

*Е.В. Бахидзе^{1,2}, П.А. Архангельская^{1,2}, А.В. Малек^{1,3}, А.А. Михетько¹, М.К. Иванов³,
Р.Б. Самсонов^{1,3}, И.В. Берлев^{1,2}*

Усовершенствование скрининга рака шейки матки с помощью определения микроРНК в цитологических препаратах

¹ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова»,
²Северо-западный Государственный Университет им. И.И. Мечникова,
³ООО «Онкосистема»,
Санкт-Петербург

Чувствительность цитологического скрининга РШМ, несмотря на используемые технические усовершенствования, остается достаточно низкой. Показано, что среди женщин с мазками, расцененными как сомнительные цитологические заключения ASCUS в 5% — 10% случаи, на самом деле, характеризовались тяжелой дисплазией. Применение новых молекулярных методов диагностики может повысить эффективность скрининга РШМ за счет повышения точности диагностики степени дисплазии. Неопластическая трансформация эпителия шейки матки сопровождается специфическими изменениями профиля экспрессии микроРНК, оценка которых имеет большой диагностический потенциал. В данной работе проведен анализ экспрессии 18 микроРНК. Установлена корреляция экспрессии пяти микроРНК (miR-375, miR-20a, miR-196b, miR145 and miR-126) со степенью неоплазии шейки матки, что позволяет рекомендовать их для дальнейшего исследования с целью внедрения в качестве диагностического теста на этапе цитологического скрининга.

Ключевые слова: микроРНК, цервикальные интраэпителиальные неоплазии, диагностика

Проблема совершенствования диагностики рака шейки матки (РШМ) не теряет своей актуальности. РШМ принадлежит третье место по уровню заболеваемости. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире заболевают свыше 500 тыс. женщин и умирает от него более 200 тыс. женщин [3]. В 2012 году был обнаружен рост заболеваемости РШМ у женщин в возрасте до 30 лет; в 2015 году прирост показателя заболеваемости РШМ составил 31,1% [1].

Основным методом вторичной профилактики рака шейки матки (РШМ) остается цитологиче-

ское исследование эпителия шейки матки. Чувствительность цитологического скрининга для диагностики цервикальных интраэпителиальных неоплазий (CIN), несмотря на проводимые технические усовершенствования, остается достаточно низкой. Открытие молекул-ингибиторов синтеза белков на посттранскрипционном уровне — микроРНК (миРНК) — предоставило новые возможности поиска тканевых онкомаркеров и анализа биопсийного материала [4]. МиРНК играют существенную роль в процессе развития злокачественных новообразований всех локализаций, включая РШМ [12]. Определенные сдвиги профиля микроРНК всегда сопровождают процесс неопластической трансформации, отражая, и, отчасти, определяя биологические и клинические особенности опухолевого роста. Уровень экспрессии определенных молекул микроРНК часто коррелирует с такими биологическими особенностями клеток, как активность пролиферации, направление и степень дифференцировки, секреторная активность, метаболический статус.

В ходе злокачественной трансформации цервикального эпителия персистенция ВПЧ приводит к характерным изменениям профиля экспрессии микроРНК, и, соответственно, их регуляторной активности. В ряде исследований, осуществленных с помощью высокопропускных технологий, продемонстрированы изменения уровней экспрессии множества микроРНК в клетках, инфицированных ВПЧ, но информация о биологическом значении изменений содержания конкретных микроРНК пока недостаточна и нуждается в уточнении [12].

Имеются данные о том, что экспрессия клеточных микроРНК отражает состояние цервикального эпителия, его реакцию на персистенцию ВПЧ, этапность процесса малигнизации [12]. В исследовании, проведенном путем оценки экспрессии микроРНК-25/92a и микроРНК-22/29a, было показано, что при помощи этих микроРНК можно дифференцировать нормальное состояние цер-

викального эпителия, цервикальной интраэпителиальной неоплазии и цервикальной карциномы [17]. В исследовании на основании анализа выборки из более 100 пациенток с различными цервикальными неоплазиями обнаружено, что содержание единственной миРНК-125 может рассматриваться в качестве потенциального биомаркера инвазивного рака шейки матки (общая точность анализа >80%) [13]. Наконец, сравнение метода выявления изменений миРНК с традиционным цитологическим методом, используемым в качестве скринингового при диагностике РШМ, показало, что метод определения экспрессии миРНК-424 и миРНК-375 обладает более высокой чувствительностью (76.0% и 74,9% против 63.8%) и большей отрицательной прогностической ценностью (NPV) (от 85.7% и 85,4% против 79.3%) по сравнению с традиционной цитологией [14].

