

На правах рукописи

Земцов Данил Сергеевич

**РОЛЬ микроРНК miR-204-5p В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ
ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ C57Bl6
С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ B16**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Омск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель –

доктор медицинских наук, профессор **Рукша Татьяна Геннадьевна**

Официальные оппоненты:

Гребнев Дмитрий Юрьевич, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Смирнова Ольга Валентиновна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией клинической патофизиологии, главный научный сотрудник Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «24» сентября 2024 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.048.03, созданного при ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, по адресу: 644099, г. Омск, Ленина, 12; тел. (3812) 23-32-89.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России и на сайте www.omsk-osma.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Корпачева
Ольга Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Меланома кожи (МК) – злокачественное новообразование кожи с высоким уровнем гетерогенности и устойчивостью к современной противоопухолевой терапии (Имянитов Е.Н., 2012; Ning N. 2020). Несмотря на успехи в области создания новых терапевтических стратегий в отношении лечения опухоли, заболевание остается потенциально смертельным злокачественным новообразованием (Ahmed B. 2020 Watt K. et al., 2020). Меланома кожи составляет от 5% до 10% среди выявленных злокачественных новообразований кожи, но из всех случаев онкологических заболеваний кожи на меланому кожи приходится более 80% смертельных исходов (Watt K. et al., 2020).

Меланома кожи характеризуется значительными генетическими и эпигенетическими изменениями, включая выраженные нарушения экспрессии и функционирования некодирующих РНК. Ранее было определено, что микроРНК miR-204-5p относится к одной из наименее экспрессируемых микроРНК при меланоме (Komina A. et al., 2016). Установлено, что низкие уровни miR-204-5p ассоциированы с высокоагрессивным фенотипом опухоли (Hong BS. et al., 2019). Вместе с тем, повышенная экспрессия miR-204-5p увеличивает способность к миграции, инвазии и метастазированию клеток рака молочной железы (Hong BS. et al., 2019). miR-204-5p и miR-211-5p, являющиеся гомологами, экспрессируются в зависимости от фенотипа клеток меланомы и связаны с различными процессами: в клетках меланомы, бедных пигментом меланином, экспрессируется miR-204-5p и участвует в подавлении клеточной подвижности; miR-211-5p экспрессируется в клетках меланомы, богатых меланином и опосредует повышение пигментации и дифференцировки клеток. Высокие уровни miR-204-5p и miR-211-5p в клетках меланомы связывают, с одной стороны, с онкосупрессорной функцией, с другой стороны – эти микроРНК ассоциированы с резистентностью к селективным ингибиторам BRAF (Vitiello M. et al., 2017).

Диссеминированная форма меланомы кожи характеризуется высокой летальностью – медиана выживаемости пациентов не превышает 9 месяцев на фоне лечения стандартными методами химиотерапии (Maverakis E. et al., 2015). По данным на 1 марта 2019 года, меланома находится на двадцатом месте по распространённости видов злокачественных новообразований в мире, с 287723 новых случаев в 2018 году с прогнозом до 466914 случаев в 2040 году. Средняя заболеваемость меланомой составляет 12.7 тысяч на 100 тыс. человек. Меланома является причиной более 60 тысяч смертей в год в мире (Bray F. et al., 2018).

Было показано, что органы-мишени метастазирования МК динамично изменяются под действием первичной опухоли раньше, чем произошла диссеминация опухолевых клеток и формирование метастазов в них (Reinado N. et al., 2017). Для обеспечения этого процесса первичная опухоль секретирует экстраклеточные везикулы, которые содержат многочисленные белки, РНК, выполняющие, в свою очередь, важные функции, в том числе, такие как взаимодействие между клетками, избегание эффектов иммунной системы, способствуя формированию так называемого опухолевого микроокружения (ОП)

в органах-мишенях, и дальнейшей инвазии опухолевых клеток в эти ткани (Mannavola F. et al., 2016). Таким образом, микроРНК могут выступать в роли модуляторов опухолевой прогрессии, регулируя экспрессию генов, ассоциированных с канцерогенезом (Peng Y., 2016).

Цель исследования – определить изменения в опухоли и органах-мишенях метастазирования после введения ингибитора miR-204-5p на модели меланомы *in vivo*

Задачи исследования:

1. Определить уровни экспрессии микроРНК miR-204-5p и miR-211-5p в клетках меланомы и паренхиматозных органов – мишеней метастазирования меланомы после введения ингибитора miR-204-5p микроРНК;
2. Определить уровни экспрессии генов-мишеней miR-204-5p в клетках меланомы и паренхиматозных органов – мишеней метастазирования меланомы после введения ингибитора miR-204-5p;
3. Осуществить анализ динамики роста опухоли после ингибирования miR-204-5p;
4. Оценить выраженность изменений характера лимфоцитарной инфильтрации в органах-мишенях метастазирования меланомы на фоне воздействия ингибитором miR-204-5p;
5. Оценить профиль экспрессии мРНК в легких мышей с меланомой B16 после экспериментальной терапии ингибитором miR-204-5p.

Научная новизна:

1. Впервые осуществлена экспериментальная терапия меланомы посредством системного введения селективного ингибитора микроРНК miR-204-5p на основе антисмысловых олигонуклеотидов с замкнутыми нуклеиновыми кислотами.
2. Впервые показано, что гены *SIRT1* и *BCL-2* являются функциональными генами-мишенями miR-204-5p в клетках легких и печени в модели меланомы B16 *in vivo*.
3. Впервые показано, что при парентеральном введении ингибитора микроРНК miR-204-5p в легких животных с трансплантированной меланомой B16 происходит усиление экспрессии генов – компонентов механизмов передачи сигнала, связанных с активацией иммунной системы и провоспалительных факторов.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

1. Использование антисмысловых олигонуклеотидов – синтетических аналогов микроРНК может быть применено для управления процессом метастазирования в органах-мишенях метастазирования меланомы *in vivo* и в дальнейшем рассмотрено как возможный терапевтический подход при диссеминированных формах злокачественных новообразований.
2. Ингибирование miR-204-5p вызывает изменение провоспалительных механизмов внутриклеточной сигнализации во внутренних органах, что может быть применено для регуляции иммунопатологических процессов.

