

И.А. Новикова, Н.Н. Тимошкина, Д.С. Кутилин

## ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ микроРНК В ОПУХОЛЕВЫХ И НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЯХ ТОЛСТОЙ КИШКИ

DOI 10.25789/YMJ.2020.72.19

УДК 613.6.027

Проведены анализ дифференциальной экспрессии микроРНК в опухолевых и нормальных тканях больных колоректальным раком (КРР), а также идентификация потенциальных lncRNA-мишеней и генов-мишеней с применением методов машинного обучения. В результате секвенирования обнаружено 6 дифференциально экспрессирующихся микроРНК (hsa-miR-143-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-let-7i-5p) в опухолевой ткани толстой кишки относительно нормальной. Для этих микроРНК определены 97 генов-мишеней и 23 потенциально взаимодействующие с ними длинные некодирующие РНК. Вместе они составляют сеть конкурентно экспрессирующихся РНК, характерную для КРР, участвующую в реализации таких сигнальных каскадов, как регуляция клеточной адгезии, активация иммунного ответа, регуляция клеточного ответа на гормоны и стресс, регуляция сигнального пути Wnt и клеточной миграции, регуляция пролиферации и клеточного цикла, регуляция взаимодействия с вирусными агентами, регуляция апоптоза и ответа на гипоксию. Полученные данные расширяют представления о механизмах регуляции экспрессии генов при КРР и могут стать основой для панели онкомаркеров.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, микроРНК, некодирующие РНК, экспрессия.

Non-coding RNAs (miRNAs and long non-coding RNAs (lncRNA)) play an important role in many biological processes, and dysregulation can lead to various diseases, including colorectal cancer (CRC). The aim of the study was to analyze the differential expression of miRNAs in the tumor and normal tissues of patients with CRC, as well as the identification of potential lncRNA targets and target genes using methods of machine learning. Analysis of miRNA expression was performed by multiple parallel sequencing on a MiSeq instrument. For bioinformatics analysis, DESeq2, TarPmiR, ORA (Over-Representation Analysis) and FMD (Functional module detection) algorithms were used. Sequencing revealed 6 differentially expressed microRNAs (hsa-miR-143-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-let-7i-5p) in the tumor tissue of the colon is relatively normal. For these microRNAs, 97 target genes and 23 potentially interacting long non-coding RNAs were identified. Together they form a network of competitively expressed RNA characteristic of CRC, which is involved in the implementation of signaling cascades such as regulation of cell adhesion, activation of the immune response, regulation of the cellular response to hormones and stress, Wnt signaling pathway and cell migration regulation, regulation of proliferation and cell cycle, regulation interaction with viral agents, regulation of apoptosis and response to hypoxia. The data obtained expand the understanding of the mechanisms of gene expression regulation in CRC and can become the basis for a panel of tumor markers.

**Keywords:** colorectal cancer, microRNA, non-coding RNA, expression, metastases, multiple parallel sequencing.

**Введение.** В настоящее время наблюдается стабильный рост заболеваемости колоректальным раком (КРР): во всем мире число ежегодно регистрируемых случаев приближается к 1,4 млн. [26]. КРР является гетерогенным многофакторным заболеванием, которое примерно в 35% случаев обусловлено генетическими факторами, включая изменения в экспрессии некодирующих РНК (нкРНК) [25]. Хотя многочисленные методы лечения, такие как хирургия, химиотерапия, лучевая терапия, таргетная терапия и иммунотерапия, показали способность уменьшать частоту рецидивов и улучшать выживаемость пациентов, 5-летняя выживаемость больных КРР все еще остается низкой [24]. Это подчеркивает необходимость поиска но-

вых биомаркеров, которые могут быть использованы для ранней диагностики и прогнозирования течения этого заболевания. Большое количество исследований выявило, что нкРНК (микроРНК и длинные некодирующие РНК (lncRNA)) играют важную роль во многих биологических процессах, и нарушение их регуляции может привести к различным заболеваниям, включая рак толстой кишки [20].

МикроРНК - это короткие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов, катализируя разрушение мРНК либо ингибируя трансляцию мРНК в белок [2]. МикроРНК вносят значительный вклад в инициацию и развитие различных молекулярных событий, включая инициацию онкогенеза, прогрессирование и метастазирование опухолей, что делает микроРНК потенциальными биомаркерами для оценки прогрессирования и прогноза КРР. Хотя микроРНК регулируют экспрессию генов, кодирующих белки, главным образом посредством деградации или сайленсинга мРНК, появляется все больше свидетельств того, что микроРНК могут взаимодействовать с lncRNA, что, в свою очередь,

также обеспечивает регуляцию экспрессии генов-мишеней [6].

Изучение регуляторной сети микроРНК – длинные некодирующие РНК – мРНК имеет большое значение как для выяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе канцерогенеза, так и для создания панели новых биомаркеров. Поэтому целью исследования стал анализ дифференциальной экспрессии микроРНК в опухолевых и нормальных тканях больных КРР, а также идентификация потенциальных lncRNA-мишеней и генов-мишеней с применением методов машинного обучения.

**Материалы и методы исследования.** Для множественного параллельного секвенирования микроРНК было выбрано 80 пациентов (аденокарцинома толстой кишки G2) в возрасте 45-69 лет (медиана возраста 65), от которых были получены парные биоптаты тканей (опухолевых и нормальных, всего 160 образцов).

**Множественное параллельное секвенирование микроРНК.** Для выделения фракции микроРНК использовали набор mirVana miRNA Isolation Kit («Ambion, Life Science Technologies»,

ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону: **НОВИКОВА Инна Арнольдовна** – к.м.н., зам. генерального директора по науке, novikovainna@yahoo.com, **ТИМОШКИНА Наталья Николаевна** – к.б.н., руковод. лаб., timoshkinann@nmoi.ru, **КУТИЛИН Денис Сергеевич** – к.б.н., в.н.с., k.denees@yandex.ru, ORCID 0000-0002-8942-3733.

США). Создание и последующую очистку библиотеки транскриптома микроРНК проводили с помощью набора TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit («Illumina», США). К фракции микроРНК последовательно пришивали 3'- и 5'-адаптеры, проводили обратную транскрипцию и амплификацию созданной конструкции микроРНК согласно прилагаемому протоколу. Копии кДНК очищали электрофорезом в 6%-ном ПААГ. кДНК из геля экстрагировали водой и осаждали 95%-ным этанолом (в качестве соосаждителя использовали гликоген). Количество кДНК определяли на флуориметре Qubit 2.0® с использованием набора Qubit dsDNA HS Assay Kit («Invitrogen», США). Множественное параллельное секвенирование нуклеотидных последовательностей библиотек кДНК проводили на приборе MiSeq («Illumina», США). Методом параллельного множественного секвенирования идентифицировали нуклеотидную последовательность в случайной выборке созданных кДНК копий. Определение экспрессии микроРНК проводили путем сравнения нуклеотидной последовательности секвенированных молекул в каждом образце с известными нуклеотидными последовательностями микроРНК, представленными в базах данных miRBase и miRGeneDB. Подход основан на алгоритме, реализованном в miRAnalyzer [1].

