

МИКРОРНК КАК МАРКЕРЫ ПРОГРЕССИВОВАНИЯ ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В РАК ШЕЙКИ МАТКИ

Димитриади Т.А.¹, Бурцев Д.В.¹, Дженкова Е.А.², Кутилин Д.С.²

¹ ГАОУ РО «Областной консультативно-диагностический центр», Ростов-на-Дону;

² ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: k.denees@yandex.ru

Инфекция вирусом папилломы человека (ВПЧ, HPV) является неотъемлемой причиной инвазивного рака шейки матки (ИРШМ). Персистенция ВПЧ инфекции приводит к интраэпителиальным поражениям, которые обычно классифицируются как цервикальная интраэпителиальная неоплазия (ЦИН) 1–3 степени. HPV-инфекция приводит к aberrантной экспрессии микроРНК. Данные на культурах клеток подтверждают участие микроРНК в каждом этапе развития ИРШМ. Тем не менее пока мало что известно о специфических микроРНК, задействованных в этом процессе у пациентов, и механизмах их дерегуляции. Поэтому целью обзора стал анализ данных литературы, посвященной профилированию микроРНК при переходе от предраковых заболеваний к ИРШМ. В обзоре представлены данные всех доступных в настоящее время в базе PubMed исследований, посвященных нарушению регуляции экспрессии микроРНК во время развития рака шейки матки. Также для составленного на основе данных публикаций списка микроРНК был проведен поиск целевых генов, используя базу данных miRWalk 2.0, и анализ сигнальных путей, в которых они задействованы (программное обеспечение Enrichr). В разных исследованиях установлено повышение экспрессии 17 (miR-21, miR-9, miR-16, miR-25, miR-10a, miR-20b, miR-31, miR-92a, miR-106a, miR-155, miR-15b, miR-17, miR-27a, miR-92b, miR-93 и др.) и понижение экспрессии 13 микроРНК (miR-218, miR-375, miR-203, miR-99a, miR-29a, miR-195, miR-125b, miR-34a, miR-100 и др.) при прогрессировании в ИРШМ. Более 16671 генов-мишеней было идентифицировано для гиперэкспрессированных микроРНК и 7075 генов для микроРНК с пониженной экспрессией. При изучении роли генов-мишеней микроРНК было обнаружено много сигнальных путей, имеющих отношение к возникновению и прогрессированию ИРШМ. Некоторые из этих микроРНК и их генов-мишеней могут быть использованы для раннего выявления цервикальных интраэпителиальных неоплазий. Особое значение для программ малоинвазивного скрининга может иметь исследование уровней экспрессии этих микроРНК в клетках шейки матки из цитологических препаратов.

Ключевые слова: рак шейки матки, NGS, микрочипы, микроРНК, вирус папилломы человека, цервикальная интраэпителиальная неоплазия.

MICRO-RNA AS MARKERS OF PRE-CANCER DISEASES PROGRESSION IN CERVICAL CANCER

Dimitriadi T.A.¹, Burtsev D.V.¹, Dzhenkova E.A.², Kutilin D.S.²

¹Regional Consultative and Diagnostic Center, Rostov-on-Don;

²Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: k.denees@yandex.ru

Human papillomavirus infection (HPV) is an essential cause of invasive cervical cancer (ICC). Persistence of HPV infection leads to intraepithelial lesions, which are usually classified as cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 1-3 grade. HPV infection leads to aberrant expression of micro-RNA. Data on cell cultures confirm the involvement of micro-RNA in each stage of the development of ICC. Nevertheless, little is known about the specific micro-RNAs involved in this process in patients, and the mechanisms of their deregulation. Therefore, the aim of the review was the analysis of literature data on the profiling of micro-RNA during the transition from precancerous diseases to ICC. The review presents data from all currently available studies in PubMed on deregulation of micro-RNA expression during the development of cervical cancer. Also, for a list of micro-RNAs compiled on the basis of publications, a search was made for target genes using the miRWalk 2.0 database and an analysis of the signaling pathways in which they are involved (Enrichr software). Different studies have shown an increase in the expression of 17 (miR-21, miR-9, miR-16, miR-25, miR-10a, miR-20b, miR-31, miR-92a, miR-106a, miR-155, miR-15b, miR-17, miR-27a, miR-92b, miR-93, etc.) and a decrease in the expression of 13 micro-RNAs (miR-218, miR-375, miR-203, miR-99a, miR-29a, miR-195, miR-125b, miR-34a, miR-100, etc.) with ICC progression. More than 16671 target genes were identified for overexpressed micro-RNAs and 7075 genes for micro-RNAs with reduced expression. When studying the role of target genes of micro-RNA, many signaling pathways were found that are related to the emergence and progression of ICC. Some of these micro-RNAs and their target genes can be used for early detection of cervical intraepithelial neoplasias. Of particular

importance for low invasive screening programs may be the study of the expression levels of these micro-RNAs in cervical cells from cytological preparations.

Keywords: cervical cancer, NGS, microarrays, miRNA, human papilloma virus, cervical intraepithelial neoplasia.

Во всем мире в 2018 году было зарегистрировано более 528 000 новых случаев и 266 000 летальных исходов от инвазивного рака шейки матки (ИРШМ) [1]. Инфекция вирусом папилломы человека (ВПЧ, HPV) является неотъемлемой причиной ИРШМ [2]. Несмотря на то что подавляющее большинство инфекций ВПЧ проходит спонтанно [3], персистенция ВПЧ-инфекции может приводить к интраэпителиальным поражениям, которые гистологически классифицируются как цервикальная интраэпителиальная неоплазия (ЦИН) 1–3 степени. Около 1/3 CIN3 прогрессирует до инвазии через 30 лет [4]. CIN1 считается морфологическим отражением инфекции ВПЧ, а CIN2 представляет собой смесь CIN1 и CIN3, часто регрессирующую [5]. Механизмы канцерогенеза изучены лишь частично. Прогрессирование до интраэпителиальных предраковых заболеваний происходит из-за нарушения в сигнальных путях, регулирующих клеточный цикл, опосредованных избыточной экспрессией вирусных белков E6 и E7, которые функционально инактивируют продукты генов *RB* и *p53*. Прогрессия до уровня инвазии включает в себя накопление генетических ошибок. Весь процесс является многоэтапным и включает ряд генетических и эпигенетических изменений [6].

Скрининг, основанный на ВПЧ-тестировании более эффективен, чем цитологический [7]. Однако положительная прогностическая ценность теста на ВПЧ для ЦИН высокой степени злокачественности низкая. Цитологическая верификация эффективна [7], но влечет за собой высокую частоту кольпоскопии и повторных тестов [8]. Поэтому новые маркеры, позволяющие повысить эффективность скрининга, были бы очень полезны.

МикроРНК (miRNAs) - это короткие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов, катализируя разрушение мРНК либо ингибируя трансляцию мРНК в белок [9]. Зрелая miRNA представляет собой одноцепочечную ~ 22 нуклеотидов РНК, получающуюся из первичного транскрипта [10]. miRNAs являются эпигенетическими регуляторами, специфичны для определенной ткани и модулируют экспрессию генов путем взаимодействия с комплементарными нуклеотидными последовательностями мРНК-мишеней [11]. miRNAs могут быть сверхэкспрессированы или гипэкспрессированы при раке [12], что связано с генетическими и эпигенетическими изменениями [13; 14].