Методология и методы исследования. Работа носит экспериментальный характер. Для достижения обозначенных ранее задач были выполнены

следующие лабораторно-инструментальные исследования: проведен экспрессионный анализ на основе ПЦР в реальном времени с определением уровня экспрессии микроРНК и генов-мишеней; иммуногистохимическое исследование; микрочипирование с определением профиля мРНК. Объектами исследования мыши линии C57Bl6 с трансплантированной меланомой B16 на фоне парентерального введения ингибитора микроРНК miR-204-5p в качестве опытной терапии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Введение специфического ингибитора микроРНК miR-204-5p *in vivo* вызывает изменение экспрессии данной микроРНК в легких, а генов-мишеней miR-204-5p *BCL2* и *SIRT1* в легких и печени – органах, характеризующихся частым поражением клетками меланомы в процессе метастазирования.

2. В ткани легких и печени происходит снижение уровней экспрессии микроРНК miR-204-5p, которая оказывает неканонические эффекты на гены-мишени – приводит к снижению экспрессии генов *BCL2* и *SIRT1*.

3. При снижении уровня экспрессии микроРНК miR-204-5p наблюдается повышение пролиферации клеток меланомы *in vitro*, а также происходят изменения в легких, характерные для активации иммунной системы и фибробластов *in vivo*.

4. Вне зависимости от уровня экспрессии микроРНК miR-204-5p метастазирование меланомы B16 сопряжено с перепрограммированием органов-мишеней – и в легких, и в печени при метастазировании происходит повышение уровня фактора сосудистого роста (VEGFA), в печени – альфа-актина гладких мышц (SMA- α), кластера дифференцировки 31 (CD31), что свидетельствует об изменении выраженности ангиогенеза, активации фибробластов.

Степень достоверности и апробация результатов. Применение современных и точных методов исследования и диагностики, большой объем экспериментального материала и проведение адекватного статистического анализа, свидетельствует о высокой достоверности выполненной работы. Все результаты были подвергнуты современному статистическому анализу. Материалы и результаты исследования представлены и обсуждены на XXII Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2019 г.).

Внедрение результатов исследования. Полученные результаты по итогам диссертационного исследования о механизмах опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи с участием микроРНК, miR-204-5p и miR-211-5p, заключающиеся в регуляции экспрессии генов *SIRT1* и *BCL2* связанных с канцерогенезом, отражены в лекционном материале по теме «Типовые нарушения тканевого роста. Канцерогенез» у студентов, обучающихся по специальности: 31.05.01 – «Лечебное дело».

Личное участие автора. Автор разработал дизайн исследования, лично проводил эксперименты с животными, культивирование клеток и имплантацию животным, выделение органокомплекса животных, провел биоинформатический анализ, ПЦР в реальном времени, совместно с коллегами выполнил иммуногистохимические исследования, самостоятельно провел обзор зарубежной и отечественной литературы. По итогам полученных результатов

провел статическую обработку и осуществил написание статей по теме диссертации и написание самой диссертационной работы.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 101 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав материалов и методов, главы собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, а также списка литературы, который включает 217 источников, из них 11 отечественных источника и 206 зарубежных. Работа иллюстрирована 13 рисунками, 4 таблицами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все исследования проводились в лаборатории кафедры патологической физиологии с курсом клинической патофизиологии им. проф. В.В. Иванова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации. Представленная работа была положительно одобрена локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета (протокол № 86/2018, от 08 ноября 2018).

Материал исследования:

В экспериментах на животных использовали мышей линии C57Bl6 (n = 30) – самки в возрасте 8 недель весом 19–26 г. Животных приобретали в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск, Россия). Мышей содержали в условиях обычного освещения, с 12-часовым цикле света/темноты при температуре 22-25 °С, доступ к еде и воде не ограничивали.

Клеточная линия меланомы кожи. В экспериментальной работе использовали опухолевые клетки мышинной меланомы кожи линии B16, которая была получена из Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск, Россия). За счет доступности, лёгкости работы, в том числе культивирования, хорошей приживаемости штамма меланомы B16, этот штамм на сегодняшний день является общепризнанным для воссоздания экспериментальной модели меланомы *in vivo* (Giavazzi R., et al. 2014). Охарактеризованная линия клеток меланомы B16 интенсивно применяется для изучения фундаментальных процессов развития опухоли (Giavazzi R., et al. 2014). Известно, что клетки меланомы B16 *in vivo* изначально метастазируют в ткани легких, а уже после этого в другие органы (Stackpole, C.W., et al. 1991; Giavazzi R., et al. 2014). Вторичные метастазы чаще всего локализуются в печени, почках, головном мозге.

Методы исследования

Клетки меланомы культивировали в питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином (ПанЭко, Москва, Российская Федерация) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Нью-

Йорк, США) и с добавлением противомикробного комплекса «Антибиотик-антимикотик» (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Гранд-Айленд, США) в условиях CO₂-инкубатора MSO-5AC (Sanyo Electric Co. Ltd., Осака, Япония) при температуре 37 °С и содержании CO₂ 5%.

Предварительно клетки были разморожены путем помещения их в водяную баню на одну минуту с температурой 37°С. Далее на микроскопе МИКМЕД-2 вариант 16 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия) была определена концентрация жизнеспособных клеток путем окрашивания их раствором метиленового синего в соотношении 1:1 (20 мкл метиленового синего на 20 мкл клеточной взвеси), подсчет осуществлялся в камере Горяева. Жизнеспособные клетки не имели окраски.

Проведя культивирование и определение концентрации клеток меланомы В16, после двукратной обработки инъекционного поля 70% спиртом, лабораторным животным в боковую поверхность передней брюшной стенки была произведена подкожная инъекция клеточной взвеси в объеме 0,5 мл концентрации 1,2 млн опухолевых клеток на 1 мл.

Ингибирование miR-204-5p in vivo.

