

## Прогностическое значение анализа микроРНК в клетках цервикального эпителия при дисплазии легкой степени

М.С. Князева<sup>1,2</sup>, Т.С. Присяжная<sup>3</sup>, Л.М. Забегина<sup>1,2</sup>, О.А. Смирнова<sup>1</sup>, А.А. Михетько<sup>1</sup>,  
И.В. Берлев<sup>1,3</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, инновационный центр «Сколково», ул. Луговая, 4, стр. 9, пом. 16;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России;  
195067 Санкт-Петербург, Пискаревский проспект, 47

Контакты: Анастасия Валерьевна Малек anastasia@malek.com

**Введение.** В настоящее время не существует надежных маркеров прогноза течения дисплазии цервикального эпителия легкой степени (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL). В научной литературе представлены разноречивые рекомендации относительно тактики ведения пациенток молодого возраста с цитологическим диагнозом LSIL. Прогрессирование дисплазии и развитие рака шейки матки ассоциированы с характерными изменениями профиля экспрессии микроРНК в клетках цервикального эпителия.

**Цель исследования** — оценить прогностическое значение микроРНК клеток цервикального эпителия при LSIL.

**Материалы и методы.** Материалами исследования служили образцы (цитологические мазки), полученные от пациенток с диагнозом LSIL ( $n = 36$ ), но с разным течением заболевания в течение последующих 6–12 мес. Анализ экспрессии микроРНК был проведен методом «двухфланговой» обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции.

**Результаты.** Уровни экспрессии miR-126, miR-21, miR-1246, miR-182 статистически значимо различались в сравниваемых группах, но прогностическая значимость анализа отдельных молекул была низкой ( $AUC < 0,65$ ). Расчет соотношений концентраций реципрокных пар микроРНК позволил повысить прогностическую значимость анализа. При ROC-анализе таких соотношений (miR-126/miR-182, miR-21/miR-182, miR-1246/miR-182) получены следующие значения:  $AUC$  0,82–0,89; чувствительность 0,71–0,92; специфичность 0,86.

**Выводы.** Анализ панели маркерных молекул микроРНК в материале цервикального эпителия и расчет соотношений концентраций реципрокных пар является перспективным методом прогноза течения LSIL.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, дисплазия легкой степени, прогноз, микроРНК, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

**Для цитирования:** Князева М.С., Присяжная Т.С., Забегина Л.М. и др. Прогностическое значение анализа микроРНК в клетках цервикального эпителия при дисплазии легкой степени. Опухоли женской репродуктивной системы 2020;16(4):66–75.

DOI: 10.17650/1994-4098-2020-16-4-66-75



### Prognostic value of microRNA assessment in cervical epithelial cells of patients with mild dysplasia

M.S. Knyazeva<sup>1,2</sup>, T.S. Prisyazhnaya<sup>3</sup>, L.M. Zabegina<sup>1,2</sup>, O.A. Smirnova<sup>1</sup>, A.A. Mikhetyko<sup>1</sup>, I.V. Berlev<sup>1,3</sup>, A.V. Malek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>N.N. Petrov National Research Institute of Oncology, Ministry of Health of Russia;  
68 Leningradskaya St., Pesochnyy, Saint Petersburg 197758, Russia;

<sup>2</sup>Oncosystem LLC; 4/9 office 16, Lugovaya St., Innovation center "Skolkovo", Moscow 143026, Russia;

<sup>3</sup>I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Health of Russia; 47 Piskarevskiy Prospekt, Saint Petersburg 195067, Russia

**Background.** Currently, there are no reliable markers for the prognosis of the low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) of the cervical epithelium. Scientific literature provides with inconsistent recommendations regarding the management of the young patients with a cytological diagnosis of LSIL. The progression of cervical dysplasia and the development of cervical cancer are associated with characteristic alterations of the microRNA expression profile.

**Objective:** to assess the prognostic value of microRNA in LSIL.

**Materials and methods.** Samples (cytological smears) obtained from patients diagnosed with LSIL ( $n = 36$ ), but with a different course of the disease over the next 6–12 months. Analysis of miRNA expression was carried out by the method of “two-tailed” reverse transcription and subsequent PCR.

**Results.** The expression level of miR-126, miR-21, miR-1246, miR-182 was statistically significantly different in the compared groups, but the predictive value of the analysis of individual molecules was low ( $AUC < 0.65$ ). Calculation of the concentration ratios of the “reciprocal” pairs of microRNAs made it possible to obtain a more effective prognostic marker. ROC analysis of such ratios (miR-126/miR-182, miR-21/miR-182, miR-1246/miR-182) yielded AUC values: 0.82–0.89, sensitivity: 0.71–0.92; specificity: 0.86.

**Conclusions.** Analysis of a panel of microRNA marker molecules in the material of the cervical epithelium and calculation of the concentration ratios of “reciprocal” pairs is a promising method for prognosis of LSIL course.

**Key words:** cervical cancer, low-grade squamous intraepithelial lesion, prognosis, microRNA, reverse transcription polymerase chain reaction

**For citation:** Knyazeva M.S., Prisyazhnaya T.S., Zabegina L.M. et al. Prognostic value of microRNA assessment in cervical epithelial cells of patients with mild dysplasia. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy* = *Tumors of female reproductive system* 2020;16(4):66–75. (In Russ.).

## Введение

Рак шейки матки занимает одну из лидирующих позиций в структуре онкологической заболеваемости среди женщин [1]. Особенностью этого заболевания является хорошо изученная стадийность его развития, которая определяет возможность диагностики и лечения так называемых предраковых изменений цервикального эпителия, или дисплазий. Термином «дисплазия» обозначают изменения пролиферативной активности клеток, развитие ядерной атипии, утрату нормальной слоистой структуры цервикального эпителия без поражения базальной мембраны [2]. В 2001 г. для классификации изменений цервикального эпителия была предложена двухстадийная система (дисплазия цервикального эпителия легкой степени (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) и дисплазия цервикального эпителия тяжелой степени (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)) [3], которая в настоящее время широко используется для описания цитологических мазков [4] и постепенно адаптируется для гистологической диагностики [5]. Традиционная трехстадийная система (цервикальная интраэпителиальная неоплазия I, II и III степени (cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade I, grade II, grade III: CIN1, CIN2, CIN3)) описания гистологических изменений имеет определенные преимущества, поэтому до настоящего времени применяется в практической гинекологии [6].

