрессии возможных пар молекул, для которых была выявлена разнонаправленная (реципрокная) корреляция со степенью дисплазии. Например, соотношение уровня экспрессии 2 молекул (miR-126 и miR-375) рассчитано по формуле  $\Delta Ct = 2^{(Ct_{miR-126} - Ct_{miR-375})}$ . Для 8 возможных пар микроРНК с разнонаправленными и статистически значимыми изменениями экспрессии определены показатели диагностической значимости при оценке пограничных состояний: HSIL и CC.

Таблица 2. Показатели диагностической значимости для молекул микроРНК  
Table 2. Characteristics of diagnostic significance for miRNA molecules

МикроРНК	AUC	Cut off	Чувствительность	Специфичность	PPV	NPV
126/375	0,8	21,5	0,70	0,72	0,76	0,65
20a/375	0,75	0,11	0,89	0,53	0,71	0,79
126/145	0,72	0,54	0,71	0,61	0,70	0,62

**Примечание.** AUC (Area Under Curve) – показатель количественной интерпретации кривой ошибок, Cut off – пороговое значение анализируемого диагностического параметра, принятое для разделения состояний HSIL и CC, PPV и NPV (positive and negative predictive value) – положительное и отрицательное предсказательные значения соответственно.

**Note.** AUC stand for area under curve, Cut off – for threshold value of the analyzed diagnostic parameter for HSIL and CC, PPV and NPV – for positive and negative predictive value, respectively.

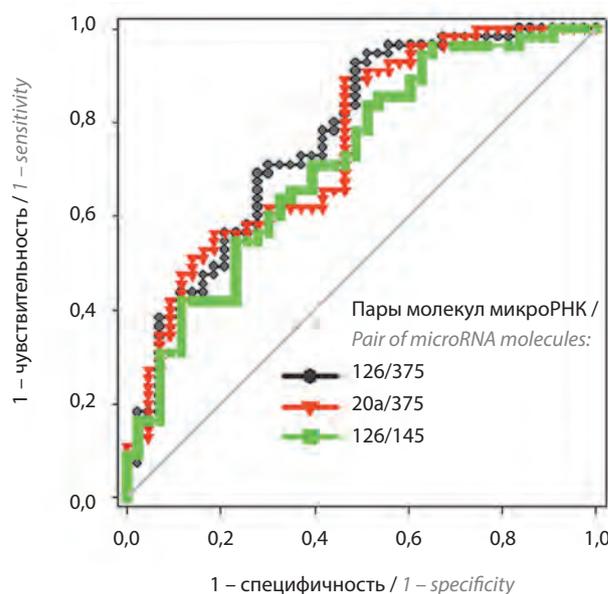


Рис. 3. Диагностическая значимость анализа соотношения концентраций 3 пар микроРНК

Fig. 3. Diagnostic significance of analysis of the ratio between 3 miRNA pairs levels

С целью повышения статистической достоверности анализа число пациенток в группах было увеличено до 52 и 40, соответственно. Наилучшие показатели диагностической значимости были получены для 3 пар молекул микроРНК: miR-126/miR-375, miR-126/miR-145 и miR-20a/miR-375 (табл. 2 и рис. 3). Оценка диагностической значимости исследуемых параметров проведена путем построения кривой ошибок (Receiver Operating Characteristic curve) по данным 92 измерений (HSIL,  $n = 52$ ; CC,  $n = 40$ ) с помощью программы Sigma Plot 12.

**Примеры практического применения метода.** Возможность использования предложенного метода на практике может быть продемонстрирована на примере 3 клинических случаев, в каждом из ко-

Таблица 3. Диагностические показатели для 3 пар молекул  
Table 3. Calculation results for relative characteristics of 3 molecular pairs

Пациентка	Пары микроРНК (значение Cut off)			Гистологическое заключение
	126/375 (<21,5)	20/375 (<0,11)	126/145 (<0,54)	
К.И.О. K.I.O.	1,097	0,003	0,436	Плоскоклеточный неороговевающий рак шейки матки, глубина инвазии 4 мм Non-keratinizing squamous cell carcinoma of the cervix, invasion depth is 4 mm
Д.Л.А. D.L.A.	1,443	0,011	0,041	Низкодифференцированный плоскоклеточный неороговевающий рак шейки матки с горизонтальным распространением на 12 мм и глубиной инвазии в строму шейки матки до 6 мм Poorly differentiated non-keratinizing squamous cell carcinoma of the cervix with 12 mm horizontal expansion and invasion depth in the direction of cervical stroma of up to 6 mm
Л.О.П. L.O.P.	3,451	0,036	0,012	Низкодифференцированный плоскоклеточный неороговевающий рак шейки матки протяженностью 17 мм, глубиной инвазии в строму шейки матки на 5,5 мм Poorly differentiated non-keratinizing squamous cell carcinoma of the cervix of 17 mm in size, invasion depth in the direction of cervical stroma is 5.5 mm