После формирования пальпаторно ощутимой опухоли случайным образом было сформировано 3 группы животных, которым вводили: контрольной группе (n = 10) 0,01 М фосфатно-буферный раствор (PBS) 100 мкл; группа отрицательного контроля (n = 10), вводили miRCURY LNA™ miRNA Negative Inhibitor Control; опытная группа (n = 10), вводили ингибитор miR-204-5p miRCURY LNA™ microRNA inhibitor в дозировке 25 мг/кг. Для проведения экспериментов использовали синтетический ингибитор miRCURY LNA™ (LNA-i-204-5p) microRNA inhibitor (Qiagen AB, Соллентуна, Швеция) и miRCURY LNA™ miRNA Inhibitor Control (Qiagen AB, Соллентуна, Швеция). Данные ингибиторы вводили животным в дозе 25 мг/кг путем подкожных инъекций в шейную складку с частотой 1 раз в 7 суток согласно инструкции производителя. LNA™ ингибиторы microRNA (антисмысловые олигонуклеотиды с замкнутыми нуклеиновыми кислотами) являются высокоаффинными аналогами нуклеиновых с модификацией рибозного кольца, что делает эти соединения более специфичными и высокостабильными. В качестве контроля использовался стерильный фосфатно-солевой раствор, вводимый в объеме 0,1 мл с тем же режимом введения.

Оценка динамики роста опухоли

Объем опухоли рассчитывали следующим образом: Объем опухоли (мм³) = (длина опухоли x ширина опухоли²) x 0,5. Индекс ингибирования роста опухоли (%) определяли как: (средний объем опухоли опытной группы – средний объем контрольной опухоли) / средний объем контрольной опухоли x 100. В конце эксперимента мышей подвергали эвтаназии, выделяли первичные опухоли и оценивали массу опухоли, массу тела животных, внутренних органов. Массу тела каждой мыши измеряли в начале эксперимента, перед трансплантацией клеток меланомы В16 и один раз в 3 дня в динамике эксперимента.

Окончание эксперимента и выделение органов

Эксперимент прекращали на 15-й с момента трансплантации клеток меланомы животным. Вывод мышей из эксперимента производили путем декапитации под хлороформным наркозом. Оценивалась масса животных. Опухоль, легкие, печень были выделены, измерены и взвешены. Выделенные органы хранили в трех вариантах: одна часть, фиксированная в растворе 10% нейтрального формалина, заливалась в парафин, вторая часть была заморожена при температуре -80°C , оставшаяся часть была стабилизирована в растворе сульфата аммония IntactRNA (Евроген, Москва, Россия) для дальнейшего исследования.

Иммуногистохимический анализ

Из FFPE образцов изготавливали срезы на предметные стекла толщиной 4 микрометра, высушивали на воздухе. В дальнейшем ткань депарафинизировали ксилолом с последующей трехкратной дегидратацией в спиртах по стандартной процедуре. Активность эндогенной пероксидазы блокировали с помощью специфического пероксидазного блока фермента в течение 10 минут при комнатной температуре. Срезы инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами к Ki-67 (разведение 1:100), SpringBio, USA, CD3 (разведение 1:150), CD8 (разведение 1:50), CD31 (разведение 1:50), αSMA (разведение 1:800), VEGFA (разведение 1:100) (Thermo Fisher Scientific, Inc, США). Срезы промывали раствором фосфатно-солевого буфера в концентрации 0,01 моль/л и затем инкубировали со вторичными антителами в течение 30 минут при 37°C . Затем обрабатывали комплексом с пероксидазой хрена (HRP) в течение 30 мин при 37°C . Визуализацию осуществляли раствором 3-амино-9-этилкарбазола (AEC) (AEC, Abcam, UK). Срезы промывали проточной водой и окрашивали гематоксилином с последующей дегидратацией и установкой на них покровного стекла. Процент положительно окрашенных клеток определяли после получения фотографий на микроскопе Olympus BX-41 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) с использованием камеры Infinity 2 (Lumenera Corporation, Ottawa, Canada) для фиксации изображений и соответствующего программного обеспечения Infinity Capture and Infinity Analyze software (version 6.5.2, Lumenera Corporation, Ottawa, Canada). Полученные изображения были просмотрены с разрешением $\times 400$, из них 10 были выбраны случайным образом для дальнейшего определения доли положительно окрашенных клеток.

Иммуноцитохимическое исследование

Для определения выраженности пролиферации клеток меланомы B16 иммуноцитохимическим методом определяли долю Ki-67-положительных клеток. С этой целью применяли поликлональные кроличьи анти-Ki-67-антитела в разведении 1:200 (ab15580: Abcam, США), в качестве вторичных антител использовали козы анти-кроличьи антитела Alexa Fluor® 488 IgG (H + L) в разведении 1:100 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США). Клетки фиксировали 4% формалином в течение 1 часа, с целью пермеабилзации в дальнейшем осуществлялась инкубация с 0.1% раствором Тритона X-100 (Biotechnik GmbH, Германия) на протяжении 15 мин. После этого наносили раствор бычьей сыворотки на 1 ч. Инкубация клеток с антителами к Ki-67 проводилась в течение ночи при температуре 4°C . Далее выполнялась инкубация со вторичными антителами в течение 1 часа. Оценивался процент клеток с

положительно окрашенными ядрами в поле зрения. Для этого общее количество клеток в поле зрения подсчитывалось при световой микроскопии. Подсчет осуществлялся не менее чем в 10 полях зрения с помощью системы визуализации EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, США) как флуоресцентно меченых клеток, так и всех клеток, визуализируемых при световой микроскопии.

Исследование миграционной активности клеток меланомы методом нанесения царапины

После трансфекции ингибитора микроРНК miR-204-5p клетки меланомы В16 культивировали до достижения 70% плотности. После этого пластиковым наконечником осуществлялось нанесение «царапины» в лунках с клеточной культурой, клетки промывались фосфатно-солевым раствором. Размер просвета оценивали сразу после нанесения «царапины», через 12ч, через 24 часа в одних с помощью системы визуализации EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, США).

Выделение микроРНК, постановка реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени

Выделение тотальной РНК из тканей проводили в стерильных условиях в ПЦР-боксе, предварительно обработав все рабочие поверхности, в том числе используемое оборудование, раствором антисептика, а также раствором RNaseZap™ RNase Decontamination Solution (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, США). Небольшие кусочки опухолевой ткани и ткани органов весом 28-30 мкг, гомогенизировали до однородной массы с добавлением лизирующего раствора из комплекта реагентов, предназначенного для выделения РНК/ДНК на основе фенол-хлороформного метода «Рибо-сорб» (Амплисенс, Россия) согласно прилагаемой инструкции. Концентрацию тотальной РНК и микроРНК в пробах определяли на флуориметре Qubit® 2.0 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Сингапур) с использованием коммерческих наборов для оценки концентрации РНК и микроРНК Qubit® HS (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Сингапур.).