Распространенность LSIL варьирует в диапазоне от 1,6 до 7,7 % женской популяции репродуктивного возраста [7], что указывает на социальную значимость разработки и применения четких алгоритмов ведения таких пациенток. Так как в большинстве случаев LSIL наблюдается спонтанная ремиссия, рекомендации Всемирной организации здравоохранения и национальные клинические рекомендации не предполагают активных лечебных мероприятий [8–10]. В целом врачебное внимание фокусируется на задаче выделения из общей популяции пациенток с высоким риском прогрессирования заболевания и развития HSIL. К факторам, которые должны учитываться лечащим врачом при оценке необходимости дополнительных диагностических процедур у пациенток с LSIL, относят возраст, статус/длительность персистенции вируса папилломы человека (ВПЧ), гинекологический анамнез. Дополнительные диагностические процедуры могут включать кольпоскопию, биопсию отдельных участков или выскабливание цервикального канала с последующим анализом полученного материала. При этом характер факторов

риска, определяющих врачебную тактику, оставляет пространство для объективных ошибок. Исследования, проведенные с целью выработки оптимальных клинических алгоритмов, дают разные результаты, что подтверждает проблематичность ситуации.

Например, оценка связи риска прогрессирования заболевания и использованных лечебно-диагностических подходов была проведена у 53 тыс. женщин с диагнозом LSIL [11]. Результаты работы показали оправданность активной лечебной тактики, включая криотерапию и конизацию, в группе молодых пациенток. Похожие выводы были сделаны авторами аналогичных по дизайну исследований [12, 13]. Другие, не менее авторитетные коллективы публикуют результаты, указывающие на отсутствие объективной необходимости углубленного скрининга среди молодых женщин и активного лечения LSIL [14, 15]. В целом обзор литературы выявляет отсутствие четких критериев прогноза течения LSIL и выбора тактики ведения таких пациенток, что определяет необходимость поиска новых маркеров.

МикроРНК — класс молекул, участвующих в эпигенетической регуляции биологии клеток. Процесс неопластической трансформации цервикального эпителия сопровождается изменением профиля экспрессии и активности этих молекул [16], что указывает на их возможный диагностический и/или прогностический потенциал.

**Целью** данного исследования была оценка возможности прогноза течения LSIL путем анализа микроРНК из клеток цервикального мазка.

## Материалы и методы

**Этические и правовые аспекты.** Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы (№ АА-АА-А18-118012390157-2), план которой был одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова». Все пациентки, материал которых был использован в работе, подписали информированное согласие на участие в исследовании. При формировании групп сравнения и анализе результатов клинические данные были деперсонализированы.

**Клинический материал.** В исследовании использовали стекла с цитологическими мазками от 36 пациенток в возрасте 18–45 лет, проходивших лечение по поводу LSIL в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова», женской

консультации № 8 СПб ГБУЗ «Детская городская поликлиника № 68» и женской консультации № 19 СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 44» в период с ноября 2017 г. по февраль 2019 г. На основании данных повторного цитологического исследования, проведенного через 6–12 мес, пациенток распределяли на 2 группы. В 1-ю группу (LSIL-stable) вошли 24 женщины с сохраняющимися LSIL, 2-ю группу (LSIL-progress) составили 12 пациенток, у которых при повторном цитологическом исследовании наблюдалось развитие HSIL.

**Цитологическое исследование.** Цитологические препараты соскобов экто- и эндоцервикса окрашивали гематоксилином — эозином, затем проводили микроскопию мазков (микроскоп Olympus BX-46 с системой визуализации и анализа микроизображений). Отбирали препараты с цитологическими признаками LSIL. По каждому препарату было получено 2 независимых цитологических заключения, образцы с противоречивыми диагнозами были исключены из исследования.

**Выделение ДНК/РНК со стекол с цитологическими мазками.** Материал мазка лизировали на стекле и переносили в пробирку в соответствии с ранее описанным протоколом [17], центрифугировали при 10000g 10 мин для седиментации клеточного детрита, чистый лизат (550 мкл) отбирали и добавляли к нему 550 мкл изопропанола и 20 мкл магнитных частиц (ООО «Силекс», Россия), перемешивали на вортексе и инкубировали при комнатной температуре 10–15 мин. Нуклеиновые кислоты, сорбированные на магнитных частицах, промывали, высушивали и элюировали согласно протоколу [17]. Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали на спектрофотометре NanoPhotometr N50 (Implen, Германия).

**Анализ ДНК/микроРНК.** Анализ микроРНК проводили методом обратной транскрипции (ОТ) и последующей полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для оценки профиля экспрессии 85 молекул, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний, использовали реагенты компании Qiagen/Exiqon (США): miRCURY LNA Universal RT microRNA Polyadenylation and cDNA synthesis Kit, Cancer Focus microRNA PCR Panels, ExiLENT SYBR Green master mix. Для анализа отдельных молекул микроРНК использовали реагенты серии ALL-MIR (Algimed Techno, Беларусь). Исследования проводили в соответствии с протоколами производителей на аппарате CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Оценку статуса инфицирования ВПЧ выполняли с помощью набора «ДНК ВПЧ ВКР скрин» (14 серотипов без дифференцирования) производства компании «Вектор Бест» (Россия).