**Статистический/биоинформационный анализ.** При анализе дифференциальной экспрессии микроРНК использовали алгоритм DESeq2, реализованный в среде R. DESeq2 представляет собой метод для проверки дифференциальной экспрессии с использованием отрицательных биномиальных обобщенных линейных моделей; оценки дисперсии и изменения логарифмической кратности. В анализ были включены микроРНК, представленные в выборках не менее чем 10 копиями. Для учета влияния интегральной экспрессии микроРНК на экспрессию сравниваемых микроРНК проводили нормализацию сравниваемых библиотек методом RLE (Relative Log Expression). При оценке статистической значимости различий использовали тест Вальда. Для учета множественности сравнений использовали метод оценки вероятности появления ложнопозитивных результатов (false discovery rate (FDR, Benjamini-Hochberg))[1].

Поиск генов-мишеней осуществляли с использованием алгоритма TarPmiR по базам данных TargetScan,

miRDB и miRTarBase. TarPmiR использует подход на основе метода «случайного леса» для прогнозирования сайта-мишени микроРНК. Random forest (с англ. - «случайный лес») - алгоритм машинного обучения, заключающийся в использовании ансамбля решающих деревьев и сочетающий в себе метод бэггинга Бреймана и метод случайных подпространств. Результатом модели «случайного леса» является предсказанная вероятность того, что целевой сайт-кандидат является истинным целевым сайтом. TarPmiR интегрирует 13 традиционных функций для прогнозирования сайтов-мишеней микроРНК, включая доступность сайтов связывания и термодинамические свойства, такие, например, как свободная энергия [9].

**Анализ избыточной представленности в сигнальных путях (ORA, Over-Representation Analysis).** Этот метод измеряет процент генов (или микроРНК) в сигнальном пути, которые имеют дифференциальную экспрессию. Целью ORA является получение списка наиболее важных сигнальных путей, упорядоченных в соответствии с p-value [19].

**Кластеризация генов-мишеней по функции (алгоритм FMD (Functional module detection)).** Алгоритм основан на методе k-ближайших соседей (k-nearest neighbors algorithm) и алгоритме поиска сообщества Лувена для кластеризации тесно связанных генов в отдельные функциональные модули. Значение Q каждого члена функционального модуля рассчитывается с использованием одностороннего точного

рованы с использованием PARalyzer v1.1. Все координаты сайтов связывания были преобразованы в сборки hg19, mm9/mm10 и ce6/ce10 соответственно с помощью UCSC LiftOver Tool. Геномные координаты консервативных сайтов-мишеней микроРНК, предсказанные TargetScan, miRanda/miRSVR, PITA, Pictar и RNA22, были также собраны и преобразованы в сборки hg19, mm9/mm10 и ce6/ce10 с использованием LiftOver. Полученные координаты сравнивали с ранее описанными кластерами CLIP с использованием BEDTools [21].

**Результаты и обсуждение.** С использованием алгоритма DESeq2 проведен анализ дифференциальной экспрессии обнаруженных микроРНК в опухолевой и нормальной ткани толстой кишки 80 пациентов (рис. 1). Обнаружено 6 дифференциально экспрессирующихся микроРНК: экспрессия двух, hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p, была снижена, а четырех, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-21-5p и hsa-let-7i-5p, повышена в опухолевой ткани по сравнению с нормальной.

Наибольший уровень экспрессии в нормальной ткани обнаружен для hsa-miR-143-3p, наименьший – для hsa-miR-92a-3p, в опухолевой ткани это были соответственно hsa-miR-10b-5p и hsa-miR-25-3p (табл. 1). Самая большая разница в экспрессии микроРНК в опухолевой ткани относительно нормальной зарегистрирована для hsa-miR-92a-3p (7,2 раза,  $p = 0,02$ ), наименьшая – для hsa-miR-26a-5p (3,6 раза,  $p = 0,01$ ) (табл. 1, рис. 1).

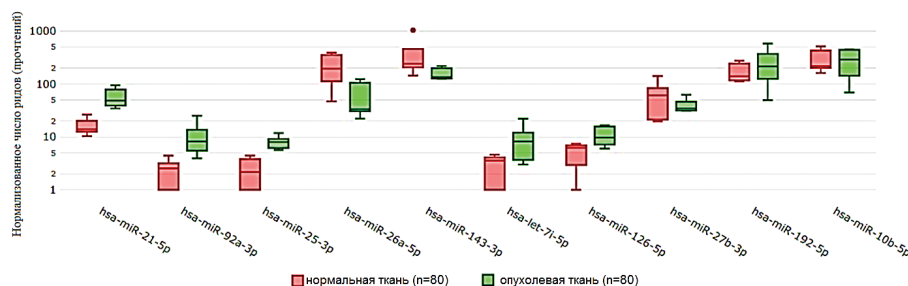


**Рис. 1.** Экспрессия 10 микроРНК с наименьшим показателем FDR (6 значимых микроРНК)

критерия Фишера и поправки Бенджамини - Хохберга для корректировки множественного сравнения [12].

**Анализ взаимодействия микроРНК-lncRNA.** Данные HITS-CLIP, PAR-CLIP и CLASH были получены из базы Gene Expression Omnibus, предварительно обработаны с помощью FASTX-Toolkit v0,0,13 и проанализи-

Для микроРНК, дифференциально экспрессирующихся в опухолях и в нормальной ткани, проведен поиск целевых генов с использованием алгоритма TarPmiR.

Для 6 микроРНК, статистически значимо изменяющих экспрессию в опухолях толстой кишки, предсказано 5360 генов-мишеней, из них валидиро-

Таблица 1

## Экспрессия микроРНК в нормальных и опухолевых тканях

| МикроРНК        | Нормальная ткань | Опухолевая ткань | FC    | log <sub>2</sub> FC | p-value | P <sub>adj</sub> |
|-----------------|------------------|------------------|-------|---------------------|---------|------------------|
| hsa-let-7i-5p*  | 1,83             | 8,20             | 4,481 | 2,164               | 0,02    | 0,04             |
| hsa-miR-10a-5p  | 36,91            | 37,00            | 1,002 | 0,004               | 0,99    | 0,99             |
| hsa-miR-10b-5p  | 301,14           | 283,17           | 0,940 | - 0,089             | 0,87    | 0,96             |
| hsa-miR-126-5p  | 4,02             | 10,09            | 2,510 | 1,328               | 0,03    | 0,05             |
| hsa-miR-143-3p* | 382,87           | 159,01           | 0,415 | - 1,268             | 0,02    | 0,04             |
| hsa-miR-192-5p  | 174,70           | 258,4            | 1,479 | 0,565               | 0,34    | 0,42             |
| hsa-miR-21-5p*  | 15,41            | 57,40            | 3,725 | 1,897               | 0,0     | 0,0              |
| hsa-miR-25-3p*  | 1,44             | 7,05             | 4,896 | 2,292               | 0,01    | 0,02             |
| hsa-miR-26a-5p* | 220,06           | 61,45            | 0,279 | - 1,840             | 0,01    | 0,02             |
| hsa-miR-27b-3p  | 60,77            | 39,16            | 0,644 | - 0,634             | 0,3     | 0,41             |
| hsa-miR-92a-3p* | 1,35             | 9,65             | 7,148 | 2,838               | 0,0     | 0,02             |

Примечание. P<sub>adj</sub> – p-value, скорректированное для множественного сравнения с использованием метода Бенджамини-Хохберга; \* - порог минимального значения экспрессии = 1; FC (fold change) – кратность изменения.