Далее для постановки ПЦР в режиме реального времени с целью оценки относительных уровней экспрессии микроРНК и мРНК проводили реакцию обратной транскрипции (ОТ) с использованием реагентов из коммерческого набора MMLV RT (Евроген, Москва, Российская Федерация) согласно инструкции производителя. Для постановки реакции ОТ в пробах, предназначенных для последующей оценки экспрессии микроРНК, вместо рандомных праймеров, входящих в набор, использовали коммерческие специфические 5х-праймеры для микроРНК miR-204-5p и miR-211-5p (№ 4427975, Applied Biosystems, Foster City, США). К каждой пробе раствора тотальной РНК добавляли 1,5 мкл специфичного 5х-праймера из соответствующих наборов для исследования микроРНК или 1,5 мкл рандом-праймера с целью дальнейшего определения экспрессии мРНК. Затем полученную смесь прогревали в термостате в течение 2 минут при температуре 70°C, после чего охлаждали во льду в течение 5 минут. Далее к полученной смеси добавляли 5,5 мкл реакционной смеси, которая состояла из 1 мкл dNTP, 1 мкл ДТТ, 2 мкл 5х-кратного стандартного буфера, 0,5 мкл обратной транскриптазы MMLV и 1 мкл воды, свободной от нуклеаз. Полученную смесь

помещали в термостат и прогревали при температуре 37°C в течение 50 минут для проведения реакции ОТ, которую далее останавливали путем прогрева проб при 70°C в течение 10 минут. Образованные растворы кДНК использовали для амплификации. Объем используемой кДНК на каждый образец составлял 2 мкл. Амплификацию осуществляли на термоциклере StepOne (Applied Biosystems, Сингапур), термоциклирование проводили по стандартно заданному алгоритму: 50°C - 2 мин, 95°C – 10 мин, затем 40 циклов 95°C – 15 секунд, 60°C – 1 мин, с детекцией в реальном времени флуоресцентного сигнала ROX. Реакционная смесь на каждую реакцию имела объем 18 мкл и состояла из 1 мкл 20х-праймеров TaqMan™ Gene Expression Assay (№ 4331182, Applied Biosystems, США) и TaqMan™ MicroRNA & Non-coding RNA Assay (№ 4427975 и 4440886 Applied Biosystems, США), 8 мкл 2,5-кратной реакционной смеси для ОТ-ПЦР в присутствии ROX (Syntol, Москва, Российская Федерация), а также 9 мкл воды, свободной от нуклеаз. Эндогенными нормализующими контролями для исследования уровней экспрессии микроРНК являлись малые некодирующие РНК RNU6B snRNA (№RT001973 Applied Biosystems, США) и SnoRNA234 (№ RT001234 Applied Biosystems, США), для матричных РНК – бета-актин (Actb Mm00446968_m1, No. 4331182; Applied Biosystems, США).

Данные были проанализированы на основе метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Экспрессию микроРНК нормировали одновременно по двум контролям – RNU6B и SnoRNA234, вычисляя квадратный корень от произведения уровней экспрессии по каждому контролю.

Профилирование мРНК на основе микрочипирования

Для проведения микрочипирования с целью профилирования мРНК ткани легких животных, которым вводился отрицательный контроль и ингибитор микроРНК miR-204-5p, использовали наборы микрочипов Gene Atlas (Affymetrix, США). Получение тотальной РНК из ткани легких мышей линии C57Bl6 с трансплантированной меланомой B16 выполнялось с помощью набора PureLink RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Уровень концентрации РНК определяли с помощью флуориметра Qubit® 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Сингапур). Для дальнейшего исследования использовались образцы с концентрацией РНК 5-10 нг. Синтез одноцепочечной ДНК проводился в 2 этапа, после чего все образцы очищали с помощью Purification Beads (Module3, WT Pico Amplification kit, Affymetrix, США). Гибридизацию осуществляли с помощью набора Affymetrix GeneChip Hybridisation Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на биологический чип Gene Chip HuGene 2.1 ST Array Strip (Thermo Fisher Scientific, Singapore) при 48°C в течение 20 часов. Промывку осуществляли с помощью набора Hybridization, Wash and Stain Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на промывочной станции Gene Atlas Fluidic Station, затем осуществляли детекцию флуоресцентных сигналов с помощью прибора Gene Atlas Imaging Station (Affymetrix, США). Анализ полученных результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Transcriptome Analysis Console 4.0.1 (Thermo Fisher Scientific, США). При сравнении уровней экспрессии генов была использована поправка на коэффициент ложного обнаружения FDR. Значения рассматривались как статистически значимые при уровне $p < 0,05$. Гены с

измененной экспрессией, объединялись в соответствии с биологическими функциями согласно представленным алгоритмам, представленным в программном обеспечении Transcriptome Analysis Console 4.0.1 (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистический анализ

Статистический анализ был выполнен с использованием программного пакета статистического анализа Statistica 10.0 (StatSoft, Москва, Российская Федерация). Нормальность распределения оценивалась на основе теста Колмогорова-Смирнова. При сравнении парных независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни. Статистический анализ данных профилирования мРНК был выполнен на основе дисперсионного анализа ANOVA. различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка характера опухолевого роста

Оценка характера опухолевого роста объема, массы опухоли, а также веса мышцей C57Bl6 с трансплантированной меланомой B16 после воздействия специфическим ингибитором miR-204-5p определила отсутствие изменений по сравнению с контрольными группами (рисунок 1).

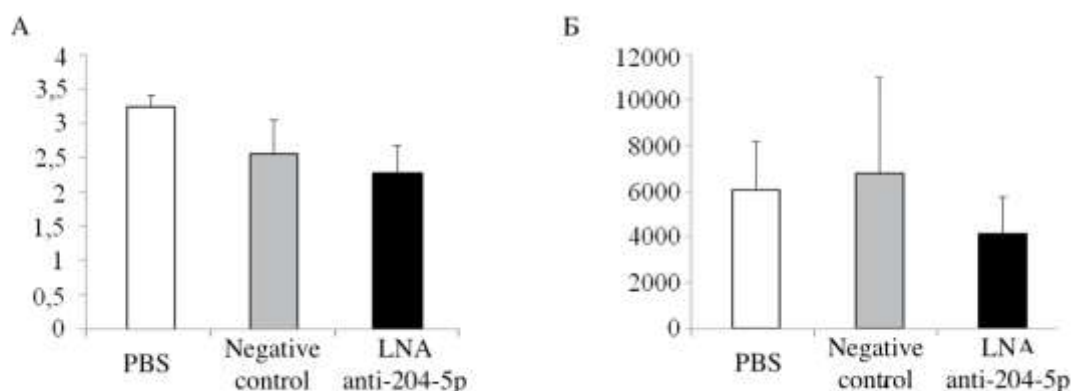


Рисунок 1 – Масса и объем опухоли меланомы B16 после воздействия микроРНК miR-204-5p *in vivo*: **А**- масса опухоли, г; **Б**-объем опухоли, мм³

