

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco637133>

Вирусные микроРНК при HPV16-ассоциированном раке шейки матки: анализ экспрессии, диагностического потенциала и биологических функций

Н.В. Елкина, М.Д. Федорова, Р.С. Фасхутдинов, Ю.О. Юрченко, К.И. Жордания, Е.А. Мустафина, Л.С. Павлова, С.В. Винокурова

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Рак шейки матки (РШМ) — четвертое по частоте встречаемости и смертности онкозаболевание среди женщин в мире. Вирусы папиллом человека (англ. human papillomaviruses, HPVs) высокого канцерогенного риска являются этиологическим фактором развития РШМ более чем в 90% случаев, при этом на долю HPV типа 16 (HPV16) приходится более 1/2 всех случаев. Дерегуляция экспрессии вирусных онкогенов *E6* и *E7* — основная причина онкотрансформации инфицированных клеток эпителия шейки матки. Механизмы нарушения их экспрессии до сих пор недостаточно изучены. Одной из таких причин может быть нарушение работы вирусных микроРНК.

Цель. Анализ экспрессии кодируемых HPV16 микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 в образцах РШМ, оценка корреляции их экспрессии с вирусной нагрузкой и общей выживаемостью пациентов, а также *in silico* анализ их потенциальных вирусных и клеточных мишеней.

Материалы и методы. Экспрессию HPV16-микроРНК-Н1 и HPV16-микроРНК-Н2 оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, для этого выделяли фракцию малых РНК из 36 образцов HPV16-положительных плоскоклеточных карцином шейки матки. После этого определяли вирусную нагрузку, рассчитывая параметр «копии ДНК HPV16 на клетку». Зависимость экспрессии микроРНК от вирусной нагрузки оценивали с помощью непараметрического коэффициента корреляции Спирмена. Кривые Каплана–Майера строили для анализа зависимости 5-летней общей выживаемости от уровня экспрессии вирусных микроРНК. Для *in silico* поиска теоретических мишеней микроРНК использовали алгоритм miRanda и онлайн-сервисы miRDB, MR-microT и TargetScan Custom 5.2.

Результаты. Экспрессия микроРНК-Н1 выявлена в 33 из 38 образцов (86,8%), а микроРНК-Н2 детектировалась в 37 из 38 образцов (97,4%) HPV16-положительного РШМ. Получена положительная корреляция экспрессии как микроРНК-Н1 ($r=0,36$, $p=0,042$), так и микроРНК-Н2 ($r=0,51$, $p=0,001$) с вирусной нагрузкой HPV16. Прослеживается тенденция к лучшей общей выживаемости пациентов при более высокой экспрессии вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2. *In silico* определены теоретические мишени в геноме HPV16 для микроРНК-Н1 (*E7*, *E2*, *E5*, *L2* и URR) и микроРНК-Н2 (*E1*, *E2*, *E5*, *L2*, *L1*, URR), а также теоретические клеточные мишени, указывающие на возможную регуляцию клеточных сигнальных путей с помощью вирусных микроРНК, — как поддерживающих нормальный вирусный цикл, так и способствующих опухолевой трансформации.

Заключение. Результаты исследования указывают на перспективность дальнейшего изучения функций вирусных микроРНК при инфекции и вирус-индуцированной онкотрансформации, и их потенциала для диагностики HPV16-ассоциированных онкопатологий.

Ключевые слова: HPV16; эпигенетика; вирусные микроРНК; HPV16-микроРНК-Н1; HPV16-микроРНК-Н2; рак шейки матки.

Как цитировать:

Елкина Н.В., Федорова М.Д., Фасхутдинов Р.С., Юрченко Ю.О., Жордания К.И., Мустафина Е.А., Павлова Л.С., Винокурова С.В. Вирусные микроРНК при HPV16-ассоциированном раке шейки матки: анализ экспрессии, диагностического потенциала и биологических функций // Российский онкологический журнал. 2024. Т. 29, № 3. С. 183–194. DOI: <https://doi.org/10.17816/onco637133>

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco637133>

Viral microRNA in HPV16-associated cervical cancer: expression, diagnostic potential, and biological functions

Nadezhda V. Elkina, Maria D. Fedorova, Radik S. Faskhutdinov, Iuliia O. Iurchenko, Kirill I. Zhordaniya, Ekaterina A. Mustafina, Larisa S. Pavlova, Svetlana V. Vinokurova

Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Cervical cancer (CC) is the fourth most common cancer among women worldwide in terms of incidence and mortality. High-risk human papillomaviruses (HPVs) are etiologic factor of CC in more than 90% of cases, with type 16 HPV (HPV16) revealed in >50% of cancers. Dysregulation of expression of viral oncogenes *E6* and *E7* is the main cause of malignant transformation in infected cervical epithelial cells. The mechanisms of impaired expression of these genes are still underexplored. The dysfunction of viral microRNAs may be among the underlying factors.

AIM: To analyze the expression of HPV16-associated microRNA-H1 and microRNA-H2 in cervical cancer specimens, evaluate the correlation of their expression to viral load and overall patient survival, and analyze *in silico* their potential viral and cellular targets.

MATERIALS AND METHODS: The expression of HPV16 microRNA-H1 and HPV16 microRNA-H2 was evaluated in the real-time polymerase chain reaction. With this purpose, small RNAs were isolated from 36 specimens of HPV16-positive squamous cell carcinomas of the cervix. Further, the viral load was assessed after calculating the value of HPV16 DNA copies per cell. The association between microRNA expression and the viral load was evaluated using the nonparametric Spearman's correlation coefficient. Kaplan-Meier curves were plotted to analyze the dependence of 5-year overall survival on the level of viral microRNA expression. The miRanda algorithm and online services mirDB, MR-microT and TargetScan Custom 5.2 were used for *in silico* search of theoretical microRNA targets.

RESULTS: MicroRNA-H1 expression was revealed in 33 of 38 specimens (86.8%), microRNA-H2 was detected in 37 of 38 specimens (97.4%) of HPV16-positive cervical cancer. There was a positive correlation between both microRNA-H1 ($r=0.36$, $p=0.042$) and microRNA-H2 ($r=0.51$, $p=0.001$) expression and HPV16 viral load. Higher level of expression of viral microRNA-H1 and microRNA-H2 tended to correlate with better overall patient survival. The theoretical microRNA-H1 (*E7*, *E2*, *E5*, *L2* and URR) and microRNA-H2 (*E1*, *E2*, *E5*, *L2*, *L1*, URR) targets in the HPV16 genome were identified *in silico*, as well as theoretical cellular targets indicating possible regulation of cellular signaling pathways by means of viral microRNAs, both controlling normal viral cycle and promoting tumor transformation.

CONCLUSION: The results of this study demonstrate promising further investigation of the functions of viral microRNAs in relation with the infectious process and virus-induced malignant transformation, and their potential importance in the diagnosis of HPV16-associated cancers.

Keywords: HPV16; epigenetics; viral microRNAs; HPV16 microRNA-H1; HPV16 microRNA-H2; cervical cancer.

To cite this article:

Elkina NV, Fedorova MD, Faskhutdinov RS, Iurchenko IO, Zhordania KI, Mustafina EA, Pavlova LS, Vinokurova SV. Viral microRNA in HPV16-associated cervical cancer: expression, diagnostic potential, and biological functions. *Russian Journal of Oncology*. 2024;29(3):183–194.

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco637133>

Submitted: 16.10.2024

Accepted: 30.11.2024

Published online: 06.12.2024

ОБОСНОВАНИЕ

По данным международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, IARC) около 12% всех онкозаболеваний (2 300 000 случаев) приходится на патологии, ассоциированные с инфекционными патогенами, включая бактерии, вирусы и паразиты [1]. Среди этих заболеваний порядка 65% (1 490 000 случаев) приходится на онкогенные вирусы. На сегодняшний день к онкогенным относят ДНК-содержащие вирус гепатита В (англ. hepatitis B virus, HBV), вирусы папилломы человека высокого онкогенного риска (англ. high-risk human papillomaviruses, HR-HPVs), вирус Эпштейна–Барр (англ. Epstein–Barr virus, EBV), вирус саркомы Капоши (англ. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus, KSHV), полиомавирус клеток Меркеля (англ. Merkel cell polyomavirus, MCPyV) и РНК-содержащие вирус гепатита С (англ. hepatitis C virus, HCV) и вирус Т-клеточного лейкоза человека (англ. human T-cell lymphotropic virus type 1, HTLV-1). Онкогенные вирусы используют различные стратегии для поддержания нормального вирусного цикла, которые при персистенции вируса и дополнительных факторах риска способствуют онкотрансформации инфицированных клеток [2]. Одна из таких стратегий — изменение эпигенетических механизмов регуляции экспрессии клеточных и вирусных генов [3]. При этом онкогенные вирусы способны не только модулировать клеточные эпигенетические процессы, но и использовать собственные инструменты, а именно вирусные микроРНК, которые в настоящее время рассматриваются как ключевые инфекционные факторы, наряду с вирусными онкобелками.

МикроРНК представляют собой короткие РНК-олигонуклеотиды длиной 17–25 оснований; это одни из основных эпигенетических регуляторов генной экспрессии [4, 5]. Вирусные микроРНК, впервые открытые в 2004 г. для вируса Эпштейна–Барр [6], играют важную роль в регуляции вирусного цикла, модулируя экспрессию вирусных и клеточных генов. В соответствии с базой данных по микроРНК miRBase [7] на сегодняшний день аннотировано и экспериментально подтверждено наличие 320 предшественников микроРНК для 34 различных вирусов, дающих начало более чем 500 зрелым формам вирусных микроРНК. Среди вирусов, имеющих свои микроРНК, по данным miRBase к онкогенным относятся 3: вирус Эпштейна–Барр, вирус саркомы Капоши и полиомавирус клеток Меркеля. Для EBV известно 25 предшественников 44 зрелых форм микроРНК, для KSHV — 13 предшественников 25 зрелых форм микроРНК, для MCPyV — 1 предшественник 2 зрелых форм микроРНК. Помимо этих 3 вирусов, имеются экспериментальные доказательства существования функциональной микроРНК у вируса гепатита В с подтвержденными биологическими функциями в экспериментах *in vitro* [8]. Вирусные микроРНК, регулируя экспрессию

клеточных и вирусных генов и модулируя процессы пролиферации, апоптоза, миграции и иммунного ответа, способны поддерживать как нормальный вирусный цикл, так и вызывать нарушения работы клеточных сигнальных путей, ассоциированных с канцерогенезом, что способствует запуску необратимых процессов онкотрансформации [9, 10].

HR-HPVs являются причиной более 730 000 случаев онкозаболеваний различных локализаций (31,7% всех онкопатологий, ассоциированных с инфекционными агентами) [11]. Рак шейки матки (РШМ) — 4-е онкозаболевание по частоте встречаемости и смертности в мире среди женщин [12] и самый частый тип рака, ассоциированный с HR-HPVs (80%, или 570 000 от всех случаев HPV-ассоциированных онкопатологий) [13]. HR-HPVs являются этиологическим фактором развития РШМ более чем в 90% случаев [13], среди которых HPV16 — самый распространённый тип HPV при РШМ (более 50% всех случаев HPV-положительного РШМ) [11]. Дерегуляция экспрессии основных вирусных онкогенов *E6* и *E7*, ингибирующих работу основных клеточных белков-онкосупрессоров p53 и Rb, является главной причиной онкотрансформации. При этом механизмы такой дерегуляции до сих пор не изучены. Одной из причин может быть нарушение в работе недавно открытых вирусных микроРНК HPV16.

На сегодняшний день известно 9 микроРНК, кодируемых различными типами HPV: HPV6, HPV16, HPV38, HPV45 и HPV68 [14]. Для HPV16 экспериментально подтверждено наличие 4 микроРНК (HPV16-микроРНК-H1, HPV16-микроРНК-H3, HPV16-микроРНК-H5 и HPV16-микроРНК-H6) [15]. Однако эти микроРНК имели крайне низкий уровень экспрессии, который оценён на небольшой и гетерогенной выборке образцов цервикальных поражений различной степени тяжести, инфицированных различными типами HR-HPVs. Анализ HPV16-микроРНК на широкой и однородной с точки зрения стадирования заболевания и HPV инфекции выборке клинических образцов позволит выявить закономерности паттерна их экспрессии, ассоциации с уровнем вирусной нагрузки и экспрессии вирусных онкогенов. Такой анализ обеспечит более надёжный подход к поиску потенциальных биологических мишеней вирусных микроРНК, что позволит расширить современные представления о регуляции нормального вирусного цикла и изучить новые механизмы дерегуляции экспрессии вирусных онкогенов HPV16 и связанной с этим онкотрансформации.

Цель исследования — анализ экспрессии кодируемых HPV16 микроРНК-H1 и микроРНК-H2 в образцах РШМ, оценка корреляции их экспрессии с вирусной нагрузкой и общей выживаемостью пациентов, а также *in silico* анализ их потенциальных вирусных и клеточных мишеней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика образцов рака шейки матки

Для анализа экспрессии вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 использовали 36 постоперационных образцов HPV16-положительного плоскоклеточного РШМ от пациентов, проходивших лечение в отделении онкогинекологии Научно-исследовательского института клинической онкологии Научного медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 2000 по 2006 г. (табл. 1).

Описание методологии исследования

Клеточные линии

В работе использовали HPV16-положительные цервикальные клеточные линии SiHa и Ca Ski, и HPV-отрицательные линии C33a (цервикальная линия, American Type Culture Collection, США), и HaCaT (спонтанно иммортализованные кератиноциты кожи, CLS, cell line service, DKFZ, Heidelberg). Клетки культивировали в ростовой среде DMEM (#C410E, ПанЭко, Россия) с добавлением антибиотиков Pen-Strep Solution ×10 (#03-031-5B, Biological Industries Israel Beit Haemek LTD, Израиль) до конечных концентраций 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и фетальной бычьей сыворотки (#S1810-500, Biowest, Франция) до 10%. Культивирование осуществляли в CO₂-инкубаторе N-BIOTEK ND-203 (Республика Корея) при 37 °C и 5% CO₂.

Таблица 1. Основные характеристики клинических образцов плоскоклеточного рака шейки матки, используемых в работе

Table 1. Main characteristics of cervical squamous cell carcinoma clinical specimens used in the work

Характеристика	Значение
Возраст, лет	Me 42 [35–50]
Размер первичного очага, <i>n</i> (%)	T1 — 27 (75%) T2 — 9 (25%)
Регионарные метастазы в лимфатические узлы, <i>n</i> (%)	N0 — 23 (64%) N1 — 13 (36%)
Отдалённые метастазы, <i>n</i>	M0 — 36 (100%)
Стадия заболевания, <i>n</i> (%)	I — 15 (42%) II — 8 (22%) III — 13 (36%)
5-летняя общая выживаемость, <i>n</i> (%)	>5 лет — 16 (44%) <5 лет — 10 (28%) Выбыло из исследования — 10 (28%)
Общее количество образцов, <i>n</i> (%)	36 (100%)

Выделение ДНК

ДНК из свежемороженых тканей выделяли с использованием набора ExtractDNA Blood & Cells (#BC111M, Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя и хранили при –20 °C. Концентрацию оценивали с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific, США).

Определение вирусной нагрузки HPV16 в образцах рака шейки матки

Для оценки вирусной нагрузки использовали набор для качественного и количественного определения и дифференциации ДНК ВПЧ ВКР «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL» (#N-2261-1-13, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Россия) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). В качестве матрицы для ПЦР-РВ использовали 50 нг геномной ДНК из свежемороженых тканей плоскоклеточного РШМ. Приготовление ПЦР-смесей и постановку ПЦР-РВ осуществляли в соответствии с инструкцией производителя. ПЦР-РВ проводили с использованием амплификатора CFX96 Touch (BioRad laboratories, Inc, США). Для расчёта количества копий ДНК HPV16 и копий β-глобина использовали калибровочные кривые, получаемые в результате ПЦР-РВ при использовании набора. Расчёт вирусной нагрузки производили по формуле: (количество копий ДНК HPV16)/((кол-во копий β-глобина)×0,5). В результате получали значение вирусной нагрузки в единицах измерения «копии ДНК HPV16 на клетку».

Выделение микроРНК

Фракцию малых РНК выделяли из образцов свежемороженых тканей плоскоклеточного РШМ с использованием набора The Ambion™ PureLink™ miRNA Isolation Kit (#K157001, Invitrogen™, США) и реагента TRIzol™ Reagent (#15596018, Invitrogen™, США). Для улучшения качества микроРНК гомогенизацию и лизис тканей сначала проводили с использованием TRIzol™ Reagent. Лизаты в соответствии с инструкцией обрабатывали до получения водной фазы, которую затем очищали от примесей ДНК и РНК с помощью набора PureLink™ miRNA Isolation Kit согласно рекомендациям производителя. Выделенную микроРНК хранили при –70 °C. Концентрацию микроРНК измеряли с использованием флуориметра The Qubit™ 2.0 (Invitrogen™, США) и набора для оценки концентрации микроРНК Qubit™ microRNA Assay Kit (#Q32881, Invitrogen™, США).

Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2

Для оценки уровня экспрессии вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 сначала проводили обратную транскрипцию (ОТ) с использованием методики stem-loop, описанной Chen и соавт. [16]. Для этого мы разработали праймеры для ОТ с последующей амплификацией в режиме

реального времени с TaqMan-зондами, последовательности которых можем предоставить по запросу.

Для ОТ использовали набор реагентов фирмы Диалат (Диалат ЛТД., Россия). Конечная реакционная смесь объёмом 25 мкл содержала 25 нг очищенной микроРНК без примесей ДНК/РНК, 1 пмоль ОТ-праймеров для микроРНК-Н1 или микроРНК-Н2 и 1 пмоль ОТ-праймера для U6, 50 ед обратной транскриптазы (#RT-10) и однократный буфер для обратной транскрипции (#RTM-100). Реакцию ОТ проводили в следующем режиме: 25 °С — 10 мин, 42 °С — 30 мин, 85 °С — 5 мин. Полученную кДНК хранили при –20 °С.

ПЦР-РВ проводили с использованием готовой смеси 5X qPCRmix-HS (#PK145L, Евроген, Россия). Конечная реакционная смесь для амплификации вирусных микроРНК объёмом 20 мкл содержала однократную смесь qPCRmix-HS; 2 пмоль прямого (специфического для конкретной микроРНК) праймера; 1 пмоль обратного (универсального) праймера; 0,2 пмоль Taqman-зонда и 1 мкл кДНК, полученной в результате ОТ. Режим ПЦР-РВ для детекции микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 был следующий: 95 °С — 5 мин; 45 циклов, включающих этапы 95 °С, — 15 с, 52 °С — 1 мин и детекцию сигнала. Конечная реакционная смесь для амплификации внутреннего контроля и референсного гена для оценки относительной экспрессии микроРНК — малой ядерной РНК U6 объёмом 20 мкл — содержала: однократную смесь qPCRmix-HS; 1 пмоль прямого и обратного праймера; 0,2 пмоль Taqman-зонда и 1 мкл в 10 раз разведённой кДНК, полученной в результате ОТ. Режим ПЦР-РВ для детекции U6 содержал следующие этапы: 95 °С — 5 мин; 35 циклов, включающих этапы 95 °С, — 15 с, 60 °С — 1 мин и детекцию сигнала. Для ПЦР-РВ использовали амплификатор CFX96 Touch (BioRad laboratories, Inc, США).

Биоинформатический поиск мишеней микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2

Для поиска потенциальных сайтов взаимодействия вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 в геноме HPV16 (GenBank: AF125673.1) использовали алгоритм miRanda [17]. Значимыми считали сайты, которые отвечали следующим критериям включения: пороговая оценка (Score) не ниже 120 и отрицательная энергия взаимодействия (ккал/моль) не выше –10. Алгоритм запускали с помощью онлайн-платформы SRplot [18].

Поиск потенциальных клеточных мишеней вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 вели с использованием 3 онлайн-сервисов: miRDB [19, 20], TargetScan Custom 5,2 [21] и MR-microT [22, 23], использующих различные алгоритмы поиска сайтов взаимодействия с целевыми последовательностями, что позволяет более достоверно определить теоретические гены-мишени. Значимыми генами-мишенями для miRDB считали гены с пороговой оценкой (Score) ≥ 50 , для MR-microT — с пороговой оценкой $\geq 0,5$, для TargetScan Custom 5.2 пороговые значения

определялись алгоритмом. Полученные мишени сравнили между собой с помощью Venn Diagramm* и гены-мишени, выявленные хотя бы 2 сервисами, в дальнейшем анализировали для обогащения категорий с использованием онлайн-сервиса Metascape (v3.5.20240901) [24] со стандартными настройками анализа. В результате получены 20 наиболее значимых категорий с $\log P$ -value < -5 , теоретически регулируемые микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2. Визуализировали Венн-объединения и обогащения категорий с помощью SRplot [18].

Этическая экспертиза

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина (протокол № 7 от 25.07.2024).

Анализ данных и статистическая обработка

Для анализа вирусной нагрузки оценивали результаты ПЦР-РВ и рассчитывали количество копий ДНК HPV16 на клетку с помощью Microsoft Excel 2016. Уровень экспрессии вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 определяли Ct-методом $\Delta\Delta Ct$ [25], вычисляя значение $-\Delta Ct$ для каждого образца с использованием Microsoft Excel 2016 по формуле: $-(Ct \text{ микроРНК}) - (Ct \text{ U6})$. Тепловую карту зависимости экспрессии вирусных микроРНК от вирусной нагрузки строили в онлайн-программе SRplot [18]. Анализ корреляции экспрессии вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 и вирусной нагрузки проводили с помощью непараметрического коэффициента корреляции Спирмена в программе GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, LLC, США). Значимой считали корреляцию при $p < 0,05$. Группы пациентов с низкими и высокими уровнями экспрессии микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 определяли с помощью пакета для среды программирования R, позволяющего выявить пороговые значения для разделения различных массивов данных, используя параметр MaxSpSe [26]. Графики Каплана–Майера для 5-летней общей выживаемости строили и оценивали в онлайн-сервисе SRplot [18]. Значимой считали разницу в кривых выживаемости при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основной результат исследования

Анализ экспрессии вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 в тканях HPV16-положительного рака шейки матки

По данным литературы для HPV16 с помощью высокопроизводительного секвенирования нового поколения (англ. new generation sequencing, NGS)

* (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)

показана экспрессия 5 вирусных микроРНК — HPV16-микроРНК-Н1, -Н2, -Н3, -Н5 и -Н6, кодируемых различными областями генома HPV16: гена *E1* для микроРНК-Н1 и микроРНК-Н5, *L1* для микроРНК-Н6 и некодирующего регуляторного участка (англ. untranslated regulatory region, URR) для микроРНК-Н2 и микроРНК-Н3. В дальнейшем авторы валидизировали результаты NGS по экспрессии вирусных микроРНК методами ПЦР-РВ и *in situ* гибридизации [14, 15]. Для этого использовали различные клинические материалы, включающие порядка 60 образцов поражений шейки матки различной степени тяжести: цервикальные интраэпителиальные неоплазии 1–3-й степени, плоскоклеточный рак и аденокарциномы шейки матки, а также нормальные мазки. При этом клинические образцы значительно различались по способу пробоподготовки и включали как фиксированные в формалине парафинизированные образцы, так и цервикальные мазки, собранные в различные транспортные среды. Ввиду большой гетерогенности выборки и наличия в ней не только HPV16-положительных образцов в результате была выявлена экспрессия только 4 вирусных микроРНК в небольшом количестве образцов (до 20% для различных HPV16-микроРНК) с крайне низким уровнем их экспрессии.

Несмотря на это анализ микроРНК, кодируемых HPV, остаётся крайне актуальным и требует более детального изучения. В настоящей работе мы провели анализ экспрессии двух микроРНК — HPV16-микроРНК-Н1 и HPV16-микроРНК-Н2 (далее микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2), — обладающих наибольшим количеством прочтений по результатам NGS [14]. Для оценки их экспрессии подобрана однородная выборка, содержащая 36 образцов свежезамороженных тканей

HPV16-положительного плоскоклеточного РШМ. Также мы разработали систему детекции микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 на основе метода stem-loop ОТ-ПЦР, описанного Chen и соавт., с использованием LNA-модифицированных Taqman-зондов для увеличения специфичности амплификации [16]. В результате анализа экспрессии вирусных микроРНК в HPV16-положительных клеточных линиях в SiHa выявлена экспрессия только микроРНК-Н2, в Ca Ski обнаружена экспрессия и микроРНК-Н1, и микроРНК-Н2. Отсутствие экспрессии микроРНК-Н1 в SiHa связано с потерей кодирующего её района гена *E1* в результате интеграции HPV16 в ДНК клетки. Кроме того, проанализировали HPV-негативные клеточные линии С33а и HaCaT для оценки специфичности разработанной методики: при ПЦР-РВ в этих линиях отсутствовала экспрессия микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2, что говорит о высокой специфичности разработанных нами систем детекции вирусных микроРНК.

При анализе экспрессии микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 в клиническом материале HPV16-положительные образцы карцином шейки матки условно разделены на 3 группы: с низкой (0–1 копий ДНК HPV16 на клетку), средней (1–10 копий ДНК HPV16 на клетку) и высокой (10–450 копий ДНК HPV16 на клетку) вирусной нагрузкой для соотнесения её с уровнями микроРНК. МикроРНК-Н1 выявлена в 33 из 38 (86,8%) образцов, значения ΔCt по медиане составили $-18,58$ [$-19,59$; $-17,44$]; экспрессия микроРНК-Н2 обнаружена в 37 из 38 (97,4%) образцов, значения $-\Delta Ct$ по медиане составили $-17,93$ [$-18,86$; $-16,02$]. Схематичное представление уровней экспрессии микроРНК и его соотношение с вирусной нагрузкой представлено в виде тепловой карты на рис. 1.

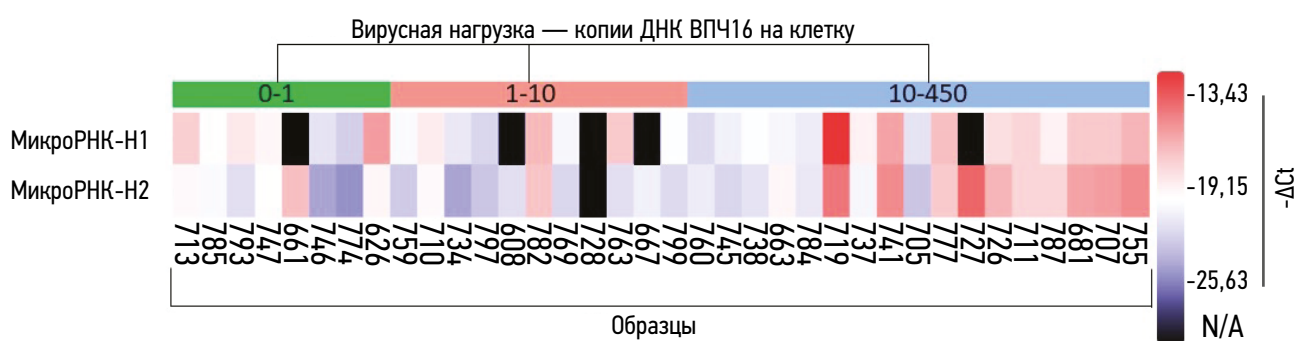


Рис. 1. Тепловая карта экспрессии вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 в клинических образцах HPV16-положительного плоскоклеточного рака шейки матки. Уровень микроРНК представлен цветовой схемой от красного (максимальный уровень экспрессии) до синего (минимальный уровень экспрессии), чёрными прямоугольниками указаны образцы без амплификации (англ. по amplification) соответствующей микроРНК (N/A). Образцы на схеме сгруппированы в соответствии с вирусной нагрузкой ДНК HPV16: 0–1 — образцы с низкой вирусной нагрузкой; 1–10 — образцы со средней вирусной нагрузкой; 10–450 — образцы с высокой вирусной нагрузкой. В нижней части указаны условные обозначения образцов рака шейки матки.

Fig. 1. Heat map of viral microRNA-H1 and microRNA-H2 expression in clinical samples of HPV16-positive squamous cell carcinoma. The microRNA level is represented by a color scheme from red (maximum expression level) to blue (minimum expression level), black rectangles indicate samples without amplification of the corresponding microRNA (N/A). Samples in the scheme are grouped according to the viral load of HPV16 DNA: 0–1 — samples with low viral load; 1–10 — samples with medium viral load; 10–450 — samples with high viral load. The lower part shows the labels of the CC samples.

Таким образом, мы показали наличие двух вирусных микроРНК в более чем 85% образцов РШМ, что значительно превосходит результаты Auvinen и соавт. [15]. Такой большой процент положительных образцов инвазивных карцином шейки матки говорит о возможной роли вирусных микроРНК в процессах онкогенеза и о дальнейшей необходимости их дополнительного исследования в других поражениях шейки матки, а также более детального анализа их биологических функций.

Оценка корреляции экспрессии вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 с вирусной нагрузкой HPV16 и общей выживаемостью

Известно, что вирусная нагрузка HPV высокого канцерогенного риска в большинстве случаев поражений шейки матки положительно коррелирует с более выраженными предраковыми поражениями, тяжестью протекания РШМ и более низкой выживаемостью пациентов [27, 28]. Более того, экспрессия ранних вирусных генов, а именно онкогенов *E6* и *E7*, также положительно коррелирует

с вирусной нагрузкой [29, 30]. Поскольку вирусные микроРНК могут принимать участие как в регуляции экспрессии вирусных генов, так и модулировать различные клеточные процессы, мы провели анализ зависимости экспрессии микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 от вирусной нагрузки HPV16. Выявлена положительная корреляция экспрессии как микроРНК-Н1 ($r=0,36$, $p=0,04$) (рис. 2 а), так и микроРНК-Н2 ($r=0,51$, $p=0,001$) (рис. 2 б) с вирусной нагрузкой HPV16, что может косвенно говорить о их потенциальной роли в регуляции экспрессии вирусных генов.

Мы оценили связь экспрессии вирусных микроРНК с общей выживаемостью пациентов с РШМ. Для этого с использованием пакета для среды программирования R, позволяющего определять пороговые значения для разделения различных массивов данных, образцы разделили на 2 группы — с низкой и высокой экспрессией микроРНК-Н1 (пороговое значение $-\Delta Ct=-18,41$) и микроРНК-Н2 (пороговое значение $-\Delta Ct=-17,56$) и построили кривые 5-летней общей выживаемости (рис. 3).

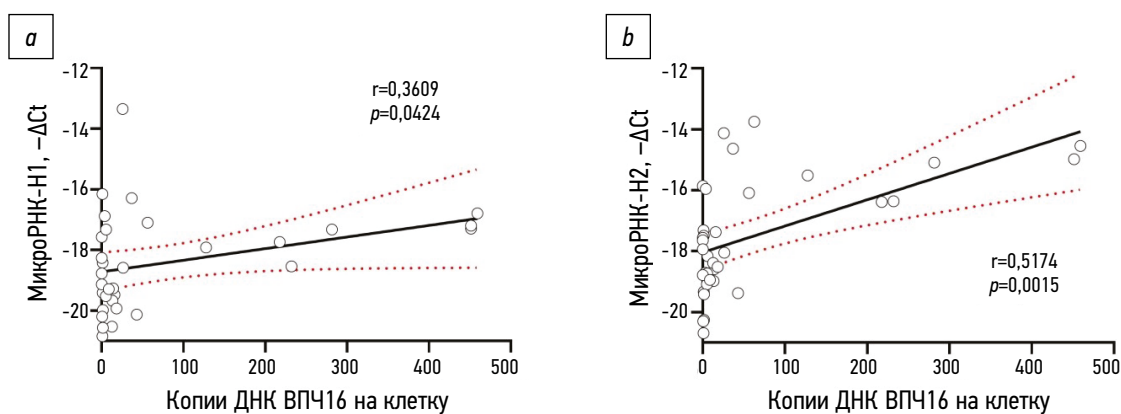


Рис. 2. Корреляционный анализ экспрессии вирусных микроРНК-Н1 (а) и микроРНК-Н2 (б) от вирусной нагрузки HPV16, r — коэффициент корреляции, p — значение p -value.

Fig. 2. Correlation analysis of viral microRNA-H1 (a) and microRNA-H2 (b) expression from HPV16 viral load. r — correlation coefficient, p — p -value.

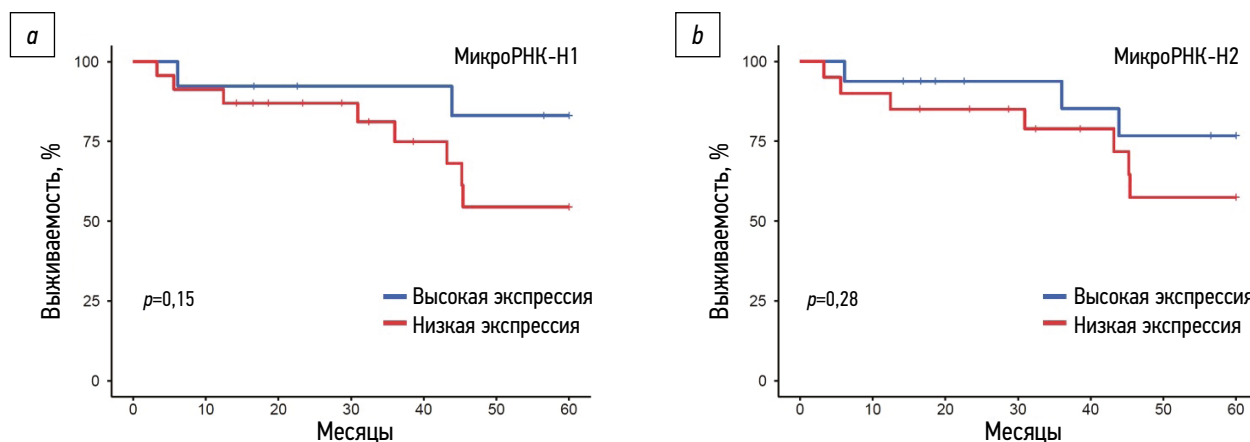


Рис. 3. Кривые Каплана–Мейера 5-летней общей выживаемости пациентов с плоскоклеточным РШМ в зависимости от уровня экспрессии микроРНК-Н1 (а) и микроРНК-Н2 (б), p — значение p -value.

Fig. 3. Kaplan–Meier curves of the 5-year overall survival of patients with squamous cell carcinoma depending on the expression level of microRNA-H1 (a) and microRNA-H2 (b), p — значение p -value.

Статистической значимости в различиях между выживаемостью пациентов с высокими и низкими уровнями экспрессии микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 получено не было, однако наблюдается тенденция к лучшей выживаемости пациентов с большей экспрессией вирусных микроРНК, что наряду с вирусной нагрузкой может быть использовано для прогнозирования течения заболевания. Таким образом, требуется дальнейший анализ экспрессии вирусных микроРНК HPV16 и их взаимосвязи с различными клиническими параметрами.

Биоинформатический анализ функций вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2

Экспрессия вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 в более чем 85% исследуемых образцов указывает на потенциальную роль этих микроРНК в регуляции экспрессии клеточных и вирусных генов, модулирующих различные пути канцерогенеза. Для выяснения возможных биологических функций вирусных микроРНК мы провели биоинформатический поиск потенциальных вирусных и клеточных мишеней микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2. В результате *in silico* анализа мы нашли множество сайтов взаимодействия вирусных микроРНК как с ранними и поздними генами, так и с некодирующей областью HPV16. Так, для микроРНК-Н1 выявили 10 потенциальных участков взаимодействия, включающих сайты в рамках считывания

E7, E2/E4, E5, L2, а также в URR. Для микроРНК-Н2 зафиксировали 17 потенциальных сайтов взаимодействия — в рамках считывания генов *E1, E2, E2/E4, E5, L1, L2* и в URR. Проведение *in vitro* и *in vivo* экспериментов для подтверждения взаимодействия вирусных микроРНК с ранними и поздними транскриптами и с некодирующей областью HPV16 позволит оценить их влияние на регуляцию нормального вирусного цикла и участие в процессе дерегуляции экспрессии вирусных онкогенов, приводящих к запуску процессов онкотрансформации.

Кроме того, мы провели *in silico* поиск возможных клеточных мишеней вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2. Для этого использовали 3 ресурса — mirDB, TargetScan Custom 5.2 и MR-microT, применяющих различные алгоритмы поиска потенциальных клеточных мишеней микроРНК. В результате получено множество теоретических мишеней, которые затем были проанализированы на наличие общих генов для увеличения их значимости. Для дальнейшего изучения обогащения категорий были использованы гены, выявленные хотя бы двумя алгоритмами (рис. 4 *a, b*), что составило 426 потенциальных мишеней для микроРНК-Н1 и 518 для микроРНК-Н2.

При оценке обогащения категорий мы проанализировали различные клеточные процессы, ассоциированные с канцерогенезом (рис. 4 *c, d*).

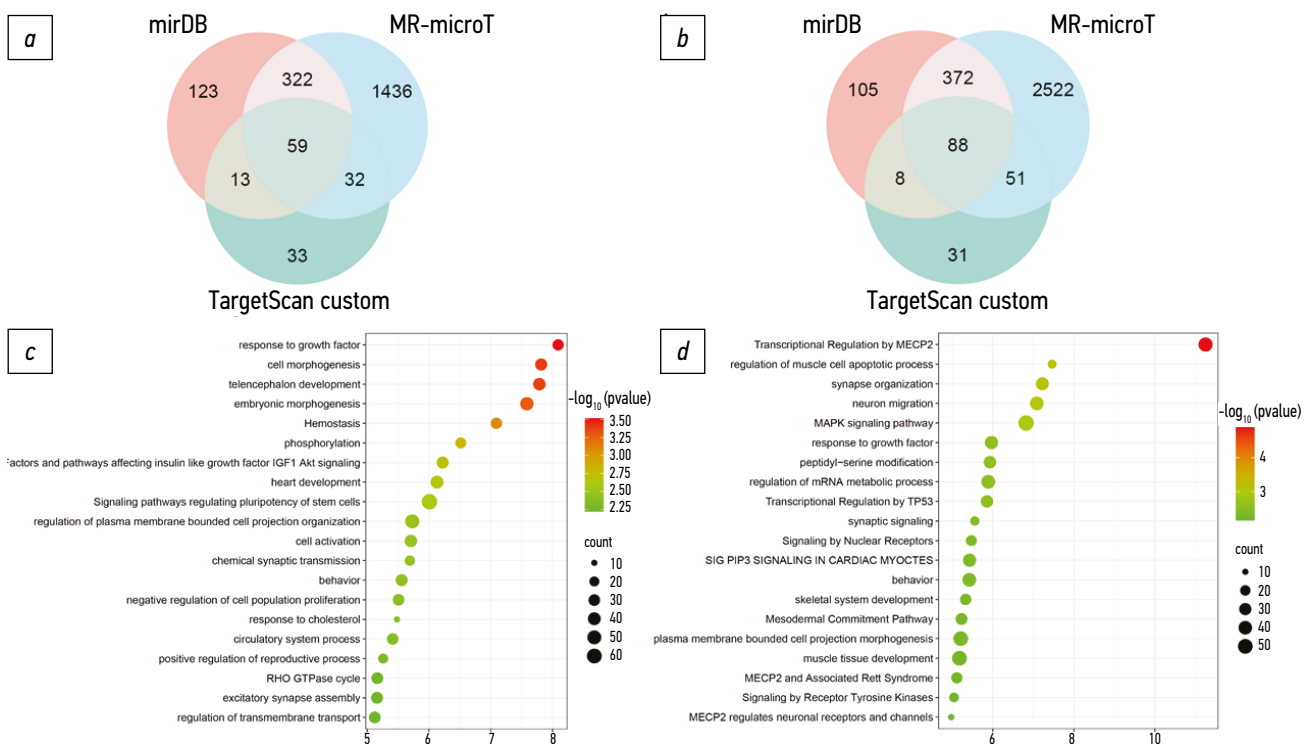


Рис. 4. Результаты биоинформатического поиска потенциальных клеточных генов-мишеней вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2. *a, b* — диаграммы Венна объединения мишеней для микроРНК-Н1 (*a*) и микроРНК-Н2 (*b*), *c, d* — топ-20 обогащенных категорий для генов-мишеней микроРНК-Н1 (*c*) и микроРНК-Н2 (*d*), ранжированных по уровню значимости ($-\log_{10} p\text{-value}$).

Fig. 4. Results of bioinformatic search for potential cellular target genes of viral microRNA-H1 and microRNA-H2, *a, b* — Venn diagrams of target association for microRNA-H1 (*a*) and microRNA-H2 (*b*), *c, d* — Top 20 enriched categories for microRNA-H1 (*c*) and microRNA-H2 (*d*) target genes, ranked by significance level ($-\log_{10} p\text{-value}$).

Для микроРНК-Н1 это такие категории, как ответ на ростовые стимулы; факторы и пути, влияющие на IGF1 (англ. Insulin-like growth factor 1; инсулиноподобный фактор роста 1) и Akt-сигнальные пути; каскады, регулирующие плюрипотентность стволовых клеток; негативная регуляция пролиферации клеток; цикл Rho-GTPаз. Для микроРНК-Н2 — фосфорилирование белков; регуляция транскрипции через МЕСР2 (англ. methyl-CpG binding protein 2; белок, связывающийся с метилированным CpG); процессы, связанные с актиновыми филаментами, регуляция транскрипции с помощью TP53; ответ на ростовые факторы; сигнальные пути ядерных рецепторов. Наличие потенциальных мишеней вирусных микроРНК, ассоциированных с данными биологическими процессами, говорит об их возможной регуляторной функции, направленной на поддержание как нормального вирусного цикла, так и процессов опухолевой трансформации.

Результаты биоинформатического анализа потенциальных вирусных и клеточных мишеней микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 свидетельствуют о необходимости более детального анализа их биологических функций *in vitro* и *in vivo* для выявления их регуляторной роли в жизненном цикле HPV16 и в процессах опухолевой трансформации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вирусные микроРНК — один из важных инструментов онковирусов для поддержания нормального вирусного цикла, модуляции различных клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференцировка и выживание клеток. С одной стороны, вирусные микроРНК, регулируя экспрессию вирусных генов, способны поддерживать нормальный вирусный цикл. Например, микроРНК-K12-7 KSHV, ингибируя экспрессию белка RTA вируса саркомы Капоши, снижает экспрессию ранних вирусных белков и способствует поддержанию латентной вирусной инфекции [31]. А микроРНК-M1 полиомавируса клеток Меркеля ингибирует экспрессию большого Т-антигена, с одной стороны, снижая репликацию вируса, с другой — поддерживая постоянный уровень ДНК МСРyV в инфицированных клетках, способствуя установлению персистирующей инфекции [32, 33]. С другой стороны, при вирус-ассоциированных онкозаболеваниях многие вирусные микроРНК выполняют функции онкогенных микроРНК, изменяя экспрессию ключевых генов-регуляторов путей, ассоциированных с канцерогенезом. Например, микроРНК-BART1 вируса Эпштейна-Барр ингибирует экспрессию PTEN при назофарингеальной карциноме, стимулируя клеточные процессы миграции, инвазии и метастазирования [29]. МикроРНК-K12-1-5p KSHV, подавляя экспрессию SOCS6 в клетках саркомы Капоши, ингибирует апоптоз и способствует пролиферации, миграции и инвазии клеток [34]. В связи с неотъемлемой ролью вирусных микроРНК в регуляции различных биологических процессов изучение недавно открытых вирусных микроРНК

HPV16 представляет большой научный и практический интерес. В нашем исследовании мы сконцентрировали внимание на 2 вирусных микроРНК — HPV16-микроРНК-Н1 и HPV16-микроРНК-Н2 [15].

В результате экспериментов мы подтвердили экспрессию вирусных микроРНК-Н1 в 33 образцах из 38 (86,8%) и микроРНК-Н2 в 37 из 38 образцов (97,4%) HPV16-положительного плоскоклеточного РШМ. Выявленная экспрессия вирусных микроРНК в большинстве исследуемых образцов может указывать на их роль в регуляции различных сигнальных путей, ассоциированных с процессами онкотрансформации. При этом отсутствие экспрессии микроРНК-Н1 в некоторых образцах может быть связано со статусом генома HPV16 в клетке. При длительной персистенции вируса может происходить интеграция генома HPV16 в хромосомы клетки-хозяина с разрывом ДНК вируса как в области генов *E1/E2*, так и позднего гена *L1*, сопровождающаяся потерей части генома вируса, в частности области гена *E1*, отвечающего за экспрессию микроРНК-Н1. Потеря экспрессии вирусных микроРНК в результате такой интеграции может способствовать дерегуляции экспрессии вирусных онкогенов. Положительная корреляция экспрессии микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 с вирусной нагрузкой и выявленные теоретические сайты взаимодействия в онкогене *E7* и ранних генах *E1* и *E2* — основных регуляторах вирусной репликации и транскрипции — указывают на их возможную роль в регуляции экспрессии вирусных генов в нормальном вирусном цикле и при онкотрансформации. А предсказанные *in silico* теоретические клеточные мишени вирусных микроРНК указывают на регуляцию не только вирусных, но и различных клеточных сигнальных путей, в том числе включающих процессы роста и дифференцировки клеток.

Дальнейшее изучение микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2, а также более детальный анализ других микроРНК HPV16 позволит глубже раскрыть процессы регуляции вирусного цикла, а также их возможную роль в дерегуляции экспрессии вирусных онкогенов *E6* и *E7*, являющейся основным пусковым механизмом онкотрансформации инфицированных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании мы показали экспрессию двух вирусных микроРНК — HPV16-микроРНК-Н1 и HPV16-микроРНК-Н2 — в большинстве образцов плоскоклеточных карцином шейки матки. Мы впервые показали положительную корреляцию экспрессии микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 с вирусной нагрузкой HPV16 и выявили тенденцию к лучшей выживаемости пациентов с более высоким уровнем вирусных микроРНК. *In silico* анализ выявил множество потенциальных сайтов взаимодействия микроРНК с геномом HPV16 и клеточными генами. Вероятная регуляция их экспрессии через вирусные микроРНК может быть причиной как повышенной экспрессии вирусных онкогенов *E6* и *E7*, так

и дерегуляции экспрессии клеточных генов, участвующих в работе различных сигнальных каскадов, в том числе и онкогенных. Дальнейшее изучение вирусных микроРНК позволит дополнить существующие механизмы онкотрансформации при персистенции HPV16, а также оценить их потенциал в диагностике HPV16-ассоциированных онкопатологий.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 23-15-00433, <https://rscf.ru/project/23-15-00433>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов. Н.В. Елкина — эксперименты по оценке уровня экспрессии микроРНК, анализу их корреляции с вирусной нагрузкой и общей выживаемостью, написание статьи; М.Д. Федорова — выделение ДНК, ВПЧ-типирование и оценка вирусной нагрузки в образцах карцином шейки матки; Р.С. Фасхутдинов — биоинформатический поиск вирусных и клеточных мишеней микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2; Ю.О. Юрченко — выделение малых РНК; К.И. Жордания — координация работы клинического подразделения для сбора материала; Е.А. Мустафина — сбор тканей плоскоклеточных карцином шейки матки; Л.С. Павлова — подбор образцов клинического материала для анализа; С.В. Винокурова — идея, разработка дизайна исследования, руководство проектом, научное редактирование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sung H., Ferlay J., Siegel R., et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // *CA Cancer J Clin.* 2021. Vol. 71, N 3. P. 209–249. doi: 10.3322/caac.21660
- Mesri E., Feitelson M., Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis // *Cell Host Microbe.* 2014. Vol. 15, N 3. P. 266–282. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.011
- MacLennan S., Marra M. Oncogenic Viruses and the Epigenome: How Viruses Hijack Epigenetic Mechanisms to Drive Cancer // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 11. P. 9543 doi: 10.3390/ijms24119543
- O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018. Vol. 9. P. 402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402
- Jorge A., Pereira E., Oliveira C., et al. MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer // *Einstein (Sao Paulo).* 2021. Vol. 19. P. eRB5996. doi: 10.31744/einstein_journal/2021RB5996
- Pfeffer S., Zavolan M., Grasser F., et al. Identification of virus-encoded microRNAs // *Science.* 2004. Vol. 304, N 5671. P. 734–736. doi: 10.1126/science.1096781
- Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, N D1. P. D155–D162. doi: 10.1093/nar/gky1141
- Yang X., Li H., Sun H., et al. Hepatitis B Virus-Encoded MicroRNA Controls Viral Replication // *J Virol.* 2017. Vol. 91, N 10. P. e01919-16doi: 10.1128/JVI.01919-16
- Vojtechova Z., Tachezy R. The Role of miRNAs in Virus-Mediated Oncogenesis // *Int J Mol Sci.* 2018. Vol. 19, N 4. doi: 10.3390/ijms19041217
- Kandeel M. Oncogenic Viruses-Encoded microRNAs and Their Role in the Progression of Cancer: Emerging Targets for Antiviral and

Соответствие принципам этики. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина (протокол № 7 от 25.07.2024).

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This research was supported by Russian Science Foundation (project № 23-15-00433, <https://rscf.ru/project/23-15-00433>)

Competing interests. The authors declare no conflicts of interests.

Authors' contribution. N.V. Elkina — experiments on estimation of microRNA expression levels, analysis of their correlation with viral load and overall survival, article writing; M.D. Fedorova — DNA isolation, HPV typing and estimation of viral load in cervical carcinoma samples; R.S. Faskhutdinov — bioinformatic search of viral and cellular targets of microRNA-H1 and microRNA-H2; Yu.O. Iurchenko — isolation of small RNAs; K.I. Zhordania — coordination of the clinical unit for material collection; E.A. Mustafina — tissue collection of cervical squamous cell carcinoma; L.S. Pavlova — selection of clinical material samples for analysis; S.V. Vinokurova — idea, research design development, project management, scientific editing.

Compliance with the principles of ethics. The study protocol was approved by the local ethics committee (Blokhin National Medical Research Center of Oncology, protokol N 7, 25.07.2024). Approval and protocol procedure was obtained according to the principles of the Declaration of Helsinki.

Anticancer Therapies // Pharmaceuticals (Basel). 2023. Vol. 16, N 4. P. 485. doi: 10.3390/ph16040485

11. Bruni L., Albero G., Mena M., et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human papillomavirus and related diseases in the world // Summary Report 10 March 2023. Режим доступа: <https://hpvcentre.net/> Дата обращения: 10 октября 2024

12. Bray F., Laversanne M., Sung H., et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J Clin.* 2024. Vol. 74, N 3. P. 229–263. doi: 10.3322/caac.21834

13. de Martel C., Georges D., Bray F., et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis // *Lancet Glob Health.* 2020. Vol. 8, N 2. P. e180–e190. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7

14. Qian K., Pietila T., Ronty M., et al. Identification and validation of human papillomavirus encoded microRNAs // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, N 7. P. e70202. doi: 10.1371/journal.pone.0070202

15. Virtanen E., Pietila T., Nieminen P., et al. Low expression levels of putative HPV encoded microRNAs in cervical samples // *Springerplus.* 2016. Vol. 5, N 1. P. 1856. doi: 10.1186/s40064-016-3524-3

16. Chen C., Ridzon D., Broomer A., et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, N 20. P. e179. doi: 10.1093/nar/gni178

17. Enright A., John B., Gaul U., et al. MicroRNA targets in *Drosophila* // *Genome Biol.* 2003. Vol. 5, N 1. C. R1. doi: 10.1186/gb-2003-5-1-r1

18. Tang D., Chen M., Huang X., et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing // *PLoS One.* 2023. Vol. 18, N 11. P. e0294236. doi: 10.1371/journal.pone.0294236

19. Chen Y., Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, N D1. P. D127–D131. doi: 10.1093/nar/gkz757
20. Liu W., Wang X. Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data // *Genome Biol.* 2019. Vol. 20, N 1. P. 18. doi: 10.1186/s13059-019-1629-z
21. Lewis B., Burge C., Bartel D. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // *Cell.* 2005. Vol. 120, N 1. P. 15–20. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035
22. Kanellos I., Vergoulis T., Sacharidis D., et al. MR-microT: a MapReduce-based MicroRNA target prediction method // *Proceedings of the 26th International Conference on Scientific and Statistical Database Management*, 2014. P. 1–4. doi: 10.1145/2618243.2618289
23. Reczko M., Maragkakis M., Alexiou P., et al. Functional microRNA targets in protein coding sequences // *Bioinformatics.* 2012. Vol. 28, N 6. C. 771–776. doi: 10.1093/bioinformatics/bts043
24. Zhou Y., Zhou B., Pache L., et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets // *Nat Commun.* 2019. Vol. 10, N 1. P. 1523. doi: 10.1038/s41467-019-09234-6
25. Rao X., Huang X., Zhou Z., Lin X. An improvement of the 2^{-ΔΔCT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis // *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013. Vol. 3, N 3. P. 71–85.
26. Lopez-Raton M., Rodriguez-Álvarez M., Cadarso-Suarez C., Gude-Sampedro F. OptimalCutpoints: an R package for selecting optimal cutpoints in diagnostic tests // *Journal of statistical software.* 2014. Vol. 61. P. 1–36. doi: 10.18637/jss.v061.i08
27. Fobian S., Mei X., Crezee J., et al. Increased human papillomavirus viral load is correlated to higher severity of cervical disease and poorer clinical outcome: A systematic review // *J Med Virol.* 2024. Vol. 96, N 6. P. e29741. doi: 10.1002/jmv.29741
28. Zhou Y., Shi X., Liu J., Zhang L. Correlation between human papillomavirus viral load and cervical lesions classification: A review of current research // *Front Med (Lausanne).* 2023. Vol. 10. P. 1111269. doi: 10.3389/fmed.2023.1111269
29. Baron C., Henry M., Tamalet C., et al. Relationship between HPV 16, 18, 31, 33, 45 DNA detection and quantitation and E6/E7 mRNA detection among a series of cervical specimens with various degrees of histological lesions // *J Med Virol.* 2015. Vol. 87, N 8. P. 1389–1396. doi: 10.1002/jmv.24157
30. Camus C., Vitale S., Loubatier C., et al. Quantification of HPV16 E6/E7 mRNA Spliced Isoforms Viral Load as a Novel Diagnostic Tool for Improving Cervical Cancer Screening // *J Clin Med.* 2018. Vol. 7, N 12. P. 530. doi: 10.3390/jcm7120530
31. Lin X., Liang D., He Z., et al. miR-K12-7-5p encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stabilizes the latent state by targeting viral ORF50/RTA // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, N 1. P. e16224. doi: 10.1371/journal.pone.0016224
32. Seo G., Chen C., Sullivan C. Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression // *Virology.* 2009. Vol. 383, N 2. P. 183–187. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.001
33. Theiss J., Gunther T., Alawi M., et al. A Comprehensive Analysis of Replicating Merkel Cell Polyomavirus Genomes Delineates the Viral Transcription Program and Suggests a Role for mcv-miR-M1 in Episomal Persistence // *PLoS Pathog.* 2015. Vol. 11, N 7. P. e1004974. doi: 10.1371/journal.ppat.1004974
34. Zhang J., Pu X., Xiong Y. kshv-mir-k12-1-5p promotes cell growth and metastasis by targeting SOCS6 in Kaposi's sarcoma cells // *Cancer Manag Res.* 2019. Vol. 11. P. 4985–4995. doi: 10.2147/CMAR.S198411

REFERENCES

1. Sung H, Ferlay J, Siegel R, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–249. doi: 10.3322/caac.21660
2. Mesri E, Feitelson M, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe.* 2014;15(3):266–82. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.011
3. MacLennan S, Marra M. Oncogenic Viruses and the Epigenome: How Viruses Hijack Epigenetic Mechanisms to Drive Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11):9543. doi: 10.3390/ijms24119543
4. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402
5. Jorge A, Pereira E, Oliveira C, et al. MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer. *Einstein (Sao Paulo).* 2021;19:eRB5996. doi: 10.31744/einstein_journal/2021RB5996
6. Pfeffer S, Zavolan M, Grasser F, et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science.* 2004;304(5671):734–736. doi: 10.1126/science.1096781
7. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D155–D62. doi: 10.1093/nar/gky1141
8. Yang X, Li H, Sun H, et al. Hepatitis B Virus-Encoded MicroRNA Controls Viral Replication. *J Virol.* 2017;91(10):e01919-16. doi: 10.1128/JVI.01919-16
9. Vojtechova Z, Tachezy R. The Role of miRNAs in Virus-Mediated Oncogenesis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4). doi: 10.3390/ijms19041217
10. Kandeel M. Oncogenic Viruses-Encoded microRNAs and Their Role in the Progression of Cancer: Emerging Targets for Antiviral and Anticancer Therapies. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023;16(4):485. doi: 10.3390/ph16040485
11. Bruni L, Albero G, Mena M, et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human papillomavirus and related diseases in the world. Summary Report 10 March 2023. Available from: <https://hvpcentre.net/>. Accessed 10 October 2024
12. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–63. doi: 10.3322/caac.21834
13. de Martel C, Georges D, Bray F, et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health.* 2020;8(2):e180–e90. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7
14. Qian K, Pietila T, Ronty M, et al. Identification and validation of human papillomavirus encoded microRNAs. *PLoS One.* 2013;8(7):e70202. doi: 10.1371/journal.pone.0070202
15. Virtanen E, Pietila T, Nieminen P, et al. Low expression levels of putative HPV encoded microRNAs in cervical samples. *Springerplus.* 2016;5(1):1856. doi: 10.1186/s40064-016-3524-3
16. Chen C, Ridzon D, Broomer A, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e179. doi: 10.1093/nar/gni178
17. Enright A, John B, Gaul U, et al. MicroRNA targets in Drosophila. *Genome Biol.* 2003;5(1):R1. doi: 10.1186/gb-2003-5-1-r1
18. Tang D, Chen M, Huang X, et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. *PLoS One.* 2023;18(11):e0294236. doi: 10.1371/journal.pone.0294236
19. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D127–D31. doi: 10.1093/nar/gkz757
20. Liu W, Wang X. Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biol.* 2019;20(1):18. doi: 10.1186/s13059-019-1629-z

21. Lewis B, Burge C, Bartel D. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15–20. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035
22. Kanellos I, Vergoulis T, Sacharidis D, et al. MR-microT: a MapReduce-based MicroRNA target prediction method. Proceedings of the 26th International Conference on Scientific and Statistical Database Management; 2014. doi: 10.1145/2618243.2618289
23. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, et al. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics*. 2012;28(6):771–776. doi: 10.1093/bioinformatics/bts043
24. Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun*. 2019;10(1):1523. doi: 10.1038/s41467-019-09234-6
25. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2^Δ(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013;3(3):71–85.
26. López-Ratón M, Rodríguez-Álvarez M, Cadarso-Suárez C, Gude-Sampedro F. OptimalCutpoints: an R package for selecting optimal cutpoints in diagnostic tests. *Journal of statistical software*. 2014;61:1–36. doi: 10.18637/jss.v061.i08
27. Fobian S, Mei X, Crezee J, et al. Increased human papillomavirus viral load is correlated to higher severity of cervical disease and poorer clinical outcome: A systematic review. *J Med Virol*. 2024;96(6):e29741. doi: 10.1002/jmv.29741
28. Zhou Y, Shi X, Liu J, Zhang L. Correlation between human papillomavirus viral load and cervical lesions classification: A review of current research. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1111269. doi: 10.3389/fmed.2023.1111269
29. Baron C, Henry M, Tamalet C, et al. Relationship between HPV 16, 18, 31, 33, 45 DNA detection and quantitation and E6/E7 mRNA detection among a series of cervical specimens with various degrees of histological lesions. *J Med Virol*. 2015;87(8):1389–1396. doi: 10.1002/jmv.24157
30. Camus C, Vitale S, Loubatier C, et al. Quantification of HPV16 E6/E7 mRNA Spliced Isoforms Viral Load as a Novel Diagnostic Tool for Improving Cervical Cancer Screening. *J Clin Med*. 2018;7(12):530. doi: 10.3390/jcm7120530
31. Lin X, Liang D, He Z, et al. miR-K12-7-5p encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stabilizes the latent state by targeting viral ORF50/RTA. *PLoS One*. 2011;6(1):e16224. doi: 10.1371/journal.pone.0016224
32. Seo G, Chen C, Sullivan C. Merkel cell polyomavirus encodes a microRNA with the ability to autoregulate viral gene expression. *Virology*. 2009;383(2):183–187. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.001
33. Theiss J, Gunther T, Alawi M, et al. A Comprehensive Analysis of Replicating Merkel Cell Polyomavirus Genomes Delineates the Viral Transcription Program and Suggests a Role for mcv-miR-M1 in Episomal Persistence. *PLoS Pathog*. 2015;11(7):e1004974. doi: 10.1371/journal.ppat.1004974
34. Zhang J, Pu X, Xiong Y. kshv-mir-k12-1-5p promotes cell growth and metastasis by targeting SOCS6 in Kaposi's sarcoma cells. *Cancer Manag Res*. 2019;11:4985–4995. doi: 10.2147/CMAR.S198411

ОБ АВТОРАХ

* Елкина Надежда Вячеславовна;

адрес: Россия, 115478, Москва, Каширское ш., д. 24, с. 15;
ORCID: 0000-0002-0503-6016;
eLibrary SPIN: 2304-9710;
e-mail: n.elkina@ronc.ru

Федорова Мария Дмитриевна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-8813-7516;
eLibrary SPIN: 4943-5931;
e-mail: m.d.fedorova@ronc.ru

Фасхутдинов Радик Сяитович;

ORCID: 0000-0002-0050-7798;
e-mail: r.faskhutdinov@ronc.ru

Юрченко Юлия Олеговна;

ORCID: 0009-0005-7357-0578;
e-mail: iurchenko.iuliia122@yandex.ru

Жордания Кирилл Иосифович, д-р мед. наук, профессор;

ORCID: 0000-0003-1380-3710;
eLibrary SPIN: 6271-8954;
e-mail: k.zhordania@ronc.ru

Мустафина Екатерина Александровна, канд. мед. наук;

ORCID: 0000-0002-1009-0383;
eLibrary SPIN: 9078-9204;
e-mail: e.mustafina@ronc.ru

Павлова Лариса Сергеевна;

ORCID: 0000-0003-3993-4823;
e-mail: l.pavlova@ronc.ru

Винокурова Светлана Владимировна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0003-1615-3928;
eLibrary SPIN: 3453-4502;
e-mail: s.vinokurova@ronc.ru

AUTHORS' INFO

* Nadezhda V. Elkina;

address: bld. 15, 24 Kashirskoye highway, 115478 Moscow, Russia;
ORCID: 0000-0002-0503-6016;
eLibrary SPIN: 2304-9710;
e-mail: n.elkina@ronc.ru

Maria D. Fedorova, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-8813-7516;
eLibrary SPIN: 4943-5931;
e-mail: m.d.fedorova@ronc.ru

Radik S. Faskhutdinov;

ORCID: 0000-0002-0050-7798;
e-mail: r.faskhutdinov@ronc.ru

Iuliia O. Iurchenko;

ORCID: 0009-0005-7357-0578;
e-mail: iurchenko.iuliia122@yandex.ru

Kirill I. Zhordaniya, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;

ORCID: 0000-0003-1380-3710;
eLibrary SPIN: 6271-8954;
e-mail: k.zhordania@ronc.ru

Ekaterina A. Mustafina, MD, Cand. Sci. (Medicine);

ORCID: 0000-0002-1009-0383;
eLibrary SPIN: 9078-9204;
e-mail: e.mustafina@ronc.ru

Larisa S. Pavlova;

ORCID: 0000-0003-3993-4823;
e-mail: l.pavlova@ronc.ru

Svetlana V. Vinokurova, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0003-1615-3928;
eLibrary SPIN: 3453-4502;
e-mail: s.vinokurova@ronc.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author