**Математический и статистический анализ результатов.** Поиск пар таких молекул микроРНК, экспрессия которых имела разнонаправленный (реципрокный) характер изменения в сравниваемых группах, вычисление соотношения их концентраций в отдельных

образцах и оценку прогностической значимости этого параметра проводили с помощью специально созданного программного алгоритма. Реципрокные пары формировались как все возможные комбинации 16 тестируемых микроРНК. Общее количество анализируемых пар рассчитывалось по формуле  $P_r = \frac{n!}{(n-r)!}$  (ряд упорядоченных наборов микроРНК размера R без замены из общего набора исследованных микроРНК размера N = 16). Для каждой пары были определены значения соотношений эффективности амплификации ( $\text{Ratio} = 2^{Ct(miR-A) - Ct(miR-B)}$ ), которые использовались в качестве дискриминантного маркера. Прогностическую значимость каждого такого маркера оценивали с помощью ROC-анализа (построения ROC-кривой и вычисления значения AUC). Статистическую обработку результатов сравнения уровней экспрессии отдельных микроРНК в сравниваемых группах проводили с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни (Mann—Whitney U-test).

## Результаты

**Поиск потенциально маркерных молекул.** Для выбора потенциально маркерных молекул было использовано по 10 образцов РНК, выделенных из материала пациенток 2 групп: LSIL-stable и LSIL-progress. Образцы РНК в эквивалентных количествах были объединены в 2 пула, каждый из которых проанализирован путем последовательного проведения реакций полиаденилирования, неспецифической ОТ и ПЦР с целью «профайлинга» 85 молекул микроРНК. Значения пороговых циклов ( $C_t$ ) >38 были исключены из анализа, техническая разница между результатами анализа 2 пулов была нивелирована с помощью межпланшетных калибраторов (interplate-calibrators), нормализация полученных данных выполнена относительно среднего арифметического значения  $C_t$ . Молекулы микроРНК, оценка экспрессии которых была результативна только в ходе анализа 1 пула, были исключены из анализа, оставшиеся молекулы были ранжированы в порядке убывания значения разницы уровня экспрессии между 2 образцами. Для дальнейшей работы были выбраны 16 молекул, уровень экспрессии которых в пулах LSIL-stable и LSIL-progress имел более чем 3-кратную разницу. Анализ данных литературы подтвердил вероятность участия этих молекул в развитии предраковых состояний и рака шейки матки (табл. 1).

**Анализ экспрессии потенциально маркерных микроРНК.** Уровень экспрессии каждой из 16 молекул был оценен с помощью реакции микроРНК-специфичной ОТ и последующей ПЦР. Специфичность ОТ обеспечивалась ОТ-праймером, клешнеобразная форма которого позволяла «связывать» молекулу микроРНК с 2 флангов. При этом в результате реакции ОТ синтезировалась молекула комплементарной ДНК, оба фланга которой имели микроРНК-специфичные участки связывания ПЦР-праймерами (рис. 1).

Таблица 1. Молекулы микроРНК, включенные в исследование

Table 1. MicroRNA included in the study

| №<br>No. | МикроРНК<br>MicroRNA | РНК-последовательность<br>RNA sequence | Идентификатор<br>Identifier | Источник<br>литературы<br>Reference |
|----------|----------------------|--|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1        | miR-10b-5p           | UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG                | MIMAT0000254                | [18, 19]                            |
| 2        | miR-16-5p            | UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG                 | MIMAT0000069                | [20]                                |
| 3        | miR-21-5p            | UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA                 | MIMAT0000076                | [21]                                |
| 4        | miR-29b-3p           | UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU                | MIMAT0000100                | [22]                                |
| 5        | miR-34a-5p           | UGGCAGUGUCUAGCUGGUUGU                  | MIMAT0000255                | [23, 24]                            |
| 6        | miR-106b-5p          | UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU                  | MIMAT0000680                | [25]                                |
| 7        | miR-126-3p           | UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG                 | MIMAT0000445                | [26]                                |
| 8        | miR-143-3p           | UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC                  | MIMAT0000435                | [27]                                |
| 9        | miR-145-5p           | GUCCAGUUUCCCCAGGAAUCCCU                | MIMAT0000437                | [21]                                |
| 10       | miR-182-5p           | UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU               | MIMAT0000259                | [21, 28]                            |
| 11       | miR-196b-5p          | UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG                 | MIMAT0001080                | [29, 30]                            |
| 12       | miR-200a-3p          | UAACACUGUCUGGUAACGAUGU                 | MIMAT0000682                | [31]                                |
| 13       | miR-200c-3p          | UAAUACUGCCGGGUAAUGAUGGA                | MIMAT0000617                | [32]                                |
| 14       | miR-205-5p           | UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG                  | MIMAT0000266                | [33]                                |
| 15       | miR-375-3p           | UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA                 | MIMAT0000728                | [34]                                |
| 16       | miR-1246-5p          | AAUGGAUUUUUGGAGCAGG                    | MIMAT0005898                | [35]                                |

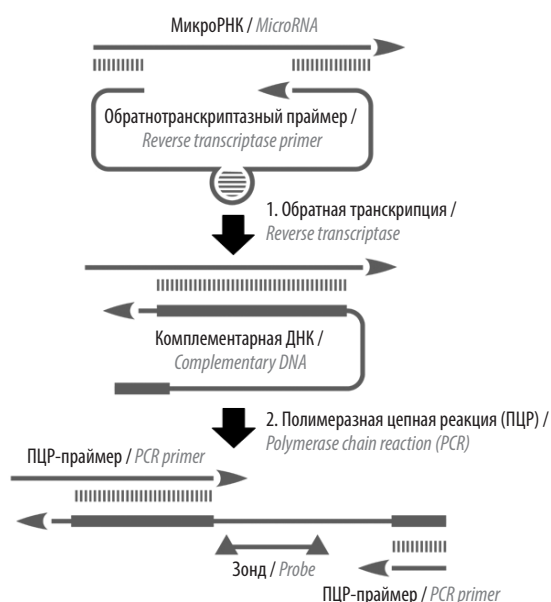
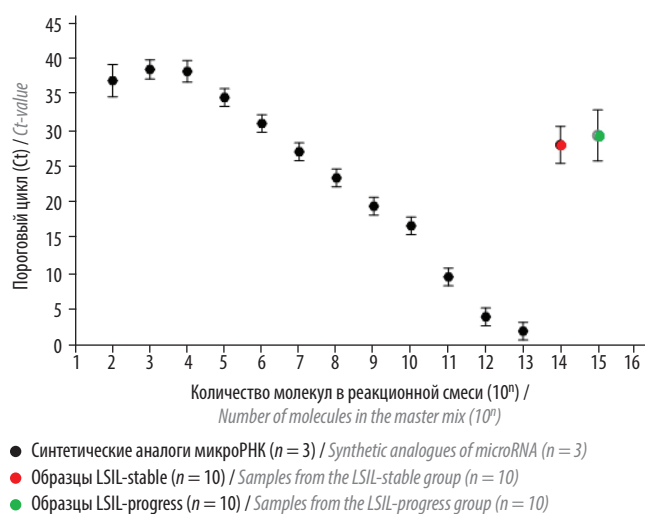