Данные по клеточным линиям и предраковым заболеваниям подтверждают участие miRNAs в каждом этапе развития ИРШМ [15; 16]. Тем не менее пока мало что известно о специфических микроРНК, задействованных в этом, и механизмах их дерегуляции [17]. Аберрантная экспрессия miRNA, по-видимому, является результатом HPV-инфекции.

Некоторые гены miRNA локализируются в сайтах, где происходит интеграция HPV ДНК. Белки, кодируемые HPV, могут влиять на экспрессию микроРНК хозяина. Е6 и Е7 HPV-белки модулируют экспрессию ДНК-метилтрансфераз, ферментов, регулирующих экспрессию генов путем метилирования их промоторных областей [17; 18].

Целью данного обзора является анализ литературы, посвященной профилированию miRNA при переходе от предраковых заболеваний к ИРШМ.

Проведен анализ всех доступных исследований, посвященных нарушению регуляции экспрессии miRNA во время развития ИРШМ, особенно при интраэпителиальных поражениях. В период с января 2010 года по декабрь 2019 года в базе данных PubMed был осуществлен поиск публикаций с ключевыми словами «miRNA / microRNA», «рак шейки матки/ cervical cancer», «прогрессия», «CIN», «предраковые поражения». 24 исследования были отобраны и включены в настоящий обзор.

Для miRNAs, которые в двух или более исследованиях изменяли свою экспрессию, проводился поиск целевых генов, используя базу данных miRWalk 2.0 [19]. Полученные списки генов-мишеней были протестированы с использованием программного обеспечения Enrichr на их представленность в биологических сигнальных путях. Enrichr - это веб-приложение, которое включает различные библиотеки генов [20]. В частности, для данного исследования были использованы KEGG и VirusMint. Релевантность обогащения каждого набора генов оценивали по *p*-значению, скорректированному для множественного тестирования на основе гипергеометрического распределения [21].

Основные результаты исследований по экспрессии miRNA при прогрессировании предраковых заболеваний в рак шейки матки

Обзор 24 наиболее важных исследований представлен в таблице 1. Одни из них исследовали переход от нормального эпителия до ИРШМ, а другие сосредоточились только на интраэпителиальных поражениях. Для оценки экспрессии miRNA наиболее часто использовались следующие методы: 1) количественная ПЦР в реальном времени (18 статей), 2) технология микрочипов (5 статей) (таблица 1).

Таблица 1

Основные результаты исследований miRNA при развитии рака шейки матки

Ссылка	Дизайн исследования/ кол-во образцов	Количество анализируемых микроРНК (методика)	Повышена экспрессия микроРНК при прогрессии			Снижена экспрессия микроРНК при прогрессии		
			SCC> CIN2 / 3> CIN1 / норма	SCC> CIN2 / 3	CIN2 / 3> CIN1 / норма	CIN1 / норма> CIN 2 / 3	CIN2 / 3> SCC	норма / CIN 1> CIN2 / 3> SCC
Li B. et al., 2010 [22]	Образцы (<i>n</i> = 140) (только ВПЧ + или -)	1 микроРНК (ОТ-ПЦР)	-	-	-	-	-	Mir-34a
Li Y. et al.,	Образцы (<i>n</i> =	1 микроРНК	-	-	-	-	-	Mir-218

2010 [23]	78); 22 CIN1, 27 CIN2 и 29 CIN3.генотип. ВПЧ	(ОТ-ПЦР)						
Li B.H. et al., 2011 [24] HYPE RLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6020348/#CR32"]	Образцы (n = 125)	1 микроРНК (ОТ-ПЦР)	-	-	-	-	miR-100	-
Deftereos G. et al., 2011 [25]	Образцы (n = 142)	2 микроРНК (ПЦР)	микроРНК-21					
Wang X. et al., 2014 [26]	Образцы (n = 158):	8 микроРНК (ПЦР)	miR-7a miR-25 miR-92a miR-378 (miR-25, miR-92a и miR-378)	микроРНК-16				miR-29a
Leung C. et al., 2014 [27]	Образцы (n = 37): 10 SCC, 16 CIN2 / 3 и 11 CIN 1	1 микроРНК (ПЦР)	miR-135a					
Goczze K. et al., 2015 [28]	Образцы (n = 98)	6 микроРНК (ПЦР)	miR-21 miR-27a miR-155		микроРНК-196			miR-34a miR-203
Shishodia G. et al., 2015 [29]	Образцы (n = 102)	2 микроРНК (ПЦР)	miR-21					let-7a
Zheng W. et al., 2015 [30]	Образцы (n = 140)	1 микроРНК (ПЦР)	miR-31					
Ma L. et al., 2015 [31]	Образцы (n = 163):	1 микроРНК (ПЦР)	miR-146a					
Bumrunghai S. et al., 2015 [32]	Образцы (n = 111): 43 SCC, 22 CIN II-III, CIN I, 12 цервицитов и 20 нормальных тканей -	1 микроРНК (ПЦР)	miR-21 (без значительного увеличения между CIN II-III и CIN I)					
Jimenez-Wences H. et al., 2016 [33]	Образцы (n = 49)	3 микроРНК (ПЦР)	miR-193b				miR-218 miR-124	
Wen F. et al., 2017 [34]	Образцы (n = 607)	1 микроРНК (ПЦР)	miR-15b					
Sun P. et al., 2017 [35]	Образцы (n = 165)	1 микроРНК (ПЦР)	микроРНК-466					
	Исследования цитологического материала							
Tian Q. et al., 2014 [36]	Образцы (n = 1021)	6 микроРНК, (ПЦР)						miR-34a miR-218 miR-375 miR-424
Ribeiro J. et al., 2015 [37]	Образцы (n = 114)	2 микроРНК (ПЦР)						miR-34a miR-125b
Malta M. et al., 2015 [38]	Образцы (n = 73):	1 микроРНК (ПЦР)						let-7c
	Исследования биопсийного материала							
Pereira P.M. et al., 2010 [39]	Образцы (n = 25): 4 SCC, 5 HSIL, 9 LSIL и 19 нормальных тканей (только	281 микроРНК (микрочипы)	miR-10a miR-132 miR-148a miR-196a miR-302b	miR-16 miR-27 miR-197 miR-106 miR-	-	-	miR-522-5p miR-512-3p	miR-26a miR-29a miR-99a miR-143 miR-145