Приведенные данные, свидетельствуют о том, что некоторые миРНК могут быть использованы в качестве потенциальных биомаркеров в ранней диагностике РШМ или в разработке таргетной терапии. Однако это положение требует более детального исследования, поскольку эффективность такого подхода еще не доказана. Изменение экспрессии миРНК может отражать самые ранние этапы цервикального канцерогенеза, поэтому получение новых данных относительно этого феномена позволит разработать новые подходы к скринингу и ранней диагностике РШМ.

Цель исследования:

- разработать метод анализа миРНК для диагностики преинвазивных неоплазий;
- оценить перспективы внедрения в клиническую практику метода анализа миРНК в материале цитологических препаратов при диагностике CIN.

Материалы и методы

В исследование включены образцы материала, полученного в ходе цитологического исследования (n=93). Цитологические препараты подвергались стандартной обработке. Цитологическое исследование проводили с помощью световой микроскопии, по результатам которой в 34 случаях было диагностировано LSIL, в 33 случаях — HSIL, в 26 случаях — РШМ. Группу контроля составили здоровые пациенты, у которых по результатам цитологического скрининга не было выявлено ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки. Диагнозы РШМ, HSIL и LSIL были подтверждены последующим гистологическим исследованием.

Выделение РНК. Выделение суммарного пула РНК проводили с помощью набора «РеалБест экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). Концентрация выделенной РНК была в диапазоне от 17,5 до 463,0 нг/мкл. Количество РНК, выделенной из материала цитологического препарата, было достаточным для анализа уровня экспрессии миРНК. Чистоту препарата оценивали как отношение поглощения при длинах волн 260/280 нм и 260/230 нм. Препараты РНК считали годными для анализа при показателях абсорбции A260/280 — 2,8, A260/230 —

Таблица 1. Изменения уровней экспрессии некоторых миРНК в процессе цервикального канцерогенеза

миРНК	Изменение	Источник
миРНК-125b	Потенциальный биомаркер инвазивного рака шейки матки (общая точность анализа>80%)	[13]
миРНК-375	Снижение экспрессии по мере прогрессирования неоплазии	[7]
миРНК-34a	Снижение уровня экспрессии при CIN2-3 по сравнению с образцами при CIN1и в образцах плоскоклеточного рака по сравнению с уровнем образцов CIN2-3	[11], [19]
миРНК-1246	Резкое снижение уровня экспрессии в образцах плоскоклеточного рака по сравнению с уровнем образцов CIN	[21]
миРНК-106b	Экспрессия значительно выше в тканях РШМ, по сравнению с нормальными образцами.	[10]
миРНК-203	Угнетается в процессе злокачественной трансформации, но коррелирует с активностью метастатической диссеминации	[2], [11]
миРНК-155-m2	Экспрессия увеличивается у пациентов с РШМ и коррелирует со стадиями FIGO	[5]
миРНК-145	Снижение уровня экспрессии по мере прогрессирования неоплазии	[16]
миРНК-146	Повышение экспрессии по мере прогрессирования неоплазии	
миРНК-126	Снижение экспрессии при развитии инвазивного РШМ	[9]
миРНК-192	Повышение уровня экспрессии в тканях микроинвазивной аденокарциномы по сравнению с нормальными образцами.	[8]
миРНК-146b-m3	Повышение экспрессии по мере прогрессирования неоплазии	[6]
миРНК-196b	Снижение экспрессии по мере прогрессирования неоплазии	[6]
миРНК-200b	Повышение экспрессии по мере прогрессирования неоплазии	[6]
миРНК-20a-m2	Повышение уровня экспрессии по мере прогрессирования CIN, по сравнению со здоровыми тканями	[20]
миРНК-31	Повышение экспрессии в тканях пациентов с РШМ по сравнению с нормальными тканями	[22]
миРНК-99a	Снижение уровня экспрессии в тканях РШМ	[17]
миРНК-23a	Изменение экспрессии в нормальных образцах по сравнению с образцами с CIN	[14]

