

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В КЛЕТКАХ ЦЕРВИКАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРИ ВЫРАЖЕННОЙ ДИСПЛАЗИИ

**Т. А. Димитриади¹, Т. Н. Чимитдоржиева², М. С. Александрова³, Л. М. Забегина³,
С. А. Чекрыгин⁴, К. В. Волков⁴, О. К. Хаташкеева², А. О. Нюганен³, А. С. Артемьева³,
Д. В. Бурцев¹, А. А. Булатова⁵, А. В. Малек^{3,5}**

¹ Областной консультативно-диагностический центр, г. Ростов-на-Дону, Россия

² ГАУЗ «Республиканская клиническая больница им. Н. А. Семашко» Министерства здравоохранения Республики Бурятия, г. Улан-Удэ, Россия

³ НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Ресурсный центр «Биобанк» научного парка Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ООО «Альгимед-Техно», Минск, Республика Беларусь

Цель исследования. Короткие некодирующие РНК — большая группа регуляторных молекул, выполняющих различные биологические функции. Изменение состава этих молекул в клетках цервикального эпителия ассоциировано с необратимыми изменениями его морфологии и развитием тяжелой дисплазии. Комплексное исследование таких изменений необходимо для поиска новых диагностических маркеров злокачественной трансформации.

Материалы и методы. Проведен анализ образцов нормального цервикального эпителия (NILM, n = 12) и образцов эпителия с признаками тяжелой дисплазии (HSIL, n = 12), полученных после проведения гистологического исследования. Исследование было выполнено с помощью технологии глубокого секвенирования (DNBseq technology), для анализа данных использована платформа miRMaster.

Результаты. Описаны изменения профиля экспрессии коротких РНК различных функциональных классов (tRNA, snoRNA, snRNA, miRNA, piwiRNA), ассоциированные с развитием тяжелой дисплазии цервикального эпителия; оценен диагностический потенциал маркерных представителей разных классов коротких РНК с повышенным и сниженным уровнем экспрессии в образцах HSIL.

Заключение. Короткие некодирующие РНК разных функциональных классов имеют высокий диагностический потенциал и могут служить молекулярными маркерами морфологических изменений, предшествующих злокачественной трансформации цервикального эпителия и развитию рака шейки матки.

Ключевые слова: секвенирование, короткие не кодирующие РНК, микроРНК, дисплазия, рак шейки матки

CHANGES IN THE EXPRESSION OF SMALL NON-CODING RNAs IN CERVICAL EPITHELIAL CELLS IN SEVERE DYSPLASIA

**T. A. Dimitriadi¹, T. N. Chimitdorzhiev², M. S. Aleksandrova³, L. M. Zabegina³,
S. A. Chekrygin⁴, K. V. Volkov⁴, O. K. Khatashkeyeva², A. O. Nyuganen³,
A. S. Artemyeva³, D. V. Burtsev¹, A. A. Bulatova⁵, A. V. Malek^{3,5}**

¹ Regional Consultative and Diagnostic Center, Rostov-on-the-Don, Russia

² State Autonomous Healthcare Institution "Republican Clinical Hospital named after N.A.Semashko" of the Ministry of Healthcare of Republic of Buryatia, Ulan-Ude, Russia

³ National Medical Research Center of Oncology named after N.N.Petrov of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint – Petersburg, Russia

⁴ Resource Center "Biobank" of Research Park of Saint – Petersburg State University, Saint – Petersburg, Russia

⁵ Limited Liability Company (LLC) "Algimed – Techno", Minsk, Republic of Belarus

Objective of the study. Short non-coding RNAs are a large group of regulatory molecules that perform various biological functions. Alteration of the composition of these molecules in cervical epithelial cells is associated with irreversible changes in its morphology and the development of severe dysplasia. A comprehensive study of such changes is required for the search of novel diagnostic markers of malignant transformation.

Materials and Methods. Specimens of normal cervical epithelium (NILM, n = 12) and specimens of epithelium with the signs of severe dysplasia (HSIL, n = 12), obtained after histological examination, were analyzed. The examination was performed using deep sequencing technology (DNBseq technology), miRMaster platform was used for data analysis.

Results. The changes in the expression profile of short RNAs of different functional classes (tRNA, snRNA, miRNA, piwiRNA), associated with the development of severe epithelial dysplasia are described, the diagnostic potential of marker representatives of different classes of short RNAs with increased and decreased expression levels in HSIL samples is assessed.

Conclusion. Short non-coding RNAs of different functional classes have a high diagnostic potential and can serve as molecular markers of morphological changes, preceding malignant transformation of cervical epithelium and the development of cervical cancer.

Keywords: sequencing, short non-coding RNAs, microRNA, dysplasia, cervical cancer

Введение

Развитие рака шейки матки — это относительно длительный процесс, дающий возможность обнаружить и вылечить пограничные состояния цервикального эпителия, которые проявляются изменением его морфологии или пролиферативной активности. Современный диагностический арсенал гинекологов включает ряд лабораторных методов: ВПЧ-тестирование, цитологическое исследование материала цервикального мазка и иммуно-цитохимические тесты, например P16/Ki67 [1]. Объективные ограничения этих методов хорошо известны. Результат визуальной оценки структуры или иммуно-цитохимического статуса отдельных клеток зависит от качества цитологического препарата и квалификации цитолога. ВПЧ-тесты позволяют оценить наличие и некоторые особенности вирусной инфекции, которая в большинстве случаев носит транзитный характер. Очевидно, что даже при оптимальном исполнении результаты этих исследований не могут формировать полной и объективной картины состояния цервикального эпителия. Такая картина могла бы быть получена путем анализа генетических и/или эпигенетических маркеров определенных этапов неопластической трансформации. Поиск таких маркеров является важной научной задачей, решение которой необходимо для разработки инновационных диагностических решений.