	HPV + или -)			142-5p miR-205				miR-199a miR-203
Li Y. et al., 2011 [40]	Образцы (<i>n</i> = 18): 6 HPV-положительных SCCs, 6 HPV - положительных CIN2 / 3 и 6 нормальных тканей. Образцы (<i>n</i> = 91): 24 HPV положительных SCCs, 24 ВПЧ-положительные CIN2 / 3 и 43 нормальные ткани, генотип. ВПЧ	875 микроРНК (микрочип) + Проверка: 6 микроРНК (ПЦР)	miR-15b miR-16 miR-17 miR-20a miR-20b miR-25 miR-31 miR-92a miR-92b miR-93 miR-106a miR-182 miR-185 miR-155 miR-221 miR-222 miR-224					let-7b miR-10b miR-29a miR-29c miR-99a miR-100 miR-125b miR-126 miR-145 miR-195 miR-199a-3p miR-218 miR-375 miR-424
Zeng K. et al., 2015 [41]	Образцы (<i>n</i> = 12) Образцы (<i>n</i> = 103). Генотипирование ВПЧ	866 человеческих и 89 вирусных микроРНК (микрочип) Валидация 9 микроРНК (ПЦР)	miR-9 miR-21 miR-31					miR-195 miR-199b-5p miR-218 miR-376a miR-497
Wilting S.M. et al., 2013 [14]	Образцы (<i>n</i> = 47): 10 SCC, 9 AdCAs, 18 CIN2 / 3 и 10 нормальных тканей	472 микроРНК (микрочипы Agilent)	let-7i miR-19b miR-21 miR-25 miR-28-5p miR-30e miR-34a miR-34b * (miR-34b-5p) miR-92a miR-92b miR-106b miR-146a miR-181d miR-200a * (miR-200a-5p)	miR-7d miR-9 miR-15a miR-15b miR-16 miR-17 miR-17 * (miR-17-3p) miR-18a miR-19a miR-20b miR-24 miR-27 miR-30d miR-93 miR-106a	let-7 g miR-10a miR-26a miR-29a miR-29b miR-29c miR-30a miR-34c-5p miR-101 miR-125a-5p miR-135b miR-143 miR-145 miR-146b-5p miR-150 miR-181b miR-191 miR-192	miR-193a-3p miR-205 miR-212 miR-221 miR-27a miR-27b miR-484 miR-636 miR-770-5p	miR-100 miR-125b miR-148a miR-188-5p miR-195 miR-199a-5p miR-199b-3p miR-218 miR-26b miR-375 miR-376a miR-378	miR-134 miR-149 miR-193b miR-203 miR-210 miR-23b miR-296-5p miR-365 miR-370 miR-493 miR-572 miR-575 miR-617 miR-622 miR-638
Cheung T.H. et al., 2012 [42]	Образцы (<i>n</i> = 33): образцы биопсии пациентов 12 CIN2, 12 CIN3, 9 CC и 9 нормальными клетками	202 микроРНК (ПЦР)	miR-9 miR-20b		miR-10a miR-34b miR-34c miR-338 miR-345 miR-424 miR-512-5p miR-518a			miR-193b miR-203
Bierkens M. et al., 2013 [43]	Образцы (<i>n</i> = 28)	1 микроРНК (ОТ-ПЦР)						miR-375
Villegas-Ruiz V. et al., 2014 [44]	Образцы (<i>n</i> = 8) Образцы (<i>n</i> = 45)	Обнаружение: 7788 микроРНК Валидация: 1 микроРНК (ПЦР)		miR-196a				

Сокращения: AdCA - аденоматозная карцинома, CIS - карцинома in situ, ICC - инвазивный рак шейки матки, SCC - плоскоклеточный рак шейки матки, HSIL - плоскоклеточное интраэпителиальное поражение, FFPE - фиксированный формалином, заключенный в парафин.

Только 1 исследование качественно проанализировало экспрессию miRNA с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [43]. Исследования, выполненные на микрочипах, различались по количеству исследованных микроРНК (от 202 до 875). В исследованиях микроРНК-кандидатов авторы анализировали только одну или несколько микроРНК на

основании литературных данных или своих собственных предыдущих исследований. В нескольких исследованиях был проведен скрининг с последующей проверкой с использованием ПЦР [40; 41].

В целом между исследованиями наблюдается большая вариабельность как в отношении количества исследуемых образцов (от 12 до 1021), так и типа образцов. В большинстве исследований были проанализированы фиксированные формалином, залитые парафином ткани (FFPE) или замороженные ткани шейки матки [37; 38]. В нескольких исследованиях приведены данные о генотипировании ВПЧ или по крайней мере об определении ВПЧ-негативных и позитивных.

Первое исследование на микрочипах было опубликовано Pereira и его коллегами в 2010 году [39]: выявлено 281 микроРНК в 25 биологических образцах и показана высокая вариабельность экспрессии miRNA, особенно среди нормальных образцов. Была обнаружена 21 микроРНК со статистически значимой дифференциальной экспрессией между пулом нормальных образцов, группой CIN1 и CIN3 и образцами плоскоклеточного рака шейки матки (ПРШМ). Экспрессия 8 таких miRNAs (miR-26a, miR-29a, miR-143, miR-145, miR-99a, miR-199a, miR-203 и miR-513) постепенно снижалась, а экспрессия 5 miRNAs (miR-10a, miR-132, miR-148a, miR-196a и miR-302b) увеличивалась в этих группах. Также наблюдалось уменьшение экспрессии от нормальной ткани к CIN с последующим увеличением от CIN к SCC для 6 микроРНК (miR-16, miR-27a, miR-106a, miR-142-5p, miR-197 и miR-205) и увеличение с последующим уменьшением в 2 раза для miR-522(miR-522-5p) и miR-512-3p.

Следующее исследование на микрочипах было выполнено Li Y. и коллегами на 18 образцах, включая HPV16-позитивные ПРШМ и CIN [40]. Из 875 протестированных микроРНК 31 (14 с пониженной и 17 с повышенной) показала значительные тенденции изменения экспрессии от нормального эпителия к опухоли. 6 из них (miR-29a, miR-92a, miR-99a, miR-155, miR-195 и miR-375) были подтверждены с помощью ПЦР на 91 образце биопсии (24 ПРШМ и 24 CIN2/3, 43 образца нормальной ткани). Обнаруженное снижение экспрессии miR-99a и miR-29a подтвердило результаты Pereira et al. [39]. Экспрессия miR-218 была наиболее значительно снижена, что подтверждается и последующими исследованиями Wilting et al. [14] и Zeng et al. [41]. В исследовании, проведенном Li Y. и коллегами [23], эта miRNA также показала более низкие уровни экспрессии у пациентов с CIN2-3, чем у пациентов с CIN1. Эта микроРНК имеет сотни генов-мишеней, включая *LAMB3*, который увеличивает клеточную миграцию и способствует канцерогенезу на мышинной модели и в кератиноцитах человека [23]. Li Y. и коллеги [40] также сравнивали экспрессию miRNA в CIN2/3 и ПРШМ с инфекцией HPV16 с нормальными тканями шейки матки без HPV. Две группы показали значительную разницу только для miR-375 и miR-99a.

В другом исследовании Li Y. и коллег [40] уровни miR-100 были значительно ниже в CIN3, чем в CIN1 и CIN2 [14; 24]. Этот результат также был подтвержден *in vitro* Li B.H. et al. на клеточных линиях шейки матки [24]. Подавление miR-100 его специфическим ингибитором заметно стимулировало рост клеток, уменьшало апоптоз клеток и ускоряло прогрессирование фазы G2/M в клетках HaCaT, которые конститутивно экспрессируют высокий уровень этой miRNA. Эти результаты указывают на то, что сниженная экспрессия miR-100 может способствовать канцерогенезу шейки матки, регулируя рост клеток, клеточный цикл и апоптоз.