ваны (подтверждены) в базах данных TargetScan, miRDB и miRTarBase взаимодействия микроРНК-мРНК для 116 генов-мишеней, в том числе 97 генов-мишеней с минимальной свободной энергией взаимодействия микроРНК-мРНК (табл. 2).

Применение алгоритма FMD (Functional module detection) к представлен-

ному в табл. 2 списку генов-мишеней позволило выделить 3 функциональных кластера, включающих 65 генов (рис. 2, табл. 3).

Из представленных в табл. 3 и на рис. 2 данных видно, что основными сигнальными путями, в которых задействованы гены-мишени, являются (Q<0,05): регуляция внутриклеточной

передачи сигнала, регуляция клеточной адгезии, дефосфорилирование белка, активация иммунного ответа, регуляция организации плазматической мембраны, регуляция роста клеток, регуляция клеточного ответа на гормоны, клеточного ответа на стресс и регуляция сигнального пути Wnt.

Альтернативным FMD методом оценки значимости дифференциально экспрессирующихся микроРНК является анализ избыточной представленности в сигнальных путях (ORA). Данные, полученные в ходе реализации алгоритма ORA, представлены в табл. 4.

К основным сигнальным каскадам, в которых задействованы микроРНК hsa-miR-143-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-21-5p и hsa-let-7i-5p, можно отнести (p<0,05): регуляцию пролиферации и клеточного цикла, иммунного ответа и ответа на воспаление, взаимодействие с вирусными агентами, регуляцию апоптоза, ответ на гипоксию и регуляцию клеточной миграции.

Анализ возможности взаимодействия 6 дифференциально экспрессирующихся микроРНК с lncRNA выявил следующие микроРНК-lncRNA пары (табл. 5).

Как видно из представленных в табл. 5 данных, пять lncRNA имеют

Таблица 2

## Гены-мишени 6 дифференциально экспрессирующихся микроРНК

| Гиперэкспрессированные микроРНК |                |                |               |                 | Гипоэкспрессированные микроРНК |                |                  |
|---------------------------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|--------------------------------|----------------|------------------|
| hsa-92a-3p                      |                | hsa-let-7i-5p  |               | hsa-miR-25-3p   | hsa-miR-21-5p                  | hsa-miR-26a-5p | hsa-miR-143-3p   |
| Гены-мишени                     |                |                |               |                 |                                |                |                  |
| <i>SPOCK2</i>                   | <i>KLF2</i>    | <i>ZNF644</i>  | <i>PDP2</i>   | <i>GALNT7</i>   | <i>ST6GAL1</i>                 | <i>CHAC1</i>   | <i>ZBTB44</i>    |
| <i>MEF2D</i>                    | <i>OTUD3</i>   | <i>TGFBR3</i>  | <i>NR6A1</i>  | <i>PER2</i>     | <i>KLHL42</i>                  | <i>CDK8</i>    | <i>MAPK7</i>     |
| <i>SNN</i>                      | <i>CPEB4</i>   | <i>SMC1A</i>   | <i>PLAGL2</i> | <i>SRPRA</i>    | <i>PAN3</i>                    | <i>TET2</i>    | <i>SECISBP2L</i> |
| <i>ATXN1</i>                    | <i>GNAQ</i>    | <i>POTEM</i>   | <i>ARID3B</i> | <i>SLX4</i>     | <i>GID4</i>                    | <i>PDE4B</i>   |                  |
| <i>FAR1</i>                     | <i>PHTF2</i>   | <i>AGO1</i>    | <i>SMCR8</i>  | <i>TMEM184B</i> |                                | <i>ZNF608</i>  |                  |
| <i>GLYR1</i>                    | <i>TSC1</i>    | <i>ONECUT2</i> | <i>MBD2</i>   | <i>LHFPL2</i>   |                                | <i>AGPAT5</i>  |                  |
| <i>PTPRJ</i>                    | <i>G3BP2</i>   | <i>BACH1</i>   |               | <i>CPEB4</i>    |                                | <i>ESR1</i>    |                  |
| <i>DAB2IP</i>                   | <i>YIPF4</i>   | <i>CCNT2</i>   |               | <i>EIF4G2</i>   |                                | <i>PIM1</i>    |                  |
| <i>RRBP1</i>                    | <i>ELOVL6</i>  | <i>CBX5</i>    |               | <i>PKDCC</i>    |                                |                |                  |
| <i>EIF4G2</i>                   | <i>GOLGA8J</i> | <i>GRPEL2</i>  |               | <i>C5orf24</i>  |                                |                |                  |
| <i>PLEKHA1</i>                  | <i>UBE2Z</i>   | <i>ADIPOR2</i> |               | <i>FNIP1</i>    |                                |                |                  |
| <i>SPRYD4</i>                   | <i>PPP1R37</i> | <i>RBFOX2</i>  |               | <i>PHLPP2</i>   |                                |                |                  |
| <i>EVI5</i>                     | <i>USP28</i>   | <i>PDE12</i>   |               | <i>SERTAD3</i>  |                                |                |                  |
| <i>PER2</i>                     | <i>KCNC4</i>   | <i>KREMEN1</i> |               |                 |                                |                |                  |
| <i>NOL4L</i>                    | <i>FAM20C</i>  | <i>CRY2</i>    |               |                 |                                |                |                  |
| <i>DNAJB12</i>                  | <i>SOCS5</i>   | <i>SURF4</i>   |               |                 |                                |                |                  |
| <i>TRAM2</i>                    | <i>SLX4</i>    | <i>IGDCC4</i>  |               |                 |                                |                |                  |
| <i>ACTC1</i>                    | <i>MAN2A1</i>  | <i>CEP135</i>  |               |                 |                                |                |                  |
| <i>CREB3L2</i>                  | <i>ATXN7</i>   | <i>SYT1</i>    |               |                 |                                |                |                  |
| <i>SOX4</i>                     | <i>GRAMD1B</i> | <i>USP47</i>   |               |                 |                                |                |                  |
| <i>TECPR2</i>                   | <i>PCMTD1</i>  | <i>SEMA4C</i>  |               |                 |                                |                |                  |