Таблица 2. Выраженность экспрессии в зависимости от диагноза (Me [25%; 75%])

миРНК	Диагноз				Ранговый дисперсионный анализ	
	Норма	LSIL	HSIL	Рак	Критерий Краскела-Уоллиса: H (3, N=113)	p
миРНК-106b	1,33 [0,01; 2,01]	1,26 [-1,28; 1,77]	1,38 [-1,03; 1,79]	2,53 [1,66; 3,19]	15,51	0,0014
миРНК-1246	3,18 [0,00; 5,44]	3,37 [1,05; 8,62]	4,71 [1,29; 7,91]	3,62 [1,79; 11,54]	1,54	0,67
миРНК-125b	1,50 [-1,07; 1,98]	-0,01 [-2,19; 1,42]	1,15 [-1,29; 1,83]	-1,67 [-3,33; -1,09]	16,69	0,0008
миРНК-126	-16,67 [-73,37; -8,70]	-8,99 [-34,91; -2,74]	-8,79 [-38,39; -4,16]	-3,29 [-7,54; -1,51]	14,22	0,0026
миРНК-145	-15,54 [-28,37; -7,63]	-13,26 [-23,51; -7,89]	-25,79 [-36,56; -16,07]	-42,40 [-62,95; -26,64]	28,64	< 0,0001
миРНК-146a	-1,58 [-2,69; -1,23]	-3,08 [-5,80; -1,74]	-2,81 [-4,34; -1,89]	-3,49 [-5,58; -1,96]	9,80	0,020
миРНК-146b-m3	-1,75 [-2,43; -1,35]	-1,83 [-2,09; -1,47]	-2,22 [-2,97; -1,99]	-2,07 [-3,39; -1,45]	4,70	0,20
миРНК-155-m2	-8,15 [-16,35; -4,55]	-11,84 [-16,60; -5,54]	-10,05 [-17,23; -6,28]	-9,03 [-14,01; -3,28]	3,51	0,32
миРНК-192	-4,08 [-8,37; 1,65]	11,62 [2,32; 82,53]	-4,66 [-11,85; 17,78]	-10,10 [-18,01; -4,20]	38,63	< 0,0001
миРНК-196b	-20,55 [-33,90; -10,65]	-15,95 [-25,03; -9,05]	-12,35 [-21,97; -6,41]	-8,27 [-11,94; -5,81]	11,05	0,012
миРНК-200b	6,34 [4,16; 8,29]	4,81 [3,00; 7,36]	5,59 [4,55; 7,59]	3,08 [1,69; 4,21]	17,40	0,0006
миРНК-203a	1,36 [-3,14; 4,24]	1,40 [-2,01; 3,80]	-1,25 [-2,85; 2,40]	-1,36 [-7,16; 1,83]	4,77	0,19
миРНК-20a-m2	3,84 [2,46; 5,42]	4,95 [3,46; 6,27]	5,55 [2,99; 7,99]	10,39 [7,00; 16,24]	23,92	< 0,0001
миРНК-31	-2,06 [-3,00; -1,28]	-2,05 [-2,59; -1,57]	-1,40 [-2,63; 1,02]	-2,99 [-5,00; -1,60]	8,86	0,031
миРНК-34a	-7,33 [-9,93; -4,54]	-4,93 [-7,32; -3,74]	-2,64 [-3,50; -2,18]	-6,17 [-11,44; -2,98]	18,04	0,0004
миРНК-375	4,30 [3,77; 5,98]	3,44 [2,02; 4,99]	1,64 [1,02; 3,41]	-2,55 [-6,74; 1,18]	46,19	< 0,0001
миРНК-99a	-1,87 [-2,97; 0,02]	-1,54 [-2,83; 1,24]	-1,51 [-1,92; -1,10]	-1,86 [-4,62; -1,27]	4,38	0,22
миРНК-23a	2,22 [1,60; 3,26]	2,77 [2,22; 4,63]	3,22 [2,30; 4,63]	1,74 [-1,30; 3,00]	10,50	0,015

1,8–2,2, которые свидетельствуют о достаточной чистоте препарата.

