

СЕКЦИЯ I

МЕМОРИАЛЬНЫЕ ЧТЕНИЯ ПАМЯТИ

Ф.Л. КИСЕЛЕВА

Доклады

Анализ изменения содержания микроРНК в цитологических препаратах как метод скрининга и дифференциальной диагностики рака шейки матки

П.А. Архангельская^{1,2}, Е.В. Бахидзе^{1,2}, С.Е. Титов³,
М.К. Иванов³, И.В. Берлев^{1,2}, А.А. Михетько¹,
Р.Б. Самсонов^{1,4}, Н.Н. Колесников⁴, А.В. Малек^{1,4}

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова», Санкт-Петербург, пос. Песочный;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», Минздрава России, Санкт-Петербург;

³ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск;

⁴ООО «Онкосистема», Санкт-Петербург

Введение. Рак шейки матки (РШМ) является одним из самых распространенных злокачественных новообразований органов женской репродуктивной системы и занимает лидирующие позиции в статистике онкологической смертности. Основным этиологическим фактором в развитии РШМ считается вирус папилломы человека (ВПЧ). МикроРНК — короткие одноцепочечные молекулы, регулирующие экспрессию большинства генов на посттранскрипционном уровне. Известно, что инфицирование ВПЧ, развитие и прогрессирование дисплазии эпителия шейки матки сопровождаются изменениями профиля экспрессии микроРНК. Оценка этих изменений может иметь диагностическое значение.

Задачи исследования. Оценить возможность использования определения экспрессии микроРНК в диагностике РШМ.

Материалы и методы. На основе анализа данных литературы мы выбрали 18 микроРНК, потенциально вовлеченных в развитие РШМ. В исследовании при-

няли участие пациентки с РШМ ($n = 33$), интраэпителиальной дисплазией различной степени (с высокой степенью поражения (High grade squamous intraepithelial lesion, HSIL), $n = 28$; с низкой степенью (Low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL), $n = 34$) и здоровые доноры ($n = 20$). Диагнозы РШМ и HSIL были подтверждены последующим гистологическим исследованием. РНК выделяли оригинальным методом из материала цитологических мазков, высушенных на стеклах. Анализ экспрессии микроРНК выполняли методом полуколичественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Параллельно во всех препаратах проводили выявление 15 типов ВПЧ высокого онкогенного риска, оценку вирусной нагрузки и генотипирование.

Результаты. Показано, что профиль экспрессии микроРНК отражает стадийность процесса прогрессирования злокачественной трансформации цервикального эпителия от незначительной дисплазии до инвазивной карциномы. Для ряда микроРНК выявлены статистически значимые изменения уровня экспрессии в ряду: норма—LSIL—HSIL—РШМ. По полученным результатам разработаны классификаторы, которые на основе оценки экспрессии 4 микроРНК позволяют уверенно дифференцировать РШМ и дисплазию любой степени (площадь под ROC-кривой (area under ROC curve, AUC) 0,876) или отделять группу РШМ + HSIL, предполагающую дальнейшее обследование, от нормы (AUC 0,940). Наблюдаемые изменения экспрессии микроРНК коррелировали с наличием ВПЧ, но не коррелировали с вирусной нагрузкой. Образцы из группы LSIL характеризовались наиболее гетерогенными профилями экспрессии микроРНК, что может указывать на неоднородность этой категории пациенток в отношении риска развития РШМ.

Выводы. Поиск характерных изменений профиля микроРНК открывает возможность разработки новых методов скрининга и дифференциальной диагностики

РШМ. Внедрение новых методов диагностики может повысить эффективность профилактики и лечения РШМ и предраковых состояний.