Рис. 1. Схема проведения анализа микроРНК методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

Fig. 1. Scheme of miRNA analysis using polymerase chain reaction with reverse transcription

В целом, такая система количественного анализа микроРНК обеспечивала высокую специфичность, что было показано ранее [36, 37]. С целью подтверждения достаточной чувствительности метода для каждой системы был проведен анализ серии разведения синтетического аналога микроРНК. Результаты, полученные при анализе образцов РНК, выделенной из биологических образцов, во всех случаях укладывались в диапазон аналитической чувствительности системы. Репрезентативный пример такого анализа представлен на рис. 2.

Для снижения уровня технических погрешностей все анализы проводили в 3 повторах, результаты усредняли. Затем результаты, полученные после анализа экспрессии 16 молекул в 36 образцах (LSIL-stable,  $n = 24$ ; LSIL-progress,  $n = 12$ ), были нормализованы относительно среднеарифметического значения порогового цикла (576 значений). Далее для каждой молекулы были вычислены средние значения в группах LSIL-stable и LSIL-progress и коэффициенты осцилляции значений в рамках сравниваемых групп. Оценка статистической значимости наблюдаемых отличий экспрессионного поведения отдельных молекул была проведена методом Манна–Уитни. Полученные результаты представлены в табл. 2.



**Рис. 2.** Оценка аналитической эффективности системы для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в диапазоне концентраций синтетического аналога микроРНК-200а 102–1013 молекул/реакции  
**Fig. 2.** Assessment of analytical efficiency of polymerase chain reaction with reverse transcription in the concentration range of synthetic analog of microRNA-200a 102–1013 molecules/reaction

Анализ данных позволяет описать разные варианты «экспрессионного поведения» молекул микроРНК. Так, в ряде случаев (miR-200c, miR-10b, miR-200a, miR-106b) наблюдался относительно стабильный уровень экспрессии во всех образцах: низкое значение коэффициента осцилляции и сходный уровень экспрессии в группах LSIL-stable и LSIL-progress. Активность этих молекул не коррелирует с прогнозом течения LSIL. Уровень экспрессии ряда молекул (miR-16, miR-205, miR-145, miR-34a, miR-196, miR-29b, miR-143) изменялся в относительно широком диапазоне значений, но сравнение групп LSIL-stable и LSIL-progress не выявило разницы, или она была статистически незначима. Нельзя исключить участие этих молекул в развитии LSIL, но вариабельный характер их экспрессионной активности не позволяет использовать их в качестве диагностических или прогностических маркеров. Для нескольких молекул были выявлены статистически значимые отличия уровней экспрессии в 2 сравниваемых группах. Так, экспрессия miR-126, miR-375, miR-21 и miR-1246 была выше, а экспрессия miR-182 — ниже в клетках цервикального эпителия пациенток, у которых за время наблюдения развилась HSIL (рис. 3).

**Таблица 2.** Результаты анализа экспрессии выбранных микроРНК в образцах групп LSIL-stable и LSIL-progress

**Table 2.** Expression of selected microRNA in samples of patients from the groups LSIL-stable and LSIL-progress

| №<br>No. | МикроРНК<br>MicroRNA | Относительный уровень экспрессии<br>Relative expression level |               |       | Коэффициент осцилляции<br>Oscillation coefficient |               |
|----------|----------------------|---|---------------|-------|---|---------------|
|          |                      | LSIL-stable   | LSIL-progress | p     | LSIL-stable                                       | LSIL-progress |
| 1        | miR-126              | 1,51  | 3,36          | 0,04  | 3,56  | 1,58          |
| 2        | miR-16               | 25,8  | 24,9          | 0,73  | 5,55  | 5,57          |
| 3        | miR-182              | 0,01  | 0,003         | 0,004 | 5,82  | 3,76          |
| 4        | miR-200c             | 2,97  | 2,44          | 0,63  | 3,94  | 3,49          |
| 5        | miR-205              | 2,39  | 2,98          | 0,98  | 2,93  | 7,75          |
| 6        | miR-375              | 0,04  | 0,20          | 0,40  | 9,15  | 2,30          |
| 7        | miR-10b              | 0,25  | 0,20          | 0,12  | 3,31  | 2,14          |
| 8        | miR-145              | 0,56  | 0,32          | 0,31  | 4,77  | 4,42          |
| 9        | miR-34a              | 0,14  | 0,18          | 0,78  | 4,44  | 3,99          |
| 10       | miR-21               | 0,27  | 0,73          | 0,05  | 5,48  | 4,73          |
| 11       | miR-196              | 26,5  | 23,2          | 0,57  | 20,75   | 13,10         |
| 12       | miR-200a             | 2,97  | 2,44          | 0,63  | 3,07  | 4,12          |
| 13       | miR-106b             | 21,5  | 24,4          | 0,78  | 2,93  | 3,23          |
| 14       | miR-29b              | 0,03  | 0,02          | 0,42  | 5,28  | 4,32          |
| 15       | miR-1246             | 635   | 1452          | 0,04  | 6,15  | 3,76          |
| 16       | miR-143              | 0,37  | 0,34          | 0,63  | 7,30  | 3,29          |

