



Оригинальная статья

Оценка профиля микроРНК в цервикальном эпителии для прогнозирования развития рецидивов рака шейки матки

Максимов А.Ю.¹ • Тимошкова М.Ю.¹ • Вереникина Е.В.¹ • Лукбанова Е.А.¹ • Кечерюкова М.М.²

Обоснование. Для прогноза развития рецидивов рака шейки матки (РШМ) мы выбрали 3 онкоассоциированных микроРНК: микроРНК-20а, -21, гиперэкспрессия которых приводит к развитию опухолей, и -23b, выполняющую роль онкосупрессора.

Цель – оценка профиля микроРНК в цервикальном эпителии для прогнозирования развития рецидивов РШМ у пациенток, ранее получавших лечение.

Материал и методы. В ходе исследования информативности экспрессии микроРНК были обследованы 145 пациенток с диагнозом РШМ на стадиях T1a1–T2a1N0M0, которых наблюдали в течение 2 лет после проведенного лечения. При этом анализировали уровень экспрессии микроРНК-20а, -21 и -23b в опухолевых операционных образцах ткани.

Результаты. Установлена вероятность рецидивов, которая в первый год наблюдения после операции снизилась с 1,0 до 0,92, а за 2 года – до 0,84. Исходный уровень экспрессии микроРНК-20а и -21 в эпителии шейки матки

у пациенток с рецидивами РШМ был выше на 44 и 47% соответственно, а микроРНК-23b – ниже на 46% по сравнению с безрецидивным течением заболевания. При начальном уровне экспрессии микроРНК-20а и -21, равном 1,08 и 1,18 соответственно, шансы повышения риска развития рецидива РШМ в первые 2 года после операции возрастали в 10,15 и 7,62 раза соответственно. Установлено, что при уровне экспрессии микроРНК-20а в цервикальном эпителии, равном 1,08, риск будет составлять 23%, а при значении 1,4 – 79,7%. При уровне экспрессии микроРНК-21, составляющем 1,18, риск развития рецидива РШМ равен 15%, при значении 1,4 – 55,5%, при значении 1,7 – 94,6%. Метод логит-регрессии позволил определить, что риск развития рецидивов резко повышается при понижении экспрессии микроРНК-23b.

Заключение. В результате проведенного нами исследования были отмечены более высокие уровни экспрессии микроРНК-20а и -21 и более низкий уровень экспрессии микроРНК-23b у больных с рецидивами РШМ по сравнению

с пациентками с благоприятным течением заболевания. Анализ экспрессионного статуса микроРНК-20а, -21, -23b после поставленного диагноза РШМ позволяет прогнозировать риски возникновения рецидивов в течение 2 лет с момента проведенной операции по удалению злокачественного новообразования.

Ключевые слова: микроРНК-20а, микроРНК-21, микроРНК-23b, экспрессия, рак шейки матки, рецидив

Для цитирования: Максимов АЮ, Тимошкова МЮ, Вереникина ЕВ, Лукбанова ЕА, Кечерюкова ММ. Оценка профиля микроРНК в цервикальном эпителии для прогнозирования развития рецидивов рака шейки матки. Альманах клинической медицины. 2020;48(5):333–40. doi: 10.18786/2072-0505-2020-48-054.

Поступила 30.09.2020; принята к публикации 17.10.2020; опубликована онлайн 30.10.2020

Введение

Сегодня рак шейки матки (РШМ) представляет собой одно из самых распространенных злокачественных новообразований, занимая 5-е место в общей структуре онкопатологий. В 2018 г. в мире было зарегистрировано 569 847 случаев РШМ (3,2% от числа всех злокачественных новообразований), умерли 311 365 человек (3,2% от числа всех смертей от злокачественных новообразований) [1]. В России заболеваемость РШМ в последние годы неуклонно растет. В структуре смертности женского населения страны он занимает 10-е место (4,8%) [2].

Для РШМ характерен длительный период развития, составляющий 10–15 лет от момента

обнаружения предшествующих цервикальных интраэпителиальных неоплазий 1-й степени (CIN I) до выявления злокачественного новообразования [3]. Такая длительность развития патологического процесса во многих случаях способствует предотвращению появления РШМ благодаря своевременному применению диагностических приемов и профилактических мероприятий. Выявление данного заболевания в преклинической фазе позволяет относительно быстро и эффективно излечивать больных более щадящими методами, а также существенно снизить количество случаев инвалидизации и смерти больных [3].



В настоящее время проходят испытания диагностические методы, основанные на определении молекулярных маркеров (антиген MN, Msm5, Cdc6, P16INK4A), связанном с использованием жидкостной цитологии [4]. Вероятно, такие методы могут найти практическое применение при уточняющей цитологической диагностике уже выявленных больных.

Диагностическими маркерами могут выступать микроРНК, которые относятся к некодирующим РНК и участвуют в регуляции таких процессов в клетке, как дифференцировка, рост и апоптоз [5]. Исследование отдельных микроРНК в качестве регуляторов экспрессии генов, задействованных в механизмах онкогенеза, может представлять большую диагностическую ценность и, как следствие, терапевтическую значимость. Если сравнивать микроРНК и протеины с точки зрения их диагностической ценности, то первые обладают намного более высокой степенью чувствительности, достигаемой благодаря qRT-ПЦР [6–8]. Помимо этого, микроРНК характеризуются повышенной устойчивостью в биологических жидкостях по сравнению с матричной РНК: они оказываются неподверженными действию рибонуклеаз в жидкостях организма, что возможно благодаря их транспортным формам, представленным экзосомами и липосомами [9, 10].