Короткие РНК. Одним из результатов завершения проекта «Геном человека» (The Human Genome Project) стало понимание, что центральная догма молекулярной биологии «Ген — РНК — Белок» отражает лишь несколько про-

центов транскрипционной активности генома [2]. Более 95 % транскриптов (РНК), продуцируемых каждой клеткой, не кодируют белковых молекул. Биологический смысл синтеза столь избыточного количества РНК пока не известен, а структура и функции некодирующих РНК (non-coding RNA) являются предметом активных исследований [3]. К настоящему моменту описано участие этих молекул в пост-транскрипционной регуляции состояния белок-кодирующих РНК, эпигенетической регуляции работы генома и внутриклеточном «сигналинге». Перечень биологических процессов, в которых участвуют эти молекулы, постоянно расширяется. Современная классификация некодирующих РНК основывается на их размере, биогенезе и предполагаемой биологической функции и включает группу коротких молекул — менее 200 (short ncRNA) и длинных — более 200 нуклеотидов. В первую группу входят относительно хорошо изученные микроРНК (miRNA), РНК, образующие комплексы с белками семейства Piwi (piwi-interacting RNA / piwiRNA); рибосомальные РНК (rRNA); малые ядерные (small nuclear RNA / snRNA); малые ядрышковые (small nucleolar RNA / sno), включая РНК, ассоциированные с тельцами Кахалы (small Cajal body-specific RNA / scaRNA); транспортные РНК (tRNA); кольцевые РНК (circular RNA / circRNA) [4] и другие классы, включая многочисленную группу идентифицированных молекул с пока неизвестными свойствами (miscellaneous RNA / miscRNA). Учитывая возможности ферментативного расщепления молекул РНК

с переходом их из одной функциональной группы в другую и различные варианты модификации этих молекул [5], представленная классификация, вероятно, не является полной. Но биологические функции отдельных классов коротких РНК уже хорошо изучены. Известно, что короткие РНК участвуют в процессе неопластической трансформации эпителиальных клеток, в частности в процессе цервикального канцерогенеза.

Например, качественные и количественные изменения состава микроРНК (microRNA) усугубляются в ряду состояний, соответствующих морфологическим диагнозам NILM < LSIL < HSIL < CIS [6]. Диагностический потенциал этой группы коротких РНК был показан рядом работ [7, 8]. Исследования последних лет демонстрируют участие пивиРНК (piwiRNA) в малигнизации цервикального эпителия [9]. Анализ современных научных данных и оценка диагностического потенциала кольцевых РНК (circRNA) в контексте развития рака шейки матки были недавно представлены отечественными авторами [10]. Более или менее достоверные данные по другим классам коротких РНК можно найти в недрах базы данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) PubMed. Активность исследований в данной области косвенно подтверждает предположение о высоком диагностическом потенциале различных классов коротких РНК.

Цель исследования — провести сравнительный анализ экспрессии известных классов коротких РНК в нормальном (NILM, Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy) и патологически измененном эпителии (HSIL, high grade squamous intraepithelial lesions) цервикального канала с целью идентификации потенциальных диагностических маркеров. В рамках представленного исследования это было сделано с помощью технологии «глубокого» секвенирования, разработанной китайской компанией MGI Tech.

Материалы и методы

Пациенты и материал. В исследовании были использованы парафиновые блоки, полученные после иссечения конусообразного участка ткани нижнего сегмента матки и цервикального канала. Средний возраст пациенток составил

38 лет. Пациентки с метаболическими или аутоиммунными заболеваниями, гинекологическими заболеваниями (кроме патологии шейки матки) были исключены из работы. После проведения гистологического исследования в парафиновых блоках были выделены участки неизмененного цервикального эпителия и эпителия с признаками выраженной дисплазии. Репрезентативные примеры представлены на рис. 1. Из участков ткани, содержащих преимущественно эпителий, были приготовлены по 8–12 тонких срезов (3–4 мкм), которые были использованы для выделения РНК. В исследование были включены образцы ткани неизмененного эпителия (NILM, $n = 12$) и образцы эпителия с признаками выраженной дисплазии (HSIL, $n = 12$).

План работы был одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России. Все пациенты подписали информированное согласие с тем, что их биологический материал и депersonализованные клинические данные будут включены в исследование.

Выделение РНК. Депарафинизация срезов проводилась путем инкубации в 1 мл минерального масла при 65 °С — 15 мин, затем масло и парафин удалялись с помощью двух отмывок 96%-м этанолом. Протеолиз был проведен в 100 мкл раствора протеиназы К, 2 мг/мл (активность: 30 ед. акт. /мг, Альгимед-Техно, Беларусь) при 60 °С — 1 ч. Оставшуюся после протеолиза ткань осаждали путем центрифугирования (10 000x g, 4 °С — 10 мин), супернатант (~100 мкл) переносили в чистую пробирку, добавляли 200 мкл буфера (0,8М ацетат натрия; pH 4,0; 0,5 % октановой кислоты) и 100 мкл р-ра гуанидин изотиоцианата (3М), перемешивали и инкубировали пять минут при комнатной температуре. Образец переносили на спин-колонку, заполненную сорбентом (BioSilica, Россия), промывали дважды буфером для промывки № 1 (500 мкл; 0,5М гуанидин изотиоцианат; 10мМ трис-ацетат; pH 6,5; 50%-й этанол; 1 % 2-меркаптоэтанол) и дважды буфером для промывки № 2 (500 мкл; 75%-й этанол; 0,1М хлорид натрия, 10мМ трис-гидрохлорид; pH 7,5 РНК с поверхности сорбента элюировали с помощью 50 мкл буфера для элюции (10мМ NaHCO₃, 10мМ ЭДТА). Концентрацию и качество выде-