При визуальной оценке органов-мишеней наличие метастазов определялось у 6 мышей, метастазы в легких были определены у 4 мышей, в селезенке – у 3 животных. Не было выявлено достоверных различий в наличии метастазов в зависимости от характера вводимого вещества животным – контроля, отрицательного контроля, специфического ингибитора микроРНК miR-204-5p. При наличии метастазов в легком микроскопически обнаруживались в просвете альвеол и строме вокруг метастаза нейтрофильные лейкоциты и мелкоочаговые инфильтраты из мононуклеарных клеток.

В печени опухолевых очагов выявлено не было. В некоторых участках синусоидных капилляров микроскопически определялись единичные или расположенные цепочками лимфоциты.

Вместе с тем, согласно проведенному иммуногистохимическому анализу, в легких и печени у животных, имеющих метастазы вне зависимости от локализации, наблюдались изменения, связанные с активацией ангиогенеза, активацией опухоли ассоциированных фибробластов (Таблица 1).

Таблица 1 – Уровни экспрессии VEGF, CD31, SMA- α , CD45Ro, Ki-67 в дистантных органах – легких и печени в зависимости от наличия метастазирования

Легкие		
	Без метастазирования (% положительно окрашенных клеток)	С метастазированием (% положительно окрашенных клеток)
VEGFA	27,8 \pm 8,3	65,9 \pm 10,5*
CD31	0,5 \pm 0,2	1,33 \pm 0,5
SMA- α	81,2 \pm 2,7	78,27 \pm 2,6
CD45Ro	5,9 \pm 1,3	4,17 \pm 0,8
Печень		
	Без метастазирования (% положительно окрашенных клеток)	С метастазированием (% положительно окрашенных клеток)
VEGFA	8,0 \pm 3,9	16,3 \pm 7,1
CD31	0,8 \pm 0,2	4,1 \pm 1,0**
SMA- α	22,9 \pm 2,9	44,1 \pm 6,6***
CD45Ro	7,6 \pm 1,5	6,4 \pm 1,4
Опухоль		
Ki-67-отрицательные клетки	39,4 \pm 8,5	54,0 \pm 11,8
* – P=0,016, ** – P=0,03, *** – P=0,014 по отношению к показателю в группе без метастазирования.		

Оценка уровня Ki-67 в ткани опухоли меланомы B16

Известно, что уровни экспрессии маркера Ki-67 тесно связаны с выживаемостью при меланоме кожи (Ilmonen S. et al., 2005). При оценке уровня экспрессии Ki-67, было выявлено увеличение Ki-67 положительных клеток меланомы B16 на фоне применения ингибитора miR-204-5p *in vitro*, что соотносится с литературными данными, где говорится об онкосупрессорной роли данной микроРНК в ткани опухоли.

При проведении иммуноцитохимического исследования уровня экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67 установлено, что при воздействии ингибитором микроРНК miR-204-5p на клетки меланомы происходит увеличение процента Ki-67-положительных клеток в ткани опухоли, что говорит о повышении пролиферации клеток меланомы B16 (рисунок 2А, 2Б, 2С).

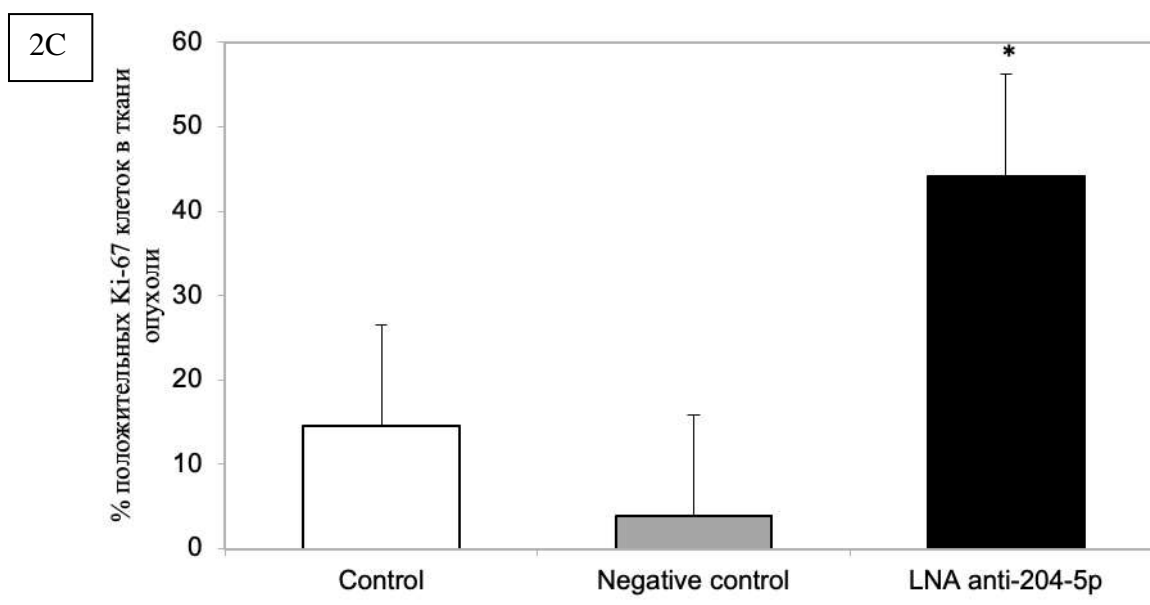
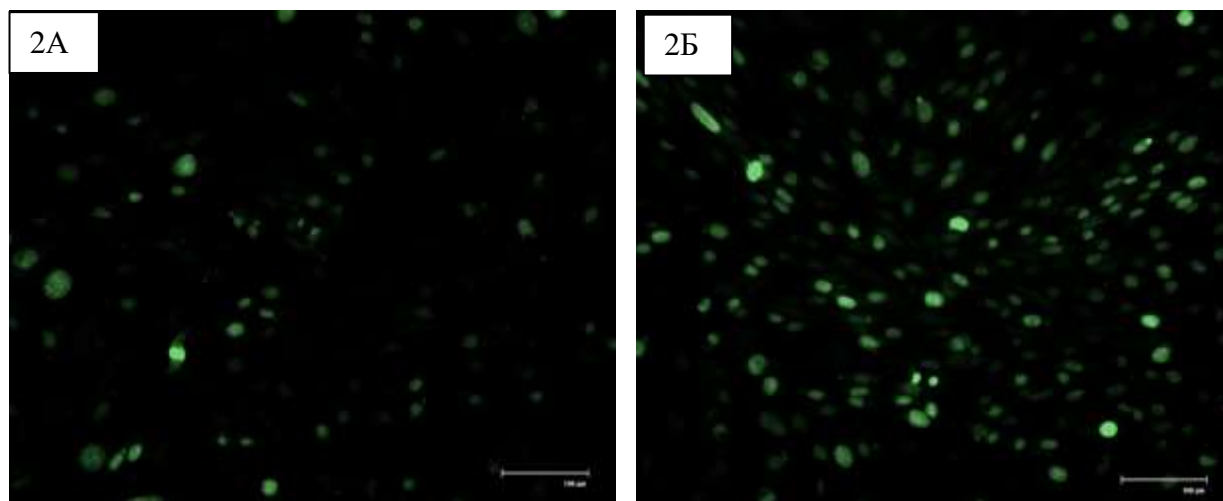