В здоровой и онкотрансформированной клетке профили микроРНК зачастую различны [5, 11]. При этом далеко не все профили микроРНК для ткани либо клетки неповторимы. При этом наиболее выигрышным можно назвать исследование микроРНК, специфичных не для конкретной ткани, а для определенной патологии. Большая ценность таких биомаркеров, как микроРНК, заключается в их способности быть предикторами патологий задолго до обнаружения первых симптомов. Наиболее значимо эта особенность проявляется в области онкологии, когда жизненно важно начать профилактику и лечение онкопатологии как можно раньше [11]. На основании данных литературы нами были выбраны три онкоассоциированных микроРНК: микроРНК-20а, -21 и -23b [12, 13].

Целью настоящей работы стала оценка уровня экспрессии микроРНК-20а, -21 и -23b в цервикальном эпителии для прогнозирования развития рецидивов РШМ у пациенток, ранее получавших лечение.

Максимов Алексей Юрьевич – д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора по перспективному научному развитию; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1397-837X>.
Тел.: +7 (863) 200 10 00; +7 (863) 300 02 00.
E-mail: onko-sekretar@mail.ru

Тимошкова Мария Юрьевна – врач-онколог, мл. науч. сотр. испытательного лабораторного центра; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1484-0580>.
Тел.: +7 (960) 489 80 80.
E-mail: m-timoshkova@yandex.ru

Вереникина Екатерина Владимировна – канд. мед. наук, заведующая отделением онкогинекологии; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1084-5176>.
Тел.: +7 (863) 300 02 00, доб. 380. E-mail: ekat.veren@yandex.ru

Лукбанова Екатерина Алексеевна – врач-биолог, науч. сотр. испытательного лабораторного центра; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3036-6199>
✉ 346783, Ростовская область, г. Азов, ул. Азовская, 163, Российская Федерация.
Тел.: +7 (928) 191 45 99.
E-mail: katya.samarskaja@yandex.ru

Кечерюкова Мадина Мажитовна – аспирант²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6131-8560>.
Тел.: +7 (928) 606 37 63.
E-mail: adele09161@mail.ru

Материал и методы

Общая характеристика клинического исследования

Базой для проведения исследования было отделение онкогинекологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. В ходе исследования информативности экспрессии микроРНК были обследованы 145 пациенток с диагнозом РШМ на стадиях T1a1–T2a1N0M0. Больных наблюдали в течение 2 лет после проведенного комплексного лечения по поводу РШМ. Для диагностики заболевания применяли клинические, цитологические методы, включающие жидкостную цитологию, а также гистологические методы, методы визуальной диагностики, генетические методы по определению экспрессии микроРНК (микроРНК-20а, микроРНК-21, микроРНК-23b).

Оценка экспрессии микроРНК

В своей работе мы анализировали уровень экспрессии микроРНК-20а, микроРНК-21, микроРНК-23b в цервикальном эпителии опухолевых операционных образцов ткани. Биоматериал отбирали во время операции и замораживали для дальнейшего хранения при температуре -70 °С. Тотальную микроРНК выделяли с помощью набора реагентов PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) по протоколу от производителя. Проверку качества выделенной РНК проводили с использованием гель-электрофореза в 1,8% агарозном геле. Библиотеку комплементарной ДНК получали с помощью реакции обратной транскрипции с использованием набора ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega). Транскрипционный уровень микроРНК определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на амплификаторе DTrprime («ДНК-технология», Россия) в 25 мкл ПЦР-смеси с красителем EvaGreen DYE (Biotium) и соответствующими праймерами TaqMan (Applied Biosystems): hsa-miR-20a, hsa-miR-21, hsa-miR-23b. Референсными локусами служили микроРНК U6 snRNA (Applied Biosystems). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали термоциклер Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) и специализированное программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager v2.1. Относительный уровень экспрессии микроРНК в опухолевом образце был нормализован к условно здоровой ткани методом ddCt [14]. Уровень экспрессии микроРНК (RE) был рассчитан по методу M.W. Pfaffl [15].

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; 344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; 344022, г. Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29, Российская Федерация



Статистический анализ результатов

При статистическом анализе использовали методы описательной статистики. Были рассчитаны средние арифметические значения (M), стандартные ошибки среднего (m), медианы (Me), стандартные отклонения (SD), коэффициенты вариации (CV, %). Для сравнения уровней экспрессии микроРНК в двух группах применяли критерий Манна – Уитни. При проверке гипотез нулевые гипотезы отвергали при уровне значимости (p) менее 0,05. При сравнении частот встречаемости показателей в группах использовали критерий хи-квадрат. Анализ безрецидивной выживаемости проводили с помощью построения кривых Каплана – Мейера и регрессионной модели Кокса. При сравнении уровня экспрессии микроРНК-20а, -21 и -23b у больных с рецидивами и без них с целью исключения ложноотрицательных результатов корректировали уровень значимости (p) контролем над ожидаемой долей ложных отклонений (англ. false discovery rate, FDR) с поправкой Бенджамини – Хохберга. Статистический анализ результатов проводили с использованием программы Statistica 12.0 (StatSoft, США).