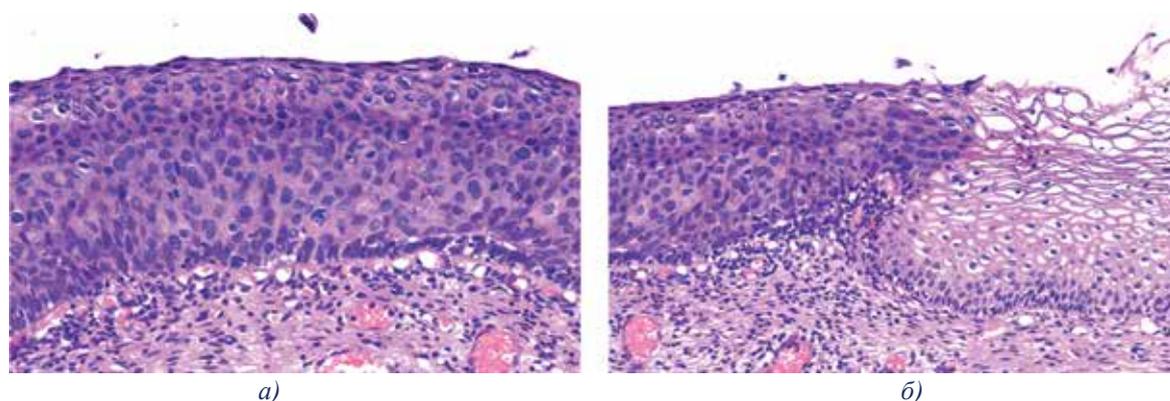


Рис. 1. Репрезентативные образцы анализируемого материала. А. Многослойный плоский эпителий с изменениями на всю толщину пласта в виде: повышения клеточной плотности, потери полярности клеток, выраженного ядерного полиморфизма и гиперхромазии, фигуры митоза определяются в нижней и средней третях пласта, в т.ч. патологические формы (HSIL). Б. Участок резкого перехода нормального неороговевающего многослойного плоского эпителия шейки матки (справа) в интраэпителиальное поражение многослойного плоского эпителия тяжелой степени (HSIL) (слева). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 400

ленной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США).

Подготовка библиотек и секвенирование.

Подготовка материала для «глубокого» секвенирования была проведена с использованием набора реагентов (MGIEasy Small RNA Library Prep Kit) в соответствии с протоколом производителя. Схематично технология подготовки библиотек представлена на рис. 2, аналогичная процедура была описана ранее [11].

Для каждого образца РНК были выполнены следующие этапы: синтез комплементарной ДНК (1), фланкирование каждой молекулы адапторными последовательностями (2–3), амплификация (4) и разделение ампликонов путем электрофореза в полиакриламидном геле (5). Фрагменты нужного размера (выделены рамкой — этап 5, рис. 2) были выделены из геля и использованы для формирования так называемых нано-клубков (DNB, DNA nanoball) в соответствии с протоколом. Перед проведением исследования отдельные меченые бар-кодами образцы (NILM, $n = 12$ и HSIL, $n = 12$) были объединены. Для оценки влияния процедуры секвенирования и метода идентификации прочтений на результат две идентичные по составу смеси были загружены в отдельные «дорожки» (lines) ячейки (MGISEQ-2000RS Sequencing Flow Cell) для параллельного исследования. Анализ был проведен на приборе DNBSEQ-G400 (MGI Tech, Китай) путем одноконцевого прочтения

методом синтеза cPAS (Combinatorial Probe-Anchor Synthesis).

Анализ данных секвенирования. Основные показатели качества секвенирования, включая общее количество прочтений, количество оригинальных прочтений, относительное содержание оснований GC, проводили с помощью программы FastQC [12] и с помощью алгоритма интегрированного в платформу miRMaster2 [13]. Дальнейший анализ данных был проведен с помощью платформы miRMaster и позволил идентифицировать «прочитанные» последовательности коротких РНК путем их сопоставления с соответствующими базами данных: miRBase 22.1 [14, 15], Ensembl [16], RNAcentral 2021 [17], GtRNAdb 18.1 [18], NONCODE 5 [19], circBase [20]. После идентификации известных молекул провели сопоставление данных, полученных на разных «дорожках». Визуализацию дифференциальной экспрессии молекул каждого класса провели путем построения Volcano-диаграмм. Оценку диагностического потенциала отдельных маркерных молекул и соотношений их концентраций в составе «реципрокных пар» провели с помощью ROC-анализа.

Результаты исследования и обсуждение

Оценка качества анализа

Суммарное количество прочтений на каждую дорожку превышало 500 млн (не менее 4 млн на образец), из которых 60 % были иден-

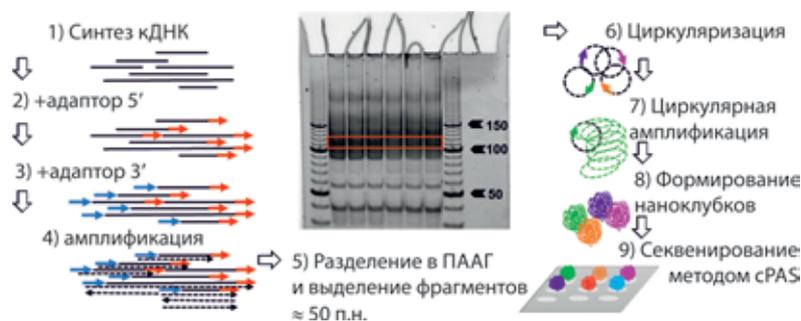


Рис. 2. Принцип (схема) процедуры подготовки материала (библиотек) для секвенирования, включая этапы выделения РНК и синтеза комплементарной ДНК - кДНК (1), очистки, реакции лигирования адаптора по 5'-концам (2), очистки, реакции лигирования адаптора по 3'-концам (3), очистки, амплификации (4), разделения в ПААГ продуктов амплификации (5), выделения из геля продуктов длиной 100-120 п.н., реакции циркуляризации фрагментов ДНК (6), циркулярной амплификации и формирования наноклубков — DNA nanoball, DNB (7-8) и, в заключение, загрузки образцов в ячейку для секвенирования

тифицированы путем поиска аналогов в базах молекул с известными (tRNA, snRNA, miRNA, piwiRNA) и еще не изученными (miscellaneous RNA) биологическими функциями. В рамках проведенного исследования реализована многоэтапная технология (выделение РНК, подготовка библиотек, секвенирование, анализ), не все этапы которой могут эффективно контролироваться. Косвенным признаком достоверности полученных результатов является их воспроизводимость. С целью оценки воспроизводимости последние этапы исследования (секвенирование и анализ, включая идентификацию молекул, подсчет и нормализацию идентичных прочтений) выполнены в двух технических повторях. На рис. 3 представлена диаграмма рассеяния результатов двух экспериментов, выраженных как Log₂ нормализованных прочтений (RPM, reads per millions), ось X отражает результаты одного анализа (дорожка 1), ось Y — другого (дорожка 2). Коэффициент корреляции Спирмена (r) для шести типов молекул > 0,99, что указывает на практическое совпадение результатов.