В исследовании Cheung и коллег экспрессию панели из 202 микроРНК исследовали в образцах нормального эпителия, CIN2, CIN3 и ИРШМ с использованием платформы qPCR [42]. 12 микроРНК (10 с повышенной и 2 с пониженной экспрессией) дифференциально экспрессировались в биопсийных образцах с CIN2/3 по сравнению с нормальными эпителиальными клетками шейки матки. Эта сигнатура из 12 микроРНК могла четко отделить CIN2/3 от нормальной ткани в независимой группе образцов (6 CIN2, 18 CIN3, 9 нормальных) и пациентов с ПРШМ (51) от лиц с нормальным эпителием шейки матки, но не CIN2 от CIN3. В целом miR-20b и miR-9 показали наивысший уровень экспрессии. Экспрессия miR-9 была также значительно выше при ПРШМ, чем при CIN2/3. Авторы считают, что miR-9 представляет особый интерес, потому что она стимулирует ангиогенез в зависимости от типа клеток [42]. Было показано, что miR-9, опосредованно понижая экспрессию E-кадгерина, приводит к активации β -катенина, что в свою очередь приводит к усилению регуляции целевого гена *VEGFA*, проангиогенного фактора [45]. Как при CIN, так и при ПРШМ наблюдали подавление экспрессии E-cadherin, что согласуется с описанным выше повышением miR-9 при CIN и ПРШМ [42].

Уилтинг и соавторы [14] исследовали с помощью микрочипов экспрессию 472 miRNAs у 47 субъектов (нормальный эпителий, CIN2/3, ПРШМ) и сравнивали их дифференциальную экспрессию с гистологией. В общей сложности 106 микроРНК были дифференциально экспрессированы при CIN2/3 и ПРШМ по сравнению с нормальным эпителием. Некоторые из этих miRNA подтвердили результаты Pereira et al. [39] и Cheung et al. [42], а также наблюдения Li et al. [14; 40] по увеличению miR-155 при переходе от CIN1 к ПРШМ. Zeng K. и его коллеги [41] сравнили профили экспрессии miRNA при ИРШМ, CIN и в нормальных тканях шейки матки с помощью микрочипового анализа и обнаружили, что экспрессия некоторых miRNAs значительно нарушена. В частности, 16 miRNAs имели повышенную экспрессию, а 10 значительно сниженную при сравнении ПРШМ с нормальной тканью. miR-21, miR-21-3p, miR-15b и miR-16 были наиболее сверхэкспрессированными, тогда как miR-218 и miR-376 были наиболее гипоэкспрессированными. 44 miRNAs были

дифференциально экспрессированы (13 повышено и 31 понижено) при сравнении CIN2/3 с нормальной тканью шейки матки. При сравнении CIN1 с нормальной тканью дифференциально экспрессированных микроРНК обнаружено не было. 9 miRNAs (miR-21, miR-218, miR-376a, miR-31, miR-630, miR-9, miR-195, miR-497, и miR-199b-5p), дифференциально экспрессированные в образцах шейки матки, были подтверждены с помощью ПЦР в 103 образцах с аналогичными характеристиками. Экспрессия miR-21, miR-31 и miR-9 была значительно повышена при ИРШМ, как обнаружено и в других работах [25-27; 40]. Методом ПЦР также было подтверждено, что экспрессия miR-218, miR-195, miR-497 и miR-199b-5p значительно снижена при ИРШМ и CIN2/3, а miR-376a только при ИРШМ, но не в CIN2 / 3. Однако при этом не наблюдалось дифференциальной экспрессии miRNA между CIN1 и нормальной тканью. Авторы выдвинули гипотезу, что miRNAs с пониженной экспрессией как при ИРШМ, так и при CIN2/3 могут быть вовлечены в аномальное превращение предраковых поражений в рак.

В других исследованиях изучали микроРНК, ранее идентифицированные как незначимые в развитии ИРШМ. Villegas-Ruiz и соавторы [46] после исследования профилей miRNA в опухолях по сравнению со нормальной тканью с помощью микрочипов сосредоточили внимание на экспрессии miR-196a в отношении её роли в прогрессировании ИРШМ: показали увеличение экспрессии этой miRNA при переходе от нормальных тканей к CIN и опухолям, подтверждая выводы Pereira et al. В исследовании Gosze [28] экспрессия miR-196a также увеличивалась при CIN1 и CIN2/3, но была значительно ниже при ИРШМ, чем при CIN2/3.

Leung с коллегами обнаружили сверхэкспрессию miR-135a при ИРШМ по сравнению с CIN1 и CIN2/3 в образцах FFPE блоков [27]. Авторы показали, что miR-135a регулирует передачу сигналов Wnt/ β -catenin через гены-мишени *SIAT1* и, возможно, *APC*. Это может в конечном итоге вызвать трансформацию в ИРШМ, при этом miR-135a также регулирует миграцию и пролиферацию раковых клеток.

Li B. et al. [22] исследовали экспрессию pri-miR-34a, предшественника miR-34a, в нормальном эпителии шейки матки, CIN и ИРШМ с помощью полуколичественной ОТ-ПЦР. Экспрессия pri-miR-34a была значительно снижена в группах CIN и ИРШМ по сравнению с нормальным эпителием. Снижение экспрессии pri-miR-34a, связанное с инфекцией HPV, происходило до морфологических нарушений эпителия шейки матки и до изменений, индуцированных HR-HPV E6 в p53-зависимом сигнальном пути. Таким образом, авторы пришли к выводу, что это начальное событие в развитии ИРШМ, и что miR-34a и его предшественник могут рассматриваться как потенциальные молекулярные маркеры для скрининга и мишени для блокирования развития ИРШМ.

Дифференциально экспрессирующиеся микроРНК и их гены-мишени

Список микроРНК, для которых установлено повышение экспрессии (17) или понижение экспрессии (13) при прогрессировании ИРШМ в нескольких исследованиях, приведен в таблице 2. Среди сверхэкспрессированных микроРНК: 1) по данным 5 исследований - одна (miR-21), 2) по данным 3 других исследований - 9 (miR-9, miR-16, miR-25, miR-10a, miR-20b, miR-31 miR- 92a, miR-106a и miR-155) и 3) по данным 2 исследований - 8 (miR-15b, miR-17, miR-27a, miR-92b, miR-93, miR-146a, miR-185 и miR-196a) связаны с канцерогенезом шейки матки. Среди гипозэкспрессированных miRNAs подобная ассоциация была обнаружена для miR-218 в 6 исследованиях, для miR-375 и miR-203 в 4 исследованиях и для miR-99a, miR-29a, miR-195, miR-125b, miR-34a и miR-100 в 3 исследованиях. На рисунке 1 представлена информация о совпадении данных разных исследований.