Таблица 3

Функциональные кластеры и сигнальные пути генов-мишеней микроРНК, дифференциально экспрессирующихся при КРР

| Кластер | Функция/сигнальный путь                                                       | Q value* | Число генов | Гены                                     |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------|------------------------------------------|
| M1      | Негативная регуляция сигнального пути протеинкиназы B                         | 0,00056  | 3           | <i>PLEKHA1, PTPRJ, OTUD3</i>             |
|         | Дефосфорилирование белка                                                      | 0,00096  | 4           | <i>TSC1, PDP2, PTPRJ, CRY2</i>           |
|         | Негативная регуляция внутриклеточной передачи сигнала                         | 0,00110  | 5           | <i>PTPRJ, PLEKHA1, TSC1, ESR1, OTUD3</i> |
|         | Положительная регуляция фокальной адгезии                                     | 0,00253  | 2           | <i>TSC1, PTPRJ</i>                       |
|         | Положительная регуляция сборки клеточных соединений                           | 0,00325  | 2           | <i>TSC1, PTPRJ</i>                       |
|         | Положительная регуляция биогенеза клеточных компонентов                       | 0,00422  | 4           | <i>TSC1, ESR1, PTPRJ, CEP135</i>         |
|         | Регуляция активности фосфопроteinфосфатазы                                    | 0,00658  | 2           | <i>CRY2, TSC1</i>                        |
|         | Клеточный ответ на дцРНК                                                      | 0,00914  | 2           | <i>PDE12, ESR1</i>                       |
|         | Сигнальный путь рецепторов клеточной поверхности, активирующий иммунный ответ | 0,01281  | 2           | <i>PLEKHA1, PTPRJ</i>                    |
|         | Регуляция организации плазматической мембраны                                 | 0,02375  | 2           | <i>SYT1, CEP135</i>                      |
|         | Стабилизация белка                                                            | 0,02442  | 2           | <i>TSC1, OTUD3</i>                       |
|         | Передача сигнала, активирующего иммунный ответ                                | 0,02984  | 2           | <i>PLEKHA1, PTPRJ</i>                    |
|         | Регуляция роста клеток                                                        | 0,03313  | 2           | <i>SYT1, PTPRJ</i>                       |
|         | Активация иммунного ответа                                                    | 0,03807  | 2           | <i>PLEKHA1, PTPRJ</i>                    |
|         | Клеточный ответ на гормоны                                                    | 0,05441  | 2           | <i>TSC1, ESR1</i>                        |
|         | Негативная регуляция клеточного цикла                                         | 0,02375  | 2           | <i>SOX4, SMC1A</i>                       |
|         | Организация эндомембранной системы                                            | 0,03258  | 2           | <i>TRAM2, SURF4</i>                      |
|         | Регуляция роста                                                               | 0,03429  | 2           | <i>SERTAD3, PIM1</i>                     |
|         | Клеточный ответ на органическое циклическое соединение                        | 0,04654  | 2           | <i>PIM1, RBFOX2</i>                      |
|         | Метаболизм лекарств                                                           | 0,04814  | 2           | <i>ST6GAL1, KLF2</i>                     |
| M3      | Положительная регуляция роста клеток                                          | 0,00914  | 2           | <i>EIF4G2, USP47</i>                     |
|         | Регуляция канонического сигнального пути Wnt                                  | 0,02083  | 2           | <i>GNAQ, USP47</i>                       |
|         | положительная регуляция активности GTPase                                     | 0,02233  | 2           | <i>GNAQ, EVI5</i>                        |
|         | процесс биосинтеза липидов                                                    | 0,03125  | 2           | <i>FAR1, ELOVL6</i>                      |

\*Q value - P-value, скорректированное с использованием поправки Бенджамини – Хохберга

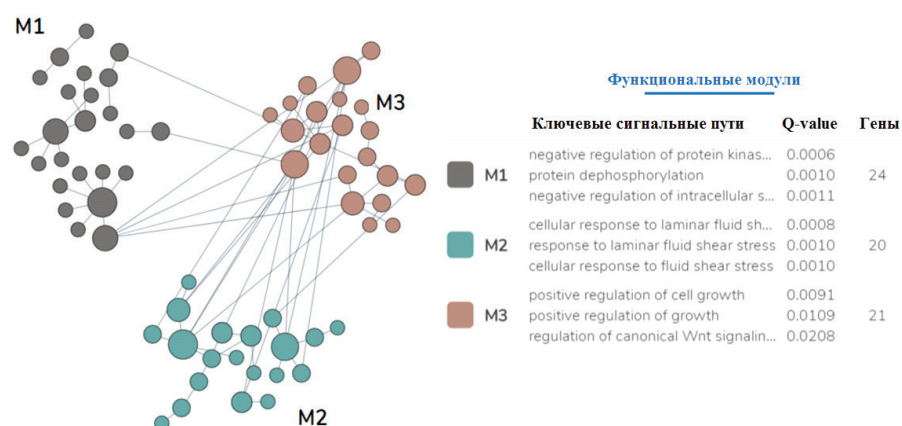


Рис. 2. Функциональные кластеры генов-мишеней 6 дифференциально экспрессирующихся при КРР микроРНК

сайты связывания общие для нескольких микроРНК. Так, например, lncRNA MALAT1 может взаимодействовать с 5 из 6 микроРНК (hsa-miR-143-3p, hsa-

miR-26a-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-21-5p).

Существенный прогресс в молекулярной биологии за последние 10 лет

выявил связь между микроРНК и КРР. Устойчивая дисрегуляция экспрессии микроРНК при КРР приводит к стимуляции онкогенов или опухолевых супрессоров [26].

Разные исследования по секвенированию микроРНК при КРР определили разные специфические профили экспрессии, которые могут быть связаны с клиническими или прогностическими особенностями. Так, Хамффорд и др.[8] идентифицировали 19 гипоксически экспрессируемых и 18 гиперэкспрессируемых микроРНК при КРР. Позже Schee et al.[7] идентифицировали 5 наиболее экспрессируемых микроРНК (hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-143-3p и hsa-miR-192-5p) в 88 образцах КРР, что по количеству идентифицированных микроРНК приближается к нашему исследованию.

Таблица 4

## Результаты анализа избыточной представленности в сигнальных путях (ORA)

| Сигнальный путь                                        | p-value | МикроРНК                                          |
|--------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------------------|
| Регуляция активности nf kappaB                         | 0,017   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Реакция на этанол                                      | 0,017   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Воспалительная реакция                                 | 0,019   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Миграция клеток                                        | 0,020   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Регуляция клеточной пролиферации                       | 0,021   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Передача сигналов, опосредованная фосфатидилинозитом   | 0,023   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Клеточный ответ на гипоксию                            | 0,026   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Сигнальный путь цитокинов                              | 0,027   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Убиквитинирование белков                               | 0,028   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Сигнальный путь рецептора эпидермального фактора роста | 0,030   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Регуляция апоптоза                                     | 0,030   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Иммунный ответ                                         | 0,030   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Контроль клеточного цикла                              | 0,031   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |
| Взаимодействие с вирусом                               | 0,040   | miR-143; miR-26a; miR-25; miR-92a; miR-21; let-7i |