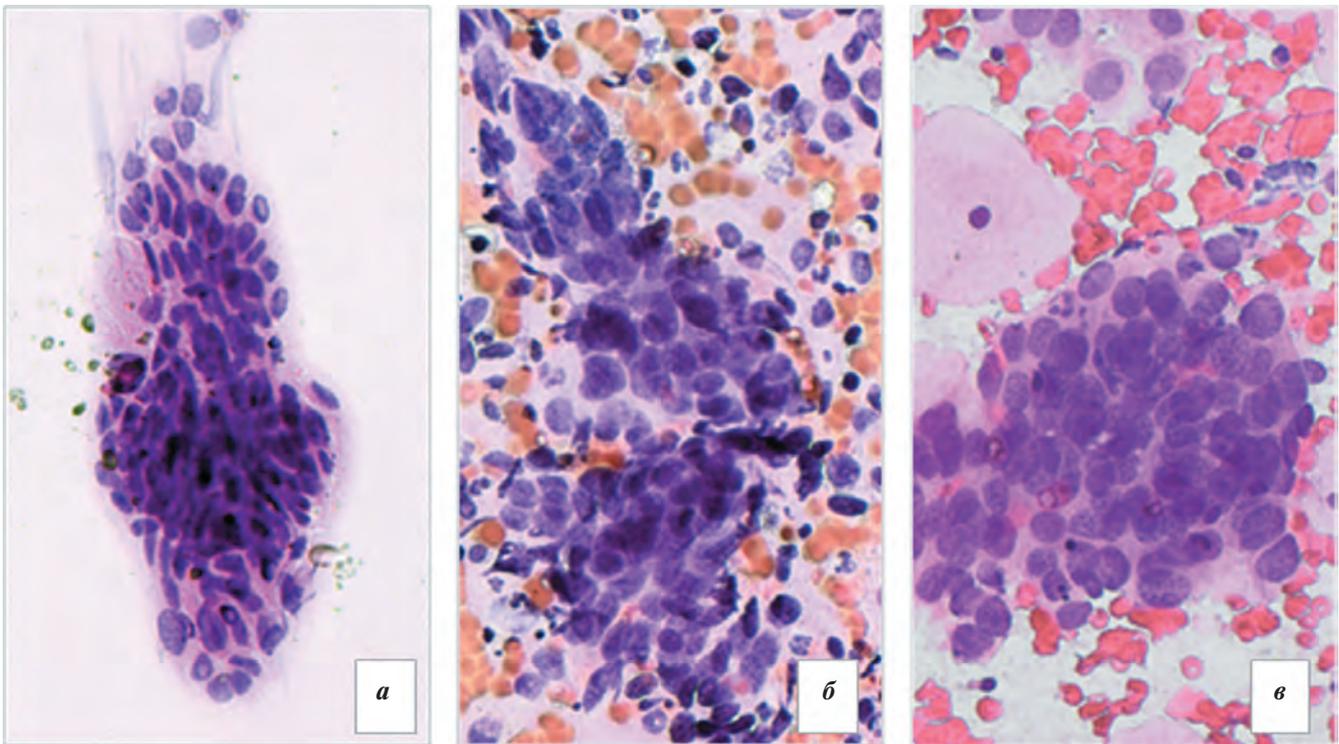


Рис. 4. Картина цитологического мазка из цервикального канала 3 пациенток (описание в тексте и табл. 3): а – К.И.О., б – Д.Л.А., в – Л.О.П.; окраска гематоксилин-эозином, ×40

Fig. 4. Pap smears from the cervical canal of 3 patients (description in the text and Table 3): a – K.I.O., б – D.L.A., в – L.O.P.; hematoxylin and eosin staining, ×40

торых цитологический диагноз «HSIL» (рис. 4) не соответствовал результатам последующего гистологического исследования, выявившего инвазивный плоскоклеточный рак. Ретроспективный анализ экспрессии 3 диагностически значимых микроРНК в материале цитологического мазка был

проведен по описанной методике. Результаты расчета относительных показателей для 3 пар молекул (табл. 3) были существенно ниже значения Cut off, что свидетельствовало о наличии инвазивной плоскоклеточной карциномы при «сомнительной» цитологической картине.