Обратная транскрипция — количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) для получения кДНК проводили в объеме 30 мкл. Использовали готовые реакционные смеси «РеалБест Мастермикс ОТ» (ЗАО «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, сразу использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР. Измерение уровней экспрессии миРНК выполняли методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве референсного гена использовали малую ядерную РНК (яРНК) U6. Реакцию ПЦР проводили в объеме 30 мкл с применением готовой реакционной смеси «РеалБест Мастер микс» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) и раствора прямого и обратного праймеров (5,0 мкМ) и зонда (2,5 мкМ). Протокол реакции ПЦР: предварительный прогрев при температуре +94 °С — 2 мин, 50 основных циклов денатурации при +94 °С — 10 с, отжига и элонгации при +60 °С — 20 с. Уровень экспрессии миРНК оценивали относительно уровня экспрессии малой яРНК U6, вычисляли по формуле $2^{(Ct\ U6 - Ct\ miR\ of\ interest)}$ и обозначали как ΔCt.

Результаты и обсуждение

В первой части работы были выбраны 18 миРНК: миР-106b; миР-1246; миР-125b; миР-126; миР-145; миР-146a; миР-146b-m3; миР-155-m2; миР-192; миР-196b; миР-200b; миР-203a; миР-20a-m2; миР-31; миР-34a; миР-375; миР-99a; миР-23a, вероятно вовлеченных в процесс неоплазии эпителия шейки матки на основании анализа данных литературы (табл. 1).

Следующим этапом работы было исследование уровня экспрессии отобранных микроРНК в цитологических препаратах пациентов все групп. Статистически значимая разница уровня экспрессии в тестируемых группах была выявлена для микроРНК молекул miR145, miR-126, miR-196b, miR-375, miR-20a (табл. 2).

Обнаружено, что прогрессирование неопластического процесса сопровождается усилением экспрессии miR-20a, miR 196 и miR-126 (рис. 1, 2, 4) и снижением экспрессии miR-375 (рис. 3). Выявлено статистически значи-

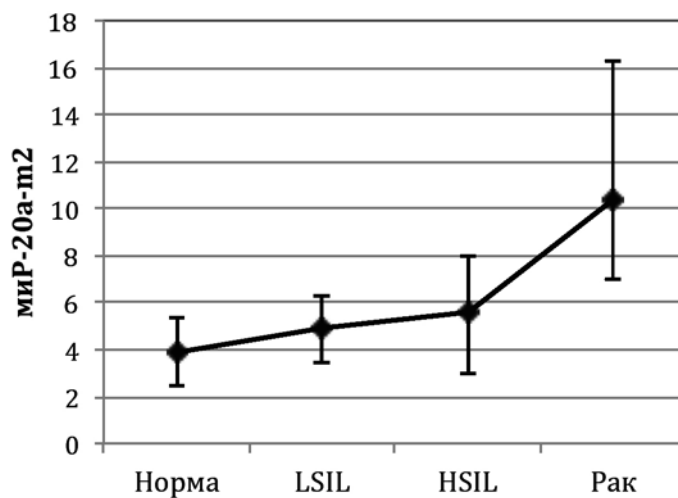


Рис. 1. Изменение экспрессии мРНК-20a-m2 по мере прогрессирования неоплазии эпителия шейки матки (Me [25%; 75%])