Таблица 5

## Взаимодействия микроРНК-lncRNA

| МикроРНК       | lncRNA     | Геномные координаты       | Выравнивание                                                                                         |
|----------------|------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1              | 2          | 3                         | 4                                                                                                    |
| hsa-let-7i-5p  | XIST       | chrX:73046461-73046481    | LncRNA: 5' agaACCCUAAAC-CCUACCUCu 3'<br>  :     <br>miRNA : 3' uugUCGUGUUUGAUGAUGGAGu 5'             |
|                | NEAT1      | chr11:65205185-65205207   | LncRNA: 5' cugguCUUGGUCUGUCUACCUCg 3'<br> ::: :     <br>miRNA : 3' uugucGUGUUUGAU-GAUGGAGu 5'        |
|                | HELLPAR    | chr12:102625721-102625741 | LncRNA: 5' uuCAGAUCUCAUU-CUACCUCc 3'<br>       :     <br>miRNA : 3' uuGUCGUGUUUGAUGAUGGAGu 5'        |
|                | AP000766.1 | chr11:107185038-107185058 | LncRNA: 5' uuCACUCUAAAU-CUACCUCa 3'<br>  : : :     <br>miRNA : 3' uuGUCGUGUUUGAUGAUGGAGu 5'          |
|                | LINC00265  | chr7:39831428-39831448    | LncRNA: 5' uuaGGCCCAUAC-CCUACCUCa 3'<br>:             <br>miRNA : 3' uugUCGUGUUUGAUGAUGGAGu 5'       |
|                | AC124045.1 | chr3:44710371-44710393    | LncRNA: 5' auUAGCCUGUAAGAU-CUACCUCa 3'<br>:    :  : :     <br>miRNA : 3' uuGUCG--UGUUUGAUGAUGGAGu 5' |
|                | MIRLET7BHG | chr22:46509673-46509694   | LncRNA: 5' gggAGGGCCGCCCCCUACCUCa 3'<br>  : : :     <br>miRNA : 3' uugUCGUGUUUGAUGAUGGAGu 5'         |
|                | OLMALINC   | chr10:102133372-102133384 | LncRNA: 5' -----cuCUCCUACCUCa 3'<br>        <br>miRNA : 3' uugucguguuuGAUGAUGGAGu 5'                 |
| hsa-miR-143-3p | HELLPAR    | chr12:102714596-102714616 | LncRNA: 5' agggcaaccuaUUCAUCUCa 3'<br>     <br>miRNA : 3' cucgaugucacgAAGUAGAGu 5'                   |
|                | MALAT1     | chr11:65269208-65269229   | LncRNA: 5' ugGUUCAUAUUCAGUCAUCUCa 3'<br>: : : :     <br>miRNA : 3' cuCGA-UGUCACGAAGUAGAGu 5'         |

Продолжение табл. 5

## Взаимодействия микроРНК-lncRNA

| 1              | 2          | 3                         | 4                                                                                  |
|----------------|------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
|                | AC245884.8 | chr19:54950318-54950338   | LncRNA: 5' ucauguCUGUAAGUCAUCUCc 3'<br>miRNA : 3' cucgauGUCACGAAGUAGAGu 5'         |
|                | MEOX2-AS1  | chr7:15734898-15734919    | LncRNA: 5' gcGUUGUGAAUCAGUCAUCUCa 3'<br>miRNA : 3' cuCGAUG-UCACGAAGUAGAGu 5'       |
|                | MEG3       | chr14:101315825-101315845 | LncRNA: 5' augggAUUGUCAUUCACUCa 3'<br>miRNA : 3' cucgaUGUCACGAAGUAGAGu 5'          |
| hsa-miR-26a-5p | TUG1       | chr22:31371700-31371719   | LncRNA: 5' augCUCUACUGG--UACUUGAa 3'<br>miRNA : 3' ucgGAUAGGACCUGAAUGAACUu 5'      |
|                | NORAD      | chr20:34637129-34637150   | LncRNA: 5' acaaaauaacuccUUACUUGAa 3'<br>miRNA : 3' ucggauaggaccuAAUGAACUu 5'       |
|                | HCG11      | chr6:26523678-26523694    | LncRNA: 5' -----uuaacuccUUACUUGAa 3'<br>miRNA : 3' ucggauaggaccuAAUGAACUu 5'       |
|                | MALAT1     | chr11:65268969-65268990   | LncRNA: 5' aaCUUGUUAUUUUUACUUGAa 3'<br>miRNA : 3' ucGGAUAGGACCUGAAUGAACUu 5'       |
|                | WASIR2     | chr16:75102-75123         | LncRNA: 5' uuauaccuauuuuuUUACUUGAa 3'<br>miRNA : 3' ucggauaggaccUAAUGAACUu 5'      |
|                | AC005332.6 | chr17:66132006-66132023   | LncRNA: 5' acaUUAUCU---UUACUUGAg 3'<br>miRNA : 3' ucgGAUAGGACCUGAAUGAACUu 5'       |
|                | AC005332.7 | chr17:66125163-66125184   | LncRNA: 5' uucuggauaaacAUUACUUGAg 3'<br>miRNA : 3' ucggauaggaccUAAUGAACUu 5'       |
|                | EBLN3P     | chr9:37087347-37087368    | LncRNA: 5' uccagggaagagcUACUUGAc 3'<br>miRNA : 3' ucggauaggaccuaAUGAACUu 5'        |
| hsa-miR-25-3p  | NORAD      | chr20:34636526-34636547   | LncRNA: 5' ccuuguuAUGUGUGUGCAAUu 3'<br>miRNA : 3' agucuggcUCUGUUCACGUUAc 5'        |
|                | XIST       | chrX:73063643-73063665    | LncRNA: 5' uuGGACUGUUAUAUGUGCAAUu 3'<br>miRNA : 3' agUCUGGC-UCUGUUCACGUUAc 5'      |
|                | MALAT1     | chr11:65268090-65268110   | LncRNA: 5' caGGAAGGAG-CGAGUGCAAUu 3'<br>miRNA : 3' agUCUGGCUCUGUUCACGUUAc 5'       |
|                | PURPL      | chr5:27494380-27494405    | LncRNA: 5' gaAGACCUGAUUUUAUGUGCAAUa 3'<br>miRNA : 3' agUCUGG-CU--CU-GUUCACGUUAc 5' |
| hsa-miR-92a-3p | OIP5-AS1   | chr15:41592688-41592709   | LncRNA: 5' uaaaaCCGGGAUAUGUGCAAUa 3'<br>miRNA : 3' uguccGGCCUGUUCACGUUAu 5'        |
|                | NORAD      | chr20:34636526-34636547   | LncRNA: 5' ccuuguuauuguguGUGCAAUu 3'<br>miRNA : 3' uguccggccuguuCAGGUUAu 5'        |
|                | XIST       | chrX:73063643-73063664    | LncRNA: 5' uggacuguuAUAUGUGCAAUu 3'<br>miRNA : 3' uguccggcccUGUUCACGUUAu 5'        |
|                | MALAT1     | chr11:65268089-65268110   | LncRNA: 5' ccAGGAAGGAGCGAGUGCAAUu 3'<br>miRNA : 3' ugUCCGGCCUGUUCACGUUAu 5'        |