Результаты

В ходе нашего исследования, длившегося 2 года, было отмечено незначительное количество рецидивов у больных с диагнозом РШМ, а именно 9,7% (14 из 145 случаев). Более половины обнаруженных рецидивов развивались в сроки от 8 до 14 месяцев. Первые рецидивы у пациенток отмечались через 4 месяца после операции (табл. 1).

При оценке безрецидивной выживаемости больных РШМ с применением метода Каплана – Мейера нами установлена вероятность отсутствия рецидивов, которая в первый год наблюдения после операции снизилась с 1,0 до 0,92, а за 2 года – до 0,84 (рис. 1).

У всех больных РШМ, включенных в исследование, ретроспективно проводили оценку начального уровня экспрессии микроРНК-20а. В результате было установлено, что исходный уровень экспрессии микроРНК-20а в эпителии шейки матки у пациенток с диагнозом РШМ, у которых в дальнейшем наблюдали развитие рецидива ($1,14 \pm 0,08$), был выше на 44% ($p=0,001$) по сравнению с пациентками с безрецидивным течением заболевания ($0,79 \pm 0,06$). При этом отметим, что гиперэкспрессия микроРНК-20а в цервикальном эпителии у больных с рецидивами РШМ отмечалась в 100% случаев, что по частоте встречаемости было значимо ($p=0,019$) выше, чем при благоприятном течении заболевания (71%) (табл. 2).

Таблица 1. Распределение больных раком шейки матки на стадиях T1a1–T2a1N0M0 с рецидивами после операции в зависимости от сроков их появления

Сроки наблюдения, мес.	Количество пациенток, абс. (%)
4–6	1 (7,1)
6–8	2 (14,4)
8–10	4 (28,6)
10–12	3 (21,4)
12–14	3 (21,4)
14–16	1 (7,1)

Мы установили, что при достижении уровня экспрессии микроРНК-20а выше 1,08 с диагностической чувствительностью 84,6% и специфичностью 91,7% вероятность развития рецидивов РШМ резко повышалась. Так, при начальном уровне экспрессии микроРНК-20а, равном 1,08, шансы повышения риска развития рецидива РШМ в первые 2 года после операции возрастали в 10,15 раза.

Используя метод логистической регрессии, установили зависимость между начальным уровнем экспрессии микроРНК-20а в цервикальном эпителии и риском развития рецидива РШМ в ближайшие 2 года после операции (рис. 2).

Нами была установлена зависимость между уровнем экспрессии микроРНК-20а в цервикальном эпителии (x) и риском развития рецидива РШМ в ближайшие 2 года после операции (y), описываемая в виде математического выражения: $y = \exp(-9,9 + 8,05 \times x) / (1 + \exp(-9,9 + 8,05 \times x))$, которое может быть использовано для прогнозирования рисков развития рецидивов РШМ на

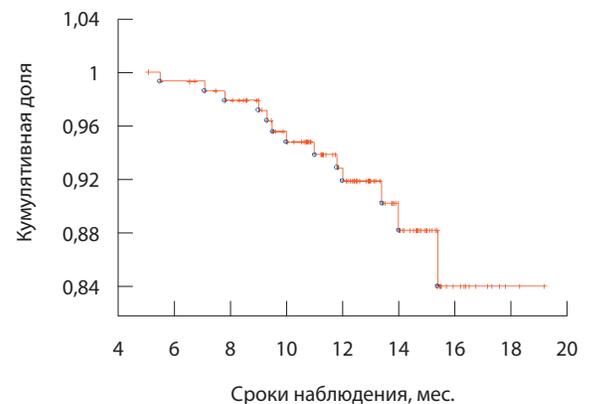


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных раком шейки матки (кривая Каплана – Мейера)

**Таблица 2.** Уровень экспрессии микроРНК-20а в цервикальном эпителии у больных раком шейки матки в зависимости от прогрессирования заболевания

Группа	RE микроРНК-20а, M ± m	Медиана	SD	CV, %	Значение p	Значение p _{кор.} по FDR
Больные РШМ с рецидивами (n = 14)	1,14 ± 0,08	1,15	0,30	26,3	0,001	0,02
Больные РШМ без рецидивов (n = 131)	0,79 ± 0,06	0,80	0,68	86,1		

FDR – false discovery rate (ожидаемая доля ложных отклонений), p_{кор.} – скорректированный уровень значимости, RE – уровень экспрессии, РШМ – рак шейки матки

Статистическую значимость p оценивали по критерию Манна – Уитни между группами, корректировку p проводили с помощью поправки Бенджамини – Хохберга по контролю FDR

Таблица 3. Уровень экспрессии микроРНК-21 в цервикальном эпителии у больных раком шейки матки в зависимости от прогрессирования заболевания

Группа	RE микроРНК-21, M ± m	Медиана	SD	CV, %	Значение p	Значение p _{кор.} по FDR
Больные РШМ с рецидивами (n = 14)	1,32 ± 0,07	1,40	0,26	19,7	0,004	0,02
Больные РШМ без рецидивов (n = 131)	0,90 ± 0,05	0,93	0,57	63,3		

FDR – false discovery rate (ожидаемая доля ложных отклонений), p_{кор.} – скорректированный уровень значимости, RE – уровень экспрессии, РШМ – рак шейки матки

Статистическую значимость p оценивали по критерию Манна – Уитни между группами, корректировку p проводили с помощью поправки Бенджамини – Хохберга по контролю FDR

основании данных по уровню экспрессии микроРНК-20а в эпителии шейки матки. К примеру, при уровне экспрессии микроРНК-20а в цервикальном эпителии, равном 1,08, риск будет составлять 23%, а при значении 1,4 – 79,7%.