**Обсуждение**

Основной задачей представленной работы являлась оценка диагностической значимости анализа микроРНК в материале цитологических мазков из цервикального канала и целесообразности внедрения этого метода в качестве дополнительного исследования в случаях сложности дифференциальной диагностики между состоянием ASC-H, H-SIL и инвазивной карциномой шейки матки на дооперационном этапе. Исследование выполнено в 3 этапа: 1) метаанализ литературных данных и выбор «потенциально маркерных» микроРНК; 2) анализ экспрессии выбранных молекул микроРНК в образцах 4 клинических групп (NILM, LSIL, HSIL и CC) и определение молекул, изменение экспрессии которых коррелирует с состоянием цервикального эпителия; 3) разработка и валидация алгоритма анализа пар микроРНК с реципрокным характером экспрессионных изменений.

Результаты исследования продемонстрировали, что оценка соотношения экспрессионной активности пар молекул микроРНК (miR-126/miR-375, miR-20a/miR-375, miR-126/miR-145) позволяет дифференцировать пограничные, по данным цитологического исследования, состояния HSIL и инвазивной плоскоклеточной карциномы с высокой достоверностью различий: показатели количественной интерпретации кривой ошибок (Area Under Curve, AUC): 0,8; 0,75; 0,72, соответственно.

В рамках данной работы не ставилась задача исследования биологической связи между феноменом реципрокного изменения активности экспрессии отдельных молекул микроРНК. В литературе мы не нашли данных о возможной взаимосвязи между механизмами регуляции отдельных молекул в реципрокных парах. Возможно, такой взаимосвязи нет и полученные данные имеют исключительно статистическое значение. Этот факт не снижает значимости полученных результатов в плане возможности разработки нового подхода к скринингу или дифференциальной диагностике РШМ. Предложенный метод основан на анализе концентрации нескольких молекул методом ОТ-ПЦР. Разработанная методология предполагает возможность воспроизведения

данного исследования в любой лаборатории, при этом полученные результаты не зависят от квалификации исполнителя и, следовательно, являются объективными. С другой стороны, внедрение метода в клиническую практику требует его методологической оптимизации и валидации на более широкой выборке пациентов. При отсутствии научных данных, объясняющих реципрокный характер экспрессионных изменений «маркерных» молекул и сложности молекулярных механизмов цервикального канцерогенеза [12], возможно, недостаточно использования только 3 пар микроРНК и требуется расширение диагностической панели.

Важное значение может иметь разработка аналогичных подходов к решению других клинически значимых вопросов, например, прогноза развития дисплазии на стадии LSIL.

**Выводы**

1. Цервикальный канцерогенез является многоступенчатым процессом, в ходе которого наблюдаются закономерные изменения активности экспрессии ряда регуляторных микроРНК. В частности, степень тяжести дисплазии цервикального эпителия сопровождается активацией экспрессии miR-126, miR-106, miR-20a и miR-196, и угнетением экспрессии miR-145 и miR-375.

2. Цитологические препараты (мазки), полученные в ходе традиционного исследования и прошедшие все этапы приготовления (фиксация, окраска), пригодны для выделения и анализа микроРНК.

3. Оценка соотношения 2 молекул микроРНК с реципрокным характером изменения экспрессионной активности в ходе цервикального канцерогенеза имеет большее диагностическое значение по сравнению с индивидуальным анализом одной или нескольких молекул.

4. Оценка соотношения экспрессионной активности пар молекул miR (126/375, 20a/375 и 126/145) позволяет с высокой достоверностью дифференцировать пограничные по данным цитологического исследования состояния HSIL и инвазивной плоскоклеточной карциномы (AUC: 0,8; 0,75; 0,72, соответственно).