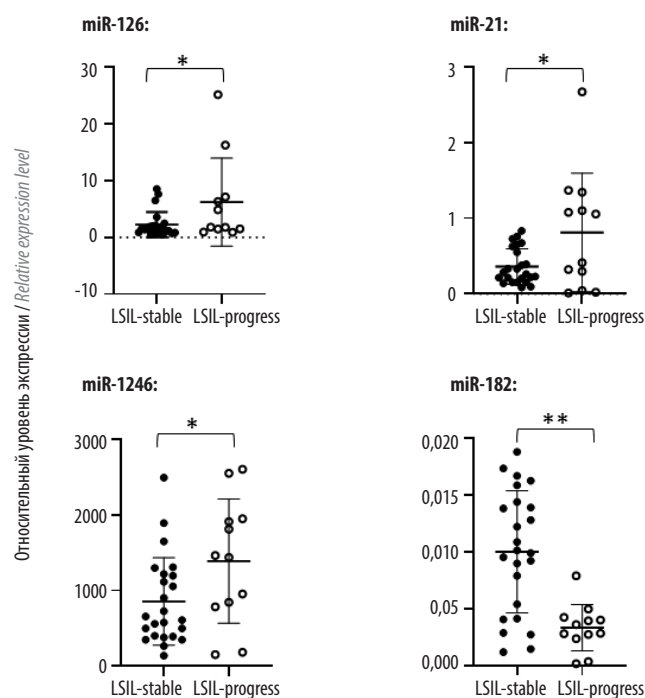


Рис. 3. Результаты оценки уровня экспрессии молекул микроРНК в материале пациенток 2 клинических групп методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Статистическая значимость оценена методом Манна–Уитни

Fig. 3. Level of microRNA expression in samples of patients from two clinical groups assessed using polymerase chain reaction with reverse transcription. Significance of differences was evaluated using the Mann–Whitney U-test

Но при оценке прогностического потенциала методом ROC-анализа ни для одной из этих молекул не было получено удовлетворительных результатов ( $AUC > 0,65$ ).

**Анализ прогностической значимости реципрокных пар микроРНК.** Феномен сочетанных и разнонаправленных (реципрокных) изменений экспрессии 2 молекул микроРНК в процессе развития онкологических заболеваний был описан ранее [17, 38, 39]. В ряде исследований было показано, что анализ соотношения концентраций 2 молекул микроРНК, для которых характерны разнонаправленные опухолюассоциированные изменения экспрессионной активности, может иметь высокий диагностический потенциал. Более того, этот подход успешно применялся в ходе разработки метода диагностики HSIL и рака шейки матки путем расчета соотношений 2 молекул микроРНК (например, miR-126/miR-375) в материале цитологических мазков [40, 41]. В рамках данного исследования разработанный ранее алгоритм был применен для поиска реципрокных пар среди 16 выбранных молекул на основе анализа «сырых» экспрессионных данных. Важным преимуществом этого подхода является отсутствие необходимости нормализации, так как разработанная программа производит подсчет соотношений показателей эффективности экспрессии пар молекул в каждом отдельном образце. Поэтому такие соотношения

не зависят от качества материала, выделения РНК и других технических факторов и могут быть использованы в качестве диагностических и/или прогностических маркеров без предварительной нормализации результатов.

Подсчет соотношений уровней экспрессии (концентрации) 120 пар молекул был сделан с помощью разработанного алгоритма. Проведенный затем ROC-анализ показал, что соотношения уровней экспрессии в парах miR-126/miR-182, miR-21/miR-182, miR-1246/miR-182 могут быть использованы в качестве маркеров прогноза течения LSIL и высокого риска развития HSIL. Так, значения AUC, вычисленные в ходе ROC-анализа расчетных значений соотношения концентраций в этих парах с использованием материала от 36 пациенток (LSIL-stable,  $n = 24$ ; LSIL-progress,  $n = 12$ ), составили 0,85; 0,80 и 0,74 соответственно (рис. 4).

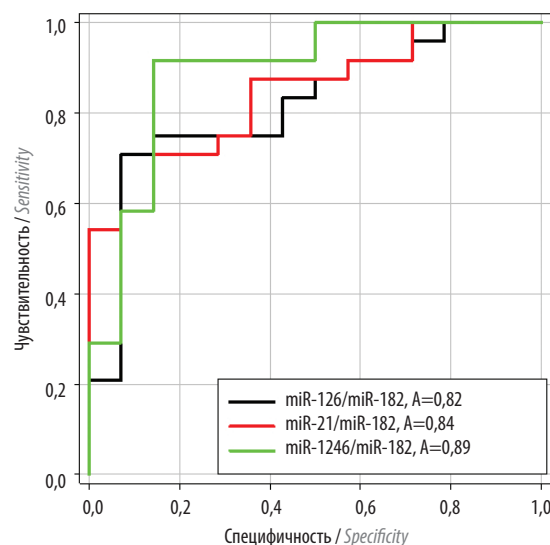


Рис. 4. Результаты ROC-анализа 3 реципрокных пар микроРНК

Fig. 4. Results of ROC analysis of 3 reciprocal microRNA pairs

Показатели прогностической значимости предложенных маркеров представлены в табл. 3. Согласно полученным данным, оценка уровня экспрессии 4 молекул микроРНК может быть предложена как дополнительный метод оценки прогноза течения LSIL.