Рисунок 2: 2А – Ki-67-позитивные клетки меланомы в контрольной группе, 2Б – Ki-67-позитивные клетки меланомы в группе, подвергнутой воздействию ингибитором микроРНК miR-204-5p, 2С – % Ki-67-позитивных клеток меланомы после воздействия ингибитором микроРНК miR-204-5p. * – достоверные различия по сравнению с контролем, негативным контролем ($P < 0,05$).

Анализ миграционной активности (scratch-test) после воздействия ингибитором miR-204-5-p

Анализ миграционной активности клеток меланомы В16 после трансфекции ингибитора miR-204-5p, в других сериях эксперимента – негативного контроля, в третьей серии экспериментов – после трансфекции фосфатно-солевого раствора выявил отсутствие различий *in vitro* в скорости зарастания полосы/царапины (рисунок 3).

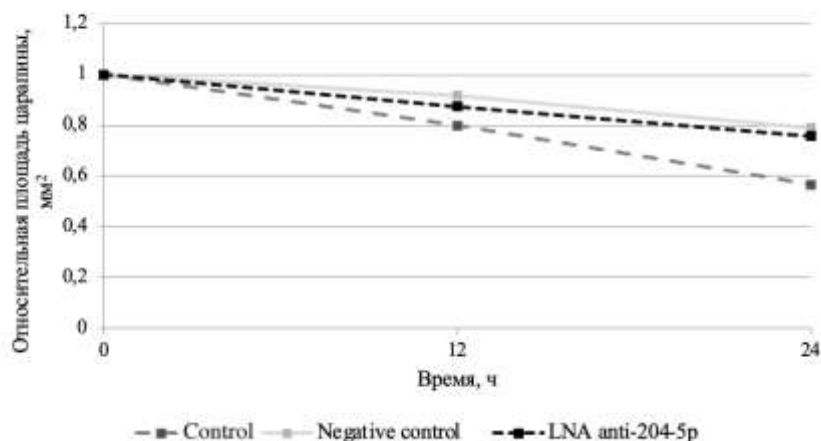


Рисунок 3 – Миграционная активность клеток меланомы В16 после воздействия ингибитором miR-204-5p, определяемая по скорости «зараствания» царапины на дне чашки Петри

Определение уровня экспрессии miR-204-5p и miR-211-5p в тканях опухоли и в органах-мишенях метастазирования меланомы (печень, легкие) после воздействия ингибитором miR-204-5p

Таким образом, исходя из выявленного влияния ингибитора микроРНК miR-204-5p на пролиферацию клеток меланомы *in vitro*, далее определялись биологические эффекты ингибирования miR-204-5p *in vivo*. Первоначально после введения специфического ингибитора микроРНК miR-204-5p *in vivo* оценивалась эффективность трансфекции посредством оценки на основе ПЦР в реальном времени уровней экспрессии микроРНК miR-204-5p и ее гомолога miR-211-5p в ткани опухоли, а также в тканях легких и печени, являющихся органами-мишенями метастазирования меланомы В16. Определялись уровни экспрессии *SIRT1* и *BCL2* – генов-мишеней miR-204-5p.

При определении уровней экспрессии вышеуказанных микроРНК было выявлено отсутствие изменений уровня экспрессии miR-204-5p и miR-211-5p в ткани опухоли (рисунок 4).

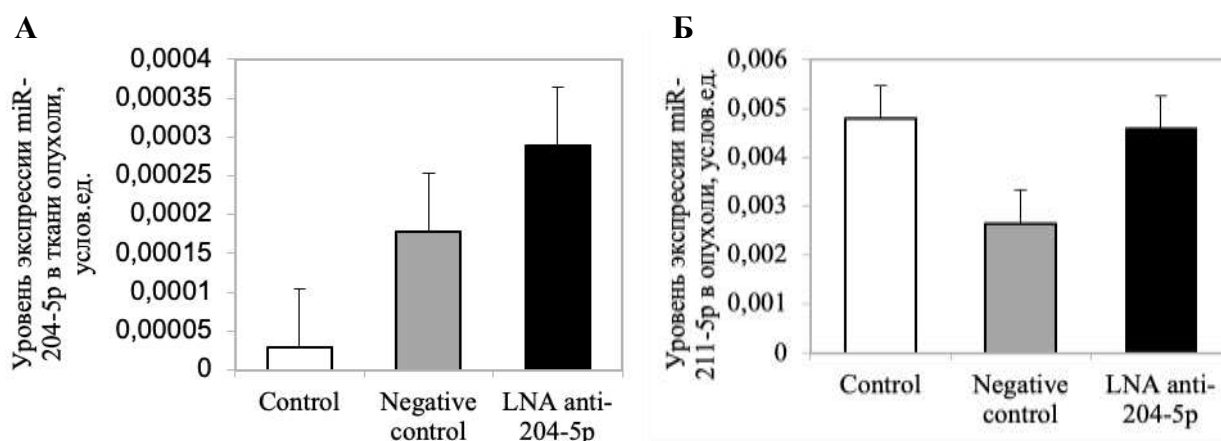


Рисунок 4 – Уровень экспрессии miR-204-5p (А) и 211-5p (Б) в ткани опухоли после воздействия ингибитором miR-204-5p.