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests**

Authors declare no conflict of interest

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M. et al. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013.
2. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359–86. DOI: 10.1002/ijc.29210. PMID: 25220842.
3. Churilla T., Egleston B., Dong Y., Shaikh T., Murphy C., Mantia-Smaldone G., Chu C., Rubin S., Anderson P. Disparities in the management and outcome of cervical cancer in the United States according to health insurance status. *Gynecol Oncol* 2016;141(3):516–23. DOI: 10.1016/j.ygy.2016.03.025. PMID: 27012428.
4. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2014. [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2012 (morbidity and mortality). Moscow: MNIOI imeni P.A. Hertzena, 2014. (In Russ.)].
5. Solomon D., Davey D., Kurman R. et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama* 2002;287(16):2114–9. PMID: 11966386.
6. Nayar R., Wilbur D.C. The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer cytopathol* 2015;123(5):271–81. DOI: 10.1002/cncy.21521. PMID: 25931431.
7. Waxman A.G., Chelmsow D., Darragh T.M. et al. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstetrics and gynecology* 2012;120(6):1465–71. DOI: 10.1097/AOG.0b013e31827001d5. PMID: 23168774.
8. Савельева Г.М., Сухих Г.Т., Манухина И.Б. Гинекология: национальное руководство. Краткое издание. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015. [Savelieva G.M., Sukhikh G.T., Manukhina I.B. Gynecology: National guidelines. Abridged edition. M.: GEOTAR-Media, 2015. (In Russ.)].
9. Li J., Liu Q., Clark L.H. et al. Deregulated miRNAs in human cervical cancer: functional importance and potential clinical use. *Future oncol* 2017;13(8):743–53. DOI: 10.2217/fon-2016-0328. PMID: 27806630.
10. Kanekura K., Nishi H., Isaka K., Kuroda M. MicroRNA and gynecologic cancers. *J Obstet Gynaecol Res* 2016;42(6):612–7. DOI: 10.1111/jog.12995. PMID: 27098274.
11. He Y., Lin J., Ding Y. et al. A systematic study on dysregulated microRNAs in cervical cancer development. *Int J Cancer* 2016;138(6):1312–27. DOI: 10.1002/ijc.29618. PMID: 26032913.
12. Архангельская П.А., Бахидзе Е.В., Берлев И.В. и др. МикроРНК, ВПЧ-инфекция и цервикальный канцерогенез: молекулярные аспекты и перспективы клинического использования. *Сибирский онкологический журнал* 2016;15(4):88–97. [Arkhangelskaya P.A., Bakhidze E.V., Berlev I.V. et al. MicroRNA, HPV and cervical carcinogenesis: molecular aspects and prospects of clinical application. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2016;15(4):88–97. (In Russ.)].
13. Tian Q., Li Y., Wang F. et al. MicroRNA detection in cervical exfoliated cells as a triage for human papillomavirus-positive women. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(9). DOI: 10.1093/jnci/dju241. PMID: 25190727.
14. Lithwick-Yanai G., Dromi N., Shtabsky A. et al. Multicentre validation of a microRNA-based assay for diagnosing indeterminate thyroid nodules utilising fine needle aspirate smears. *J Clin Pathol* 2017;70(6):500–7. DOI: 10.1136/jclinpath-2016-204089. PMID: 27798083.
15. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Веряскина Ю.А. и др. Повышение точности и информативности тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии опухолей молочной железы путем анализа микроРНК в материале цитологического мазка. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(3):44–52. [Kolesnikov N.N., Titov S.E., Veryaskina Y.A. et al. Improvement of accuracy and diagnostic significance of breast tumor fine-needle aspiration biopsy by miRNA analysis of material isolated from cytological smears. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in molecular oncology* 2016;3(1):44–52. (In Russ.)].
16. Lin W., Feng M., Chen G. et al. Characterization of the microRNA profile in early-stage cervical squamous cell carcinoma by next-generation sequencing. *Oncol Rep* 2017;37(3):1477–86. DOI: 10.3892/or.2017.5372. PMID: 28098890.
17. Liang S., Tian T., Liu X. et al. Microarray analysis revealed markedly differential miRNA expression profiles in cervical intraepithelial neoplasias and invasive squamous cell carcinoma. *Future oncol* 2014;10(13):2023–32.
18. Chen J., Zheng Y., Qin L. et al. Identification of miRNAs and their targets through high-throughput sequencing and degradome analysis in male and female *Asparagus officinalis*. *BMC plant biology* 2016;16:80. DOI: 10.2217/fon.14.38. PMID: 24559408.
19. He X.P., Shao Y., Li X.L. et al. Downregulation of miR-101 in gastric cancer correlates with cyclooxygenase-2 overexpression and tumor growth. *FEBS J* 2012;279(22):4201–12. DOI: 10.1111/febs.12013. PMID: 23013439.
20. Wilting S.M., Snijders P.J., Verlaet W. et al. Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. *Oncogene* 2013;32(1):106–16. DOI: 10.1038/onc.2012.20. PMID: 22330141.
21. Lajer C.B., Garnæs E., Friis-Hansen L. et al. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *Br J Cancer* 2012;106(9):1526–34. DOI: 10.1038/bjc.2012.109. PMID: 22472886.
22. Witten D., Tibshirani R., Gu S.G. et al. Ultra-high throughput sequencing-based small RNA discovery and discrete statistical biomarker analysis in a collection of cervical tumours and matched controls. *BMC Biol* 2010;8:58. DOI: 10.1186/1741-7007-8-58. PMID: 20459774.
23. Pereira P.M., Marques J.P., Soares A.R. et al. MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PloS One* 2010;5(7):e11780. DOI: 10.1371/journal.pone.0011780. PMID: 20668671.
24. Piao J., You K., Guo Y. et al. Substrate stiffness affects epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer cells through miR-106b and its target protein DAB2. *Int J Oncol* 2017. DOI: 10.3892/ijo.2017.3978. PMID: 28498390.
25. Yang Y., Xie Y.J., Xu Q. et al. Down-regulation of miR-1246 in cervical cancer tissues and its clinical significance. *Gynecol Oncol* 2015;138(3):683–8. DOI: 10.1016/j.ygy.2015.06.015. PMID: 26074491.
26. Chen J., Yao D., Zhao S. et al. MiR-1246 promotes SiHa cervical cancer cell proliferation, invasion, and migration through suppression of its target gene thrombospondin 2. *Arch Gynecol Obstet* 2014;290(4):725–32. DOI: 10.1007/s00404-014-3260-2. PMID: 24806621.
27. Ribeiro J., Marinho-Dias J., Monteiro P. et al. miR-34a and miR-125b expression in HPV infection and cervical cancer development. *Biomed Res Int*