**Оценка влияния ВПЧ на прогноз течения LSIL.** С учетом известной роли, которую играет ВПЧ в этиологии рака шейки матки, можно было предполагать, что прогноз клинического течения LSIL также может определяться или коррелировать с фактом инфицированности ВПЧ высокого онкогенного риска. Все образцы, включенные в исследование, были протестированы на присутствие вирусной ДНК, метод анализа позволял оценить наличие любого (любых) из 14 онкогенных ВПЧ. В группе LSIL-progress 58,3 % (7 из 12), а в группе LSIL-stable 62,5 % (15 из 24) образцов были ВПЧ-положительны. Количество образцов в группах сравнения не позволяет уверенно оценить разницу, но полученные результаты

Таблица 3. Показатели диагностической значимости расчетных показателей соотношений концентраций реципрокных пар микроРНК

Table 3. Diagnostic accuracy of estimated concentration ratios of reciprocal microRNA pairs

| Реципрокная пара микроРНК<br>Reciprocal microRNA pair | AUC  | Чувствительность<br>Sensitivity | Специфичность<br>Specificity | PPV, % | NPV, % | Аккуратность, %<br>Accuracy, % |
|---|------|---------------------------------|------------------------------|--------|--------|--------------------------------|
| miR-126/miR-182                                       | 0,82 | 0,75                            | 0,857                        | 66,67  | 90,00  | 78,95                          |
| miR-21/miR-182  | 0,84 | 0,708                           | 0,857                        | 63,16  | 89,47  | 76,32                          |
| miR-1246/miR-182                                      | 0,89 | 0,917                           | 0,857                        | 85,71  | 91,67  | 89,47                          |

не подтверждают привычный тезис о решающей роли ВПЧ в течении LSIL. В рамках данного исследования нам не удалось получить и проанализировать материал от пациенток группы LSIL-progress на момент проведения повторного цитологического исследования. Возможно, расширение групп сравнения и оценка динамики изменения профиля микроРНК и статуса инфицирования ВПЧ позволят сделать более конкретные выводы.

### Обсуждение

Участие микроРНК в цервикальном карциногенезе доказано сотнями научных работ. С учетом интенсивности проводимых исследований и количества публикуемых результатов можно было бы ожидать появления в лабораторной и клинической практике новых диагностических подходов, основанных на анализе активности микроРНК. Но пока таких методов нет, поэтому важно понимать, какие именно проблемы фундаментального или технологического плана требуют решения.

Одной из основных проблем на пути внедрения методов анализа микроРНК в клиническую практику до недавнего времени была сложность детекции коротких молекул. До применения традиционной ПЦР короткая молекула микроРНК требует проведения не только ОТ (синтеза комплементарной ДНК), но и удлинения. Поиск оптимального подхода к решению этой задачи отражен в научной литературе [42, 43]. В 2017 г. была предложена очередная «новая» технология [36]. Основной особенностью этого метода была структура праймера для ОТ, который «связывал» молекулу микроРНК с 2 сторон (two-tailed reverse transcription), что существенно повышало специфичность детекции (см. рис. 1). В ходе данного исследования мы использовали именно эту систему, но наши эксперименты по оценке эффективности ОТ с ПЦР с разведениями синтетических молекул показали предел чувствительности метода. Как видно из рис. 2, при концентрации микроРНК  $<10^4$  в 1 реакцию наблюдается стабильное значение эффективности амплификации. Этот феномен, вероятно, обеспечивается присутствием ОТ-праймера в реакционной смеси для ПЦР. Если диапазон измеряемых в биологических образцах концентраций

микроРНК не выходит за рамки чувствительности метода, описанная особенность не мешает его использованию. Но этот факт должен быть экспериментально проверен.

Другой проблемой, более фундаментального характера, является широкий диапазон изменений уровня активности (или концентрации) отдельных молекул, наблюдаемый как в клетках нормальных тканей, так и при патологических изменениях [44]. В отличие от бинарного характера диагностики ВПЧ интерпретация результатов анализа 1 молекулы микроРНК требует осторожности. Вероятным подходом к решению этой проблемы является поиск молекул с относительно стабильным уровнем экспрессии в клетках цервикального эпителия и одновременный анализ нескольких молекул микроРНК. В представленном исследовании минимальный разброс значений относительной концентрации (минимальный коэффициент осцилляции) наблюдался для miR-200a, miR-106b, miR-205, но для этих молекул не было показано существенной разницы среднего уровня экспрессии между сравниваемыми группами (см. табл. 2). Существенная разница между группами, наблюдавшаяся, например, для miR-1246 или miR-182, сочеталась с широким разбросом значений в рамках каждой группы (см. табл. 2, рис. 3). Идентификация микроРНК с оптимальным сочетанием указанных характеристик требует проведения более масштабных исследований.

Вариабельность нормальных показателей экспрессионной активности отдельных молекул микроРНК является причиной и третьего проблематичного аспекта. Традиционно экспрессионные данные требуют нормализации. Факт отсутствия надежных референсных молекул для нормализации данных анализа экспрессии микроРНК известен и широко обсуждается в научной литературе [45, 46]. В рамках представленной работы мы применили ранее предложенный метод решения этой задачи и показали, что расчетные показатели соотношения концентраций пар микроРНК с так называемым реципрокным характером экспрессионных изменений имеют высокий диагностический потенциал. В то время как ни одна из 16 включенных

в исследование молекул не могла быть использована как маркер для дискриминации 2 состояний LSIL-stable и LSIL-progress, соотношение концентраций реципрокных пар (miR-126/miR-182, miR-21/miR-182, miR-1246/miR-182) позволяло дифференцировать 2 клинические группы с достаточно высокой степенью специфичности и чувствительности.

### Выводы

1. Технология анализа микроРНК с помощью «двухфланговой» ОТ и последующей ПЦР с 2 микроРНК-специфичными праймерами обеспечивает достаточный уровень аналитической аккуратности оценки концентрации микроРНК в материале цервикального эпителия.

2. Из 16 молекул микроРНК, включенных в исследование, для 4 (miR-126, miR-21, miR-1246, miR-182) была показана статистически значимая разница

уровня экспрессии между группами LSIL-stable и LSIL-progress. Но в ходе оценки диагностической значимости полученных экспрессионных данных с помощью ROC-анализа значение AUC не превышало 0,65 ни в одном из 16 случаев.

3. Расчет соотношений концентраций реципрокных пар микроРНК позволяет получить новый диагностический маркер. При ROC-анализе таких соотношений (miR-126/miR-182, miR-21/miR-182, miR-1246/miR-182) получены следующие значения: AUC 0,82–0,89; чувствительность 0,71–0,92; специфичность 0,86; предиктивное значение положительного результата 63,16–85,71 %; предиктивное значение отрицательного результата 89,47–91,67 %.