Аналогичная картина в отношении экспрессии микроРНК miR-204-5p и miR-211-5p наблюдалась в ткани печени во всех трех исследуемых группах – в контроле, негативном контроле и в группе животных, которым вводился ингибитор miR-204-5p: уровни микроРНК сохранялись без изменений (рисунок 5).

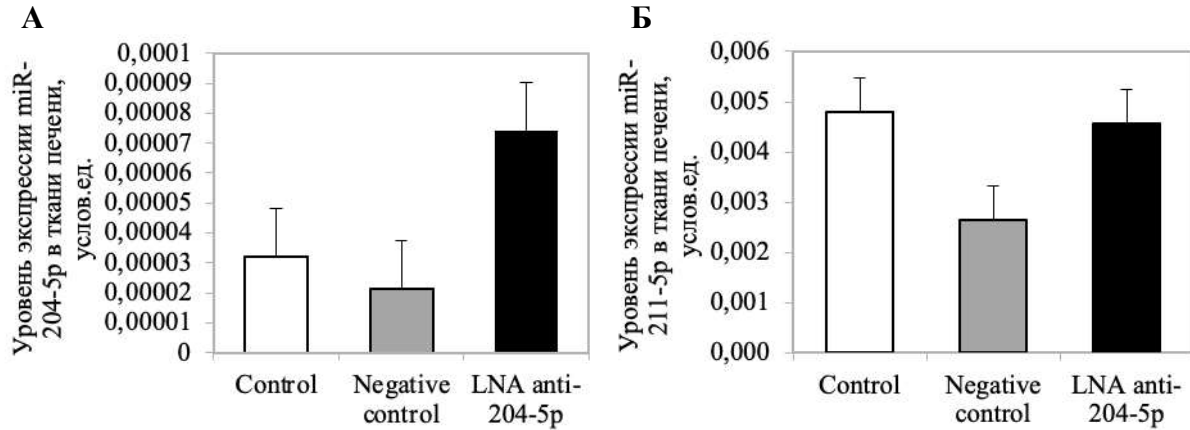


Рисунок 5 – Уровни экспрессии miR-204-5p (А) и miR-211-5p (Б) в ткани печени.

В ткани легких наблюдалось снижение уровня экспрессии уровня miR-204-5p по сравнению с экспрессией в легких в группах животных, которым вводился контроль, негативный контроль. Уровень miR-211-5p не изменялся (рисунок 6). Легкие являются типичной локализацией при метастазировании в мышинной модели меланомы B16 и одним из наиболее распространенных органов-мишеней для метастазирования меланомы у людей (Giavazzi R. et al. 2014).

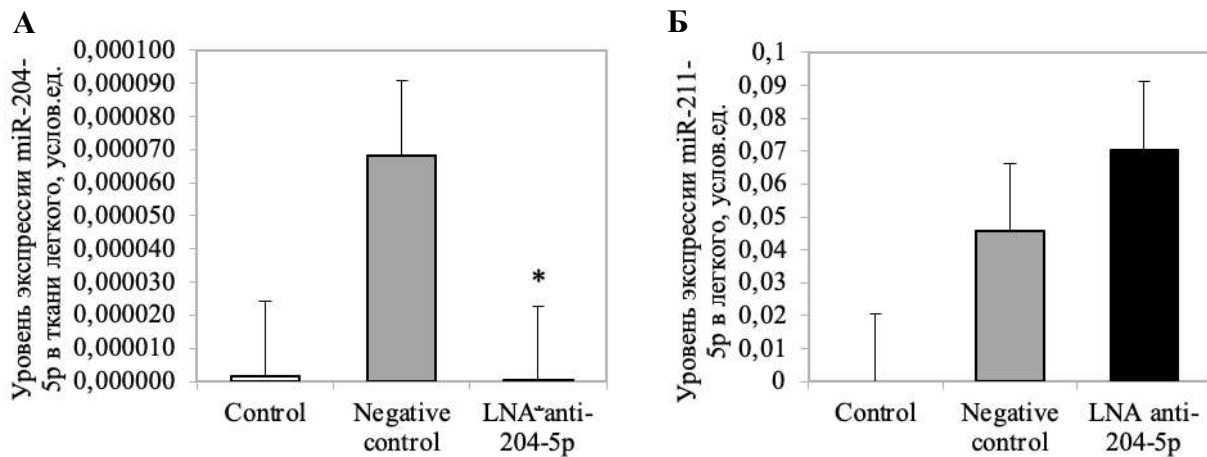


Рисунок 6 – Уровень экспрессии miR-204-5p и miR-211-5p в легких мышей C57Bl6/B16 после введения ингибитора miR-204-5p. **А** – Уровень экспрессии miR-204-5p в легких. * – достоверно по отношению к отрицательному контролю ($P < 0,05$). **Б** – Уровень экспрессии miR-211-5p в легких.

Оценка экспрессии генов-мишеней miR-204-5p *SIRT1* и *BCL2* в опухоли и дистантных органах – печени и легких

Согласно биоинформатическому анализу, *SIRT1* и *BCL2* являются генами-мишенями miR-204-5p. Вместе с тем, проведение экспрессионного анализа показало отсутствие изменений в экспрессии *BCL2* и *SIRT1* в ткани опухоли меланомы В16 (рисунок 7)