Эпигенетическая регуляция инфекции вируса папиллом человека 16-го типа

С.В. Винокурова, Н.П. Киселёва, М.Д. Фёдорова,
А.Н. Катаргин, Д.С. Ёлкин, П.М. Абрамов,
А.Э. Миннегалиева, Л.С. Павлова, Ф.Л. Киселёв,
Н.В. Говердовская

ФГБУ «Российский онкологический научный центр
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Инфекция вирусами папиллом человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска является этиологическим фактором развития рака шейки матки, а также опухолей аногенитальной области и ротоглотки. В настоящее время установлено, что процесс трансформации эпителия инициируется повышенной экспрессией вирусных онкогенов *E6* и *E7*. Однако молекулярные механизмы дерегуляции экспрессии вирусных онкогенов остаются недостаточно изученными.

Задачи исследования. Изучение роли некодирующих РНК, а также метилирования генома ВПЧ 16-го типа на экспрессию вирусных онкогенов.

Материалы и методы. Выделение ДНК и малых РНК проводили из клинических образцов карцином шейки матки различных стадий с использованием микродиссекции. Анализ экспрессии микроРНК выполняли методом глубокого секвенирования и количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Эффект метилирования на активность вирусного промотора исследовали путем введения селективного метилирования сайтов связывания транскрипционных факторов и последующего измерения экспрессии генов-репортеров и вирусных онкогенов. Анализ экспрессии вирусных генов в зависимости от экспериментально изменяемой активности исследуемых микроРНК проводили на клеточных линиях рака шейки матки.

Результаты. Установлено, что паттерн метилирования вирусного генома специфически меняется в процессах дифференцировки плоскоклеточного эпителия и трансформации эпителия, особенно в сайтах связывания вирусного белка *E2*, являющегося ключевым фактором регуляции вирусной транскрипции и репликации. Метилирование одного из сайтов связывания *E2* приводит к существенной активации вирусного промотора и увеличению (до 5 раз) экспрессии вирусных онкогенов. Идентифицированы микроРНК, экспрессия которых изменяется на стадиях продуктивной и трансформирующей инфекции ВПЧ 16-го типа. Для ВПЧ 16-го типа показано, что микроРНК *miR-106a*, *-135*, *-196a* и *-224* негативно регулируют экспрессию вирусного онкогена *E6*.

Выводы. Полученные данные позволяют предположить, что метилирование регуляторной области ВПЧ 16-го типа является важным механизмом регуляции экспрессии вирусных генов во время нормального вирусного цикла. Метилирование сайтов связывания вирусного белка *E2* может приводить к активации вирусного промотора и повышенной экспрессии вирусных онкогенов. Кроме того, наши данные указывают на возможность регуляции клеточными микроРНК продуктивной и трансформирующей вирусной инфекции ВПЧ.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда (РНФ)
(грант № 15-15-00125).*

Экспрессия эволюционно новых генов в опухолях и возможная роль этого феномена в эволюции

А.П. Козлов

ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого», Санкт-Петербург

Введение. Ранее нами была сформулирована гипотеза эволюционной роли опухолей, одним из нетривиальных предсказаний которой является предположение о специфической экспрессии эволюционно новых генов в опухолях.

Задачи исследования. Изучение опухолеспецифичности экспрессии эволюционно новых генов и эволюционную новизну генов с опухолеспецифической экспрессией.

Материалы и методы. Для определения эволюционной новизны генов мы использовали программы HomoloGene, release 68, ProteinHistorian, BLAST и HMMER. Ортологи изучаемых генов искали в 26 полногеномных последовательностях эу- и прокариот.

Для изучения опухолеспецифичности экспрессии применяли полимеразную цепную реакцию на панелях комплементарной ДНК (кДНК) из нормальных и опухолевых тканей. Использовали также сравнение *in silico* без данных последовательностей кДНК из нормальных и опухолевых тканей.

Результаты. Мы описали несколько единичных генов с двойной специфичностью — эволюционно новых, экспрессирующихся опухолеспецифически или преимущественно в опухолях (*OTF*, *ESRG*, *PVT1*, *ELFN1-ASI*, *HHLA1*, *DCD*, *SPRR1A*, *CLLUI*, *PBOV1* и др.).

Мы также показали эволюционную новизну целых классов генов, экспрессирующихся преимущественно в опухолях, а именно СТ-Х генов и генов, некодирующих опухолеспецифические РНК, описанных в нашей лаборатории.

