

ТОМСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ И  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

НИКИТИНА ЕКАТЕРИНА ГЕННАДЬЕВНА

ПАТТЕРН ЭКСПРЕССИИ микроРНК ПРИ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ И  
РАКЕ ГОРТАНИ

14.01.12 – онкология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н. Литвяков Н.В.

Томск – 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |    |
|---|----|
| Список сокращений .....   | 5  |
| Введение.....   | 6  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ   |    |
| 1.1. Общая информация о микроРНК, история открытия .....                              | 14 |
| 1.2. Биогенез микроРНК .....  | 15 |
| 1.3. МикроРНК при ОГШ .....   | 19 |
| 1.4. МикроРНК как биомаркер малоинвазивной или неинвазивной диагностики при ОГШ ..... | 23 |
| 1.5. МикроРНК при ранней диагностике ОГШ и прогнозировании заболевания .....          | 25 |
| 1.6. МикроРНК при папилломавирус-позитивных опухолях головы и шеи .....               | 27 |
| Заключение.....   | 30 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ   |    |
| 2.1. Характеристика клинического материала.....                                       | 32 |
| 2.2. Методы исследования .....  | 35 |
| 2.2.1 Подготовка клинических проб .....   | 35 |
| 2.2.2. Методика выделения РНК .....   | 35 |
| 2.2.3. Методика выделения ДНК.....  | 37 |
| 2.2.4 Полимеразная цепная реакция для определения экспрессии микроРНК .....           | 37 |
| 2.2.4.1. Методика ОТ-ПЦР.....   | 38 |
| 2.2.4.2. Методика ПЦР в режиме реального времени .....                                | 39 |
| 2.2.5. Определение вирусоносительства .....   | 42 |
| 2.2.6. Статистическая обработка результатов.....                                      | 43 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ  |    |

|   |     |
|---|-----|
| 3.1. Паттерн экспрессии микроРНК в группе пациентов с предраковыми заболеваниями гортани.....   | 45  |
| 3.1.1. Оптимизация выборки больных с предраковыми заболеваниями по уровню экспрессии микроРНК.....  | 45  |
| 3.1.2.Экспрессия микроРНК в патологически измененной ткани относительно прилежащей нормальной у пациентов с предопухолевыми изменениями гортани ..... | 47  |
| 3.1.3. Экспрессия микроРНК у пациентов с предопухолевыми заболеваниями в зависимости от ВПЧ-инфицирования .....                                       | 52  |
| 3.2. Паттерн экспрессии микроРНК при злокачественных опухолях гортани.....  | 55  |
| 3.2.1. Оптимизация выборки по анализируемым клинико-патологическим и молекулярным характеристикам .....   | 55  |
| 3.2.2. Экспрессия микроРНК в опухолевой относительно нормальной ткани пациентов с диагнозом рака гортани .....  | 62  |
| 3.2.3. Экспрессия микроРНК в зависимости от стадии распространенности опухолевого процесса и лимфогенного метастазирования .....                      | 68  |
| 3.2.4. Экспрессия микроРНК в зависимости от степени дифференцировки опухолевой ткани .....  | 72  |
| 3.2.5. Экспрессия микроРНК в зависимости от наличия ДНК вируса папилломы человека в ткани пациентов с раком гортани .....                             | 73  |
| 3.2.6. Анализ связи экспрессии микроРНК и выживаемости больных раком гортани .....  | 75  |
| 3.3. Сравнительная характеристика паттерна экспрессии микроРНК у больных с предопухолевыми заболеваниями и раком гортани.....                         | 77  |
| 3.4.1. Коэкспрессия микроРНК у больных раком гортани.....   | 83  |
| 3.4.2. Коэкспрессия микроРНК у больных с предопухолевыми патологиями гортани .....  | 88  |
| 3.5.1. Определение паттерна микроРНК в ткани и слюне пациентов .....  | 91  |
| Заключение по результатам.....  | 100 |
| Выводы .....  | 107 |

|                  |     |
|------------------|-----|
| Литература ..... | 109 |
|------------------|-----|

## **Список сокращений**

ВПЧ – вирус папилломы человека

РГ – рак гортани

РРП – рак ротовой полости

ХГЛ – хронический гиперпластический ларингит

ЗНО – злокачественные новообразования

ДНО – доброкачественные новообразования

ОГШ – опухоли головы и шеи

ДI/II/III – дисплазия I/II/III степени

ЛТ – лучевая терапия

СОД – суммарная очаговая доза

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

## Введение

Открытие принципиально нового класса малых молекул РНК длиной 19-24 нуклеотидов, которых называли микроРНК, стало весьма значительным событием в молекулярной биологии конца XX века [Lee R.C.et al., 1993; Wightman B.et al., 1993]. Связываясь с 3'-UTR мРНК генов-мишеней по принципу полной или частичной комплементарности, микроРНК постранскрипционно регулируют генную экспрессию, полностью инактивируя или ингибируя мРНК [Bartel D.P.2004; Zamore P.D. B. Haley2005]. В настоящее время приведена значительная доказательная база о роли микроРНК не только в регулировании многих ключевых процессов в жизнедеятельности клетки и поддержании ее гомеостаза [Flynt A.S. E.C. Lai2008; Lodish H.F.et al.,2008; Stadler B.M. H. Ruohola-Baker 2008], но и участии их в патогенезе многих заболеваний, в том числе и онкологических [Farazi T.A.et al.,2013; Nikitina E.et al.,2012].

В настоящее время уже получены убедительные данные о том, что в опухолях разных локализаций происходит нарушение регуляции генов микроРНК и сами малые РНК могут выступать в роли онкогенов или опухолевых супрессоров [Calin G.A.et al., 2002; Kent O. J. Mendell 2006]. Известно, что значения aberrантной экспрессии многих микроРНК при злокачественных новообразованиях (ЗНО) могут смещаться в ту или иную сторону в зависимости от тканевого происхождения опухоли, роли микроокружения и генов-мишеней задействованных в канцерогенезе опухоли анализируемой локализации [Tian L.et al.,2014]. Aberrантная экспрессия микроРНК может быть следствием различных причин, таких как, делеции, амплификации хромосомных локусов микроРНК, мутации или нарушение регуляции транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию микроРНК [Wald A.I.et al., 2011]. Влияние на микроРНК могут оказывать и эпигенетические механизмы регуляции [Iorio M.V. C.M. Croce2012; Nikitina E.et al., 2012].

Первые шаги в анализе уровня экспрессии микроРНК при опухолях области головы и шеи были сделаны на клеточных линиях, полученных от плоскоклеточных карцином [Jiang J.et al., 2005; Lu J.et al., 2005; Volinia S.et al., 2006]. При работе же с клиническими образцами опухолей этой локализации авторы зачастую используют объединенные, не унифицированные по клинико-патологическим характеристикам выборки пациентов с опухолями ротовой полости, гортаноглотки и др. [Childs G.et al., 2009; Hui A.B.et al., 2010], что существенно затрудняет интерпретацию результатов. В настоящее время в литературе представлены данные относительно aberrантной экспрессии при опухолях головы и шеи (ОГШ) для некоторых онкосупрессорных и онкогенных микроРНК [Bose P.et al., 2013; Shiiba M.et al., 2010]. Конкретно для рака

гортани имеются только весьма разрозненные данные по некоторым микроРНК (табл. 1). Таким образом, представилось перспективным провести анализ паттерна экспрессии микроРНК в клинических опухолях гортани, которые занимают второе место по частоте заболеваемости среди ЗНО области головы и шеи в мире [Chu E.A. Y.J. Kim 2008; Ferlay J.et al.,2015].

Описание аберрантного паттерна при верифицированном диагнозе злокачественной патологии важно с точки зрения поиска новых мишеней для таргетной терапии и маркеров для прогноза и мониторинга заболевания [Hackl M.et al.,2010]. Однако для понимания механизмов канцерогенеза и оценки вовлеченности микроРНК в трансформацию клеток необходим также анализ образцов с предопухолевыми изменениями. Эти данные, могут быть использованы для уточняющей диагностики и оценки риска прогрессии заболевания, при мониторинге предопухоловой патологии гортани у пациента, которая может продолжаться длительный период (до 10 лет). Таким образом, анализ образцов с предопухолевыми изменениями и оценка риска развития рака гортани у этих больных, помимо фундаментального знания, достаточно актуальна и с практической точки зрения в плане определения тактики ведения пациентов.

Известно, что дисплазия (легкая, средняя и тяжелая степень) является начальным этапом канцерогенеза плоского эпителия. В зависимости от степени дисплазии злокачественную трансформацию претерпевают от 2% до 74% случаев [Minni A.et al., 2008; Sampedro A.et al., 1994]. Причем дисплазия I степени (легкая) может элиминироваться, в то время как дисплазия средней и тяжелой степени тяжести чаще прогрессируют в злокачественное новообразование – в 11% и 30-74%, соответственно по разным данным [Weller M.et al.,2010] [Minni A.et al., 2008; Sampedro A.et al., 1994].

Одним из существенных факторов злокачественной трансформации дисплазии плоского эпителия верхних дыхательных путей является воздействие онкогенных типов вируса папилломы человека (ВПЧ), который при длительной персистенции способен запускать процесс клеточной трансформации. Канцерогенез опухолей гортани является многоступенчатым и растянутым во времени процессом, занимающим чаще всего десятки лет, и протекающем на фоне хронических воспалительных заболеваний [Weller M.et al., 2010], а зачастую и на фоне хронической инфекции [Jayaprakash V.et al.,2011]. Принимая это во внимание, представилось перспективным оценить частоту встречаемости высокоонкогенных типов ВПЧ, молекулярного показателя специфичного для данной локализации, и оценить его возможную связь с аберрантной экспрессией анализируемых микроРНК.

Среди микроРНК интереса, включенных в исследование были выбраны те молекулы, относительно которых в литературе представлены данные, доказывающие их значительную роль в канцерогенезе при других локализациях. Для микроРНК-21, -18а, -200а, -200с, -205, -221, -494 было показано, что они играют одну из ключевых ролей в регуляции процессов клеточного цикла, апоптоза, роста, инвазии, пролиферации клеток при опухолях репродуктивных систем у женщин (рак молочной железы, рак яичников), глиобластомах и многих других локализациях [Cochrane D.R.et al., 2009; Esquela-Kerscher A. F.J. Slack 2006; Korpai M.et al., 2008; Krichevsky A.M. G.G. 2009; Qin A.-Y.et al., 2013]. Для микроРНК-155 отмечено непосредственное участие в формировании иммунного ответа [Teng G. F.N. Papavasiliou 2009].

Высочайшая специфичность паттерна микроРНК, в сравнение с профилем мРНК в ткани, говорит о пригодности малых молекул в качестве высокоинформативных биомаркеров злокачественной опухоли [Jiang J.et al., 2005; Lu J.et al., 2005]. Также положительным моментом, в пользу возможности использования микроРНК как биомаркеров, служит их малый размер и биологические особенности, которые обеспечивают высокую стабильность молекул, что подтверждено рядом исследований [Brase J.C.et al., 2010; Mitchell P.S.et al., 2008]. В литературе представлены отдельные работы посвященные оценке возможности использования в качестве диагностического маркера ЗНО профиля микроРНК слюны пациентов с карциномами ротовой полости [Liu C.J.et al., 2010; Park N.J.et al., 2009]. Оценка паттерна микроРНК в патологически измененной относительно нормальной ткани гортани и/или биоматериале полученном неинвазивным методом (слюны) позволит расширить представления о молекулярных основах канцерогенеза и обозначить подходы к выявлению новых перспективных биомаркеров, на основе микроРНК, для ранней диагностики и мониторинга предопухолевой патологии и терапии заболевания, а также для оценки прогрессирования опухолей.

#### **Цель:**

Исследование паттерна экспрессии микроРНК у пациентов с предопухолевыми изменениями и плоскоклеточными карциномами гортани в сравнительном аспекте, в зависимости от клинико-патологических параметров и исхода заболевания.

#### **Задачи исследования:**

1. Исследовать паттерн экспрессии микроРНК в патологически измененной ткани от пациентов с предопухолевыми заболеваниями гортани;



2. Оценить экспрессию микроРНК в опухолевой ткани от пациентов с плоскоклеточными карциномами гортани и ее связь с клинико-патологическими показателями, исходом заболевания;
3. Провести сравнительную оценку экспрессии микроРНК в опухолевой и прилежащей нормальной ткани от ВПЧ-позитивных и ВПЧ-негативных пациентов;
4. Сравнить паттерны экспрессии микроРНК в патологически измененной ткани у пациентов с предопухолевыми и злокачественными заболеваниями гортани;
5. Изучить уровень микроРНК в слюне пациентов с предопухолевыми и злокачественными патологиями гортани.

#### **Научная новизна работы.**

Впервые изучен паттерн экспрессии микроРНК-21, -18a, -200a, -200c, -205, -221, -494 не только в опухолевой ткани, но и в патологически измененной ткани, относительно прилежащей нормальной ткани в ряду образцов без дисплазии к дисплазии III степени и раку гортани. Выделена группа микроРНК, для которых наблюдается повышение экспрессии в патологически измененной ткани по мере утяжеления диагноза (микроРНК-21, -155, -200c, -205). В опухоли гортани выявлена aberrантная гиперэкспрессия онкогенных микроРНК-21, -155, -205 и гипэкспрессия онкосупрессорной микроРНК-200a. Впервые показана возможность использования показателя уровня экспрессии восьми анализируемых микроРНК в качестве потенциального фактора риска развития рака гортани из предопухолевых патологий.

Впервые изучен паттерн восьми микроРНК в слюне пациентов с предопухолевыми патологиями и раком гортани. Показано снижение уровня некоторых микроРНК в слюне больных раком гортани по сравнению с пациентами с дисплазиями II-III степени. Впервые проанализирована связь ВПЧ с уровнем экспрессии микроРНК-21, -18a, -200a, -200c, -205, -221, -494 у лиц с патологиями гортани.

#### **Теоретическая и практическая значимость.**

Выявленное повышение экспрессии микроРНК-21, -155 и -205 в ряду патологических состояний от образцов без диспластических изменений к ДИ и далее к раку гортани расширяет теоретические представления о механизмах канцерогенеза, позволяя предположить, что молекулярно-генетические нарушения на уровне регуляции экспрессии микроРНК происходят уже на начальном этапе формирования предопухолевой патологии (в образцах без дисплазии) и усиливаются по мере ее развития. Среди анализируемых микроРНК выявлены новые потенциальные маркеры, определение которых в патологически измененной ткани у пациентов с предопухолевыми заболеваниями гортани может быть использовано для оценки риска злокачественной

трансформации, что даст возможность формировать группы повышенного риска развития рака гортани.

Аберрантный паттерн экспрессии онкогенных микроРНК-21, -155, -205 и онкосупрессорной микроРНК-200а в опухолевой ткани гортани свидетельствует о перспективности дальнейших исследований этих микроРНК в качестве новых мишеней для таргетной терапии рака гортани. Изучение уровня микроРНК в биоматериале полученном неинвазивным способом (слюне) позволило выявить ассоциацию ряда микроРНК с раком гортани. Определение паттерна микроРНК в слюне является перспективным для дальнейших исследований в плане возможности разработки неинвазивных методов определения риска злокачественной трансформации предопухолевых патологий гортани и дискриминации дисплазии II-III степени и рака гортани ранней стадии.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Аберрантная экспрессия микроРНК обнаруживается в образцах как предопухолевой патологии, так и в опухолевой ткани, что свидетельствует о важной роли микроРНК в развитии диспластических изменений плоскоклеточного эпителия гортани и его злокачественной трансформации.

2. Значительная гиперэкспрессия онкогенных микроРНК-21, -155, -205 и гипозэкспрессия онкосупрессорной микроРНК-200а в опухоли гортани относительно прилежащей нормальной ткани определяет перспективность исследований этих микроРНК в качестве мишеней для таргетной терапии.

3. Оценка уровня микроРНК в слюне может быть использована для разработки неинвазивных методов определения риска злокачественной трансформации предопухолевых патологий гортани.

#### **Апробация работы**

Основные положения диссертационной работы были представлены на региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н. В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии», г. Томск (2010, 2011, 2013 гг); X конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения-2014», г. Санкт-Петербург (2014г.); дважды на V Всемирном конгрессе, посвященном проблематике опухолей головы и шеи («5<sup>th</sup> world Congress of IFHNOS & annual meeting of the AHNOS»), г. Нью-Йорк, США (2014г.); на VIII Съезде онкологов и радиологов стран-участников СНГ, г. Казань (2014г.); на XVIII Российском онкологическом конгрессе, г. Москва (2014г.); на международном симпозиуме

посвященном проблематике ВПЧ-положительных опухолей головы и шеи (International Symposium on HPV Infection in Head and Neck Cancer), г. Познань, Польша (2014г.); на Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии», г. Томск (2014, 2015гг); на VII съезде Российского общества медицинских генетиков, г. Санкт-Петербург (2015г.); на международной конференции «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» («Cellular and molecular mechanisms of tumor-microenvironment crosstalk»), г. Томск (2015г.).

#### **Внедрение результатов исследования**

Полученные результаты внедрены в теоретические курсы «Эволюционная биология» и «Эволюционная генетика» на кафедре цитологии и генетики Биологического института Томского государственного университета, а также результаты внедрены в практику Томского НИИ онкологии для определения риска развития и прогнозирования злокачественного новообразования на основе определения паттерна экспрессии микроРНК в слюне пациентов.

#### **Публикации**

Основные результаты исследования опубликованы в 20 работах, из них – 4 в журналах, рекомендованных ВАК.

#### **Материалы и методы исследования:**

В исследование включены больные с предопухолевыми патологиями и плоскоклеточными карциномами гортани, проходящие обследование/лечение в клинике Томского НИИ онкологии (база данных №20156220688 от 28 апреля 2015 г. Никитина Е.Г., Бычков В.А., Черемисина О. В., Кульбакин Д. Е., Чижевская С.Ю., Ибрагимова М.К., Уразова Л.Н., Литвяков Н.В., Чойнзонов Е.Л. «База данных учета клинко-патологических, вирусологических и молекулярных параметров предопухолевых и опухолевых патологий гортани»). Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288), получено разрешение этического комитета института. Материалом для исследования послужили операционный материал или биоптаты патологически измененной и прилежащей нормальной ткани от пациентов со злокачественными новообразованиями гортани (n=55) и больных с предраковыми патологиями (n=26) данной локализации, а также слюна этих пациентов.

#### **В работе использованы следующие методы:**

1. Экстракция РНК из ткани набором реагентов miRVana™ (Ambion, USA).
2. Экстракция РНК из слюны с использованием Trizol Reagent (Invitrogen, USA), согласно стандартному протоколу с модификацией.
3. Обратнo-транскриптазная ПЦР для микроРНК hsa-microRNA-18a-5p, hsa-microRNA -21-5p, hsa- microRNA -155-5p, hsa- microRNA -200a-3p, hsa- microRNA -200c-3p, hsa- microRNA -205-5p, hsa- microRNA -221-3p и hsa- microRNA -494-3p проведена с применением специфичных праймеров особой шпильевидной конструкции [Chen C.et al., 2005].
4. Количественная ПЦР в режиме реального времени (qPCR) проведена с использованием специфичных праймеров к анализируемым микроРНК [Iyevleva A.G.et al., 2012]. В качестве гена-рефери использовалась микроРНК-103 [Peltier H.J. G.J. Latham 2008], уровень экспрессии микроРНК рассчитан согласно методу Pfaffl [Pfaffl M.W.2001].
5. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 8.0» и программы PAST V2.17. Сравнение значений уровня экспрессии между подгруппами проведено с использованием t-теста Уэлша [Ruxton G.D. 2006]. Для установления связи между изучаемыми вирусогенетическими и клинико-морфологическими параметрами был проведен ряд тестов – дискриминантный, корреляционный и двублоковый PLS-анализ. Для оценки ассоциации между изменением уровня экспрессии микроРНК и риском развития и/прогрессии патологии гортани использовали критерий Фишера. Прогностическая значимость признаков в отношении общей и безрецидивной выживаемости у больных РГ оценена с использованием программы Survival Analysis. Кривые кумулятивной выживаемости строились по методу Каплана-Майера. Значимость различий в выживаемости между группами оценена по критерию Log-rang теста. Для всех статистических подсчетов применен критерий множественности сравнения Бенджамини-Хохберга (FDR - false discovery rate).
6. Экстракция ДНК из ткани фенольным методом с использованием протеиназы К.
7. Метод определения вирусоносительства на основе ПЦР в режиме реального времени, с использованием коммерческих наборов «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL».
8. Генотипирование вирус-позитивных образцов с использованием наборов «АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL».

#### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, выводов, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 29 рисунками и 28 таблицами. Библиографический указатель включает 303 источника, из них 11 отечественных и 292 зарубежных.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общая информация о микроРНК, история открытия

Предположения о том, что молекулы рибонуклеиновых кислот способны нести информационную нагрузку были высказаны еще в 70-е гг [Crick F.H.1968; Woese C.1967]. С того времени был открыт широчайший спектр их функций, отличных от функций только посредников между ДНК и белками. Было обнаружено, что РНК могут образовывать комплексы вторичных структур, способные изменять молекулярные взаимодействия внутриклеточных компонентов и генную экспрессию. Весьма важным открытием стало обнаружение малых некодирующих РНК (small noncoding RNA, snRNA), функционирование которых ведет к подавлению экспрессии генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях.

В декабре 1993 года группы ученых под руководством Victor Ambros и Gary Ruvkun независимо друг от друга опубликовали в журнале Cell результаты исследований, в которых описывали как малый некодирующий транскрипт *lin-4* регулирует экспрессию *lin-14* путем присоединения к 3'нетранслируемой области (3'UTR) мРНК *lin-14* у *Caenorhabditis elegans* [Lee R.C.et al., 1993; Wightman B.et al., 1993]. Было показано, что первая открытая малая РНК, названная микроРНК, контролирует согласование во времени этапов личиночного развития *C.elegans* [Lee R.C.et al., 1993]. Дальнейшие исследования показали, что *lin-4* контролирует экспрессию гена *lin-14* по принципу обратной связи через бессмысловое взаимодействие РНК-РНК [Olsen P.H. V. Ambros 1999].

Однако наиболее важные функции микроРНК оставались неизвестными до открытия другой молекулы – *let-7*. В. Reinhart с соавторами (2000) из лаборатории профессора G. Ruvkun показали, что *let-7* представляет собой РНК длиной в 21 нуклеотид, которая контролирует переход личинки к поздней стадии развития *C.elegans* [Reinhart B.J.et al., 2000]. Исследователи показали, что РНК *let-7* обнаруживается у многих форм живых организмов, включая позвоночных, асцидий, моллюсков, аннелид и артропод. Было предположено, что РНК-опосредованная регуляция трансляции может быть широко распространенной моделью генной регуляции, которая присутствует у многих видов животных [Pasquinelli A.E.et al., 2000].

МикроРНК способны регулировать многочисленные биологические процессы, такие, как рост клеток (в том числе, стволовых), их дифференцировку и гибель [Flynt A.S. E.C. Lai 2008], нейропроцессы и иммунный ответ [Lodish H.F.et al., 2008; Stadler B.M. H. Ruohola-Baker 2008] и многие другие. Одна микроРНК может влиять на экспрессию

нескольких тысяч генов, таким образом, эти малые молекулы, потенциально, могут контролировать одну треть генома человека [Lewis B.P. et al., 2005].

Более 50% генов, кодирующих известные микроРНК человека, расположены в областях хромосом, где располагаются онкогенные или онкосупрессорные гены. Такие микроРНК получили название oncomiRNAs (oncogenic microRNA) [Esquela-Kerscher A. F.J. Slack 2006]. В настоящее время получены исчерпывающие данные о том, что в злокачественных опухолях происходит нарушение регуляции генов микроРНК и что сами малые РНК могут выступать в роли как онкогенов, так и опухолевых супрессоров [Kent O. J. Mendell 2006]. Появляется все больше данных о том, что определенную роль в канцерогенезе играют сбои и нарушения работы микроРНК на всех этапах созревания и процессинга, начиная от локализации в геноме, регуляции на уровне транскрипции/процессинга и заканчивая пост-транскрипционной модификацией молекул.

Согласно базе данных по микроРНК (miRbase.org), начиная с 1993 года было открыто более 1920 зрелых микроРНК человека и 1100 зрелых микроРНК мышей [Kozomara A. S. Griffiths-Jones 2013]. По всей видимости, этот перечень не окончателен и будет пополняться. Огромное количество микроРНК и гомологичных молекул среди разных видов организмов позволяет говорить о значительной роли этого класса РНК в механизмах регуляции генной экспрессии, имеющей древнее происхождение. Это предположение нашло подтверждение в значительном количестве публикаций [Grosshans H. F.J. Slack 2002].

## **1.2. Биогенез микроРНК**

МикроРНК могут транскрибироваться с интергенных участков генов или с интронов смысловых генов. Примерно 50% микроРНК имеют свой собственный промотер. Остальные же обнаруживаются в интронах или экзонах кодируемых или не кодируемых транскрипционных единиц [Kim V.N. et al., 2009; Saini H.K. et al., 2008].

Среди млекопитающих 61% микроРНК экспрессируется с полицистронных участков генов [Chiang H.R. et al., 2010]. Эти кластеры могут содержать информацию о многих семействах микроРНК, которых объединяют по наличию одинакового сайта узнавания мишени (seed region). Несмотря на некоторые различия в биогенезе микроРНК животных, растений и грибов, основные этапы этого процесса остаются сходными (рис. 1). Они могут быть представлены следующим образом (на примере биогенеза микроРНК животных):

(1) транскрипция гена РНК-полимеразой II и формирование первичного транскрипта микроРНК со стебле-петлевой структурой (pri-microRNA);

(2) образование молекулы предшественника микроРНК длиной около 70 нуклеотидов (pre- microRNA);

(3) завершающая стадия созревания эффекторной 22-нуклеотидной молекулы с характерной шпилькоподобной вторичной структурой [Kim V.N.2005].

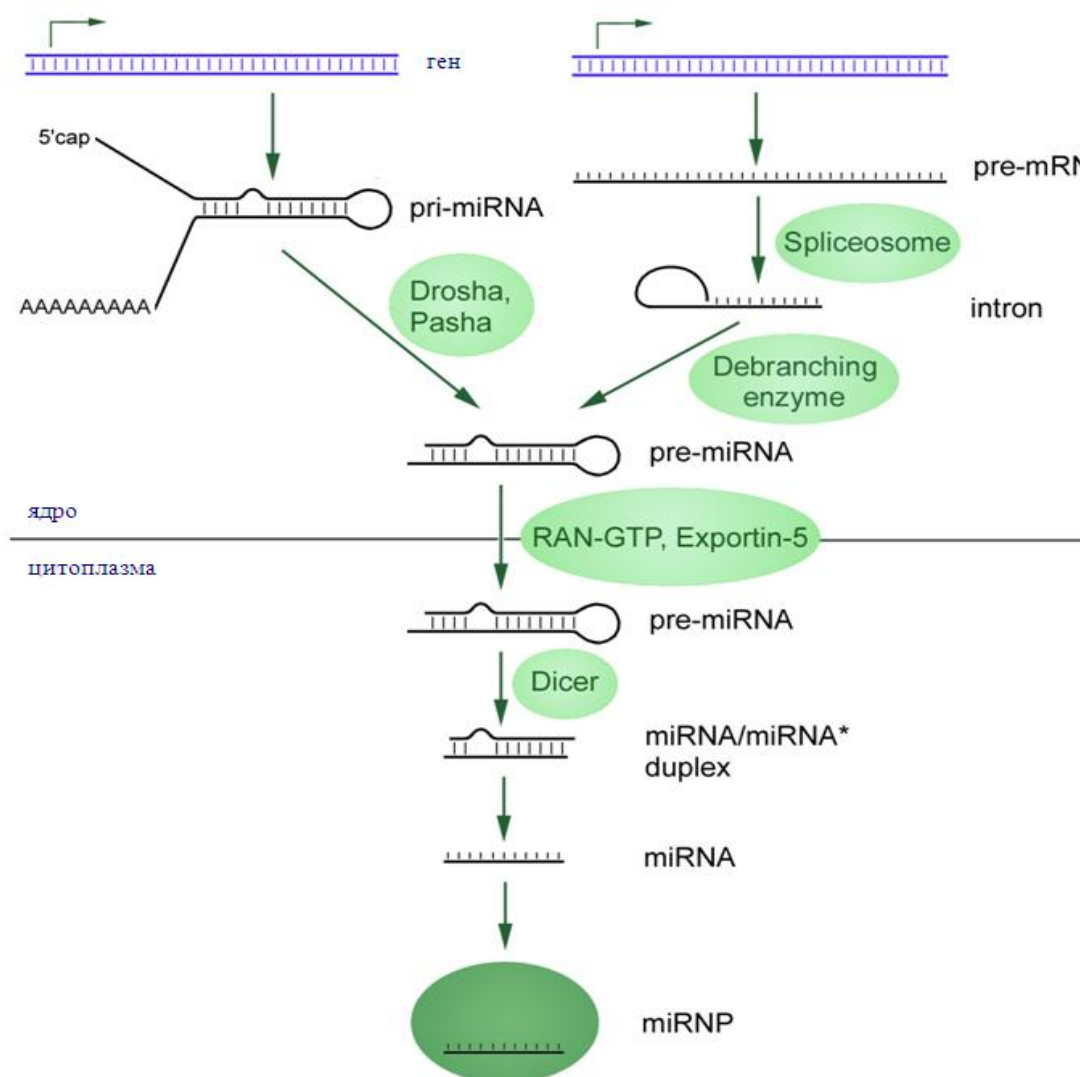


Рисунок 1 – Схема биогенеза микроРНК. Комментарии в тексте.

Первичная молекула микроРНК – pri-microRNA имеет длину около 1000 нуклеотидов. На первом этапе процессинга pri-microRNA узнается энзимом Droscha. Последующий процессинг зависит от размера терминальной петли, структуры линейной части pri-microRNA и фланкирующих последовательностей сайта эндонуклеазной активности энзима [Lee Y.et al.,2003; Zeng Y. B.R. Cullen 2003]. Комплекс выполняющий процессинг микроРНК был назван микропроцессорным комплексом, его размер около 600 кДа и он весьма консервативен у всех животных [Denli A.M.et al.,2004; Gregory R.I.et al., 2004]. Droscha, в составе микропроцессорного комплекса, ассиметрично разрезает обе цепи



спиличной структуры около основания петли и освобождает 60-70-нуклеотидную молекулу, названную pre-microRNA [Gregory R.I. R. Shiekhattar 2005].

Pre-microRNA распознается ядерным фактором переноса Exportin-5 [Bohnsack M.T. et al., 2004; Lund E. et al., 2004]. Последующий цитоплазматический процессинг состоит в том, что второй энзим RNAase-III – Dicer – совместно с транскрипционным РНК-связывающим белком (TRBP) расщепляет молекулу pre-microRNA и формирует два двучепочечных нуклеотида [Hutvagner G. et al., 2001; Ketting R.F. et al., 2001]. Одна из цепей этого дуплекса – плюс-цепь объединяется по АТФ-независимому принципу с большим белковым комплексом и образует РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC) [Kim V.N. 2005]. Цепь в составе RISC становится зрелой микроРНК и проводит комплекс к таргетной мРНК [Doench J.G. et al., 2003]. Белок Ago является обязательным компонентом RISC и играет ключевую роль в посттранскрипционном сайленсинге генов (PTGS).

Недавно удалось установить, что некоторые микроРНК могут и не использовать основной путь биогенеза. Например, созревание таких молекул как микроРНК-320 и микроРНК-484 не зависит от белков Drosha и DGCR8 [Yi R. et al., 2009], а микроРНК-451 созревает по Dicer-независимому пути [Cheloufi S. et al., 2010, Yang, 2010 #20]. Drosha- и DGCR8-независимые микроРНК составляют группу так называемых митронов и митронов «с хвостом» (miRtrons и tailed miRtrons). Pre-microRNA таких молекул созревают путем сплайсинга и экзонуклеазного разрезания цепей [Babiarz J.E. et al., 2008; Berezikov E. et al., 2007].

Нарушение пути биогенеза микроРНК может привести к серьезным последствиям для клетки и, в последующем, для всего организма. Делеции, сбой механизма созревания микроРНК или нарушение регуляции микроокружения играют определенную роль в процессе трансформации клетки [Kumar M.S. et al., 2007]. Так, показано, что потеря или сбой работы компонентов пути биогенеза микроРНК, включая Dicer и DGCR8, может привести к изменению пролиферации и дифференцировки стволовых клеток [Bernstein E. et al., 2003; Wang Y. et al., 2007]. Интересно отметить, что DGCR8 является одним из генов в регионе 22q11.2, моноаллельную делецию которого имеют более 90% больных синдромом Ди Джорджи (наиболее распространенный из генетических синдромов, обусловленных делецией [Shiohama A. et al., 2003]). Наиболее часто к опухолевой трансформации ведет сбой работы Dicer вследствие делеции этого локуса. Причем, Dicer является гаплонедостаточным опухолевым супрессором, т.е., даже частичная делеция этого гена способна привести к малигнизации клетки [Lambertz I. et al., 2010].

Для микроРНК характерен принцип узнавания сайта мишени, который впервые был предложен Lewis et al. в 2005 году (Seed Sequence Principle) [Lewis B.P. et al., 2005].

Авторы продемонстрировали, что в большинстве случаев микроРНК связываются с мишенью через последовательность от второго до восьмого нуклеотидов их 5' конца (Seed Sequence). Для девятого-двадцатого нуклеотидов взаимодействие хотя и необходимо, но полной комплементарности не требует.

Взаимодействие микроРНК с молекулой-мишенью – мРНК в большинстве случаев приводит к репрессии гена, однако есть данные и об усилении экспрессии гена-мишени [Ørom U.A.et al., 2008; Stark A.et al., 2007]. Наличие нескольких пар несоответствия в регионе затравки 5' конца микроРНК 3'UTR мишени (при неполной комплементарности) ведет к ингибированию мРНК на уровне трансляции, т.е. ведет к снижению уровня белка таргетного гена без снижения количества мРНК в клетке. Альтернативным путем действия микроРНК является путь, который ведет к дестабилизации мишени через аденозин/урацил богатые элементы [von Roretz C. I.-E. Gallouzi 2008], т.е. к непосредственному разрушению таргетной мРНК. Эти неканонические типы взаимодействия остаются недостаточно изученными и не могут быть предсказаны биоинформатическими методами, однако, они являются весьма важными для понимания механизмов соответствия сайтов мишени затравке 5' конца микроРНК.

К настоящему времени помимо цис-регуляторного механизма показан и новый уровень регуляции генной экспрессии (рис. 2). После изменения экспрессии специфичных микроРНК-таргетных генов (например, генов, кодирующих транскрипционные факторы или РНК-регулирующие белки) последующие эффекты могут изменить транскрипцию и других мРНК (или повлиять на взаимодействие между белками) [Liu X.et al.,2009]

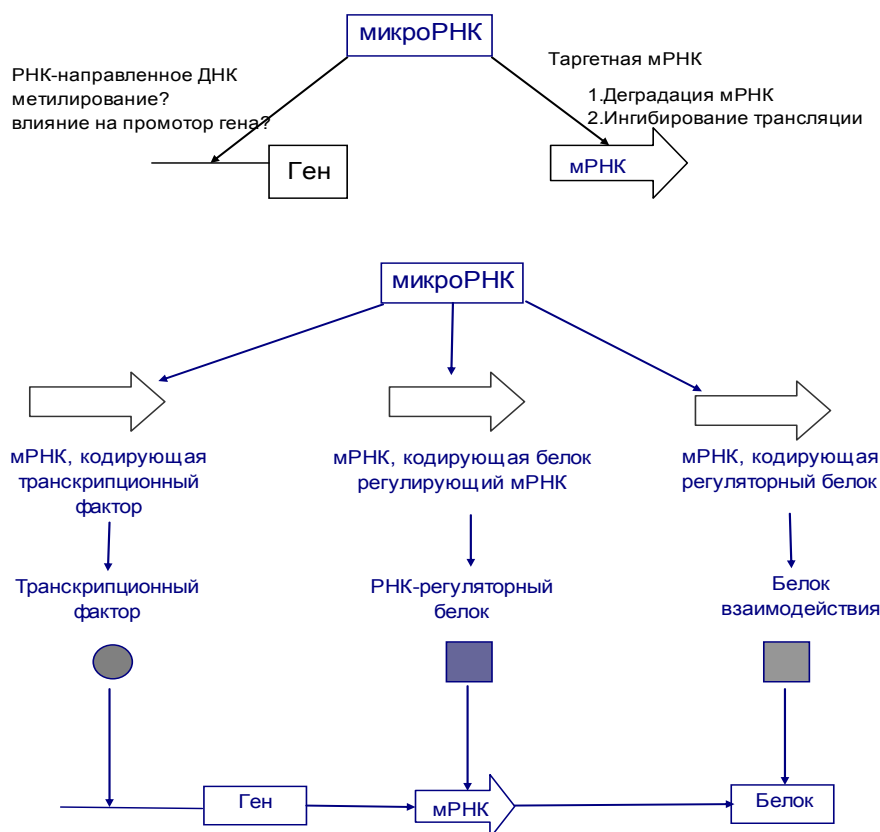


Рисунок 2. – Потенциальные механизмы действия микроРНК.

Цис-регуляция: микроРНК напрямую воздействует на таргетную мРНК и регулирует экспрессию генов-мишеней на посттранскрипционном уровне. Транс-регуляция: микроРНК проявляют свои регуляторные функции через опосредованное воздействие на некоторые гены (например, кодирующие транскрипционные факторы, белки-регуляторы, белки, которые взаимодействуют с белками-мишенями) [Liu X.et al., 2009].

### 1.3. МикроРНК при ОГШ

Аберрантная экспрессия микроРНК может быть следствием разных событий в клетке, включая делеции, амплификации, мутации или нарушение регуляции транскрипционных факторов, чьими мишенями являются специфичные микроРНК. Более того, показано, что влияние на микроРНК оказывают и эпигенетические механизмы регуляции [Benetti R.et al., 2008; Braconi C.et al., 2010]. Впервые связь между злокачественными опухолями и микроРНК была обнаружена группой ученых во главе с профессором G. Calin в 2002 году [Calin G.A.et al., 2002]. С того времени проведено, и продолжают проводиться, большое количество исследований посвященных роли микроРНК в онкогенезе, связи микроРНК с различными клинико-морфологическими

характеристиками опухоли, прогнозом, метастазированием, а также с возможностями использования микроРНК для малоинвазивной/неинвазивной диагностики.

Успехи ученых в развитии высокоразрешающих геномных технологий (таких как микропрофилирование, глубокое секвенирование) позволяют проводить исследования по определению роли и функций микроРНК при различных локализациях опухолей, в том числе и при опухолях головы и шеи. Однако, одной из самых распространенных ошибок в подобных исследованиях является плохая согласованность между методологическими и экспериментальными постановками проблемы. Достаточно много факторов накладывают отпечаток на противоречивость результатов, например, гетерогенность выборки, генетическая вариабельность исследуемых объектов, клинико-патологические характеристики пациентов, а также различия в методологии эксперимента. Другие ограничения при определении роли микроРНК в канцерогенезе ОГШ связаны с мультифакториальностью этиологии, значительной гетерогенностью локализаций и относительно небольшой частотой встречаемости этих новообразований, что провоцирует ученых использовать объединенные, не оптимизированные по клинико-патологическим показателям выборки пациентов.

В настоящее время в литературе представлены данные относительно aberrантной экспрессии при ОГШ для некоторых микроРНК, которые отнесены как к группе онкосупрессорных (let-7, микроРНК-125a/b, **-200a**, -133a/b, семейства микроРНК-99, микроРНК-375, -100, -205, **-494** и ряда других), так и онкогенных (микроРНК-**21**, **-155**, **-221**, -222, -224, кластеров микроРНК-106b-25, микроРНК-17-92 и микроРНК-106a и других) [Bose P.et al., 2013; Shiiba M.et al., 2010].

Относительно выбранных нами микроРНК (-18a, -21, -155, -200a, -200c, -205, -221 и -494) в литературе представлены интересные, но, к сожалению, разрозненные данные, полученные либо на клеточных линиях ОГШ, либо на объединенных и/или малочисленных выборках, включающих разные локализации опухолей области головы и шеи (табл. 1).

Для микроРНК-200a и -200c валидированными мишенями являются транскрипционные факторы типа цинковых пальцев *ZEB1* и *ZEB2*, которые функционируют в качестве транскрипционных репрессоров Е-кадгерина, задействованного в процессе эпителиально-мезенхимального перехода. Также они принимают участие в регуляции клеточной пролиферации, клеточного цикла и апоптоза [Cochrane D.R.et al., 2009; Du Y.et al., 2009; Uhlmann S.et al., 2010]. В литературе продемонстрирована связь сниженного уровня экспрессии микроРНК-200a с повышенной

миграционной активностью опухолевых клеток [Korpal M. Y. Kang 2008; Park S.-M.et al., 2008], в том числе и при опухолях ротовой полости [Park N.J.et al., 2009].

Таблица 1 – Паттерн экспрессии микроРНК интереса при опухолях головы и шеи

| Авторы, год          | Значимые изменение экспрессии микроРНК     |                      | Материалы исследования  | Методы исследования                   |
|----------------------|--|----------------------|---|---------------------------------------|
|                      | Гипер-экспрессия                           | Гипо-экспрессия      |   |                                       |
| Avissar et al, 2009  | -18a<br>-21<br>-221                        |                      | Ткань опухолей языка, гортани, дна ротовой полости, <b>n=16</b>                               | Микрочипы, ПЦР                        |
| Cervigne et al, 2009 | -21  |                      | Ткань опухолей ротовой полости, <b>n=52</b> ; образцы лейкоплакии, <b>n=16</b>                | TaqMan low density arrays (TLDA), ПЦР |
| Chang et al, 2008;   | -18<br>-21<br><b>-155</b>                  | -494                 | Ткань опухолей ротовой полости, ротоглотки, глотки, гортани, <b>n=4</b> ; Культура клеток ОГШ | Микрочипы, ПЦР                        |
| Childs et al, 2009   | -21  | -205                 | Ткань опухолей ротовой полости, ротоглотки, глотки, гортани, <b>n=104</b>                     | Микрочипы, ПЦР                        |
| Jiang et al, 2005    | -205                                       |                      | Культура клеток ОГШ   | ПЦР                                   |
| Kozaki et al, 2008   |  | <b>-155</b><br>-200c | Культура клеток опухоли ротовой полости   | ПЦР                                   |
| Li et al, 2009       | -21  |                      | Ткань рака языка, <b>n=103</b>  | Микрочипы, ПЦР, Нозерн блоттинг       |
| Park et al, 2009     |  | <b>-200a</b>         | Слюна пациентов с ЗНО ротовой полости, <b>n=50</b>  | ПЦР                                   |
| Tran et al, 2007     | -18<br>-21<br><b>-200a</b><br>-221<br>-205 | -200c                | Культура клеток ОГШ   | Микрочипы, Нозерн блоттинг            |
| Wong et al, 2008     | -21<br><b>-155</b>                         |                      | Ткань рака языка, <b>n=4</b>  | ПЦР                                   |
| Yu et al, 2009       | -21<br>-221                                |                      | Модель рака ротовой полости (хомячок), <b>n=8</b>   | Микрочипы                             |

Для микроРНК кластера микроРНК-17-92 (микроРНК-18a в его составе), которые гиперэкспрессированы при ОГШ, выявлено участие в регуляции опухолевого супрессора ретинобластомы (*RBI*) [Volinia S.et al., 2006]. Получены предварительные результаты по выявлению роли этих микроРНК в регуляции *TGFβ* (Transforming Growth Factor beta) сигнального пути [Petrocca F.et al., 2008]. Еще одним из мишеней является транскрипт *p21* кодируемый геном циклин-зависимого ингибитора киназы 2 (*CDKN1A*). Инактивация гена *p21* посредством микроРНК, вероятно, играет важную роль и в табак-ассоциированном

канцерогенезе при опухолях головы и шеи, т.к. он может подавлять индукцию системы ДНК-репарации опосредованной регуляцией гена *p53* [Ivanovska I.et al.,2008].

Одним из важнейших моментов в дезрегуляции при канцерогенезе опухолей головы и шеи являются нарушения PI3K/PTEN/АКТ сигнального пути [Leemans C.R.et al., 2011]. В настоящее время в литературе представлено значительное количество убедительных доказательств участия микроРНК-21 в регуляции этого сигнального пути на примере первичных опухолей и клеточных линий ОГШ [Cervigne N.K.et al., 2009; Chang S.S.et al., 2008; Childs G.et al., 2009; Tran N.et al., 2007]. МикроРНК-21 является наиболее наглядным примером для демонстрации дезрегуляции микроРНК при онкологических заболеваниях, что подтверждено рядом широкомасштабных экспериментов. В настоящее время экспериментально подтверждены мишени микроРНК-21, такие как ген *PDCD4* (programmed cell death protein 4), *RECK* (reversion inducing cysteine-rich protein with kazal motifs), *maspin* (mammary serine protease inhibitor), *NFIB* (nuclear factor I), *TPM1* (Tropomyosin 1), *SPRY2* (Sprouty2) и *PTEN* (phosphatase and tensin homologue). Все эти мишени принимают непосредственное участие в трансформации клеток, прогрессии и инвазии опухоли [Krichevsky A.M. G.G.2009].

Для микроРНК-155 показана повышенная экспрессия в опухолях головы и шеи, а также проведены исследования ее возможной роли в канцерогенезе рака ротовой полости [Chang S.S.et al., 2008; Hui A.B.et al., 2010]. Показана ее ключевая роль в регуляции иммунологических процессов, в том числе и при формировании врожденного и адаптивного иммунных ответов [Teng G. F.N. Papavasiliou 2009]. Также показана связь дезрегуляции экспрессии этой молекулы с геномной нестабильностью и вирусными инфекциями [Tili E.et al., 2011]. Интересно отметить, что микроРНК-155 принимает участие в регуляции TGF- $\beta$ -индуцированного эпителиально-мезенхимального перехода [Kong W.et al.,2008].

Относительно микроРНК-205 в литературе приведены двойственные результаты – она может выступать как в роли онкосупрессора, так онкогена. Показано, что в случае некоторых видов опухолей микроРНК-205 индуцирует апоптоз и тормозит рост и инвазию клеток опухоли [Wu H.et al., 2009]. Эта микроРНК принимает участие в эпителиально-мезенхимальном переходе и процессе приобретения клеткой эмбрионального фенотипа [Gregory P.A.et al., 2008; Korpai M.et al., 2008], а также регулирует клеточную пролиферацию, клеточный цикл и апоптоз [Cochrane D.R.et al., 2009; Du Y.et al., 2009; Uhlmann S.et al., 2010; Zidar N.et al.,2011]

МикроРНК-221, мишенями которой являются транскрипты *p27* и *p57* (участники регуляции генов контрольных точек клеточного цикла), также гиперэкспрессирована при

ОГШ [Avisar M. et al., 2009]. Сниженная экспрессия p27 при некоторых опухолях головы и шеи некоторыми учеными рассматривается в качестве маркера прогрессии рака [Queiroz A. B. et al., 2010]. По уже имеющимся в литературе данным микроРНК-221 также относят к группе онкогенных, поскольку показана ее гиперэкспрессия при раке желудка, щитовидной железы, гепатоклеточной карциноме и некоторых других [He H. et al., 2005; Kim Y.-K. et al., 2009; Колесников Н. et al., 2013].