4. Анализ панели маркерных молекул микроРНК в материале цервикального эпителия и расчет соотношений концентраций реципрокных пар является перспективным методом прогноза течения LSIL.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, 2019. 250 с. [Malignant tumors in Russia in 2018 (incidence and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute – a branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia, 2019. 250 p. (In Russ.)].
2. Cooper D.B., McCathran C.E. Cervical Dysplasia. StatPearls Publishing LLC, 2020.
3. Solomon D. The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. JAMA 2002;287(16):2114.
4. Nayar R., Wilbur D.C. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: A Historical Perspective. Acta Cytologica 2017;61(4–5):359–72.
5. Kurman R.J., Carcangiu M.L., Harrington C.S., Young R.H. WHO classification of tumours of female reproductive organs. Lyon: IARC Press, 2014.
6. Доброхотова Ю.Э., Боровкова Е.И. Международные алгоритмы ведения пациенток с дисплазией шейки матки. Гинекология 2018;20(5):27–32. [Dobrokhotova Yu.E., Borovkova E.I. International algorithms used for the management of patients with cervical dysplasia. Ginekologiya = Gynecology 2018;20(5):27–32. (In Russ.)].
7. Flagg E.W., Torrone E.A., Weinstock H. Ecological Association of Human Papillomavirus Vaccination with Cervical Dysplasia Prevalence in the United States, 2007–2014. Am J Public Health 2016;106(12):2211–8.
8. World Health Organization. Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice. 2nd edn. Copenhagen: World Health Organization, 2014.
9. Доброкачественные и предраковые заболевания шейки матки с позиции профилактики рака. Клинические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации. [Benign and precancerous diseases of the cervix from the position of cancer prevention. Clinical recommendations of the Ministry of Health of Russia. (In Russ.)].
10. Grigore M., Cruickshank M.E., Nieminen P. et al. National guidelines for management of cervical squamous intraepithelial lesion: A survey of European Federation for colposcopy members. Eur J Obstet Gynecol Rep Biol 2021;256:46–50.
11. Tai Y.J., Chen Y.Y., Hsu H.C. et al. Clinical management and risk reduction in women with low-grade squamous intraepithelial lesion cytology: A population-based cohort study. PLoS One 2017;12(12):e0188203. DOI: 10.1371/journal.pone.0188203.
12. Firnhaber C., Swarts A., Goeieman B., Rakhombe N. et al. Cryotherapy reduces progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1 in South African HIV-infected women: A randomized, controlled trial. J Acquir Immune Defic Syndr 2017;76(5):532–8. DOI: 10.1097/QAI.0000000000001539..
13. St-Martin G., Thamsborg L.H., Andersen B. et al. Management of low-grade cervical cytology in young women. Cohort study from Denmark. Acta Oncol 2020;1–8. DOI: 10.1080/0284186X.2020.1831061.
14. Buick C., Jembere N., Wang L., Kupets R. Cervical screening and colposcopy management of women age 24 and under. J Obstet Gynaecol Can 2020;42(12):1518–24. DOI: 10.1016/j.jogc.2020.06.013.
15. Min C.J., Massad L.S., Dick R. et al. Assessing physician adherence to guidelines for cervical cancer screening and management of abnormal screening results. J Low Genit Tract Dis 2020;24(4):337–42. DOI: 10.1097/LGT.0000000000000558.
16. Pisarska J., Baldy-Chudzik K. MicroRNA-based fingerprinting of cervical lesions and cancer. J Clin Med 2020;9(11):3668.
17. 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(1):44–52. [Kolesnikov N.N., Titov S.E., Veraskina Yu.A. et al. Improving the accuracy and informativeness of fine-needle aspiration biopsy of breast tumors by analyzing microRNA in the cytological smears. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2016;3(1):44–52. (In Russ.)].