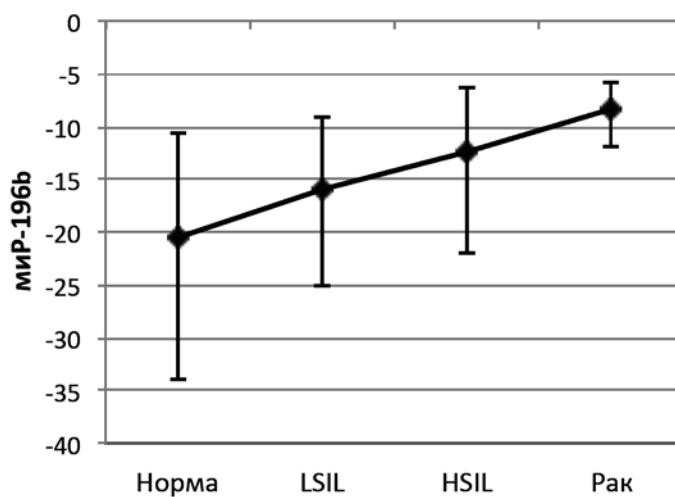


Рис. 2. Изменение экспрессии мРНК-196b по мере прогрессирования неоплазии эпителия шейки матки (Me [25%; 75%])

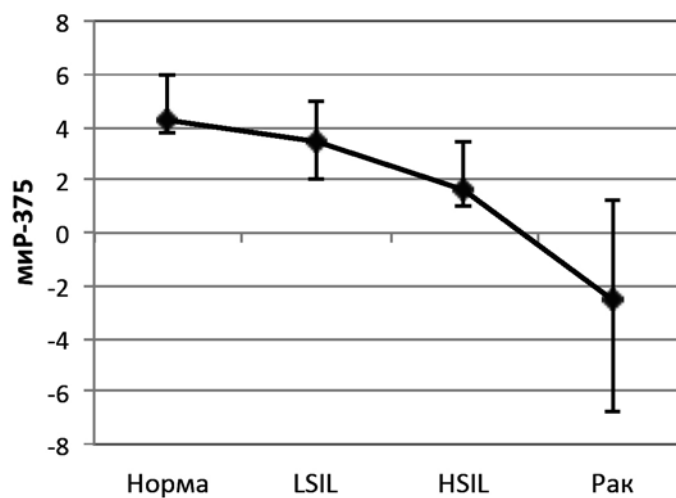


Рис. 3. Изменение экспрессии мРНК-375 по мере прогрессирования неоплазии эпителия шейки матки (Me [25%; 75%])

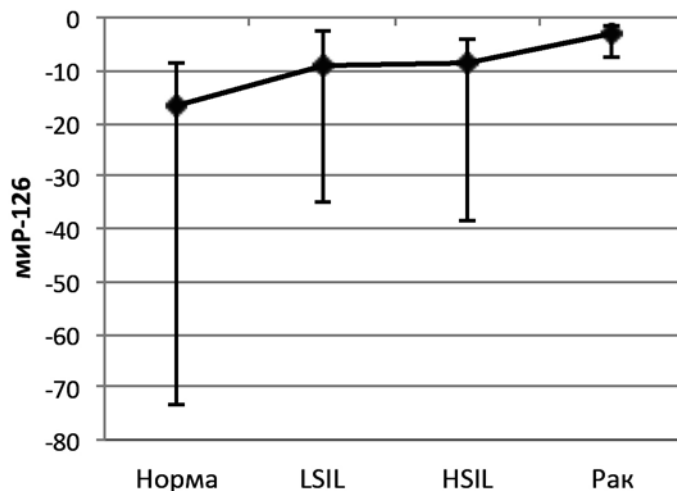


Рис. 4. Изменение экспрессии мРНК-126 по мере прогрессирования неоплазии эпителия шейки матки (Me [25%; 75%])