- 2015;2015:304584.  
DOI: 10.1155/2015/304584.  
PMID: 26180794.
28. Cui F., Li X., Zhu X. et al. MiR-125b inhibits tumor growth and promotes apoptosis of cervical cancer cells by targeting phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit delta. *Cell Physiol Biochem* 2012;30(5):1310–8. DOI: 10.1159/000343320. PMID: 23160634.
  29. Nuovo G.J., Wu X., Volinia S. et al. Strong inverse correlation between microRNA-125b and human papillomavirus DNA in productive infection. *Diagn Mol Pathol* 2010;19(3):135–43. DOI: 10.1097/PDM.0b013e3181c4daaa. PMID: 20736742.
  30. Wang C., Zhou B., Liu M., Gao R. MiR-126-5p restoration promotes cell apoptosis in cervical cancer by targeting Bcl2l2. *Oncol Res* 2017;25(4):463–70. DOI: 10.3727/096504016X14685034103879. PMID: 28438233.
  31. Yang Y., Song K.L., Chang H., Chen L. Decreased expression of microRNA-126 is associated with poor prognosis in patients with cervical cancer. *Diagnostic pathology* 2014;9:220. DOI: 10.1186/s13000-014-0220-x. PMID: 25551621.
  32. Yu Q., Liu S.L., Wang H. et al. MiR-126 Suppresses the proliferation of cervical cancer cells and alters cell sensitivity to the chemotherapeutic drug bleomycin. *Asian Pacific journal of cancer prevention: Asian Pac J Cancer Prev* 2014;14(11):6569–72. PMID: 24377569.
  33. Azizmohammadi S., Safari A., Azizmohammadi S. et al. Molecular identification of miR-145 and miR-9 expression level as prognostic biomarkers for early-stage cervical cancer detection. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians* 2017;110(1):11–5. DOI: 10.1093/qjmed/hew101. PMID: 27345415.
  34. Ye C., Sun N.X., Ma Y. et al. MicroRNA-145 contributes to enhancing radiosensitivity of cervical cancer cells. *FEBS letters* 2015;589(6):702–9. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.01.037. PMID: 25666710.
  35. Greco D., Kivi N., Qian K. et al. Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS One* 2011;6(7):e21646. DOI: 10.1371/journal.pone.0021646. PMID: 21747943.
  36. Wang X., Tang S., Le S.Y. et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One* 2008;3(7):e2557. DOI: 10.1371/journal.pone.0002557. PMID: 18596939.
  37. Shen C., Yang H., Liu H. et al. Inhibitory effect and mechanisms of microRNA-146b-5p on the proliferation and metastatic potential of Caski human cervical cancer cells. *Mol Med Rep* 2015;11(5):3955–61. DOI: 10.3892/mmr.2015.3151. PMID: 25572123.
  38. Paiva I., Gil da Costa R.M., Ribeiro J. et al. A role for microRNA-155 expression in microenvironment associated to HPV-induced carcinogenesis in K14-HPV16 transgenic mice. *PLoS One* 2015;10(1):e0116868. DOI: 10.1371/journal.pone.0116868. PMID: 25625305.
  39. Lao G., Liu P., Wu Q. et al. Mir-155 promotes cervical cancer cell proliferation through suppression of its target gene LKB1. *Tumour Biol* 2014;35(12):11933–8. DOI: 10.1007/s13277-014-2479-7. PMID: 25155037.
  40. Park H., Lee M.J., Jeong J.Y. et al. Dysregulated microRNA expression in adenocarcinoma of the uterine cervix: clinical impact of miR-363-3p. *Gynecol Oncol* 2014;135(3):565–72. DOI: 10.1016/j.ygyno.2014.09.010. PMID: 25230213.