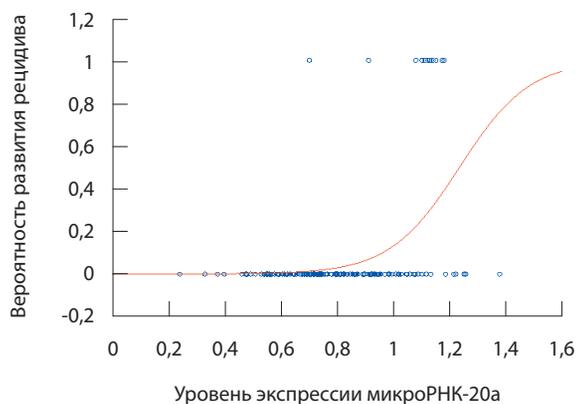
Мы также определяли исходный уровень экспрессии микроРНК-21 в цервикальном эпителии, который у больных с возникшими в дальнейшем рецидивами РШМ (1,32 ± 0,07) был выше на 47% (p = 0,004) по сравнению с пациентками, у которых рецидивов не наблюдалось (0,90 ± 0,05). При этом гиперэкспрессия микроРНК-21 в эпителии

шейки матки отмечалась у большинства больных независимо от развития рецидивов РШМ: у 85,7% пациенток с рецидивами РШМ и 79,4% пациенток с благоприятным течением заболевания (табл. 3).

Высокий риск возникновения рецидивов можно ожидать при достижении уровня экспрессии микроРНК-21 выше 1,18 с диагностической чувствительностью 91,2% и специфичностью 87,9%. При этом шансы развития рецидивов РШМ в первые 2 года после операции возрастали в 7,62 раза при начальном уровне экспрессии микроРНК-21, равном 1,18.

Благодаря использованию метода логит-регрессии была смоделирована зависимость между исходным уровнем экспрессии микроРНК-21 в эпителии шейки матки и риском развития рецидива РШМ в течение 2 лет после операции (рис. 3).

Зависимость между уровнем экспрессии микроРНК-21 в цервикальном эпителии (x) и риском возникновения рецидива РШМ в ближайшие 2 года после операции (y) выражается математическим уравнением: $y = \exp(-12,1 + 8,8 \times x) / (1 + \exp(-12,1 + 8,8 \times x))$. Исходя из данной зависимости, следует, что при уровне экспрессии микроРНК-21, составляющем 1,18, риск развития рецидива РШМ равен 15%, при значении 1,4 – 55,5%, при значении 1,7 – 94,6%.

**Рис. 2.** Кривая логит-регрессии связи вероятности развития рецидива у больных раком шейки матки и уровня экспрессии микроРНК-20а в цервикальном эпителии

**Таблица 4.** Уровень экспрессии микроРНК-23b в цервикальном эпителии у больных раком шейки матки в зависимости от прогрессирования заболевания

Группа	RE микроРНК-23b, M ± m	Медиана	SD	CV, %	Значение p	Значение p _{кор.} по FDR
Больные РШМ с рецидивами (n = 14)	-1,27 ± 0,16	-1,32	0,59	46,5	0,009	0,03
Больные РШМ без рецидивов (n = 131)	-0,87 ± 0,11	-0,86	1,25	143,7		

FDR – false discovery rate (ожидаемая доля ложных отклонений), p_{кор.} – скорректированный уровень значимости, RE – уровень экспрессии, РШМ – рак шейки матки

Статистическую значимость p оценивали по критерию Манна – Уитни между группами, коррекцию p проводили с помощью поправки Бенджамини – Хохберга по контролю FDR

Таблица 5. Оценка влияния экспрессии микроРНК-20a, -21, -23b на выживаемость больных раком шейки матки, свободную от рецидивов (метод регрессионного анализа Кокса)

Уровень экспрессии	Бета-стандартизированный показатель	Статистика Вальда	Значение p	Отношение шансов
МикроРНК-20a	5,04	5,84	0,015	15,4
МикроРНК-21	8,09	13,05	0,0003	32,7
МикроРНК-23b	-1,98	8,63	0,003	0,138

Начальный уровень экспрессии микроРНК-23b в цервикальном эпителии у больных с рецидивами РШМ (-1,27 ± 0,16) был ниже на 46% (p = 0,009) по сравнению с таковым у пациенток с благоприятным течением болезни (-0,87 ± 0,11). У всех (100%) больных с рецидивами РШМ отмечена гипоксепрессия микроРНК-23b в эпителиальной ткани, что превышало (p = 0,03) частоту ее встречаемости при безрецидивном течении заболевания (74,8%) (табл. 4).