Таблица 2

miRNAs, участвующие в развитии РШМ, выявленные в более чем одном исследовании

микроРНК	Ссылка на исследование	микроРНК	Ссылка на исследование
miR-15b ^a , miR-17, miR-92b, miR-93, miR-185, miR-16, miR-106a	[14; 40]	miR-218	[14; 23; 36; 40; 41]
miR-92a, miR-25	[14; 26]	miR-375	[14; 36; 40; 43]
miR-21	[25; 29; 32; 41]	miR-99a	[14; 39; 40]
miR-10a	[14; 39; 42]	miR-29a	[26; 39; 40]
miR-20b	[14; 40; 42]	miR-203	[14; 28; 39; 42]
miR-155	[14; 38; 40]	miR-195	[14; 40; 41]
miR-9	[14; 41; 42]	miR-125b	[14; 37; 40]
miR-31	[30; 40; 41]	miR-34a	[28; 36; 37]
miR-27a	[28; 39]	miR-100	[14; 24; 40]
miR-146a	[14; 31]	miR-145	[39; 40]
miR-196a	[39; 44]	miR-424	[36; 40]
miR-193b ^b	[14; 42]	miR-497	[14; 41]

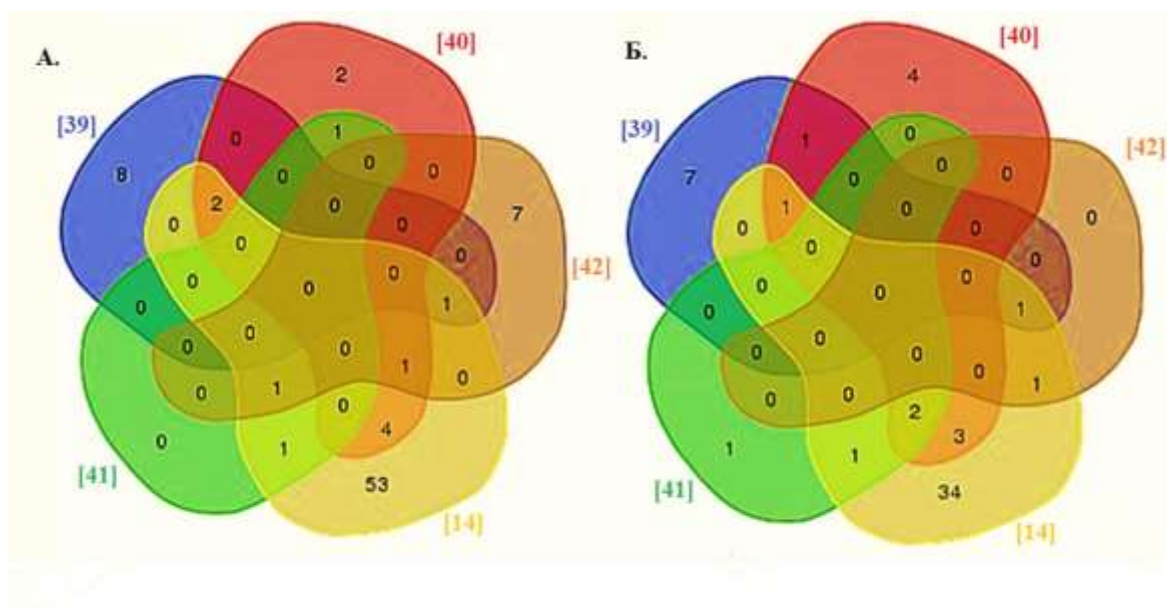


Рис. 1. Диаграмма Венна, показывающая (А) повышенную и (Б) пониженную экспрессию miRNAs в разных исследованиях

Количество экспериментально подтвержденных генов-мишеней для вышеупомянутых микроРНК, полученных в базе данных miRWalk 2.0, представлено в таблице 3.

Около 16671 генов-мишеней было идентифицировано для гиперэкспрессированных микроРНК и 7075 генов для микроРНК с пониженной экспрессией. После удаления из этого перечня генов с множественными сайтами связывания miRNA, а также генов, общих между гиперэкспрессированными микроРНК и микроРНК с пониженной экспрессией, осталось 3395 и 1575 генов соответственно. Анализ обогащения генов-мишеней для микроРНК с пониженной экспрессией обеспечил статистически значимые данные об избыточной репрезентации и Kegg биологических путях (таблица 4). Впоследствии анализ обогащения был сосредоточен только на генах-мишенях микроРНК, обнаруженных в большом количестве исследований (элементы Kegg pathway и Virus Mint).

Таблица 3

Гены-мишени для miRNAs, участвующих в прогрессии ИРШМ (данные из miRWalk 2.0)

Гены-мишени miRNA со сниженной экспрессией (n)	Гены-мишени miRNA с повышенной экспрессией (n)	Гены-мишени (без множественных сайтов-мишеней) miRNA со сниженной экспрессией (n)	Гены-мишени (без множественных сайтов-мишеней) miRNA с повышенной экспрессией (n)	Уникальные гены-мишени miRNA со сниженной экспрессией	Уникальные гены-мишени miRNA с повышенной экспрессией
7075	16671	3584	5987	1576	3564

Таблица 4

Анализ обогащения для генов-мишеней микроРНК, участвующих в прогрессии ИРШМ (Kegg pathway и Virus Mint)

№	Kegg pathway	P-value	Z-score	Virus Mint	P-value	Z-score
1	Viral carcinogenesis_Homo sapiens	9.94E-2	-1.98	Epstein-Barr virus (strain GD1)	8.24E-13	-1.19
2	Pathways in cancer_Homo sapiens	9.51E-1	-2.06	Human immunodeficiency virus 1	2.13E-08	-0.93
3	Proteoglycans in cancer_Homo sapiens	5.83E-1	-1.99	Homo sapiens	5.09E-07	-0.53
4	Hepatitis B_Homo sapiens_hsa05161	1.58E-0	-1.86	Human papillomavirus type 16	3.19E-05	-0.49
5	HTLV-I infection_Homo sapiens_hsa05166	1.78E-10	-1.82	Human adenovirus 5	2.57E-04	-0.07
6	Cell cycle_Homo sapiens_hsa04110	1.74E-10	-1.63	Human papillomavirus type 11	7.22E-04	-0.03
7	Prostate cancer_Homo sapiens_hsa05215	3.60E-08	-1.8	Human immunodeficiency virus type 1	1.12E-03	1.17
8	Endocytosis_Homo sapiens_hsa04144	5.14E-08	-1.77	Human adenovirus 2	2.55E-03	1.46
9	Chronic myeloid leukemia_Homo sapiens	5.13E-08	-1.71	Simian virus 40	6.24E-03	1.29
10	Epstein-Barr virus infection_Homo sapiens	6.12E-08	-1.73	Vaccinia virus	8.74E-03	3.98

Потенциальные гены-мишени miRNA были также протестированы в базе данных CCDB, где перечислены 257 генов с повышенной экспрессией и 110 со сниженной экспрессией при ИРШМ. Среди тех генов, которые ранее были идентифицированы как

мишени для микроРНК с пониженной экспрессией (соответственно сами гены должны быть сверхэкспрессированы при прогрессировании до ИРШМ), 22 (8,5%) действительно были сверхэкспрессированы при ИРШМ. С другой стороны, среди генов-мишеней микроРНК с повышенной экспрессией (соответственно эти гены должны быть слабо экспрессированы при развитии ИРШМ) 34 (30,9%) действительно были гипоекспрессированы при ИРШМ (таблица 5).