Мы изучили филогенетическое распределение ортологов генов, экспрессирующихся в опухолях, и по-

казали, что различные функциональные классы генов имеют разную эволюционную новизну, причем некоторые из них обогащены эволюционно новыми генами. Оказалось, что эволюция онкогенов, генов-супрессоров опухолевого роста и дифференцировочных генов происходит параллельно, что подтверждает участие опухолей в происхождении новых клеточных типов. Некоторые гены человека, определяющие прогрессивные признаки, возникают у рыб и впервые экспрессируются в опухолях рыб.

Мы также проанализировали данные литературы об экспрессии эволюционно новых генов, возникших с участием различных молекулярных механизмов. Эти сведения подтверждают тот факт, что гены, произошедшие путем геной дупликации и перестановки экзонов, а также возникшие *de novo* и из последовательностей эндогенных ретровирусов, экспрессируются в опухолях, причем некоторые из них с очень высокой специфичностью.

Выводы. Экспрессия эволюционно новых генов в опухолях может быть новым биологическим феноменом, играющим важную роль в возникновении новых типов клеток, тканей и органов. Целесообразно изучить возможность использования эволюционно новых генов и их продуктов в качестве мишеней для диагностики, терапии и профилактики опухолей.

Involvement of persistent viral infections in the development of autoimmune diseases

M.F. Murovska, S.V. Chapenko, M.A. Cistjakovs,
A.M. Sultanova, S.A. Rasa, Z.E. Nora-Krukke, V.V. Groma
Rīga Stradiņš University, Riga

Background. Viruses and viral infections are considered to be the main risk factors for autoimmune disease development (especially with genetic predisposition).

Objective. This study aims to investigate involvement of persistent human herpesvirus 6 (HHV-6) and parvovirus B19 (B19) infection in rheumatoid arthritis (RA), autoi-

mmune thyroiditis (AIT) and myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) development.

Materials and methods. 80 RA, 45 AIT and 200 ME/CFS patients, and corresponding controls were enrolled in this study. Viral genomic DNA was detected by PCR, infection activity phase by RT-PCR and real time PCR, HHV-6 variants by restriction analysis, presence of viral antigens by immunohistochemistry.

Results. HHV-6B and B19 genomic sequences were detected in blood DNA of 31 % (25/80) and 27 % (22/80) RA patients, respectively. In 10/25 RA patients active HHV-6 and in 8/22 active B19 infection was detected. Elevated median HHV-6 load was detected in 10/25 RA patients with persistent HHV-6 infection. HHV-6 and/or B19 genomic sequences were detected in all 7 investigated synovial tissue/fluid samples and presence of viral antigens was shown immunohistochemically. In AIT patients the presence of persistent HHV-6 infection was significantly higher than in the control group (98 % vs. 77 % respectively). A significantly higher frequency of HHV-6 activation marker (U79/80 mRNA) was found in patients' thyroid gland tissue samples with AIT (41 % vs. 6 % respectively). The median HHV-6 load was higher in patients with active viral infection than in patients without it. The presence of HHV-6 antigens expression was demonstrated in intrafollicular cellular clusters and immunohistochemistry indicated thyrocytes in the follicle wall. Analysing 200 patients with ME/CFS, persistent HHV-6 infection in latent phase had 80/200 (40 %), whereas in active phase – 26/200 (13 %) patients. HHV-6 U89/90 gene expression was detected in 57 ME/CFS patients and median HHV-6 load was 1634.7 (IQR 7425.6–278.3) copies/ 10^6 cells. In addition latent B19 infection had 24/200 (12 %) and active – 34/200 (17 %) patients with ME/CFS. B19 NS1 gene expression was detected in 25 ME/CFS patients and median B19 viral load was 27.4 IQR: 60.3–4.1 copies/ μ g of DNA.

Conclusions. Presence of HHV-6 and B19 infection markers in RA, AIT and ME/CFS patients, correlation of persistent infection activity phase with clinical course severity allows suggest involvement of these viruses as the etiopathogenic factors/co-factors in the autoimmune diseases development.