  41. How C., Hui A.B., Alajez N.M. et al. MicroRNA-196b regulates the homeobox B7-vascular endothelial growth factor axis in cervical cancer. *PLoS One* 2013;8(7):e67846. DOI: 10.1371/journal.pone.0067846. PMID: 23861821.
  42. Zeng F., Xue M., Xiao T. et al. MiR-200b promotes the cell proliferation and metastasis of cervical cancer by inhibiting FOXG1. *Biomed Pharmacother* 2016;79:294–301. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.02.033. PMID: 27044840.
  43. Cheng Y.X., Zhang Q.F., Hong L. et al. MicroRNA-200b suppresses cell invasion and metastasis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma. *Mol Med Rep* 2016;13(4):3155–60. DOI: 10.3892/mmr.2016.4911. PMID: 26935156.
  44. Mao L., Zhang Y., Mo W. et al. BANF1 is downregulated by IRF1-regulated microRNA-203 in cervical cancer. *PLoS One* 2015;10(2):e0117035. DOI: 10.1371/journal.pone.0117035. PMID: 25658920.
  45. Zhao S., Yao D.S., Chen J.Y. et al. Aberrant expression of miR-20a and miR-203 in cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(4):2289–93. PMID: 23725129.
  46. Zhao S., Yao D., Chen J. et al. MiR-20a promotes cervical cancer proliferation and metastasis in vitro and in vivo. *PLoS one* 2015;10(3):e0120905. PMID: 23725129.
  47. Song L., Liu S., Zhang L. et al. MiR-21 modulates radiosensitivity of cervical cancer through inhibiting autophagy via the PTEN/Akt/HIF-1alpha feedback loop and the Akt-mTOR signaling pathway. *Tumour Biol* 2016;37(9):12161–8. DOI: 10.1007/s13277-016-5073-3. PMID: 27220494.
  48. Peralta-Zaragoza O., Deas J., Meneses-Acosta A. et al. Relevance of miR-21 in regulation of tumor suppressor gene PTEN in human cervical cancer cells. *BMC Cancer* 2016;16:215. DOI: 10.1186/s12885-016-2231-3. PMID: 26975392.
  49. Zheng W., Liu Z., Zhang W. et al. MiR-31 functions as an oncogene in cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2015;292(5):1083–9. DOI: 10.1007/s00404-015-3713-2. PMID: 25894339.
  50. Geng D., Song X., Ning F. et al. MiR-34a inhibits viability and invasion of human papillomavirus-positive cervical cancer cells by targeting E2F3 and regulating survivin. *Int J Gynecol Cancer* 2015;25(4):707–13. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000399. PMID: 25675046.
  51. Shen Y., Zhou J., Li Y. et al. miR-375 mediated acquired chemo-resistance in cervical cancer by facilitating EMT. *PLoS One* 2014;9(10):e109299. DOI: 10.1371/journal.pone.0109299. PMID: 25330011.
  52. 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. PMID: 22987659.
  53. Wang L., Chang L., Li Z. et al. miR-99a and -99b inhibit cervical cancer cell proliferation and invasion by targeting mTOR signaling pathway. *Med Oncol* 2014;31(5):934. DOI: 10.1007/s12032-014-0934-3. PMID: 24668416.
  54. Mestdagh P., Van Vlierberghe P., De Weer A. et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 2009;10(6):R64. DOI: 10.1186/gb-2009-10-6-r64. PMID: 19531210.

Поступила в редакцию: 29.06.17 г. Поступила в печать 26.07.2017 г.