Таблица 5

Гены-мишени miRNAs при развитии ИРШМ

Гиперэкспрессированные гены (n=22)		Гипоекспрессированные гены (n=34)			
APLP2	KLK2	ANLN	ITM2C	NDUFS6	VEGFC
CTSS	KRT10	APOL2	KIT	PCNA	
DAP3	MEF2A	BCL2L1	KRT7	PDGFRA	
EPB41L4B	NTN4	CEACAM6	KRT8	PIGF	
GARS	OAT	CRABP2	MAP3K11	PIGT	
GATA3	PA2G4	CTGF	MCM2	S100A8	
HYAL1	PDIA3	ERBB4	MMP1	SAA1	
KLF3	RTN3	FGFR2	MMP12	SFN	
THBS1	SERPINB5	IER5	MMP14	STAT1	
TIMP3	SMAD2	IFI6	MYCN	TBC1D1	
TGFB1		IMP3	NDRG1	TPX2	

Таким образом, в разных исследованиях неоднократно было обнаружено, что уровни экспрессии нескольких miRNAs связаны с развитием предраковых поражений в ИРШМ (рисунок 2).

Гиперэкспрессированная микроРНК miR-21, ассоциированная с CIN и ИРШМ в 4 исследованиях [14; 25; 41], представляет особый интерес. miR-21 является одной из наиболее широко распространенных микроРНК у млекопитающих. Её активация связана со многими видами рака, различного происхождения [47]. Определение функции miR-21 было объектом многих исследовательских групп за последние 10 лет. miR-21 взаимодействует с большим количеством генов-мишеней и тонко реагирует на внеклеточные сигналы. Хотя miR-21 был признан ключевым регулятором многих процессов, вовлеченных в контроль пролиферации клеток, он также связан с ключевыми процессами при воспалении. В отличие от других микроРНК, miR-21 не просто характерен для провоспалительного или иммуносупрессивного статуса, но он действует как ключевой сигнал, опосредующий их баланс [47]. Другие микроРНК, изменение экспрессии которых показано в данном обзоре (miR-125b, miR-155, miR-146a), играют важную роль в иммунном ответе и воспалении [48]. Например, при развитии ИРШМ наблюдается пониженная экспрессия miR-125b. Интересно, что эта miRNA играет важную роль в иммунном ответе и воспалении, но может действовать как онкоген и онкосупрессор. miR-125b связан с HPV-индуцированным канцерогенезом по двум сигнальным путям: а) имеет гомологию с HPV-L2, которая необходима для сборки вирусного капсида (поэтому после ранней инфекции miR-125b может ингибировать репликацию HPV); б) miR-125b приводит к инактивации сигнального пути p53, таким

образом, поддерживая клетки, пораженные вирусом, жизнеспособными. Это может привести к повышенному риску интеграции ВПЧ-генома и развитию опухолевого поражения [16].

Обнаружено, что miR-34a, miR-125 и miR-375 снижают экспрессию при переходе от нормального эпителия к ИРШМ как в тканях, так и в клетках цитологических мазков. Это открывает возможность применения этих микроРНК в процессе тестирования больших групп населения. Основным ограничением существующих исследований является ограниченное число включенных в них объектов. В принципе, только образцы, включающие все поражения, выявленные при популяционном скрининге, и случайную выборку здоровых женщин из той же группы, должны отбираться для подобных исследований. Вместо этого большинство исследований проводилось на вспомогательных материалах, происхождение и принцип выбора которых подробно не описаны. При этом экспрессия одних микроРНК была дизрегулирована на всех стадиях канцерогенеза, других только при переходе от CIN2/3 к ИРШМ [14; 42] (рисунок 2). При изучении роли экспериментально подтвержденных генов-мишеней микроРНК, идентифицированных как изменяющие экспрессию при канцерогенезе шейки матки, было обнаружено много сигнальных путей, имеющих отношение к возникновению и прогрессированию ИРШМ. Интересно, что совпадение данных исследований на основе микрочипов было ограниченным. Это может быть связано с различиями в дизайне исследования и группах пациентов (разные этнические группы) или с небольшим количеством исследованных образцов ИРШМ и CIN. Также во всех исследованиях использовались разные микрочипы, содержащие различное количество и типы зондов miRNA. Из наиболее важных микроРНК с нарушением экспрессии, определенных в многочисленных исследованиях, следует отметить miR-10a [14; 42], miR-20b [14; 40], miR-9 [14; 41; 42], miR-16 и miR-106a [14; 39] (с повышенной экспрессией) и miR-99a [14; 39; 40], miR-203 [14; 39; 42] и miR-195 [14; 40; 41] (с пониженной экспрессией). Несмотря на быстро растущее число обнаруженных микроРНК (в настоящее время более 2600), большинство исследований сосредоточено на первых 800 микроРНК. В последнее время возросло использование технологии секвенирования следующего поколения (NGS) для профилирования экспрессии miRNA. Секвенирование малых РНК, позволяющее также обнаруживать другие небольшие некодирующие РНК (пиРНК, тРНК), обладает наибольшей чувствительностью обнаружения и высочайшей точностью в анализе дифференциальной экспрессии. Для применения методов NGS к малым РНК стандартизация экспериментальных и биоинформационных протоколов только началась. Тем не менее в ближайшем будущем ожидается значительное увеличение числа исследований, посвященных применению NGS к miRNAs, в том числе при канцерогенезе шейки матки. Идеальным подходом было бы применение NGS в однородных крупномасштабных исследованиях для исследования всего

«miRNome» (всей совокупности микроРНК, по аналогии с геномом) с целью выявления надежных miRNA-кандидатов, релевантных для прогрессирования ИРШМ [49].