Далее в работе представлены результаты анализа данных секвенирования одной «дорожки».

Анализ разницы профиля экспрессии малых РНК в группах NILM и HSIL

С целью сравнительной оценки «вовлеченности» разных классов малых РНК, для каждого такого класса построены диаграммы рассеяния.

Например, вулканическая диаграмма (рис. 4) демонстрирует зависимость двух параметров: разницы экспрессии отдельных молекул между группами образцов (HSIL vs. NILM), выраженной как Log₂ кратности среднего количества (по оси X) и статистическую значимость этой разницы для сравниваемых групп (HSIL, $n = 12$ vs. NILM, $n = 12$), выраженную как отрицательный Log₁₀ критерия Уилкоксона (по оси Y). Каждая точка на диаграммах отражает «поведение» одной молекулы, относящейся к одному из шести классов: miRNA, piwiRNA, tRNA, snoRNA, snRNA и малых РНК с неизвестными биологическими функциями (miscRNA, miscellaneous RNA). Красным и синим обозначены молекулы, экспрессия которых в группах (HSIL и NILM) отличается более чем в 2 раза при уровне статистической значимости $p < 0,1$.

Представленные данные демонстрируют «участие» всех исследуемых классов малых РНК в процессе формирования характерных изменений морфологии цервикального эпителия, предшествующих его неопластической трансформации. Наиболее значимый дисбаланс наблюдается среди молекул с неизвестными функциями и среди микроРНК. Выраженные изменения наблюдались и среди других классов малых РНК (piwiRNA, tRNA, snoRNA, snRNA). Интересно, что тяжелая дисплазия ассоциировалась преимущественно с угнетением экспрессии микроРНК (число синих точек больше числа красных). В других классах коротких РНК наблюда-

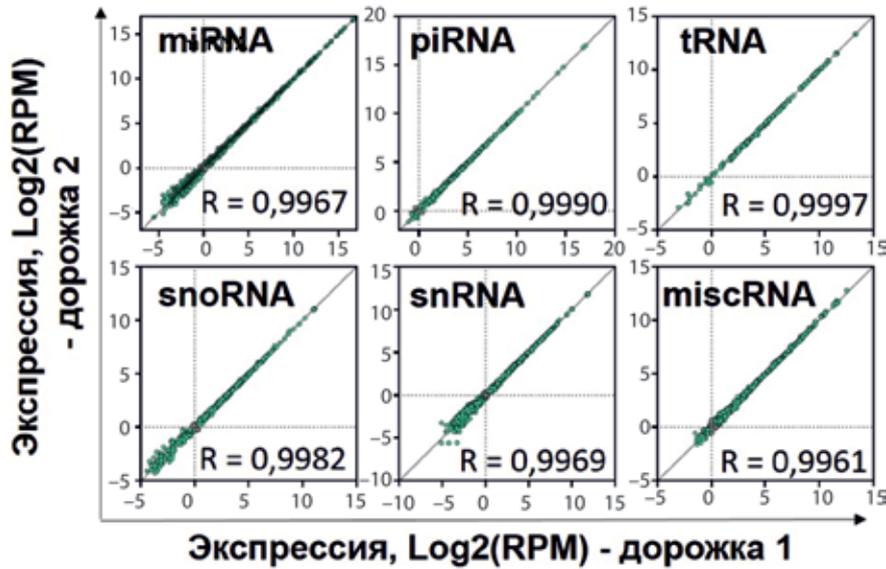


Рис. 3. Оценка воспроизводимости анализа (correlation plot). Результаты двух технических повторов анализа одной библиотеки (смеси 24 образцов) представлены по оси X (дорожка 1) и по оси Y (дорожка 2)

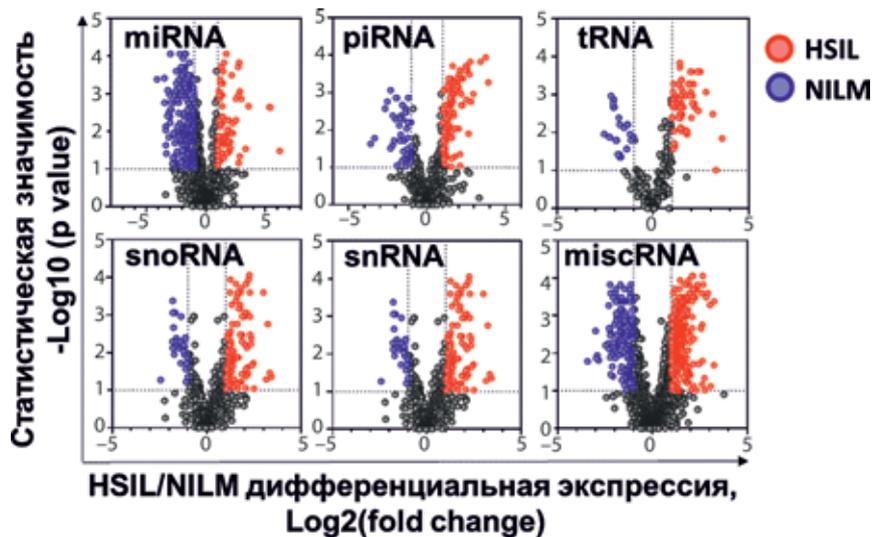


Рис. 4. Сравнительный анализ экспрессии различных классов коротких РНК в клетках нормального (NILM, n.12) и измененного (HSIL, n.12) цервикального эпителия. Результаты представлены в виде Volcano-диаграммы, где каждая точка отражает характер экспрессии одной молекулы в двух группах образцов: по оси X — Log2 кратности количества молекул в образцах HSIL относительно NILM (fold change), по оси Y — Log10 T-критерия Уилкоксона (p value), характеризующего статистическую значимость различия экспрессии данной молекулы в двух сравниваемых группах образцов (HSIL vs NILM). Цветом показаны молекулы со статистически значимо повышенным уровнем экспрессии в клетках HSIL (красный) или NILM (синий цвет)

ется обратная ситуация: развитие дисплазии ассоциировалось с активацией экспрессионной активности.