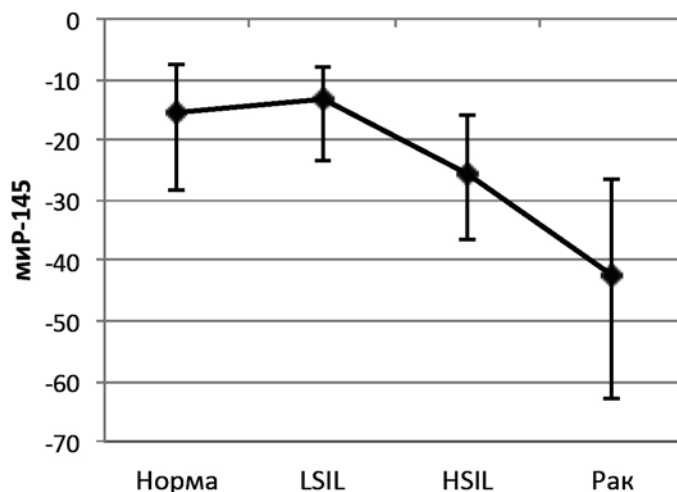


Рис. 5. Изменение экспрессии мРНК-145 по мере прогрессирования неоплазии эпителия шейки матки (Me [25%; 75%])

мое снижение уровня экспрессии miR 145 у пациентов с LSIL по сравнению с пациентами с HSIL ($p < 0,0001$); и уровня экспрессии у пациентов с HSIL, по сравнению с пациентами с РШМ (рис. 5).

Применение корреляционного анализа (по Спирмену) позволило ранжировать показатели miРНК по тесноте взаимосвязи со степенью неоплазии. В соответствии со шкалой Чеддока, положительной слабой корреляционной взаимосвязью со степенью агрессивности неоплазии связаны показатели miR-196b ($r = 0,304$; $p = 0,0011$); miR-126 ($r = 0,309$; $p < 0,001$) и miR-20a-m2 ($r = 0,421$; $p < 0,001$). Между степенью неоплазии и выраженностью экспрессии показателей miR-145 и miR-375 установлена высоко

значимая ($p < 0,001$) отрицательная связь, при этом, если с miR-145 сила связи еще слабая ($r = -0,473$), то с miR-375 — уже средняя ($r = -0,633$) (рис. 6).

При прогрессировании неоплазии в эпителии шейки матки наблюдается усиление экспрессии miR-20a ($p < 0,0001$); miR-196 ($p = 0,012$); miR-126 ($p = 0,0026$) и снижение экспрессии miR-375 ($p < 0,0001$), miR-145 ($p < 0,0001$).

Таким образом, изменение профиля пяти miРНК: miR-375, miR-20a, miR-196b, miR145 и miR-126 отражают этапы малигнизации эпителия шейки матки от слабой интраэпителиальной неоплазии до тяжелой и инвазивного рака с высокой степенью корреляции. Это позволяет рекомендовать их для дальнейшего исследова-



Рис. 6. Ранговые корреляции по Спирмену экспрессии миРНК со степенью прогрессирования неоплазии

ния с целью внедрения в качестве диагностического теста на этапе цитологического скрининга.