В литературе показана роль микроРНК-494 в регуляции клеточного цикла [Lim L. et al., 2014; Yamanaka S. et al., 2012], а также в развитии опухоли и связь с тканевой принадлежностью на примере клеточных линий рака легкого, молочной железы и трансформированных бронхиальных эпителиальных клеток [Liu L. et al., 2010; Liu Y. et al., 2012]. МикроРНК-494 также индуцирует клеточный арест при раке легкого и холангиокарциноме [Ohdaira H. et al., 2012].

#### **1.4. МикроРНК как биомаркер малоинвазивной и/или неинвазивной диагностики при ОГШ**

По мере развития молекулярно-биологических подходов и углубления знаний о патогенезе ЗНО, биомаркеры стали рассматриваться как эффективное дополнение к общепринятым методам (гистологическому анализу) для уточнения и верификации клинического диагноза. В литературе продемонстрированы результаты исследований, свидетельствующие об изменении уровня экспрессии внеклеточных микроРНК в сыворотке крови, плазме, моче и некоторых других биологических жидкостях, а также взаимосвязи этого показателя с разными патологическими состояниями, включая злокачественные новообразования [Weber J. A. et al., 2010]. Weber J. A. et al. (2010) представили данные об анализе 12 биологических жидкостей на предмет качества и количества выделяемой микроРНК, а также охарактеризовали возможность использования этих биоматериалов для диагностики рака. Авторы выявили, что максимальное число обнаруживаемых микроРНК (458) находится в слюне, а наименьшее число (204) – в моче. Большинство циркулирующих микроРНК заключены в липидную оболочку или липопротеиновые комплексы, такие как апоптотические тела, микровезикулы или экзосомы, что обеспечивает им защиту от вездесущих РНКаз [Michael A. et al., 2010].

Современные подходы к диагностике ЗНО в основном полагаются на результаты, полученные на биопсийном материале. Этот подход, безусловно, является некомфортным и болезненным для пациентов, поэтому многие исследователи стремятся найти менее травматичные биоресурсы, такие как плазма/сыворотка крови, моча, слюна или другие.

Более того, анализ на микроРНК в сыворотке на основе ПЦР детекции, является достаточно легким и чувствительным подходом [Wittmann J. H.-M. Jäck 2010], что позволяет ученым возлагать большие надежды на этот биоматериал и проводить исследования в этой области.

Lawrie C.H. et al. (2008) впервые продемонстрировали повышенный уровень экспрессии микроРНК-155, микроРНК-210, и микроРНК-21 в сыворотке пациентов с диагнозом В-клеточной лимфомы в сравнении с группой контроля. Более того, авторами показано, что существует связь между повышенной экспрессией микроРНК-21 в сыворотке крови пациентов и увеличением показателя безрецидивной выживаемости [Lawrie C.H. 2008]. Почти одновременно с вышеупомянутыми авторами группа Mitchell P.S. et al. (2008) показали потенциальную возможность использования микроРНК сыворотки крови для диагностики рака простаты [Mitchell P.S. et al., 2008]. Повышение уровня экспрессии микроРНК-184 в плазме пациентов с раком языка также было продемонстрировано в работе Wong T.S. et al. в 2008 году. Более того, эти же авторы выявили, что экспрессия микроРНК-184 в плазме снижается после хирургического удаления первичного очага опухоли [Wong T.-S. et al., 2008], это же показали и Liu C.J. et al. (2010) относительно микроРНК-31 [Liu C.J. et al., 2010]. Эти данные позволяют говорить о возможности использования микроРНК для мониторинга заболевания. Однако необходимо подтверждение на более крупных выборках, а также унификации в исполнении эксперимента и интерпретации результатов прежде чем они смогут быть использованы в клинической практике. MacLellan S.A. et al. (2012) в своей работе показали, что экспрессия пятнадцати микроРНК сыворотки была повышена, а пяти микроРНК понижена у пациентов с диагнозом рака ротовой полости (РРП). Согласно результатам анализа кривой ошибок (ROC-анализу) авторами были выявлены потенциальные биомаркеры для детекции рака ротовой полости или дисплазий поздней степени (микроРНК-16, let-7b, микроРНК-338-3p, микроРНК-223, и микроРНК-29a) [MacLellan S.A. et al., 2012]. Liu X. et al. (2013) показали, что комбинация пяти микроРНК сыворотки крови (микроРНК-16, -21, -24, -155, и -378) дает 87,7% чувствительности и 82,0% специфичности при постановке диагноза рака носоглотки. В следующей своей публикации эти авторы представили расширенные данные по этой локализации и показали, что комбинация данных по профилю экспрессии микроРНК и TNM стадий позволяет улучшить качество прогнозирования заболевания, по сравнению с результатами по использованию этих показателей по отдельности [Liu N. et al., 2014]. Также Liu X. et al (2014) предполагают, что использование четырех микроРНК, а именно микроРНК-22, микроРНК-572, микроРНК-638 and микроРНК-1234 в добавление к TNM-стадированию



позволит персонифицировать терапию для пациентов с диагнозом рака носоглотки [Liu N. et al., 2014].

Внеклеточные микроРНК могут быть достаточно весомыми маркерами при опухолях головы и шеи, особенно для тех локализаций, что расположены в ротовой полости, опухолевые клетки которых выделяют те или иные молекулы непосредственно в слюну. Исследования посвященные анализу экспрессии микроРНК в слюне показали, что патологические процессы в ротовой полости накладывают отпечаток на состав этой биологической жидкости.

Однако количество публикаций по анализу микроРНК в слюне среди пациентов с опухолями головы и шеи очень ограничено. Представлены данные о специфичности экспрессии некоторых микроРНК слюны (-31, -200a и -125a), собранной от пациентов с диагнозом рака ротовой полости в сравнении с аналогичным показателем у здоровых доноров [Liu C.J. et al., 2010; Park N.J. et al., 2009]. В работе Langevin S.M. et al. (2010) на смывах из ротовой полости пациентов с ОГШ выявлено, что статус метилирования промотора микроРНК-137 ассоциирован с полом и индексом веса тела [Langevin S.M. et al., 2010].

Для интерпретации результатов по экспрессии микроРНК в сыворотке крови и слюне необходимы стандартизация методов выделения, условий хранения РНК, использования генов для нормализации результата и статистической обработки данных [Wittmann J. H.-M. Jäck 2010]. И конечно же необходимы данные, полученные на больших выборках, с унификацией образцов по полу, возрасту и использование аналогичной по клинико-морфологическим параметрам группы здорового контроля и, самое главное, их валидация в проспективных исследованиях.

### **1.5. МикроРНК при ранней диагностике ОГШ и прогнозировании заболевания**

В литературе представлено очень мало работ, посвященных роли микроРНК в патогенезе опухолей и возможности использования малых молекул для ранней диагностики заболеваний области головы и шеи. Лейкоплакия ротовой полости является редко встречающейся формой предопухолевой патологии, однако 1-2% этих повреждений прогрессируют в злокачественное новообразование [Napier S.S. P.M. Speight 2008]. В настоящее время существует проблема дифференцировки лейкоплакии от неинвазивного состояния до инвазивного. Для уточнения диагноза требуется серия прицельных биопсий, что является травматичной и болезненной процедурой для пациента, и гистологическая оценка морфолога [Van der Waal I. 2009]. В работах Cervigne N.K. et al., (2009) показано, что мульти-микроРНК-профилирование позволяет с высокой точностью предсказывать

прогрессирование лейкоплакии ротовой полости. Авторы установили, что экспрессия трех микроРНК в патологически измененной ткани, микроРНК-345, -21 и -181b была достоверно ассоциирована с развитием плоскоклеточной карциномы [Cervigne N.K.et al., 2009]. Yang Y. et al. в 2013 году опубликовали данные, по результатам которых можно судить о перспективности использования микроРНК слюны для оценки вероятности прогрессии лейкоплакий в дополнение к стандартным методам диагностики патологий ротовой полости. Так, они показали, что уровень экспрессии микроРНК-10b, микроРНК-145, микроРНК-99b, микроРНК-708 и микроРНК-181c значимо ниже в слюне пациентов с прогрессирующей лейкоплакией в сравнении с подгруппой лиц без прогрессии данного заболевания [Yang Y.et al.,2013].

Появляется все больше работ, посвященных прогностической ценности микроРНК при опухолях головы и шеи. Childs G. et al. (2009), используя профилирование 236 уникальных микроРНК методом ПЦР в режиме реального времени на образцах, полученных от 104 пациентов, выявили низкий уровень экспрессии микроРНК-205 и let-7d, а также статистически значимую корреляцию этого показателя с локорегиональным метастазированием и уменьшением сроков выживаемости [Childs G.et al., 2009]. Более того, они показали, что на основе данных по экспрессии этих двух микроРНК можно предсказывать прогрессию заболевания. Другие авторы обнаружили, что экспрессия микроРНК-451 при опухолях ОГШ является достоверным маркером прогноза рецидива заболевания [Hui A.B.et al., 2010]. В работе Avissar M. et al. (2009), авторы показали обоснованность использования показателя отношения экспрессии микроРНК-221 к микроРНК-375, с целью дифференциации опухолевой ткани от нормальной ткани со специфичностью 93% и чувствительностью 92% и продемонстрировали, что этот показатель потенциально может быть использован в качестве диагностического маркера рака [Avissar M.et al., 2009]. В литературе встречаются данные и о связи экспрессии некоторых микроРНК (например, микроРНК-205, с метастазированием [Fletcher A.M.et al., 2008]. Однако когорта пациентов в данном исследовании составила всего 19 человек, поэтому актуальными остаются дальнейшие подтверждения и исследования в этом направлении с увеличением групп обследуемых. На примере когорты пациентов с опухолями головы и шеи Summerer I. et al. (2013) показали, что изменение паттерна циркулирующих микроРНК (микроРНК-425-5p, микроРНК-93-5p) в плазме крови в ходе радиотерапии отражает ответ опухоли на проводимое лечение, а значит потенциально этот показатель может быть использован в качестве биомаркера для мониторинга терапии [Summerer I.et al., 2013]. В работе Lo W.L. et al. (2011) было показано значительное

снижение экспрессии микроРНК-200с в ткани регионарных лимфоузлов при ОГШ, что позволяет судить о роли этой микроРНК в метастазировании [Lo W.L.et al.,2011].

### **1.6. МикроРНК при папилломавирус-позитивных опухолях головы и шеи**

Согласно современным представлениям, 10-25% случаев рака в мире могут быть ассоциированы с хроническими вирусными инфекциями. В настоящее время общепризнанно, что определенные типы вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска является этиологическим фактором рака шейки матки (по данным пресс-релиза ВОЗ 1996 г.).

Вирус папилломы человека (ВПЧ) относится к подгруппе А семейства Papillomaviridae (Mel.). Геном представлен циклически замкнутой двунитевой ДНК протяженностью около 8 тыс. пар оснований, кодирующей всего 8 открытых рамок считывания. Изолированная ДНК обладает инфекционными и трансформирующими свойствами. Геном ВПЧ разделен на 3 функционально-активных региона: LCR (long control region), early (E) и late (L). Наиболее важными с точки зрения онкогенных потенций ВПЧ являются онкобелки Е6 и Е7, которые являются онкогенами этих вирусов (среди ВПЧ высокого риска), и играют ключевую роль в процессе канцерогенеза. В последние годы было показано, что в инфекционном процессе ВПЧ различают две стадии:

- стадия репродуктивной инфекции, когда вирусная ДНК находится в свободном (эписомальном) состоянии;
- стадия интегративной инфекции, когда ДНК вируса встраивается в геном инфицированных клеток.

Первая стадия является обратимой и у многих инфицированных организмов наступает ремиссия. Стадия интегративной инфекции является первым шагом к опухолевому перерождению клетки и очень часто заканчивается развитием карциномы [Хансон К.П. Е.Н. Имянитов2002].

Все большее внимание исследователей привлекает изучение этиологической и патогенетической роли вирусов при опухолях ОГШ. Международным Агентством по изучению рака (IARC) на популяции больных ОГШ различных регионов мира, была показана связь риска развития опухолей с инфицированностью респираторного тракта ВПЧ 16 типа [Sytjänen S.2007]. Было обнаружено, что частота выявления ВПЧ варьирует в зависимости от локализации опухоли. В исследованиях, проведенных Klussmann J.P. et al. (2001) вирус папилломы человека обнаружен в 18-23%, 8%, 25% и 7-25% случаев при раке ротовой полости, носоглотки, ротоглотки и гортани, соответственно [Klussmann J.P.et al., 2001]. Li W. et al. (2003) показали, что 46% злокачественных опухолей миндалин в

Австралии являлись вирус-позитивными (n=67), в то время как у пациентов из Китая (n=16) с той же локализацией опухоли папилломавирус обнаружен не был [Li W.et al., 2003]. Kreimer A.R. et al. (2005) провели системный анализ 60 публикаций по ВПЧ при опухолях головы и шеи в разных регионах мира [Kreimer A.R.et al., 2005]. Они выявили повышенную частоту встречаемости ВПЧ в опухолевой ткани пациентов Северной Америки в сравнении с больными из Европы и Азии. Также они отметили, что при раке ротоглотки ВПЧ встречается чаще (35,6%), чем при раке ротовой полости (23,5%) или гортани (24,0%) [Kreimer A.R.et al., 2005].

При опухолях головы и шеи ВПЧ-статус имеет значительное влияние на клинические показатели, включая прогноз и выживаемость [Lajer C.B. C.v. Buchwald 2010]. Показано, что у ВПЧ-позитивных больных ОГШ отмечается более благоприятное течение заболевания по сравнению с ВПЧ-негативными [Marur S.et al., 2010; Sturgis E.M. K.K. Ang 2011], однако точные механизмы таких различий не установлены. Отмечают увеличение чувствительности ВПЧ-позитивных опухолей к химио- и лучевой терапии, благодаря чему улучшаются показатели общей и безрецидивной выживаемости [Kofler B.et al., 2014]. Lassen P. et al. (2009) показали, что общая пятилетняя выживаемость после радиотерапии составила 62% у p16-позитивных (опосредованный маркер ВПЧ-инфекции) пациентов в сравнении с 26% для p16-негативными пациентами [Lassen P.et al., 2009]. Fischer C.A. et al. (2010) подтвердили, что p16-позитивные пациенты с ЗНО ротовой полости имеют более высокие показатели пятилетней выживаемости, чем p16-негативные пациенты (57,1% против 26,8%, соответственно) [Fischer C.A.et al., 2010].

В настоящее время выдвигаются предположения о том, что разница в клинических показателях ВПЧ-позитивных опухолей является следствием воздействия вирусных генов на геном хозяина, в том числе и на микроРНК [Lajer C.B. C.v. Buchwald 2010]. Однако количество исследований по данному вопросу невелико. Lajer C.B. et al. (2011) показали, что ВПЧ-инфекция ассоциирована с изменениями в экспрессии микроРНК-127-3р и микроРНК-363 в опухолях ротовой полости и глотки [Lajer C.et al., 2011]. В работе Zheng Z.M. и Wang X. (2011) представлены результаты эксперимента по интерференции E6-p53 и E7-pRb вирус-индуцируемых путей и обнаружено, что онкобелки E6 и E7 папилломавируса могут влиять на изменение экспрессии кластера микроРНК-15/16, семейства микроРНК-17-92, микроРНК-21, микроРНК-23b, микроРНК -34a и кластера микроРНК-106b/93/25 в клетке хозяина [Zheng Z.-M. X. Wang 2011]. По результатам своих исследований Nuovo, G.J. et al (2010) пришли к заключению, что количество белка ВПЧ L2 ассоциировано со снижением экспрессии микроРНК-125b [Nuovo G.J.et al., 2010]. Авторы обнаружили, что восстановление или снижение экспрессии микроРНК-125b

экспериментальным путем приводит к снижению или повышению количества вирусных частиц в клетке хозяина, соответственно [Nuovo G.J.et al., 2010]. Другими авторами было показано, что экспрессия белка ВПЧ Е5 вызывает повышение экспрессии одних микроРНК (микроРНК-146а) и снижению других (микроРНК-324-5р и микроРНК-203) [Greco D.et al., 2011]. Wald A.I. et al. (2011) наблюдали дифференциальную экспрессию микроРНК в вирус-позитивных опухолях ОГШ в сравнении с вирус-негативными [Wald A.I.et al., 2011].

## **Заключение**

Открытия последних лет, связанные с ролью микроРНК в патогенезе злокачественных новообразований человека пробудили огромный интерес представителей фундаментальной науки и в сфере трансляционной биомедицины. Регуляция генной экспрессии является многоуровневым процессом, где от момента синтеза мРНК до образования белкового продукта происходит несколько этапов контроля, таких как транскрипция, процессинг мРНК, транспортировка их в цитоплазму, трансляция и регуляция на уровне деградации мРНК [Албертс Б.А. et al., 1994]. Раскрытие роли и доли вовлеченности малых молекул в этом процессе позволяет выявить новый уровень фундаментальных знаний, что в последующем может найти реализацию в практической деятельности. Определение участия микроРНК в патогенезе заболеваний, в том числе и онкологических, позволит приоткрыть завесу механизма этого сложного и многокомпонентного процесса, в котором задействованы системы регуляции разного уровня, начиная от молекулярных до системных.

В настоящее время накопленный багаж знаний об участии микроРНК в канцерогенезе при многих локализациях, а также данные о высочайшей специфичности паттерна микроРНК в сравнение с профилем мРНК в ткани говорит о пригодности малых молекул в качестве высокоинформативных биомаркеров злокачественной опухоли [Jiang J. et al., 2005; Lu J. et al., 2005]. Перспектива применения микроРНК в клинической практике имеет множество приложений, такие как ранняя диагностика, прогнозирование и мониторинг заболевания, возможность их использования в терапии злокачественной патологии в качестве мишеней таргетных препаратов. В этом случае необходимо учитывать дуалистические функции микроРНК. Если микроРНК выступает в роли онкосупрессора, необходимо повысить уровень ее экспрессии путем увеличения копийности или снятия репрессии кодирующего гена, либо привнести зрелую микроРНК в опухолевую клетку. Если же микроРНК выступает в роли онкогена, актуальным будет тем или иным способом подавить ее экспрессию.

Прежде чем приступить к практическому применению микроРНК, следует прояснить ряд вопросов. К ним относятся общая роль микроРНК в клеточных путях и механизмах регуляции их экспрессии и поиск с валидацией критичных микроРНК, которые вовлечены в развитие злокачественной патологии. Несмотря на значительное количество данных и публикаций, посвященных этим вопросам, остается ряд пробелов, касающихся отдельных локализаций и патологических состояний, к которым относятся предопухолевые патологии и рак гортани. Детальный анализ опубликованных исследований показывает, что зачастую ученые используют не оптимизированные

выборки, объединенные по разным локализациям области головы и шеи пациентов всех возрастов и обоих полов (данные приведены выше по тексту). Несмотря на большое количество публикаций о роли микроРНК при опухолях головы и шеи, смещение акцента на более частные вопросы, как то «микроРНК в слюне» или «роль микроРНК при метастазировании» показывает, что качественных и подробных работ очень мало, хотя эти направления исследований являются многообещающими и весьма перспективными. Можно найти базы данных, охватывающие разные аспекты изучения микроРНК. Для поиска общей информации о конкретных микроРНК, генных картах, последовательностях и т.д., наиболее надежными из которых являются базы данных [microRNA.org](http://microRNA.org), [miRBase](http://miRBase.org), [miRGen 2.0](http://miRGen.org) и другие. При поиске потенциальных мишеней и информации о них, установлении соответствия сайтов узнавания и условной оценке предсказания мишеней, проведении исследований по валидации мишеней микроРНК хорошим подспорьем могут быть базы данных [TargetScan](http://TargetScan.org), [PicTar](http://PicTar.org), [TarBase](http://TarBase.org), [Diana-microT](http://Diana-microT.org), [miRTarBase](http://miRTarBase.org) и некоторые другие. Работы, посвященные определенным микроРНК при раке различных локализаций, представлены в базе [HMDD](http://HMDD.org) (Human miRNA & Disease Database (<http://202.38.126.151/hmdd/miRna/md/>)). Существует даже база данных, в которой Babu et al. объединили данные по экспрессии микроРНК при опухолях головы и шеи (<http://tarmiR.rgcb.res.in/henecan/>), что в значительной степени облегчает работу исследователей в этой области.

Стоит обратить внимание и на особенность микроРНК как регуляторов экспрессии генов и способность их взаимно дополнять и взаимно замещать функции друг друга, что определяет необходимость анализировать общую картину с помощью соответствующих математических методов. В своей работе мы провели учет всех особенностей, связанных с исследованием микроРНК при патологиях гортани, выстроив патологический ряд от дисплазии 0 до верифицированного рака 4 стадии распространенности процесса, оптимизировав выборки по исходным клинко-патологическим параметрам.

Таким образом, на сегодняшний день актуальными являются фундаментальные и клинические разработки в области микроРН-омики. Результаты подобных исследований позволят выявить статус микроРНК в нормальных и трансформированных клетках, а также оценить возможность применения молекул микроРНК для модуляции клеточного роста, пролиферации и процессов метаболизма. Понимание роли микроРНК в онкогенезе позволит с новой позиции взглянуть на его молекулярные основы и выявить более перспективные биомаркеры для ранней диагностики и терапевтических подходов при лечении опухолей ОГШ.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Характеристика пациентов и клинического материала

В исследование были включены 81 пациент с патологиями гортани, обратившихся за консультативной помощью и проходивших стационарное лечение в отделении опухолей головы и шеи Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский научно-исследовательский онкологии». Пациенты были разделены на две подгруппы: больные с предопухолевыми заболеваниями и карциномой гортани (n=26 и n=55, соответственно). Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ президента РФ 39 от 24.12.93 №2288) получено разрешение этического комитета Томского НИИ онкологии. Всеми обследованными пациентами было подписано информированное согласие.

Возраст больных варьировал в пределах от 23 до 77 лет. Характеристика обследованных лиц представлена в таблице 2.

Таблица 2 - Распределение пациентов по полу и возрасту

| Характеристика | Рак гортани, n (%) | Предопухолевые заболевания гортани, n (%) | p    |
|----------------|--------------------|---|------|
| Возраст        | 56±10 (30-77)      | 54 ±11 (23-71)                            | 1,00 |
| ≥44            | 7 (13%)            | 6 (23%)                                   |      |
| 45-64          | 39 (71%)           | 14 (54%)                                  |      |
| ≥65            | 9 (16%)            | 6 (23%)                                   |      |
| Пол            |                    |   |      |
| Муж.           | 50 (91%)           | 20 (77%)                                  | 0,16 |
| Жен.           | 5 (9%)             | 6 (23%)                                   |      |

Для анализа сравниваемых групп по гистологическому типу использовалась рекомендуемая ВОЗ (2005) «Гистологическая классификация опухолей гортани». Гистологическое исследование проводилось в отделении патологической анатомии и цитологии Томского НИИ онкологии. У всех обследованных больных верифицирован первичный диагноз плоскоклеточного рака гортани (РГ) разной степени дифференцировки. Стадия заболевания определялась в соответствии с седьмым изданием Международной классификации опухолей по системе TNM, опубликованном в 2009 году. Распространенность опухолевого процесса оценивалась по международной системе TNM (табл. 3). Наблюдение за 37 из 55 больными (отслеживаемость 67%), проходившими стационарное лечение в клинике Томского НИИ онкологии, проводилось в течение 4-х лет. Локорегиональный рецидив отмечен у 8% (3 из 37) пациентов в сроки от 3 месяцев до



3-х лет от момента окончания лечения, при этом летальный исход зарегистрирован у 16,2% (6 из 37) больных по причине основного заболевания и у 2,7% – по невыясненным причинам (1 из 37).

После забора биоматериала, проведения обследования, а также постановки диагноза больные раком гортани получали 2 курса неoadъювантной химиотерапии (ХТ) с интервалом 3-4 недели по схеме: паклитаксел 175 мг/м<sup>2</sup>, карбоплатин AUC=6, с последующей лучевой терапией (ЛТ) в режиме мультифракционирования дозы по 1,3 Гр 2 раза в день с интервалом 4 ч, с оценкой эффекта при СОД 40 изоГр. Затем больным, у которых была достигнута частичная регрессия более 50%, продолжили ЛТ в режиме мультифракционирования дозы до СОД 65 изоГр с оценкой эффекта терапии. Пациентам, у которых эффект терапии был оценен как стабилизация и частичная регрессия менее 50%, проведено хирургическое лечение.

Таблица 3 - Распределение пациентов с карциномой гортани по TNM

| Характеристика                           | Рак гортани, n, % |
|--|-------------------|
| TNM                                      |                   |
| I  | 10 (18%)          |
| II                                       | 14 (25%)          |
| III                                      | 19 (35%)          |
| IV                                       | 12 (22%)          |
| Региональное метастазирование            |                   |
| N0                                       | 43 (78%)          |
| N>0                                      | 12 (22%)          |
| Отдаленное метастазирование              |                   |
| M0                                       | 55 (100%)         |
| Степень дифференцировки опухолевой ткани |                   |
| Низкая                                   | 9 (16%)           |
| Умеренная                                | 38 (69%)          |
| Высокая                                  | 5 (10%)           |
| нет информации                           | 3 (5%)            |

Группу с предопухолевыми заболеваниями составили 6 пациентов с доброкачественными опухолями, 3 человека с папилломатозом и 17 – с хроническим гиперпластическим ларингитом гортани. Согласно результатам гистологического анализа у 14 человек отмечено отсутствие диспластических изменений ткани гортани, у остальных выявлены дисплазии I, II и III степени (2, 3 и 7 пациентов, соответственно).

Всем обследованным пациентам проведена молекулярно-генетическая экспертиза по определению вирусоносительства и типированию вируса-папилломы человека (ВПЧ) у вирус-позитивных лиц.

68 образцов ткани опухолей и участков морфологически неизменной ткани (нормальная), взятой на расстоянии не менее 2 см от очага опухоли, были получены в

результате диагностических биопсий при видеоларингоскопии и 13 образцов – после оперативного вмешательства по поводу рака. Диагноз подтверждался результатами морфологического обследования. Слюна этих же пациентов получена в день обращения за консультативной помощью в эндоскопическое отделение либо в день проведения операции в отделении опухолей головы и шеи клиники Томского НИИ онкологии.

## 2.2 Методы исследования

**2.2.1 Подготовка клинических проб.** Во время проведения диагностической биопсии или оперативного вмешательства по поводу рака фрагменты опухолевой и прилежащей неизменной ткани (размером 0,3-0,5 см для биопсий и 0,5-1,0 см для операционного биоматериала), взятой на расстоянии не менее 2 см от очага опухоли, помещались в пробирки «Eppendorf» с 0,5-1 мл среды для транспортировки и хранения РНК *RNAlater* (Sigma, USA), а также в пробирки «Eppendorf» с 0,5-1 мл среды для транспортировки и хранения ДНК. Забор слюны проводился во время обращения за консультативной помощью в эндоскопическое отделение либо в день проведения операции в отделении опухолей головы и шеи клиники.

Экстракцию тотальной фракции РНК из ткани проводили с использованием набора реагентов *miRVana™* (Ambion, USA) согласно стандартному протоколу ([http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_055423.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_055423.pdf)). Предварительная отработка методов выделения РНК из слюны показала, что при работе с этим типом биоматериала оптимальный результат позволяет получить метод экстракции РНК с использованием *Trizol Reagent* (Invitrogen, USA), согласно стандартному протоколу ([http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)).

**2.2.2. Методика выделения РНК.** При работе с набором реагентов *miRVana™* гомогенизированный фрагмент ткани помещался в 0,3-0,6 мл лизирующего раствор (*Lysis/Binding Buffer*) на 10-15 мин с тщательным перемешиванием, добавляли 1/10 V раствора для гомогенизации (*Homogenate additive*) и держали пробирки на льду в течение 10 мин. Затем добавляли 1V в равной пропорции фенол-хлороформа и тщательно перемешивали 30-60 сек. с последующим центрифугированием при 10000 об./мин. в течение 5 мин. Супернатант переносили в чистые пробирки с 1.25 V 100% спирта. Затем смесь переносили в пробирки с картриджем и центрифугировали 15 сек. при 10000 об./мин. Промывку картриджа проводили добавлением 0,7 мл буфера для отмывки №1 (*Wash Solution 1*), затем дважды - 0,5 мл буфера для отмывки №2/3 (*Wash Solution 2/3*) с центрифугированием в течение 15 сек. при 10000 об./мин. после каждого этапа. Растворение РНК проводили в 40-50 мкл раствора для элюции (*Elution Solution*) прогретого до 95°C.

Перед выделением РНК из слюны, пробирку с биоматериалом центрифугировали при 10000 об./мин. в течение 5 мин. Супернатант в объеме 150-250 мкл помещали в 800 мкл раствора *Trizol* и тщательно перемешивали. Образец инкубировали в течение 5 мин. при 15-30°C. Затем добавляли 0,2 мл хлороформа и тщательно перемешивали.

Центрифугировали пробирки при 4°C 15 мин. при 12000 об./мин. Верхнюю фазу, содержащую РНК, переносили в чистые пробирки, с последующим добавлением 0,5 мл 95% спирта и 1мкл гликогена концентрацией 20 мг/мл (ThermoScientific, USA). Центрифугировали пробирки при 4°C 10 мин. при 12000 об./мин. Супернатант удаляли пипеткой с последующей промывкой РНК в 75% спирте. Верхнюю фазу удаляли пипеткой, осадок подсушивали и растворяли в 25 мкл стерильной воды.

Оценка концентрации нуклеиновых кислот по оптической плотности при длине волны 260 нм, а так же оценка качества препарата по соотношению оптической плотности при длинах волн 260 нм и 280 нм проведена на спектрофотометре NanoDrop 2000 (ThermoScientific, USA). При использовании набора реагентов miRVana™, выход РНК варьировал от 50 до 800 нг/мкл,  $A_{260}/A_{280}=1,97$  (для ткани, рис. 3), от 5 до 70 нг/мкл,  $A_{260}/A_{280}=1,85$  (для слюны).

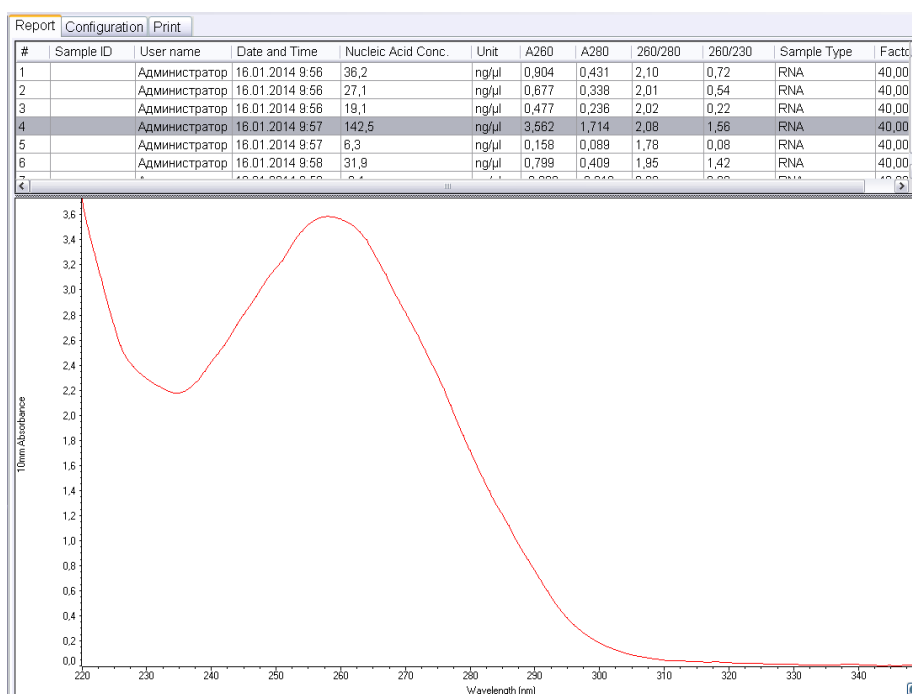


Рисунок 3 – Результаты анализа РНК выделенной из ткани с прибора NanoDrop 2000.

Качество выделенной РНК проверяли при помощи системы капиллярного электрофореза TapeStation (Agilent Technologies, USA) с использованием набора реагентов R6K ScreenTape (Agilent Technologies, USA). Результаты показали, что значение RIN (RNA integrity number) для образцов РНК, выделенных из ткани колоночным методом miRVana™ составил 8,77 (от 8,3 до 9,0, рис. 4), что говорит о высоком качестве полученных образцов и пригодности их к анализу методом количественной ПЦР в режиме реального времени. РНК хранили при –80°C в низкотемпературном холодильнике.

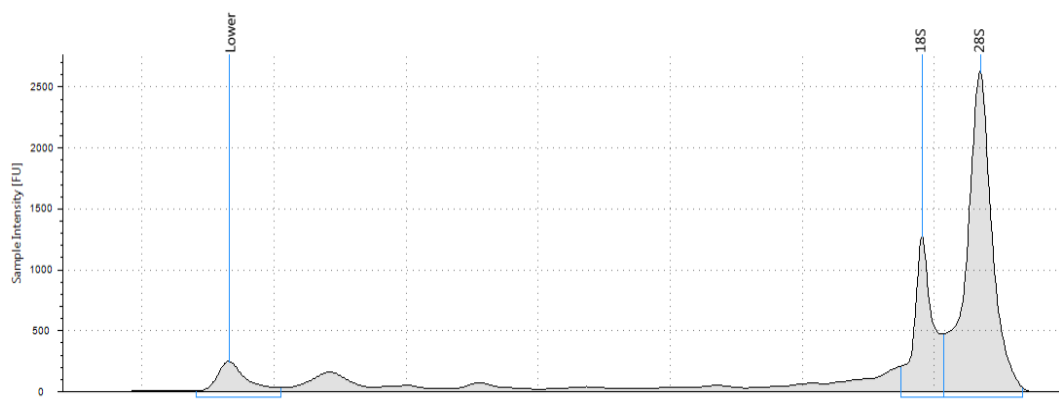


Рисунок 4 – Результат определения RIN для образца #55C (RIN = 9.2).

**2.2.3. Методика выделения ДНК.** Выделение ДНК из замороженных образцов биопсий или операционного биоматериала проводили фенол-хлороформным методом, при котором использовали пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл и вносили по 50 мкл исследуемого материала, добавляли 15 мкл раствора 10 x Трис-ЭДТА («Сибэнзим», Россия), 50 мкл раствора 10% додецилсульфата натрия (ДСН) и перемешивали. Вносили 15 мкл раствора протеиназы К («Сибэнзим», Россия), вновь перемешивали. Инкубировали 1-6 часов при температуре 37°C. В каждую пробирку добавляли по 0,6 мл фенола («Медиген», Россия) и встряхивали в течение одной минуты. Для разделения фаз пробирку центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин. После чего верхнюю фазу, содержащую ДНК переносили в чистые пробирки. Добавляли равный объем смеси фенол-хлороформ, встряхивали в течение 30 секунд. Центрифугировали 10 минут при 12000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в чистые пробирки. Добавляли равный объем хлороформа и встряхивали в течение 30 секунд. Затем центрифугировали 10 минут при 12000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в чистые пробирки. Добавляли 2 мкл раствора ДНК-носителя, 0,01 часть по объему 1,5 М раствора ацетата Na, 2,5 объема 96% этилового спирта и перемешивали. Пробирки помещали в морозильную камеру (на ночь). ДНК осаждали центрифугированием в течение 15-30 минут при 14000 об/мин при 4°C. Супернатант удаляли пипеткой с последующей промывкой ДНК в 70% спирте с перемешиванием. Супернатант удаляли пипеткой, осадок подсушивали и растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера (10 ммоль Трис-НСl pH=8,0, 0,1 ммоль ЭДТА pH=8,0, 2% ДСН).

**2.2.4 Полимеразная цепная реакция для определения экспрессии микроРНК.** Определение уровня экспрессии микроРНК (hsa-microRNA-18a-5p, hsa-microRNA-21-5p, hsa-microRNA-155-5p, hsa-microRNA-200a-3p, hsa-microRNA-200c-3p, hsa-microRNA-205-

5p, hsa-microRNA-221-3p, hsa-microRNA-494-3p) проводили по схеме представленной на рис. 5.

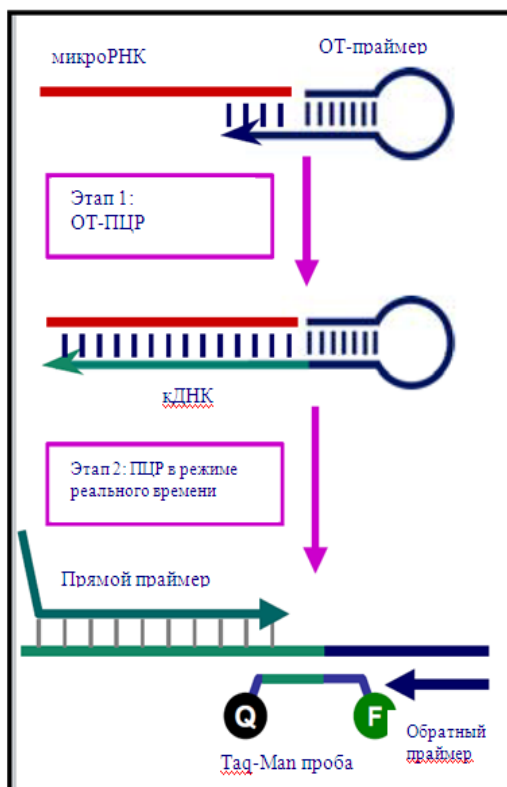


Рисунок 5 – Схема учета уровня экспрессии микроРНК.

Примечание: Этап 1 – типоспецифичный праймер для обратной транскрипции (ОТ-праймер) шпильчатой конструкции отжигается и удлинит матрицу; Этап 2 – для проведения реакции ПЦР в режиме реального времени используются типоспецифичный прямой праймер, TaqMan® проба и универсальный обратный праймер.

**2.2.4.1. Методика ОТ-ПЦР.** Мультиплексная обратно-транскриптазная ПЦР (ОТ-ПЦР) проведена в объеме 20 мкл, в состав которого входили 100-500 нг РНК-матрицы, 0.5 нМ микроРНК-специфичного праймера, 1 ед. ингибитора РНКаз, 50 ед. MMLV ревертазы («Сибэнзим», Россия), 1x MMLV буфера и 1 mM каждого dNTP. Режим импульсной ОТ-ПЦР использовали с целью увеличить эффективность реакции и снизить возможные неспецифичные взаимодействия между праймерами микроРНК [Iyevleva A.G. et al., 2012]. Протокол реакции был следующий: 38 циклов при 16°C в течение 20 сек., 42°C в течение 20 сек., 50°C в течение 1 сек. с заключительным этапом прогрева смеси при 85°C в течение 1 мин. При каждой постановке были включены отрицательные контроли не содержащие РНК и/или несущие в составе геномную ДНК.

Оптимизация и проверка праймеров/проб на показатели гомологии, структурных и биохимических параметров, а также их качества были проведены в программе Vector NTI

Advanced 11.5 и с использование базы данных BLAST  
([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome))

**2.2.4.2. Методика ПЦР в режиме реального времени.** ПЦР в режиме реального времени проведена в объеме 20 мкл на амплификаторе Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Australia). В составе каждой реакционной смеси содержались: 1мкл ОТ-продукта, 0,35 ед. TaqDNA полимеразы («Сибэнзим», Россия), 1х ПЦР буфер (pH = 8.3), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкл каждого dNTP, 200 нМ прямого праймера, 20 нМ обратного праймера и 400 нМ специфичной TaqMan пробы. После прогрева смеси в течение 2 мин. при 94°C, ПЦР проводилась согласно следующему режиму: 45 циклов при 94°C в течение 10 сек. и 30 сек. при 62°C. Все реакции ПЦР в режиме реального времени проведены в триплете согласно протоколу [Iyevleva A.G.et al., 2012]. Праймеры и пробы для микроРНК указаны в таблице 4.

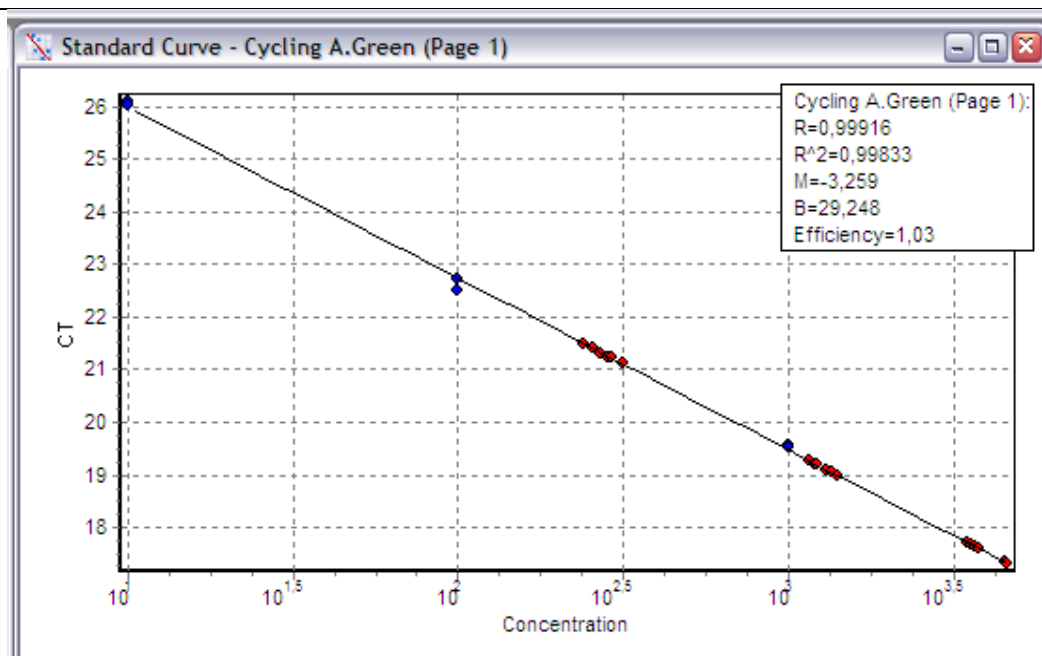
Таблица 4 - Праймеры и пробы для ПЦР

|                |   |
|----------------|---|
| микроРНК-18a   |   |
| ОТ-праймер     | gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgcactatctgc  |
| Прямой праймер | gccgctaaggtgcatctagt                                  |
| Проба          | (FAM)-tcgcactggatacgcactatctgc-(RTQ1)                 |
| микроРНК-21    |   |
| ОТ-праймер     | gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgcactcaaca   |
| Прямой праймер | gccgctagcttatcagact                                   |
| Проба          | (FAM)-cgactggatacgcactccaacat-( RTQ1)                 |
| микроРНК-155   |   |
| ОТ-праймер     | gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgcaccccctat  |
| Прямой праймер | gccgcttaatgctaactctg                                  |
| Проба          | (FAM)-tcgcactggatacgcacccccta-( RTQ1)                 |
| микроРНК-200a  |   |
| ОТ-праймер     | gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgcacacatcg   |
| Прямой праймер | gccgctaacactgtctggtta                                 |
| Проба          | (FAM)-cgactggatacgcacacatcgtt-( RTQ1)                 |
| микроРНК-200c  |   |
| ОТ-праймер     | gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgcactccatcat |
| Прямой праймер | gccgctaatactgccgggt                                   |
| Проба          | (FAM)-tcgcactggatacgcactccatca-( RTQ1)                |
| микроРНК-205   |   |
| ОТ-праймер     | gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgaccagactc   |
| Прямой праймер | gccgctccttcattccac                                    |
| Проба          | (FAM)-tcgcactggatacgaccagact-( RTQ1)                  |
| микроРНК-221   |   |
| ОТ-праймер     | gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgcagaaacc    |
| Прямой праймер | gccgcagctacattgtctg                                   |
| Проба          | (FAM)- cgactggatacgcagaaacc-( RTQ1)                   |
| микроРНК-494   |   |
| ОТ-праймер     | gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgcagaggtt    |

|                  |  |
|------------------|--|
| Прямой праймер   | ccgctgaaacatacacgg                                   |
| Проба            | (FAM)- cgactggatacgacgaggttt-( RTQ1)                 |
| микроРНК-103     |  |
| ОТ-праймер       | gtcgtatccagtgccagggtccgaggtattcgactggatacgactcatagcc |
| Прямой праймер   | ccgcagcagcattgtacag                                  |
| Проба            | (FAM)-cgactggatacgactcatagc-( RTQ1)                  |
| Обратный праймер | gtgcagggtccgaggtat                                   |

Анализ результатов ПЦР в режиме реального времени осуществлялся автоматически в программном обеспечении, соответствующем используемому оборудованию. В каждой постановке проводился контроль за основными показателями эффективности и качества реакции ПЦР по стандартной кривой (рис. 6А). Для расчета уровня экспрессии микроРНК использованы значения Ct (рис. 6Б).

А



Б



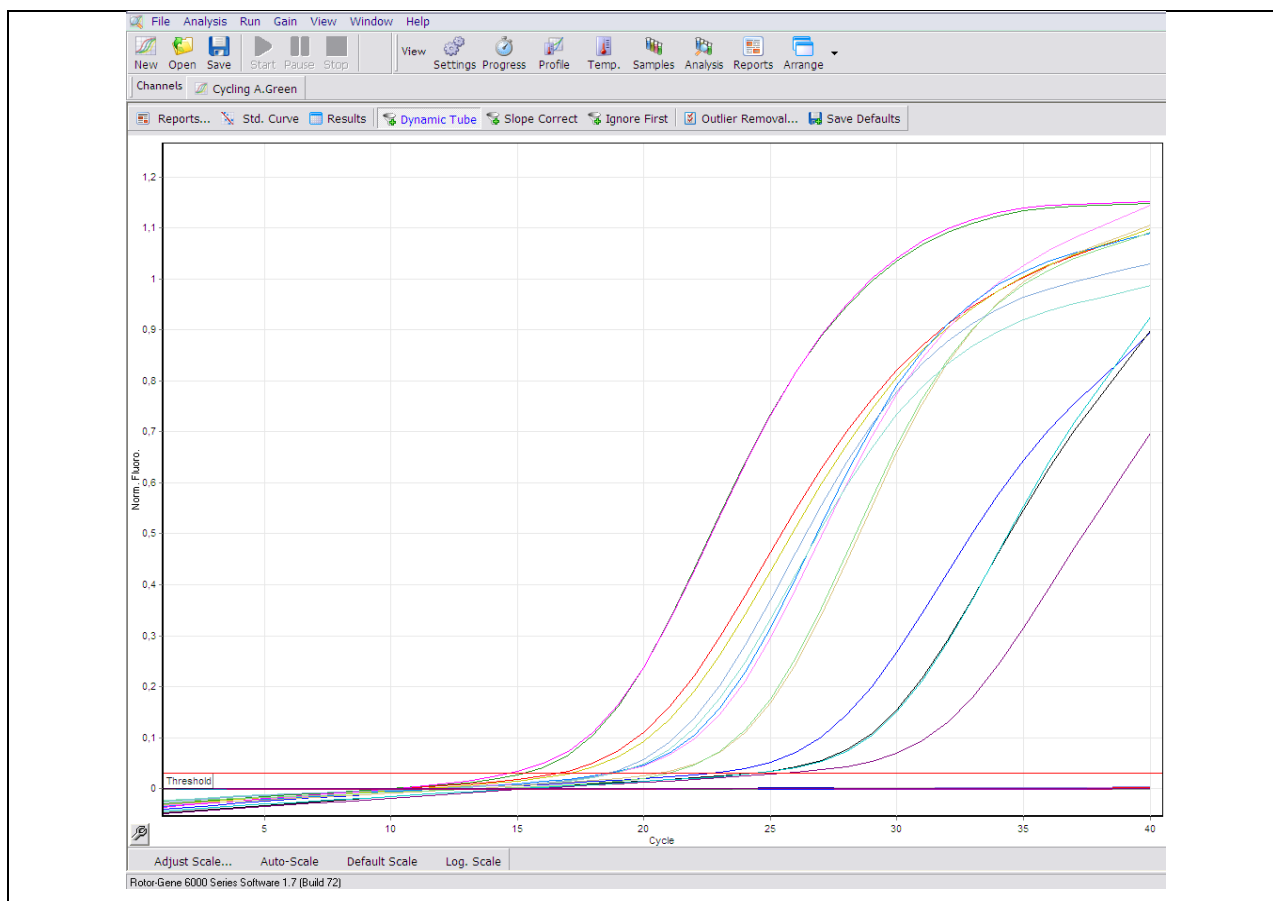


Рисунок 6 – Результаты постановки ПЦР в режиме реального времени.