Имея в виду практическую задачу разработки диагностического инструмента, следует понимать, что важным фактором является не толь-

ко изменение экспрессии потенциального маркера в патологической ткани относительно здоровой, но также её средняя активность. Этот фактор определяет возможность использования диагностических технологий, аналитическая чувствительность которых имеет объективные

ограничения. Для сопоставления диагностического потенциала разных классов малых РНК проведено сопоставление нормализованного и усредненного (для 24 образцов) показателя экспрессионной активности каждой молекулы (по оси X) и разницы ее экспрессии между группами образцов HSIL vs. NILM (по оси Y). Результаты представлены на рис. 5.

Для интерпретации результатов, представленных на рис. 5, следует учитывать, что большинство коммерческих наборов для анализа микроРНК с помощью обратной транскрипции и ПЦР (пример: Qiagen, ThermoFisher, BioCat GmbH, Takara) рекомендуют использовать в качестве стартового материала не менее 20–100 pg тотальной РНК. С учетом данных исследований состава тотальной РНК [21, 22] это количество может включать $0,3\text{--}1,5 \times 10^{-18}$ молей или 0,2–1 млн молекул микроРНК всех типов. Значение 5 по оси X на диаграммах рис. 5 соответствует всего 32 специфическим молекулам в каждом миллионе идентифицированных коротких РНК ($\text{Log}(2)32 = 5$). Соответственно, 20 pg тотальной РНК будут содержать $0,3 \times 10^{-18}$ или 0,2 млн молекул микроРНК, в числе которых будет лишь

несколько специфических (потенциально маркерных) молекул. Эти крайне приблизительные расчеты позволяют понять, что «копийность» большинства идентифицированных молекул (показаны черным цветом) недостаточна для использования технологий рутинной диагностики. При этом каждый класс коротких РНК содержит от нескольких до нескольких десятков молекул с измененным уровнем экспрессии и относительно высокой «копийностью»: красным выделены молекулы с повышенным уровнем экспрессии в образцах HSIL, синим — в образцах LSIL. Эти молекулы могут рассматриваться как потенциальные диагностические маркеры тяжелой дисплазии цервикального эпителия.

Оценка диагностического потенциала отдельных молекул

Проведенный анализ показал, что каждый функциональный класс коротких РНК содержит потенциально маркерные молекулы. Метод ROC-анализа был использован для оценки диагностического потенциала молекул, выбранных с учетом лишь одной из трех ранее описанных характеристик — степени дифференциальной

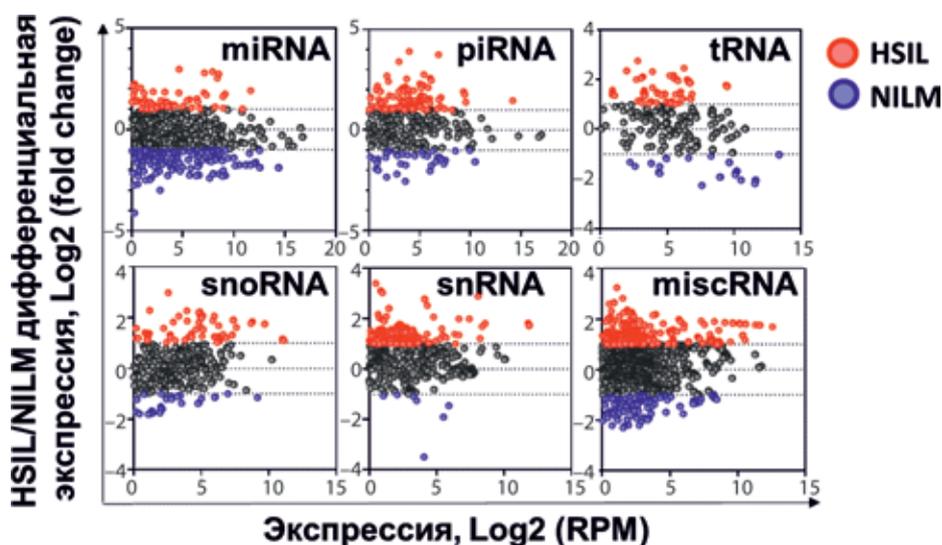


Рис. 5. Сравнительный анализ средней и дифференциальной экспрессии различных классов коротких РНК в клетках нормального (NILM, $n=12$) и измененного (HSIL, $n=12$) цервикального эпителия. Результаты представлены в виде Volcano-диаграммы, где каждая точка отражает характер экспрессии одной молекулы в двух группах образцов: по оси X — Log_2 среднее для 24 образцов нормализованное значение экспрессии (RPM, read per million), по оси Y — Log_2 кратности количества молекул в образцах HSIL относительно NILM (fold change). Цветом показаны молекулы с относительно высоким средним значением экспрессии, которая значимо повышена в образцах HSIL (красный) или в образцах NILM (синий цвет)

экспрессии, $\log_2(\text{fold change HSIL vs NILM})$. На рис. 6 представлены ROC кривые для пяти молекул каждого класса с повышенным уровнем экспрессии в образцах HSIL и максимальными значениями площади под кривой (AUC, area under curve). Видно, что все молекулы имеют высокий диагностический потенциал, особенно интересные результаты получены для малых ядерных (snRNA), ядрышковых (snoRNA) и piwi-ассоциированных РНК.

Аналогичным методом была проведена оценка диагностического потенциала молекул, экспрессия которых снижена в образцах измененного эпителия (HSIL) по сравнению с образцами здорового эпителия цервикального канала. В соответствии с результатами, которые представлены на рис. 7, снижение экспрессии ряда молекул микроРНК также может быть диагностическим критерием дисплазии. Эти данные находят соответствие с результатами, представленными на рис. 4, — угнетение экспрессии отдельных молекул микроРНК может «ярче» отражать морфологические изменения цервикального эпителия, а оценка снижения концентрации таких молекул может иметь больший диагностический потенциал, чем анализ микроРНК с повышенным уровнем экспрессии (часто называемых «онко-миР»).