Высокий риск развития рецидива РШМ может быть спрогнозирован при уровне экспрессии микроРНК-23b ниже -1,16 с диагностической

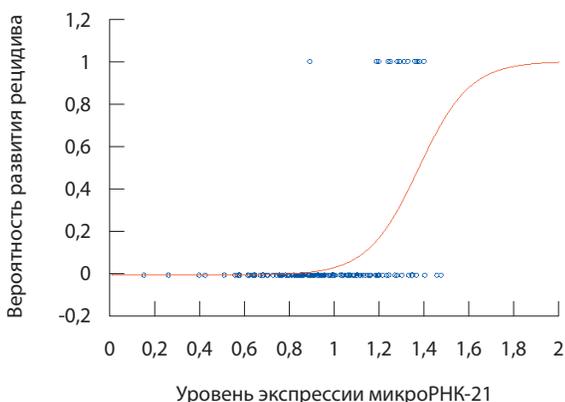
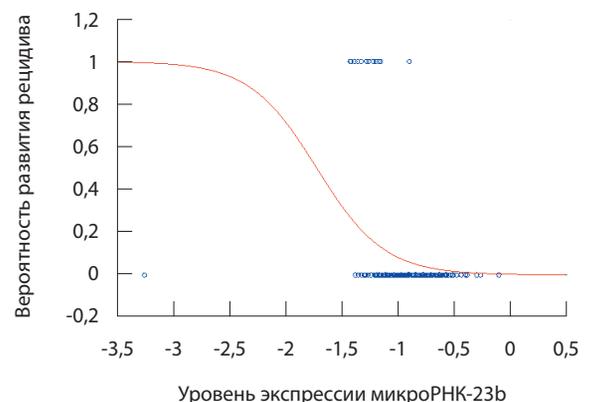
чувствительностью 90,3% и специфичностью 85,6%. По достижении начального уровня экспрессии микроРНК-23b, равного -1,16, шансы риска развития рецидива РШМ в первые 2 года после операции возрастали в 6,41 раза.

Кривая логит-регрессии отражала обратную зависимость между уровнем экспрессии микроРНК-23b в цервикальном эпителии и вероятностью развития рецидива у больных РШМ (рис. 4).

Зависимость между уровнем экспрессии микроРНК-23b в эпителии шейки матки (x) и риском развития рецидива РШМ в течение 2 лет после операции (y) описывается следующим математическим выражением: $y = \exp(-5,75 - 3,3 \times x) / (1 + \exp(-5,75 - 3,3 \times x))$, согласно которому при экспрессии микроРНК-23b, равной -1,16, риск развития рецидива РШМ составляет 12,8%, при значении -2,0 – 70%, при значении -2,5 – 92,4%.

Применяя метод регрессионного анализа Кокса, выявили зависимость между экспрессионным статусом микроРНК-20a, -21, -23b и выживаемостью больных РШМ, свободной от рецидивов (табл. 5).

Таким образом, мы проследили зависимость между уровнем экспрессии микроРНК-20a, -21,

**Рис. 3.** Кривая логит-регрессии связи вероятности развития рецидива у больных раком шейки матки и уровня экспрессии микроРНК-21 в цервикальном эпителии**Рис. 4.** Кривая логит-регрессии связи вероятности развития рецидива у больных раком шейки матки и уровня экспрессии микроРНК-23b в цервикальном эпителии



-23b и риском развития рецидива у больных РШМ.

Обсуждение

В настоящее время все больше исследований посвящается оценке значимости микроРНК в качестве онкомаркеров. Известно, что микроРНК-20a представляет собой регуляторную единицу в пролиферации и инвазии злокачественных клеток при раке легких человека [16], гепатоцеллюлярной карциноме [17], раке яичника OVCAR3 [18]. Кроме того, в исследовании *in vitro* было продемонстрировано, что гиперэкспрессия микроРНК-20a приводит к усилению миграции опухолевых клеток РШМ человека линий HeLa и C-33A, а следовательно, способствует развитию опухоли [19]. Данные, полученные в проведенном исследовании, вполне согласуются с общеизвестными представлениями о роли микроРНК-20a, а также дополняют их. Мы выяснили, что исходный уровень экспрессии микроРНК-20a в цервикальном эпителии был на 44% выше у больных РШМ с отмеченными в течение 2 лет после лечения рецидивами по сравнению с пациентками с благоприятным течением болезни. При этом риск развития рецидива РШМ резко (в 10,15 раза) повышался при достижении уровня экспрессии микроРНК-20a более 1,08 с диагностической чувствительностью 84,6% и специфичностью 91,7%.