Результаты реакции ПЦР в режиме реального времени валидированы при помощи 2,2% агарозного гель-электрофореза (рис. 7).

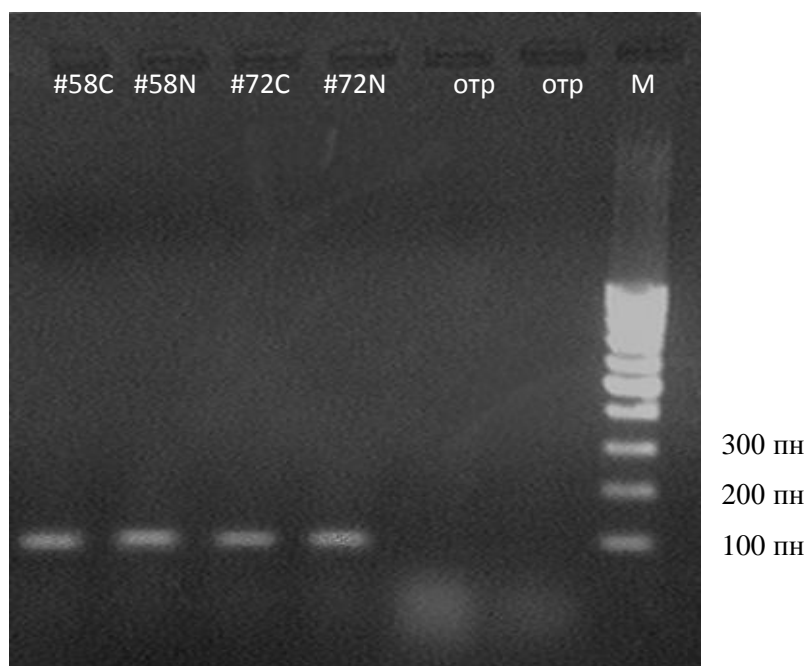


Рисунок 7 – Результаты электрофореза продуктов амплификации. Примечание: М –ДНК-маркер.

В качестве гена-рефери выбрана микроРНК-103 [Peltier H.J. G.J. Latham 2008], калибровка выполнена относительно нормальной ткани, уровень экспрессии микроРНК рассчитан по формуле согласно методу Pfaffl [Pfaffl M.W. 2001] (рис. 8). В качестве конечного результата использовано логарифмически трансформированное по основанию  $e$  нормализованное значение уровня экспрессии ( $\ln(\text{fold} + \text{const})$ ).

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{t, \text{target}}(\text{calibrator} - \text{test})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{t, \text{ref}}(\text{calibrator} - \text{test})}}$$

Рисунок 8 – Формула расчета уровня экспрессии согласно методу Pfaffl [Pfaffl M.W. 2001].  $E$  – эффективность реакции,  $C_t$  пороговый цикл генов мишеней (target) и гена-рефери (ref).  $\Delta C_{t, \text{target}}(\text{calibrator} - \text{test}) = C_t$  гена мишени в калибраторе минус  $C_t$  гена мишени в опытном образце;  $\Delta C_{t, \text{ref}}(\text{calibrator} - \text{test}) = C_t$  гена-рефери в калибраторе минус  $C_t$  гена-рефери в опытном образце

**2.2.5. Определение вирусоносительства**, а также генотипирование ВПЧ вирус-позитивных образцов проведено на основе ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов фирмы «АмплиСенс» (ФГУН ЦНИИЭ, Москва).

Программа Amplisens FRT HR HPV Screen RG4x (метод мультиплекс-ПЦР в режиме реального времени) и набор реагентов «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» позволяют проводить реакции по выявлению и количественному определению ДНК ВПЧ ВКР на амплификаторе Rotor-Gene 6000 фирмы «Corbett Research», Австралия. Данный набор реагентов способен выявлять ДНК вируса двух основных филогенетических групп – А7 и А9, которые включают 10 типов, а также ДНК ВПЧ51 (А5) и 56 (А6) типов (табл. 5).

Таблица 5 - Определяемые в работе типы ВПЧ высокого онкогенного риска

| Филогенетические группы генитальных ВПЧ |                |        |
|---|----------------|--------|
| α 9                                     | α 7            | α 6    |
| 16, 31, 33, 35, 52, 58                  | 18, 45, 39, 59 | 51, 56 |

Метод основан на одновременной амплификации и детекции в режиме «реального времени» участков ДНК E1-E2 генов ВПЧ и участка β-глобинового гена, используемого в качестве внутреннего контроля. В каждой постановке ПЦР использованы образцы ДНК ВПЧ с известной концентрацией для построения калибровочной кривой и контроля качества и эффективности реакции (рис. 9). Анализ результатов осуществляется автоматически в программном обеспечении, соответствующем используемому оборудованию. При детекции положительного сигнала по одному из каналов регистрации

флюоресценции, помимо регистрации результата внутреннего контроля, образец считался вирус-позитивным [Кувва Д. О. Шипулина2008].

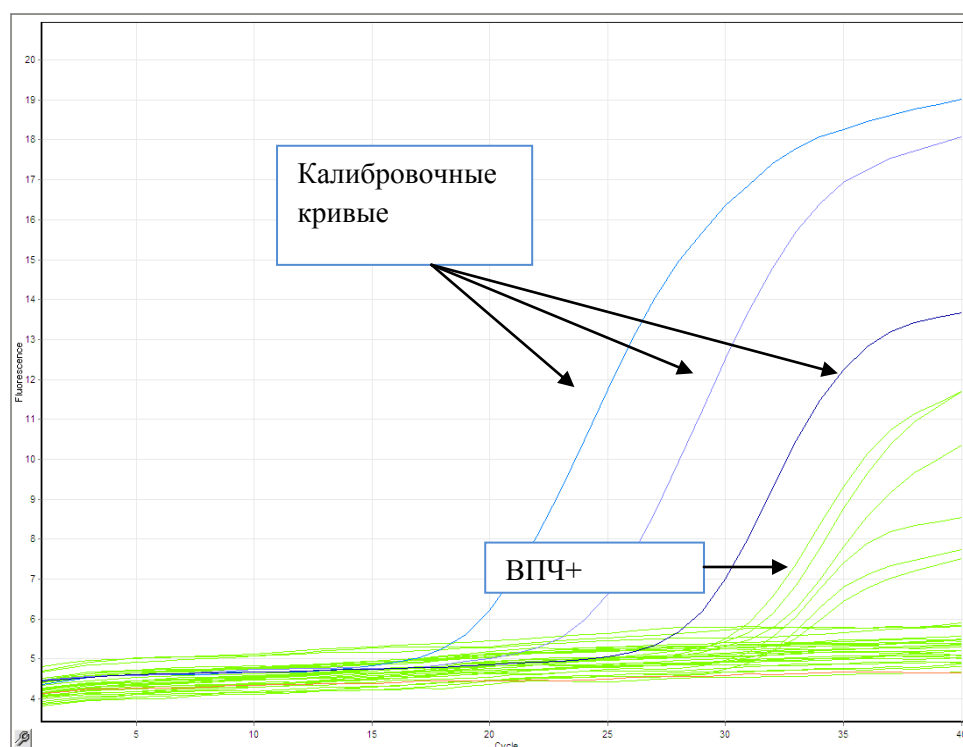


Рисунок 9 – Результат ПЦР в режиме реального времени по определению вирусоносительства.

Программа Amplisens FRT HR HPV Genotype RG4x и набор реагентов «АмплиСенс ВПЧ ВКР генотип-FL» позволяют дифференцировать 12 типов ВПЧ в положительных образцах. Метод основан на одновременной амплификации участков ДНК 3-х типов ВПЧ и участка  $\beta$ -глобинового гена. Каждый тип регистрируется по своему каналу флуоресценции, что позволяет не только выявить, но и определить генотип обнаруженного ВПЧ.

#### **2.2.6. Статистическая обработка результатов**

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 8.0» и программы PAST V2.17, а также в программе NovaSpark. Сравнение значений уровня экспрессии между подгруппами проведено с использованием t-теста Уэлша [Ruxton G.D. 2006], который не требует однородности дисперсий и позволяет проводить сравнение подгрупп с малым количеством образцов (менее 5). Для установления связи между изучаемыми вирусно-генетическими и клинико-морфологическими параметрами был проведен ряд тестов – дискриминантный, корреляционный и двублоковый PLS-анализ. Для оценки ассоциации между изменением уровня экспрессии микроРНК и риском развития и/прогрессии патологии гортани использовали критерий Фишера по расчету отношения шансов (OR). OR указывался с 95%

доверительным интервалом (Confidence interval - CI). Прогностическая значимость признаков в отношении общей и безрецидивной выживаемости у больных РГ оценена с использованием программы Survival Analysis, "Statistica for Windows 8.0". Кривые кумулятивной выживаемости строились по методу Каплана-Майера. Значимость различий в выживаемости между группами оценена по критерию Log-rang теста. Для всех статистических подсчетов применен критерий множественности сравнения Бенджамини-Хохберга (FDR – false discovery rate). Все значения  $p$  удовлетворяющие условию  $FDR \leq 5\%$  принимались как статистически значимые.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Паттерн экспрессии микроРНК в группе пациентов с предраковыми заболеваниями гортани

#### 3.1.1. Оптимизация выборки больных с предраковыми заболеваниями по уровню экспрессии микроРНК

Проведено определение уровня экспрессии микроРНК-18а, -21, -155, -200а, -200с, -205, -221 и -494 на 26 образцах полученных от пациентов с предопухолевыми изменениями и/или хроническими воспалительными заболеваниями гортани. Для того чтобы оценить внутреннюю структуру данных и вклад клинико-патологических параметров (пол, возраст, диагноз, степень дисплазии и ВПЧ-инфицирование) на экспрессию анализируемых микроРНК на первом этапе исследования проведен многомерный анализ данных. Выявлен выпадающий образец с нетипичным для общей группы паттерном экспрессии (рис. 10), что предполагает необходимость исключения его при проведении дальнейшего исследования. Этот образец был получен от женщины в возрасте 23 лет с диагнозом рецидивирующего папилломатоза гортани (без дисплазии).

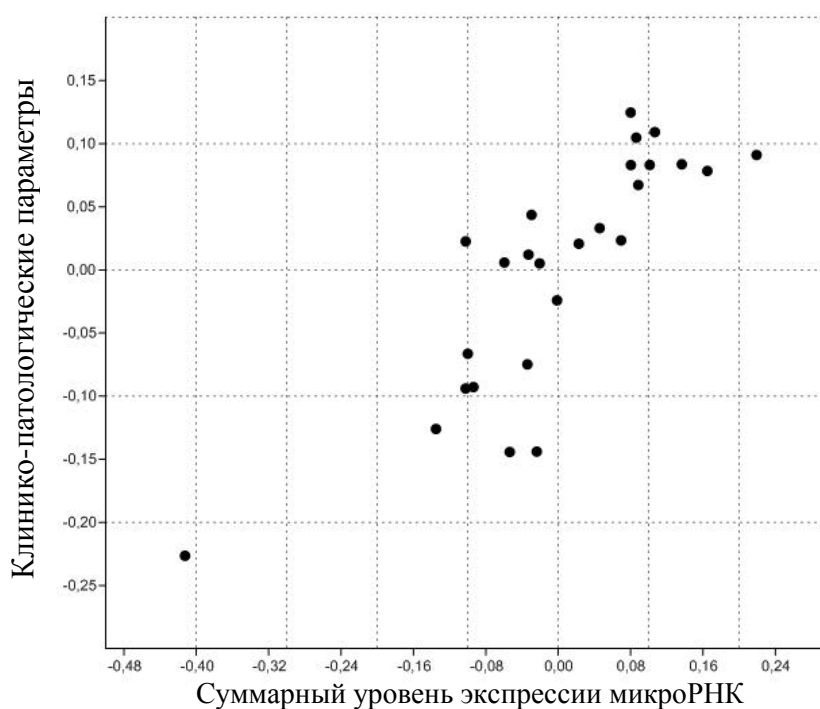


Рисунок 10 – Результат двухблокового PLS-анализа.

Примечание: каждой точке соответствует один анализируемый образец с учетом информации о клинико-патологических параметрах (ось Y) и совокупного значения уровня экспрессии микроРНК-18а, -21, -155, -200а, -200с, -205, -221 и -494 (ось X).

При стратификации группы пациентов по половой принадлежности и возрасту дискриминантный анализ не показал статистически значимой разницы в совокупном уровне экспрессии. Не выявлено разницы в экспрессии и при попарном сравнении экспрессии отдельных микроРНК (табл. 6, 7). В литературе нами не найдено данных о влиянии половозрастного показателя на уровень экспрессии микроРНК у пациентов с предопухоловой патологией, что вероятно связано с ограниченным количеством публикаций посвященных проблематике микроРНК при предопухоловых заболеваниях области головы и шеи.

Таблица 6 – Уровень экспрессии микроРНК в патологически измененной ткани относительно прилежащей нормальной ткани от пациентов с предопухоловыми заболеваниями гортани в зависимости от пола.

| микроРНК | женщины |            | мужчины |            | p     | FDR, % |
|----------|---------|------------|---------|------------|-------|--------|
|          | N       | Mean±SE    | N       | Mean±SE    |       |        |
| -18a     | 6       | -0,12±0,16 | 19      | -0,09±0,12 | 0,974 | 97,4   |
| -21      | 6       | 1,00±0,58  | 20      | 0,27±0,35  | 0,658 | 105,3  |
| -155     | 6       | 0,09±0,36  | 20      | 0,21±0,31  | 0,408 | 109,0  |
| -200a    | 5       | -0,84±0,98 | 18      | -1,05±0,43 | 0,057 | 22,9   |
| -200c    | 6       | 0,23±0,65  | 20      | -0,65±0,37 | 0,567 | 113,5  |
| -205     | 6       | 0,15±0,89  | 20      | -0,74±0,38 | 0,901 | 103,0  |
| -221     | 6       | -3,34±0,86 | 20      | -0,57±0,52 | 0,035 | 28,5   |
| -494     | 6       | -0,79±0,40 | 20      | -0,49±0,51 | 0,732 | 97,7   |

Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; значение нормы экспрессии соответствует 0

Таблица 7 – Уровень экспрессии микроРНК в патологически измененной ткани относительно прилежащей нормальной ткани от пациентов с предопухоловыми заболеваниями гортани в зависимости от возраста

| Микро РНК | До 45 лет |            | 45-65 лет |            | Старше 65 лет |            | p1   | FDR, % | p2   | FDR, % | p3   | FDR, % |
|-----------|-----------|------------|-----------|------------|---------------|------------|------|--------|------|--------|------|--------|
|           | N         | Mean±SE    | N         | Mean±SE    | N             | Mean±SE    |      |        |      |        |      |        |
| -18a      | 6         | 0,05±0,20  | 14        | -0,16±0,10 | 5             | -0,09±0,36 | 0,38 | 305,4  | 0,34 | 275,9  | 0,33 | 131,5  |
| -21       | 6         | 0,02±0,98  | 14        | 0,38±0,29  | 6             | 1,00±0,60  | 0,73 | 97,3   | 0,41 | 165,6  | 0,37 | 97,4   |
| -155      | 6         | -0,06±0,71 | 14        | 0,39±0,34  | 6             | -0,04±0,30 | 0,58 | 116,3  | 0,98 | 98,1   | 0,37 | 73,0   |
| -200a     | 5         | -2,29±0,98 | 13        | -0,53±0,43 | 5             | -0,96±0,94 | 0,67 | 106,6  | 0,96 | 128,6  | 0,62 | 62,1   |
| -200c     | 6         | -0,30±0,91 | 14        | -0,38±0,43 | 6             | -0,74±0,53 | 0,94 | 107,0  | 0,69 | 183,4  | 0,61 | 70,0   |
| -205      | 6         | -0,55±1,25 | 14        | -0,64±0,39 | 6             | -0,29±0,43 | 0,95 | 94,6   | 0,85 | 169,9  | 0,56 | 74,2   |
| -221      | 6         | -0,84±0,77 | 14        | -1,59±0,69 | 6             | -0,6±1,309 | 0,48 | 128,3  | 0,92 | 147,4  | 0,55 | 87,8   |
| -494      | 6         | -1,22±1,33 | 14        | -0,01±0,40 | 6             | -1,17±0,71 | 0,40 | 158,0  | 0,98 | 111,6  | 0,17 | 136,5  |

Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; p1 – «до 45 лет» vs «45-65 лет», p2 - «до 45 лет» vs «старше 65 лет», p3 - «45-65» vs «старше 65 лет»; значение нормы экспрессии соответствует 0

Таким образом, в соответствие с полученными результатами об отсутствие значимой разницы в уровне экспрессии анализируемых микроРНК между подгруппами мужчин и женщин, а также больных разных возрастных групп, для дальнейшего анализа

выбрана вся когорта пациентов кроме женщины в возрасте 23 лет, что составило 96% (25/26) от начальной выборки пациентов.

### 3.1.2. Экспрессия микроРНК в патологически измененной ткани относительно прилежащей нормальной у пациентов с предопухолевыми изменениями гортани

Анализ паттерна экспрессии анализируемых микроРНК выявил отклонения экспрессии в патологически измененной ткани относительно прилежащей нормальной среди пациентов с предопухолевыми изменениями ткани гортани. Для микроРНК-200а, -205, -221 отмечена тенденция к повышению экспрессии по мере утяжеления диагноза, хотя изменения не укладываются в 5% барьер FDR (табл. 8).

Таблица 8 – Уровень экспрессии микроРНК в патологически измененной ткани относительно прилежащей нормальной от пациентов с предопухолевыми изменениями гортани

| микроРНК | N  | Mean±SE    | p     | FDR, % |
|----------|----|------------|-------|--------|
| -18a     | 24 | -0,09±0,10 | 0,417 | 47,7   |
| -21      | 25 | 0,31±0,28  | 0,278 | 37,1   |
| -155     | 25 | 0,14±0,26  | 0,598 | 59,8   |
| -200a    | 22 | -0,84±0,37 | 0,033 | 13,4   |
| -200c    | 25 | -0,60±0,30 | 0,057 | 11,4   |
| -205     | 25 | -0,73±0,31 | 0,025 | 20,4   |
| -221     | 25 | -1,07±0,50 | 0,040 | 10,8   |
| -494     | 25 | -0,54±0,42 | 0,210 | 33,6   |

Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Стьюдента (t-test for single means); значение нормы экспрессии соответствует 0

Первые эксперименты по определению роли микроРНК в канцерогенезе опухолей головы и шеи проведены на клеточных линиях, а также образцах полученных от пациентов со злокачественными новообразованиями области головы и шеи [Jiang J.et al., 2005; Tran N.et al., 2007; Wong T.-S.et al., 2008]. Данные же о роли микроРНК в процессе канцерогенеза опухолей ОГШ на клинических образцах пациентов с гистологически верифицированной дисплазией I-III степени, впервые представлены Cervighe N. K. et al в 2009 году [Cervigne N.K.et al., 2009]. В этой работе авторы получили интересные результаты о повышении экспрессии микроРНК-21, -181b и -345 по мере утяжеления степени дисплазии, что свидетельствует о вовлеченности малых молекул-регуляторов трансформации клеток. Авторы обнаружили, что паттерн экспрессии непрогрессирующих и прогрессирующих лейкоплакий различается и общая экспрессия микроРНК второй подгруппы гораздо ближе к группе больных раком ротовой полости, что может быть использовано для прогнозирования заболевания.

Нами проведен анализ 25 образцов, полученных от пациентов с предопухолевыми заболеваниями, группу которых составили как лица без диспластических изменений, так и с дисплазиями II-III степени, т.е. группы по своим молекулярно-генетическим и патоморфологическим характеристикам весьма разнородной, следствием чего вероятно и явилось обнаружение лишь тенденции изменения экспрессии некоторых микроРНК. Нами проведен многомерный анализ с использованием данных по экспрессии анализируемых микроРНК, однако дискриминантный анализ не выявил различий в совокупном уровне экспрессии микроРНК в зависимости от диагноза ( $F(16,22) = 1,10$ ,  $p < 0,4080$ ). При сравнении же экспрессии микроРНК по отдельности внутри подгрупп для некоторых микроРНК, которые отнесены к группе онкогенных, выявлено повышение их экспрессии по мере утяжеления диагноза. Средний уровень экспрессии микроРНК-21 и -155 повышается с повышением степени дисплазии, что графически представлено на рисунке 11 А и Б, соответственно.

Известно, что при выявлении дисплазий гортани I степени вероятность их самопроизвольной элиминации достаточно высока в сравнении с дисплазиями II и III степени [О.В. Ч. et al., 2013]. Согласно мета-анализу Weller M.D. et al (2010) злокачественную трансформацию претерпевают в среднем 14% случаев дисплазий (CI 95%, от 8% до 22%) [Weller M. et al., 2010]. Причем авторами выявлено, что частота трансформации клеток прямо пропорционально соотносится с утяжелением степени дисплазии, хотя отмечено, что прогноз заболевания основанный только на данных гистологического анализа не очень точен и зафиксированы случаи, когда дисплазия I степени развивается в ЗНО, а дисплазия II или III степени не претерпевает трансформации и/или элиминируются [Weller M. et al., 2010]. Более того, результаты гистологического анализа могут варьировать в значительной степени в силу человеческого фактора [Gale N. et al., 2009; McLaren K. et al., 2000].

Таким образом, в клинической практике существенным моментом для отнесения пациента к группе риска развития злокачественной патологии является однозначное разделение на подгруппы лиц без диспластических изменений и с дисплазией II-III степени. В своем исследовании, в виду малочисленности выборки и отсутствия статистической значимости в уровне экспрессии анализируемых микроРНК в подгруппах, нами были объединены подгруппы без дисплазии и ДI, а также ДII и ДIII, что также обосновано с точки зрения гистологической стратификации диагноза [Поддубный Б.К. Б.Н.В., Унгиадзе Г.В. 2009].



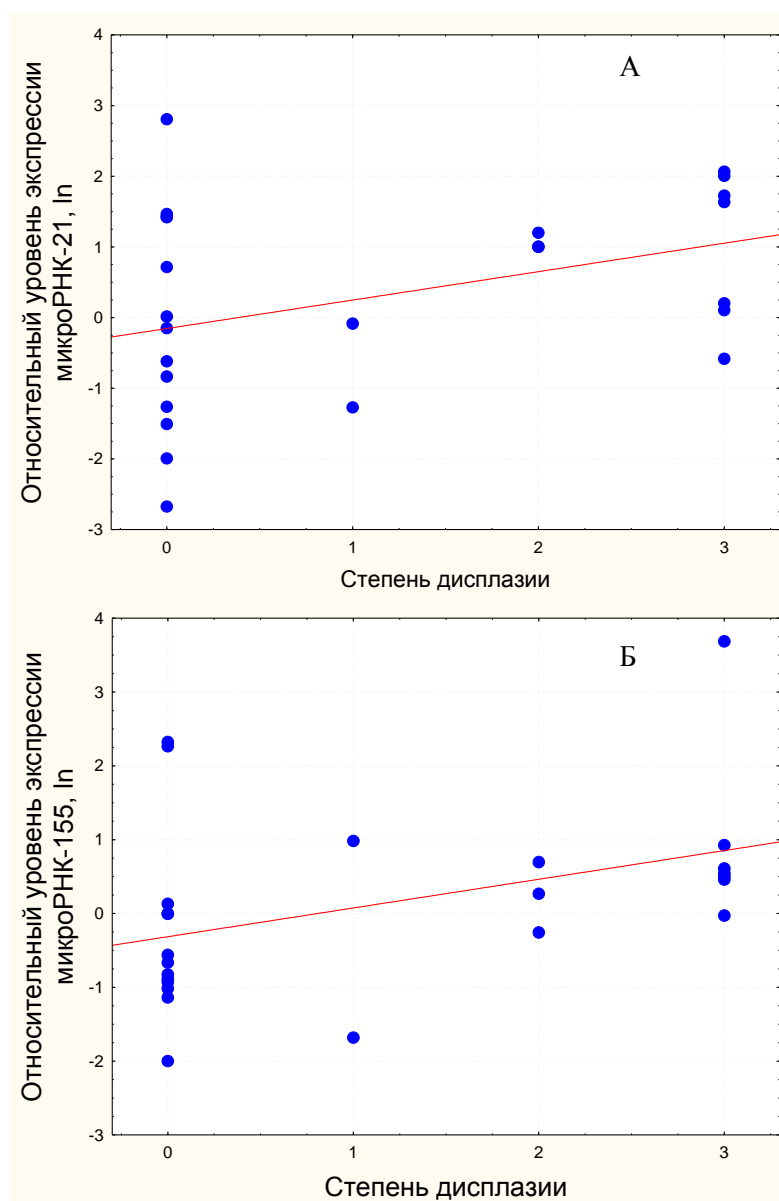


Рисунок 11 – Экспрессия микроРНК-21 (А) и -155 (Б) в группе пациентов с дисплазиями. Примечание : 0 – группа без дисплазии, n=14; 1 – группа с ДІ, n=2; 2 - группа с ДІІ, n=3; 3 - группа с ДІІІ, n=7.

Показано повышение экспрессии микроРНК-21, -155, -200с и -205 среди больных с ДІІ и ДІІІ в сравнении с пациентами первой подгруппы (n=15 vs n=10,  $p=0,019$ ,  $p=0,045$ ,  $p=0,020$  и  $p=0,038$ , соответственно, табл. 9), однако эти значения не удовлетворяют 5% поправке FDR. Несмотря на тот факт, что значения  $p$  для этих микроРНК превышают 5% порог FDR, рассчитанные значения чувствительности и специфичности для микроРНК-21 показали обнадеживающие значения – 60% и 90%, соответственно. Эти данные позволяют судить о перспективности использования показателя экспрессии микроРНК-21 в патологически измененной ткани при гистологической верификации диагноза дисплазии ДІІ-ДІІІ.

Таблица 9 – Уровень экспрессии микроРНК в патологически измененной ткани в зависимости от степени дисплазии.

| микроРНК   | Без дисплазии-ДI |            | Д II-III |            | p     | FDR, % |
|--|------------------|------------|----------|------------|-------|--------|
|  | N                | Mean±SE    | N        | Mean±SE    |       |        |
| -18a   | 14               | -0,07±0,13 | 10       | -0,11±0,18 | 0,861 | 86,1   |
| -21  | 15               | -0,17±0,39 | 10       | 1,04±0,28  | 0,019 | 15,5   |
| -155   | 15               | -0,27±0,33 | 10       | 0,74±0,35  | 0,045 | 9,1    |
| -200a  | 13               | -0,99±0,50 | 9        | -0,63±0,58 | 0,641 | 85,4   |
| -200c  | 15               | -1,15±0,34 | 10       | 0,24±0,44  | 0,020 | 8,1    |
| -205   | 15               | -1,20±0,43 | 10       | -0,02±0,32 | 0,038 | 10,3   |
| -221   | 15               | -0,98±0,66 | 10       | -1,22±0,79 | 0,819 | 93,6   |
| -494   | 15               | -0,89±0,63 | 10       | -0,01±0,45 | 0,267 | 42,7   |
| Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; значение нормы экспрессии соответствует 0 |                  |            |          |            |       |        |

Тенденция повышения экспрессии некоторых микроРНК в ряду гистологического диагноза от легкой дисплазии (I степень) к тяжелой дисплазии (III степени) позволяют предположить, что по мере развития предопухолевой патологии происходит накопление молекулярных нарушений связанных с микроРНК и ассоциированных с прогрессией заболевания. Эти данные согласуются с гипотезой о том, что большинство генетических изменений приобретаются клеткой на ранних этапах канцерогенеза опухолей головы и шеи [Ha P.K.et al.,2003]. В эксперименте на клинических образцах нормального эпителия, дисплазий, рака области головы и шеи показали, что образцы с предопухолевыми изменениями имеют аберрантную экспрессию около 334 генов в сравнении с группой контроля (здоровая ткань) [Ha P.K.et al., 2003]. При сравнении же группы с предопухолевыми заболеваниями и раком выявлена значимая разница в экспрессии лишь 23 генов. Аномальная экспрессия была выявлена в генах цитокератина, клеточной адгезии, MAP-киназного пути и цитокинов, включая гиперэкспрессию *VEGF*. Это подтверждают и другие авторы [Al Moustafa A.-E.et al.,2002]. Таким образом, результаты Ha P.K. et al (2003) свидетельствуют о том, что большинство генетических изменений происходят на ранних этапах канцерогенеза и они затрагивают основные гены-мишени, которые претерпевают дезрегуляцию в процессе клеточной трансформации [Ha P.K.et al., 2003].

Для предракового состояния важной особенностью является наличие в большинстве этих случаев хронического воспаления. Признано, что именно воспалительным процессам принадлежит важная роль в этиопатогенезе рака гортани, в частности, гиперпластическим заболеваниям верхних дыхательных путей (папилломатоз, хронический гиперпластический ларингит). В общей структуре воспалительных заболеваний ЛОР-органов на долю хронического гиперпластического ларингита

приходится от 8,4% до 10,0% с последующей малигнизацией эпителия гортани в 8,0-20,0% случаев [Осипов В.Д.2005; Чумаков Ф. И. Р.Т.А.2002]. Подавляющее большинство проанализированных в нашей работе образцов согласно гистологическому заключению содержали участки выраженного воспаления. Для микроРНК-155 показано участие в регуляции активации воспалительных каскадов, что является показателем важной связующей роли микроРНК-155 между хроническим воспалением и злокачественной патологией [Tili E.et al., 2011]. Основываясь на результатах своей работы, Tili E. et al (2011) предположили, что гиперэкспрессия микроРНК-155 является одной из причин повышения уровня мутационной активности в геноме, что, в конечном счете, приводит к повышенному риску злокачественной трансформации. Кроме того, в настоящее время накоплена значительная доказательная база относительно функциональной роли микроРНК-155 в канцерогенезе. Показано, что микроРНК-155 принимает непосредственное участие в регуляции TGF- $\beta$ /Smad-индуцированного эпителиально-мезенхимального перехода [Kong W.et al., 2008], гликолизе [Kong W.et al., 2014], JNK2/STAT3 пути [Jiang S.et al., 2010], NF-kB и АКТ пути [Bakirtzi K.et al., 2011]. Относительно функциональной роли микроРНК-21, -200с и -205 в канцерогенезе стоит упомянуть их общую вовлеченность в этот процесс и контроль многих генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла, апоптоза, роста и дифференцировки опухолевой ткани [Feng X.et al.,2014; Hong L.et al.,2013; Qin A.-Y.et al., 2013].

Таким образом, aberrантная экспрессия в целом и повышение уровня экспрессии некоторых микроРНК в ряду патологических состояний от дисплазии 0 к дисплазии III степени и по мере приобретения клеткой генетических нарушений позволяет судить о вовлеченности этих микроРНК в процесс трансформации клеток. Это утверждение согласуется с данными, которые получены в эксперименте с использованием разных вариантов клинических образцов, таких как ткань, сыворотка и слюна [Brito J.A.et al., 2014; Cervigne N.K.et al., 2009; Yang Y.et al., 2013]. Cervigne N.K. et al. (2009) показали, что изменение общего паттерна экспрессии микроРНК-345, -21 и -181b в патологически измененной ткани достоверно ассоциировано с развитием плоскоклеточной карциномы [Cervigne N.K.et al., 2009]. Ya Yang et al (2013) выявили повышенный уровень экспрессии микроРНК-708, -10b, -19a, -30e, -26a, -660 и гипоекспрессию микроРНК-99, -15a, -197,-145 и -150 [Yang Y.et al., 2013]. Интересно отметить, что данные относительно микроРНК-181b у этих двух авторов были противоположны (показана гиперэкспрессия у Cervigne N.K. и гипоекспрессия у Ya Yang в группах больных с одинаковым гистологическим типом ткани и прогнозом заболевания). Результаты Cervigne N.K. et al. (2009) были подтверждены Brito J.A.R et al (2014), которые также показали гиперэкспрессию

микроРНК-21, -181b и -345 и выявили ассоциацию между гиперэкспрессией этих микроРНК и морфологическими изменениями в клетке (повышенным содержанием ДНК и числом митотических нарушений, повышенным ядерно-цитоплазматическим соотношением, аномальным количеством «мнимого» митоза, повышенным числом или размером ядрышек), т.е. признаками, по которым гистологи определяют степень дисплазии [Brito J.A.et al., 2014].

Таким образом, в ходе исследования нами показана тенденция аберрантного повышения экспрессии микроРНК-21, -155, -200с и -205 в ряду патологических состояний от отсутствия дисплазии к ДШ. Эти данные позволяют предположить участие этих микроРНК в малигнизации ткани гортани и свидетельствуют о том, что молекулярно-генетические нарушения происходят и накапливаются по мере утяжеления степени дисплазии. Показатели чувствительности и специфичности в 60% и 90% при определении экспрессии микроРНК-21 позволяют говорить о перспективности дальнейших исследований микроРНК-21 в плане использования ее для диагностики степени дисплазии.

### **3.1.3. Экспрессия микроРНК у пациентов с предопухолевыми заболеваниями в зависимости от ВПЧ-инфицирования**

Все больше экспериментальных и клинических данных подтверждают важнейшую роль в канцерогенезе опухолей верхних дыхательных путей онкогенного вируса папилломы человека, который при длительной персистенции способен воздействовать на геном клетки хозяина. Канцерогенез опухолей гортани является многоступенчатым и растянутым во времени процессом, занимающим чаще всего десятки лет, и протекающем на фоне хронических воспалительных заболеваний [Weller M.et al., 2010], а зачастую и на фоне хронической инфекции [Jayaprakash V.et al., 2011]. Принимая во внимание вышеупомянутые факты, представилось перспективным оценить частоту встречаемости высокоонкогенных типов ВПЧ в этой группе, а также связь между инфицированием вирусом папилломы человека и экспрессией микроРНК.

В группе пациентов с предопухолевыми заболеваниями частота встречаемости ВПЧ составила 7,7% (2 из 26, рис. 12), что несколько ниже аналогичного показателя согласно данным мировой литературы. В обоих вирус-позитивных образцах выявлен 16 тип ВПЧ, причем ДНК папилломавируса также была обнаружена и в прилежащей нормальной ткани пациента. Согласно данным литературы при предопухолевых заболеваниях гортани уровень детекции вируса варьирует от 18,5-35,9% при гиперпластическом ларингите и до 100% при папилломатозе гортани [McKaig R.G.et al.,

1998; Пачес А.И. 2000]. Однако более свежие результаты мета-анализа представленные Jayaprakash V. et al (2011) свидетельствуют, что частота встречаемости ВПЧ16/18 типов в группе пациентов с дисплазиями ротовой полости и ротоглотки варьирует от 22,2% до 26,2% [Jayaprakash V. et al., 2011]. Возможно, приводимые в литературе данные по высокому уровню инфицированности больных вирусом папилломы объясняются региональными особенностями данного показателя у здорового населения, выбором анализируемой локализации, а также методологическими особенностями проведения эксперимента.

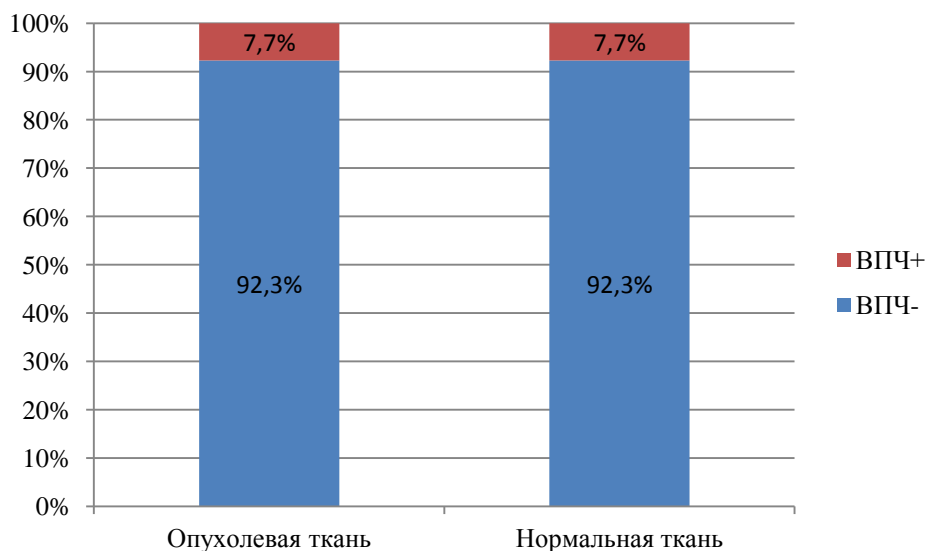


Рисунок 12 – Распространенность ВПЧ в ткани от пациентов с предопухолевой патологией гортани.

Дискриминантный анализ экспрессии 8 микроРНК не выявил различий между подгруппами вирус-инфицированных и вирус-негативных пациентов с предопухолевыми заболеваниями ( $F(8,12) = 1,23$ ,  $p < 0,35$ ). Однако сравнение значений экспрессии по каждой микроРНК в отдельности показал значимое повышение экспрессии микроРНК-21 (23vs2,  $p=0,002$ ) у вирус-позитивных лиц, а также тенденцию повышения экспрессии микроРНК-18a (22vs2,  $p=0,041$ ), значение  $p$  которой не преодолевает 5% барьер FDR (табл. 10). Однако делать какие-то однозначные выводы на столь ограниченной по количеству вирус-позитивных человек выборке в условиях данной работы не представляется возможным.

В настоящее время накоплена значительная доказательная база подтверждающая уникальность ВПЧ-позитивных опухолей головы и шеи в сравнении с вирус-негативными в эпидемиологическом, гистопатологическом, клиническом и прогностическом аспектах [Lajer C. et al., 2012]. В литературе опубликовано несколько работ посвященных анализу роли ВПЧ в дезрегуляции микроРНК на примере клеточных линий и клинических

образцах рака шейки матки (локализации, для которой доказана этиологическая роль ВПЧ) и опухолей области головы и шеи. Wald A.I. et al (2011) на примере ВПЧ-16-положительных и –отрицательных опухолей области головы и шеи обнаружили, что паттерн экспрессии некоторых микроРНК значительно отличается в группах (повышается уровень экспрессии микроРНК- 363, -33, -497 и понижается – микроРНК- 155, -181a, -181b, -29a, -218, -222, -221, и -142-5p) [Wald A.I. et al., 2011]. Lajer C.B. et al (2012) методом микрочипов также продемонстрировали, что ВПЧ-положительные опухоли языка имеют отличный от ВПЧ-отрицательных паттерн экспрессии [Lajer C. et al., 2012]. Валидировав результаты для некоторых микроРНК методом ПЦР, авторы пришли к заключению, что микроРНК -15a/16, -143/-145, а также микроРНК кластера-363 вероятно играют особую роль в вирус-ассоциированном канцерогенезе. Также авторы выявили тенденцию к повышению уровня экспрессии многих других микроРНК, в том числе и микроРНК-21, что было показано и в нашем исследовании на образцах с предопухолевой патологией [Lajer C. et al., 2012].

Таблица 10 – Уровень экспрессии микроРНК в патологически измененной ткани относительно прилежащей нормальной ткани от пациентов в зависимости от ВПЧ-инфицирования.

| микроРНК | ВПЧ- |            | ВПЧ+ |            | p     | FDR, % |
|----------|------|------------|------|------------|-------|--------|
|          | N    | Mean±SE    | N    | Mean±SE    |       |        |
| -18a     | 22   | -0,05±0,11 | 2    | -0,46±0,16 | 0,041 | 16,56  |
| -21      | 23   | 0,14±0,28  | 2    | 2,27±0,54  | 0,002 | 1,56   |
| -155     | 23   | -0,01±0,23 | 2    | 1,84±1,85  | 0,329 | 87,84  |
| -200a    | 20   | -0,89±0,41 | 2    | -0,42±0,53 | 0,486 | 55,65  |
| -200c    | 23   | -0,76±0,26 | 2    | 1,31±2,43  | 0,405 | 64,82  |
| -205     | 23   | -0,76±0,33 | 2    | -0,38±0,35 | 0,431 | 57,48  |
| -221     | 23   | -0,99±0,51 | 2    | -1,98±2,62 | 0,714 | 71,47  |
| -494     | 23   | -0,59±0,45 | 2    | 0,08±0,56  | 0,355 | 71,11  |

Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; значение нормы экспрессии соответствует 0

Согласно результатам проведенного исследования показано статистически значимое повышение экспрессии микроРНК-21 в группе лиц с вирус-инфицированными предопухолевыми патологиями, что может опосредованно свидетельствовать о вовлеченности этой микроРНК в вирус-ассоциированный канцерогенез. Однако эти данные требуют уточнения на расширенных выборках пациентов.

## **3.2. Паттерн экспрессии микроРНК при злокачественных опухолях гортани**

### **3.2.1. Оптимизация выборки по анализируемым клинико-патологическим и молекулярным характеристикам**

С целью изучения внутренней структуры данных, а именно для определения выбросов, а также взаимосвязей между всеми анализируемыми клинико-патологическими и молекулярными характеристиками, был проведен многомерный анализ данных. Результаты двублокового PLS-анализа по экспрессии микроРНК-18a, -21, -155, -200a, -200c, -205, -221, -494 и клинико-патологических характеристик (пол, возраст, стадии Т и N, степень дифференцировки опухоли, ВПЧ-инфицирование) 55 пациентов с первичным диагнозом рака гортани позволил выявить подгруппу из 6 выпадающих образцов с отличным от остальных образцов уровнем экспрессии (рис. 13). Группирующим признаком для них явился возраст пациентов. Показано, что все 6 выпадающих образцов принадлежали пациентам в возрасте до 45 лет (86% от анализируемой когорты данной возрастной подгруппы), причем 3 из них получены от женщин (60% от всех женщин, включенных в анализ). Таким образом, пациенты в возрасте до 45 лет представляют собой обособленную подгруппу и имеют отличный паттерн экспрессии микроРНК, чем пациенты старшего возраста, что было учтено при последующей обработке данных и эти пациенты были исключены из анализа. Полученный результат позволил оценить структуру анализируемой выборки и вычленить возможные факторы, влияющие на вариабельность значений внутри группы пациентов, что в дальнейшем было проверено стратификацией выборки на подгруппы согласно клинико-патологическим параметрам.

В литературе представлено значительное количество данных по функциональным исследованиям микроРНК полученным на примере клеточных линий и *in vivo*. При постановке эксперимента с использованием биоматериала пациентов многие авторы стараются унифицировать выборку по тем или иным клинико-патологическим параметрам, таким как локализация процесса, стадия, наличие метастазов и некоторым другим, чтобы снизить их возможное влияние на вариабельность результатов. В настоящее время известно, что многие микроРНК являются ключевыми регуляторами в процессе старения, а также некоторые микроРНК локализованы в половых хромосомах [Boon R.A. et al., 2013], что предполагает наличие возможной зависимости между экспрессией микроРНК и этими показателями. В силу представленных выше результатов многомерного анализа, а также учитывая, что в данном исследовании была использована общая выборка пациентов обоих полов без возрастных ограничений, явилось

целесообразным провести анализ возможного влияния половозрастной компоненты на паттерн экспрессии изучаемых микроРНК в анализируемой выборке больных раком гортани.

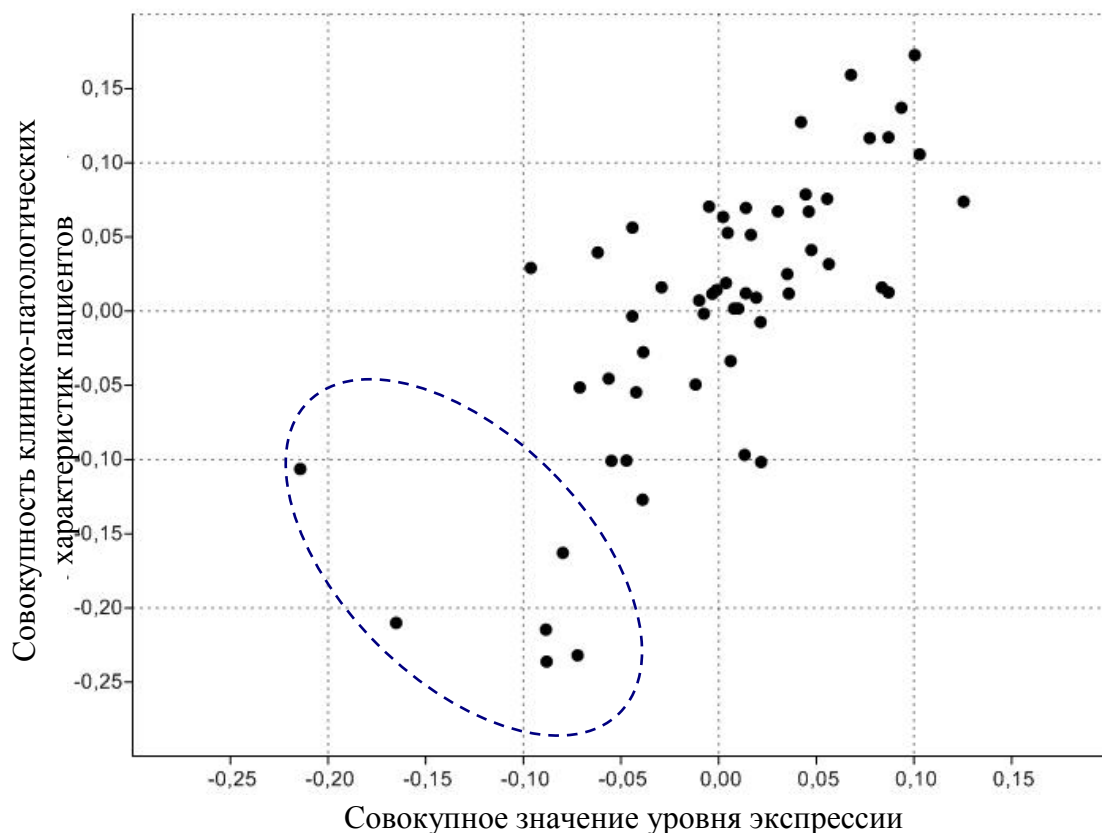


Рисунок 13 – Результат двублокового PLS-анализа. Примечание: каждой точке соответствует один анализируемый образец с учетом информации о клинико-патологических параметрах (ось Y) и совокупного значения уровня экспрессии микроРНК-18а, -21, -155, -200а, -200с, -205, -221 и -494 (ось X).

Для оценки влияния возраста на уровень экспрессии микроРНК когорта пациентов была разделена на три условные подгруппы согласно представленным выше результатам и с учетом классических подходов стратификации онкологических больных по данному показателю: 1 группа – до 45 лет ( $n=7$ ); 2 группа – 45-65 лет ( $n=39$ ); 3 группа – старше 65 лет ( $n=9$ ).