ЛИТЕРАТУРА

- Каприн А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). — М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2017. — 250 с.
- Botezatu A., Goia-Rusanu C.D., Iancu I.V. et al. Quantitative analysis of the relationship between microRNA124a, -34b and -203 gene methylation and cervical oncogenesis // *Mol. Med. Rep.* — 2011. — Vol. 4. — № 1. — P. 121–128.
- Castellsague X., Pawlita M., Roura E., Marqal N. Prospective seroepidemiologic study on the role of human papillomavirus and other infections in cervical carcinogenesis: evidence from the cohort // *Int. J. Cancer.* — 2014. — Vol. 135(2). — P. 440–452.
- Di Leva G., Garofalo M., Croce C. M. MicroRNAs in cancer // *Annu. Rev. Pathol.* — 2014. — Vol. 9. — P. 287–314.
- Fang H., Shuang D., Yi Z., Sheng H., Liu Y. Up-regulated microRNA-155 expression is associated with poor prognosis in cervical cancer patients // *Biomed Pharmacother.* — 2016. — Vol. 83. — P. 64–69.
- Han Y., Xu G.X., Lu H. et al. Dysregulation of miRNA-21 and their potential as biomarkers for the diagnosis of cervical cancer // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* — 2015. — Vol. 8. — № 6. — P. 7131–7139.
- Hao M., Zhao W., Zhang L. et al. Low folate levels are associated with methylation-mediated transcriptional repression of miR-203 and miR-375 during cervical carcinogenesis // *Oncol. Lett.* — 2016. — Vol. 11(6). — P. 3863–3869.
- Heejeong Lee, Kyu Rae Kim et al. MicroRNA expression profiling and Notch1 and Notch2 expression in minimal deviation adenocarcinoma of uterine cervix // *World J. Surg. Oncol.* — 2014. — Vol. 12. — P. 334.
- Huang T.H., Chu T.Y. Repression of miR-126 and upregulation of adrenomedullin in the stromal endothelium by cancer-stromal cross talks confers angiogenesis of cervical cancer // *Oncogene.* — 2014. — Vol. 33(28). — P. 3636–3647.
- Gao D., Zhang Y., Zhu M. et al. miRNA Expression Profiles of HPV-Infected Patients with Cervical Cancer in the Uyghur Population in China // *PLoS One.* — 2016. — Vol. 11(10).
- Gocze K., Gombos K., Kovacs K. et al. MicroRNA expressions in HPV-induced cervical dysplasia and cancer // *Anticancer Res.* — 2015. — Vol. 35. — № 1. — P. 523–530.
- Pedroza-Torres A., Lopez-Urrutia E., Garcia-Castillo V. et al. MicroRNAs in cervical cancer: evidences for a miRNA profile deregulated by HPV and its impact on radio-resistance // *Molecules.* — 2014. — Vol. 19. — № 5. — P. 6263–6281.
- 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. — Vol. 2015. — P. 304584.
- 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. — Vol. 43(6). — P. 358–366.

15. 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. — Vol. 106. — № 9. — doi: 10.1093/jnci/dju241.
16. 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. — Vol. 3 (7).
17. Wang X., Wang H.K., Li Y. et al. MicroRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2014. — Vol. 111. — № 11. — P. 4262–4267.
18. 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. — Vol. 31(5). — P. 934.
19. Wang L., Yu J., Xu J. et al. The analysis of microRNA-34 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with corresponding pericarcinous tissues // *Gene.* — 2015. — Vol. 554. — № 1. — P. 1–8.
20. Xin F., Liu P., Ma C-F. A circulating serum miRNA panel as early detection biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* — 2016. — Vol. 20 (23). — P. 4846-4851.
21. 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. — Vol. 138 (3). — P. 683-688.
22. Zheng W., Liu Z., Zhang W., Hu X. miR-31 functions as an oncogene in cervical cancer // *Arch Gynecol. Obstet.* — 2015. — Vol. 292(5). — P. 1083-1089.

Поступила в редакцию 25.04.2017 г.

*E.V. Bakhidze^{1,2}, P.A. Arkhangelskaya^{1,2}, A.V. Malek^{1,3},
A.A. Mihetko¹, M.K. Ivanov², R.B. Samsonov^{1,3},
I.V. Berlev^{1,2}*

Improvement of cervical cancer screening using determination of microRNA in cytological preparations

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology

²I.I. Mechnikov North-West State Medical University

³Ltd. "Oncosystem"
St. Petersburg

The sensitivity of cytological screening of cervical cancer, despite the ongoing technical improvements, remains quite low. It was showed that among women with smears, regarded as questionable cytological data of ASCUS, from 5% to 10%, in fact, they had severe dysplasia. The use of new molecular diagnostic methods can improve the effectiveness of screening of cervical cancer by improving the accuracy of diagnosis of the degree of dysplasia. Neoplastic transformation of the cervix epithelium is accompanied by specific changes in the profile of siRNA expression, the evaluation of which has a great diagnostic potential. In this study, the expression of 18 miRNA was analyzed. The correlation of the expression of five miRNAs (miR-375, miR-20a, miR-196b, miR145 and miR-126) with the degree of neoplasia of the cervix was established, which allowed them to be recommended for further investigation for the purpose of introduction as a diagnostic test at the stage of cytological screening.

Key words: microRNA, cervical intraepithelial neoplasia, diagnosis