Окончание табл. 5

| 1             | 2      | 3                       | 4                                                                               |
|---------------|--------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
|               | SNHG14 | chr15:25364949-25364970 | LncRNA: 5' agcaccaauuuuGUGCAAUg 3'<br>miRNA : 3' uguccggcccuguuCACGUUAu 5'      |
| hsa-miR-21-5p | TUG1   | chr22:31372028-31372048 | LncRNA: 5' gauAAAUGAG-CUAAUAAGCUu 3'<br>miRNA : 3' aguUGUAGUCAGACUAUUCGAu 5'    |
|               | XIST   | chrX:73043927-73043947  | LncRNA: 5' cugcCACCCAUAU-AUAAGCUa 3'<br>miRNA : 3' aguuGUAGUCAGACUAUUCGAu 5'    |
|               | MALAT1 | chr11:65266342-65266365 | LncRNA: 5' uuuGCAUUCAAGUCCAUAAGCUg 3'<br>miRNA : 3' aguUGUAG--UCAGACUAUUCGAu 5' |
|               | FAM66E | chr8:7841811-7841833    | LncRNA: 5' acuugAUUGUGGUGGAUAAGCUu 3'<br>miRNA : 3' aguugUAGU-CAGACUAUUCGAu 5'  |

В нашем исследовании экспрессия 2 микроРНК (miR-143-3p и miR-26a-5p) была снижена, а 4 (miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-21-5p и let-7i-5p) повышена в опухолевой ткани по сравнению с нормальной. Полученные результаты находят подтверждение в работах других авторов. Так, miR-143-3p является частью кластера, связанного с онкогенами, генами-репарации ДНК и генами, регулирующими сигнальные пути WNT и MAPK. В работе Tokarz P. и Blasiak J. [28] показано, что hsa-miR-143-3p в клетках KPP снижает экспрессию ДНК-метилтрансферазы 3A (DNMT3A) и изменяет фенотип злокачественной трансформации, а также hsa-miR-143-3p является негативным прогностическим фактором для выживаемости у пациентов с KPP. Hernández R. и соавт. показано, что гиперэкспрессия miR-21 приводит к возникновению опухоли, увеличивая инвазию и метастазирование [10]. Ранее Лю и соавт. [23], проанализировав концентрации miR-21 и miR-92a в сыворотке пациентов с KPP, обнаружили более высокие уровни этих микроРНК по сравнению со здоровыми субъектами. При KPP экспрессия miR-92a значительно повышена в тканях, что приводит к снижению E-кадгерина и повышению уровня β-катенина и виментина, участвующих в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода [18]. В опухолях толстой кишки let-7 подавляет KRAS, и её экспрессия связана с лучшими результатами выживания пациентов [4].

Таким образом, исследованные микроРНК можно разделить на онкогенные и онкосупрессивные. Онкогенные микроРНК в основном нацелены и ингибируют экспрессию генов-супрессоров. Активация этих микроРНК ока-

зывает значительное влияние на прогрессирование KPP (например, miR-21 и miR-92a). Однако ряд микроРНК (онкосупрессивные микроРНК) играет важную роль в замедлении прогрессирования опухоли посредством подавления онкогенов, связанных с пролиферацией, апоптозом, инвазией и миграцией (например, miR-143 и let-7i).

Рассмотрим подробнее один из выявленных нами функциональных кластеров (M3) и влияние на него 5 микроРНК (рис. 3). Гиперэкспрессия miR-92a-3p может приводить к подавлению экспрессии генов *FAR1*, *EVI5*, *MAN2A1*, *PCMTD1*, *GNAQ*, *PHTF2* и *ELOVL6*. В свою очередь подавление экспрессии генов *FAR1* и *ELOVL6* (*Fatty Acid Elongase 6*) может привести к изменению липидного состава мембран клеток и нарушению нормальной презентации клеточных антигенов, что важно для маскировки опухолевых клеток от иммунной системы [3]. Подавление генов *PHTF2* (Putative Homeodomain Transcription Factor 2) и *EVI5* (*Ecotropic Viral Integration Site 5*) приводит к нарушению регуляции клеточного цикла и транскрипции широкого спектра генов, а гена *GNAQ* (G Protein Subunit Alpha Q) - к нарушению регуляции хемотаксиса дендритных клеток (по данным <https://www.genecards.org>).

В то же время гипоекспрессия miR-26a-5p может приводить к увеличению экспрессии генов *CDK8*, *TET2* и *AGPAT5* (рис. 3). Увеличение экспрессии *TET2* приводит к изменению эпигенетической регуляции экспрессии генов при клеточной дифференцировке [22], а гена *AGPAT5* - способствует изменению представленности опухолевых антигенов на поверхности клеток. *CDK8* может оказывать активирующее влияние на функцию факторов транскрипции [27] и выступать в качестве онкогена при KPP, вызывая гиперактивацию сигнального пути Wnt [5]. Таким образом, изменение экспрессии этих микроРНК при KPP может способствовать эпителиально-мезенхимальному переходу и маскировке опухолевых клеток от иммунной системы, что подтверждается и в других работах [10].

Однако очевидно, что данных о

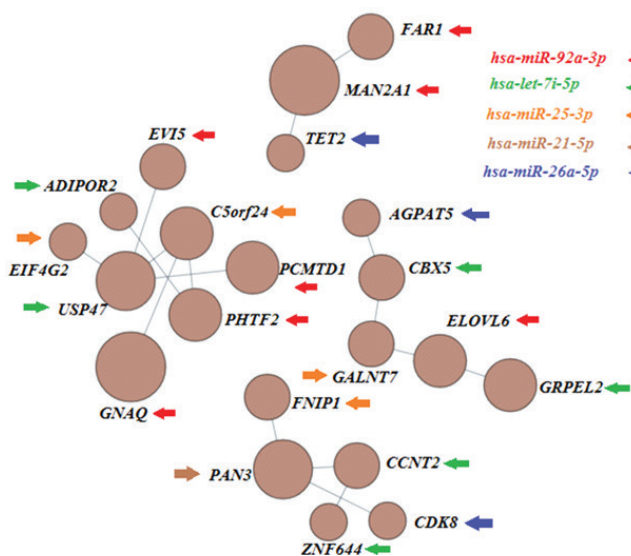


Рис. 3. Функциональный кластер M3, состоящий из 21 гена-мишени 5 дифференциально экспрессирующихся при KPP микроРНК

взаимодействии микроРНК-мРНК недостаточно для полного понимания механизмов канцерогенеза. В последние годы получены данные о сложных регуляторных взаимодействиях (путем конкурентного связывания) между lncRNA, микроРНК и геном-мишенью у больных КРР [15, 25].