При сопоставлении уровня экспрессии по каждой микроРНК в отдельности выявлено, что только уровень экспрессии микроРНК-494 у лиц с диагнозом рак гортани в возрасте до 45 лет значимо снижен в сравнении с больными в возрасте 45-65 лет, а также лицами старше 65 лет ( $7$  vs  $36$ ,  $p = 0,00038$  и  $7$  vs  $9$ ,  $p = 0,00039$ , соответственно, табл. 11). Для этой микроРНК также наблюдалась слабая положительная корреляция с возрастом пациентов обоих полов ( $r=0,37$ ,  $p=0,006$ , рис. 14).



Таблица 11 – Уровень экспрессии микроРНК в опухолевой относительно прилежащей нормальной ткани от пациентов в зависимости от возраста.

| Микро РНК | До 45 лет |            | 45-65 лет |            | Старше 65 лет |            | p1   | FDR, % | p2   | FDR, % | p3   | FDR, % |
|-----------|-----------|------------|-----------|------------|---------------|------------|------|--------|------|--------|------|--------|
|           | N         | Mean±SE    | N         | Mean±SE    | N             | Mean±SE    |      |        |      |        |      |        |
| -18a      | 7         | -0,08±0,40 | 38        | 0,23±0,14  | 9             | 0,19±0,18  | 0,47 | 63,3   | 0,56 | 64,0   | 0,86 | 85,5   |
| -21       | 7         | 1,84±0,83  | 39        | 0,94±0,23  | 9             | 1,32±0,47  | 0,31 | 61,4   | 0,60 | 60,1   | 0,47 | 53,6   |
| -155      | 7         | 0,39±0,54  | 39        | 0,67±0,20  | 9             | 1,14±0,31  | 0,64 | 72,8   | 0,25 | 67,7   | 0,21 | 56,2   |
| -200a     | 7         | -1,41±0,95 | 39        | -1,02±0,25 | 9             | -0,51±0,61 | 0,69 | 69,4   | 0,44 | 58,5   | 0,44 | 71,0   |
| -200c     | 7         | -0,62±0,55 | 39        | -0,17±0,21 | 9             | 0,12±0,30  | 0,45 | 71,6   | 0,27 | 53,1   | 0,45 | 60,1   |
| -205      | 7         | -0,84±0,97 | 38        | 0,75±0,22  | 8             | 0,20±0,58  | 0,12 | 48,6   | 0,38 | 60,6   | 0,39 | 77,5   |
| -221      | 6         | 1,00±1,04  | 36        | -0,19±0,24 | 9             | -1,09±0,55 | 0,27 | 72,2   | 0,10 | 40,3   | 0,15 | 60,0   |
| -494      | 7         | -2,67±0,63 | 36        | -0,07±0,21 | 9             | 0,52±0,26  | 0,00 | 0,3    | 0,00 | 0,3    | 0,09 | 74,4   |

Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; p1 – «до 45 лет» vs «45-65 лет», p2 – «до 45 лет» vs «старше 65 лет», p3 – «45-65» vs «старше 65 лет»; значение нормы экспрессии соответствует 0

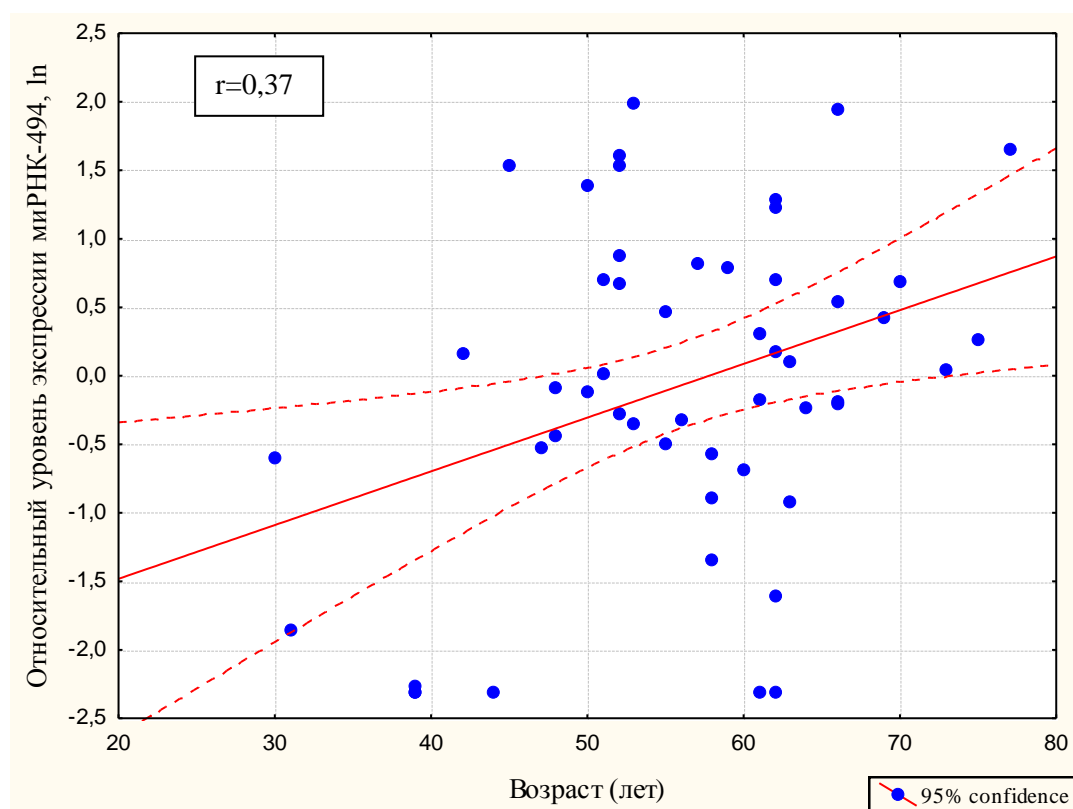


Рисунок 14 – Экспрессия микроРНК-494 у пациентов в зависимости от возраста. Примечание – каждой точке соответствует результат по уровню экспрессии микроРНК-494, полученный от одного пациента.

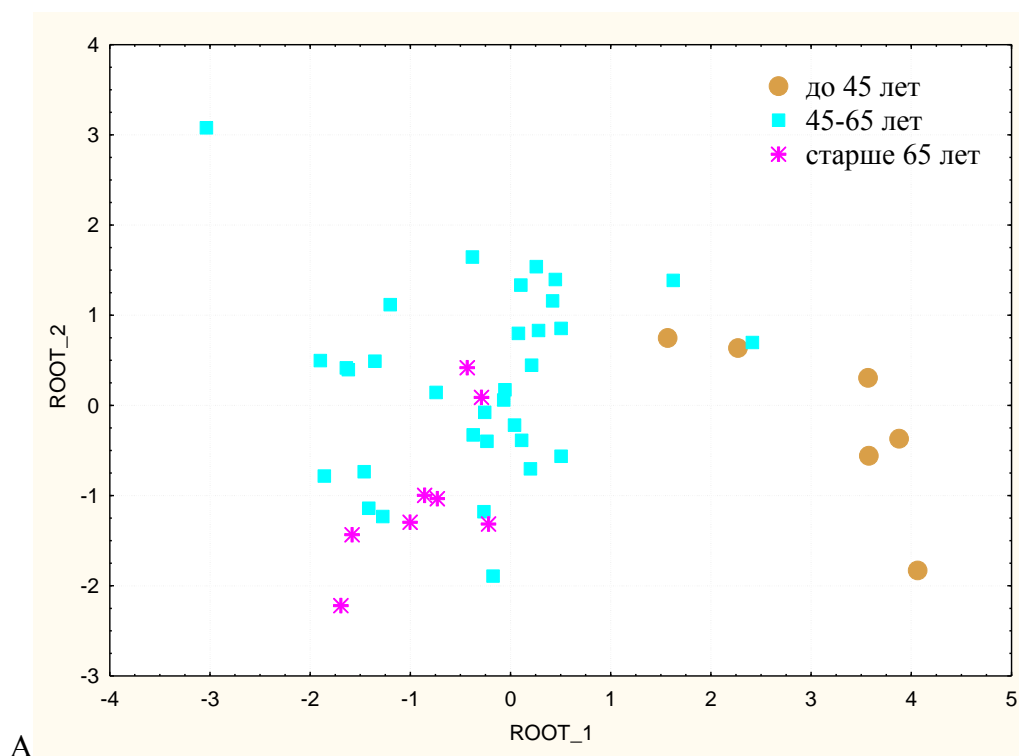
С целью дифференциации выборки пациентов всех возрастов по нескольким переменным одновременно (анализируемым микроРНК) проведен дискриминантный анализ, который позволяет выявлять различия между группами и дает возможность классифицировать объекты по принципу максимального сходства. Выявлено, что уровень

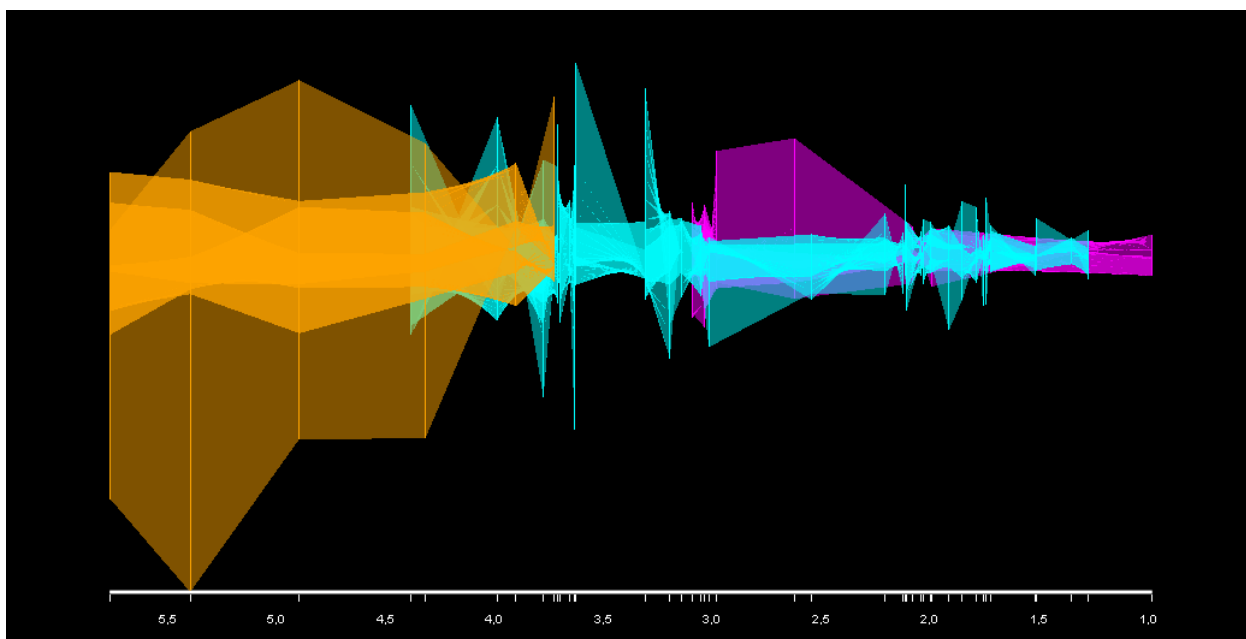
экспрессии 8 микроРНК значимо отличается внутри группы, т.е. в зависимости от возраста пациентов ( $F(16,74) = 3,63$   $p < 0,0001$ , рис. 15a), причем основной вклад в разделение группы осуществляется за счет микроРНК-494, которая имеет самый высокий уровень корреляции с возрастом ( $r=0,37$ ). Другие микроРНК не вносят вклад в корреляцию с возрастом: микроРНК-205 ( $r=0,15$ ), -21 ( $r=-0,06$ ), -221 ( $r=-0,05$ ), -200a ( $r=0,14$ ).

При обработке данных методом визуализации NovaSpark, в основе которого лежит определение статистического расстояния по Махаланобису, выявлено, что 2D-модель представления данных по суммарной экспрессии анализируемых микроРНК позволяет еще раз отчетливо вычленить подгруппу людей в возрасте до 45 лет. Этот метод представления данных также позволяет судить и о наличии особенностей в уровне экспрессии всех анализируемых микроРНК по вертикальному диапазону искривления кривых, который варьирует в большей степени у молодых пациентов, чем у подгрупп старше 45 лет (оранжевый цвет и голубой/розовый, соответственно). Стоит отметить, что образцы подгруппы пациентов старше 65 лет пространственно расположены обособленно от первой подгруппы (рис. 15б). Полученные данные свидетельствуют о влиянии возрастной компоненты на уровень экспрессии микроРНК.

Объяснить полученные результаты в рамках данной работы не представляется возможным, поскольку любые гипотезы требуют постановки дополнительных экспериментов. Однако в литературе представлены данные подтверждающие возможное участие некоторых микроРНК в биологическом старении. Показана гиперэкспрессия микроРНК-34a в ткани и крови мышей старшего возраста в сравнении с молодыми мышами [Li X.et al., 2011]. Другая группа авторов на примере мышинной модели преждевременного старения выявила, что микроРНК-29 подавляет экспрессию гена коллагена IV типа, что в свою очередь приводит к ослаблению базальной мембраны клеток в пожилых тканях и играет роль в старении [Takahashi M.et al.,2012]. Hooten NN et al (2010) на примере мононуклеаров периферической крови 28 человек выявили снижение экспрессии микроРНК-155 у пожилых людей в сравнении с людьми более молодого возраста [Hooten N.N.et al.,2010], что показано и другими авторами [Brosh R.et al.,2008], хотя учеными принято считать эту микроРНК онкогенной, поскольку уровень ее экспрессии при ЗНО чаще всего повышен. Возможно, такое несоответствие связано с тем, что микроРНК-155 располагается в хрупком локусе 21 хромосомы (q21.3), в большей степени подверженном нарушениям и интеграции вирусов или генетических элементов. Однако, авторы отмечают необходимость дальнейших исследований в этом направлении для объяснения регуляции микроРНК-155 в геноме [Hooten N.N.et al., 2010].

Более широкий список работ в литературе представлен относительно связи паттерна микроРНК при возраст-ассоциированных заболеваниях, таких как кардиоваскулярные и нейро-дегенеративные заболевания. В культуре клеток, а также на мышцах обнаружено и даже валидировано, что микроРНК-**21**, -216, -217, -181b, -31b, -34a, а также микроРНК кластера **-17/92** (к которому относится анализируемая нами микроРНК-**18a**) гипохэкспрессированы в стареющих эндотелиальных клетках [Hackl M.et al., 2010; Menghini R.et al., 2009]. Somel et al. (2010) при работе с образцами префронтальной коры головного мозга человека выявили возраст-ассоциированную гипохэкспрессию микроРНК-34a, -33b, -181 и -1271 [Somel M.et al., 2010]. Авторы подтвердили свои результаты и на образцах мозга макаки, также обнаружив и гипохэкспрессию микроРНК-29b [Somel M.et al., 2010]. На мышках было показано повышение уровня экспрессии микроРНК-30d, -34a, -468 и -709 в ткани мозга и печени, что авторы ассоциировали с процессом старения.





Б

Рисунок 15 – Графическое отображение данных по экспрессии анализируемых микроРНК в зависимости от возраста пациентов. Примечание – А: по осям X и Y в виде ROOT-1 и ROOT-2, представлены результаты дискриминантного анализа в виде условных значений по экспрессии микроРНК-18a, -21, -155, -200a, -200c, -205, -221, -494 в зависимости от возраста пациентов. Точками, квадратами и крестиками обозначены пациенты в возрасте до 45 лет, 45-65 года и старше 65 лет, соответственно; Б: 2D-модель представления данных по экспрессии микроРНК в зависимости от возраста пациентов. Оранжевый, голубой, розовый цвета соответствуют образцам, полученным от пациентов в возрасте до 44 лет, 45-65 года и старше 65 лет, соответственно.

Учитывая результаты, представленные выше, для оценки влияния половой принадлежности на профиль экспрессии микроРНК в ткани пациентов РГ выбрана подгруппа лиц старше 45 лет. Дискриминантный анализ профиля экспрессии 8 микроРНК показал отсутствие значимых различий изучаемых показателей в зависимости от пола пациентов ( $F(8,37) = 1,21$   $p < 0,32$ ). Однако сравнение уровня экспрессии по каждой микроРНК в отдельности позволило выявить значимое различие между женщинами и мужчинами для микроРНК-200a и -21 (2 vs 46,  $p=0,006$  и  $p=0,003$ , соответственно, табл. 12), что может объясняться и эффектом малых выборок в связи с малочисленностью группы пациентов женского пола.

В литературе известны данные о связи пола с уровнем экспрессии микроРНК. Проведен эксперимент и по выявлению влияния эстрогена на уровень экспрессии микроРНК на примере клеточной линии рака молочной железы. Используя метод микрочипов, авторы получили доказательство связи половой компоненты с изменением уровня экспрессии 23 микроРНК, причем результат был подтвержден методом ПЦР для 8 из них, в списке которых также была и выявленная нами микроРНК-21 [Maillot G. et al.,

2009]. В 2014 г. Meder B. et al, используя метод микрочипов, на примере 109 образцов крови здоровых людей показали значимую корреляцию 318 микроРНК с возрастом и 144 микроРНК с полом [Meder B. et al., 2014]. Причем применение поправки Бонферроне подтвердило значимые значения корреляции с возрастом пациентов лишь для 35 микроРНК, а по результатам высокоразрешающего секвенирования авторы заключили, что возрастная компонента является более существенным фактором связанным с изменением паттерна экспрессии микроРНК, чем пол. На основе полученных результатов Meder B. et al разработали интернет-приложение свободного доступа для определения возможного влияния половозрастной компоненты на анализируемые микроРНК (<http://www.ccb.uni-saarland.de/microRNAcon>), результаты которого, однако, пока применимы только к такому биоматериалу как кровь.

Таблица 12 – Уровень экспрессии микроРНК в опухолевой относительно прилежащей нормальной ткани от пациентов в зависимости от пола.

| микроРНК   | женщины |            | мужчины |            | p     | FDR, % |
|--|---------|------------|---------|------------|-------|--------|
|  | N       | Mean±SE    | N       | Mean±SE    |       |        |
| -18a   | 2       | 0,15±0,05  | 46      | 0,14±0,15  | 0,962 | 96,2   |
| -21  | 2       | 1,76±0,16  | 46      | 0,98±0,22  | 0,006 | 2,4    |
| -155   | 2       | 0,59±1,32  | 46      | 0,76±0,18  | 0,899 | 102,8  |
| -200a  | 2       | -2,68±0,53 | 46      | -0,85±0,24 | 0,003 | 2,5    |
| -200c  | 2       | -0,42±0,01 | 46      | -0,11±0,18 | 0,097 | 25,9   |
| -205   | 2       | 0,36±0,16  | 46      | 0,66±0,22  | 0,258 | 51,7   |
| -221   | 2       | -1,72±2,19 | 46      | -0,31±0,23 | 0,524 | 69,9   |
| -494   | 2       | -2,56±2,96 | 46      | -0,08±0,25 | 0,408 | 65,3   |
| Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; значение нормы экспрессии соответствует 0 |         |            |         |            |       |        |

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что такой фактор как возраст пациентов может существенно увеличивать вариабельность значений экспрессии микроРНК. Образцы, полученные из опухоли гортани женщин, также могут сильно выпадать из общей когорты по уровню экспрессии микроРНК. Это определяет необходимость учета половозрастной компоненты при планировании исследования и анализе экспериментальных данных, а также при подборе группы контроля с сопоставимым соотношением пациентов по этому критерию. В результате проведенного исследования из дальнейшего анализа были исключены больные раком гортани с возрастом моложе 45 лет и женщины.

### 3.2.2. Экспрессия микроРНК в опухолевой относительно нормальной ткани пациентов с диагнозом рака гортани

Для выявления общего профиля экспрессии микроРНК включенных в анализ выбрана группа мужчин в возрасте старше 45 лет, что составило абсолютное большинство изначально анализируемой когорты (84%). Среди пациентов для некоторых микроРНК выявлен aberrantный уровень экспрессии в опухолевой ткани относительно прилежащей условно-нормальной ткани. Установлена гиперэкспрессия микроРНК-21, -155 и -205 ( $p=0,00005$ ,  $p=0,00008$  и  $p=0,00085$ , соответственно) и гипоекспрессия микроРНК-200a у пациентов мужского пола старше 45 лет с первичным диагнозом рака гортани (табл. 13).

Таблица 13 – Средний уровень экспрессии микроРНК в опухолевой относительно прилежащей нормальной ткани у пациентов.

| микроРНК  | N         | Mean±SE           | p              | FDR, %      |
|---|-----------|-------------------|----------------|-------------|
| -18a  | 45        | 0,23±0,12         | 0,071          | 11,39       |
| <b>-21</b>  | <b>46</b> | <b>0,98±0,22</b>  | <b>0,00005</b> | <b>0,04</b> |
| <b>-155</b>   | <b>46</b> | <b>0,76±0,18</b>  | <b>0,00008</b> | <b>0,03</b> |
| <b>-200a</b>  | <b>46</b> | <b>-0,85±0,24</b> | <b>0,0008</b>  | <b>0,22</b> |
| -200c   | 46        | -0,11±0,18        | 0,569          | 65,05       |
| <b>-205</b>   | <b>44</b> | <b>0,66±0,22</b>  | <b>0,003</b>   | <b>0,75</b> |
| -221  | 43        | -0,31±0,23        | 0,174          | 23,24       |
| -494  | 43        | -0,08±0,25        | 0,762          | 76,21       |
| Примечание: Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Стьюдента (t-test for single means); значение нормы экспрессии соответствует 0 |           |                   |                |             |

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы полученными на опухолях разных локализаций, в том числе и на опухолях области головы и шеи. Так, известно, что микроРНК-21, -155 и -205 играют в клетке онкогенную роль и повышение их экспрессии связано с регуляцией различных процессов задействованных в канцерогенезе. МикроРНК-200a является известным онкосупрессором, исходя из функций выполняемых ею в клетке, относительно этой микроРНК также отмечено снижение ее экспрессии по сравнению с нормальной тканью.

МикроРНК-21 является одной из первых микроРНК открытых у млекопитающих. Результаты исследований показали, что эта микроРНК является эволюционно весьма консервативной молекулой. МикроРНК-21 является наилучшим примером демонстрации дезрегуляции микроРНК при онкологических заболеваниях, что подтверждено рядом широкомасштабных экспериментов в этой области. МикроРНК-21 участвует практически во всех процессах, которые участвуют в злокачественной трансформации, а именно в регуляции процессов апоптоза, клеточного цикла, пролиферации, инвазии, роста и

прогрессии опухолевого клона [Hong L.et al., 2013]. Это заключение было подтверждено рядом функциональных исследований, в которых выявлена связь экспрессии микроРНК-21 и изменений экспрессии генов-мишеней, более подробные данные приведены в таблице 14. Гиперэкспрессия микроРНК-21 показана на примере многих локализаций, в частности при глиобластоме, раке молочной железы, яичника, желудка, печени и др. [Krichevsky A.M. G.G.2009]. В литературе представлены значительное количество данных о гиперэкспрессии микроРНК-21 в клеточных линиях и клинических образцах опухолей области головы и шеи [Chen D.et al., 2013]. Наши результаты согласуются с данными, полученными Ren J, et al (2010) и Cao P. et al (2012). Ren J. et al (2010) в своей работе показали, что в образцах рака гортани наблюдается гиперэкспрессия микроРНК-21 в сравнении с нормальной тканью (n=39), причем повышение экспрессии этой микроРНК ассоциировано с низкой степенью дифференцировки ткани, стадиями T<sub>3-4</sub>, а также со статусом метастазирования. Исследовав методом ПЦР 48 парных образцов, полученных от пациентов с раком гортани, Cao P. et al (2012) выявили значимую гиперэкспрессию микроРНК-21, -93, -205 и -708, но не для микроРНК-155, которая также входила в их исследование [Cao P.et al.,2013; Ren J.et al.,2010].

Таблица 14 – Онкогенная роль микроРНК-21

| Гены-мишени        | Локализация  | Биологическое действие           | Авторы   |
|--------------------|--|----------------------------------|--|
| <i>PTEN</i>        | Культура клеток и ткань опухоли холангиокарциномы        | Апоптоз                          | [Meng F.et al.,2007]<br>[Pezzolesi M.G.et al.,2008]  |
| <i>PDCD4</i>       | Культура клеток рака молочной железы                     | Апоптоз                          | [Lu Z.et al.,2008]                                   |
| <i>TPM1</i>        | Культура клеток рака молочной железы MCF-7               | Рост опухоли                     | [Zhu S.et al.,2007]                                  |
| <i>SPRY1</i>       | Фибробласты сердца                                       | Рост клеток                      | [Thum T.et al.,2008]                                 |
| <i>SPRY2</i>       | кардиоциты   | Морфогенез, рост клеток          | [Sayed D.et al.,2008]                                |
| <i>RECK</i>        | Рак желудка  | Пролиферация, инвазия, апоптоз   | [Zhang Z.et al.,2008]<br>[Gabriely G.et al.,2008]    |
| <i>BCL2</i>        | Культура клеток рака молочной железы MCF-7, глиобластома | Апоптоз                          | [Wickramasinghe N.S.et al.,2009] [Shi L.et al.,2010] |
| <i>MARCKS</i>      | Культура клеток рака простаты                            | Апоптоз, пролиферация, инвазия   | [Li T.et al.,2009]                                   |
| <i>HNRPK, TP63</i> | Культура клеток глиобластомы                             | Апоптоз                          | [Papagiannakopoulos T.et al.,2008]                   |
| <i>IL12A</i>       | Трансгенные мыши   | Воспаление                       | [Lu T.X.et al.,2009]                                 |
| <i>JAG1</i>        | Дендритные клетки  | Дифференцировка клеток           | [Hashimi S.T.et al.,2009]                            |
| <i>BTG2</i>        | Рак гортани  | Клеточный цикл                   | [Liu M.et al.,2009]                                  |
| <i>LRRFIP1</i>     | Культура клеток глиобластомы                             | Резистентность к химиопрепаратам | [Li Y.et al.,2009]                                   |
| <i>BMPR2</i>       | Культура клеток рака                                     | Метастазирование                 | [Qin W.et al.,2009]                                  |

|                        |   |  |   |
|------------------------|---|--|---|
|                        | простаты  |  |   |
| <i>TGFBR2</i>          | Мезенхимальные стволовые клетки                 | Апоптоз                                      | [Kim Y.J.et al.,2009]   |
| <i>CDC25A</i>          | Культура клеток рака прямой кишки               | Клеточный цикл                               | [Wang P.et al.,2009]<br>[Queiroz de Oliveira P.E.et al.,2009] |
| <i>PELI1 (Pellino)</i> | Гепатокарцинома мыши                            | NF-каппаВ сигнальный путь, регенерация ткани | [Marquez R.T.et al.,2010]                                     |
| <i>ANKRD46</i>         | Рак молочной железы in vitro и in vivo          | Рост, миграция                               | [Yan L.X.et al.,2011]   |
| <i>CDK2AP1</i>         | Рак головы и шеи                                | Пролиферация, инвазия                        | [Zheng J.et al.,2011]   |
| <i>MEF2C</i>           | Рак мозга                                       | Пролиферация                                 | [Yelamanchili S.V.et al., 2010]                               |
| <i>MSH2, MSH6</i>      | Рак прямой кишки                                | Клеточный цикл, апоптоз                      | [Valeri N.et al.,2010]  |
| <i>PPAR α</i>          | Культура клеток легочной гладкомышечной артерии | Пролиферация, инвазия                        | [Sarkar J.et al.,2010]  |
| <i>ANP32A, SMARCA4</i> | Культура клеток рака простаты                   | Пролиферация, выживаемость клеток, миграция  | [Schramedei K.et al.,2011]                                    |
| <i>THRB</i>            | Папиллярная карцинома щитовидной железы         | Пролиферация                                 | [Jazdzewski K.et al.,2010]                                    |

МикроРНК-155 также весьма консервативна среди животных и выявляется у асцидий, рыб, лягушек и млекопитающих [Griffiths-Jones S.2010]. В эксперименте *in vivo* при экзогенном введении микроРНК-155 в организм было выявлено, что эта молекула может ингибировать рост опухоли, вирусную инфекцию, и снижать скорость прогрессии кардиоваскулярных заболеваний. Показана ее ключевая роль в регуляции иммунологических процессов, в том числе и при формировании ответов врожденной и адаптивной иммунной систем [O'Connell R.M.et al.,2007; Teng G. F.N. Papavasiliou 2009]. Регуляция активации воспалительных каскадов является показателем важной коммуникативной роли микроРНК-155 между воспалением и злокачественной патологией [Jiang S.et al., 2010]. МикроРНК-155 принимает непосредственное участие в регуляции многих ключевых процессов канцерогенеза [Jiang S.et al.,2012; Kong W.et al., 2008], [Jiang S.et al., 2010],[Bakirtzi K.et al., 2011]. На основе функциональных исследований были выявлены и валидированны ряд мишеней этой микроРНК, которые отражают ее роль в канцерогенезе опухолей (таблица 15).

В зависимости от локализации микроРНК-155 может играть двойственную роль в канцерогенезе. В литературе приведены результаты, демонстрирующие гиперэкспрессию микроРНК-155 во многих солидных опухолях: при раке молочной железы, легкого, прямой кишки и других, что позволяет предположить важную роль этой микроРНК в канцерогенезе [Volinia S.et al., 2006]. В то время как при лимфоме Беркитта у взрослых и при меланоме отмечена гипоекспрессия микроРНК-155 [Levati L.et al.,2009; Metzler M.et



al., 2004]. При опухолях головы и шеи представлены отдельные работы, в которых показана гиперэкспрессия микроРНК-155 в опухолевой ткани. Следует отметить, что большинство этих исследований были проведены без стратификации опухолей головы и шеи по отдельным локализациям [Chang S.S.et al., 2008; Chen Z.et al.,2012; Hui A.B.et al., 2010].

Таблица 15 – Онкогенная роль микроРНК-155

| Гены-мишени   | Локализация   | Биологическое действие  | Авторы  |
|---|---|---|---|
| <i>FOXO3a</i> ,<br><i>RhoA</i> ,<br><i>TP53INP1</i> ,<br><i>C/EBP<math>\beta</math></i> ,<br><i>VHL</i> | Рак молочной железы   | Апоптоз, пролиферация, инвазия, ЭМП, ангиогенез опухоли, метаболизм | [Jiang S.et al., 2010; Kong W.et al.,2010; Kong W.et al., 2014; Kong W.et al., 2008; Zhang C.et al.,2013] |
| <i>SOCS1</i>  | Рак молочной железы, рак гортани, рак прямой кишки, рак печени, лимфома | Клеточная пролиферация, инвазия и метастазирование                  | [Bakirtzi K.et al., 2011; Jiang S.et al., 2010; Yan X.L.et al., 2013; Zhao X.-d.et al.,2013]              |
| <i>SEL1L</i> ,<br><i>TP53INP1</i> ,<br><i>MLH1</i>  | Рак поджелудочной железы  | Клеточная пролиферация и апоптоз                                    | [Gironella M.et al.,2007; Liu J.et al.,2013; Liu W.-J.et al., 2013]                                       |
| <i>JMJD1A</i>   | Рак носоглотки  | Маркер плохого прогноза заболевания                                 | [Du Z.-M.et al.,2011]   |
| <i>BACH1</i>  | Рак носоглотки, рак почки   | Клеточная пролиферация, инвазия и апоптоз                           | [Du Z.-M.et al., 2011; Li S.et al.,2012]  |
| <i>SHIP1</i> ,<br><i>C/EBP<math>\beta</math></i> ,<br><i>HDAC4</i> ,<br><i>SMAD5</i> ,<br><i>PIK3R1</i> | В-клеточный рак трансгенных мышей                                       | Клеточная пролиферация, дифференцировка, апоптоз и метастазирование | [Costinean S.et al.,2009; Rai D.et al.,2010; Sandhu S.K.et al.,2012]                                      |
| <i>APC</i>  | Папиллярный рак щитовидной железы                                       | Рост клеток, клеточная пролиферация и апоптоз                       | [Zhang X.et al.,2013]   |
| <i>CK1a</i>   | Саркома жировой ткани   | Клеточная пролиферация и активация клеточного цикла                 | [Zhang P.et al.,2012]   |
| <i>CDC73</i>  | Рак ротовой полости   | Клеточная пролиферация и апоптоз                                    | [Rather M.I.et al.,2013]  |
| <i>SKI</i>  | Культура клеток меланомы  | Рост клеток, клеточная пролиферация и апоптоз                       | [Levati L.et al.,2011]  |
| <i>CLDN-1</i>   | Рак яичника   | Миграция клеток, инвазия и адгезия                                  | [Qin W.et al.,2013]   |
| <i>SMAD2</i>  | Культура клеток рака желудка  | Рост клеток, клеточная пролиферация, миграция и инвазия             | [Li C.-L.et al.,2012]   |

Молекулы семейства микроРНК-200 и микроРНК-205, также как и рассмотренные выше микроРНК, являются весьма консервативными у билатеральных животных. В литературе широко представлены данные о значительной роли представителей семейства микроРНК-200, а также микроРНК-205 в онкогенезе, в частности, в эпителиально-

мезенхимальном переходе и процессе приобретения клеткой эмбрионального фенотипа [Bracken C.P.et al., 2008; Gregory P.A.et al., 2008; Korpai M.et al., 2008]. Также они принимают участие в регуляции клеточной пролиферации, клеточного цикла и апоптоза [Cochrane D.R.et al., 2009; Du Y.et al., 2009; Uhlmann S.et al., 2010; Zidar N.et al., 2011].

Uhlmann S. с соавторами (2010) на клеточных линиях опухолей молочной железы показали роль семейства микроРНК-200 в регуляции клеточной инвазии, опосредованной эпидермальным фактором роста, а также разное действие членов этого семейства на регуляцию клеточного цикла [Uhlmann S.et al., 2010]. Cochrane D. с соавт. (2009) на клеточных линиях опухолей молочной железы, яичников и эндометрия продемонстрировали, что члены семейства микроРНК-200 (-200a и -200c) репрессируют не только *ZEB1* и 2, но и ряд других генов, отвечающих за мезенхимальный фенотип клеток (*FN1*, *NTRK2*, *QK1* и *TUBB3*), что приводит к изменению способности клеток к инвазии и миграции [Cochrane D.R.et al., 2009]. Более подробные данные относительно роли микроРНК-200 в клетке приведены в таблице 16. Многочисленные исследования показали онкосупрессорную роль микроРНК-200 в канцерогенезе опухолей мочевого пузыря, молочной железы, а также ротовой и носовой полостей и др. [Feng X.et al., 2014].

Таблица 16 – Онкосупрессорная роль микроРНК-200

| Гены-мишени   | Локализация                                       | Биологическое действие                              | Авторы  |
|---|---|---|---|
| <i>ERRFI-1 (ERBB)</i>                                     | Культура клеток рака мочевого пузыря              | Клеточный рост, эпителиально-мезенхимальный переход | [Adam L.et al.,2009]  |
| <i>ZEB1</i> и <i>ZEB2</i>                                 | Культура клеток опухоли                           | Клеточная миграция, ЭМП                             | [Korpai M.et al., 2008; Park S.-M.et al., 2008]                               |
| <i>ZEB1</i> , <i>CTNNB1</i>                               | Рак носоглотки, молочной железы                   | Рост клеток, миграция, инвазия                      | [Korpai M.et al., 2008; Mongroo P.S. A.K. Rustgi2010; Park S.-M.et al., 2008] |
| <i>BMI-1</i> , <i>Mo-MLV</i>                              | Культура клеток эмбриональной карциномы (НТВ-106) | ЭМП, миграция, дифференцировка                      | [Polytarchou C.et al., 2012; Shimono Y.et al., 2009]                          |
| <i>PLCγ1</i>  | Рак молочной железы                               | Инвазия, клеточный цикл                             | [Uhlmann S.et al., 2010]  |
| <i>FAP1</i>   | Культуры клеток                                   | Апоптоз, клеточный цикл                             | [Schickel R.et al.,2010]  |
| <i>SUZ12</i>  | Культуры клеток рака молочной железы              | Рост клетки, инвазия                                | [Iliopoulos D.et al.,2010]  |
| <i>JAG1</i> , <i>MALM2</i> , <i>MALM3</i>                 | Культура клеток метастазирующего рака простаты    | ЭМП, метастазирование                               | [Brabletz S.et al.,2011; Vallejo D.M.et al.,2011]                             |
| <i>FN1</i> , <i>LEPR</i> , <i>NTRK2</i> , <i>ARHGAP19</i> | Культуры клеток рака эндометрия и молочной железы | Пролиферация, подвижность клеток                    | [Bai J.-X.et al.,2013; Cochrane D.R.et al., 2009]                             |
| <i>p38α</i>   | Мышиная модель рака яичника                       | Рост опухоли  | [Mateescu B.et al.,2011]  |

В литературе авторы отмечают дуалистическую роль микроРНК-205. Онкосупрессорную роль микроРНК-205 осуществляет путем подавления пролиферации при ЗНО (репрессируя гены *ErbB3*, *E2F1* и гены MAPK- и AR-сигнальных путей), а также подавляя процесс эпителиально-мезенхимального перехода и инвазию (через репрессию генов *PKCε*, *ZEB1/2*, *MMP2* и *MMP9*, *VEGF-A*) (обзор Qin, A.Y et al, 2013). Представлены данные свидетельствующие и об онкогенной роли микроРНК-205, которая участвует в малигнизации, прогрессии опухолевого процесса и развитии устойчивости к противоопухолевой терапии, репрессируя гены *PTEN*, *CYR61* и *CTGF*, *SHIP2* (Cao et al., 2012; Nam et al., 2012). Подробные данные о роли микроРНК-205 в канцерогенезе опухолей представлены в таблице 17.

Для микроРНК-205 отмечены как ее гиперэкспрессия, например, при раке шейки матки и эндометрия, так и гипоекспрессия – при раке молочной железы, простаты и меланоме [Qin A.-Y.et al., 2013]. Относительно регуляции экспрессии микроРНК-205 при опухолях головы и шеи в литературе также приведены весьма противоречивые данные. Одни авторы отмечают ее гиперэкспрессию [Cao P.et al., 2013; Fletcher A.M.et al., 2008; Qu C.et al.,2012; Tran N.et al., 2007], другие гипоекспрессию [Childs G.et al., 2009; Kim J.-S.et al., 2014; Zidar N.et al., 2011], что авторы объясняют возможными влияниями выбора гистотипов опухоли, ее подтипов, микроокружения и регуляции генов-мишеней. Так, Teta et al. (2012) в своей работе показали, что микроРНК-205 значительно гиперэкспрессирована в клетках эпидермиса, но не волосяных фолликулов, что позволяет судить об эпителий-специфичности экспрессии этой микроРНК [Teta M.et al., 2012]. В пользу этого суждения получены и другие данные относительно участия микроРНК-205 в регуляции генов вовлеченных в формировании эпителия и адгезии клеток [Gandellini P.et al.,2009; Gregory P.A.et al., 2008].

Противоречивы данные относительно роли микроРНК-205 и при раке гортани. Cao P. et al (2012) выявили значимую гиперэкспрессию микроРНК-21, -93, -205 и -708 у пациентов с раком гортани [Cao P.et al., 2013]. Однако же Tian L. et al (2014) показали онкосупрессорную роль микроРНК-205 при раке гортани *in vitro* (культура Нер-2 клеток) и *in vivo* (n=30), обнаружив значимое понижение ее экспрессии в опухолевых клетках [Tian L.et al., 2014].

Таблица 17 – Дуалистическая роль микроРНК-205

| Гены-мишени                     | Локализация                                 | Биологическое действие | Авторы                   |
|---------------------------------|---|------------------------|--------------------------|
| <b>Онкосупрессорные функции</b> |   |                        |                          |
| <i>MED1</i>                     | Рак простаты                                | Апоптоз                | [Hulf T.et al.,2013]     |
| <i>hnRNP-K</i>                  | Рак простаты, культура клеток рака простаты | Пролиферация           | [Szczyrba J.et al.,2013] |

|                           |   |                                       |  |
|---------------------------|---|---------------------------------------|--|
| <i>ΔNp63α</i>             | Культура клеток рака простаты   | Инвазия, метастазирование             | [Gandellini P.et al., 2009]                  |
| <i>IL-24, IL-32</i>       | Культура клеток рака простаты   | Апоптоз, пролиферация, инвазия        | [Majid S.et al.,2010]                        |
| <i>PKCε</i>               | Рак простаты, культура клеток рака простаты                             | Инвазия                               | [Gandellini P.et al., 2009]                  |
| <i>ErbB3</i>              | Культура клеток рака молочной железы                                    | Клеточный рост, пролиферация          | [Adachi R.et al.,2011]                       |
| <i>VEGF-A</i>             | Культура клеток рака молочной железы                                    | Инвазия, метастазирование             | [Wu H.et al., 2009]                          |
| <i>ZEB1/2</i>             | Культура клеток рака пищевода   | ЭМП, пролиферация, апоптоз            | [Matsushima K.et al.,2011]                   |
| <i>E2F1</i>               | Культура клеток меланомы  | Клеточный рост, пролиферация, апоптоз | [Dar A.A.et al.,2011]                        |
| <i>SFK</i>                | Культура клеток рака почки  | Клеточный цикл, пролиферация, инвазия | [Majid S.et al.,2011]                        |
| <i>VEGF-A</i>             | Культура клеток глиобластомы  | Клеточная миграция, инвазия, апоптоз  | [Song H. G. Bu2009; Yue X.et al.,2012]       |
| <i>CYR61 CTGF</i>         | Рак шейки матки, рак эндометрия   | Пролиферация, миграция                | [Karaayvaz M.et al.,2012; Xie H.et al.,2012] |
| <b>Онкогенные функции</b> |   |                                       |  |
| <i>PTEN1</i>              | Культура клеток рака полости носа, культура клеток рака молочной железы | Апоптоз, клеточный цикл               | [Greene S.B.et al.,2010; Qu C.et al., 2012]  |
| <i>TRAF2</i>              | Культура клеток рака молочной железы                                    | Клеточный цикл                        | [Tanic M.et al.,2012]                        |
| <i>SHIP2</i>              | Плоскоклеточная карцинома   | Апоптоз                               | [Yu J.et al.,2010]                           |

Таким образом, нами получены результаты, демонстрирующие гиперэкспрессию онкогенных микроРНК-21, -155, 205 и гипоекспрессию онкосупрессорной микроРНК-200a в опухолевой ткани пациентов с первичным диагнозом рака гортани, что согласуется с данными литературы полученными для этих микроРНК на примере других локализаций. Эти данные позволяют предположить значительную роль микроРНК-21, 155, 200a и -205 в канцерогенезе опухолей гортани, что вероятно связано с их функциональной ролью и участием их в регуляции многих генов и клеточных процессов, задействованных в малигнизации.

### **3.2.3. Экспрессия микроРНК в зависимости от стадии распространенности опухолевого процесса и лимфогенного метастазирования**

При сравнении показателей экспрессии микроРНК между подгруппами согласно стадии распространенности опухолевого процесса в виду малочисленности выборок были объединены пациенты с I и II стадией, а также лица с III и IV стадиями. Сравнение этих подгрупп попарно не выявило значимых различий в уровне экспрессии анализируемых

микроРНК (табл. 18). Что также было выявлено и по результатам дискриминантного анализа ( $F(24,81) = 0,69$   $p=0,8492$ ).

Таблица 18 – Уровень экспрессии микроРНК в опухолевой относительно прилежащей нормальной ткани от пациентов в зависимости от стадии опухоли.

| микроРНК   | T <sub>1-2</sub> |            | T <sub>3-4</sub> |            | p    | FDR, % |
|--|------------------|------------|------------------|------------|------|--------|
|  | N                | Mean±SE    | N                | Mean±SE    |      |        |
| -18a   | 20               | 0,20±0,21  | 25               | 0,26±0,15  | 0,15 | 58,3   |
| -21  | 21               | 0,64±0,27  | 25               | 1,27±0,33  | 0,66 | 75,2   |
| -155   | 21               | 0,67±0,33  | 25               | 0,84±0,17  | 0,45 | 119,7  |
| -200a  | 21               | -1,05±0,30 | 25               | -0,69±0,36 | 0,56 | 74,2   |
| -200c  | 21               | -0,22±0,19 | 25               | -0,01±0,30 | 0,46 | 74,1   |
| -205   | 21               | 0,50±0,15  | 23               | 0,81±0,39  | 0,09 | 74,2   |
| -221   | 21               | -0,70±0,32 | 22               | 0,06±0,31  | 0,46 | 91,3   |
| -494   | 19               | -0,29±0,39 | 24               | 0,09±0,33  | 0,83 | 82,9   |
| Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; значение нормы экспрессии соответствует 0 |                  |            |                  |            |      |        |

Сравнение показателей экспрессии отдельных микроРНК в зависимости от стадии распространенности опухолевого процесса показало, что для некоторых микроРНК (в частности для микроРНК-21, -200c и -205) основной разброс значений формируется за счет образцов полученных от пациентов с поздними стадиями (рис. 16). Количество пациентов в подгруппе с I стадией составило 8 человек, II стадией – 13 пациентов, III и IV- стадиями - 16 и 9 пациентов, соответственно. Известно, что при росте опухоли помимо общего увеличения количества клеток происходит и повышение гетерогенности опухоли. Каждая опухоль по своему строению может быть архитектурно сложна, участки опухоли также различны по васкуляризации, инфильтрации иммунными клетками "хозяина", соединительнотканскими компонентами и другим характеристикам, которые могут менять фенотип идентичных клеток [Buick R.N. 1984; Dexter D.L. P.C. 1982]. Вследствие клональной эволюции опухоли накапливаются патологические клетки с селективными ростовыми преимуществами и повышенным злокачественным потенциалом, что способствует увеличению скорости роста, инвазивности, метастатической активности [Чехун В. Ф. et al., 2012].