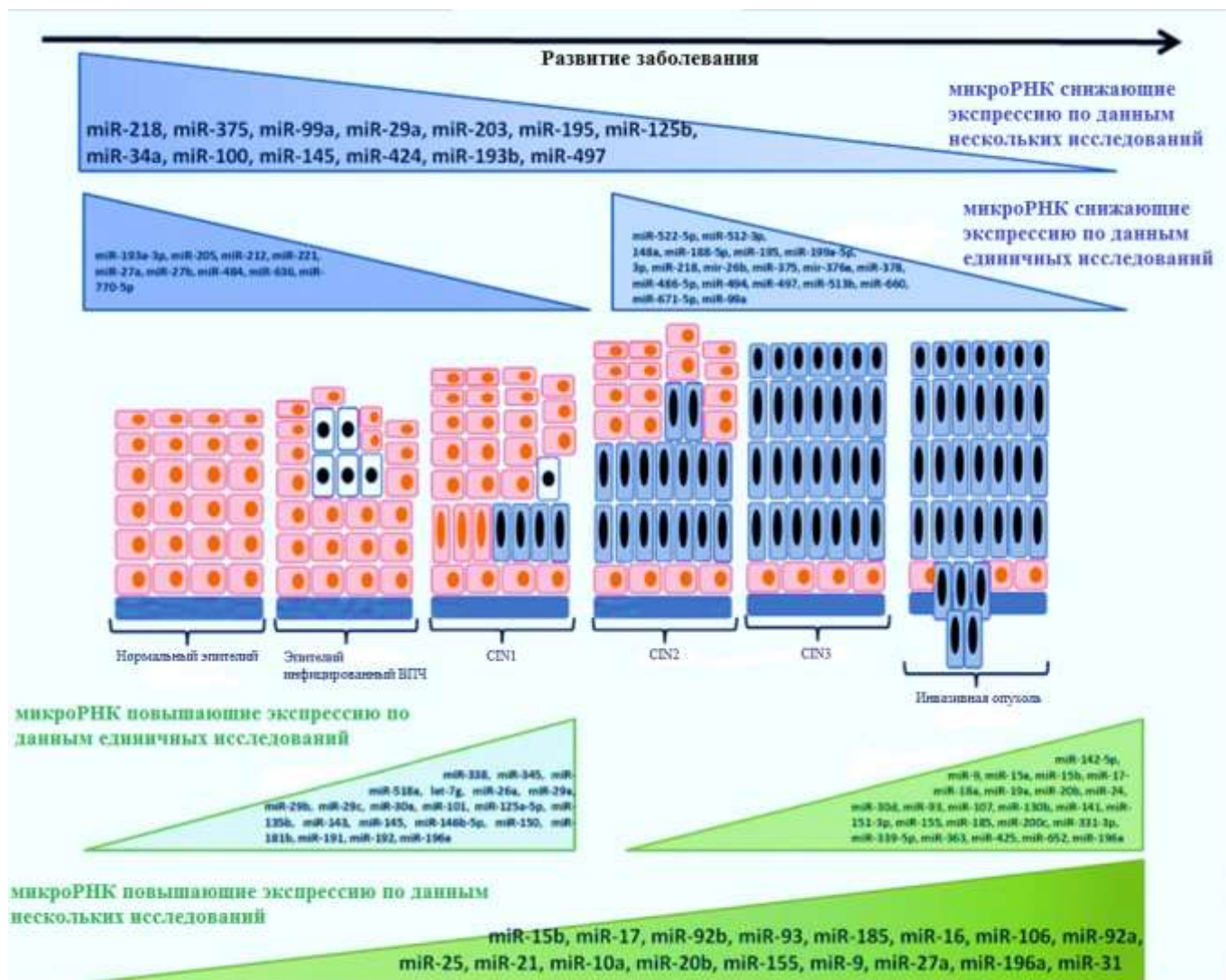


Рис. 2. Сводная информация о нарушении экспрессии miRNAs при развитии рака шейки матки

Заключение. Важная проблема скрининга ИРШМ заключается в том, что пока нет однозначного ответа на вопрос, могут ли определенные сигнатуры miRNA быть ассоциированы с риском CIN высокой степени. Исследование уровней miRNA в клетках шейки матки с цитологических препаратов, безусловно, открывает новые перспективы применения молекулярных маркеров в программах скрининга.

Список литературы

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D.M., Piñeros M., Znaor A., Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer*. 2019. V. 144(8). P.1941-1953.
2. Bosch F.X., Broker T.R., Forman D., Moscicki A.B., Gillison M.L., Doorbar J., Stern P.L., Stanley M., Arbyn M., Poljak M. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*. 2013. V. 31(Suppl 7). P. 1–31.
3. Rodriguez A.C., Schiffman M., Herrero R., Wacholder S., Hildesheim A., Castle P.E., Solomon D., Burk R. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J. Natl. Cancer Inst.* 2008. V. 100(7). P. 513–517.
4. McCredie M.R., Paul C., Sharples K.J., Baranyai J., Medley G., Skegg D.C., Jones R.W. Consequences in women of participating in a study of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia 3. *Aust. N Z J Obstet Gynaecol*. 2010. V. 50(4). P. 363–370.
5. Castle P.E., Schiffman M., Wheeler C.M., Solomon D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. *Obstet Gynecol*. 2009. V. 113(1). P. 18–25.
6. Schiffman M., Yu K., Zuna R., Terence Dunn S., Zhang H., Walker J., Gold M., Hyun N., Rydzak G., Katki H.A. Proof-of-principle study of a novel cervical screening and triage strategy: computer-analyzed cytology to decide which HPV-positive women are likely to have \geq CIN2. *Int. J. Cancer*. 2017. V. 140(3). P. 718–725.
7. Ronco G., Dillner J., Elfstrom K.M., Tunesi S., Snijders P.J., Arbyn M., Kitchener H., Segnan N., Gilham C., Giorgi-Rossi P. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*. 2014. V. 383. P. 524–532.
8. Ronco G., Zappa M., Franceschi S., Tunesi S., Caprioglio A., Confortini M., Del Mistro A., Carozzi F, Segnan N, Zorzi M. Impact of variations in triage cytology interpretation on human papillomavirus-based cervical screening and implications for screening algorithms. *Eur. J. Cancer*. 2016. V. 68. P. 148–155.
9. Farazi T.A., Hoell J.I., Morozov P., Tuschl T. MicroRNAs in human cancer. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2013. V. 774. P. 1–20.
10. Palanichamy J.K., Rao D.S. miRNA dysregulation in cancer: towards a mechanistic understanding. *Front Genet*. 2014. V. 5. P. 54.
11. Macfarlane L.A., Murphy P.R. MicroRNA: biogenesis, function and role in Cancer. *Curr. Genomics*. 2010. V. 11(7). P. 537–561.
12. Lin S., Gregory R.I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015. V. 15(6). P. 321–333.

13. Iorio M.V., Croce C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J.* 2012. V. 18(3). P. 215–222.
14. Wilting S.M., Snijders P.J., Verlaat W., Jaspers A., Wiel M.A., Wieringen W.N., Meijer G.A., Kenter G.G., Yi Y., Sage C. Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. *Oncogene.* 2013. V. 32. P. 106-116.
15. Rao Q., Shen Q., Zhou H., Peng Y., Li J., Lin Z. Aberrant microRNA expression in human cervical carcinomas. *Med. Oncol.* 2012. V. 29(2). P. 1242–1248.
16. Ribeiro J., Sousa H. MicroRNAs as biomarkers of cervical cancer development: a literature review on miR-125b and miR-34a. *Mol. Biol. Rep.* 2014. V. 41(3). P. 1525–1531.
17. Wilting S.M., Steenbergen R.D., Tijssen M., van Wieringen W.N., Helmerhorst T.J., van Kemenade F.J., Bleeker M.C., van de Wiel M.A., Carvalho B., Meijer G.A. Chromosomal signatures of a subset of high-grade premalignant cervical lesions closely resemble invasive carcinomas. *Cancer Res.* 2009. V. 69(2). P. 647–655.
18. Chaiwongkot A., Vinokurova S., Pientong C., Ekalaksananan T., Kongyingyoes B., Kleebkaow P., Chumworathayi B., Patarapadungkit N., Reuschenbach M., von Knebel Doeberitz M. Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int. J. Cancer.* 2013. V. 132(9). P. 2087–2094.
19. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk-database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* 2011. V. 44. P. 839-847.
20. Chen E.Y., Tan C.M., Kou Y., Duan Q., Wang Z., Meirelles G.V., Clark N.R., Ma'ayan A. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics.* 2013. V. 14. P. 128.
21. Reimand J., Isserlin R., Voisin V., Kucera M., Tannus-Lopes C., Rostamianfar A., Wadi L., Meyer M., Wong J., Xu C., Merico D., Bader G.D. Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat. Protoc.* 2019. V. 14. P. 482-517.
22. Li B., Hu Y., Ye F., Li Y., Lv W., Xie X. Reduced miR-34a expression in normal cervical tissues and cervical lesions with high-risk human papillomavirus infection. *International journal of gynecological cancer.* 2010. V. 20(4). P. 597–604.
23. Li Y., Liu J., Yuan C., Cui B., Zou X., Qiao Y. High-risk human papillomavirus reduces the expression of microRNA-218 in women with cervical intraepithelial neoplasia. *The Journal of international medical research.* 2010. V. 38(5). P. 1730–1736.
24. Li B.H., Zhou J.S., Ye F., Cheng X.D., Zhou C.Y., Lu W.G., Xie X. Reduced miR-100 expression in cervical cancer and precursors and its carcinogenic effect through targeting PLK1 protein. *Eur. J. Cancer.* 2011. V. 47(14). P. 2166–2174.