В проведенном нами исследовании 6 lncRNA взаимодействуют с более чем одной из дифференциально экспрессирующихся микроРНК. Одна из этих lncRNA - MALAT1 (имеет сайты связывания с miR-143-3p, miR-26a-5p, miR-25-3p, miR-92a-3p и miR-21-5p) представляет собой длинную сплайсированную некодирующую РНК, которая участвует в эпигенетической модуляции экспрессии генов ассоциированных с миграцией клеток и тесно связана с развитием рака [16]. XIST (имеет сайты связывания с let-7i-5p, miR-25-3p, miR-92a-3p и miR-21-5p) является ключевым эффектором в инактивации X-хромосомы, тем самым обеспечивает дозовое равенство (т. е. количество активных вариантов одного гена) [11]. NORAD (имеет сайты связывания с miR-26a-5p, miR-25-3p и miR-92a-3p) ассоциирована с такими онкологическими заболеваниями, как рак поджелудочной железы и мочевого пузыря [14]. HELLP (взаимодействующая с let-7i-5p и miR-143-3p) активирует большой набор генов, которые участвуют в клеточном цикле и регулируют инвазивную способность клеток [13]. А TUG1 (взаимодействующая с miR-26a-5p и miR-21-5p) играет важную роль в эпигенетической регуляции транскрипции, способствует пролиферации клеток [25].

В настоящее время роль кэРНК-сети (сети конкурентно экспрессирующихся РНК), состоящей из микроРНК (miR-143-3p, miR-26a-5p, miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-21-5p и let-7i-5p), длинных некодирующих РНК (табл. 5) и матричных РНК (табл. 2), в развитии КРР остается до конца неясной. Но данные, полученные в ходе биоинформатического анализа, могут стать основой дальнейших исследований сложной регуляторной сети мРНК-lncRNA-микроРНК для лучшего понимания механизмов канцерогенеза и идентификации новых биомаркеров КРР.

**Заключение.** Таким образом, в результате множественного параллельного секвенирования обнаружено 6 дифференциально экспрессирующихся микроРНК (hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-let-7i-

5p) в опухолевой ткани толстой кишки относительно нормальной. Для этих микроРНК определены 97 генов-мишеней, относящихся к 3 функциональным кластерам, и 23 потенциально взаимодействующих с ними длинных некодирующих РНК. Вместе они составляют сеть конкурентно экспрессирующихся РНК (кэРНК-сеть), характерную для КРР, участвующую в реализации таких сигнальных каскадов, как регуляция клеточной адгезии, активация иммунного ответа, регуляция клеточного ответа на гормоны и стресс, регуляция сигнального пути Wnt и клеточной миграции, регуляция пролиферации и клеточного цикла, регуляция взаимодействия с вирусными агентами, регуляция апоптоза и ответа на гипоксию. Полученные данные расширяют представления о механизмах регуляции генов в условиях данной онкопатологии и могут стать основой для разработки панели онкомаркеров.

**Конфликт интересов и вклад авторов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Новикова И.А.: разработка концепции исследования, написание текста статьи (разделы введение и обсуждение), получение и первичная обработка биологического материала.

Тимошкина Н.Н.: подготовка библиотек и проведение множественного параллельного секвенирования микроРНК

Кутилин Д.С.: разработка концепции исследования, написание текста статьи (разделы введение, материалы и методы, результаты, обсуждение и заключение), проведение статистического/биоинформационного анализа.

## Литература

- Кутилин Д.С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком / Д.С. Кутилин // Молекулярная биология. 2020; 54(4):580-595.
- Kutulin D.S. Regulation of gene expression of testicular cancer antigens in patients with colorectal cancer. Molecular biology. 2020; 54(4):580-595 (in Russ).
- МикроРНК как маркеры прогрессирования предраковых заболеваний в рак шейки матки / Т.А. Димитриади, Д.В. Бурцев, Е.А. Дженкова, Д.С. Кутилин // Современные проблемы науки и образования. 2020; 1. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29529> (дата обращения: 04.03.2020)
- MicroRNA as markers of pre-cancer diseases progression in cervical cancer/ Dimitriadi T.A., Burtsev D.V., Dzenkova E.A., Kutulin D.S. // Modern problems of science and education. 2020; 1. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29529> (in Russ)
- Терапевтическая роль полиненасыщен-

ных жирных кислот и их производных в патофизиологических процессах / Н.В. Гроза, А.Б. Голованов, Е.А. Наливайко, Г.И. Мягкова // Вестник МИТХТ. – 2012. – Т. 7, №5. – С.3-16.

Therapeutic role of polyunsaturated fatty acids and of their derivatives in pathophysiological processes/ Groza N.V., Golovanov A.B., Nalivayko E.A., Myagkova G.I. // Vestnik MITHT. 2012; 7(5):3-16 (in Russ).

4. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in KRAS predicts improved outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with salvage cetuximab/panitumumab monotherapy / Saridaki Z., Weidhaas J.B., Lenz H.J. [et al.] // Clin. Cancer Res. 2014;20:4499-4510.

5. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity / Firestein R., Bass A.J., Kim S.Y. [et al.] // Nature. 2008; 455 (7212): 547-51.

6. Colorectal cancer outcomes and treatment patterns in patients too young for average-risk screening / Abdelsattar Z.M., Wong S.L., Regenbogen S.E. [et al.] // Cancer. 2016; 122: 929-934.

7. Deep sequencing the microRNA transcriptome in colorectal cancer/ Schee K., Lorenz S., Worren M.M. [et al.] // PLoS One. 2013; 8:e66165.

8. Differential expression of miRNAs in colorectal cancer: comparison of paired tumor tissue and adjacent normal mucosa using high-throughput sequencing / Hamford J., Stangeland A.M., Hughes T. [et al.] // PLoS One. 2012; 7:e34150.

9. Ding J., Li X., Hu H. TarPmiR: a new approach for microRNA target site prediction. Bioinformatics. 2016; 32(18):2768-75.

10. Downregulated microRNAs in the colorectal cancer: diagnostic and therapeutic perspectives/ Hernández R., Sánchez-Jiménez E., Melguizo C. [et al.] // BMB Rep. 2018; 51(11):563-571.

11. Evidence of Xist RNA-independent initiation of mouse imprinted X-chromosome inactivation/ Kalantry S., Purushothaman S., Bowen R. B. [et al.] // Nature. 2009; 460(7255):647-651.

12. Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder/ Krishnan A., Zhang R., Yao V. [et al.] // Nature Neuroscience. 2016; 19(11):1454-1462.

13. HELLP babies link a novel lincRNA to the trophoblast cell cycle/ van Dijk M., Thulluru H.K., Mulders J. [et al.] // Clin Invest. 2012;122(11):4003-11.

14. LINC00657 promotes the development of colon cancer by activating PI3K/AKT pathway/ Lei Y., Wang Y.H., Wang X.F., Bai J. // Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018; 22(19):6315-6323.

15. Long noncoding RNA HEIH promotes colorectal cancer tumorigenesis via counteracting mir-939mediated transcriptional repression of Bcl-Xl / Cui C., Zhai D., Cai L. [et al.] // Cancer Res. Treat. 2018; 50: 992-1008.

16. MALAT1 long non-coding RNA in cancer/ Yoshimoto R., Mayeda A., Yoshida M., Nakagawa S. // Biochimica et Biophysica Acta. 2016; 1859 (1):192-199.

17. Microarray analysis of colorectal cancer stromal tissue reveals upregulation of two oncogenic miRNA clusters/ Nishida N., Nagahara M., Sato T. [et al.] // Clin. Cancer Res. 2012; 18:3054-3070.