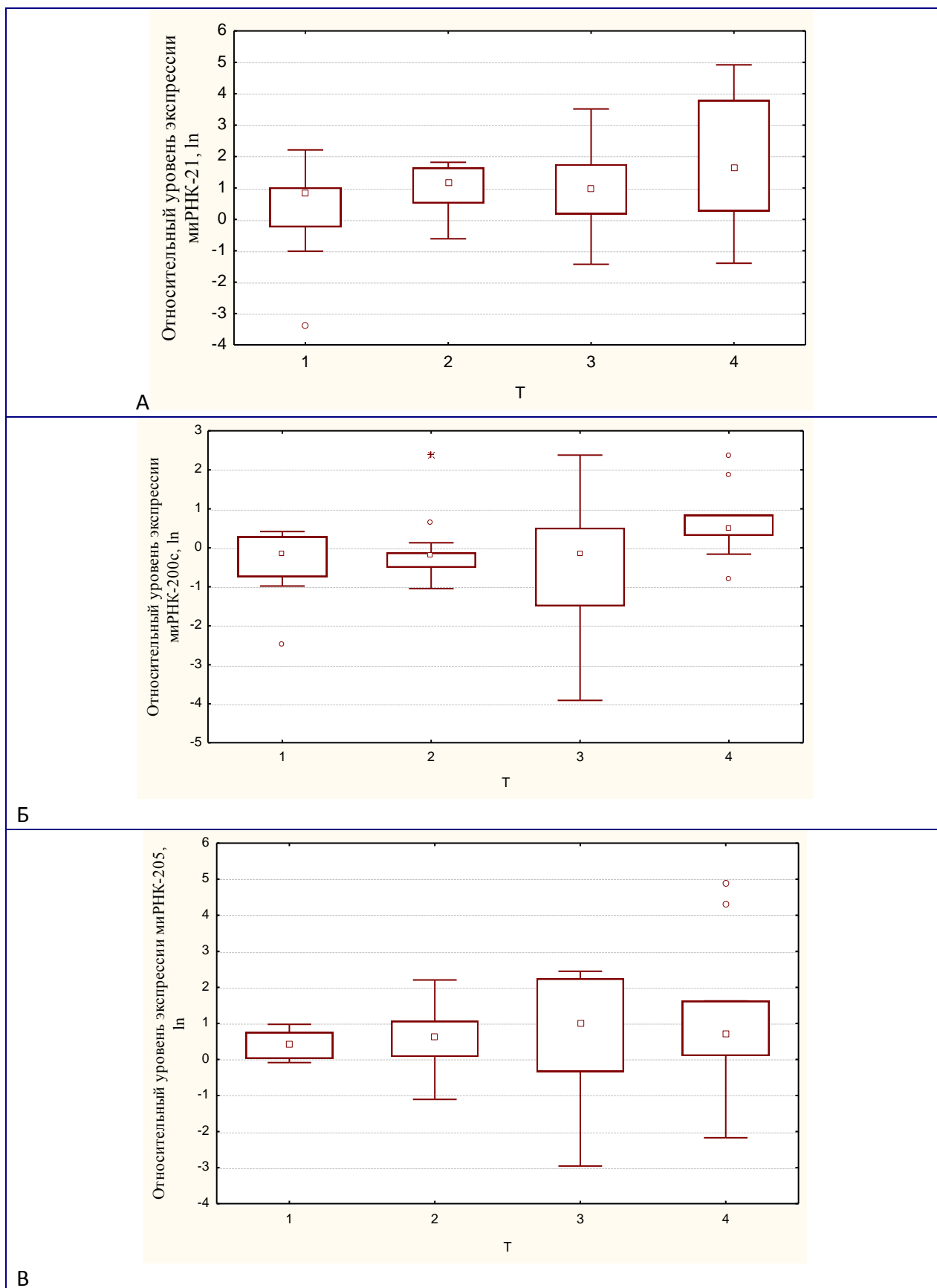


Рисунок 16 – Уровень экспрессии микроРНК-21 (А), -200с (Б) и -205 (В) в опухолевой относительно прилежащей нормальной ткани от пациентов в зависимости от стадии распространенности опухолевого процесса. Примечание -  $\square$  Медиана  $\square$  25%-75%  $\perp$  Доверительный интервал  $\circ$  Выбросы.

Таким образом, полученные данные согласуются с идеей о гетерогенности опухоли, обнаруживая неоднородность и неоднозначность экспрессии некоторых микроРНК на ранних и поздних этапах канцерогенеза, что во многом привносит некий хаос в интерпретацию результатов и должно учитываться при анализе данных в виде унификации подгруппы согласно размеру опухоли. Однако полученный результат не исключает влияния фактора малых выборок.

Несмотря на значительный разброс значений между подгруппами выявлена положительная корреляция для микроРНК-21 со стадией опухоли ( $r=0,32$ ,  $p=0,029$ ), однако этот уровень значимости не удовлетворяет критерию FDR.

Не выявлено влияния лимфогенного метастазирования на результаты общего паттерна экспрессии анализируемых микроРНК в группе мужчин старше 45 лет ( $F(16,54)=0,97$ ,  $p<0,4995$ ), что также подтверждено и для каждой микроРНК в отдельности (табл. 19). Хотя для микроРНК-200с выявлено значительное понижение уровня экспрессии у пациентов без метастазирования в сравнении с подгруппой лиц с 1 и более лимфогенных метастазов, однако с учетом поправки FDR это значение статистически не значимо. В литературе показано, что экспрессия микроРНК-200с обратно ассоциирована с лимфогенным метастазированием. Выявлено, что именно гипозэкспрессия молекул семейства микроРНК-200 наблюдается в клеточных культурах с повышенной способностью к метастазированию [Burk U. et al., 2008; Korpai M. Y. Kang 2008]. В ткани печеночных метастазов экспрессия микроРНК-200с выше, чем в первичном локусе опухоли (колоректальный рак) [Hur K. et al., 2013]

Таблица 19 – Уровень экспрессии микроРНК в опухолевой ткани относительно прилегающей нормальной от пациентов в зависимости от лимфогенного метастазирования.

| микроРНК   | N <sub>0</sub> |            | N <sub>1-2</sub> |            | p     | FDR, % |
|--|----------------|------------|------------------|------------|-------|--------|
|  | N              | Mean±SE    | N                | Mean±SE    |       |        |
| -18a   | 35             | 0,16±0,14  | 8                | 0,26±0,23  | 0,696 | 139,2  |
| -21  | 36             | 0,85±0,24  | 8                | 1,82±0,57  | 0,123 | 49,2   |
| -155   | 36             | 0,72±0,21  | 8                | 1,04±0,37  | 0,449 | 119,8  |
| -200a  | 36             | -0,82±0,28 | 8                | -0,82±0,50 | 0,993 | 99,3   |
| -200с  | 36             | -0,35±0,20 | 8                | 0,87±0,46  | 0,018 | 14,5   |
| -205   | 34             | 0,63±0,25  | 8                | 0,53±0,49  | 0,858 | 114,5  |
| -221   | 34             | -0,27±0,24 | 7                | -0,35±0,76 | 0,923 | 105,5  |
| -494   | 33             | -0,11±0,32 | 8                | 0,04±0,25  | 0,717 | 114,8  |
| Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан согласно t-критерию Уэлша; значение нормы экспрессии соответствует 0 |                |            |                  |            |       |        |

В данной работе не выявлено ассоциации между aberrантной экспрессией анализируемых микроРНК и стадией распространенности опухолевого процесса, однако в



литературе приведены данные относительно связи гиперэкспрессии микроРНК-21 с поздними стадиями опухоли, а также с лимфогенным метастазированием [Qian B.et al., 2009; Yan L.-X.et al.,2008], что показано и для микроРНК-155 [Shibuya H.et al.,2009] и для микроРНК-221 [Karakatsanis A.et al., 2013], на примере локализаций не относящихся к области головы и шеи. В то время как Tian L. et al (2014) в своей работе представили данные о корреляции экспрессии микроРНК-205 с поздними стадиями рака гортани, но не с метастазированием [Tian L.et al., 2014].

Таким образом, по уровню экспрессии микроРНК-18a, 21, -155, -200a, -200c, -205, -221 и -494 в опухолевой относительно прилежащей условно нормальной ткани не выявлено связи со стадией опухолевого процесса и лимфогенным метастазированием.

### 3.2.4. Экспрессия микроРНК в зависимости от степени дифференцировки опухолевой ткани

Для микроРНК-18a наблюдается тенденция к повышению уровня экспрессии от низкой к высокой степени дифференцировки ткани, что, однако, не является статистически значимым с учетом критерия FDR (рис. 17, табл. 20). Отсутствие значимой разницы в совокупном уровне экспрессии анализируемых микроРНК в подгруппах мужчин старше 45 лет в зависимости от стадии дифференцировки опухолевой ткани также показано и дискриминантным анализом ( $F(16,52)=0,74$ ,  $p < 0,7415$ ).

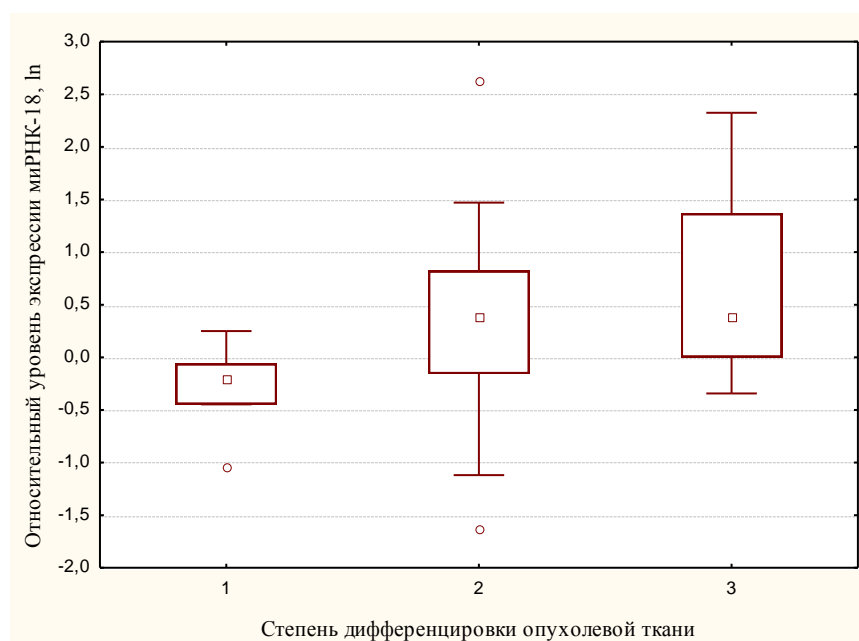


Рисунок 17 – Экспрессия микроРНК-18a в зависимости от степени дифференцировки опухолевой ткани. Примечание – 1, 2 и 3 – подгруппы с низкой (n=6), умеренной (n=33) и высокой (n=4) степенью дифференцировки опухолевой ткани, соответственно. □ Медиана □ 25%-75% I Доверительный интервал ○ Выбросы.



Таблица 20 – Уровень экспрессии микроРНК в опухолевой ткани относительно прилежащей нормальной от пациентов в зависимости от степени дифференцировки опухолевой ткани.

| Микро РНК   | Низкая |            | Умеренная |            | Высокая |            | p1   | FDR, % | p2   | FDR, % | p3   | FDR, % |
|---|--------|------------|-----------|------------|---------|------------|------|--------|------|--------|------|--------|
|   | N      | Mean±SE    | N         | Mean±SE    | N       | Mean±SE    |      |        |      |        |      |        |
| -18a  | 6      | -0,29±0,18 | 32        | 0,31±0,15  | 4       | 0,68±0,57  | 0,01 | 12,0   | 0,14 | 57,6   | 0,53 | 141,8  |
| -21   | 6      | 0,87±0,68  | 33        | 0,97±0,27  | 4       | 0,34±0,68  | 0,89 | 89,4   | 0,59 | 94,8   | 0,39 | 156,9  |
| -155  | 6      | 0,61±0,39  | 33        | 0,74±0,22  | 4       | 0,62±0,70  | 0,77 | 88,5   | 0,99 | 99,2   | 0,87 | 115,9  |
| -200a   | 6      | -0,60±0,51 | 33        | -0,91±0,31 | 4       | -0,94±0,70 | 0,60 | 95,9   | 0,70 | 93,7   | 0,97 | 97,3   |
| -200с   | 6      | -0,65±0,62 | 33        | -0,1±0,221 | 4       | 0,19±0,20  | 0,41 | 82,8   | 0,23 | 61,9   | 0,32 | 257,0  |
| -205  | 6      | 0,37±0,61  | 31        | 0,69±0,28  | 4       | 0,47±0,38  | 0,63 | 84,6   | 0,90 | 102,5  | 0,64 | 127,7  |
| -221  | 5      | 0,15±0,11  | 31        | -0,40±0,31 | 4       | -0,38±0,30 | 0,10 | 39,7   | 0,14 | 112,8  | 0,97 | 110,7  |
| -494  | 6      | -1,14±1,05 | 30        | 0,07±0,28  | 4       | -0,06±0,53 | 0,27 | 72,9   | 0,39 | 77,3   | 0,83 | 132,4  |
| Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; p1 – «низкая» vs «умеренная», p2 - «низкая» vs «высокая», p3 - «умеренная» vs «высокая»; значение нормы экспрессии соответствует 0 |        |            |           |            |         |            |      |        |      |        |      |        |

Вероятно в силу низкой информативности показателя, в литературе крайне мало уделяется внимания ассоциации aberrантной экспрессии микроРНК и степени дифференцировки опухолевой ткани. Из широкого спектра анализируемых микроРНК такая связь выявлена, например, для микроРНК-141 при раке мочевого пузыря [Mahdavinezhad A.et al., 2015] и для микроРНК-1246 при раке ротовой полости [Liao L.et al., 2015]. Однако данных по влиянию степени дифференцировки на уровень экспрессии анализируемых нами микроРНК в литературе не встречалось.

Результаты, полученные на данной выборке пациентов с диагнозом рак гортани свидетельствуют об отсутствии различий по уровню экспрессии анализируемых микроРНК в опухолевой ткани в зависимости от степени ее дифференцировки.

### 3.2.5. Экспрессия микроРНК в зависимости от наличия ДНК вируса папилломы человека в ткани пациентов с раком гортани

В настоящее время все большее внимание исследователей привлекает вирусная теория канцерогенеза верхних дыхательных путей [Parkin D.M. 2006]. При этом по оценкам разных авторов, от 25% до 35% опухолей головы и шеи ассоциировано с ВПЧ-инфекцией [Gillison M.L.et al., 2000; McKaig R.G.et al., 1998; Киселев Ф.Л. 2000]. В мировой литературе представлены убедительные доказательства того, что вирус-позитивные опухоли головы и шеи являются обособленной подгруппой и реагируют на лечение отличным от вирус-негативных опухолей образом. Зарубежные коллеги постулируют, что определение вирусоносительства является весьма важным для определения тактики лечения пациента, прогнозирования течения заболевания, а также выживаемости [Fakhry C.et al., 2014]. Отмечается рост частоты встречаемости

папилломавирус-положительных опухолей области головы и шеи, что широко обсуждается в литературе [D'Souza G. A. Dempsey 2011; Gillison M.L. et al., 2014; Gillison M.L. et al., 2000]. Предполагают, что как одна из возможных причин в различиях клинических показателей ВПЧ-положительных опухолей является воздействие вирусных генов на микроРНК хозяина [Lajer C.B. C.v. Buchwald 2010], что было экспериментально показано, например, для кластера микроРНК-15/16, семейства микроРНК-17-92, микроРНК-21, -23b, -34a и кластера микроРНК-106b/93/25 [Zheng Z.-M. X. Wang 2011]. Однако данный вопрос крайне слабо освещен в литературе.

Когорта пациентов с раком гортани проанализирована на предмет инфицирования 12 типов вируса папилломы человека высокого онкогенного риска. Инфицированность ВПЧ опухолевой ткани составила 14,5% (8/55), а в прилежащей нормальной ткани – 12,7% (7/55) (рис. 18).

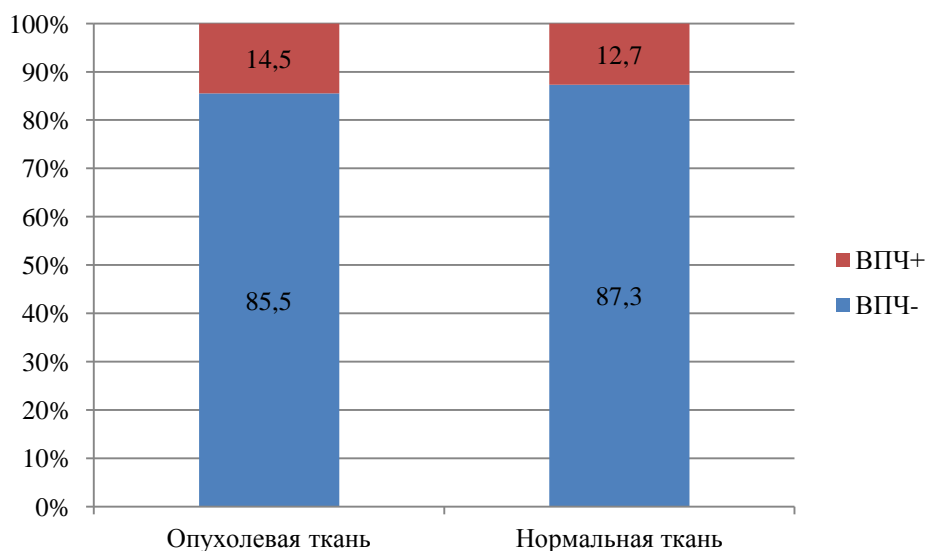


Рисунок 18 – Распространенность ВПЧ в ткани от пациентов с карциномами гортани.

В подавляющем большинстве вирус-положительные случаи являлись моноинфекцией (89%). Стоит отметить, что у лиц с раком гортани спектр типов ВПЧ различается в нормальной эпителии и в опухолевой ткани. Ведущим типом в вирус-положительных образцах нормальной ткани являлся ВПЧ16 (66,6%), другие типы представлены значительно реже: ВПЧ31/33/45 по 16,6%. В опухолевой же ткани пациентов также доминировал ВПЧ16 (71,4%), а остальные ВПЧ31/45/51 встречались по 14,2%. Интересно отметить, что парно положительными оказались всего 4 случая, т.е. в них определялся ВПЧ одного и того же типа как в нормальной, так и в опухолевой ткани пациента. Причем 3 из 4 пар содержали ДНК ВПЧ16.

В данном исследовании проведена оценка влияния папилломавирусной инфекции в опухолях гортани на уровень экспрессии микроРНК-18a, -21, -155, -200a, -200c, -205, -221 и -494. Анализ совокупного значения уровня экспрессии восьми микроРНК не выявил различий между группой вирус-позитивных и вирус-негативных опухолей мужчин старше 45 лет ( $F(8,30) = 0,49$ ,  $p < 0,8531$ ), также как и при индивидуальном сравнении по каждой микроРНК (табл. 21).

Таблица 21 – Уровень экспрессии микроРНК в опухолевой ткани относительно прилежащей нормальной от пациентов в зависимости от ВПЧ-инфицирования.

| микроРНК   | ВПЧ+ |            | ВПЧ- |            | p    | FDR, % |
|--|------|------------|------|------------|------|--------|
|  | N    | Mean±SE    | N    | Mean±SE    |      |        |
| -18a   | 6    | -0,01±0,29 | 39   | 0,27±0,14  | 0,38 | 76,8   |
| -21  | 6    | 0,66±0,30  | 40   | 1,03±0,25  | 0,36 | 95,0   |
| -155   | 6    | 0,76±0,43  | 40   | 0,76±0,20  | 0,99 | 98,8   |
| -200a  | 6    | -0,83±0,46 | 40   | -0,85±0,27 | 0,97 | 110,4  |
| -200c  | 6    | -0,44±0,44 | 40   | -0,06±0,20 | 0,43 | 57,6   |
| -205   | 6    | 0,95±0,12  | 38   | 0,62±0,25  | 0,23 | 187,9  |
| -221   | 6    | -0,05±0,14 | 37   | -0,35±0,26 | 0,32 | 127,1  |
| -494   | 5    | 0,36±0,55  | 38   | -0,13±0,27 | 0,42 | 67,7   |
| Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан согласно t-критерию Уэлша; значение нормы экспрессии соответствует 0 |      |            |      |            |      |        |

Таким образом, ВПЧ инфекция не была ассоциирована с уровнем экспрессии анализируемых микроРНК в опухолевой ткани гортани.

### 3.2.6. Анализ связи экспрессии микроРНК и выживаемости больных раком гортани

К настоящему времени опубликовано значительное количество работ, в которых проведен анализ связи уровня экспрессии микроРНК и показателей общей и безрецидивной выживаемости. Согласно литературным данным, показано что микроРНК имеет важное прогностическое значение в определении выживаемости пациентов со злокачественными новообразованиями [Li J.et al., 2009], в том числе и при опухолях головы и шеи [Wu B.-h.et al.,2011].

Общая двухгодичная выживаемость больных была оценена на примере 36 (78%) прослеженных пациентов из группы мужчин старше 45 лет с диагнозом первичного рака гортани. Анализ показателей общей выживаемости в подгруппах лиц с повышенной ( $\ln \geq 1$ ) и пониженной экспрессией ( $\ln < 1$ ) анализируемых микроРНК была схожа и статистически не различалась (табл. 22).

Таблица 22 – Двухлетняя выживаемость пациентов с первичным диагнозом рака гортани

| микроРНК   | 2-х летняя выживаемость, % |                | p    | FDR, % |
|--|----------------------------|----------------|------|--------|
|  | Гиперэкспрессия            | Гипоэкспрессия |      |        |
| -18a   | 70,0                       | 79,1           | 0,79 | 90,3   |
| -21  | 75,0                       | 78,0           | 0,80 | 80,0   |
| -155   | 67,5                       | 81,5           | 0,51 | 102,0  |
| -200a  | 73,5                       | 83,5           | 0,58 | 92,8   |
| -200c  | 69,0                       | 85,8           | 0,19 | 76,0   |
| -205   | 47,0                       | 87,0           | 0,09 | 72,0   |
| -221   | 66,5                       | 85,1           | 0,64 | 85,3   |
| -494   | 68,0                       | 83,4           | 0,48 | 128,0  |
| Примечание: уровень значимости рассчитан согласно Log-Rank тесту |                            |                |      |        |

Несмотря на то, что не была выявлена связь уровня экспрессии анализируемых микроРНК с показателем выживаемости, в литературе все же имеются данные в пользу диагностической и прогностической значимости микроРНК при ЗНО. Например, показано, что высокий уровень экспрессии микроРНК-21 является неблагоприятным прогностическим фактором общей выживаемости больных опухолями головы и шеи [Avisar M.et al., 2009; Li J.et al., 2009]. Высокий уровень экспрессии микроРНК-21 ассоциирован с низкой общей выживаемостью пациентов с ОГШ и пищеварительного тракта, что может служить обоснованием использования этой микроРНК в качестве диагностического маркера и маркера оценки эффективности лечения для больных [Nair V.S.et al., 2012; Yang M.et al., 2013]. M. Yang et al (2013) на примере немелкоклеточного рака легкого также показали ассоциацию aberrантной экспрессии не только микроРНК-21, но и -155 с низкой выживаемостью, а также их диагностическую мощьность в предсказании возникновения рецидива [Yang M.et al., 2013].

Другие авторы обнаружили значимую связь между aberrантной экспрессией микроРНК-205 и -451 и локорегиональным рецидивом пациентов с ОГШ, причем в независимости от стадии заболевания и проводимого лечения [Childs G.et al., 2009; Hui A.B.et al., 2010]. Ряд статей посвящен микроРНК-200 при ЗНО и показано, что гипоэкспрессия этой микроРНК может быть ассоциирована с низкой выживаемостью, а также может служить прогностическим маркером для пациентов со злокачественной патологией [Du Y.et al., 2009; Liu X.-G.et al., 2012; Wiklund E.D.et al., 2011], что показано и относительно микроРНК-221 [Guo H.-Q.et al., 2010; Hong F.et al., 2013; Pu X.x.et al., 2010].

Согласно полученным нами результатам aberrантная экспрессия исследуемых микроРНК в опухолевой ткани гортани не ассоциирована с двухгодичной выживаемостью.

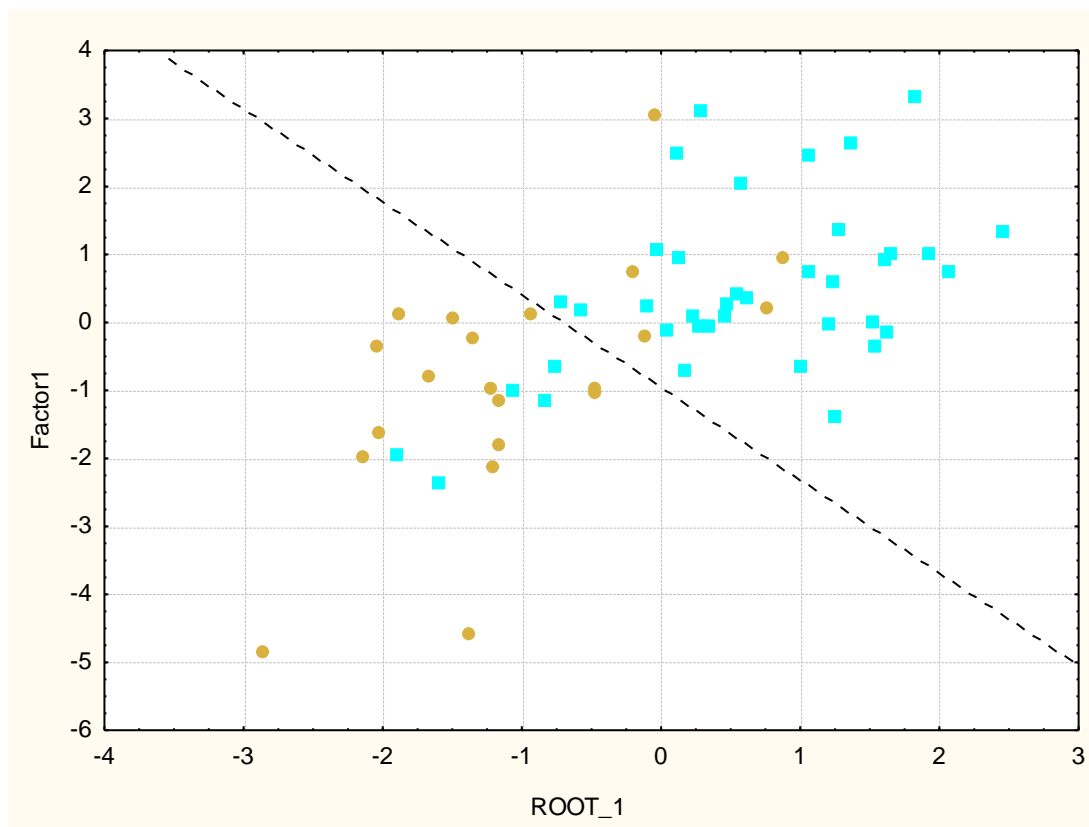
### 3.3. Сравнительная характеристика паттерна экспрессии микроРНК у больных с предопухолевыми заболеваниями и раком гортани

Представилось перспективным оценить полученные результаты по экспрессии микроРНК при предопухолевых патологиях и раке гортани в аспекте развития злокачественной патологии, для чего были сопоставлены данные по экспрессии в подгруппах лиц с дисплазиями и пациентов с уже поставленным диагнозом ЗНО гортани.

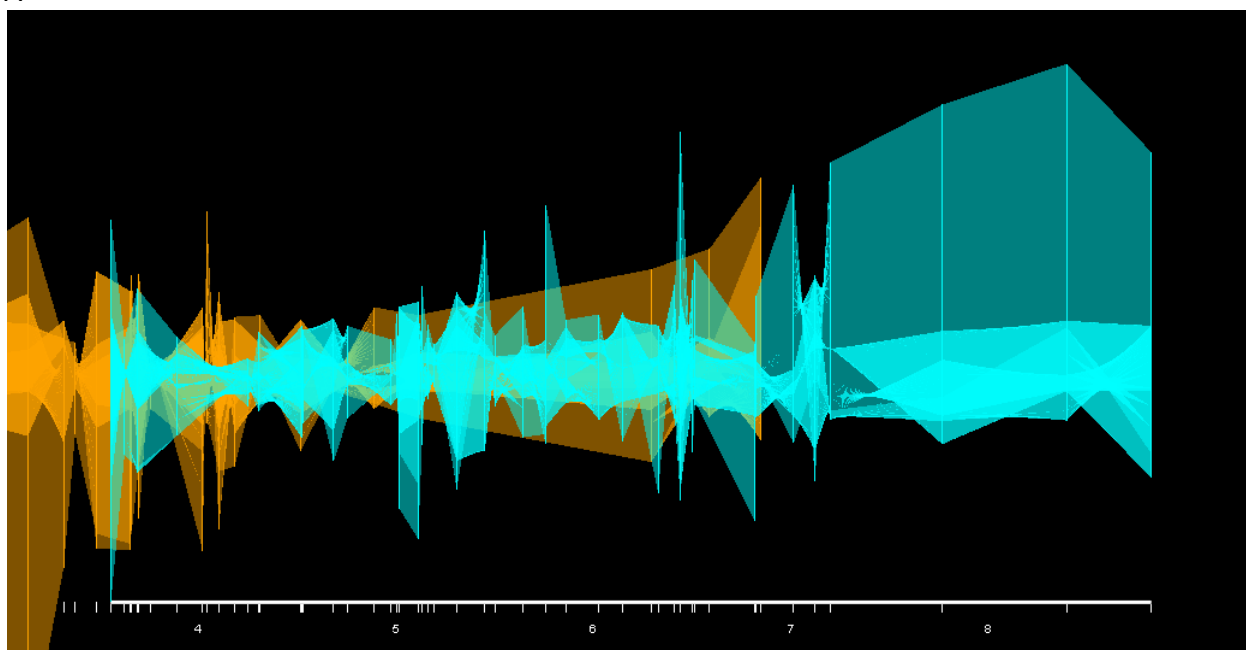
Учитывая полученные предварительно результаты, для сравнительного анализа образцов пациентов выбраны оптимизированные группы: 1 – пациенты старше 40 лет с предопухолевыми изменениями гортани (n=25); 2 – больные мужского пола старше 45 лет со злокачественными новообразованиями гортани (n=46).

Показано значимое различие в паттерне экспрессии 8 микроРНК между группами пациентов с предопухолевыми изменениями ткани гортани и со злокачественными заболеваниями ( $F(8,51) = 2,92$ ,  $p < 0,0078$ , рис. 19), причем основной вклад формируется за счет микроРНК-205, -155, -18, -221, -200с ( $r=0,42$ ,  $r=0,24$ ,  $r=0,20$ ,  $r=0,19$ ,  $r=0,17$ , соответственно). Нами были рассчитаны показатели чувствительности и специфичности теста основанного на расчете экспрессии восьми микроРНК для двух подгрупп, показатели которых составили 67% и 85%, соответственно.

При обработке результатов экспрессии анализируемых микроРНК методом визуализации NovaSpark 2D-модель позволяет разделить больных с предопухолевыми заболеваниями и раком гортани. Интересно отметить, что на графике крайние левые и правые кривые, область экспрессии которых не пересекается между подгруппами, принадлежат пациентам молодого и старшего возраста (средний возраст составил 48,4 года и 61,2 года, соответственно), а также они получены от лиц без диспластических изменений (4 из 5 случаев) и от пациентов с поздними стадиями распространенности опухолевого процесса T<sub>3-4</sub> (6 из 6 случаев), соответственно.



А



Б

Рисунок 19 – Графическое отображение данных по экспрессии анализируемых микроРНК в зависимости от диагноза. Примечание – А: по осям X и Y в виде ROOT-1 и Factor1, представлены результаты дискриминантного анализа в виде условных значений по экспрессии микроРНК-18a, -21, -155, -200a, -200c, -205, -221, -494 в зависимости от диагноза пациентов. Точками указаны лица с предопухоловой патологией; квадратами – пациенты с РГ; Б: 2D-модель представления данных по экспрессии микроРНК в зависимости от диагноза пациентов. Оранжевый и голубой цвета соответствуют образцам, полученным от пациентов с предопухоловой патологией и РГ, соответственно.

Было проведено сравнение уровня экспрессии отдельных микроРНК между тремя подгруппами – без дисплазии-ДІ, ДІІ-ІІ и Т<sub>1-4</sub>. Выявлено, что у больных раком гортани статистически значимо гиперэкспрессированы микроРНК-205, -155, -200с и -21 (15vs46, p=0,0002, p=0,008, p=0,009, p=0,013, соответственно) в сравнение с группой без диспластических изменений (табл. 23). Интересно отметить, что показатели экспрессии в группах лиц с дисплазиями ІІ-ІІІ и раком гортани были схожи и статистически не различались, что позволяет судить о близости этих подгрупп на молекулярном уровне.

Таблица 23 – Уровень экспрессии микроРНК в патологически измененной ткани у больных с предопухолевыми патологиями и раком гортани.

| Микро РНК | Без дисплазии-ДІ |            | ДІІ-ІІ |            | РГ – рак гортани |            | p1     | FDR, % | p2    | FDR, % |
|-----------|------------------|------------|--------|------------|------------------|------------|--------|--------|-------|--------|
|           | N                | Mean±SE    | N      | Mean±SE    | N                | Mean±SE    |        |        |       |        |
| -18a      | 14               | -0,07±0,13 | 10     | -0,11±0,18 | 45               | 0,23±0,12  | 0,098  | 15,7   | 0,130 | 52,0   |
| -21       | 15               | -0,17±0,39 | 10     | 1,04±0,28  | 46               | 0,98±0,22  | 0,013  | 2,5    | 0,877 | 116,9  |
| -155      | 15               | -0,27±0,33 | 10     | 0,74±0,35  | 46               | 0,76±0,18  | 0,008  | 3,1    | 0,956 | 95,6   |
| -200a     | 13               | -0,99±0,50 | 9      | -0,63±0,58 | 46               | -0,85±0,24 | 0,798  | 79,8   | 0,727 | 116,3  |
| -200с     | 15               | -1,15±0,34 | 10     | 0,24±0,44  | 46               | -0,11±0,18 | 0,009  | 2,5    | 0,476 | 95,2   |
| -205      | 15               | -1,20±0,43 | 10     | -0,02±0,32 | 44               | 0,66±0,22  | 0,0002 | 0,2    | 0,084 | 66,9   |
| -221      | 15               | -0,98±0,66 | 10     | -1,22±0,79 | 43               | -0,31±0,23 | 0,341  | 39,0   | 0,279 | 74,4   |
| -494      | 15               | -0,89±0,63 | 10     | -0,01±0,45 | 43               | -0,08±0,25 | 0,233  | 31,1   | 0,903 | 103,2  |

Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; p1 – «Без дисплазии-ДІ» vs «РГ», p2 - «ДІІ-ІІ» vs «РГ»; значение нормы экспрессии соответствует 0

Поскольку для некоторых микроРНК наблюдалась тенденция повышения экспрессии микроРНК-21, -155 и -205 по мере утяжеления диагноза, что представлено на рис. 20, было интересным провести расчет отношения шансов и оценки риска развития злокачественной патологии. Для достижения этой цели все пациенты были разделены на две группы: 1 – с повышенной более чем в два раза относительно нормальной ткани экспрессией микроРНК; 2 – с низкой экспрессией микроРНК. Установлены обнадеживающие результаты для микроРНК-205 и -155. В группе больных раком гортани, в сравнении с группой лиц с диспластическими изменениями, количество случаев с гиперэкспрессией микроРНК-205 в 2,98 раз выше, чем с гипоекспрессией (OR(CI 95%)=4,79(1,41-16,26), p=0,007). Это свидетельствует о том, что риск прогрессии заболевания повышается при повышении экспрессии микроРНК-205. Также показано, что частота случаев с повышенным уровнем экспрессии микроРНК-155 в 2 и более раза в патологически измененной ткани наблюдается значимо чаще у пациентов с раком гортани, чем у лиц без диспластических изменений, а риск развития заболевания возрастает (OR(CI 95%)=6,82(1,68-27,66), p=0,004). Наиболее примечательно, что данные показатели формируются не только за счет поздних стадий рака. Так, даже при сравнении

подгрупп лиц без дисплазии против T1-2, частота случаев с повышенным в 2 и более раза уровнем экспрессии микроРНК-155 по-прежнему превалирует у пациентов с ЗНО, а риск прогрессии заболевания увеличивается ( $OR(CI\ 95\%)=5,33(1,15-24,68)$ ,  $p=0,028$ ).

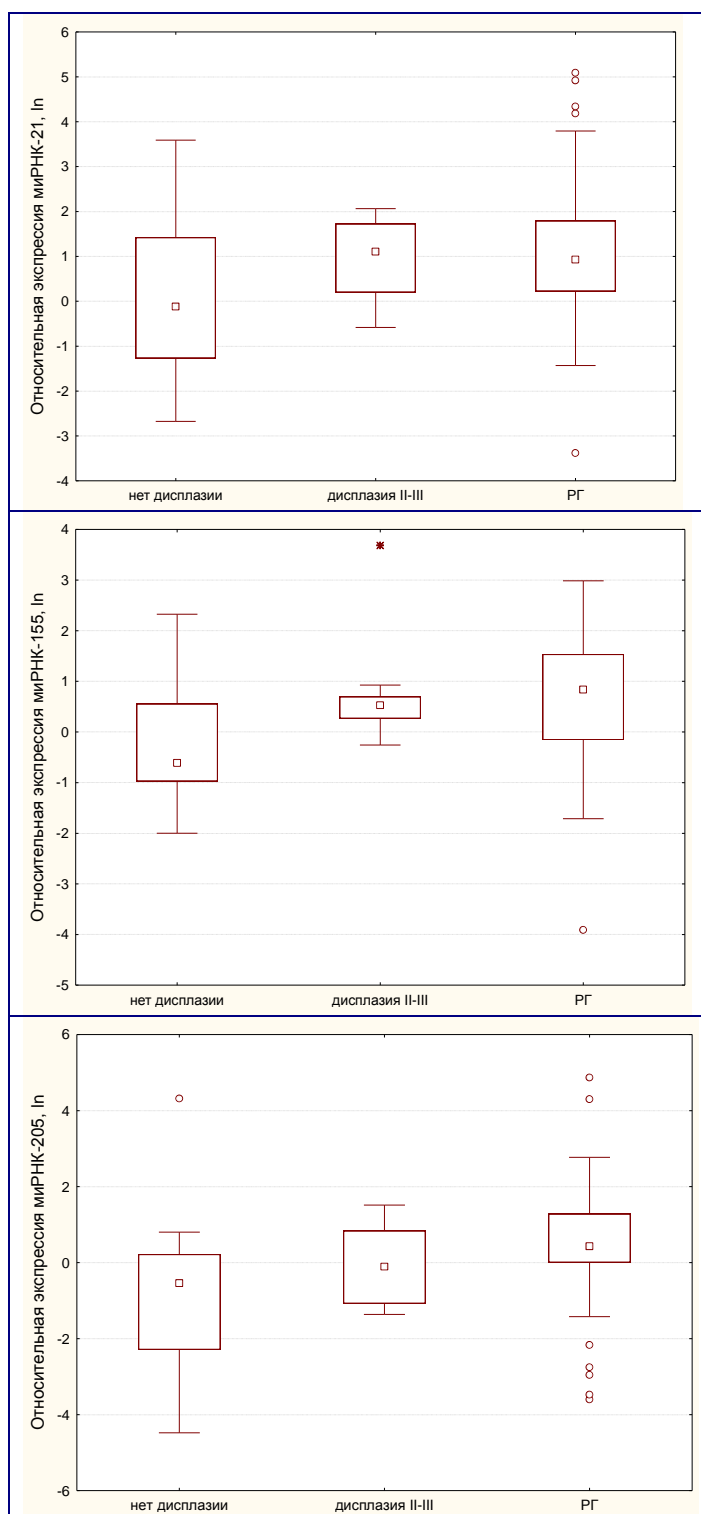


Рисунок 20 – Экспрессия микроРНК-21, -155 и -205 в группах пациентов с предопухолевыми заболеваниями и раком гортани. Примечание – группа лиц без дисплазии+ДІ, n=15; группа с ДІ+ДІІІ, n=10; больные раком гортани T1-2, n=46;  $\square$  Медиана 25%-75% Доверительный интервал Выбросы.



Таким образом, показано, что уровень экспрессии микроРНК-21, -155, а также -205 повышается по мере малигнизации процесса в ряду образцов «отсутствие дисплазии→дисплазия II→дисплазия III степени→рак гортани». Это свидетельствует об участии этих микроРНК в регуляции процессов, задействованных в канцерогенезе опухолей гортани, а положительные результаты по оценке риска развития патологии при учете частоты встречаемости случаев с гиперэкспрессией микроРНК-155 и 205 позволяет судить о предполагаемой диагностической ценности этих показателей.

Представленные выше данные свидетельствуют о том, что группа пациентов с предопухолевыми изменениями гетерогенна по паттерну экспрессии анализируемых микроРНК, а группа без диспластических изменений в достаточной мере обособлена. Для диагностики и/или уточнения диагноза особый интерес представляют группы больных с ДП-III и T<sub>1</sub> и перспектива разделения их по паттерну экспрессии микроРНК для определения точного диагноза пациента и снижения риска постановки ложноотрицательного результата при гистологическом анализе. Для оценки возможности использования показателя уровня экспрессии микроРНК в качестве критерия разделения выборки пациентов и подтверждения или уточнения заключения гистологического анализа проведено сравнение групп с дисплазиями II-III степени и больных с T<sub>1</sub>. Однако ни совокупное значение уровня экспрессии анализируемых микроРНК, определяемое дискриминантным анализом ( $F(8,7) = 0,31$   $p < 0,9380$ ), ни сравнение аналогичных показателей по каждой микроРНК в отдельности не выявил различий между этими подгруппами (табл. 24).

Таблица 24 – Уровень экспрессии микроРНК в патологически измененной ткани у больных ДП-III и пациентов с T1 стадией рака гортани.

| микроРНК   | ДП-III |            | T1 |            | p     | FDR, % |
|--|--------|------------|----|------------|-------|--------|
|  | N      | Mean±SE    | N  | Mean±SE    |       |        |
| -18a   | 10     | -0,11±0,18 | 7  | -0,13±0,16 | 0,924 | 128,8  |
| -21  | 10     | 1,04±0,28  | 8  | 0,07±0,60  | 0,161 | 95,2   |
| -155   | 10     | 0,74±0,35  | 8  | -0,04±0,65 | 0,303 | 69,6   |
| -200a  | 9      | -0,63±0,58 | 8  | -0,88±0,37 | 0,724 | 60,6   |
| -200c  | 10     | 0,24±0,44  | 8  | -0,41±0,34 | 0,261 | 78,2   |
| -205   | 10     | -0,02±0,32 | 8  | 0,41±0,15  | 0,238 | 86,0   |
| -221   | 10     | -1,22±0,79 | 8  | -0,56±0,50 | 0,489 | 82,7   |
| -494   | 10     | -0,01±0,45 | 8  | 0,24±0,30  | 0,645 | 92,4   |
| Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень экспрессии ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; значение нормы экспрессии соответствует 0 |        |            |    |            |       |        |

Полученные результаты согласуются с данными представленными в мировой литературе для микроРНК-21, -155 и -205, которые играют важные функциональные роли в развитии злокачественной патологии. Несмотря на отсутствие данных по исследованию тканевых образцов полученных от пациентов с диспластическими изменениями ткани гортани о роли этих микроРНК можно судить по экспериментам проведенным *in vitro*, на ксенографтных моделях либо на злокачественных опухолях (при сравнительной характеристике экспрессии относительно группы контроля). Показано, что микроРНК-21 принимает участие во многих ключевых процессах, которые позволяют нормальной клетке переродиться в опухолевую – это и регуляция клеточного цикла, апоптоза, клеточного роста и инвазии, пролиферации и ангиогенеза [Krichevsky A.M. G.G. 2009; Krutovskikh V.A. Z. Herceg 2010]. МикроРНК-155 в свою очередь может активировать клеточную пролиферацию, ингибировать апоптоз и ускорять рост опухоли [Chen D.et al., 2013]. Относительно же микроРНК-205 в литературе представлены противоречивые результаты: показана ее онкогенная роль, при регуляции генов принимающих участие в p14ARF пути [Childs G.et al., 2009], онкогена PTEN, что приводит к активации PI3K/Akt-сигнального пути [Qu C.et al., 2012], а также регуляции клеточной пролиферации, метастазирования и ангиогенеза [Xie H.et al., 2012] и онкосупрессорная роль путем подавления пролиферации при ЗНО (репрессируя гены *ErbB3*, *E2F1* и гены MAPK- и AR-сигнальных путей), а также препятствуя процессу эпителиально-мезенхимального перехода и подавляя инвазию (через репрессию генов *PKCε*, *ZEB1/2*, *MMP2* и *MMP9*, *VEGF-A*) [Qin W.et al., 2013]. Эти данные позволяют судить о сложной функциональной роли микроРНК-205, которая может зависеть от гистотипов опухоли, ее подтипов и микроокружения [Tian L.et al., 2014], а также этапа канцерогенеза и регулируемых ею генов-мишеней.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что пациенты с предопухолевой патологией составляют гетерогенную группу по клинкоморфологическим и молекулярно-генетическим показателям, в том числе и по паттерну экспрессии микроРНК. Некоторые микроРНК (в частности микроРНК-21, -155, 200с и -205) могут играть важную роль в канцерогенезе опухолей гортани, о чем свидетельствует повышение их экспрессии в ряду патологического состояния «отсутствие дисплазии→дисплазия II→дисплазия III степени». Причем для микроРНК-21, -155 и -205 эта тенденция сохраняется и при добавлении данных по группе «рак гортани». Получены обнадеживающие результаты относительно возможности разделения образцов предопухолевой патологии и раком гортани на основе определения совокупного паттерна экспрессии восьми анализируемых микроРНК. Вычислено, что частота случаев с

гиперэкспрессией микроРНК-205 и -155 выше при раке гортани, чем при предопухолевых патологиях, что позволяет говорить о перспективности дальнейших исследований данных микроРНК в плане оценки возможности их использования данного показателя для определения риска развития рака гортани.

### 3.4.1. Коэкспрессия микроРНК у больных раком гортани

Определение корреляционных связей aberrантной экспрессии определенных микроРНК в процессе канцерогенеза является одной из важнейших задач молекулярной онкологии, решение которой может осветить фундаментальные аспекты данного процесса и найти отражение в клинической практике. Важно отметить, что для микроРНК, как и многих молекулярных регуляторов клетки и организма в целом, характерно образование сложной системы взаимодействий друг с другом, что отмечают и многие авторы [De Craene B. G. Berx2013; Gurtan A.M. P.A. Sharp2013; Iorio M.V. C.M. Croce2009; Zhou J.-J.et al.,2014].

Результаты корреляционного анализа 46 образцов мужчин старше 45 лет с первичным раком гортани свидетельствуют о том, что между некоторыми микроРНК существует связь (рисунок 21).

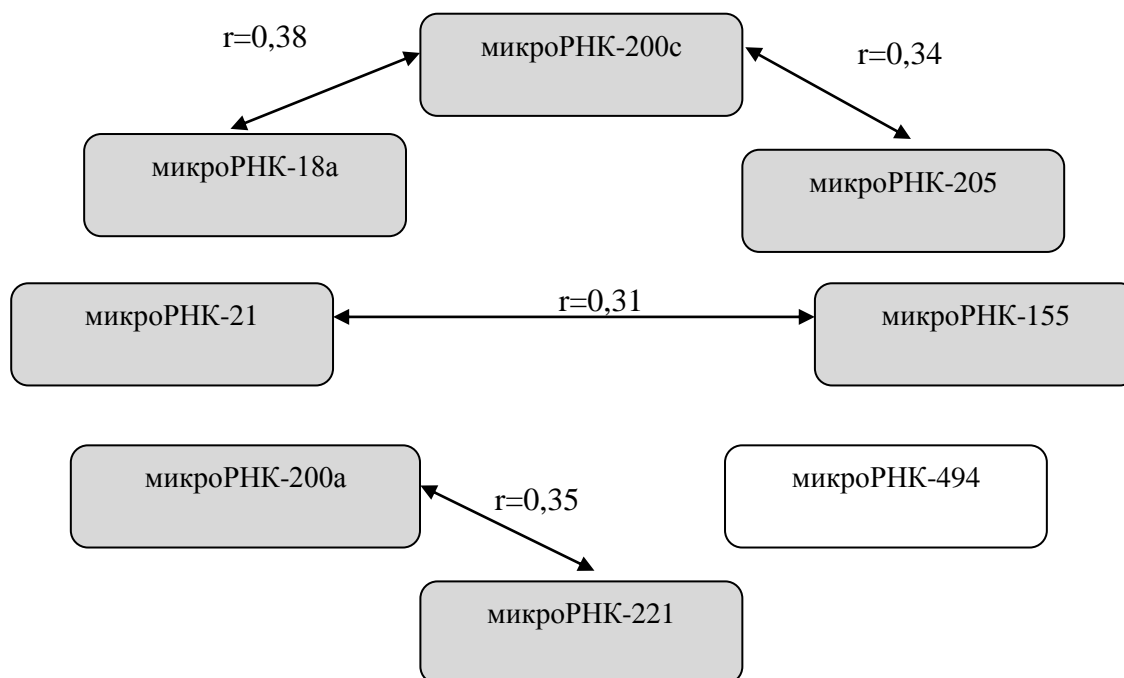


Рисунок 21 – Корреляционные взаимосвязи между показателями относительного уровня экспрессии изучаемых микроРНК в опухолевой ткани больных раком гортани.