25. Deftereos G., Corrie S.R., Feng Q., Morihara J., Stern J., Hawes S.E., Kiviat N.B. Expression of mir-21 and mir-143 in cervical specimens ranging from histologically normal through to invasive cervical cancer. *PLoS One*. 2011. V. 6(12). P. e28423.
26. Wang X., Wang H.K., Li Y., Hafner M., Banerjee N.S., Tang S., Briskin D., Meyers C., Chow L.T., Xie X. microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111(11). P. 4262–4267.
27. Leung C.O., Deng W., Ye T.M., Ngan H.Y., Tsao S.W., Cheung A.N., Pang R.T., Yeung W.S. miR-135a leads to cervical cancer cell transformation through regulation of beta-catenin via a SIAH1-dependent ubiquitin proteosomal pathway. *Carcinogenesis*. 2014. V. 35(9). P. 1931–1940.
28. Gocze K., Gombos K., Kovacs K., Juhasz K., Gocze P., Kiss I. MicroRNA expressions in HPV-induced cervical dysplasia and cancer. *Anticancer Res*. 2015. V. 35(1). P. 523–530.
29. Shishodia G., Shukla S., Srivastava Y., Masaldan S., Mehta S., Bhambhani S., Sharma S., Mehrotra R., Das B.C., Bharti A.C. Alterations in microRNAs miR-21 and let-7a correlate with aberrant STAT3 signaling and downstream effects during cervical carcinogenesis. *Mol. Cancer*. 2015. V. 14. P. 116.
30. Zheng W., Liu Z., Zhang W., Hu X. miR-31 functions as an oncogene in cervical cancer. *Arch Gynecol. Obstet*. 2015. V. 292(5). P. 1083–1089.
31. Ma L., Hong Y., Lu C., Chen Y., Ma C. The occurrence of cervical cancer in Uygur women in Xinjiang Uygur autonomous region is correlated to microRNA-146a and ethnic factor. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2015. V. 8(8). P. 9368–9375.
32. Bumrunghai S., Ekalaksananan T., Evans M.F., Chopjitt P., Tangsiriwatthana T., Patarapadungkit N., Kleebkaow P., Luanratanakorn S., Kongyingyoes B., Worawichawong S. Up-regulation of miR-21 is associated with cervicitis and human papillomavirus infection in cervical tissues. *PLoS One*. 2015. V. 10(5). P. e0127109.
33. Jimenez-Wences H., Martinez-Carrillo D.N., Peralta-Zaragoza O., Campos-Viguri G.E., Hernandez-Sotelo D., Jimenez-Lopez M.A., Munoz-Camacho J.G., Garzon-Barrientos V.H., Illades-Aguiar B., Fernandez-Tilapa G. Methylation and expression of miRNAs in precancerous lesions and cervical cancer with HPV16 infection. *Oncol. Rep*. 2016. V. 35(4). P. 2297–2305.
34. Wen F., Xu J.Z., Wang X.R. Increased expression of miR-15b is associated with clinicopathological features and poor prognosis in cervical carcinoma. *Arch. Gynecol. Obstet*. 2017. V. 295(3). P. 743–749.
35. Sun P., Shen Y., Gong J.M., Zhou L.L., Sheng J.H., Duan F.J., New A. MicroRNA expression signature for cervical Cancer. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2017. V. 27(2). P. 339–343.

36. Tian Q., Li Y., Wang F., Xu J., Shen Y., Ye F., Wang X., Cheng X., Chen Y., Wan X. MicroRNA detection in cervical exfoliated cells as a triage for human papillomavirus-positive women. *J. Natl. Cancer Inst.* 2014. V. 106(9). P. dju241.
37. Ribeiro J., Marinho-Dias J., Monteiro P., Loureiro J., Baldaque I., Medeiros R., Sousa H. miR-34a and miR-125b expression in HPV infection and cervical Cancer development. *Biomed. Res. Int.* 2015. V. 2015. P. 304-584.
38. Malta M., Ribeiro J., Monteiro P., Loureiro J., Medeiros R., Sousa H. Let-7c is a candidate biomarker for cervical intraepithelial lesions: a pilot study. *Molecular diagnosis & therapy.* 2015. V. 19(3). P. 191–196.
39. Pereira P.M., Marques J.P., Soares A.R., Carreto L., Santos M.A. MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One.* 2010. V. 5(7). P. e11780.
40. Li Y., Wang F., Xu J., Ye F., Shen Y., Zhou J., Lu W., Wan X., Ma D., Xie X. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *J. Pathol.* 2011. V. 224(4). P. 484–495.
41. Zeng K., Zheng W., Mo X., Liu F., Li M., Liu Z., Zhang W., Hu X. Dysregulated microRNAs involved in the progression of cervical neoplasm. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2015. V. 292. P. 905-913.
42. Cheung T.H., Man K.N., Yu M.Y., Yim S.F., Siu N.S., Lo K.W., Doran G., Wong R.R., Wang V.W., Smith D.I. Dysregulated microRNAs in the pathogenesis and progression of cervical neoplasm. *Cell Cycle.* 2012. V. 11(15). P. 2876–2884.
43. Bierkens M., Krijgsman O., Wilting S.M., Bosch L., Jaspers A., Meijer G.A., Meijer C.J., Snijders P.J., Ylstra B., Steenbergen R.D. Focal aberrations indicate EYA2 and hsa-miR-375 as oncogene and tumor suppressor in cervical carcinogenesis. *Genes, chromosomes & cancer.* 2013. V. 52(1). P. 56–68.
44. Villegas-Ruiz V., Juarez-Mendez S., Perez-Gonzalez O.A., Arreola H., Paniagua-Garcia L., Parra-Melquiadez M., Peralta-Rodriguez R., Lopez-Romero R., Monroy-Garcia A., Mantilla-Morales A. Heterogeneity of microRNAs expression in cervical cancer cells: over-expression of miR-196a. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014. V. 7(4). P. 1389–1401
45. Ma L., Young J., Prabhala H., Pan E., Mestdagh P., Muth D., Teruya-Feldstein J., Reinhardt F., Onder T.T., Valastyan S. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* 2010. V. 12(3). P. 247–256.
46. Tilborghs S., Corthouts J., Verhoeven Y., Arias D., Rolfo C., Trinh X.B., van Dam P.A. The role of nuclear factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2017. V. 120. P. 141–150.
47. Sheedy F.J. Turning 21: induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. *Front Immunol.* 2015. V. 6. P. 19.

48. Mangino G., Chiantore M.V., Iuliano M., Fiorucci G., Romeo G. Inflammatory microenvironment and human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016. V. 30. P. 103–111.
49. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature.* 2017. V. 543(7645). P. 378–84.