18. Hou R., Wang D., Lu J. MicroRNA-10b inhibits proliferation, migration and invasion in cervical cancer cells via direct targeting of insulin-like growth factor-1 receptor. *Oncol Lett* 2017;13(6):5009–15.
19. Zou D., Zhou Q., Wang D. et al. The downregulation of microRNA-10b and its role in cervical cancer. *Oncol Res* 2016;24(2):99–108. DOI: 10.3727/096504016X14611963142173.
20. Ding Z., Liu S.J., Liu X.W. et al. MiR-16 inhibits proliferation of cervical cancer cells by regulating KRAS. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020;24(20):10419–25. DOI: 10.26355/eurrev\_202010\_23393.
21. Okoye J.O., Ngokere A.A., Onyenekwe C.C., Erinle C.A. Comparable expression of miR-let-7b, miR-21, miR-182, miR-145, and p53 in serum and cervical cells: Diagnostic implications for early detection of cervical lesions. *Int J Health Sci* 2019;13(4):29–38.
22. Li Y., Zhang Z., Xiao Z. et al. Chemotherapy-mediated miR-29b expression inhibits the invasion and angiogenesis of cervical cancer. *Oncotarget* 2017;8(9):14655–65.
23. Zhu Y., Han Y., Tian T. et al. miR-21-5p, miR-34a, and human telomerase RNA component as surrogate markers for cervical cancer progression. *Pathol Res Practice* 2018;214(3):374–9.
24. 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.
25. Fan Y., Sheng W., Meng Y. et al. LncRNA PTENP1 inhibits cervical cancer progression by suppressing miR-106b. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2020;48(1):393–407. DOI: 10.1080/21691401.2019.1709852.
26. Xu J., Wang H., Wang H. et al. The inhibition of miR-126 in cell migration and invasion of cervical cancer through regulating ZEB1. *Hereditas* 2019;156(1):11.
27. Wang X. miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2. *Mol Med Rep* 2012;5(3):753–60. DOI: 10.3892/mmr.2011.696.
28. Tang T., Wong H.K., Gu W. et al. microRNA-182 plays an onco-miRNA role in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2013;129(1):199–208.
29. Zhao X., Zhang W., Ji W. miR-196b is a prognostic factor of human laryngeal squamous cell carcinoma and promotes tumor progression by targeting SOCS2. *Biochem Biochem Biophys Res Commun* 2018;501(2):584–92. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.05.052.
30. How C., Hui A.B.Y., 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.
31. Wang H., Zhang D., Chen Q., Hong Y. Plasma expression of miRNA-21, -214, -34a, and -200a in patients with persistent HPV infection and cervical lesions. *BMC Cancer* 2019;19(1):986.
32. Mei J., Wang D.H., Wang L.L. et al. microRNA-200c suppressed cervical cancer cell metastasis and growth via targeting MAP4K4. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22(3):623–31.
33. Yang W., Hong L., Xu X. et al. LncRNA GAS5 suppresses the tumorigenesis of cervical cancer by downregulating miR-196a and miR-205. *Tumor Biol* 2017;39(7):1010428317711315.
34. Yu X., Zhao W., Yang X. et al. miR-375 Affects the proliferation, invasion, and apoptosis of HPV16-positive human cervical cancer cells by targeting IGF-1R. *Int J Gynecol Cancer* 2016;26(5):851–8.
35. Du P., Lai Y.H., Yao D.S. et al. Lentivirus media miR-1246 knockdown inhibits tumor growth and promotes apoptosis of SiHa cells. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2018;53(7):481–6.
36. Androvic P., Valihrach L., Elling J. et al. Two-tailed RT-qPCR: A novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res* 2017;45(15):1–13.
37. Коробкина Е.А., Князева М.С., Киль Ю.В. и др. Сравнительный анализ методов детекции микроРНК с помощью метода обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Клиническая лабораторная диагностика 2018;63(11):722–8. [Korobkina E.A., Knyazeva M.S., Kil Yu.V. et al. Comparative analysis of microRNA detection methods using reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2018;63(11):722–8. (In Russ.)].
38. Borisov E., Knyazeva M., Novak V. et al. Analysis of reciprocally dysregulated miRNAs in eutopic endometrium is a promising approach for low invasive diagnostics of adenomyosis. *Diagnostics (Basel)* 2020;10(10):782. DOI: 10.3390/diagnostics10100782.
39. Knyazeva M., Korobkina E., Karizky A. et al. Reciprocal dysregulation of miR-146b and miR-451 contributes in malignant phenotype of follicular thyroid tumor. *Inr J Med Sci* 2020;21(17):5950.
40. Архангельская П.А., Самсонов Р.Б., Штам Т.А. и др. Оценка экспрессии 4 микроРНК в цитологических препаратах в качестве дополнительного метода диагностики рака шейки матки. Опухоли женской репродуктивной системы 2017;13(3):63–72. [Arkhangelskaya P.A., Samsonov R.B., Shtam T.A. et al. Assessment of the expression of 4 microRNAs in cytological specimens as an additional method for the diagnosis of cervical cancer. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy = Tumors of Female Reproductive System* 2017;13(3):63–72. (In Russ.)].
41. Ivanov M., Titov S., Glushkov S. et al. Detection of high-grade neoplasia in air-dried cervical PAP smears by a microRNA-based classifier. *Oncol Rep* 2018;39(3):1099–111. DOI: 10.3892/or.2018.6214.
42. Chen C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005;33(20):e179. DOI: 10.1093/nar/gni178.
43. Benes V., Collier P., Kordes C. et al. Identification of cytokine-induced modulation of microRNA expression and secretion as measured by a novel microRNA specific qPCR assay. *Sci Rep* 2015;5:11590. DOI: 10.1038/srep11590.
44. Rotival M., Siddle K.J., Silvert M. et al. Population variation of miRNAs and isomiRs and their impact on human immunity to infection. *Genome Biol* 2020;21(1):187. DOI: 10.1186/s13059-020-02098-w.
45. Inada K., Okoshi Y., Cho-Isoda Y. et al. Endogenous reference RNAs for microRNA quantitation in formalin-fixed, paraffin-embedded lymph node tissue. *Sci Rep* 2018;8(1):5918. DOI: 10.1038/s41598-018-24338-7.
46. Faraldi M., Gomarasca M., Sansoni V. et al. Normalization strategies differently affect circulating miRNA profile associated with the training status. *Sci Rep* 2019;9(1):1584. DOI: 10.1038/s41598-019-38505-x.

#### Вклад авторов

А.В. Малек: разработка дизайна исследования, написание статьи;  
И.В. Берлев: разработка дизайна исследования;  
Т.С. Присяжная: получение и анализ клинических данных, написание статьи;  
О.А. Смирнова: получение и анализ клинических данных;  
А.А. Михетько: анализ цитологического материала;  
М.С. Князева: получение и анализ данных полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, написание статьи;  
Л.М. Забегина: получение и анализ данных полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

**Authors' contributions**

A.V. Malek: developing the study design, article writing;

I.V. Berlev: developing the study design;

T.S. Prisyazhnaya: clinical data collection and analysis, article writing;

O.A. Smirnova: clinical data collection and analysis;

A.A. Mikheto: cytological analysis;

M.S. Knyazeva: collecting and analysis the results of polymerase chain reaction with reverse transcription, article writing;

L.M. Zabegina: collecting and analysis the results of polymerase chain reaction with reverse transcription.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

A.B. Малек / A.V. Malek: <https://orcid.org/0000-0001-5334-7292>

M.C. Князева / M.S. Knyazeva: <https://orcid.org/0000-0002-2079-5061>

L.M. Забегина / L.M. Zabegina: <https://orcid.org/0000-0003-0827-1641>

O.A. Смирнова / O.A. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0003-1140-6578>

A.A. Михетько / A.A. Mikheto: <https://orcid.org/0000-0002-3396-125X>

I.V. Берлев / I.V. Berlev: <https://orcid.org/0000-0001-6937-2740>

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

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

**Финансирование.** Исследование проведено в рамках инициативной НИР АААА-А18-118012390157-2, не предполагающей внешних источников финансирования.

**Financing.** The study was carried out within the framework of the initiative research project АААА-А18-118012390157-2 and didn't involve external sources of funding.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

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 of N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

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