МикроРНК-21 представляет собой онкоген, влияющий на функциональную активность опухолевых клеток при раке молочной железы [20], простаты [21], поджелудочной железы [22]. В ряде исследований было показано, что гиперэкспрессия микроРНК-21 приводила к усилению пролиферации опухолевых клеток РШМ линии PDCD4 и снижению их чувствительности к апоптозу [23]. В другой работе также была показана роль данного онкомаркера в качестве регулятора пролиферации, апоптоза и миграции HPV16-позитивных плоскоклеточных клеток шейки матки [24]. В нашей работе определена роль микроРНК-21 в качестве предиктора развития рецидивов РШМ: исходный уровень его экспрессии в цервикальном эпителии больных РШМ с последующим прогрессированием заболевания был на 47% выше по сравнению с пациентками с безрецидивным течением болезни. При повышенном уровне экспрессии микроРНК-21, так же как и микроРНК-20a, можно с диагностической чувствительностью 91,2% и специфичностью 87,9% прогнозировать высокие шансы развития рецидивов.

МикроРНК-23b, в отличие от вышеописанных микроРНК-20a и -21, является опухолевым

супрессором, ингибируя посредством влияния на гены-мишени *SRC* и *AKT1* клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию, а также индуцируя остановку клеточного цикла в стадии G0/G1 [25]. Наши данные согласуются с представлением других исследователей о роли этого онкомаркера. Исходный уровень экспрессии микроРНК-23b в цервикальном эпителии у больных с развивающимися рецидивами РШМ был на 46% ниже по сравнению с пациентками с благоприятным течением болезни. Высокий риск развития рецидивов РШМ можно с диагностической чувствительностью 90,3% и специфичностью 85,6% прогнозировать при достижении нижнего порога экспрессии микроРНК-23b, равного 1,16.

Таким образом, анализ полученных данных позволил установить связь между уровнем экспрессии таких онкомаркеров, как микроРНК-20a, -21, -23b, и риском развития рецидивов РШМ, что может служить важным диагностическим инструментом, который наряду с усовершенствованными терапевтическими методиками позволит увеличить продолжительность жизни пациенток с диагнозом РШМ.

Заключение

В результате проведенного исследования отмечены более высокие уровни экспрессии микроРНК-20a и -21 и более низкий уровень экспрессии микроРНК-23b у больных с рецидивами РШМ по сравнению с пациентками, у которых в течение 2 лет наблюдения рецидивы не были обнаружены.

Вероятность благоприятного безрецидивного течения заболевания в первый год наблюдения после операции снизилась с 1,0 до 0,92, а за 2 года – до 0,84 (метод Каплана – Мейера).

Риск возникновения рецидивов, оцененный методом логит-регрессии, резко увеличивается при повышении экспрессии микроРНК-20a, -21 и понижении экспрессии микроРНК-23b. При этом влияние повышения экспрессии онкогенных микроРНК-20a и микроРНК-21 на риск развития рецидивов было более выраженным по сравнению со снижением экспрессии антиопухолевой микроРНК-23b.

Таким образом, анализ экспрессионного статуса микроРНК-20a, -21, -23b после положительного заключения жидкостного цитологического исследования о РШМ позволяет не только уточнить и подтвердить поставленный диагноз, но и прогнозировать повышение риска возникновения рецидивов в течение 2 лет после операции по удалению злокачественного новообразования. ©



Дополнительная информация

Финансирование

Работа выполнена в рамках госзадания «Разработка и применение новых методов клеточных технологий для иммунотерапии опухолей».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, связанных с данной работой.

Участие авторов

А.Ю. Максимов – концепция и дизайн исследования, утверждение итогового варианта текста рукописи; М.Ю. Тимошкова – проведение молекулярно-генетических исследований, написание текста; Е.В. Вереникина – обеспечение посещения пациентов, предоставления письменного информированного согласия, проведение клинического обследования пациентов,

редактирование текста; Е.А. Лукбанова – сбор образцов, концепция и дизайн статьи, написание текста; М.М. Кечерюкова – анализ результатов клинического обследования пациентов, статистический анализ данных, медико-генетическое консультирование. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература / References