Положительная корреляция отмечена для онкогенных микроРНК-21 и -155 ( $r=0,31$ ,  $p=0,00001$ ); микроРНК-200с и -18а ( $r=0,38$ ,  $p=0,001$ ), 200с и -205 ( $r=0,34$ ,  $p=0,025$ ), -200а и -221 ( $r=0,35$ ,  $p=0,021$ ), а также наблюдается тенденция положительной корреляции между микроРНК-21 и -200с ( $r=0,31$ ,  $p=0,036$ ), однако значение  $p$  не удовлетворяет 5% поправке FDR (рис. 21).

Полученные результаты говорят о наличии взаимосвязи между этими микроРНК, которая может быть основана на участии их в процессах внутриклеточной регуляции генов. Стратификация общей выборки на подгруппы согласно тому или иному показателю и корреляционный анализ в них позволяет отследить влияние клинико-патологических характеристик на формирование связей.

При стратификации группы пациентов по стадии распространенности опухолевого процесса выявлено, что у больных с  $T_{1-2}$  ( $n=21$ ) сохраняется положительная корреляция между микроРНК-21 и -155 причем она сильнее, чем в общей группе ( $r=0,81$ ,  $p=0,0001$ ). Также в этой группе лиц наблюдается тенденция корреляции между микроРНК-200а и -200с ( $r=-0,45$ ,  $p=0,041$ ) и микроРНК-18а и -221 ( $r=0,47$ ,  $p=0,039$ ), значения  $p$  которых не удовлетворяют 5% поправке FDR (рис. 22).

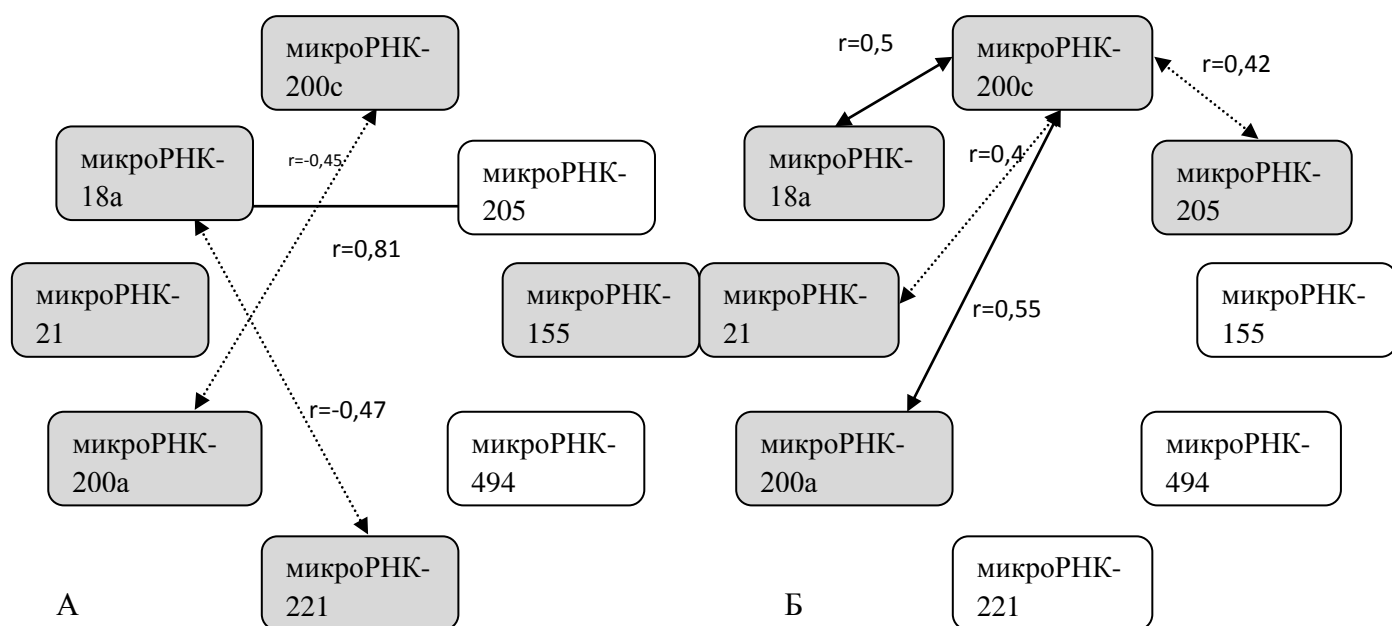


Рисунок 22 – Корреляционные взаимосвязи между показателями относительного уровня экспрессии изучаемых микроРНК больных раком гортани с 1-2 (А) и 3-4 (Б) стадиями распространенности опухолевого процесса.

У больных с  $T_{3-4}$  стадиями распространенности опухолевого процесса ( $n=25$ ) обнаружена положительная связь между экспрессией микроРНК-200а и -200с ( $r=0,55$ ,  $p=0,04$ ), которая в силу противоположности знака показателя корреляции нивелируется в общей группе пациентов. Показана положительная корреляция между микроРНК-18а и -

200с ( $r=0,50$ ,  $p=0,01$ ), а также на уровне тенденции – между микроРНК-200с и -205 ( $r=0,42$ ,  $p=0,041$ ), микроРНК-21 и -200с ( $r=0,40$ ,  $p=0,044$ ).

В подгруппе пациентов без лимфогенных метастаз ( $n=36$ ) картина корреляционных взаимосвязей повторяет таковую и в общей группе (коррелируют между собой микроРНК-21 и -155,  $r=0,63$ ,  $p=0,0001$ ; микроРНК-18а и -200с,  $r=0,38$ ,  $p=0,024$ ; микроРНК-200с и -205,  $r=0,36$ ,  $p=0,038$ ; микроРНК-200а и -221,  $r=0,38$ ,  $p=0,029$ ), с добавлением двух новых взаимосвязей – микроРНК-200а и -200с ( $r=-0,42$ ,  $p=0,012$ ) и микроРНК-18а и -221 ( $r=0,51$ ,  $p=0,002$ ) (рис. 23А). Причем в подгруппе лиц с зафиксированным 1 или более лимфогенных метастазов ( $n=8$ ) наблюдается лишь 1 значимая связь – микроРНК-18а и -221 ( $r=0,77$ ,  $p=0,042$ ), которая в силу противоположности знака показателя корреляции нивелируется в общей группе пациентов (рис. 23Б).

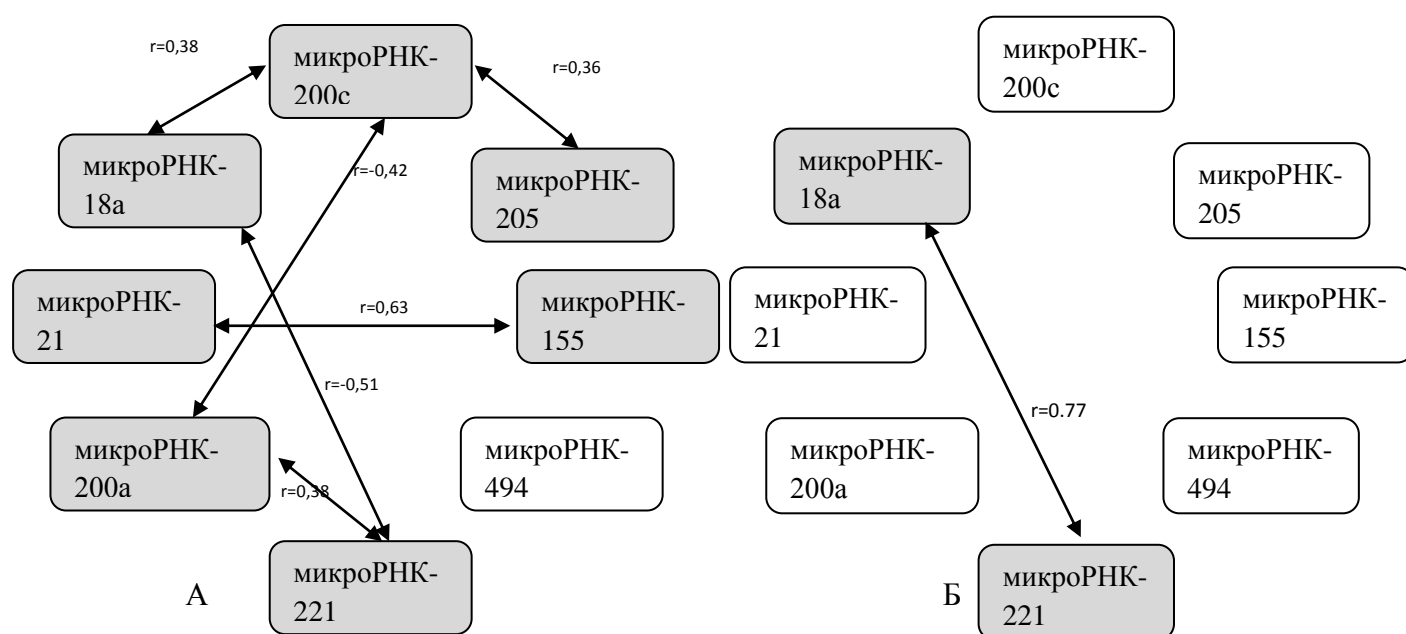


Рисунок 23 – Корреляционные взаимосвязи между показателями относительного уровня экспрессии изучаемых микроРНК больных РГ без метастазирования (А) и пациентов с регионарными метастазами (Б).

Интересно отметить, что у папилломавирус-негативных пациентов ( $n=40$ ) сохраняется лишь 1 значимая связь (между микроРНК-21 и -155,  $r=0,55$ ,  $p=0,0001$ ), в то время как между микроРНК-18а и 200с, микроРНК-200с и -205, микроРНК-200а и -211 корреляция обнаружена на уровне тенденции ( $r=0,37$ ,  $p=0,09$ ,  $r=0,37$ ,  $p=0,022$ ,  $r=0,35$ ,  $p=0,033$ , соответственно), т.е. значения  $p$  для них не преодолевают 5% поправки FDR (рис. 24А). В группе же вирус-позитивных больных значимых корреляционных связей не выявлено, что может быть связано с малочисленностью выборки ( $n=6$ ),

но показана связь между микроРНК-21 и -155, микроРНК-200а и 221, микроРНК-221 и -494 на уровне тенденции ( $r=0,87$ ,  $p=0,026$ ,  $r=0,82$ ,  $p=0,045$ ,  $r=-0,88$ ,  $p=0,048$ , соответственно) (рис. 24Б).

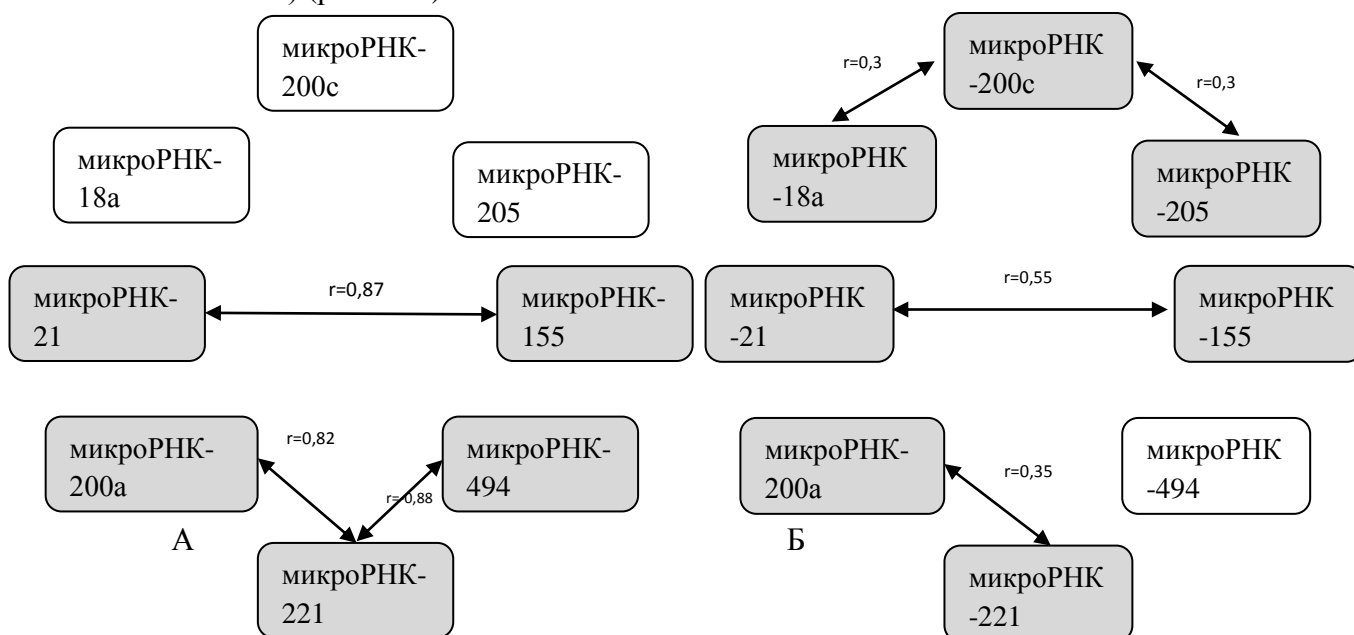


Рисунок 24 – Корреляционные взаимосвязи между показателями относительного уровня экспрессии изучаемых микроРНК вирус-положительных больных РГ (А) и вирус-негативных пациентов (Б).

Известно, что микроРНК участвуют в регуляции генов посредством присоединения к ним по принципу комплементарности, причем микроРНК могут действовать совместно при регуляции конкретных мишеней или групп генов, вовлеченных в схожие клеточные процессы [Xu J.et al., 2011]. Например, Hu et al (2011) в своей работе показали, что использование именно коктейля предшественников микроРНК-21, -24 и -221 повышает эффективность приживления трансплантируемых сердечных клеток-предшественников [Hu S.et al., 2011]. Zhu et al. (2013) продемонстрировали, что микроРНК-21 и -221 совместно регулируют 56 генов [Zhu W.et al.,2013].

Наиболее сильная и четко прослеживаемая в общей выборке и подгруппах связь выявлена для микроРНК-21 и -155, которой не обнаружено только у больных с  $T_{3-4}$  и лиц с лимфогенными метастазами. Для микроРНК-155 показано участие в регуляции сигнального пути JAK-STAT, механизм, непосредственно задействованный в регуляции иммунной системы. Повышение экспрессии микроРНК-155 приводит к гиперэкспрессии гена сигнального белка и активатора транскрипции из семейства белков STAT (STAT3), через репрессию ингибитора этого гена *SOC31*. Интересно отметить, что микроРНК-21 контролируется энхансером, содержащим 2 сайта связывания гена *STAT3*, а гиперэкспрессия микроРНК-21 в свою очередь повышает онкогенный потенциал самого гена *STAT3* [Löffler D.et al.,2007].

Еще одним возможным объяснением корреляционной связи микроРНК-21 и -155 является их участие в репрограммировании клетки, процессе, позволяющем ей переходить на путь дедифференцировки и приобретать фенотип плюрипотентной клетки. Описаны 3 этапа клеточного репрограммирования: инициация, переходный период и созревание клетки [Yang C.-S. T.M. Rana2012], в которых происходит ряд молекулярно-генетических событий затрагивающих, в том числе, и микроРНК. Так, показано отрицательное влияние транскрипционного фактора *c-Myc* на активацию микроРНК-21 на первом этапе репрограммирования. Ингибирование микроРНК-21, а также микроРНК-29а, приводит к снижению «барьера» репрограммирования, что позволяет клетке запустить этот процесс [Yang C.-S. et al., 2011]. Во время второго этапа репрограммирования, мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП), в работу включаются микроРНК-10b [Ma L. et al., 2007], -155 [Kong W. et al., 2008] и противоположные им по действию микроРНК-205 [Gregory P.A. et al., 2008; Wiklund E.D. et al., 2011] и семейство микроРНК-200 [Chen J. et al., 2012], для которых также выявлена корреляционная связь ( $r=0,34$ ). МикроРНК-155 участвует в формировании мезенхимального фенотипа [Kong W. et al., 2008], в то время как микроРНК-205 и малые молекулы семейства микроРНК-200 участвуют в регуляции формирования эпителиального фенотипа [Chen J. et al., 2012; Gregory P.A. et al., 2008; Wiklund E.D. et al., 2011]. Эти процессы происходят при непосредственном участии гена *c-Myc*. Причем для микроРНК-155 выявлена двойственная роль в регулировании мезенхимально-эпителиального перехода, в зависимости от микроокружения опухоли [Xiang X. et al., 2011]. Для микроРНК кластера **-17/92** (членом которого является анализируемая нами микроРНК-**18a**) также показана активирующая роль в репрограммировании клетки, посредством регуляции этими микроРНК генов *Tgfb $\beta$ 2* и *p21* [Li Z. et al., 2011].

Согласно данным литературы репрограммирующий фактор *c-Myc* может влиять на активацию и микроРНК-200с и -18a [Concepcion C.P. et al., 2012]. В нормальной, а также в патологически измененной ткани, микроРНК кластера -17/92 участвуют в регуляции клеточного роста посредством подавления экспрессии генов, задействованных в основных путях регуляции этого процесса, включая пути с участием *c-Myc/Rb/E2F* генов [Gurtan A.M. P.A. Sharp 2013]. Подавление транскрипционной активности микроРНК-200с фактором *c-Myc* также приводит к активации роста клеток, повышению их инвазивной активности и запуску эпителиально-мезенхимального перехода. Вышеперечисленные последствия влияния гена *c-Myc* связаны с канцерогенезом и наиболее вероятно имеют место быть при малигнизации клеток при раке гортани.

Несмотря на то, что микроРНК-200 представляют одно семейство, микроРНК-200a и -200c отнесены к разным подсемействам или кластерам и располагаются на разных хромосомах [Feng X.et al., 2014], что возможно накладывает отпечаток на корреляционные взаимосвязи между этими и другими микроРНК, анализируемыми в данной работе. Выявлено, что у лиц с T<sub>1-2</sub> микроРНК-200a отрицательно коррелирует с микроРНК-200c,  $r=-0,31$ , в то время как у больных с поздними стадиями – корреляционная взаимосвязь положительна,  $r=0,55$ . Также показано, что микроРНК-200c коррелирует с -18a, -205; микроРНК-200a – с микроРНК-221. МикроРНК-200c и -205 объединяет тот факт, что обе они играют определенную роль в регуляции клеточного цикла [Krichevsky A.M. G.G.2009; Uhlmann S.et al., 2010; Wu H.et al., 2009], а также в эпителиально-мезенхимальном переходе и процессе приобретения клеткой эмбрионального фенотипа, посредством прямой (для микроРНК-200c) и через посредника (для микроРНК-205) регуляции экспрессии генов *ZEB1* и *ZEB2* [Feng X.et al., 2014].

Для микроРНК-221 выявлена отрицательная зависимость между уровнем её экспрессии и геном *p27Kip1* [Di Martino M.T.et al.,2013; le Sage C.et al.,2007; Pineau P.et al., 2010], который играет существенную роль в регуляции перехода от G1 к S-фазе клеточного цикла [Li W.et al., 2006] . Участие в регуляции данного процесса, а также положительная корреляционная зависимость между геном *p27Kip1* отмечена и для микроРНК-200a [Valencia-Sanchez M.A.et al., 2006]. Так, Valencia-Sanchez M.A. (2006) показали, что гиперэкспрессия микроРНК-200a/141 ведет к клеточному аресту, что может быть связано с повышенным уровнем экспрессии *p27Kip1*. Это позволяет предположить, что подавление микроРНК-200a ведет к запуску клеточной программы. Причем действие микроРНК-200a и -200c в данной ситуации отмечено как разнонаправленное [Valencia-Sanchez M.A.et al., 2006].

### **3.4.2. Коэкспрессия микроРНК у больных с предопухолевыми патологиями гортани**

Для гетерогенной группы пациентов с предопухолевыми изменениями ткани гортани также выявлена сложная сеть положительной корреляционной связи между микроРНК, а именно: микроРНК-21 и -155, -494 ( $r=0,60$ ,  $p=0,001$ ;  $r=0,42$ ,  $p=0,036$ , соответственно), микроРНК-155 и -494 ( $r=0,55$ ,  $p=0,005$ ), микроРНК-200c и -205, -494 ( $r=0,60$ ,  $p=0,001$ ;  $r=0,55$ ,  $p=0,005$ ), микроРНК-494 и -205 ( $r=0,51$ ,  $p=0,009$ ), а также микроРНК-200c и -494 ( $r=0,40$ ,  $p=0,046$ , однако значение  $p$  не удовлетворяет поправке FDR) (рис. 25).



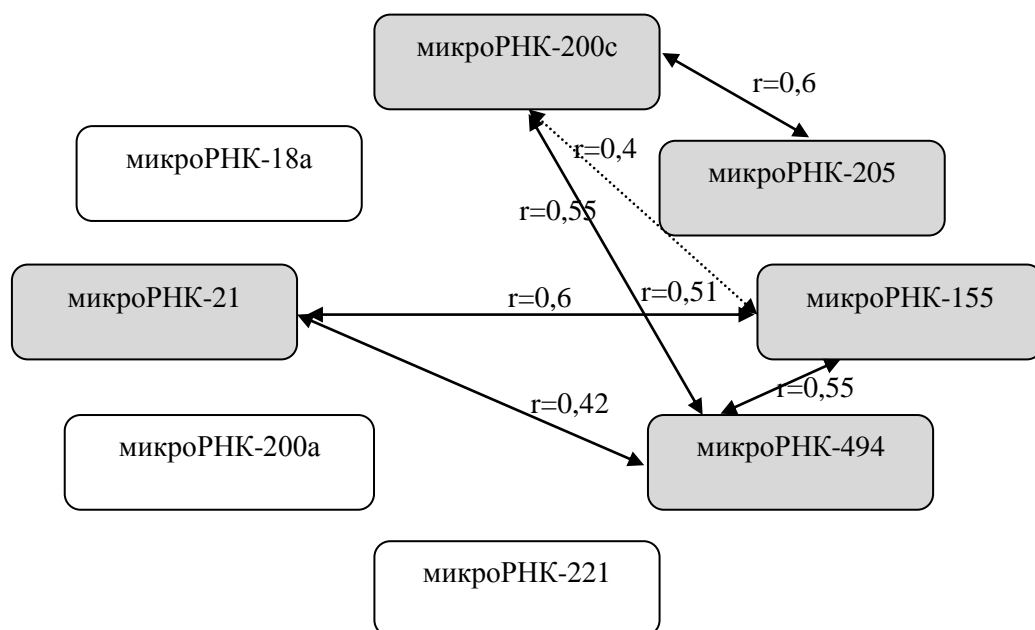


Рисунок 25 – Схема коэкспрессии микроРНК в ткани больных с предопухолевыми изменениями гортани.

Интересно отметить, что корреляционный анализ подгрупп пациентов согласно диагнозу показал, что у больных без дисплазий или с дисплазиями I степени ( $n=15$ ) сохраняются связи между микроРНК-21 и -155, -494 ( $r=0,63$ ,  $p=0,011$ ,  $r=0,56$ ,  $p=0,028$ , соответственно), между микроРНК-200с и -205, -494 ( $r=0,74$ ,  $p=0,002$ ,  $r=0,57$ ,  $p=0,025$ , соответственно) и между микроРНК-155 и -494 ( $r=0,62$ ,  $p=0,014$ ), а также обнаруживается новая взаимосвязь между микроРНК-21 и -221 ( $r=0,60$ ,  $p=0,019$ ) (рис. 26А). У пациентов же с дисплазиями средней и тяжелой степени ( $n=10$ ) выявлена корреляция между показателями уровня экспрессии только микроРНК-200с и -155 ( $r=0,88$ ,  $p=0,001$ ) (рис. 26Б).

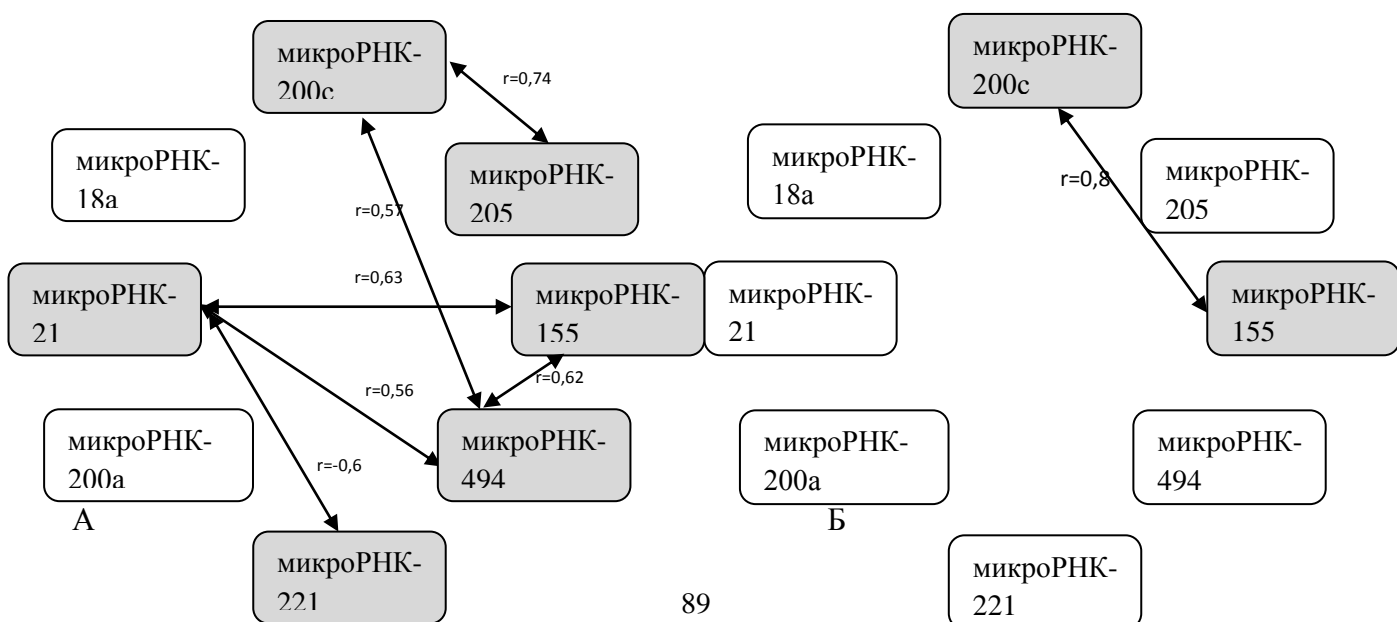


Рисунок 26 – Схема коэкспрессии микроРНК в ткани больных без дисплазии-ДІ (А) и ДІ-ІІІ (Б).

Анализ корреляционных связей в группе пациентов с предопухолевыми патологиями выявил как схожие, так и отличные схемы взаимодействия между анализируемыми микроРНК в сравнении с группой больных раком гортани. В обеих группах отслеживается корреляция между онкогенными микроРНК-21 и -155, для которых было показано повышение уровня экспрессии по мере утяжеления диагноза и гиперэкспрессия при РГ. Показана положительная корреляционная связь в обеих группах между микроРНК-200с и -205, для которых также прослеживается тенденция к повышению экспрессии от «отсутствие дисплазии» к тяжелой степени дисплазии у пациентов с предопухолевыми патологиями и от T<sub>1-2</sub> к T<sub>3-4</sub> у больных раком гортани. Учитывая вовлеченность этих микроРНК в регуляцию многих генов, задействованных в канцерогенезе, что было описано выше, полученный результат позволяет судить о важной роли этих микроРНК в трансформации клеток, аберрантная экспрессия которых фиксируется уже на ранних этапах малигнизации. Полученные данные позволяют предположить, что регуляция клеточных процессов осуществляется не одиночными участниками, но системой взаимодействующих микроРНК, мишенями которых зачастую являются одни и те же гены.

В группе лиц с предопухолевой патологией обнаружены и новые, не характерные для больных ЗНО гортани, корреляционные взаимодействия. В частности, показана положительная корреляция между показателями уровня экспрессии микроРНК-494 и -21, -200с, -205, -155 ( $r=0,42$ ,  $p=0,036$ ,  $r=0,55$ ,  $p=0,005$   $r=0,51$ ,  $p=0,009$   $r=0,55$ ,  $p=0,005$ , соответственно), а также выявлена тенденция корреляции между микроРНК-200с и -155 ( $r=0,40$ ,  $p=0,046$ ; но значение  $p$  не удовлетворяет поправке FDR). Таким образом, можно отметить, что у пациентов с дисплазиями микроРНК-494, взаимодействуя с несколькими микроРНК, играет определенную роль на начальных этапах канцерогенеза. Известно, что эта микроРНК-494 локализована в хромосоме 14q32.31, участке который зачастую делетирован в опухолях головы и шеи [Lee D.J.et al., 1997], хотя данные относительно изменений экспрессии этой микроРНК в опухолевой ткани противоречивы. Chang S.S. et al (2008) показали ее гиперэкспрессию в опухолевой ткани пациентов с опухолями головы и шеи в сравнении с нормальной тканью [Chang S.S.et al., 2008]. Однако Libório-Kimura T.N. et al (2015) выявили гипоекспрессию этой микроРНК в опухолях ротовой полости, показав также повышенную экспрессию ее гена-мишени *HOXA10* (homeobox gene A10) в тех же образцах ткани [Libório-Kimura T.N.et al., 2015]. Функциональные исследования

выполненные на образцах рака языка позволили продемонстрировать, что ингибирование гена *HOXA10* в значительной степени влияет на снижение клеточной пролиферации, опосредованной геном *p21* [Carrera M.et al.,2014]. На модели клеточных линий выявлено, что микроРНК-494 участвует в регуляции клеточного роста [Chang S.S.et al., 2008]. При раке бронхов показана роль микроРНК-494 в регуляции *PTEN*, выступая в роли онкогена [Duan H.et al., 2010] и способствует повышению активности гена *Akt* [Liu Y.et al., 2012], хотя при раке желудка эта микроРНК функционирует как анти-онкоген, подавляя экспрессию гена *c-Myc* [He W.et al.,2014].

Учитывая данные, представленные в литературе, для анализируемых микроРНК отмечено участие их в регуляции многих ключевых процессов в клетке, задействованных в канцерогенезе, опухолевой прогрессии и других процессах связанных с онкогенезом. Таким образом, полученные данные позволяют отметить наличие связи между некоторыми из микроРНК, в основе которых лежит участие их в регуляции экспрессии определенных генов или процессов.

### **3.5.1. Определение паттерна экспрессии микроРНК в ткани и слюне пациентов**

После открытия в 1993 году нового класса малых молекул, которые назвали микроРНК, интерес к ним развивался как снежная лавина. Ученых все больше и больше заинтересовывали различные аспекты и функционирования микроРНК, и их роли в жизнедеятельности клетки, и возможности использования их для диагностических и терапевтических целей, и, в рамках этих задач, возможности использования их для мало- и неинвазивной диагностики. Обнаружение внеклеточных РНК в слюне открыло для ученых новое поле возможностей и зародило интерес к исследованиям природы, происхождения и биологических качеств РНК слюны [Park N.J.et al.,2006; Zhang L.et al., 2010], в том числе и микроРНК [Langevin S.M.et al., 2010; Li Y.et al.,2004; Park N.J.et al., 2009]. Благодаря значительному количеству исследований посвященных диагностике по слюне в настоящее время в литературе даже вошел в обиход термин «salivaomics» [Yan W.et al., 2008]. Однако же в мировой литературе исследований посвященных проблеме канцерогенеза и прогностической ценности использования микроРНК слюны при злокачественных опухолях крайне ограничено.

Показано, что микроРНК присутствует в стабильной форме в общей фракции слюны и ее супернатанте [Park N.J.et al., 2009]. В своей же работе, дабы исключить влияние внутриклеточных микроРНК, мы использовали безклеточный супернатант слюны пациентов.

Для оценки возможности использования для диагностики биоматериала полученного неинвазивным путем было проанализировано 23 образца слюны полученной от пациентов с патологиями гортани. При использовании выбранных нами методик по выделению РНК и количественному анализу 8 микроРНК обнаружено, что при использовании этого типа биоматериала результат стабильно фиксируется для всех микроРНК, кроме микроРНК-494, для которой уровень определялся только в 33% случаев. В связи с полученным результатом для проведения анализа в слюне были выбраны только 7 микроРНК, а именно микроРНК-18а, -21, -155, -200а, -200с, -205, -221. Авторы работающие в данной области исследований отмечают, что, несмотря на широкий спектр микроРНК представленных в слюне, их профиль все же ограничен в сравнение с профилем микроРНК экспрессирующихся в ткани [Bahn J.H.et al.,2015].

Для определения внутренней структуры данных и анализа связи между уровнем микроРНК и клинико-патологическими характеристиками пациентов с патологиями гортани проведен двублоковый PLS-анализ и дискриминантный анализ данных, которые позволили выявить целостную картину изменения уровня анализируемых микроРНК.

Двублоковый PLS-анализ по сопоставлению данных клинико-патологических параметров (пол, возраст, T и N) и суммарному уровню семи микроРНК проведенного на 16 образцах слюны пациентов с диагнозом рак гортани показал тенденцию к стратификации анализируемых образцов согласно возрасту (рис. 27), как это было показано и на образцах ткани. Так, самые крайние точки на графике соответствуют образцам полученным от лиц моложе 45 лет (3 из 3 случаев) и больным старше 65 лет (2 из 2 случаев). Однако в силу ограниченного числа анализируемых образцов, исключить выпадающие из общей картины, не представилось возможным, поэтому для дальнейшего анализа использована общая группа больных.

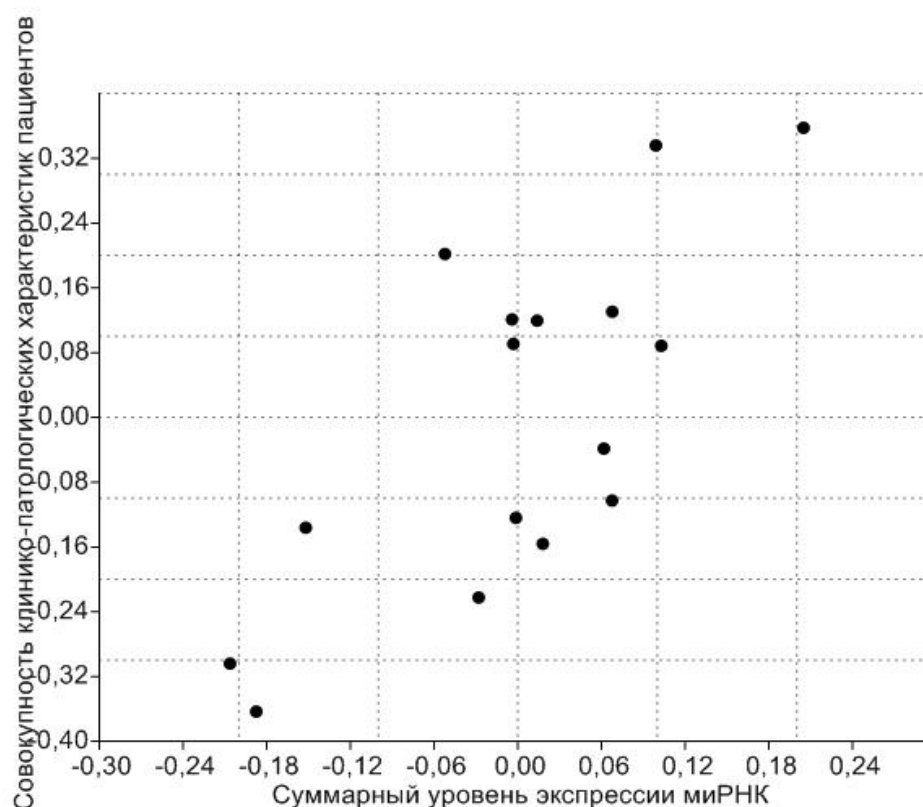


Рисунок 27 – Результат двублокового PLS-анализа. Примечание – каждой точке соответствует один анализируемый образец с учетом информации о клинико-патологических параметрах (ось Y) и уровня микроРНК-18а, -21, -155, -200а, -200с, -205, -221 (ось X).

В силу малочисленности подгрупп не представилось возможности проанализировать влияние половозрастной компоненты на уровень микроРНК в слюне, однако проведена оценка влияния стадии распространенности опухолевого процесса. Дискриминантный анализ уровня семи микроРНК не показал различий в зависимости от стадии распространенности опухолевого процесса ( $F(21,9) = 0,94, p < 0,5736$ ). Не выявлено значимых различий в уровне отдельных микроРНК между подгруппами пациентов с  $T_{1-2}$  и  $T_{3-4}$  стадиями (табл. 25), однако для микроРНК-200а наблюдается тенденция к понижению экспрессии во второй группе (7vs8,  $p = 0,033$ ), хотя значение не удовлетворяет 5% поправке FDR.

Таблица 25 – Уровень микроРНК в слюне пациентов с РГ в зависимости от стадии распространенности опухолевого процесса.

| микроРНК | $T_{1-2}$ |            | $T_{3-4}$ |            | P     | FDR, % |
|----------|-----------|------------|-----------|------------|-------|--------|
|          | N         | Mean±SE    | N         | Mean±SE    |       |        |
| -18a     | 7         | -3,49±0,57 | 7         | -2,47±0,92 | 0,256 | 89,90  |
| -21      | 7         | -1,97±0,52 | 9         | -0,72±0,45 | 0,354 | 82,60  |
| -155     | 7         | -1,74±0,50 | 9         | -1,37±0,34 | 0,865 | 86,54  |

|   |   |            |   |            |       |       |
|---|---|------------|---|------------|-------|-------|
| -200a   | 7 | -0,02±1,02 | 8 | -2,76±0,64 | 0,033 | 23,50 |
| -200с   | 7 | 0,13±0,53  | 9 | 0,53±0,38  | 0,814 | 94,97 |
| -205  | 7 | -1,66±0,56 | 9 | -1,30±0,56 | 0,552 | 96,65 |
| -221  | 7 | -3,95±0,29 | 8 | -3,53±0,50 | 0,704 | 98,62 |
| Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; значение нормы уровня соответствует 0 |   |            |   |            |       |       |

Дискриминантный анализ уровня экспрессии 7 микроРНК не выявил значимых различий между подгруппами пациентов с лимфогенным метастазированием и без. Однако применение подхода пошаговой дискриминации позволило определить три микроРНК, которые играют существенную роль в формировании специфичной картины экспрессии для каждой из анализируемых подгрупп. Таким образом, дискриминантный анализ по микроРНК-21, -18a и -205 показал значимую разницу в их экспрессии между подгруппами лиц без метастазов против подгруппы с лимфогенным метастазированием ( $F(3,10) = 6,01$ ,  $p < 0,0131$ , рис. 28a). Получены весьма обнадеживающие показатели чувствительности и специфичности данного подхода, показатели которых составили 100% и 80%, соответственно. При обработке данных методом визуализации NovaSpark, также выявлено, что на 2D-модели представления данных по совокупному значению экспрессии микроРНК-21, -18a и -205 образцы полученные от пациентов с метастазами и без располагаются в двух непересекающихся областях, что позволяет однозначно разделить сравниваемые нами подгруппы (рис. 28б). Полученные нами результаты позволяют судить о перспективности использования подобных подходов (дискриминантный анализ и визуализация данных в программе NovaSpark) для уточнения диагноза, однако стоит отметить, что данные получены на небольшой выборке и требуют уточнения и верификации.

Для микроРНК-21 также выявлено значимое повышение уровня в образцах полученных из слюны пациентов с метастазами в сравнении с подгруппой лиц без регионарного метастазирования (12vs4,  $p=0,001$ ) (табл. 26).

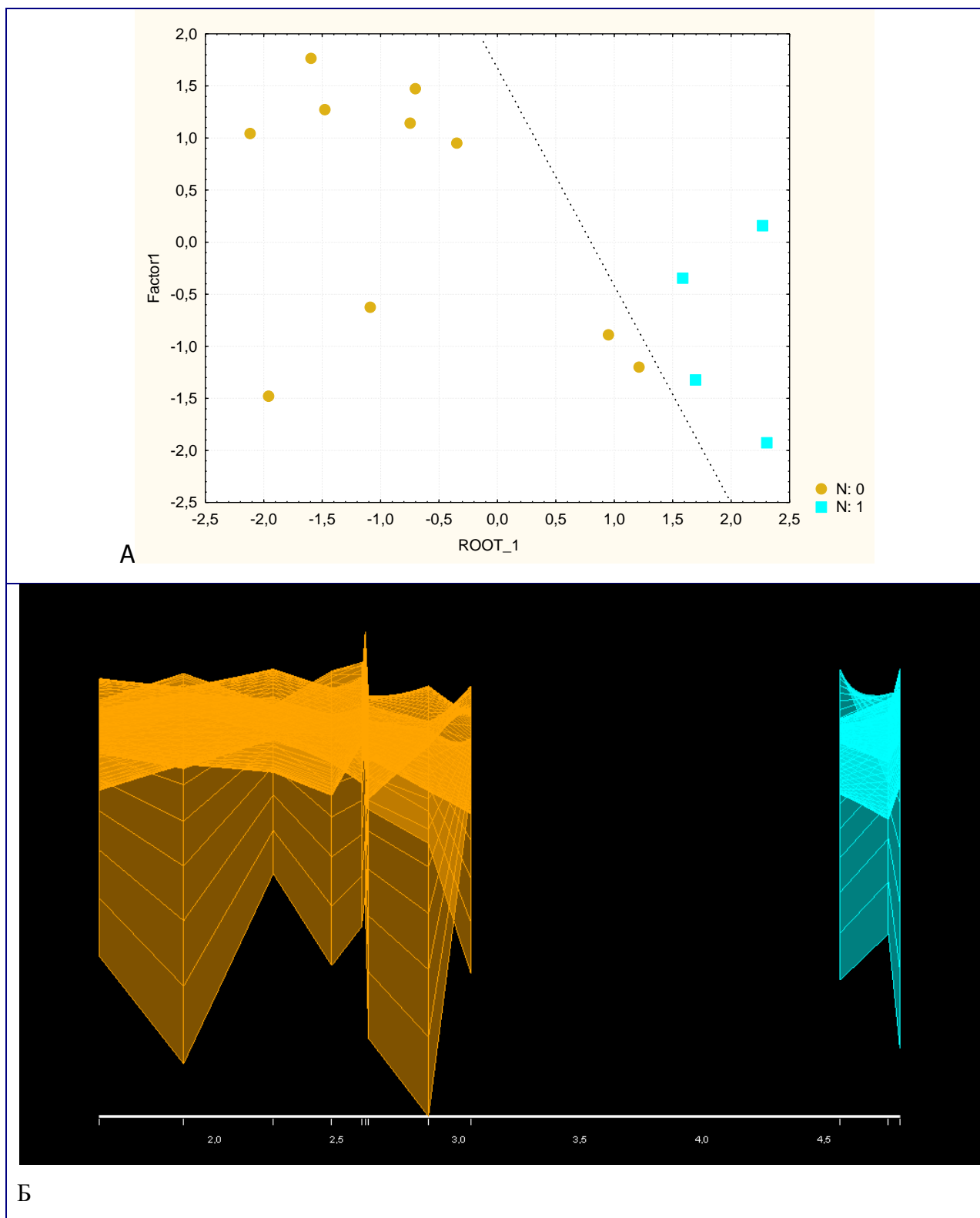


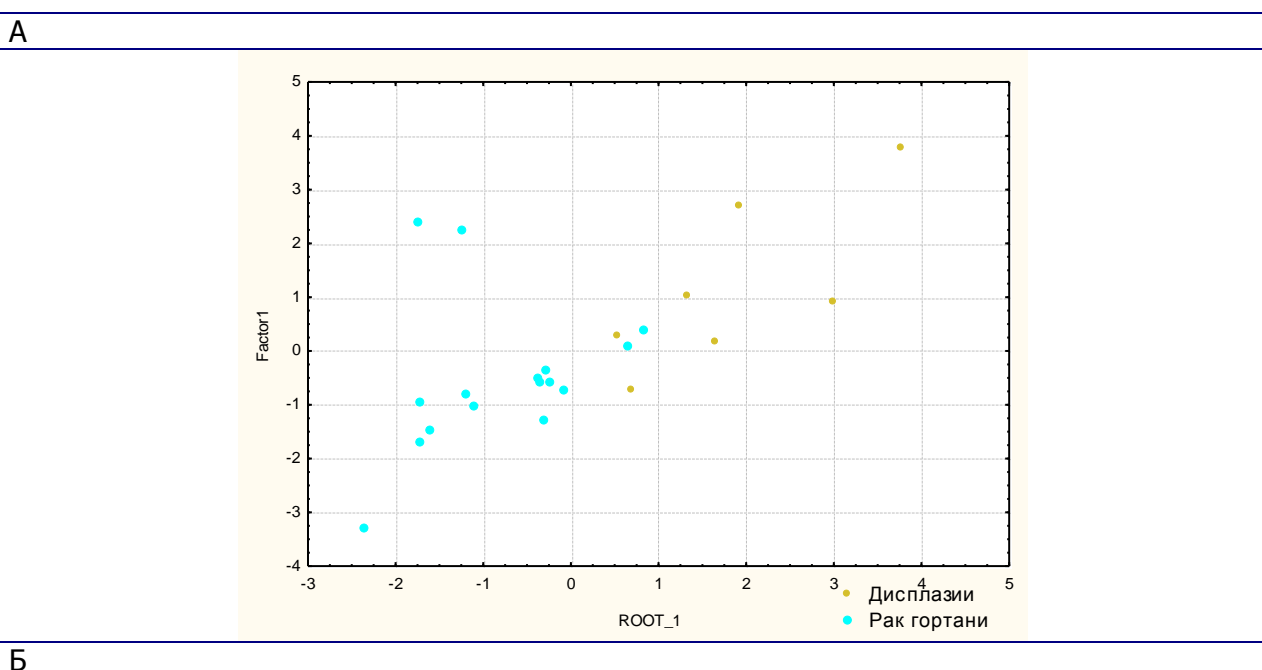
Рисунок 28 – Графическое отображение данных по уровню анализируемых микроРНК в слюне в зависимости от лимфогенного метастазирования. Примечание – А: по осям X и Y в виде ROOT-1 и Factor1, представлены результаты дискриминантного анализа в виде условных значений по уровню микроРНК-18a, -21, -205 в зависимости от лимфогенного метастазирования. Точками и квадратами обозначены пациенты без метастазов и с лимфогенными метастазами, соответственно; Б: 2D-модель представления данных по экспрессии микроРНК в зависимости от лимфогенного метастазирования. Оранжевый и голубой цвета соответствуют образцам, полученным от пациентов без метастазов и с лимфогенными метастазами, соответственно.