Снижение экспрессионной активности piwi-RNA, snoRNA и snRNA имеет менее значимый диагностический потенциал, чем активация экспрессии некоторых молекул этих классов. Среди

молекул, функции которых еще не известны (miscRNA), есть потенциальные маркеры цервикальной дисплазии, причем как с повышенной (рис. 6), так и с пониженной (рис. 7) экспрессией в клетках измененного эпителия.

Оценка диагностического потенциала «реципрокных пар» молекул

Проблема нормализации результатов ОТ-ПЦР анализа коротких молекул РНК и клинически внятной интерпретации этих результатов до настоящего времени не решена. Авторы ряда исследований описывали и предлагали использовать так называемые референсные молекулы (нормализаторы), которые имеют предположительно стабильный уровень экспрессии в анализируемых образцах. В таком случае оценка экспрессионных изменений маркерных молекул может быть проведена относительно так называемых нормализаторов. Альтернативный вариант, использованный в ряде исследований [7, 8], выполненных с помощью ОТ-ПЦР, предполагает одновременный анализ молекул с разнонаправленным характером экспрессионных изменений, наблюдаемых при развитии HSIL. Расчет соотношения концентраций молекул, формирующих так называемые реципрокные пары, позволял решить проблему нормализации, а диагностический потенциал рассчитанного параметра был обычно выше, чем диагностический потенциал отдельных молекул в па-

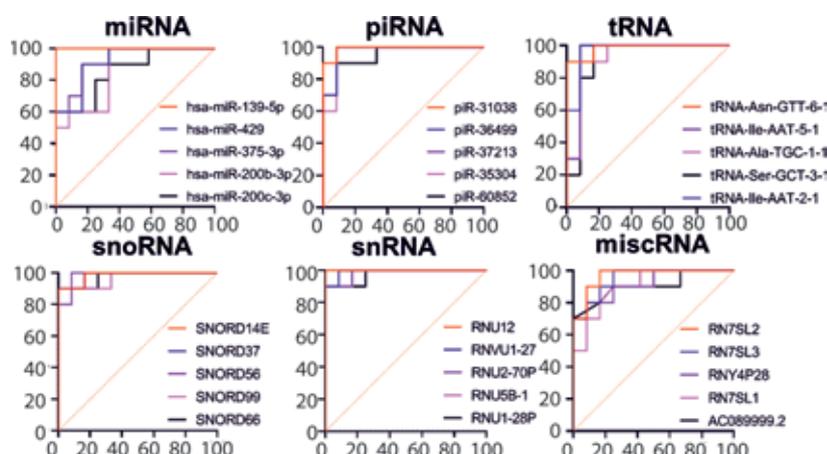


Рис. 6. Примеры молекул с повышенным уровнем экспрессии в HSIL и максимальным диагностическим потенциалом. ROC анализ

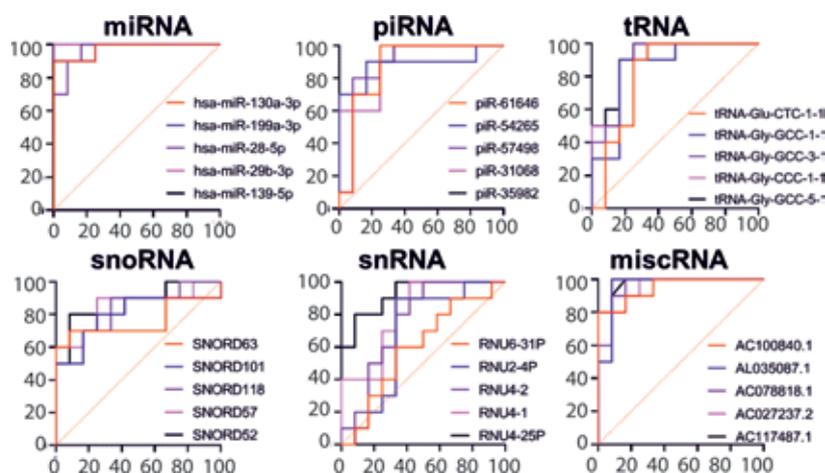


Рис. 7. Примеры молекул с пониженным уровнем экспрессии в HSIL и максимальным диагностическим потенциалом. ROC анализ

Таблица 1

Диагностический потенциал отдельных молекул и формируемых ими «реципрокных пар»

Класс	Молекулы ↑ в HSIL		Молекулы ↓ в HSIL		Реципрокные пары	
	Название	AUC	Название	AUC	Названия	AUC
miRNA	hsa-miR-429	0,93	hsa-miR-199a-3p	0,98	hsa-miR-429/hsa-miR-199a-3p	1,00
	hsa-miR-375-3p	0,92	hsa-miR-130a-3p	0,97	hsa-miR-375-3p/hsa-miR-130a-3p	1,00
piRNA	piR-36499	0,98	piR-31068	0,89	piR-36499/piR-31068	0,98
	piR-37213	0,98	piR-35982	0,89	piR-37213/piR-35982	0,98
tRNA	tRNA-Ile-AAT-2-1	0,97	tRNA-Gly-CCC-1-1	0,91	tRNA-Ile-AAT-2-1/tRNA-Gly-CCC-1-1	1,00
	tRNA-Ile-AAT-5-1	0,94	tRNA-Gly-GCC-1-1	0,85	tRNA-Ile-AAT-5-1/tRNA-Gly-GCC-1-1	0,96
snoRNA	SNORD56	0,98	SNORD57	0,85	SNORD56/SNORD57	1,00
	SNORD37	0,98	SNORD52	0,87	SNORD37/SNORD52	1,00
snRNA	RNU5B-1	0,98	RNU2-4P	0,67	RNU5B-1/RNU2-4P	1,00
	RNU1-28P	0,96	RNU4-1	0,82	RNU1-28P/RNU4-1	0,97

ре. В случае анализа данных глубокого секвенирования проблема нормализации не стоит. Но эта ситуация позволяет оценить диагностический потенциал реципрокных пар, который для ряда молекул оказался выше индивидуальных значений. В табл. 1 представлены значения площади под кривой (AUC, area under curve), полученные с помощью ROC анализа.