18. MicroRNA-92a functions as an oncogene in colorectal cancer by targeting PTEN/ Zhang G., Zhou H., Xiao H. [et al.] // Dig. Dis. Sci. 2014; 59:98-107.

19. miEAA: microRNA enrichment analysis and annotation/ Backes C., Khaleeq Q.T., Meese E., Keller A. // Nucleic Acids Res. 2016; 44(W1):W110-6.

20. Noncoding RNAs in the development,

diagnosis, and prognosis of colorectal cancer/ Weng M., Wu D., Yang C. [et al.] // Transl. Res. 2017; 181:108-120.

21. Quinlan A.R., Hall I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features, Bioinformatics. 2010; 26: 841-842.

22. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification / Ito S., D'Alessio A.C., Taranova O.V. [et al.] // Nature. 2010; 466(7310):1129-1133

23. Serum miR-21 and miR-92a as biomarkers in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer/ Liu G.H., Zhou Z.G., Chen R. [et al.]// Tumour Biol. 2013; 34:2175-2181.

24. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics. CAA Cancer J. Clin. 2019; 69: 7-34.

25. Tang X.J., Wang W., Hann S.S. Interactions among lncRNAs, miRNAs and mRNA in colorectal cancer // Biochimie. 2019;163:58-72.

26. The Dual Role of MicroRNAs in Colorectal

Cancer Progression / Ding L., Lan Z., Xiong X. [et al.] //Int. J. Mol. Sci. 2018; 19(9):2791.

27. The two faces of Cdk8, a positive/negative regulator of transcription / Nemet J., Jelicic B., Rubelj I., Sopta M.// Biochimie. 2014; 97: 22-7.

28. Tokarz P., Blasiak J. The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment // Acta Biochim Pol. 2012; 59:467-474.

М.П. Кириллина, И.В. Кононова, С.И. Софронова,  
П.М. Иванов

## ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

DOI 10.25789/YMJ.2020.72.20

УДК 618.146-006.6:578.825

Методом жидкостной цитологии проведено исследование цитологических образцов 100 женщин в возрасте от 23 до 60 лет, отмечено преобладание в образцах NILM по сравнению с интраэпителиальными поражениями шейки матки. Среди интраэпителиальных поражений значительно чаще встречались низкой степени - LSIL. Положительные тесты на ВПЧ наблюдались менее чем у половины женщин, которым был проведен тест. Среди положительных тестов на ВПЧ в преобладающем количестве были тесты высокого онкогенного риска, наиболее часто отмечены ВПЧ 16 и 51 типа. Позитивность теста на ВПЧ высокого онкогенного риска у женщин с NILM и с интраэпителиальными поражениями (LSIL, HSIL, ASCUS) примерно равна. Позитивность теста на ВПЧ высокого онкогенного риска зависит от возраста - у женщин до 45 лет этот показатель выше, чем у женщин 46 лет и старше.

Исследование показало необходимость применения методов комплексной диагностики при проведении цитологического исследования. Совместное применение жидкостной цитологии и ВПЧ-тестирования позволяет повысить эффективность диагностики за счет снижения количества малоинформативного материала и выявлять патологические изменения на более ранних стадиях. Это значительно повысит ценность проводимых диагностических мероприятий, позволит расширить возможности врача-цитолога при постановке диагноза и выдаче рекомендаций в клинической практике патологий шейки матки.

**Ключевые слова:** вирус папилломы человека, рак шейки матки, диагностика, жидкостная цитология.

The analysis of cytological samples of 100 women aged 23 to 60 years was carried out by liquid-based cytology. The predominance of NILM in the samples in comparison with intraepithelial lesions of the cervix was noted. Among intraepithelial lesions, low-grade LSIL was significantly more common. Positive HPV tests were found in less than half of the cases in tested women. Among the positive tests of high oncogenic risk the types 16 and 51 were considered as high-risk HPV types. There is approximately equal positivity of the high-risk HPV test in women with NILM and intraepithelial lesions (LSIL, HSIL, ASCUS). The positivity of the high-risk HPV test depends on age: in women under 45 years this indicator is higher than in women 46 years and older.

According to our survey, with cytological study it is necessary to apply integrated test approach when screening high-risk HPV infection. The combined use of liquid-based cytology and HPV testing can improve the effectiveness of diagnostics by reducing the amount of uninformative material and allows to detect pathological changes at an earlier stage. It will significantly increase the value of diagnostic measures and will improve cytologist's experience in diagnosing and giving recommendations in clinical practice of cervical pathologies.

**Keywords:** human papillomavirus, cervical cancer, diagnostics, liquid-based cytology.

Рак шейки матки (РШМ) находится на 2-м месте среди злокачественных новообразований женских репродуктивных органов и на 4-м - в структуре онкологической заболеваемости женского населения, составляя около 12% злокачественных опухолей у женщин и 60–80% всех форм рака гениталий [7, 21]. Ежегодно в мире выявляется 440 тыс. новых случаев РШМ, что составляет 5,8% от общей частоты

заболеваемости раком [4]. Эпидемиологические и молекулярно-биологические данные указывают на важную роль вируса папилломы человека (ВПЧ) в возникновении цервикальных интраэпителиальных неоплазий (CIN) и рака шейки матки [5]. Так, в 70-х гг. в качестве канцерогенного агента подозревали вирус простого герпеса 2-го серотипа (HSV-2), однако 20-летний опыт исследования роли этого вируса не позволил прийти к позитивному заключению [1]. Этот вирус, возможно в ассоциации с цитомегаловирусом, бактериями и простейшими, может выступать в качестве кофактора канцерогенеза, инициируя развитие дисплазии и поддерживая ее в состоянии стабилизации. В многочисленных работах, опубликованных в 1980-1990 гг., показана связь вируса папилломы человека с дисплазией и плоскоклеточ-

ным раком шейки матки. С помощью методов гибридизации было показано, что от 80 до 100% раков шейки матки содержат ДНК ВПЧ. Была выявлена грубая корреляция между частотой РШМ и выявляемостью ВПЧ в популяции; так, в странах с высокой частотой РШМ выявляемость ВПЧ-инфекции была в пределах 10-20%, тогда как в странах с низкой частотой – 5-10% [10].

Особенности этиопатогенеза плоскоклеточного рака дистальных отделов женских гениталий определяются экзогенными факторами, среди которых важное место занимает вирусная инфекция. Возникновению инфекции способствует снижение защитных сил организма после перенесенных инфекционных заболеваний, курение, алкоголь, молодой возраст, эндометриоз, большое число половых пар-

Якутский научный центр комплексных медицинских проблем: **КИРИЛЛИНА Мария Петровна** – к.б.н., в.н.с.-руковод. лаб.; зав. лаб. Клиники СВФУ им. М.К. Аммосова, kirillinaamp@mail.ru, **КОНОНОВА Ирина Васильевна** – к.м.н., н.с., **СОФРОНОВА Саргылана Ивановна** – к.м.н., гл.н.с.-руковод. отдела, **ИВАНОВ Петр Михайлович** – д.м.н., с.н.с.; проф. МИ СВФУ им. М.К. Аммосова.