- World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Cancer Today. Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, worldwide, both sexes, all ages [Internet]. Available from: http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population.
- Чимитдоржиева ТН, Писарева ЛФ, Ляхова НП. Рак шейки матки: заболеваемость и смертность (литературный обзор). Сибирский научный медицинский журнал. 2017;37(4):85–91. [Chimitdorzhieva TN, Pisareva LF, Lyakhova NP. [Cervical cancer: incidence and mortality (review)]. The Siberian Scientific Medical Journal. 2017;37(4):85–91. Russian.]
- Голева ОП, Тасова ЗБ, Прудникова ОН, Леонов ОВ, Ширинская НВ. О проблеме своевременности выявления злокачественных новообразований шейки матки в Омской области. Здравоохранение Российской Федерации. 2016;60(6):298–302. doi: 10.18821/0044-197X-2016-60-6-298-302. [Goleva OP, Tasova ZB, Prudnikova ON, Leonov OV, Shirinskaya NV. [About problem of timeliness of detection of cervix malignant neoplasms in population of Omsk region]. Health Care of the Russian Federation. 2016;60(6):298–302. Russian. doi: 10.18821/0044-197X-2016-60-6-298-302.]
- Марочко КВ. Чувствительность методов исследования в выявлении цервикальной интраэпителиальной неоплазии 3 степени и рака шейки матки. Фундаментальная и клиническая медицина. 2016;1(2):51–5. [Marochko KV. [The sensitivity of distinct techniques for identification of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cervical cancer]. Fundamental and Clinical Medicine. 2016;1(2):51–5. Russian.]
- Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. Int J Mol Sci. 2019;20(24):6249. doi: 10.3390/ijms20246249.
- Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). Methods. 2010;50(4):298–301. doi: 10.1016/j.jmeth.2010.01.032.
- Кипкеева ФМ, Музаффарова ТА, Никулин МП, Апанович ПВ, Нариманов МН, Малихова ОА, Кушлинский НЕ, Стилиди ИС, Карпухин АВ. Группа микроРНК в качестве кандидатов в прогностические биомаркеры метастазирования рака желудка. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020;169(1):84–7. [Kipkeeva FM, Muzaffarova TA, Apanovich PV, Karpukhin AV, Nikulin MP, Narimanov MN, Malikhova OA, Kushlinskii NE, Stilidi IS. A group of miRNA as candidates for prognostic biomarkers of gastric cancer metastasis. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2020;169(1):77–80.]
- Solayman MH, Langae T, Patel A, El-Wakeel L, El-Hamamsy M, Badary O, Johnson JA. Identification of Suitable Endogenous Normalizers for qRT-PCR Analysis of Plasma microRNA Expression in Essential Hypertension. Mol Biotechnol. 2016;58(3):179–87. doi: 10.1007/s12033-015-9912-z.
- Малек АВ, Берштейн ЛМ, Филатов МВ, Беляев АМ. Система экзосомальных межклеточных коммуникаций и ее роль в процессе метастатической диссеминации. Вопросы онкологии. 2014;60(4):430–7. [Malek AV, Berstein LM, Filatov MV, Belyaev AM. [Exosomal intercellular communications system and its role in the process of metastatic dissemination]. Problems in Oncology. 2014;60(4):430–7. Russian.]
- Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. PLoS One. 2012;7(7):e41561. doi: 10.1371/journal.pone.0041561.
- Yuan H, Mischoulon D, Fava M, Otto MW. Circulating microRNAs as biomarkers for depression: Many candidates, few finalists. J Affect Disord. 2018;233:68–78. doi: 10.1016/j.jad.2017.06.058.
- Hasanzadeh M, Movahedi M, Rejali M, Maleki F, Moetamani-Ahmadi M, Seifi S, Hosseini Z, Khazaei M, Amerizadeh F, Ferns GA, Rezaei M, Avan A. The potential prognostic and therapeutic application of tissue and circulating microRNAs in cervical cancer. J Cell Physiol. 2019;234(2):1289–94. doi: 10.1002/jcp.27160.
- Yeung CL, Tsang TY, Yau PL, Kwok TT. Human papillomavirus type 16 E6 suppresses microRNA-23b expression in human cervical cancer cells through DNA methylation of the host gene C9orf3. Oncotarget. 2017;8(7):12158–73. doi: 10.18632/oncotarget.14555.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Fang QY, Deng QF, Luo J, Zhou CC. MiRNA-20a-5p accelerates the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer by targeting and downregulating KLF9. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2020;24(5):2548–56. doi: 10.26355/eurrev_202003_20522.
- Karimkhanloo H, Mohammadi-Yeganeh S, Ahmadi Z, Paryan M. Bioinformatics prediction and experimental validation of microRNA-20a targeting Cyclin D1 in hepatocellular carcinoma. Tumour Biol. 2017;39(4):1010428317698361. doi: 10.1177/1010428317698361.
- Zhu T, Gao W, Chen X, Zhang Y, Wu M, Zhang P, Wang S. A Pilot Study of Circulating MicroRNA-125b as a Diagnostic and Prognostic Biomarker for Epithelial Ovarian Cancer. Int J Gynecol Cancer. 2017;27(1):3–10. doi: 10.1097/IGC.0000000000000846.
- Kang HW, Wang F, Wei Q, Zhao YF, Liu M, Li X, Tang H. miR-20a promotes migration and invasion by regulating TNKS2 in human cervical cancer cells. FEBS Lett. 2012;586(6):897–904. doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.020.
- Liu AN, Qu HJ, Gong WJ, Xiang JY, Yang MM, Zhang W. LncRNA AWPPH and miRNA-21 regulates cancer cell proliferation and chemosensitivity in triple-negative breast cancer by interacting with each other. J Cell Biochem. 2019;120(9):14860–6. doi: 10.1002/jcb.28747.
- Zedan AH, Blavnsfeldt SG, Hansen TF, Nielsen BS, Marcussen N, Pleckaitis M, Osther PJS, Sørensen FB. Heterogeneity of miRNA expression in localized prostate cancer with clinicopathological correlations. PLoS One. 2017;12(6):e0179113. doi: 10.1371/journal.pone.0179113.



22. Qu K, Zhang X, Lin T, Liu T, Wang Z, Liu S, Zhou L, Wei J, Chang H, Li K, Wang Z, Liu C, Wu Z. Circulating miRNA-21-5p as a diagnostic biomarker for pancreatic cancer: evidence from comprehensive miRNA expression profiling analysis and clinical validation. *Sci Rep.* 2017;7(1):1692. doi: 10.1038/s41598-017-01904-z.

23. Ajuyah P, Hill M, Ahadi A, Lu J, Hutvagner G, Tran N. MicroRNA (miRNA)-to-miRNA Regulation of Programmed Cell Death 4 (PDCD4). *Mol Cell Biol.* 2019;39(18):e00086-19. doi: 10.1128/MCB.00086-19.