Представленные данные указывают на целесообразность использования метода расчета

соотношений концентрации молекул, формирующих «реципрокные пары», т.к. это позволяет не только нормализовать результаты, но и оптимизировать их диагностическую значимость.

Выводы

1. Анализ профиля экспрессии коротких РНК в материале цервикального эпителия с помощью технологии MGI-Tech и аналитической платфор-

мы miRMaster позволяет получать качественные и воспроизводимые результаты.

2. Изменение морфологии цервикального эпителия, предшествующие его неопластической трансформации, сопровождается выраженными изменениями экспрессионной активности коротких РНК различных функциональных классов (miRNA, piwiRNA, tRNA, snoRNA, snRNA).

3. Выбор потенциально маркерных молекул должен быть основан на комплексном анализе следующих характеристик: (1) средний уровень экспрессии в клетках цервикального эпителия, (2) степень изменения экспрессионной активности, ассоциированного с развитием морфологических изменений (дисплазии) и (3)

статистическая значимость экспрессионных изменений.

4. Высокий диагностический потенциал могут иметь молекулы микроРНК как с повышенным, так и с пониженным уровнем экспрессии в клетках HSIL.

5. Высокий диагностический потенциал также имеют представители других классов коротких РНК: piwiRNA, tRNA, snoRNA, snRNA, включая молекулы с неизвестными функциями (miscRNA).

6. Оценка соотношения концентрации молекул, формирующих «реципрокные пары», позволяет повысить диагностическую значимость результатов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. РОАГ (Российское Общество Акушеров Гинекологов). Клинические рекомендации — Цервикальная интраэпителиальная неоплазия, эрозия и эктропион шейки матки — 2024-2025-2026 (25.09.2024)
2. Mattick J., Amaral P. RNA, the Epicenter of Genetic Information: A new understanding of molecular biology.; Abingdon (UK), 2022; ISBN 9781000623086.
3. Mangiavacchi A., Morelli G. Orlando, V. Behind the scenes: How RNA orchestrates the epigenetic regulation of gene expression. *Front. Cell Dev. Biol.* 2023, 11, doi:10.3389/fcell.2023.1123975.
4. Shi J., Zhou T., Chen Q. Exploring the expanding universe of small RNAs. *Nat. Cell Biol.* 2022, 24, 415–423, doi:10.1038/s41556-022-00880-5.
5. Xiong Q., Zhang Y. Small RNA modifications: regulatory molecules and potential applications. *J. Hematol. Oncol.* 2023, 16, 64, doi:10.1186/s13045-023-01466-w.
6. Choi P.-W., Liu T.L., Wong C.W., et al. The Dysregulation of MicroRNAs in the Development of Cervical Pre-Cancer—An Update. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 7126, doi:10.3390/ijms23137126.
7. Kniazeva M., Zabegina L., Shalaev A., et al. NOVAprep-miR-Cervix: New Method for Evaluation of Cervical Dysplasia Severity Based on Analysis of Six miRNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 9114, doi:10.3390/ijms24119114.
8. Ivanov M.K.; Titov S.E.; Dzyubenko V. V. et al. Detection of Cervical Lesions and Cancer in Air-Dried Cytologic Smears by Combined Analysis of mRNA and miRNA Expression Levels. *J. Mol. Diagnostics* 2021, 23, 541–554, doi:10.1016/j.jmol.2021.01.016.
9. Silvia B.J., Shetty S., Behera R., et al. A comprehensive review on the role of PIWI-interacting RNA (piRNA) in gynecological cancers. *Life Sci.* 2024, 357, 123065, doi:10.1016/j.lfs.2024.123065.
10. Begliarzade S., Sufianov A., Ilyasova T. et al. Circular RNA in cervical cancer: Fundamental mechanism and clinical potential. *Non-coding RNA Res.* 2024, 9, 116–124, doi:10.1016/j.ncrna.2023.11.009.
11. Бандык Я. А., Князева М. С., Гаранин, А. Ю. и др. Возможности дифференциальной диагностики фолликулярных неоплазий щитовидной железы путем анализа малых некодирующих РНК. *Вопросы онкологии* 2024, 70, 189–201, doi:https://orcid.org/0000-0002-9178-8512.
12. Wingett S.W., Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research* 2018, 7, 1338, doi:10.12688/f1000research.15931.2.
13. Fehlmann T., Kern F., Laham O. miRMaster 2.0: multi-species non-coding RNA sequencing analyses at scale. *Nucleic Acids Res.* 2021, 49, W397–W408, doi:10.1093/nar/gkab268.
14. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019, 47, D155–D162, doi:10.1093/nar/gky1141.
15. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42, D68–D73, doi:10.1093/nar/gkt1181.

16. Yates A. D., Achuthan P., Akanni W. et al. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Res.* 2019, doi:10.1093/nar/gkz966.
17. Sweeney B. A., Petrov A. I., Ribas C. E. et al. RNAcentral 2021: secondary structure integration, improved sequence search and new member databases. *Nucleic Acids Res.* 2021, 49, D212–D220, doi:10.1093/nar/gkaa921.
18. Thornlow B. P., Armstrong J., Holmes A. D. et al. Predicting transfer RNA gene activity from sequence and genome context. *Genome Res.* 2020, 30, 85–94, doi:10.1101/gr.256164.119.
19. Zhao Y., Li H., Fang S. et al. NONCODE 2016: an informative and valuable data source of long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44, D203–D208, doi:10.1093/nar/gkv1252.
20. Glažar P., Papavasileiou P., Rajewsky N. circBase: a database for circular RNAs. *RNA* 2014, 20, 1666–1670, doi:10.1261/rna.043687.113.
21. Bissels U., Wild S., Tomiuk, S. Absolute quantification of microRNAs by using a universal reference. *RNA* 2009, 15, 2375–2384, doi:10.1261/rna.1754109.
22. Peltier H. J., Latham, G. J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008, 14, 844–852, doi:10.1261/rna.939908.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Димитриади Татьяна Александровна, доктор медицинских наук, врач-онколог, врач акушер-гинеколог, руководитель Областного центра патологии шейки матки, доцент кафедры персонализированной и трансляционной медицины Ростовского государственного медицинского университета, 344011, РФ, г. Ростов-на-Дону, ул. Пушкинская, д. 127 e-mail: tdimitriadi@yandex.ru