Таблица 26 – Уровень микроРНК в слюне пациентов с РГ в зависимости от метастазирования.

| микроРНК | N0 |            | N1-2 |            | p     | FDR, % |
|----------|----|------------|------|------------|-------|--------|
|          | N  | Mean±SE    | N    | Mean±SE    |       |        |
| -18a     | 10 | -2,60±0,69 | 4    | -3,92±0,66 | 0,146 | 34,2   |
| -21      | 12 | -1,53±0,46 | 4    | -0,47±0,28 | 0,001 | 0,72   |
| -155     | 12 | -1,60±0,37 | 4    | -1,32±0,25 | 0,170 | 29,8   |
| -200a    | 11 | -0,90±0,79 | 4    | -3,09±1,02 | 0,116 | 40,7   |
| -200c    | 12 | 0,35±0,38  | 4    | 0,37±0,55  | 0,523 | 73,3   |
| -205     | 12 | -1,38±0,49 | 4    | -1,68±0,56 | 0,710 | 82,8   |
| -221     | 11 | -3,65±0,36 | 4    | -3,95±0,59 | 0,841 | 84,1   |

Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; значение нормы уровня соответствует 0

Проведен сравнительный анализ изменения уровня микроРНК в группе лиц с предопухолевой патологией и раком гортани. Дискриминантный анализ данных по уровню 7 микроРНК позволил выявить значимое различие в показателях между пациентами с предраковыми изменениями и раком гортани ( $F(21,29) = 5,55$ ,  $p < 0,0033$ , рис. 29а), причем участие в стратификации образцов принимают все семь микроРНК. Рассчитанные показатели чувствительности и специфичности этого теста составили 71% и 93%, соответственно. Визуализация результатов в программе NovaSpark, показала, что на 2D-модели представления данных по совокупному значению уровня анализируемых микроРНК, образцы полученные от пациентов с предопухолевой патологией и раком гортани имеют тенденцию к группировке согласно верифицированным диагнозам (рис. 29б).





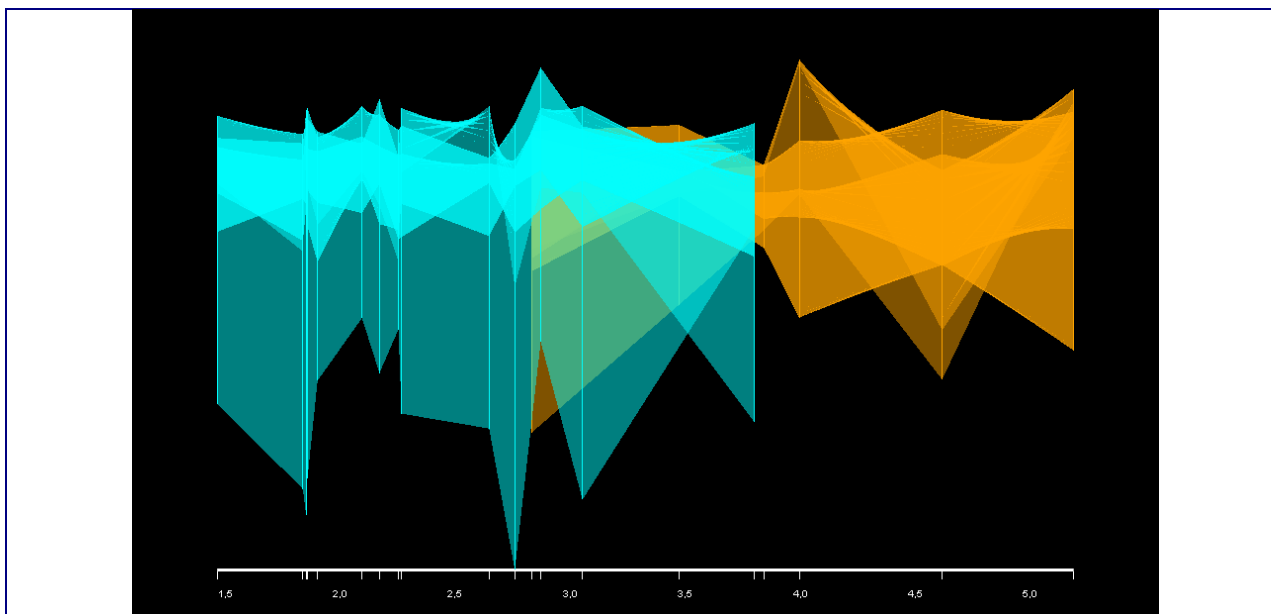


Рисунок 29 – Уровень 7 микроРНК в слюне в зависимости от диагноза. Примечание – А: по осям X и Y в виде ROOT-1 и Factor-1, представлены результаты дискриминантного анализа в виде условных значений по уровню микроРНК- микроРНК-18а, -21, -155, -200а, -200с, -205 и -221, в зависимости от диагноза. Б: 2D-модель представления данных по уровню микроРНК в зависимости от диагноза. Оранжевый и голубой цвета соответствуют образцам, полученным от пациентов с дисплазиями и раком гортани, соответственно.

Показано достоверное различие в уровне некоторых отдельных микроРНК в слюне пациентов в зависимости от диагноза. Так, у пациентов с предраковой патологией в слюне обнаружен повышенный уровень микроРНК-21 и -200с в сравнение с группой пациентов с диагнозом рака гортани (7vs16,  $p=0,011$ , 7vs16,  $p=0,0061$ , соответственно, табл. 28). Более того, при сравнении подгрупп лиц с дисплазией II-III степени и пациентов с 1-2 стадией рака статистическая значимость значений уровня сохраняется, что говорит в пользу возможности использования этого параметра в слюне для уточнения диагноза в дополнение к основным диагностическим методам. К сожалению, в литературе данных по изменению уровня микроРНК-18а, -21, -155, -200а, -200с, -205, -221. в слюне не представлено. Однако N.J. Park et al (2009) в своей работе приводят результаты о специфичности уровня микроРНК-31, -200а и -125а в слюне, собранной от пациентов с диагнозом рака ротовой полости в сравнении с аналогичным показателям у здоровых доноров [Park N.J.et al., 2009]. Yang et al. (2013) на группе пациентов с прогрессирующей и не прогрессирующей лейкоплакиями выявили специфичный паттерн микроРНК для каждой из подгрупп [Yang Y.et al., 2013]. Авторы выявили повышенный уровень микроРНК-197, -let-7, -99а/б, -126 и -145 в подгруппе пациентов с не прогрессирующей патологией в сравнение с прогрессирующей, что позволило авторам предположить, что эти микроРНК задействованы в определенных процессах, предотвращающих

малигнизацию клеток [Yang Y.et al., 2013]. Также авторы провели параллель между тканью и слюной, отметив, что паттерн микроРНК перекликается в обоих типах биоматериала, позволяя при работе со слюной выявлять подгруппу пациентов с низким уровнем прогрессии патологии уже на ранних стадиях малигнизации.

Таблица 28 – Уровень микроРНК в слюне пациентов с РГ в зависимости от диагноза.

А

| микроРНК  | Дисплазии |             | РГ |            | p     | FDR, % |
|---|-----------|-------------|----|------------|-------|--------|
|   | N         | Mean±SE     | N  | Mean±SE    |       |        |
| -18a  | 7         | -4,52±1,13  | 14 | -2,98±0,54 | 0,230 | 40,32  |
| -21   | 7         | 0,20±0,37   | 16 | -1,26±0,37 | 0,011 | 3,74   |
| -155  | 7         | -0,33±0,84  | 16 | -1,53±0,28 | 0,187 | 43,81  |
| -200a   | 7         | -2,82±0,91  | 15 | -1,48±0,67 | 0,254 | 35,63  |
| -200c   | 7         | 2,62±0,67   | 16 | 0,36±0,31  | 0,006 | 4,30   |
| -205  | 7         | 14,91±14,37 | 16 | -1,46±0,39 | 0,267 | 31,21  |
| -221  | 7         | -3,59±0,73  | 15 | -3,73±0,30 | 0,866 | 86,64  |
| Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень ± ошибка среднего; уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; значение нормы уровня соответствует 0 |           |             |    |            |       |        |

Б

| микроРНК  | Д II - III |            | T1-2 |            | p     | FDR, % |
|---|------------|------------|------|------------|-------|--------|
|   | N          | Mean±SE    | N    | Mean±SE    |       |        |
| -18a  | 4          | -6,21±0,00 | 6    | -3,32±0,65 | 0,002 | 1,49   |
| -21   | 4          | 0,48±0,64  | 6    | -2,32±0,46 | 0,007 | 2,65   |
| -155  | 4          | 0,46±1,25  | 6    | -1,92±0,56 | 0,120 | 14,07  |
| -200a   | 4          | -3,58±1,56 | 6    | 0,56±1,00  | 0,056 | 9,80   |
| -200c   | 4          | 3,52±0,91  | 6    | 0,01±0,62  | 0,013 | 2,95   |
| -205  | 4          | 0,93±1,47  | 6    | -1,86±0,62 | 0,118 | 16,56  |
| -221  | 4          | -4,52±0,99 | 6    | -3,85±0,32 | 0,532 | 53,27  |
| Примечание: N - объем выборки в подгруппе; Mean±SE – средний уровень ± ошибка среднего; значение нормы уровня соответствует 0 |            |            |      |            |       |        |

Полученные результаты по определению уровня микроРНК в слюне пациентов с предопухолевой патологией и раком гортани свидетельствуют, что этот биоматериал подходит для данной процедуры и показывает стабильный, воспроизводимый результат для подавляющего большинства проанализированных микроРНК (всех кроме микроРНК-494). Данные дискриминантного анализа по определению уровня микроРНК-21, -18a и -205 о возможности разделения подгрупп лиц по статусу регионального метастазирования позволяют предположить, что слюна может быть использована для уточнения диагноза при злокачественной патологии. В то время как наличие значимой разницы в уровне микроРНК-18a, -21 и -200c между подгруппами лиц с ДП-Ш и больных РГ T<sub>1-2</sub> свидетельствует о том, что слюна, биоматериал полученный неинвазивным путем, может быть использована для уточнения диагноза при предопухолевых состояниях гортани.

Однако эти пилотные данные требуют уточнения на более крупной и унифицированной по клинико-патологическим параметрам выборке и выявления показателей чувствительности и специфичности подхода.

## Заключение по результатам

В ходе исследования проведена оценка паттерна экспрессии микроРНК в ткани и слюне пациентов с предопухолевыми патологиями и злокачественными новообразованиями гортани. Для достижения поставленных задач нами выбран путь анализа данных как с общих позиций: PLS-анализ, который позволяет оценить взаимосвязь всех микроРНК с анализируемыми параметрами и дискриминантный анализ, который позволяет выявлять различия между группами и дает возможность классифицировать объекты по принципу максимального сходства; так и частных подходов, таких как t-критерий Уэлша для сравнения двух групп.

На первом этапе исследования проанализирована общая группа пациентов с предопухолевыми заболеваниями, группу которых составили лица как без дисплазий, так и с дисплазиями I-III степени. Проведена унификация выборки методом PLS-анализа данных, который позволяет оценить вклад клинично-патологических параметров (пол, возраст, диагноз, степень дисплазии и ВПЧ-инфицирование) на экспрессию анализируемых микроРНК. Результаты позволили выявить выпадающий образец, вследствие чего в последующем анализе он исключен из выборки.

При стратификации группы пациентов по половой принадлежности и возрасту дискриминантный анализ не показал статистически значимой разницы в совокупном уровне экспрессии. Не выявлено разницы в экспрессии и при попарном сравнении экспрессии отдельных микроРНК, что позволило для дальнейшего анализа выбрать всю когорту пациентов кроме женщины в возрасте 23 лет.

Анализ паттерна экспрессии анализируемых микроРНК в общей группе пациентов с предопухолевыми заболеваниями выявил отклонения экспрессии в патологически измененной ткани относительно прилежащей нормальной на уровне тенденции к повышению экспрессии для микроРНК-200a, -205, -221, хотя изменения не укладываются в 5% барьер FDR. Стоит отметить, что эту группу составили лица с разными гистологическими диагнозами, что вероятно внесло вклад в полученный результат. Более детальный анализ выборки показал, что дискриминантный анализ не выявил различий в совокупном уровне экспрессии микроРНК в зависимости от диагноза. Однако при сравнении экспрессии микроРНК по отдельности внутри подгрупп для некоторых микроРНК, которые отнесены к группе онкогенных, выявлено повышение их экспрессии по мере утяжеления диагноза (микроРНК-21, -155, 200c, -205). Показано, что только для микроРНК-21 эти показатели чувствительности и специфичности имеют высокие значения – 60% и 90%, соответственно. Так, в группе пациентов с ДП-III, в сравнении с группой лиц без дисплазии -ДІ, количество случаев с гиперэкспрессией микроРНК-21 в

1,5 раза выше, чем с гипоекспрессией. Это свидетельствует о том, что риск прогрессии заболевания повышается при повышении экспрессии микроРНК-21 ( $OR=13,5$ ,  $CI$  95%, 1,34-135,9,  $p=0,017$ ). Эти данные позволяют судить о перспективности использования показателя экспрессии микроРНК-21 в патологически измененной ткани при гистологической верификации диагноза.

Тенденция повышения экспрессии микроРНК-21, -155, -200с, -205 в ряду гистологического диагноза от легкой дисплазии (I степень) к тяжелой дисплазии (III степени) позволяют предположить, что по мере развития предопухолевой патологии происходит накопление молекулярных нарушений связанных с микроРНК и ассоциированных с прогрессией заболевания. Полученные нами данные согласуются с гипотезой о том, что большинство генетических изменений приобретаются клеткой на ранних этапах канцерогенеза опухолей головы и шеи [Ha P.K.et al., 2003].

Относительно функциональной роли микроРНК-21, -155, -200с и -205 в канцерогенезе стоит упомянуть их общую вовлеченность в этот процесс и контроль многих генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла, апоптоза, роста и дифференцировки опухолевой ткани [Feng X.et al., 2014; Hong L.et al., 2013; Qin A.-Y.et al., 2013]. Интересно отметить, что в частности для микроРНК-155 показано участие в регуляции активации воспалительных каскадов, что является показателем важной связующей роли микроРНК-155 между хроническим воспалением и развитием злокачественной патологии [Tili E.et al., 2011].

PLS-анализ по экспрессии микроРНК-18а, -21, -155, -200а, -200с, -205, -221, -494 и клинико-патологических характеристик (пол, возраст, стадии T и N, степень дифференцировки опухоли, ВПЧ-инфицирование) 55 пациентов с первичным диагнозом рака гортани позволил выявить подгруппу из 6 выпадающих образцов с отличным от остальных образцов уровнем экспрессии. Группирующим признаком для них явился возраст (до 45 лет). Выявлено, что уровень экспрессии 8 микроРНК значимо отличается в зависимости от возраста пациентов ( $F(16,74) = 3,632211$   $p < 0,0001$ ), причем основной вклад в разделение группы осуществляется за счет микроРНК-494, которая имеет самый высокий уровень корреляции с возрастом ( $r=0,37$ ,  $p=0,006$ ). При сопоставлении уровня экспрессии по каждой микроРНК в отдельности выявлено, что только уровень экспрессии микроРНК-494 у лиц с диагнозом рак гортани в возрасте до 45 лет значимо снижен в сравнении с больными в возрасте 45-65 лет, а также лицами старше 65 лет (7vs36,  $p=0,00038$  и 7vs9,  $p=0,00039$ , соответственно). При обработке данных методом визуализации NovaSpark, в основе которого лежит определение статистического расстояния по Махаланобису, выявлено, что 2D-модель представления данных по

экспрессии анализируемых микроРНК позволяет еще раз отчетливо вычленить подгруппу людей в возрасте до 45 лет. Таким образом, пациенты в возрасте до 45 лет представляют собой обособленную подгруппу и имеют отличный паттерн экспрессии микроРНК, чем пациенты старшего возраста.

Учитывая полученные результаты, для оценки влияния половой принадлежности на профиль экспрессии микроРНК в ткани пациентов РГ выбрана подгруппа лиц старше 45 лет.

Дискриминантный анализ профиля экспрессии 8 микроРНК показал отсутствие значимых различий изучаемых показателей в зависимости от пола пациентов. Однако сравнение уровня экспрессии по каждой микроРНК в отдельности позволило выявить значимое различие между женщинами и мужчинами для микроРНК-200a и -21 (2vs46,  $p=0,006$  и  $p=0,003$ , соответственно), что однако может объясняться и эффектом малых выборок в связи с малочисленностью группы пациентов женского пола.

Для последующего анализа выбрана группа мужчин в возрасте старше 45 лет. Среди пациентов с РГ для некоторых микроРНК выявлен aberrantный уровень экспрессии в опухолевой ткани относительно прилежащей нормальной ткани. Установлена гиперэкспрессия микроРНК-**21**, **-155** и **-205** ( $p=0,00005$ ,  $p=0,00008$  и  $p=0,00085$ , соответственно) и гипоекспрессия микроРНК-**200a** ( $p=0,0008$ ) у пациентов мужского пола старше 45 лет с первичным диагнозом рака гортани.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы полученными на опухолях разных локализаций, в т.ч. и на опухолях головы и шеи. Так, известно, что микроРНК-21, -155 и -205 играют в клетке онкогенную роль и повышение их экспрессии связано с регуляцией различных процессов задействованных в канцерогенезе. МикроРНК-200a является известным онкосупрессором, исходя из функций выполняемых ею в клетке, относительно этой микроРНК также отмечено снижение ее экспрессии по сравнению с нормальной тканью.

Сравнение подгрупп пациентов в зависимости от стадии распространенности опухолевого процесса, лимфогенного метастазирования и степени дифференцировки опухолевой ткани не выявило значимых различий в уровне экспрессии анализируемых микроРНК, что также было показано и по результатам дискриминантного анализа.

Проведена оценка общей двухгодичной выживаемости больных на примере 36 (78%) прослеженных пациентов из группы мужчин старше 45 лет с диагнозом первичного рака гортани. Анализ показателей общей выживаемости в подгруппах лиц с повышенной ( $\ln \geq 1$ ) и пониженной экспрессией ( $\ln < 1$ ) анализируемых микроРНК была схожа и статистически не различалась.

Для сравнительного анализа образцов пациентов с разными диагнозами выбраны оптимизированные группы: 1 – пациенты старше 40 лет с предопухолевыми изменениями гортани (n=25); 2 – больные мужского пола старше 45 лет со злокачественными новообразованиями гортани (n=46).

Показано значимое различие в паттерне экспрессии 8 микроРНК в группах пациентов с предопухолевыми и со злокачественными заболеваниями гортани ( $F(8,51) = 2,9204$ ,  $p < 0,0078$ ). Нами были рассчитаны показатели чувствительности и специфичности теста основанного на расчете экспрессии восьми микроРНК для двух подгрупп, показатели которых составили 67% и 85%, соответственно.

Выявлено, что у пациентов с раком гортани значимо гиперэкспрессированы микроРНК-205, -155, -200с и -21 (15vs46,  $p=0,0002$ ,  $p=0,008$ ,  $p=0,009$ ,  $p=0,013$ , соответственно) в сравнение с группой без диспластических изменений. Интересно отметить, что показатели экспрессии в подгруппах лиц с дисплазиями II-III и раком гортани были схожи и статистически не различались, что позволяет судить о близости этих подгрупп на молекулярном уровне.

Согласно полученным результатам по всем проанализированным микроРНК обнаружены интересные данные для микроРНК-205 и -155. Установлено, что в группе пациентов с раком гортани, в сравнении с группой лиц с диспластическими изменениями, количество случаев с гиперэкспрессией микроРНК-205 ( $\ln > 0$ ) в 2,98 раз выше, чем с гипоекспрессией. Это свидетельствует о том, что риск прогрессии заболевания повышается при повышении экспрессии микроРНК-205 ( $OR=4,79$ ,  $CI\ 95\%$ , 1,41-16,26,  $p=0,007$ ). Также показано, что частота случаев с повышенным уровнем экспрессии микроРНК-155 в 2 и более раза в патологически измененной ткани наблюдается значимо чаще у пациентов с раком гортани, чем у лиц без диспластических изменений, а шанс развития заболевания возрастает ( $OR=6,82$ ,  $CI\ 95\%$ , 1,68-27,66,  $p=0,004$ ). Наиболее примечательно, что данные показатели формируются не только за счет поздних стадий рака. Так, даже при сравнении подгрупп лиц без дисплазии против T<sub>1-2</sub>, частота случаев с повышенным в 2 и более раза уровнем экспрессии микроРНК-155 по-прежнему превалирует у пациентов с ЗНО, а шанс прогрессии заболевания увеличивается ( $OR=5,33$ ,  $CI\ 95\%$ , 1,15-24,68,  $p=0,028$ ).

Таким образом, полученные нами результаты показали, что уровень экспрессии микроРНК-21, -155, а также -205 постепенно повышается по мере утяжеления диагноза в ряду образцов «отсутствие дисплазии→дисплазия II→дисплазия III степени→рак гортани». Это свидетельствует об участии этих микроРНК в регуляции процессов, задействованных в канцерогенезе опухолей гортани, а положительные результаты по

оценке риска развития патологии при учете частоты встречаемости случаев с гиперэкспрессией микроРНК-155 и 205 позволяет судить о предполагаемой диагностической ценности этих показателей.

Важно отметить, что для микроРНК, как и многих молекулярных регуляторов клетки и организма в целом, характерно образование сложной системы взаимодействий друг с другом, что отмечают многие авторы [De Craene B. G. Berx 2013; De Craene B. G. Berx 2013; Gurtan A.M. P.A. Sharp 2013; Iorio M.V. C.M. Croce 2009; Zhou J.-J. et al., 2014]. Результаты корреляционного анализа 46 образцов от мужчин старше 45 лет с первичным раком гортани и 25 образцов от пациентов с предопухолевыми заболеваниями показали, что между некоторыми микроРНК существует взаимосвязь. Так, выявлено, что в обеих группах прослеживается корреляция между онкогенными микроРНК-21 и -155, для которых было показано повышение уровня экспрессии по мере утяжеления диагноза и гиперэкспрессия при РГ. Показана положительная корреляционная взаимосвязь в обеих группах и между микроРНК-200с и -205, для которых также отмечена тенденция к повышению экспрессии от «отсутствия дисплазии» к тяжелой степени дисплазии у пациентов с предопухолевыми патологиями и от T<sub>1-2</sub> к T<sub>3-4</sub> у больных РГ.

Проведена оценка частоты встречаемости специфичного для данной локализации фактора риска – папилломавируса высокого онкогенного риска как в патологически измененной, так и прилежащей нормальной ткани гортани. Показано, что в группе пациентов с предопухолевыми заболеваниями частота встречаемости ВПЧ составила 7,7% (2 из 26), что несколько ниже аналогичного показателя согласно данным мировой литературы. В обоих вирус-позитивных образцах выявлен 16 тип ВПЧ, причем ДНК папилломавируса также была обнаружена и в прилежащей нормальной ткани этих пациентов.

Оценка распространенности ВПЧ в опухолевой и прилежащей нормальной ткани больных раком гортани показала, что инфицированность ВПЧ обследованных лиц с РГ в опухолевой ткани составила 14,5% (8/55), а в прилежащей нормальной ткани – 12,7% (7/55). В подавляющем большинстве вирус-позитивные случаи являлись моноинфекцией (89%). Стоит отметить, что у лиц с РГ спектр типов ВПЧ разнится в нормальном эпителии и в опухолевой ткани. Ведущим типом в вирус-позитивных образцах нормальной ткани являлся ВПЧ16 (66,6%), другие типы представлены значительно реже: ВПЧ31/33/45 по 16,6%. В опухолевой ткани пациентов также доминировал ВПЧ16 (71,4%), а остальные же встречались лишь в единичных случаях: ВПЧ31/45/51 по 14,2%. Интересно отметить, что парно позитивными оказались всего 4 случая, т.е. в них определялся ВПЧ одного и того



же типа как в нормальной, так и в опухолевой ткани пациента. Причем 3 из 4 пар содержали ДНК ВПЧ 16 типа.

Дискриминантный анализ экспрессии 8 микроРНК не выявил различий между подгруппами вирус-инфицированных и вирус-негативных пациентов с предопухолевыми заболеваниями. Однако сравнение значений экспрессии по каждой микроРНК в отдельности показал значимое повышение экспрессии микроРНК-21 (23vs2,  $p=0,002$ ) у вирус-позитивных лиц. Полученный результат позволяет предположить, что изменение экспрессии микроРНК-21 может быть сопряжено с инфицированностью клеток ВПЧ, однако эти данные необходимо уточнять на более репрезентативных выборках пациентов. У больных раком гортани ассоциации ВПЧ инфекции с уровнем экспрессии микроРНК в опухолевой ткани не выявлено.

Представилось перспективным оценить возможность использования для диагностики биоматериала полученного неинвазивным путем (слюны), для чего было проанализировано 23 образца слюны полученной от пациентов с патологиями гортани. В силу малочисленности подгрупп не представилось возможности проанализировать влияние половозрастной компоненты на уровень микроРНК в слюне, однако проведена оценка влияния стадии распространенности опухолевого процесса. Дискриминантный анализ уровня семи микроРНК не показал различий в зависимости от стадии распространенности опухолевого процесса, что было выявлено и при сравнении уровня отдельных микроРНК между подгруппами пациентов с T<sub>1-2</sub> и T<sub>3-4</sub> стадиями.

Применение подхода пошаговой дискриминации позволило определить три микроРНК (-21, -18a и -205), которые играют существенную роль в формировании специфичного паттерна для лиц с лимфогенными метастазами и без метастазирования ( $p < 0,0131$ ). Показатели чувствительности и специфичности данного подхода составили 100% и 80%, соответственно. При обработке данных методом визуализации NovaSpark, также выявлено, что на 2D-модели представления данных по совокупному значению уровня микроРНК-21, -18a и -205 образцы полученные от пациентов с метастазами и без располагаются в двух непересекающихся областях, что позволяет однозначно разделить сравниваемые нами подгруппы. Полученные нами результаты позволяют судить о перспективности использования подобных подходов для уточнения диагноза пациентов.

Сравнительная характеристика паттерна экспрессии микроРНК у лиц с предопухолевыми заболеваниями и раком гортани показал, что уровень микроРНК-18a, -21, -155, -200a, -200c, -205, -221 в первой группе значимо отличается от паттерна у больных РГ ( $p < 0,0033$ ). Причем рассчитанные показатели чувствительности и специфичности этого теста составили 71% и 93%, соответственно.

Анализ данных по отдельным микроРНК показал, что у пациентов с предраковыми патологиями в слюне обнаружен повышенный уровень микроРНК-21 и -200с в сравнении с группой пациентов с диагнозом рака гортани (7vs16,  $p=0,011$ , 7vs16,  $p=0,0061$ , соответственно). Более того, при сравнении подгрупп лиц с дисплазией II-III степени и пациентов с I-II стадиями рака статистическая значимость значений экспрессии сохраняется, что говорит в пользу возможности использования этого параметра в слюне для уточнения диагноза в дополнение к основным диагностическим методам. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований уровня микроРНК в слюне в плане возможности разработки методов неинвазивной диагностики лимфогенного метастазирования рака гортани и определения риска злокачественной трансформации предопухолевых патологий гортани.

## **Выводы:**

1. В патологически измененной ткани больных с предопухолевыми патологиями гортани относительно прилежащей нормальной ткани показано снижение экспрессии микроРНК-200а, -205 и -221 ( $p < 0,05$ ,  $5 < \text{FDR} < 20\%$ ). Выявлено повышение экспрессии микроРНК-21, -155, -200с и -205 у пациентов с дисплазией II-III степени по сравнению с пациентами без дисплазии ( $p < 0,05$ ,  $5 < \text{FDR} < 20\%$ ).
2. Онкогенные микроРНК-21, -155, 205 статистически значимо ( $p < 0,05$ ,  $\text{FDR} < 5\%$ ) гиперэкспрессированы, а онкосупрессорная микроРНК-200а гипоекспрессирована в опухоли гортани относительно прилежащей нормальной ткани.
3. Установлено отсутствие ассоциации между aberrантной экспрессией анализируемых микроРНК и стадией опухолевого процесса, лимфогенным метастазированием, степенью дифференцировки опухолевой ткани, двухгодичной общей выживаемостью. Возраст и пол пациентов существенно увеличивают вариабельность значений экспрессии микроРНК.
4. Уровень экспрессии онкогенных микроРНК-21, -155 и -205 повышается в патологически измененной ткани в ряду от образцов без дисплазии до рака гортани, что свидетельствует о значимости этих микроРНК для процесса злокачественной трансформации эпителия гортани. Статистически значимо частота случаев с гиперэкспрессией микроРНК-205 и -155 выше при раке гортани, чем при предопухолевых патологиях. Определение паттерна экспрессии восьми анализируемых микроРНК позволяет дискриминировать образцы с предопухолевой патологией и раком гортани с чувствительностью 67% и специфичностью 85% ( $p = 0,0078$ ).
5. Aberrантная экспрессия микроРНК-21 в ткани статистически значимо повышена в группе лиц с вирус-позитивными предопухолевыми патологиями по сравнению с вирус-негативными пациентами. У больных раком гортани не установлено ассоциации ВПЧ инфекции с уровнем экспрессии микроРНК.
6. Уровень микроРНК-18а, -21 и -200с в слюне статистически значимо ( $p < 0,05$ ,  $\text{FDR} < 5\%$ ) снижен у больных раком гортани ранних стадий по сравнению с пациентами с дисплазиями ДП-III. Паттерн микроРНК-18а, -21, -155, -200а, -200с, -205 и -221 в слюне позволяет дискриминировать пациентов с предопухолевыми патологиями от больных раком гортани с чувствительностью 71% и специфичностью 93%.

## Литература

1. Поддубный Б.К. Унгиадзе Г.В. Диагностическая и лечебная эндоскопия верхних дыхательных путей. - Москва: Практическая медицина, 2009.
2. Черемисина О.В., Чойнзонов Е.Л. и др. Хронический гиперпластический ларингит как критерий формирования группы риска по раку гортани. // Российская оториноларингология. 2013. V. № 2. N 63. - P.84-89.
3. Adachi R., Horiuchi S., Sakurazawa Y., Hasegawa T., Sato K., Sakamaki T. ErbB2 down-regulates microRNA-205 in breast cancer // Biochemical and biophysical research communications. 2011. V. 411. N 4. - P.804-808.
4. Adam L., Zhong M., Choi W., Qi W., Nicoloso M., Arora A., Calin G., Wang H., Siefker-Radtke A., McConkey D. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy // Clinical Cancer Research. 2009. V. 15. N 16. - P.5060-5072.
5. Al Moustafa A.-E., Alaoui-Jamali M.A., Batist G., Hernandez-Perez M., Serruya C., Alpert L., Black M.J., Sladek R., Foulkes W.D. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells // Oncogene. 2002. V. 21. N 17. - P.2634-2640.
6. Avissar M., McClean M.D., Kelsey K.T., Marsit C.J. MicroRNA expression in head and neck cancer associates with alcohol consumption and survival // Carcinogenesis. 2009. V. 30. N 12. - P.2059-2063.
7. Babiarz J.E., Ruby J.G., Wang Y., Bartel D.P., Blelloch R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs // Genes & development. 2008. V. 22. N 20. - P.2773-2785.
8. Bahn J.H., Zhang Q., Li F., Chan T.-M., Lin X., Kim Y., Wong D.T., Xiao X. The Landscape of MicroRNA, Piwi-Interacting RNA, and Circular RNA in Human Saliva // Clinical chemistry. 2015. V. 61. N 1. - P.221-230.
9. Bai J.-X., Yan B., Zhao Z.-N., Xiao X., Qin W.-W., Zhang R., Jia L.-T., Meng Y.-L., Jin B.-Q., Fan D.-M. Tamoxifen represses miR-200 microRNAs and promotes epithelial-to-mesenchymal transition by up-regulating c-Myc in endometrial carcinoma cell lines // Endocrinology. 2013. V. 154. N 2. - P.635-645.
10. Bakirtzi K., Hatziaepostolou M., Karagiannides I., Polytarchou C., Jaeger S., Iliopoulos D., Pothoulakis C. Neurotensin signaling activates microRNAs-21 and-155 and Akt, promotes tumor growth in mice, and is increased in human colon tumors // Gastroenterology. 2011. V. 141. N 5. - P.1749-1761. e1.
11. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // cell. 2004. V. 116. N 2. - P.281-297.
12. Benetti R., Gonzalo S., Jaco I., Muñoz P., Gonzalez S., Schoeftner S., Murchison E., Andl T., Chen T., Klatt P. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases // Nature structural & molecular biology. 2008. V. 15. N 3. - P.268-279.
13. Berezikov E., Chung W.-J., Willis J., Cuppen E., Lai E.C. Mammalian mirtron genes // Molecular cell. 2007. V. 28. N 2. - P.328-336.
14. Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., Murchison E.P., Alcorn H., Li M.Z., Mills A.A., Elledge S.J., Anderson K.V., Hannon G.J. Dicer is essential for mouse development // Nature genetics. 2003. V. 35. N 3. - P.215-217.
15. Bohnsack M.T., Czaplinski K., GÖRLICH D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs // Rna. 2004. V. 10. N 2. - P.185-191.

16. Boon R.A., Iekushi K., Lechner S., Seeger T., Fischer A., Heydt S., Kaluza D., Tréguer K., Carmona G., Bonauer A. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function // *Nature*. 2013. V. 495. N 7439. - P.107-110.
17. Bose P., Brockton N.T., Dort J.C. Head and neck cancer: from anatomy to biology // *International journal of cancer*. 2013. V. 133. N 9.
18. Brabletz S., Bajdak K., Meidhof S., Burk U., Niedermann G., Firat E., Wellner U., Dimmler A., Faller G., Schubert J. The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells // *The EMBO journal*. 2011. V. 30. N 4. - P.770-782.
19. Bracken C.P., Gregory P.A., Kolesnikoff N., Bert A.G., Wang J., Shannon M.F., Goodall G.J. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition // *Cancer research*. 2008. V. 68. N 19. - P.7846-7854.
20. Braconi C., Huang N., Patel T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes // *Hepatology*. 2010. V. 51. N 3. - P.881-890.
21. Brase J.C., Wuttig D., Kuner R., Sultmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer // *Mol Cancer*. 2010. V. 9. N 9. - P.306.
22. Brito J.A., Gomes C.C., Guimarães A.L., Campos K., Gomez R.S. Relationship between microRNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia // *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2014. V. 43. N 3. - P.211-216.
23. Brosh R., Shalgi R., Liran A., Landan G., Korotayev K., Nguyen G.H., Enerly E., Johnsen H., Buganim Y., Solomon H. p53-repressed miRNAs are involved with E2F in a feed-forward loop promoting proliferation // *Molecular systems biology*. 2008. V. 4. N 1.
24. Buick R.N. Cell heterogeneity in human ovarian carcinoma // *J.of Cellular Physiol*. 1984. V. Suppl.3. - P.6.
25. Burk U., Schubert J., Wellner U., Schmalhofer O., Vincan E., Spaderna S., Brabletz T. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells // *EMBO reports*. 2008. V. 9. N 6. - P.582-589.
26. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. V. 99. N 24. - P.15524-15529.
27. Cao P., Zhou L., Zhang J., Zheng F., Wang H., Ma D., Tian J. Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma // *Head & neck*. 2013. V. 35. N 5. - P.720-728.
28. Carrera M., Bitu C.C., Manninen A., Salo T., Coletta R.D. Biological Role of HOXA10 Homeobox Gene in Oral Squamous Cell Carcinoma // *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2014. V. 117. N 2. - P.e199.
29. Cervigne N.K., Reis P.P., Machado J., Sadikovic B., Bradley G., Galloni N.N., Pintilie M., Jurisica I., Perez-Ordóñez B., Gilbert R. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma // *Human molecular genetics*. 2009. V. 18. N 24. - P.4818-4829.
30. Chang S.S., Jiang W.W., Smith I., Poeta L.M., Begum S., Glazer C., Shan S., Westra W., Sidransky D., Califano J.A. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma // *International journal of cancer*. 2008. V. 123. N 12. - P.2791-2797.
31. Cheloufi S., Dos Santos C.O., Chong M.M., Hannon G.J. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis // *Nature*. 2010. V. 465. N 7298. - P.584-589.
32. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // *Nucleic acids research*. 2005. V. 33. N 20. - P.e179-e179.

33. Chen D., Cabay R.J., Jin Y., Wang A., Lu Y., Shah-Khan M., Zhou X. MicroRNA deregulations in head and neck squamous cell carcinomas // *Journal of oral & maxillofacial research*. 2013. V. 4. N 1.
34. Chen J., Wang G., Lu C., Guo X., Hong W., Kang J., Wang J. Synergetic cooperation of microRNAs with transcription factors in iPS cell generation // *PloS one*. 2012. V. 7. N 7. - P.e40849.
35. Chen Z., Jin Y., Yu D., Wang A., Mahjabeen I., Wang C., Liu X., Zhou X. Down-regulation of the microRNA-99 family members in head and neck squamous cell carcinoma // *Oral oncology*. 2012. V. 48. N 8. - P.686-691.
36. Chiang H.R., Schoenfeld L.W., Ruby J.G., Auyeung V.C., Spies N., Baek D., Johnston W.K., Russ C., Luo S., Babiarz J.E. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes // *Genes & development*. 2010. V. 24. N 10. - P.992-1009.
37. Childs G., Fazzari M., Kung G., Kawachi N., Brandwein-Gensler M., McLemore M., Chen Q., Burk R.D., Smith R.V., Prystowsky M.B. Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma // *The American journal of pathology*. 2009. V. 174. N 3. - P.736-745.
38. Chu E.A., Kim Y.J. Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up // *Otolaryngologic clinics of North America*. 2008. V. 41. N 4. - P.673-695.
39. Cochrane D.R., Howe E.N., Spoelstra N.S., Richer J.K. Loss of miR-200c: a marker of aggressiveness and chemoresistance in female reproductive cancers // *Journal of oncology*. 2009. V. 2010.
40. Concepcion C.P., Bonetti C., Ventura A. The miR-17-92 family of microRNA clusters in development and disease // *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*. 2012. V. 18. N 3. - P.262.
41. Costinean S., Sandhu S.K., Pedersen I.M., Tili E., Trotta R., Perrotti D., Ciarlariello D., Neviani P., Harb J., Kauffman L.R. Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein  $\beta$  are targeted by miR-155 in B cells of E $\mu$ -MiR-155 transgenic mice // *Blood*. 2009. V. 114. N 7. - P.1374-1382.
42. Crick F.H. The origin of the genetic code // *Journal of molecular biology*. 1968. V. 38. N 3. - P.367-379.
43. D'Souza G., Dempsey A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine // *Preventive medicine*. 2011. V. 53. - P.S5-S11.
44. Dar A.A., Majid S., de Semir D., Nosrati M., Bezrookove V., Kashani-Sabet M. miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. V. 286. N 19. - P.16606-16614.
45. De Craene B., Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression // *Nature Reviews Cancer*. 2013. V. 13. N 2. - P.97-110.
46. Denli A.M., Tops B.B., Plasterk R.H., Ketting R.F., Hannon G.J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex // *Nature*. 2004. V. 432. N 7014. - P.231-235.
47. Dexter D.L. P.C. Intraneoplastic diversity // *Intraneoplastic diversity*. 1982. V. 695. - P.11.
48. Di Martino M.T., Gullà A., Cantafio M.E.G., Lionetti M., Leone E., Amodio N., Guzzi P.H., Foresta U., Conforti F., Cannataro M. In vitro and in vivo anti-tumor activity of miR-221/222 inhibitors in multiple myeloma // *Oncotarget*. 2013. V. 4. N 2. - P.242.
49. Doench J.G., Petersen C.P., Sharp P.A. siRNAs can function as miRNAs // *Genes & development*. 2003. V. 17. N 4. - P.438-442.
50. Du Y., Xu Y., Ding L., Yao H., Yu H., Zhou T., Si J. Down-regulation of miR-141 in gastric cancer and its involvement in cell growth // *Journal of gastroenterology*. 2009. V. 44. N 6. - P.556-561.
51. Du Z.-M., Hu L.-F., Wang H.-Y., Yan L.-X., Zeng Y.-X., Shao J.-Y., Ernberg I. Upregulation of MiR-155 in nasopharyngeal carcinoma is partly driven by LMP1 and

- LMP2A and downregulates a negative prognostic marker JMJD1A // *PloS one*. 2011. V. 6. N 4. - P.e19137.
52. Duan H., Jiang Y., Zhang H., Wu Y. MiR-320 and miR-494 affect cell cycles of primary murine bronchial epithelial cells exposed to benzo [a] pyrene // *Toxicology in Vitro*. 2010. V. 24. N 3. - P.928-935.
  53. Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer // *Nature Reviews Cancer*. 2006. V. 6. N 4. - P.259-269.
  54. Fakhry C., Zhang Q., Nguyen-Tan P.F., Rosenthal D., El-Naggar A., Garden A.S., Soulieres D., Trotti A., Avizonis V., Ridge J.A. Human papillomavirus and overall survival after progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma // *Journal of Clinical Oncology*. 2014. - P.JCO. 2014.55. 1937.
  55. Farazi T.A., Hoell J.I., Morozov P., Tuschl T. MicroRNAs in human cancer // *MicroRNA Cancer Regulation* : Springer, 2013. - P.1-20.
  56. Feng X., Wang Z., Fillmore R., Xi Y. MiR-200, a new star miRNA in human cancer // *Cancer letters*. 2014. V. 344. N 2. - P.166-173.
  57. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 // *International Journal of Cancer*. 2015. V. 136. N 5. - P.E359-E386.
  58. Fischer C.A., Zlobec I., Green E., Probst S., Storck C., Lugli A., Tornillo L., Wolfensberger M., Terracciano L.M. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? // *International journal of cancer*. 2010. V. 126. N 5. - P.1256-1262.
  59. Fletcher A.M., Heaford A.C., Trask D.K. Detection of metastatic head and neck squamous cell carcinoma using the relative expression of tissue-specific mir-205 // *Translational oncology*. 2008. V. 1. N 4. - P.202-IN2.
  60. Flynt A.S., Lai E.C. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity // *Nature Reviews Genetics*. 2008. V. 9. N 11. - P.831-842.
  61. Gabriely G., Wurdinger T., Kesari S., Esau C.C., Burchard J., Linsley P.S., Krichevsky A.M. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators // *Molecular and cellular biology*. 2008. V. 28. N 17. - P.5369-5380.
  62. Gale N., Michaels L., Luzar B., Poljak M., Zidar N., Fischinger J., Cardesa A. Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx // *Histopathology*. 2009. V. 54. N 6. - P.639-656.
  63. Gandellini P., Folini M., Longoni N., Pennati M., Binda M., Colecchia M., Salvioni R., Supino R., Moretti R., Limonta P. miR-205 exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase C $\epsilon$  // *Cancer research*. 2009. V. 69. N 6. - P.2287-2295.
  64. Gillison M.L., Castellsagué X., Chaturvedi A., Goodman M.T., Snijders P., Tommasino M., Arbyn M., Franceschi S. Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix // *International journal of cancer*. 2014. V. 134. N 3. - P.497-507.
  65. Gillison M.L., Koch W.M., Capone R.B., Spafford M., Westra W.H., Wu L., Zahurak M.L., Daniel R.W., Viglione M., Symer D.E. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers // *Journal of the National Cancer Institute*. 2000. V. 92. N 9. - P.709-720.
  66. Gironella M., Seux M., Xie M.-J., Cano C., Tomasini R., Gommeaux J., Garcia S., Nowak J., Yeung M.L., Jeang K.-T. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. V. 104. N 41. - P.16170-16175.

67. Greco D., Kivi N., Qian K., Leivonen S.-K., Auvinen P., Auvinen E. Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs // *PloS one*. 2011. V. 6. N 7. - P.e21646.
68. Greene S.B., Herschkowitz J.I., Rosen J.M. The ups and downs of miR-205: identifying the roles of miR-205 in mammary gland development and breast cancer // *RNA biology*. 2010. V. 7. N 3. - P.300-304.
69. Gregory P.A., Bert A.G., Paterson E.L., Barry S.C., Tsykin A., Farshid G., Vadas M.A., Khew-Goodall Y., Goodall G.J. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1 // *Nature cell biology*. 2008. V. 10. N 5. - P.593-601.
70. Gregory R.I., Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer // *Cancer research*. 2005. V. 65. N 9. - P.3509-3512.
71. Gregory R.I., Yan K.-p., Amuthan G., Chendrimada T., Doratotaj B., Cooch N., Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs // *Nature*. 2004. V. 432. N 7014. - P.235-240.
72. Griffiths-Jones S. miRBase: microRNA sequences and annotation // *Current Protocols in Bioinformatics*. 2010. - P.12.9. 1-12.9. 10.
73. Grosshans H., Slack F.J. Micro-RNAs small is plentiful // *The Journal of cell biology*. 2002. V. 156. N 1. - P.17-22.
74. Guo H.-Q., Huang G.-L., Guo C.-C., Pu X.-X., Lin T.-Y. Diagnostic and prognostic value of circulating miR-221 for extranodal natural killer/T-cell lymphoma // *Disease markers*. 2010. V. 29. N 5. - P.251-258.
75. Gurtan A.M., Sharp P.A. The role of miRNAs in regulating gene expression networks // *Journal of molecular biology*. 2013. V. 425. N 19. - P.3582-3600.
76. Ha P.K., Benoit N.E., Yochem R., Sciubba J., Zahurak M., Sidransky D., Pevsner J., Westra W.H., Califano J. A transcriptional progression model for head and neck cancer // *Clinical Cancer Research*. 2003. V. 9. N 8. - P.3058-3064.
77. Hackl M., Brunner S., Fortschegger K., Schreiner C., Micutkova L., Mück C., Laschober G.T., Lepperdinger G., Sampson N., Berger P. miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging // *Aging cell*. 2010. V. 9. N 2. - P.291-296.
78. Hashimi S.T., Fulcher J.A., Chang M.H., Gov L., Wang S., Lee B. MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation // *Blood*. 2009. V. 114. N 2. - P.404-414.
79. He H., Jazdzewski K., Li W., Liyanarachchi S., Nagy R., Volinia S., Calin G.A., Liu C.-g., Franssila K., Suster S. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. V. 102. N 52. - P.19075-19080.
80. He W., Li Y., Chen X., Lu L., Tang B., Wang Z., Pan Y., Cai S., He Y., Ke Z. miR-494 acts as an anti-oncogene in gastric carcinoma by targeting c-myc // *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2014. V. 29. N 7. - P.1427-1434.
81. Hong F., Li Y., Xu Y., Zhu L. Prognostic significance of serum microRNA-221 expression in human epithelial ovarian cancer // *Journal of International Medical Research*. 2013. - P.0300060513475759.
82. Hong L., Han Y., Zhang Y., Zhang H., Zhao Q., Wu K., Fan D. MicroRNA-21: a therapeutic target for reversing drug resistance in cancer // *Expert opinion on therapeutic targets*. 2013. V. 17. N 9. - P.1073-1080.
83. Hooten N.N., Abdelmohsen K., Gorospe M., Ejiogu N., Zonderman A.B., Evans M.K. microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age // *PloS one*. 2010. V. 5. N 5. - P.e10724.
84. Hu S., Huang M., Nguyen P.K., Gong Y., Li Z., Jia F., Lan F., Liu J., Nag D., Robbins R.C. Novel microRNA prosurvival cocktail for improving engraftment and function of



- cardiac progenitor cell transplantation // *Circulation*. 2011. V. 124. N 11 suppl 1. - P.S27-S34.
85. Hui A.B., Lenarduzzi M., Krushel T., Waldron L., Pintilie M., Shi W., Perez-Ordóñez B., Jurisica I., O'Sullivan B., Waldron J. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas // *Clinical Cancer Research*. 2010. V. 16. N 4. - P.1129-1139.
  86. Hulf T., Sibbritt T., Wiklund E.D., Patterson K., Song J., Stirzaker C., Qu W., Nair S., Horvath L., Armstrong N. Epigenetic-induced repression of microRNA-205 is associated with MED1 activation and a poorer prognosis in localized prostate cancer // *Oncogene*. 2013. V. 32. N 23. - P.2891-2899.
  87. Hur K., Toiyama Y., Takahashi M., Balaguer F., Nagasaka T., Koike J., Hemmi H., Koi M., Boland C.R., Goel A. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis // *Gut*. 2013. V. 62. N 9. - P.1315-1326.
  88. Hutvágner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E., Bálint É., Tuschl T., Zamore P.D. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA // *Science*. 2001. V. 293. N 5531. - P.834-838.
  89. Iliopoulos D., Jaeger S.A., Hirsch H.A., Bulyk M.L., Struhl K. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer // *Molecular cell*. 2010. V. 39. N 4. - P.493-506.
  90. Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review // *EMBO molecular medicine*. 2012. V. 4. N 3. - P.143-159.
  91. Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact // *Journal of Clinical Oncology*. 2009. V. 27. N 34. - P.5848-5856.
  92. Ivanovska I., Ball A.S., Diaz R.L., Magnus J.F., Kibukawa M., Schelter J.M., Kobayashi S.V., Lim L., Burchard J., Jackson A.L. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression // *Molecular and cellular biology*. 2008. V. 28. N 7. - P.2167-2174.
  93. Iyevleva A.G., Kuligina E.S., Mitiushkina N.V., Togo A.V., Miki Y., Imyanitov E.N. High level of miR-21, miR-10b, and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas // *Breast cancer research and treatment*. 2012. V. 131. N 3. - P.1049-1059.
  94. Jayaprakash V., Reid M., Hatton E., Merzianu M., Rigual N., Marshall J., Gill S., Frustino J., Wilding G., Loree T. Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: a meta-analysis, 1985–2010 // *Oral oncology*. 2011. V. 47. N 11. - P.1048-1054.
  95. Jazdzewski K., Boguslawska J., Jendrzewski J., Liyanarachchi S., Pachucki J., Wardyn K.A., Nauman A., de la Chapelle A. Thyroid hormone receptor  $\beta$  (THRB) is a major target gene for microRNAs deregulated in papillary thyroid carcinoma (PTC) // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010. V. 96. N 3. - P.E546-E553.
  96. Jiang J., Lee E.J., Gusev Y., Schmittgen T.D. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines // *Nucleic acids research*. 2005. V. 33. N 17. - P.5394-5403.
  97. Jiang S., Zhang H.-W., Lu M.-H., He X.-H., Li Y., Gu H., Liu M.-F., Wang E.-D. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene // *Cancer research*. 2010. V. 70. N 8. - P.3119-3127.
  98. Jiang S., Zhang L.F., Zhang H.W., Hu S., Lu M.H., Liang S., Li B., Li Y., Li D., Wang E.D. A novel miR-155/miR-143 cascade controls glycolysis by regulating hexokinase 2 in breast cancer cells // *The EMBO journal*. 2012. V. 31. N 8. - P.1985-1998.
  99. Karaayvaz M., Zhang C., Liang S., Shroyer K.R., Ju J. Prognostic significance of miR-205 in endometrial cancer // *PloS one*. 2012. V. 7. N 4. - P.e35158.