24. Chopjitt P, Pientong C, Bumrungrathai S, Kongyingoes B, Ekalaksananan T. Activities of E6 Protein of Human Papillomavirus 16 Asian Variant on miR-21 Up-regulation and Expression of Human Immune Response Genes. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(9):3961–8. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.9.3961.

25. Zhou W, Xu J, Wang C, Shi D, Yan Q. miR-23b-3p regulates apoptosis and autophagy via suppressing SIRT1 in lens epithelial cells. *J Cell Biochem.* 2019;120(12):19635–46. doi: 10.1002/jcb.29270.

Evaluation of microRNA profile in cervical epithelium for predicting cervical cancer recurrence

A.Yu. Maksimov¹ • M.Yu. Timoshkova¹ • E.V. Verenikina¹ • E.A. Lukbanova¹ • M.M. Kecheryukova²

Background: To predict the development and recurrence of cervical cancer (CC), we selected three oncoassociated miRNAs: miRNA-20a, -21, whose overexpression leads to the development of tumors, and -23b, which acts as an oncosuppressor.

Aim: To evaluate the microRNA profile in the cervical epithelium for predicting CC recurrence in patients who underwent early treatment.

Materials and methods: In the study of the informativeness of expression included 145 patients with T1a1-T2a1N0M0 CC who were followed up for 2 years after treatment. Expression of microRNA-20a, -21 and -23b was analyzed in tumor tissue samples.

Results: The risk of recurrence decreased from 1.0 to 0.92 after 1 year of the follow-up, and to 0.84 after 2 years. The initial expression of microRNA-20a and -21 in the cervical epithelium in patients with recurrent CC was 44% and 47% higher, respectively, than in patients without recurrence, while microRNA-23b expression was 46% lower. When initial levels of microRNA-20a and -21 expressions were 1.08 and 1.18, respectively, the risk of CC recurrence during the first two years after the surgery increased by 10.15 and 7.62 times, respectively. MicroRNA-20a expression in cervical epithelium equal to 1.08 was associated with 23% risk, and equal to 1.4 – with 79.7% risk.

MicroRNA-21 expression equal to 1.18 was associated with 15% risk of CC recurrence; equal to 1.4 – with 55.5% risk; equal to 1.7 – 94.6%. Logistic regression showed that recurrence risks increased sharply when microRNA-23b expression declined.

Conclusion: We registered higher levels of microRNA-20a and -21 expressions and lower microRNA-23b expression in patients with recurrent CC, compared to favorable course of the disease. An analysis of the expression profiles of microRNA-20a, -21 and -23b after CC diagnosis allow prognosis of recurrence risks within 2 years after the tumor removal surgery.

Key words: microRNA-20a, microRNA-21, microRNA-23b, expression, cervical cancer, recurrence

For citation: Maksimov AYu, Timoshkova MYu, Verenikina EV, Lukbanova EA, Kecheryukova MM. Evaluation of microRNA profile in cervical epithelium for predicting cervical cancer recurrence. *Almanac of Clinical Medicine.* 2020;48(5):333–40. doi: 10.18786/2072-0505-2020-48-054.

Received 30 September 2020; accepted 17 October 2020; published online 30 October 2020

Aleksey Yu. Maksimov – MD, PhD, Professor, Deputy Director¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1397-837X>. Tel.: +7 (863) 200 10 00; +7 (863) 300 02 00. E-mail: onko-sekretar@mail.ru

Maria Yu. Timoshkova – MD, Oncologist, Junior Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1484-0580>. Tel.: +7 (960) 489 80 80. E-mail: m-timoshkova@yandex.ru

Ekaterina V. Verenikina – MD, PhD, Head of Department of Oncogynecology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1084-5176>. Tel.: +7 (863) 300 02 00, ext. 380. E-mail: ekat.veren@yandex.ru

Ekaterina A. Lukbanova – Biologist, Research Fellow, Experimental Laboratory Center¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3036-6199>
✉ 163 Azovskaya ul., Azov, Rostov Region, 346783, Russian Federation. Tel.: +7 (928) 191 45 99. E-mail: katya.samarskaja@yandex.ru

Madina M. Kecheryukova – Postgraduate Student²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6131-8560>. Tel.: +7 (928) 606 37 63. E-mail: adele09161@mail.ru

Funding

The study was carried out as a part of the state assignment “Development and application of new methods of cell technologies for immunotherapy of tumors”.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Authors' contributions

A.Yu. Maksimov, the study concept and design, approval of the final version of the manuscript; M.Yu. Timoshkova, molecular genetic testing, text writing; E.V. Verenikina, arrangement of written informed consent, patient management, text editing; E.A. Lukbanova, sample collection, the paper concept and design, text writing; M.M. Kecheryukova, analysis of the results of patient management, statistical analysis, genetic counselling. All the authors have made their significant contributions to the research and preparation of the article, have read and approved its final version before publication.

¹National Medical Research Centre for Oncology; 63 14-ya Iliniya, Rostov-on-Don, 344037, Russian Federation

²Rostov State Medical University; 29 Nakhichevskiy pereulok, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation