



Оригинальные исследования / Original research

© ЛАВРЕНТЬЕВ С. Н., АКСЕНЕНКО М. Б., АВЕРЧУК А. С., ЗИНЧЕНКО И. С.

УДК: 616-006.81-091.8-08:615.277.3:577.21

DOI: 10.20333/2500136-2020-3-70-77

Модуляция уровня miR-204-5p индуцирует формирование премеастатической ниши в модели меланомы B16 *in vivo*

С. Н. Лаврентьев, М. Б. Аксененко, А. С. Аверчук, И. С. Зинченко

Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск 660022, Российская Федерация

Цель исследования. Определение профиля микроРНК в органах-мишенях метастазирования после экспериментального повышения уровня синтетическим аналогом miR-204-5p *in vivo*.

Материал и методы. Исследование было выполнено на лабораторных мышах линии C57Bl6, которым были имплантированы клетки культуры меланомы B16 для формирования подкожной солидной опухоли. Животные, которым была привита меланома, были распределены на III группы: контрольная (n=3); отрицательный контроль (n=5); опытная (n=6), животным данной группы был введен синтетический аналог (имитатор) исследуемой микроРНК miR-204-5p, в дозировке 1,2 мг/кг в виде раствора.

Результаты. Исследование экспрессии miR-204-5p в ткани почек, легких и печени экспериментальных животных показало увеличение экспрессии данной микроРНК в 9 раз по сравнению с контролем в тканях почек. Далее было проведено определение экспрессионного профиля микроРНК в этой ткани. Результаты микрочипирования показали, что после введения имитатора miR-204-5p изменяется уровень 12 микроРНК, при этом 9 микроРНК имели пониженный уровень экспрессии более чем в 2 раза. Данные микроРНК участвуют в регуляции генов-компонентов 47 внутриклеточных механизмов передачи сигнала. Механизмы передачи сигнала, регулируемые микроРНК с наиболее высоким уровнем изменений, включали сигнальные пути митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК), протеогликанов при раке, почечно-клеточном раке почек, клеточной адгезии, деградация лизина, процессы регуляции реабсорбции кальция и синтеза различных видов гормонов.

Заключение. При введении антисмысловых нуклеотидов их повышенная концентрация, а значит и предполагаемые эффекты, наблюдаются в ткани почек. Анализ сигнальных каскадов, регулируемых микроРНК с наиболее высоким уровнем изменений, показал наличие трансформации сигнальных механизмов функционально связанных с канцерогенезом, в том числе с раком почек. Подобный результат может указывать на возможное формирование премеастатических ниш в ткани почек у экспериментальных животных.

Ключевые слова: микроРНК, miR-204-5p, меланома, сигнальные пути, гены мишени, метастазирование, биоинформатический анализ.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Лаврентьев СН, Аксененко МБ, Аверчук АС, Зинченко ИС. Модуляция уровня miR-204-5p индуцирует формирование премеастатической ниши в модели меланомы B16 *in vivo*. *Сибирское медицинское обозрение*. 2020;(3):70-77. DOI: 10.20333/2500136-2020-3-70-77

miR-204-5p level modulation that induces formation of premetastatic niche in B16 melanoma *in vivo* model

S. N. Lavrentev, M. B. Aksenenko, A. S. Averbuch, I. S. Zinchenko

Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk 660022, Russian Federation

The aim of the research. Determination of microRNA profile in metastasis target organs after experimental increase of their level by synthetic analogue miR-204-5p *in vivo*.

Material and methods. The study was performed in laboratory mice of C57Bl6 line who were implanted with B16 melanoma culture cells to form subcutaneous solid tumor. Animals that were inoculated with melanoma were divided into III groups: check (n = 3); negative check (n = 5); experimental (n = 6), animals of this group got synthetic analogue (simulator) of the studied miR-204-5p microRNA, at a dosage of 1.2 mg / kg in the form of a solution.

Results. The study of miR-204-5p expression in tissues of kidneys, lungs, and liver of experimental animals showed an increase in this miRNA expression ninefold compared with the check one in kidney tissues. Next, microRNA expression profile of this tissue was determined. Microchipping results showed that after miR-204-5p simulator introduction, the level of 12 miRNAs changes, while 9 miRNAs had a reduced expression level of more than 2 times. These miRNAs are involved in regulation of component genes of 47 intracellular signal transmission mechanisms. Signal transmission mechanisms regulated by miRNAs with the highest change level included signaling pathways of mitogen-activated protein kinases (MAPK), proteoglycans in case of cancer, renal cell kidney carcinoma, cell adhesion, lysine degradation, regulation of calcium reabsorption and synthesis of various types of hormones.

Conclusion. When introducing antisense nucleotides, their increased concentration, and hence the expected effects, are observed in kidney tissues. Analysis of signaling cascades regulated by miRNAs with the highest change level showed transformation of signaling mechanisms functionally associated with carcinogenesis, including kidney cancer. Similar result may indicate possible formation of premetastatic niches in kidney tissue of experimental animals.

Key words: miRNA, miR-204-5p, melanoma, signaling pathways, target genes, metastasis, bioinformatic analysis.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Lavrentev SN, Aksenenko MB, Averbuch AS, Zinchenko IS. miR-204-5p level modulation that induces formation of premetastatic niche in B16 melanoma *in vivo* model. *Siberian Medical Review*. 2020;(3):70-77. DOI: 10.20333/2500136-2020-3-70-77

Введение

Антисмысловые олигонуклеотиды и малые интерферирующие РНК в последнее время приобретают все большую значимость в качестве важных терапевтических моделей для лечения онкозаболеваний. Подавляя трансляцию специфических онкобелков-мишеней, малые РНК способны влиять на развитие новообразований, что делает их эффективным терапевтическим инструментом. Так одним из первых клинически разрешенных препаратов, основанных на антисмысловом механизме, является патисиран, нацеленный на мРНК белка транскриптаза (TTR) [1].

Одним из новых и малоизученных направлений в терапии онкозаболеваний с применением антисмысловых олигонуклеотидов, с целью деградации целевой мРНК, является применение микроРНК. МикроРНК – это эндогенные некодирующие РНК, представляющие собой нуклеотидную последовательность, состоящую в среднем из 22 нуклеотидов. В клетке микроРНК посттранскрипционно регулируют многочисленные метаболические процессы, в том числе, по данным ряда исследователей, принимают участие в опухолевой трансформации. Одна микроРНК может регулировать изменение уровня экспрессии до ста генов [2]. Традиционно применяются два подхода в изменении уровня экспрессии микроРНК. Первое направление – увеличение уровня экспрессии путем применения синтетических аналогов (имитаторов) исследуемой микроРНК; второе – блокирование активности, то есть снижение уровня экспрессии исследуемой микроРНК путем с помощью комплементарных ингибиторов – антисмысловых олигонуклеотидов [3].

Учитывая данные, полученные нами ранее, микроРНК miR-204-5p является одной из наиболее сниженных в меланоме, по сравнению с меланоцитарными невусами [4]. Поэтому введение синтетического аналога данной микроРНК, с целью увеличения уровня экспрессии целевых белков, рассматривается как одно из возможных направлений терапевтического воздействия.

В данном исследовании была предпринята попытка определения механизмов изменения уровня экспрессии микроРНК miR-204-5p посредством введения синтетического аналога данной микроРНК на модели меланомы B16 *in vivo*, определение профиля опосредованного изменения уровней экспрессии микроРНК в ткани почки. На основе полученных данных, с помощью биоинформатического анализа, была проведена детекция опосредованных изменений путей передачи внутриклеточного сигнала с целью определения возможных терапевтических мишеней.

Материал и методы

Исследование было выполнено на лабораторных мышках линии C57Bl6. Данная инбредная линия лабораторных мышей стандартно используется для воспроизведения модели меланомы кожи. Животные были получены из ФИЦ ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Проведение эксперимента одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Яснецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, (протокол № 79/2017 от 22.11.2017). Все исследования и манипуляции с животными выполнялись при соблюдении правил и рекомендаций представленных в приказе Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 199н. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», а также в международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных» и Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2008 ред.).

Для моделирования меланомы кожи были использованы половозрелые самки лабораторных мышей линии C57Bl6, средняя масса животных на начало эксперимента составляла 18,5 г. В месте содержания животных поддерживалось естественное освещение, а также средняя температура 20-22 °С. Животным был не ограничен доступ к жидкости и корму.

Клеточная культура меланомы B16 предоставлена ФБГУ «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН и до момента имплантации сохранялась в жидком азоте.

Перед проведением имплантации клетки меланомы размораживались в течение 1 минуты на водяной бане при температуре 37 °С. После разморозки культуры на световом микроскопе МИКМЕД-2 вариант 16 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия) подсчитывалось количество жизнеспособных клеток в камере Горяева под увеличением $\times 400$. Для подсчета жизнеспособных клеток к 20 мкл метиленового синего добавляли 20 мкл взвеси клеток, при этом нежизнеспособные клетки окрашивались в синий цвет.

После подготовки и подсчета клеток двум лабораторным животным после обработки операционного поля с соблюдением правил асептики и антисептики в боковую поверхность живота была произведена имплантация культуры клеток в объеме 500 мкл, в количестве 60000 жизнеспособных клеток. На 14 сутки после трансплантации на боковой поверхности живота отчетливо пальпировалась подкожная солидная опухоль в размере 20 мм. Была произведена эвтаназия животных под хлороформным наркозом путем декапитации. С соблюдением правил асептики

и антисептики было произведено вскрытие животных, выделение опухолевого узла с последующим промыванием ткани опухолевого узла стерильным раствором RPMI-1640 + L-глутамин (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK). Ткань опухолевого узла была гомогенизирована и приготовлен раствор взвеси опухолевых клеток на 1 г опухолевой ткани добавлен 1 мл стерильного раствора RPMI-1640 + L-глутамин (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK).

На последующем этапе эксперимента готовую взвесь опухолевых клеток перививали путем подкожной инъекции с соблюдением правил асептики и антисептики лабораторным мышам линии C57Bl6 (n=15) для формирования подкожной солидной опухоли. Рост опухолевого узла определяли один раз в трое суток путем пальпации боковой поверхности живота.

У 14 лабораторных животных перевитая меланома дала рост и животные случайным образом были распределены на III группы. I группа (n=3) контрольная, животным данной группы на 7 сутки внутривенно в боковую вену хвоста однократно, был введен фосфатно-солевой раствор (VWR Radnor, PA, USA), в объеме 200 мкл. Группа II, (n=5) отрицательный контроль, животным данной группы однократно внутривенно в боковую вену хвоста был введен негативный контроль имитатора mirvana™ mirna Mimic Negative Control #1 (Ambion, Carlsbad, USA) 1,2 мг/кг, конечный объем раствора 200 мкл. III – опытная группа (n=6), животным данной группы был введен синтетический аналог (имитатор) исследуемой микроРНК miR-204-5p mirVana® miR-204-5p mimic (Ambion, Carlsbad, USA), в дозировке 1,2 мг/кг в виде раствора 7,4 мМ в объеме 200 мкл. Для разведения и в качестве трансфектанта был использован InvivoFectamine® 3.0 Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA).

Вывод животных из эксперимента осуществляли на 15 сутки путем декапитации под хлороформным наркозом. После вскрытия макроскопически оценивали и взвешивали органы. Для дальнейших исследований фиксировали кусочки ткани в криопробирках в жидком азоте.

Выделение РНК осуществляли в ламинарном боксе с соблюдением правил асептики, антисептики. Перед выделением РНК образцы ткани извлекались из жидкого азота и размораживались на ледяной бане. Во время работы для избегания контаминации образцов руки и стерильные наборы инструментов дополнительно обрабатывали средством для деонтаминации от РНК RNaseZap™ (Applied Biosystems, USA). Из образцов ткани, полученных при вскрытии животных и сохраненных в жидком азоте с помощью набора DiaGene 3317.0050 (Москва, Россия), согласно протоколу производителя и элюировали 150 мкл

деионизированной свободной от нуклеаз воды. Концентрацию микроРНК измеряли на флуориметре Qubit® 2.0 (Invitrogen by Life Technologies, Singapore, Singapore) с использованием набора Qubit® microRNA Assay kit (Ref. Q32880, Юджин, Орегон, США). Концентрация микроРНК в образцах, представленных на микрочиповый анализ, превысила 16,2 нг/мкл.

Микрочипирование проводили с использованием системы для микрочипирования GeneAtlas™ (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Использовались образцы РНК с концентрацией микроРНК в диапазоне от 16,2 до 49,8 нг / мкл, подвергались полиаденилированию и последующему биотинилированию с использованием Affymetrix® Flash Tag™ Biotin HSR (Ref. 901913, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Меченые молекулы затем гибридизовались при 48 °С в течение 20 ч на массивах в Матрице Affymetrix® miRNA 4.1 Array Strip (Affymetrix, Santa Clara, USA) с использованием модуля гибридизации и окрашивания GeneChip® GeneAtlas™ (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) системы GeneAtlas™. Интенсивность флуоресцентного сигнала оценивали при помощи системы GeneAtlas™ Imaging Station. Как спайковый контроль олигонуклеотидов, так и контрольные стадии процедуры гибридизации были выполнены в соответствии с инструкциями производителя и под контролем качества. Контроль качества эксперимента проводился автоматически на этапе визуализации и для последующего анализа использовались только образцы, прошедшие порог контроля качества.

Для определения уровней экспрессии исследуемой микроРНК miR 204-5p был произведен анализ ПЦР в реальном времени. Реакцию обратной транскрипции проводили в реакционной смеси, содержащей 2 мкл 5х праймеров специфичных к исследуемой микроРНК miR-204-5p TaqMan Assays hsa-miR-204-5p (Assay ID 478491, № A25576, Applied Biosystems, Foster City, USA), 4 мкл РНК матрицы, полученный объем разводили стерильной водой свободной от РНКаз до конечного объема 9 мкл., после чего к полученной смеси добавляли 1 мкл фермента MMLV ревертазы по 2 мкл DTT и dNTP и 4 мкл 5х буфера для синтеза первой цепи из набора MMLV RT kit (Евроген, Москва, РФ). Полученную смесь прогревали в течение 2 минут при 70 °С. После чего к полученной комплементарной ДНК добавляли 8 мкл 2,5-кратной реакционной смеси РТ-ПЦР и ROX-эталонного красителя (Синтол, Москва, Россия), 1 мкл 20-кратных праймеров, и деионизированную воду до общего объема 20 мкл. U6snRNA и snoRNA 234 (Assay ID 001973, No. 4427975; Applied Biosystems, USA и Assay ID 001234, No. 4427975;

Applied Biosystems, USA) соответственно, были использованы в качестве эндогенных контролей для оценки относительных уровней экспрессии микроРНК. Реакцию проводили на системе StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Singapore, Singapore) со следующим протоколом циклирования температуры: 50 °C в течение 2 мин и 95 °C в течение 10 мин, затем 40 циклов 95 °C в течение 15 сек и 60 °C в течение 1 мин с детекцией FAM/VIC. Для каждого эксперимента было выполнено по три повтора. Экспрессия микроРНК или мРНК нормализовалась до геометрического среднего значения U6 snRNA и snoRNA 234. Данные анализировали с использованием метода $\Delta\Delta Ct$.

Для контроля качества, статистического анализа и аннотирования микроРНК использовали программное обеспечение Expression Console и Transcriptome Analysis Console 2.0 Soft-Ware (Build 1.4.0.3.8) (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Данные были автоматически статистически проанализированы с использованием теста ANOVA и FDR-скорректированных значений. Различия в экспрессии микроРНК оценивали с помощью U -критерия Манна-Уитни и считали значимыми при $p \leq 0,05$. Иерархическая кластеризация уровней экспрессии микроРНК была сформирована с помощью программного обеспечения Transcriptome Analysis Console 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Данные ПЦР в реальном времени были проанализированы методом $\Delta\Delta Ct$ и непараметрическому U -критерий Манна-Уитни с использованием программы Statistica 6.1 (StatSoft, Москва, Россия).

Анализ сигнальных путей, регулируемых наиболее измененными микроРНК в образцах ткани почек экспериментальной группы по сравнению с контрольной группой, осуществляли при помощи программного обеспечения DIANA miRPath v. 3.0 на основе базы данных KEGG (с применением баз данных TargetScan v.7.0, TarBase, microT-CDS). Определение генов мишеней mmu-miR-26a-5p, производилось по трем биоинформатическим базам данных (TargetScan, MIRDB, MiRTarBase).

Результаты и обсуждение

Исследование экспрессии miR-204-5p в ткани печени, лёгких и почек экспериментальных животных показало увеличение экспрессии miR-204-5p в ткани почек в экспериментальной группе в 9 раз по сравнению с контролем ($p=0,01$). В ткани печени отмечалась тенденция к увеличению уровня miR-204-5p ($p=0,06$). На основании полученных данных на следующем этапе исследования было проведено определение экспрессионного профиля микроРНК в ткани почек у животных в экспериментальной и контрольной группах.

По результатам микрочипирования в ткани почек экспериментальных животных, после введения синтетического аналога (имитатора) miR-204-5p, по сравнению с группой контроля, было выявлено изменение уровня 12 микроРНК. При этом 9 микроРНК имели пониженный уровень экспрессии в ткани почек после введения мимика miR-204-5p, тогда как 4 микроРНК были повышены, но менее чем в 2 раза. При иерархической кластеризации результатов микрочипирования (рис. 1, 2) наблюдалось четкое разделение образцов экспериментальной и контрольной групп на два класса. Наиболее значимые изменения между экспериментальной группой после введения имитатора miR-204-5p и контрольной группой наблюдались в микроРНК, определенных в таблице 1. Следует отметить, что все микроРНК, которые были изменены в экспериментальной группе по сравнению

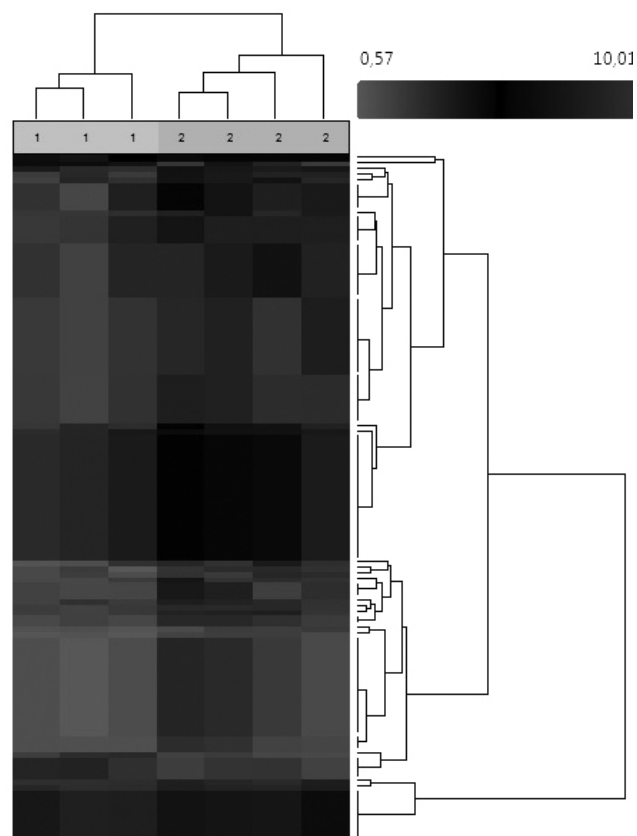


Рисунок 1. Результаты профилирования микроРНК почек экспериментальной группы животных (обозначены цифрой 1) и контрольной группы (обозначены цифрой 2). Цвет кластера от серого до черного отражает относительный уровень экспрессии микроРНК в соответствии с цветовым ключом.

Figure 1. Results of microRNA profiling of kidneys from experimental group of animals (indicated by number 1) and the check group (indicated by number 2). Cluster color, varying from gray to black, reflects the relative level of miRNA expression in accordance with the key color.

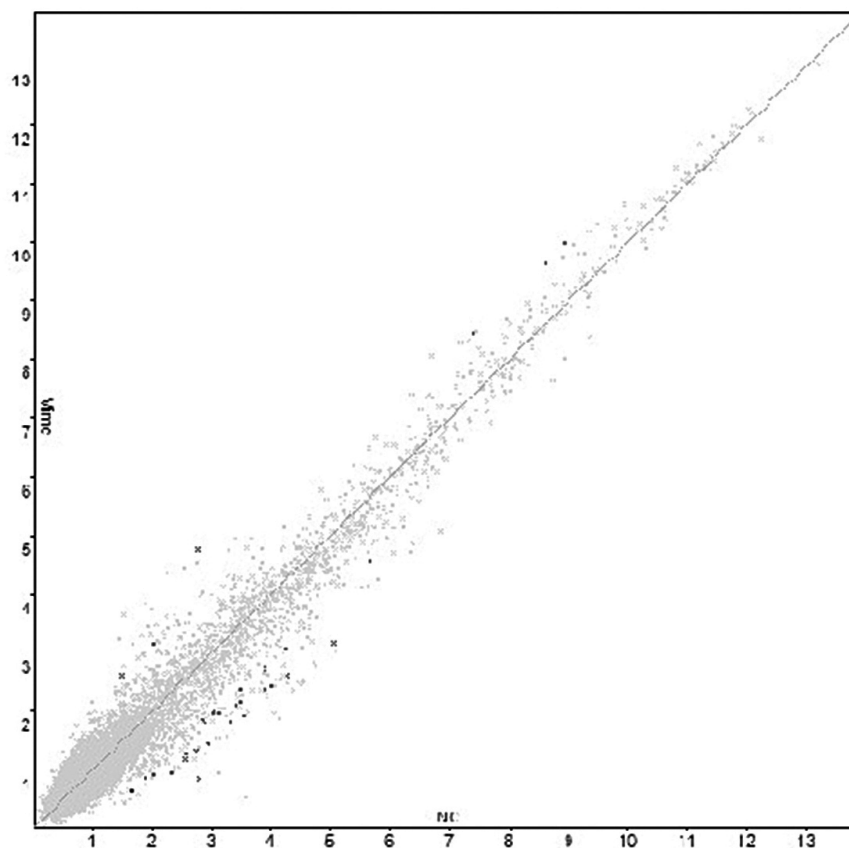


Рисунок 2. Диаграмма разброса уровня экспрессии микроРНК образцов ткани почек экспериментальной группы животных и контрольной. Сверху от разделительной линии обозначены уровни микроРНК с повышенной экспрессией в экспериментальной группе по сравнению с контролем. Снизу от разделительной линии – обозначены уровни микроРНК с повышенной экспрессией в экспериментальной группе по сравнению с контролем.

Figure 2. Diagram of miRNA expression level of kidney tissue samples from experimental animal group and a check one. Above the dividing line are microRNA levels with increased expression in experimental group compared with the check one. Below the dividing line are miRNAs levels with increased expression in experimental group compared to the check one.

Таблица 1

Уровни экспрессии микроРНК тканей почек мышей линии C57Bl6 с экспериментальной меланомой B16 после введения имитатора miR-204-5p и контрольной группы по данным микрочипирования

Table 1

miRNAs expression levels of kidney tissue in C57Bl6 mice line experimental B16 melanoma after administration of miR-204-5p simulator and in check group according to microchip data

№	Наименование микроРНК	Кратность различий уровней экспрессии микроРНК в экспериментальной группе в сравнение с контрольной группой *	p
1	mmu-miR-26a-5p	-3,7	0,026332
2	mmu-miR-221-3p	-2,6	0,047448
3	mmu-miR-669n	-2,59	0,015563
4	mmu-miR-3102-5p.2-5p	-2,2	0,026169
5	mmu-miR-652-3p	-2,18	0,047324
6	mmu-miR-3472	-2,16	0,037189
7	mmu-miR-6898-5p	-2,07	0,030964

Примечание: * отрицательное значение показателя – пониженный уровень микроРНК в группе модуляции miR-204-5p, p – различия считались статистически значимыми при значении показателя <0,05.

Note: * a negative value of the indicator is a reduced level of microRNA in the miR-204-5p modulation group, p– differences were considered statistically significant with a value of <0.05.

с контрольной группой более чем в 2 раза, демонстрировали снижение экспрессии в группе животных после введения имитатора miR-204-5p. Наиболее выраженное снижение экспрессии микроРНК в 3,7 раза в экспериментальной группе по сравнению с контрольной группой наблюдалось для miR-26a-5p, что способствовало выбору данной микроРНК для дальнейшего исследования. Целью дальнейшего биоинформатического анализа была оценка возможных механизмов модулирующего эффекта miR-204-5p на экспрессию miR-26a-5p.

Определены 47 механизмов передачи сигнала посредством биоинформационного анализа как измененные в образцах ткани почек экспериментальной группы по сравнению с контрольной группой. Сигнальные механизмы представлены в таблице 2. Механизмы передачи сигнала, регулируемые микроРНК с наиболее высоким уровнем изменений, включали сигнальные пути митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК), протеогликанов при почечно-клеточном раке, клеточной адгезии, деградации лизина, процессы регуляции реабсорбции кальция и синтеза различных видов гормонов (табл. 2).

Биоинформатический анализ генов-мишеней и сигнальных каскадов, регулируемых максимально сниженной микроРНК – miR-26a-5p, выявил у нее 42 гена-мишени. Гены-мишени для микроРНК определялись на основе следующих информационных баз: TargetScan, MIRDB, MiRTarBase. Для дальнейшего исследования были использованы гены (рис. 3), являющиеся мишенями для данной микроРНК на основе трех вышеуказанных баз данных. Полученные гены-мишени, регулируются измененными в экспериментальной группе микроРНК. Гены-мишени miR26a-5p включали: *Dmxi1*, *Nudt11*, *Strbp*, *Kcnj2*, *Stradb*, *Rgs17*, *Ppp3r1*, *Trp53inp1*, *Ccnj*, *Tmem184b*, *Map2*, *Pten*, *Fa2h*, *Nus1*, *Elavl2*, *Ctstl*, *Patz1*, *Tob1*, *Msantd1*, *Tbc1d30*, *Slc2a13*, *Acs13*, *Slc38a2*, *Ezh2*, *Mdn1*, *Acbd5*, *Atf2*, *Trpc3*, *Mtx2*, *Crebzf*, *Dock4*, *Slc19a2*, *Rhoq*, *Sema6d*, *Tmem263*, *Capn10*, *Arhgef26*, *Osbpl2*, *Zdhhc6*, *Ndfip2*, *Ddx17*, *Mat2a*. Функциональная роль генов-мишеней miR-26a-5p связана с 64 биологическими процессами, включающими апоптоз, клеточную пролиферацию, ангиогенез, ответ на окислительный стресс, метаболизм пирувата, сигнальные каскады МАРК, RAS, p53.

Таблица 2
Механизмы передачи сигнала, регулируемые микроРНК с наиболее высоким уровнем изменений (представлено 15 наиболее статистически высокозначимых сигнальных механизмов)

Table 2
Signal transmission mechanisms regulated by miRNAs with the highest change level (15 of most statistically important signaling mechanisms are presented)

№	Сигнальные пути (KEGG pathway)	p
1	Протеогликаны при раке (mму05205)	0,0000003944362
2	Сигнальный путь гормонов щитовидной железы (mму04919)	0,0000027966718
3	FoxO - сигнальный механизм (mму04068)	0,0001554165293
4	Деградация лизина (mму00310)	0,0001985048280
6	Биосинтез стероидов (mму00100)	0,0007464296541
7	Почечно-клеточный рак (mму05211)	0,0009025783621
8	Сигнальный каскад при раке (mму05200)	0,0023275754862
9	Сигнальный механизм рецепторов Т-лимфоцитов (mму04660)	0,0485862149247
10	МАРК сигнальный каскад (mму04010)	0,0484778478264
11	Эндокринный механизм регуляции реабсорбции кальция (mму04961)	0,0337499197418
12	Ras-сигнальный путь (mму04014)	0,0250555391704
13	Клеточной адгезии (mму04514)	0,0010618037984
14	Всасывания минералов (mму04978)	0,0193072642447
15	Гипертрофическая кардиомиопатия (mму05410)	0,0163278839683

Примечание: p – различия считались статистически значимыми при значении показателя <0,05.

Note: p– differences were considered statistically significant with a value of <0.05.

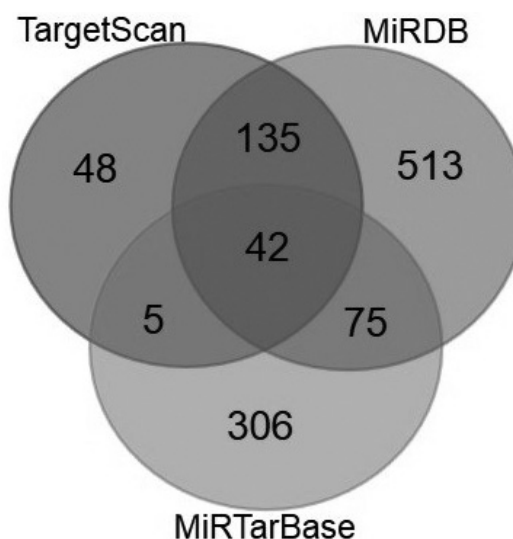


Рисунок 3. Диаграмма Эйлера-Венна генов-мишеней микроРНК miR-26a-5p, которые были определены по трем биоинформатическим базам данных (TargetScan, MIRDB, MiRTarBase).

Figure 3. Euler/Venn diagram of miR-26a-5p miRNA target genes, which were determined using three bioinformatics databases (Target Scan, MIRDB, MiRTarBase).

Применение антисмысловых олигонуклеотидов обладает потенциальной терапевтической значимостью для лечения различных заболеваний. Данный фармакологический эффект связан с модулированием экспрессионной активности различных микроРНК и дальнейшим изменением содержания в клетках их генов-мишеней, которые в свою очередь могут отвечать за реализацию таких биологических процессов как: пролиферация, инвазия, ангиогенез, влияющих на опухолевую прогрессию.

В этой связи нами было выполнено экспериментальное исследование на основе модуляциями уровня микроРНК miR-204-5p в меланоме B16 *in vivo*. Выявлено, что при введении антисмысловых нуклеотидов, их повышенная концентрация, а значит и предполагаемые эффекты, наблюдаются в ткани почек. В этой связи в дальнейшем было осуществлено микрочипирование ткани почек контрольной и экспериментальной групп с целью оценки характера изменений всех микроРНК в данной ткани после повышения уровня miR-204-5p. Известно, что многие микроРНК действуют синергически, а поэтому изменение уровня одной микроРНК может приводить к изменению уровней экспрессии других микроРНК.

Результаты исследования были получены при помощи ПЦР в режиме реального времени и метода микрочипирования. Был получен разнонаправленный характер результатов. Причинами этого явления может являться небольшой объём выборки. Помимо этого, структура самой микроРНК может приводить к снижению качества отжига при проведении метода микрочипирования, т.к. данная микроРНК обладает относительно большой длиной – 22 пары нуклеотидов, что может приводить к нарушению связывания комплементарных нуклеотидов гена и данной микроРНК образца.

Анализ сигнальных каскадов регулируемых микроРНК с наиболее высоким уровнем изменений, показал наличие трансформации сигнальных механизмов функционально связанных с канцерогенезом, в том числе с почечно-клеточным раком. Подобный результат может указывать на возможное формирование премеагастатических ниш в ткани почек у экспериментальных животных.

Для успешного метастазирования опухоли требуются не только формирование локальных ниш в первичном опухолевом узле, но и «премеагастатических» ниш в органах-мишенях метастазирования [5]. Формирование премеагастатических ниш необходимо для выживания клеток опухоли их инвазии и формировании микрометастазов в отдаленных органах [6]. В процессе формирования премеагастатической ниши происходит деградация компонентов внеклеточного матрикса: протеогликанов, гликопротеинов,

полисахаридов и др. [7], что приводит к гиперактивации сигнальных каскадов, регулируемых микроРНК с наиболее высоким уровнем изменений.

Нарушения регуляции кальциевого обмена, полученные по данным биоинформатического анализа, могут свидетельствовать также в пользу формирования премеагастатических ниш в дистантных органах. Помимо этого данный феномен может быть связан с активацией кальций-зависимых ферментов, например белка S-100, который является одним из самых изученных на данный момент онкомаркеров меланомы кожи [8].

Биоинформационный анализ генов-мишеней и сигнальных каскадов, регулируемых максимально сниженной микроРНК – miR-26a-5p, выявил у нее 42 гена-мишени. Одним из самых изученных генов-мишеней данной микроРНК был ген *EZH2*. Роль гена усилителя *zeste homolog 2 (EZH2)* в канцерогенезе сложна и может варьироваться в зависимости от типа рака или стадии [9]. *EZH2* представляет собой высококонсервативную гистоновую метилтрансферазу, которая нацелена на лизин 27 гистона H3 (H3K27) [10]. Гиперэкспрессия *EZH2* часто обнаруживается при опухолях различной локализации и коррелирует с поздними стадиями заболевания и с плохим прогнозом [11]. По данным литературы, описана взаимосвязь гена *EZH2* и одним из основных драйверных генов при меланоме кожи геном BRAF [12].

Следует отметить, что сочетанное фармакологическое ингибирование с применением вемурафениба (BRAF-ингибитора) и GSK2816126 (*EZH2* ингибитора) показало лучший терапевтический эффект по сравнению с монотерапией вемурафенибом [13].

Заключение

Таким образом, можно резюмировать, что модуляция уровня miR-204-5p на модели экспериментальной меланомы на мышах линии *C57Bl6* привела к изменениям уровней экспрессии небольшого кластера микроРНК, которые могут участвовать в формировании премеагастатических ниш в органах мишенях.

Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 19-15-00110).

Литература

1. Lee RG, Crosby J, Baker BF, Graham MJ, Crooke RM. Antisense Technology: An Emerging Disease Therapeutics. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2013;(6):969–980. DOI: 10.1007/s12265-013-9495-7
2. Zborovskaya IB, Komel'kov AV. MicroRNA-155-5p in pathogenesis of cancer. *Advances in Molecular Oncology*. 2017;4(3):27-36.
3. Esau CC, Monia BP. Therapeutic potential for microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(2–3):101–114. DOI: 10.1016/j.addr.2007.03.007

4. Palkina NV, Komina AV, Aksenenko MB, Ruksha TG. MicroRNA 204-5p decreases proliferation/viability and the ability to form colonies in melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017; 137(10): 291. DOI: 10.1016/j.jid.2017.07.777

5. Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, Psaila B, Kaplan RN, Bromberg JF, Kang Y, Bissell MJ, Cox TR, Giaccia AJ, Ertler JT, Hiratsuka S, Ghajar CM, Lyden D. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews Cancer*. 2017;17(5):302-317. DOI: 10.1038/nrc.2017.6

6. Lu P, Weaver VM, Werbcorresponding Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology*. 2012;196(4):395-406. DOI: 10.1083/jcb.201102147

7. Ozbek S, Balasubramanian PG, Chiquet-Ehrmann R, Tucker RP, Adams JC. The evolution of extracellular matrix. *Molecular and Cellular Biology*. 2010;21(14):4300-4305. DOI: 10.1091/mbc.E10-03-0251

8. Xiong TF, Pan FQ, Li D. Expression and clinical significance of S100 family genes in patients with melanoma. *Melanoma Research*. 2019;29(1):23-29. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000512

9. Sanna L, Marchesi I, Melone MAB, Bagella L. The role of enhancer of zeste homolog 2: From viral epigenetics to the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(9):6508-6517. DOI: 10.1002/jcp.26545

10. Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutation Research*. 2008;627(1-2):21-29. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2008.07.010

11. Sun R, Shen J, Gao Y, Zhou Y, Yu Z, Hornicek F, Kan Q, Duan Z. Overexpression of EZH2 is associated with the poor prognosis in osteosarcoma and function analysis indicates a therapeutic potential. *Oncotarget*. 2016;7(25):38333-38346. DOI: 10.18632/oncotarget.9518

12. Sanchez IM, Purwin TJ, Chervoneva I, Erkes DA, Nguyen MQ, Davies MA, Nathanson KL, Kemper K, Peep DS, Aplin AE. In Vivo ERK1/2 Reporter Predictively

Models Response and Resistance to Combined BRAF and MEK Inhibitors in Melanoma. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2019;18(9):1637-1648. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-18-1056

13. Fu H, Cheng L, Sa R, Jin Y, Chen L. Combined tazemetostat and MAPKi enhances differentiation of papillary thyroid cancer cells harbouring BRAF^{V600E} by synergistically decreasing global trimethylation of H3K27. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020;24(6):3336-3345. DOI: 10.1111/jcmm.15007

Сведения об авторах

Лаврентьев Семен Николаевич, аспирант, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2644788; e-mail: SemyonLavrentev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2214-1336>

Аксененко Мария Борисовна, к.м.н., доцент, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2644788; e-mail: aksenenko_mariya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7660-700X>

Аверчук Антон Сергеевич, к.б.н., доцент, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2644788; e-mail: antonaverchuk@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1284-6711>

Зинченко Иван Сергеевич, аспирант, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2644788; e-mail: Zinchenko.Ivan.003@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7085-6304>

Author information

Semen N. Lavrentev, graduate student, Professor V. F. Voino-YasenskyKrasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone: +7(391)2644788; e-mail: SemyonLavrentev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2214-1336>

Maria B. Aksenenko, Cand.Med.Sci., Professor V. F. Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; I. S. Berzon Krasnoyarsk Clinical Hospital №20; Address: 12, Instrumentalnaya Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660123; Phone: +7(391)2644788; e-mail: aksenenko_mariya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7660-700X>

Anton S. Averchuk, Cand.Bio.Sci., Professor V. F. Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; I. S. Berzon Krasnoyarsk Clinical Hospital №20; Address: 12, Instrumentalnaya Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660123; Phone: +7(391)2644788; e-mail: antonaverchuk@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1284-6711>

Ivan S. Zichenko, graduate student, Professor V. F. Voino-YasenskyKrasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone: +7(391)2644788; e-mail: Zinchenko.Ivan.003@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7085-6304>

Дата поступления 23.02.2020 г.

Дата рецензирования 09.04.2020 г.

Принята к печати 13.05.2020 г.

Received 23 February 2020

Revision Received 09 April 2020

Accepted 13 May 2020



This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.