100. Karakatsanis A., Papaconstantinou I., Gazouli M., Lyberopoulou A., Polymeneas G., Voros D. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance // *Molecular carcinogenesis*. 2013. V. 52. N 4. - P.297-303.
101. Kent O., Mendell J. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes // *Oncogene*. 2006. V. 25. N 46. - P.6188-6196.
102. Ketting R.F., Fischer S.E., Bernstein E., Sijen T., Hannon G.J., Plasterk R.H. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans* // *Genes & development*. 2001. V. 15. N 20. - P.2654-2659.
103. Kim J.-S., Park S.-Y., Lee S.A., Park M.-G., Yu S.-K., Lee M.-H., Park M.-R., Kim S.-G., Oh J.-S., Lee S.-Y. MicroRNA-205 suppresses the oral carcinoma oncogenic activity via down-regulation of Axin-2 in KB human oral cancer cell // *Molecular and cellular biochemistry*. 2014. V. 387. N 1-2. - P.71-79.
104. Kim V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing // *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005. V. 6. N 5. - P.376-385.
105. Kim V.N., Han J., Siomi M.C. Biogenesis of small RNAs in animals // *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009. V. 10. N 2. - P.126-139.
106. Kim Y.-K., Yu J., Han T.S., Park S.-Y., Namkoong B., Kim D.H., Hur K., Yoo M.-W., Lee H.-J., Yang H.-K. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer // *Nucleic acids research*. 2009. V. 37. N 5. - P.1672-1681.
107. Kim Y.J., Hwang S.J., Bae Y.C., Jung J.S. MiR-21 Regulates Adipogenic Differentiation through the Modulation of TGF- $\beta$  Signaling in Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue // *Stem cells*. 2009. V. 27. N 12. - P.3093-3102.
108. Klussmann J.P., Weissenborn S.J., Wieland U., Dries V., Kolligs J., Jungehuelssing M., Eckel H.E., Dienes H.P., Pfister H.J., Fuchs P.G. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas // *Cancer*. 2001. V. 92. N 11. - P.2875-2884.
109. Kofler B., Laban S., Busch C., Lörincz B., Knecht R. New treatment strategies for HPV-positive head and neck cancer // *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2014. V. 271. N 7. - P.1861-1867.
110. Kong W., He L., Coppola M., Guo J., Esposito N.N., Coppola D., Cheng J.Q. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer // *Journal of Biological Chemistry*. 2010. V. 285. N 23. - P.17869-17879.
111. Kong W., He L., Richards E., Challa S., Xu C., Permuth-Wey J., Lancaster J., Coppola D., Sellers T., Djeu J. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer // *Oncogene*. 2014. V. 33. N 6. - P.679-689.
112. Kong W., Yang H., He L., Zhao J.-j., Coppola D., Dalton W.S., Cheng J.Q. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor  $\beta$ /Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA // *Molecular and cellular biology*. 2008. V. 28. N 22. - P.6773-6784.
113. Korpál M., Kang Y. The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis // *RNA biology*. 2008. V. 5. N 3. - P.115-119.
114. Korpál M., Lee E.S., Hu G., Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2 // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. V. 283. N 22. - P.14910-14914.

115. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data // *Nucleic acids research*. 2013. - P.gkt1181.
116. Kreimer A.R., Clifford G.M., Boyle P., Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review // *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2005. V. 14. N 2. - P.467-475.
117. Krichevsky A.M. G.G. miR-21: a small multi-faceted RNA // *J. Cell. Mol. Med*. 2009. V. 13. N 1. - P.39-53.
118. Krutovskikh V.A., Herceg Z. Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers // *Bioessays*. 2010. V. 32. N 10. - P.894-904.
119. Kumar M.S., Lu J., Mercer K.L., Golub T.R., Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis // *Nature genetics*. 2007. V. 39. N 5. - P.673-677.
120. Lajer C., Garnæs E., Friis-Hansen L., Norrild B., Therkildsen M.H., Glud M., Rossing M., Lajer H., Svane D., Skotte L. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer // *British journal of cancer*. 2012. V. 106. N 9. - P.1526-1534.
121. Lajer C., Nielsen F., Friis-Hansen L., Norrild B., Borup R., Garnæs E., Rossing M., Specht L., Therkildsen M., Nauntofte B. Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study // *British journal of cancer*. 2011. V. 104. N 5. - P.830-840.
122. Lajer C.B., Buchwald C.v. The role of human papillomavirus in head and neck cancer // *Apmis*. 2010. V. 118. N 6- 7. - P.510-519.
123. Lambertz I., Nittner D., Mestdagh P., Denecker G., Vandesompele J., Dyer M.A., Marine J.-C. Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo // *Cell Death & Differentiation*. 2010. V. 17. N 4. - P.633-641.
124. Langevin S.M., Stone R.A., Bunker C.H., Grandis J.R., Sobol R.W., Taioli E. MicroRNA-137 promoter methylation in oral rinses from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with gender and body mass index // *Carcinogenesis*. 2010. V. 31. N 5. - P.864-870.
125. Lassen P., Eriksen J.G., Hamilton-Dutoit S., Tramm T., Alsner J., Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck // *Journal of Clinical Oncology*. 2009. V. 27. N 12. - P.1992-1998.
126. Lawrie C.H. MicroRNA expression in lymphoid malignancies: new hope for diagnosis and therapy? // *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008. V. 12. N 5a. - P.1432-1444.
127. le Sage C., Nagel R., Egan D.A., Schrier M., Mesman E., Mangiola A., Anile C., Maira G., Mercatelli N., Ciafrè S.A. Regulation of the p27Kip1 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation // *The EMBO journal*. 2007. V. 26. N 15. - P.3699-3708.
128. Lee D.J., Koch W.M., Yoo G., Lango M., Reed A., Califano J., Brennan J.A., Westra W.H., Zahurak M., Sidransky D. Impact of chromosome 14q loss on survival in primary head and neck squamous cell carcinoma // *Clinical Cancer Research*. 1997. V. 3. N 4. - P.501-505.
129. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* // *cell*. 1993. V. 75. N 5. - P.843-854.
130. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Rådmark O., Kim S. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing // *Nature*. 2003. V. 425. N 6956. - P.415-419.
131. Leemans C.R., Braakhuis B.J., Brakenhoff R.H. The molecular biology of head and neck cancer // *Nature Reviews Cancer*. 2011. V. 11. N 1. - P.9-22.

132. Levati L., Alvino E., Pagani E., Arcelli D., Caporaso P., Bondanza S., Di Leva G., Ferracin M., Volinia S., Bonmassar E. Altered expression of selected microRNAs in melanoma: antiproliferative and proapoptotic activity of miRNA-155 // *International journal of oncology*. 2009. V. 35. N 2. - P.393-400.
133. Levati L., Pagani E., Romani S., Castiglia D., Piccinni E., Covaciu C., Caporaso P., Bondanza S., Antonetti F.R., Bonmassar E. MicroRNA- 155 targets the SKI gene in human melanoma cell lines // *Pigment cell & melanoma research*. 2011. V. 24. N 3. - P.538-550.
134. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // *cell*. 2005. V. 120. N 1. - P.15-20.
135. Li C.-L., Nie H., Wang M., Su L.-P., Li J.-F., Yu Y.-Y., Yan M., Qu Q.-L., Zhu Z.-G., Liu B.-Y. microRNA-155 is downregulated in gastric cancer cells and involved in cell metastasis // *Oncology reports*. 2012. V. 27. N 6. - P.1960-1966.
136. Li J., Huang H., Sun L., Yang M., Pan C., Chen W., Wu D., Lin Z., Zeng C., Yao Y. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor // *Clinical Cancer Research*. 2009. V. 15. N 12. - P.3998-4008.
137. Li S., Chen T., Zhong Z., Wang Y., Li Y., Zhao X. microRNA-155 silencing inhibits proliferation and migration and induces apoptosis by upregulating BACH1 in renal cancer cells // *Molecular medicine reports*. 2012. V. 5. N 4. - P.949-954.
138. Li T., Li D., Sha J., Sun P., Huang Y. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells // *Biochemical and biophysical research communications*. 2009. V. 383. N 3. - P.280-285.
139. Li W., Sanki A., Karim R.Z., Thompson J.F., Soon Lee C., Zhuang L., McCarthy S.W., Scolyer R.A. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma // *Pathology*. 2006. V. 38. N 4. - P.287-301.
140. Li W., Thompson C.H., O'Brien C.J., McNeil E.B., Scolyer R.A., Cossart Y.E., Veness M.J., Walker D.M., Morgan G.J., Rose B.R. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil // *International journal of cancer*. 2003. V. 106. N 4. - P.553-558.
141. Li X., Khanna A., Li N., Wang E. Circulatory miR-34a as an RNA-based, noninvasive biomarker for brain aging // *Aging (Albany NY)*. 2011. V. 3. N 10. - P.985.
142. Li Y., John M.A.S., Zhou X., Kim Y., Sinha U., Jordan R.C., Eisele D., Abemayor E., Elashoff D., Park N.-H. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection // *Clinical Cancer Research*. 2004. V. 10. N 24. - P.8442-8450.
143. Li Y., Li W., Yang Y., Lu Y., He C., Hu G., Liu H., Chen J., He J., Yu H. MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme // *Brain research*. 2009. V. 1286. - P.13-18.
144. Li Z., Yang C.S., Nakashima K., Rana T.M. Small RNA- mediated regulation of iPS cell generation // *The EMBO journal*. 2011. V. 30. N 5. - P.823-834.
145. Liao L., Wang J., Ouyang S., Zhang P., Wang J., Zhang M. Expression and Clinical Significance of microRNA-1246 in Human Oral Squamous Cell Carcinoma // *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2015. V. 21. - P.776.
146. Libório-Kimura T.N., Jung H.M., Chan E.K. miR-494 represses HOXA10 expression and inhibits cell proliferation in oral cancer // *Oral oncology*. 2015. V. 51. N 2. - P.151-157.
147. Lim L., Balakrishnan A., Huskey N., Jones K.D., Jodari M., Ng R., Song G., Riordan J., Anderton B., Cheung S.T. MicroRNA- 494 within an oncogenic microRNA megacluster regulates G1/S transition in liver tumorigenesis through suppression of mutated in colorectal cancer // *Hepatology*. 2014. V. 59. N 1. - P.202-215.

148. Liu C.J., Kao S.Y., Tu H.F., Tsai M.M., Chang K.W., Lin S.C. Increase of microRNA miR- 31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer // *Oral diseases*. 2010. V. 16. N 4. - P.360-364.
149. Liu J., Mao Q., Liu Y., Hao X., Zhang S., Zhang J. Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients // *Chinese Journal of Cancer Research*. 2013. V. 25. N 1. - P.46.
150. Liu L., Jiang Y., Zhang H., Greenlee A.R., Han Z. Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo (a) pyrene-trans-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide // *Life sciences*. 2010. V. 86. N 5. - P.192-198.
151. Liu M., Wu H., Liu T., Li Y., Wang F., Wan H., Li X., Tang H. Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma // *Cell research*. 2009. V. 19. N 7. - P.828-837.
152. Liu N., Cui R.X., Sun Y., Guo R., Mao Y.P., Tang L.L., Jiang W., Liu X., Cheng Y.K., He Q.M. A four- miRNA signature identified from genome- wide serum miRNA profiling predicts survival in patients with nasopharyngeal carcinoma // *International journal of cancer*. 2014. V. 134. N 6. - P.1359-1368.
153. Liu W.-J., Zhao Y.-P., Zhang T.-P., Zhou L., Cui Q.-C., Zhou W.-X., You L., Chen G., Shu H. MLH1 as a direct target of MiR-155 and a potential predictor of favorable prognosis in pancreatic cancer // *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2013. V. 17. N 8. - P.1399-1405.
154. Liu X.-G., Zhu W.-Y., Huang Y.-Y., Ma L.-N., Zhou S.-Q., Wang Y.-K., Zeng F., Zhou J.-H., Zhang Y.-K. High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer // *Medical Oncology*. 2012. V. 29. N 2. - P.618-626.
155. Liu X., Chen Z., Yu J., Xia J., Zhou X. MicroRNA profiling and head and neck cancer // *Comparative and functional genomics*. 2009. V. 2009.
156. Liu Y., Lai L., Chen Q., Song Y., Xu S., Ma F., Wang X., Wang J., Yu H., Cao X. MicroRNA-494 is required for the accumulation and functions of tumor-expanded myeloid-derived suppressor cells via targeting of PTEN // *The Journal of Immunology*. 2012. V. 188. N 11. - P.5500-5510.
157. Lo W.L., Yu C.C., Chiou G.Y., Chen Y.W., Huang P.I., Chien C.S., Tseng L.M., Chu P.Y., Lu K.H., Chang K.W. MicroRNA- 200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells // *The Journal of pathology*. 2011. V. 223. N 4. - P.482-495.
158. Lodish H.F., Zhou B., Liu G., Chen C.-Z. Micromanagement of the immune system by microRNAs // *Nature Reviews Immunology*. 2008. V. 8. N 2. - P.120-130.
159. Löffler D., Brocke-Heidrich K., Pfeifer G., Stocsits C., Hackermüller J., Kretzschmar A.K., Burger R., Gramatzki M., Blumert C., Bauer K. Interleukin-6–dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer // *Blood*. 2007. V. 110. N 4. - P.1330-1333.
160. Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B.L., Mak R.H., Ferrando A.A. MicroRNA expression profiles classify human cancers // *Nature*. 2005. V. 435. N 7043. - P.834-838.
161. Lu T.X., Munitz A., Rothenberg M.E. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression // *The Journal of Immunology*. 2009. V. 182. N 8. - P.4994-5002.
162. Lu Z., Liu M., Stribinskis V., Klinge C., Ramos K., Colburn N., Li Y. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene // *Oncogene*. 2008. V. 27. N 31. - P.4373-4379.
163. Lund E., Güttinger S., Calado A., Dahlberg J.E., Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors // *Science*. 2004. V. 303. N 5654. - P.95-98.

164. Ma L., Teruya-Feldstein J., Weinberg R.A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer // *Nature*. 2007. V. 449. N 7163. - P.682-688.
165. MacLellan S.A., Lawson J., Baik J., Guillaud M., Poh C.F.Y., Garnis C. Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high- risk oral lesions // *Cancer medicine*. 2012. V. 1. N 2. - P.268-274.
166. Mahdavinezhad A., Mousavi-Bahar S.H., Poorolajal J., Yadegarazari R., Jafari M., Shabab N., Saidijam M. Evaluation of miR-141, miR-200c, miR-30b Expression and Clinicopathological Features of Bladder Cancer // *Int J Mol Cell Med Winter*. 2015. V. 4. N 1. - P.2.
167. Maillot G., Lacroix-Triki M., Pierredon S., Gratadou L., Schmidt S., Bénès V., Roché H., Dalenc F., Auboeuf D., Millevoi S. Widespread estrogen-dependent repression of micrnas involved in breast tumor cell growth // *Cancer research*. 2009. V. 69. N 21. - P.8332-8340.
168. Majid S., Dar A.A., Saini S., Yamamura S., Hirata H., Tanaka Y., Deng G., Dahiya R. MicroRNA- 205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer // *Cancer*. 2010. V. 116. N 24. - P.5637-5649.
169. Majid S., Saini S., Dar A.A., Hirata H., Shahryari V., Tanaka Y., Yamamura S., Ueno K., Zaman M.S., Singh K. MicroRNA-205 inhibits Src-mediated oncogenic pathways in renal cancer // *Cancer research*. 2011. V. 71. N 7. - P.2611-2621.
170. Marquez R.T., Wendlandt E., Galle C.S., Keck K., McCaffrey A.P. MicroRNA-21 is upregulated during the proliferative phase of liver regeneration, targets Pellino-1, and inhibits NF- $\kappa$ B signaling // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010. V. 298. N 4. - P.G535-G541.
171. Marur S., D'Souza G., Westra W.H., Forastiere A.A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic // *The Lancet Oncology*. 2010. V. 11. N 8. - P.781-789.
172. Mateescu B., Batista L., Cardon M., Gruosso T., de Feraudy Y., Mariani O., Nicolas A., Meyniel J.-P., Cottu P., Sastre-Garau X. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response // *Nature medicine*. 2011. V. 17. N 12. - P.1627-1635.
173. Matsushima K., Isomoto H., Yamaguchi N., Inoue N., Machida H., Nakayama T., Hayashi T., Kunizaki M., Hidaka S., Nagayasu T. MiRNA-205 modulates cellular invasion and migration via regulating zinc finger E-box binding homeobox 2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. : BioMed Central Limited, 2011.
174. McKaig R.G., Baric R.S., Olshan A.F. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology // *Head & neck*. 1998. V. 20. N 3. - P.250-265.
175. McLaren K., Burnett R., Goodlad J., Howatson S., Lang S., Lee F., Lessells A., Ogston S., Robertson A., Simpson J. Consistency of histopathological reporting of laryngeal dysplasia // *Histopathology*. 2000. V. 37. N 5. - P.460-463.
176. Meder B., Backes C., Haas J., Leidinger P., Stähler C., Großmann T., Vogel B., Frese K., Giannitsis E., Katus H.A. Influence of the confounding factors age and sex on microRNA profiles from peripheral blood // *Clinical chemistry*. 2014. V. 60. N 9. - P.1200-1208.
177. Meng F., Henson R., Wehbe-Jane H., Ghoshal K., Jacob S.T., Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer // *Gastroenterology*. 2007. V. 133. N 2. - P.647-658.
178. Menghini R., Casagrande V., Cardellini M., Martelli E., Terrinoni A., Amati F., Vasa-Nicotera M., Ippoliti A., Novelli G., Melino G. MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1 // *Circulation*. 2009. V. 120. N 15. - P.1524-1532.
179. Metzler M., Wilda M., Busch K., Viehmann S., Borkhardt A. High expression of precursor microRNA- 155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma // *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2004. V. 39. N 2. - P.167-169.

180. Michael A., Bajracharya S.D., Yuen P.S., Zhou H., Star R.A., Illei G.G., Alevizos I. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers // *Oral diseases*. 2010. V. 16. N 1. - P.34-38.
181. Minni A., Barbaro M., Rispoli G., Diaferia F., Bernardeschi D., Filipo R. Treatment with laser CO2 cordectomy and clinical implications in management of mild and moderate laryngeal precancerosis // *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2008. V. 265. N 2. - P.189-193.
182. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogosova-Agadjanyan E.L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K.C., Allen A. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. V. 105. N 30. - P.10513-10518.
183. Mongroo P.S., Rustgi A.K. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition // *Cancer biology & therapy*. 2010. V. 10. N 3. - P.219-222.
184. Nair V.S., Maeda L.S., Ioannidis J.P. Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review // *Journal of the National Cancer Institute*. 2012. V. 104. N 7. - P.528-540.
185. Napier S.S., Speight P.M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature // *Journal of oral pathology & medicine*. 2008. V. 37. N 1. - P.1-10.
186. Nikitina E., Urazova L., Stegny V. MicroRNAs and human cancer // *Exp Oncol*. 2012. V. 34. N 1. - P.2-8.
187. Nuovo G.J., Wu X., Volinia S., Yan F., di Leva G., Chin N., Nicol A.F., Jiang J., Otterson G., Schmittgen T.D. Strong inverse correlation between microRNA-125b and human papillomavirus DNA in productive infection // *Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology, part B*. 2010. V. 19. N 3. - P.135.
188. O'Connell R.M., Taganov K.D., Boldin M.P., Cheng G., Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. V. 104. N 5. - P.1604-1609.
189. Ohdaira H., Sekiguchi M., Miyata K., Yoshida K. MicroRNA- 494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells // *Cell proliferation*. 2012. V. 45. N 1. - P.32-38.
190. Olsen P.H., Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation // *Developmental biology*. 1999. V. 216. N 2. - P.671-680.
191. Ørom U.A., Nielsen F.C., Lund A.H. MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation // *Molecular cell*. 2008. V. 30. N 4. - P.460-471.
192. Papagiannakopoulos T., Shapiro A., Kosik K.S. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells // *Cancer research*. 2008. V. 68. N 19. - P.8164-8172.
193. Park N.J., Li Y., Yu T., Brinkman B.M., Wong D.T. Characterization of RNA in saliva // *Clinical chemistry*. 2006. V. 52. N 6. - P.988-994.
194. Park N.J., Zhou H., Elashoff D., Henson B.S., Kastratovic D.A., Abemayor E., Wong D.T. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection // *Clinical Cancer Research*. 2009. V. 15. N 17. - P.5473-5477.
195. Park S.-M., Gaur A.B., Lengyel E., Peter M.E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2 // *Genes & development*. 2008. V. 22. N 7. - P.894-907.
196. Parkin D.M. The global health burden of infection- associated cancers in the year 2002 // *International journal of cancer*. 2006. V. 118. N 12. - P.3030-3044.
197. Pasquinelli A.E., Reinhart B.J., Slack F., Martindale M.Q., Kuroda M.I., Maller B., Hayward D.C., Ball E.E., Degnan B., Müller P. Conservation of the sequence and

- temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA // *Nature*. 2000. V. 408. N 6808. - P.86-89.
198. 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. V. 14. N 5. - P.844-852.
  199. Petrocca F., Visone R., Onelli M.R., Shah M.H., Nicoloso M.S., De Martino I., Iliopoulos D., Piloizzi E., Liu C.-G., Negrini M. E2F1-regulated microRNAs impair TGF $\beta$ -dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer // *Cancer cell*. 2008. V. 13. N 3. - P.272-286.
  200. Pezzolesi M.G., Platzer P., Waite K.A., Eng C. Differential expression of PTEN-targeting microRNAs miR-19a and miR-21 in Cowden syndrome // *The American Journal of Human Genetics*. 2008. V. 82. N 5. - P.1141-1149.
  201. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic acids research*. 2001. V. 29. N 9. - P.e45-e45.
  202. Pineau P., Volinia S., McJunkin K., Marchio A., Battiston C., Terris B., Mazzaferro V., Lowe S.W., Croce C.M., Dejean A. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. V. 107. N 1. - P.264-269.
  203. Polytarchou C., Iliopoulos D., Struhl K. An integrated transcriptional regulatory circuit that reinforces the breast cancer stem cell state // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. V. 109. N 36. - P.14470-14475.
  204. Pu X.x., Huang G.l., Guo H.q., Guo C.c., Li H., Ye S., Ling S., Jiang L., Tian Y., Lin T.y. Circulating miR- 221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression // *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2010. V. 25. N 10. - P.1674-1680.
  205. Qian B., Katsaros D., Lu L., Preti M., Durando A., Arisio R., Mu L., Yu H. High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF- $\beta$ 1 // *Breast cancer research and treatment*. 2009. V. 117. N 1. - P.131-140.
  206. Qin A.-Y., Zhang X.-W., Liu L., Yu J.-P., Li H., Wang S.-Z.E., Ren X.-B., Cao S. MiR-205 in cancer: An angel or a devil? // *European journal of cell biology*. 2013. V. 92. N 2. - P.54-60.
  207. Qin W., Ren Q., Liu T., Huang Y., Wang J. MicroRNA-155 is a novel suppressor of ovarian cancer-initiating cells that targets CLDN1 // *FEBS letters*. 2013. V. 587. N 9. - P.1434-1439.
  208. Qin W., Zhao B., Shi Y., Yao C., Jin L., Jin Y. BMPRII is a direct target of miR-21 // *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2009. V. 41. N 7. - P.618-623.
  209. Qu C., Liang Z., Huang J., Zhao R., Su C., Wang S., Wang X., Zhang R., Lee M.-H., Yang H. MiR-205 determines the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma by directly targeting PTEN // *Cell Cycle*. 2012. V. 11. N 4. - P.785-796.
  210. Queiroz A.B., Focchi G., Dobo C., Gomes T.S., Ribeiro D.A., Oshima C.T. Expression of P27, P21WAF/Cip1, and P16INK4a in normal oral epithelium, oral squamous papilloma, and oral squamous cell carcinoma // *Anticancer research*. 2010. V. 30. N 7. - P.2799-2803.
  211. Queiroz de Oliveira P.E., Zhang L., Wang Z., Reese C. Hypoxia-mediated regulation of Cdc25A phosphatase by p21 and miR-21 // *Cell Cycle*. 2009. V. 8. N 19. - P.3157-3164.
  212. Rai D., Kim S.-W., McKeller M.R., Dahia P.L., Aguiar R.C. Targeting of SMAD5 links microRNA-155 to the TGF- $\beta$  pathway and lymphomagenesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. V. 107. N 7. - P.3111-3116.
  213. Rather M.I., Nagashri M.N., Swamy S.S., Gopinath K.S., Kumar A. Oncogenic MicroRNA-155 Down-regulates Tumor Suppressor CDC73 and Promotes Oral



- Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation IMPLICATIONS FOR CANCER THERAPEUTICS // *Journal of Biological Chemistry*. 2013. V. 288. N 1. - P.608-618.
214. Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquinelli A.E., Bettinger J.C., Rougvie A.E., Horvitz H.R., Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. 2000. V. 403. N 6772. - P.901-906.
  215. Ren J., Zhu D., Liu M., Sun Y., Tian L. Downregulation of miR-21 modulates Ras expression to promote apoptosis and suppress invasion of Laryngeal squamous cell carcinoma // *European Journal of Cancer*. 2010. V. 46. N 18. - P.3409-3416.
  216. Ruxton G.D. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test // *Behavioral Ecology*. 2006. V. 17. N 4. - P.688-690.
  217. Saini H.K., Enright A.J., Griffiths-Jones S. Annotation of mammalian primary microRNAs // *BMC genomics*. 2008. V. 9. N 1. - P.564.
  218. Sampedro A., Alvarez C.A., Suarez C., Nistal A.M. Quantitative pathology of the intraepithelial laryngeal neoplasia // *Otolaryngology--Head and Neck Surgery*. 1994. V. 110. N 2. - P.185-194.
  219. Sandhu S.K., Volinia S., Costinean S., Galasso M., Neinast R., Santhanam R., Parthun M.R., Perrotti D., Marcucci G., Garzon R. miR-155 targets histone deacetylase 4 (HDAC4) and impairs transcriptional activity of B-cell lymphoma 6 (BCL6) in the Eμ-miR-155 transgenic mouse model // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. V. 109. N 49. - P.20047-20052.
  220. Sarkar J., Gou D., Turaka P., Viktorova E., Ramchandran R., Raj J.U. MicroRNA-21 plays a role in hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2010. V. 299. N 6. - P.L861-L871.
  221. Sayed D., Rane S., Lypowy J., He M., Chen I.-Y., Vashistha H., Yan L., Malhotra A., Vatner D., Abdellatif M. MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths // *Molecular biology of the cell*. 2008. V. 19. N 8. - P.3272-3282.
  222. Schickel R., Park S.-M., Murmann A.E., Peter M.E. miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1 // *Molecular cell*. 2010. V. 38. N 6. - P.908-915.
  223. Schramedei K., Mörbt N., Pfeifer G., Läuter J., Rosolowski M., Tomm J., von Bergen M., Horn F., Brocke-Heidrich K. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4 // *Oncogene*. 2011. V. 30. N 26. - P.2975-2985.
  224. Shi L., Chen J., Yang J., Pan T., Zhang S., Wang Z. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity // *Brain research*. 2010. V. 1352. - P.255-264.
  225. Shibuya H., Iinuma H., Shimada R., Horiuchi A., Watanabe T. Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer // *Oncology*. 2009. V. 79. N 3-4. - P.313-320.
  226. Shiiba M., Uzawa K., Tanzawa H. MicroRNAs in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and oral squamous cell carcinoma (OSCC) // *Cancers*. 2010. V. 2. N 2. - P.653-669.
  227. Shimono Y., Zabala M., Cho R.W., Lobo N., Dalerba P., Qian D., Diehn M., Liu H., Panula S.P., Chiao E. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells // *cell*. 2009. V. 138. N 3. - P.592-603.
  228. Shiohama A., Sasaki T., Noda S., Minoshima S., Shimizu N. Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region // *Biochemical and biophysical research communications*. 2003. V. 304. N 1. - P.184-190.

229. Somel M., Guo S., Fu N., Yan Z., Hu H.Y., Xu Y., Yuan Y., Ning Z., Hu Y., Menzel C. MicroRNA, mRNA, and protein expression link development and aging in human and macaque brain // *Genome research*. 2010. V. 20. N 9. - P.1207-1218.
230. Song H., Bu G. MicroRNA-205 inhibits tumor cell migration through down-regulating the expression of the LDL receptor-related protein 1 // *Biochemical and biophysical research communications*. 2009. V. 388. N 2. - P.400-405.
231. Stadler B.M., Ruohola-Baker H. Small RNAs: keeping stem cells in line // *cell*. 2008. V. 132. N 4. - P.563-566.
232. Stark A., Lin M.F., Kheradpour P., Pedersen J.S., Parts L., Carlson J.W., Crosby M.A., Rasmussen M.D., Roy S., Deoras A.N. Discovery of functional elements in 12 Drosophila genomes using evolutionary signatures // *Nature*. 2007. V. 450. N 7167. - P.219-232.
233. Sturgis E.M., Ang K.K. The epidemic of HPV-associated oropharyngeal cancer is here: is it time to change our treatment paradigms? // *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2011. V. 9. N 6. - P.665-673.
234. Summerer I., Niyazi M., Unger K., Pitea A., Zangen V., Hess J., Atkinson M.J., Belka C., Moertl S., Zitzelsberger H. Changes in circulating microRNAs after radiochemotherapy in head and neck cancer patients // *Radiat Oncol*. 2013. V. 8. N 1. - P.296.
235. Syrjänen S. Human papillomaviruses in head and neck carcinomas // *New England Journal of Medicine*. 2007. V. 356. N 19. - P.1993-1995.
236. Szczyrba J., Nolte E., Hart M., Döll C., Wach S., Taubert H., Keck B., Kremmer E., Stöhr R., Hartmann A. Identification of ZNF217, hnRNP- K, VEGF- A and IPO7 as targets for microRNAs that are downregulated in prostate carcinoma // *International journal of cancer*. 2013. V. 132. N 4. - P.775-784.
237. Takahashi M., Eda A., Fukushima T., Hohjoh H. Reduction of type IV collagen by upregulated miR-29 in normal elderly mouse and klotho-deficient, senescence-model mouse // *PloS one*. 2012. V. 7. N 11. - P.e48974.
238. Tanic M., Zajac M., Gómez-López G., Benítez J., Martínez-Delgado B. Integration of BRCA1-mediated miRNA and mRNA profiles reveals microRNA regulation of TRAF2 and NFκB pathway // *Breast cancer research and treatment*. 2012. V. 134. N 1. - P.41-51.
239. Teng G., Papavasiliou F.N. Shhh! silencing by microRNA-155 // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009. V. 364. N 1517. - P.631-637.
240. Teta M., Choi Y.S., Okegbe T., Wong G., Tam O.H., Chong M.M., Seykora J.T., Nagy A., Littman D.R., Andl T. Inducible deletion of epidermal Dicer and Drosha reveals multiple functions for miRNAs in postnatal skin // *Development*. 2012. V. 139. N 8. - P.1405-1416.
241. Thum T., Gross C., Fiedler J., Fischer T., Kissler S., Bussen M., Galuppo P., Just S., Rottbauer W., Frantz S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts // *Nature*. 2008. V. 456. N 7224. - P.980-984.
242. Tian L., Zhang J., Ge J., Xiao H., Lu J., Fu S., Liu M., Sun Y. MicroRNA-205 suppresses proliferation and promotes apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma // *Medical Oncology*. 2014. V. 31. N 1. - P.1-10.
243. Tili E., Michaille J.-J., Wernicke D., Alder H., Costinean S., Volinia S., Croce C.M. Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. V. 108. N 12. - P.4908-4913.
244. Tran N., McLean T., Zhang X., Zhao C.J., Thomson J.M., O'Brien C., Rose B. MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines // *Biochemical and biophysical research communications*. 2007. V. 358. N 1. - P.12-17.
245. Uhlmann S., Zhang J., Schwäger A., Mannsperger H., Riazalhosseini Y., Burmester S., Ward A., Korf U., Wiemann S., Sahin Ö. miR-200bc/429 cluster targets PLCγ1 and

- differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer // *Oncogene*. 2010. V. 29. N 30. - P.4297-4306.
246. Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J., Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs // *Genes & development*. 2006. V. 20. N 5. - P.515-524.
  247. Valeri N., Gasparini P., Braconi C., Paone A., Lovat F., Fabbri M., Sumani K.M., Alder H., Amadori D., Patel T. MicroRNA-21 induces resistance to 5-fluorouracil by down-regulating human DNA MutS homolog 2 (hMSH2) // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. V. 107. N 49. - P.21098-21103.
  248. Vallejo D.M., Caparros E., Dominguez M. Targeting Notch signalling by the conserved miR- 8/200 microRNA family in development and cancer cells // *The EMBO journal*. 2011. V. 30. N 4. - P.756-769.
  249. Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management // *Oral oncology*. 2009. V. 45. N 4. - P.317-323.
  250. Volinia S., Calin G.A., Liu C.-G., Ambs S., Cimmino A., Petrocca F., Visone R., Iorio M., Roldo C., Ferracin M. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006. V. 103. N 7. - P.2257-2261.
  251. von Roretz C., Gallouzi I.-E. Decoding ARE-mediated decay: is microRNA part of the equation? // *The Journal of cell biology*. 2008. V. 181. N 2. - P.189-194.
  252. Wald A.I., Hoskins E.E., Wells S.I., Ferris R.L., Khan S.A. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus // *Head & neck*. 2011. V. 33. N 4. - P.504-512.
  253. Wang P., Zou F., Zhang X., Li H., Dulak A., Tomko R.J., Lazo J.S., Wang Z., Zhang L., Yu J. microRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells // *Cancer research*. 2009. V. 69. N 20. - P.8157-8165.
  254. Wang Y., Medvid R., Melton C., Jaenisch R., Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal // *Nature genetics*. 2007. V. 39. N 3. - P.380-385.
  255. Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J., Galas D.J., Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids // *Clinical chemistry*. 2010. V. 56. N 11. - P.1733-1741.
  256. Weller M., Nankivell P.C., McConkey C., Paleri V., Mehanna H.M. The risk and interval to malignancy of patients with laryngeal dysplasia; a systematic review of case series and meta- analysis // *Clinical otolaryngology*. 2010. V. 35. N 5. - P.364-372.
  257. Wickramasinghe N.S., Manavalan T.T., Dougherty S.M., Riggs K.A., Li Y., Klinge C.M. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells // *Nucleic acids research*. 2009. V. 37. N 8. - P.2584-2595.
  258. Wightman B., Ha I., Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans* // *cell*. 1993. V. 75. N 5. - P.855-862.
  259. Wiklund E.D., Bramsen J.B., Hulf T., Dyrskjot L., Ramanathan R., Hansen T.B., Villadsen S.B., Gao S., Ostensfeld M.S., Borre M. Coordinated epigenetic repression of the miR- 200 family and miR- 205 in invasive bladder cancer // *International journal of cancer*. 2011. V. 128. N 6. - P.1327-1334.
  260. Wittmann J., Jäck H.-M. Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2010. V. 1806. N 2. - P.200-207.
  261. Woese C. The genetic code // 1967.

262. Wong T.-S., Liu X.-B., Wong B.Y.-H., Ng R.W.-M., Yuen A.P.-W., Wei W.I. Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue // *Clinical Cancer Research*. 2008. V. 14. N 9. - P.2588-2592.
263. Wu B.-h., Xiong X.-p., Jia J., Zhang W.-f. MicroRNAs: new actors in the oral cancer scene // *Oral oncology*. 2011. V. 47. N 5. - P.314-319.
264. Wu H., Zhu S., Mo Y.-Y. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer // *Cell research*. 2009. V. 19. N 4. - P.439-448.
265. Xiang X., Zhuang X., Ju S., Zhang S., Jiang H., Mu J., Zhang L., Miller D., Grizzle W., Zhang H. miR-155 promotes macroscopic tumor formation yet inhibits tumor dissemination from mammary fat pads to the lung by preventing EMT // *Oncogene*. 2011. V. 30. N 31. - P.3440-3453.
266. Xie H., Zhao Y., Caramuta S., Larsson C., Lui W.-O. miR-205 expression promotes cell proliferation and migration of human cervical cancer cells // *PloS one*. 2012. V. 7. N 10. - P.e46990.
267. Xu J., Li C.-X., Li Y.-S., Lv J.-Y., Ma Y., Shao T.-T., Xu L.-D., Wang Y.-Y., Du L., Zhang Y.-P. MiRNA-miRNA synergistic network: construction via co-regulating functional modules and disease miRNA topological features // *Nucleic acids research*. 2011. V. 39. N 3. - P.825-836.
268. Yamanaka S., Campbell N.R., An F., Kuo S.C., Potter J.J., Mezey E., Maitra A., Selaru F.M. Coordinated effects of microRNA-494 induce G<sub>2</sub>/M arrest in human cholangiocarcinoma // *Cell Cycle*. 2012. V. 11. N 14. - P.2729-2738.
269. Yan L.-X., Huang X.-F., Shao Q., Huang M.-Y., Deng L., Wu Q.-L., Zeng Y.-X., Shao J.-Y. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis // *Rna*. 2008. V. 14. N 11. - P.2348-2360.
270. Yan L.X., Wu Q.N., Zhang Y., Li Y.Y., Liao D.Z., Hou J.H., Fu J., Zeng M.S., Yun J.P., Wu Q.L. Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth // *Breast Cancer Res*. 2011. V. 13. N 1. - P.R2.
271. Yan W., Yu W., Than S., Hu Z., Zhou H., Wong D. Salivaomics Knowledge Base (SKB)[abstract 1179]. 2008.
272. Yan X.L., Jia Y.L., Chen L., Zeng Q., Zhou J.N., Fu C.J., Chen H.X., Yuan H.F., Li Z.W., Shi L. Hepatocellular carcinoma- associated mesenchymal stem cells promote hepatocarcinoma progression: Role of the S100A4- miR155- SOCS1- MMP9 axis // *Hepatology*. 2013. V. 57. N 6. - P.2274-2286.
273. Yang C.-S., Li Z., Rana T.M. microRNAs modulate iPS cell generation // *Rna*. 2011. V. 17. N 8. - P.1451-1460.
274. Yang C.-S., Rana T.M. Learning the molecular mechanisms of the reprogramming factors: let's start from microRNAs // *Mol. BioSyst*. 2012. V. 9. N 1. - P.10-17.
275. Yang M., Shen H., Qiu C., Ni Y., Wang L., Dong W., Liao Y., Du J. High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer // *European Journal of Cancer*. 2013. V. 49. N 3. - P.604-615.
276. Yang Y., Li Y.-x., Yang X., Jiang L., Zhou Z.-j., Zhu Y.-q. Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis // *BMC cancer*. 2013. V. 13. N 1. - P.129.
277. Yelamanchili S.V., Chaudhuri A.D., Chen L.-N., Xiong H., Fox H.S. MicroRNA-21 dysregulates the expression of MEF2C in neurons in monkey and human SIV/HIV neurological disease // *Cell death & disease*. 2010. V. 1. N 9. - P.e77.
278. Yi R., Pasolli H.A., Landthaler M., Hafner M., Ojo T., Sheridan R., Sander C., O'Carroll D., Stoffel M., Tuschl T. DGCR8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. V. 106. N 2. - P.498-502.

279. Yu J., Peng H., Ruan Q., Fatima A., Getsios S., Lavker R.M. MicroRNA-205 promotes keratinocyte migration via the lipid phosphatase SHIP2 // *The FASEB journal*. 2010. V. 24. N 10. - P.3950-3959.
280. Yue X., Wang P., Xu J., Zhu Y., Sun G., Pang Q., Tao R. MicroRNA-205 functions as a tumor suppressor in human glioblastoma cells by targeting VEGF-A // *Oncology reports*. 2012. V. 27. N 4. - P.1200-1206.
281. Zamore P.D., Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs // *Science*. 2005. V. 309. N 5740. - P.1519-1524.
282. Zeng Y., Cullen B.R. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells // *Rna*. 2003. V. 9. N 1. - P.112-123.
283. Zhang C., Zhao J., Deng H. 17 $\beta$ -Estradiol up-regulates miR-155 expression and reduces TP53INP1 expression in MCF-7 breast cancer cells // *Molecular and cellular biochemistry*. 2013. V. 379. N 1-2. - P.201-211.
284. Zhang L., Farrell J.J., Zhou H., Elashoff D., Akin D., Park N.H., Chia D., Wong D.T. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer // *Gastroenterology*. 2010. V. 138. N 3. - P.949-957. e7.
285. Zhang P., Bill K., Liu J., Young E., Peng T., Bolshakov S., Hoffman A., Song Y., Demicco E.G., Terrada D.L. MiR-155 is a liposarcoma oncogene that targets casein kinase-1 $\alpha$  and enhances  $\beta$ -catenin signaling // *Cancer research*. 2012. V. 72. N 7. - P.1751-1762.
286. Zhang X., Li M., Zuo K., Li D., Ye M., Ding L., Cai H., Fu D., Fan Y., Lv Z. Upregulated miR-155 in papillary thyroid carcinoma promotes tumor growth by targeting APC and activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013. V. 98. N 8. - P.E1305-E1313.
287. Zhang Z., Li Z., Gao C., Chen P., Chen J., Liu W., Xiao S., Lu H. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression // *Laboratory investigation*. 2008. V. 88. N 12. - P.1358-1366.
288. Zhao X.-d., Zhang W., Liang H.-j., Ji W.-y. Overexpression of miR-155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3 // *PloS one*. 2013. V. 8. N 2. - P.e56395.
289. Zheng J., Xue H., Wang T., Jiang Y., Liu B., Li J., Liu Y., Wang W., Zhang B., Sun M. miR-21 downregulates the tumor suppressor P12CDK2AP1 and Stimulates Cell Proliferation and Invasion // *Journal of cellular biochemistry*. 2011. V. 112. N 3. - P.872-880.
290. Zheng Z.-M., Wang X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2011. V. 1809. N 11. - P.668-677.
291. Zhou J.-J., Zheng S., Sun L.-F., Zheng L. MicroRNA regulation network in colorectal cancer metastasis // *World journal of biological chemistry*. 2014. V. 5. N 3. - P.301.
292. Zhu S., Si M.-L., Wu H., Mo Y.-Y. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1) // *Journal of Biological Chemistry*. 2007. V. 282. N 19. - P.14328-14336.
293. Zhu W., Zhao Y., Xu Y., Sun Y., Wang Z., Yuan W., Du Z. Dissection of protein interactomics highlights MicroRNA synergy // *PloS one*. 2013. V. 8. N 5. - P.e63342.
294. Zidar N., Boštjančič E., Gale N., Kojc N., Poljak M., Glavač D., Cardesa A. Down-regulation of microRNAs of the miR-200 family and miR-205, and an altered expression of classic and desmosomal cadherins in spindle cell carcinoma of the head and neck—hallmark of epithelial-mesenchymal transition // *Human pathology*. 2011. V. 42. N 4. - P.482-488.
295. Албертс Б.А., Брей Д.Д., Льюис Д., Рэфф М., Роберте К., Уотсон Д. Молекулярная биология клетки. - М. : Мир, 1994.

296. Киселев Ф.Л. Вирус-ассоциированные опухоли человека // Биохимия. 2000. V. №65. - P.68-77.
297. Колесников Н., Титов С., Веряскина Ю., Карпинская Е., Шевченко С., Ахмерова Л., Иванов М., Козлов В., Елисафенко Е., Гуляева Л. МикроРНК, Эволюция и рак // Цитология. 2013. V. 55. N 3. - P.159-164.
298. Куевда Д., Шипулина О. ВПЧ-тестирование: алгоритмы диагностики и требования к молекулярным тестам для выявления вирусов папилломы человека // Профілактична. 2008. - P.75.
299. Осипов В.Д. Влияние загрязнения атмосферного воздуха в крупном промышленном городе на эпидемиологию рака гортани // Российская оториноларингология. 2005. V. №5. - P.3.
300. Пачес А.И. Опухоли головы и шеи. - Москва : Медицина, 2000. - 480.
301. Хансон К.П., Имянитов Е.Н. Современные представления о канцерогенезе рака шейки матки // Практическая онкология. 2002. V. 3. N 3. - P.145-155.
302. Чехун В. Ф., Шербан С.Д., Савцова З.Д. Гетерогенность опухоли – динамическое состояние // Онкология. 2012. V. T.14. N №1. - P.7.
303. Чумаков Ф. И. Р.Т.А. О распространенности и некоторых особенностях хронического гиперпластического ларингита // Вестник Оториноларингологии. 2002. V. №2. - P.3.