Dimitriadi Tatyana A., MD., Doctor of Science, oncologist, gynecologist, Head of the Regional Center of Cervical Pathology Regional Advisory and Diagnostic Centre, associate Professor, Department of personalized and translational medicine, Rostov State Medical University, 344011 Russian Federation, Rostov-on-Don, 127 Pushkinskaia str., , e-mail: tdimitriadi@yandex.ru

Чимитдоржиева Татьяна Намжиловна, кандидат медицинских наук, врач акушер-гинеколог, заместитель главного врача по амбулаторно-поликлинической работе ГАУЗ «Республиканская клиническая больница им. Н. А. Семашко» Министерства здравоохранения Республики Бурятия, 670031 Россия, г. Улан-Удэ, ул. Павлова, д. 12, e-mail: chtn2008@mail.ru

Chimitdorzhieva Tatiana N., MD., PhD, gynecologist, Deputy Chief Physician for Outpatient Work State Autonomous healthcare institution « N. A. Semashko Republican clinical hospital» Ministry of health of the Republic of Buryatia? 670031 Russian Federation, Ulan-Ude, Pavlova 12, e-mail: chtn2008@mail.ru

Александрова Маргарита Сергеевна, научный сотрудник лаборатории субклеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, 197758 Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская 68, e-mail: margo9793@gmail.com

Aleksandrova Margarita S., researcher of Subcellular technology Lab. N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, 197758 Russian Federation, St. Petersburg, Pesochny, st. Leningradskaya 68, e-mail: margo9793@gmail.com

Забегина Лидия Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории субклеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, 197758 Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская 68, e-mail: lidusikza@yandex.ru

Zabegina Lidia M., Junior researcher of Subcellular technology Lab. N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, 197758 Russian Federation, St. Petersburg, Pesochny, st. Leningradskaya 68, e-mail: lidusikza@yandex.ru

Чекрыгин Сергей Алексеевич, специалист ресурсного центра «Биобанк» научного парка Санкт-Петербургского государственного университета, 199034 Российская Федерация, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7/9, e-mail: st079809@student.spbu.ru

Chekrygin Sergey A., Specialist of the Biobank Resource Center of the St. Petersburg State University Research Park, 199034 Russian Federation, St. Petersburg, Universitetskaya Emb., 7/9, e-mail: st079809@student.spbu.ru

Волков Кирилл Владимирович, кандидат биологических наук, и. о. директора ресурсного центра «Биобанк» научного парка Санкт-Петербургского государственного университета, 199034 Российская Федерация, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7/9, e-mail: kirill.volkov@spbu.ru

Volkov Kirill V., PhD in Biology, Acting Director of the Biobank Resource Center of the St. Petersburg State University Research Park, 199034 Russian Federation, St. Petersburg, Universitetskaya Emb., 7/9, e-mail: kirill.volkov@spbu.ru

Хаташкеева Ольга Кондратьевна, врач иммунологического отдела клинико-диагностической лаборатории ГАУЗ «Республиканская клиническая больница им. Н. А. Семашко» Министерства здравоохранения Республики Бурятия, 670031 Российская Федерация, г. Улан-Удэ, ул. Павлова, д. 12, e-mail: khatashkeeva@yandex.ru

Khatashkeeva Olga K. immunological of Department of Clinical Laboratory Diagnostics State Autonomous healthcare institution «N. A. Semashko Republican clinical hospital» Ministry of health of the Republic of Buryatia, 670031, Russian Federation, Ulan-Ude, Pavlova 12, e-mail: khatashkeeva@yandex.ru

Нюганен Анна Олеговна, врач патологоанатомического отделения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, 197758 Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская 68, e-mail: annanyuganen@gmail.com

Nuganen Anna O., pathologist of Pathology Department N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, 197758 Russian Federation, St. Petersburg, Pesochny, st. Leningradskaya 68, e-mail: annanyuganen@gmail.com

Артемуева Анна Сергеевна, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий патологоанатомическим отделением, руководитель научной лаборатории морфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, 197758 Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская 68, e-mail: oinochoya@gmail.com

Artemyeva Anna S., MD., PhD, Head of Pathology Department, Head of Laboratory of Tumor Morphology, N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, 197758 Russian Federation, St. Petersburg, Pesochny, st. Leningradskaya 68, e-mail: oinochoya@gmail.com

Бурцев Дмитрий Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, врач-онколог, главный врач Областного консультативно-диагностического центра г. Ростова-на-Дону, заведующий кафедрой персонализированной и трансляционной медицины Ростовского государственного медицинского университета, 344011 Российская Федерация, г. Ростов на Дону, ул. Пушкинская, д. 127, e-mail: dr-burtsev@mail.ru

Burtsev Dmitry V., MD., Doctor of Science, Professor, Head of the Regional Consulting and Diagnostic Center, Head of the Department of personalized and translational medicine, Rostov State Medical University, Head of the Department of personalized and translational medicine, Rostov State Medical University, 344011 Russian Federation, Rostov-on-Don, 127 Pushkinskaia str., e-mail: dr-burtsev@mail.ru

Булатова Анна Александровна, начальник отдела научных исследований и разработок ООО «Альгимед Техно», 220090 Республика Беларусь, г. Минск, Логойский тракт, 22/1, e-mail: a.bulatova@algimed.by

Bulatova Anna A., Head of R&D Department of the Algimed Techno Ltd., 220090 Republic of Belarus, Minsk, Logoisk tract 22/1, e-mail: a.bulatova@algimed.by

Малек Анастасия Валерьевна, доктор медицинских наук, врач-онколог, заведующая лабораторией субклеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, 197758 Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская 68, e-mail: anastasia@malek.com.ru

Malek Anastasia V., MD., Doctor of Science, Head of Laboratory of Subcellular Technologie N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, 197758 Russian Federation, St. Petersburg, Pesochny, st. Leningradskaya 68, e-mail: anastasia@malek.com.ru