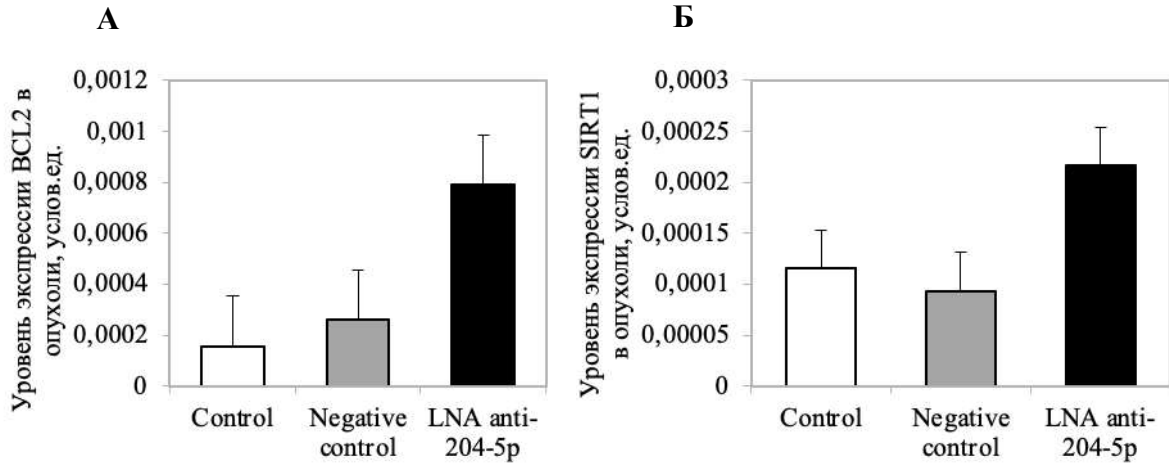


Рисунок 7 – Уровень экспрессии *BCL2* и *SIRT1* в клетках меланомы В16 in vivo после воздействия ингибитором miR-204-5p
А– Экспрессия *BCL2*, Б – Экспрессия *SIRT1*

В легких животных, которым вводился специфический ингибитор микроРНК miR-204-5p, отмечалось снижение уровней экспрессии *SIRT1* по сравнению с показателями их экспрессии у животных группы негативного контроля и контроля (рисунок 8).

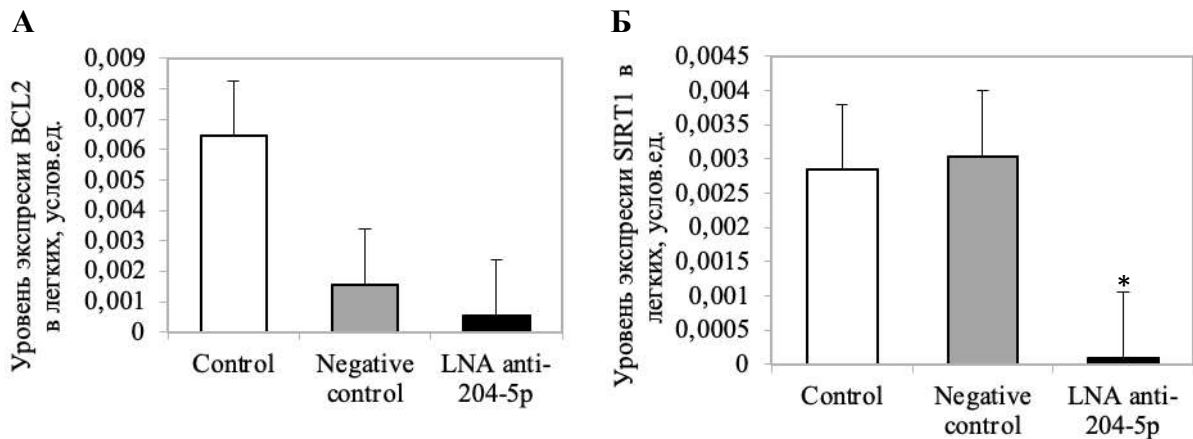


Рисунок 8: А –Уровень экспрессии *BCL2* в легких после воздействия ингибитором miR-204-5p, негативным контролем, контролем. Б – Уровень экспрессии *SIRT1* в легких животных после воздействия специфическим ингибитором miR-204-5p. * – достоверные различия по сравнению с контролем, негативным контролем ($P < 0,05$).

При определении уровней экспрессии *SIRT1* и *BCL2* в печени было выявлено снижение уровня *SIRT1*, *BCL2* у животных, которым осуществлялось введение ингибитора miR-204-5p по сравнению с показателями у животных группы, которым осуществлялось введение негативного контроля (рисунок 9).

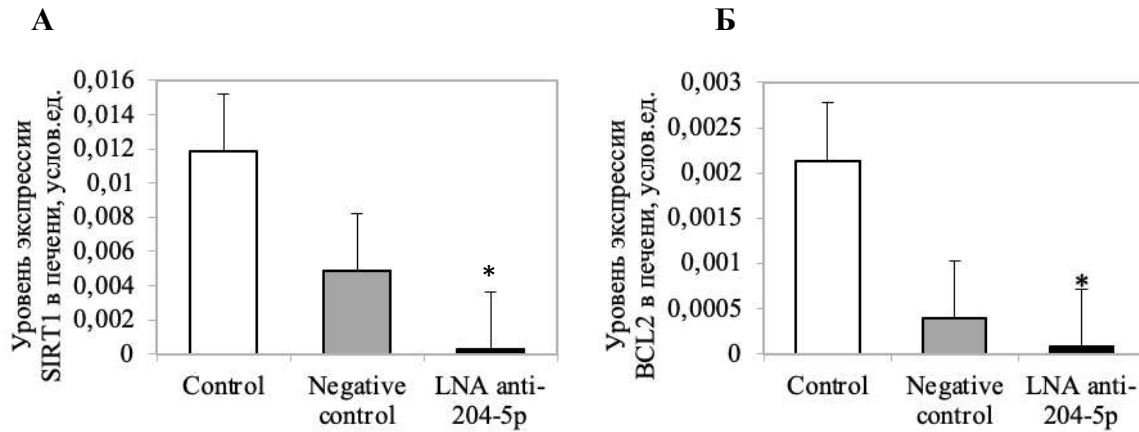


Рисунок 9 – Экспрессия генов мишеней miR-204-5p *SIRT1* и *BCL2* в ткани печени после воздействия ингибитором miR-204-5p. **А** – Уровень экспрессии *SIRT1*. * – достоверно по сравнению с отрицательным контролем ($P < 0,05$). **Б** – Уровень экспрессии *BCL2*. * – достоверно по сравнению с отрицательным контролем ($P < 0,05$).

Определение уровня CD3+ и CD8+ клеток в тканях органов-мишеней метастазирования меланомы

При определении доли CD3+ лимфоцитов на фоне применения ингибитора miR-204-5p, выявлено отсутствие изменений в уровне CD3+ лимфоцитов в тканях легких и печени (рисунок 10).

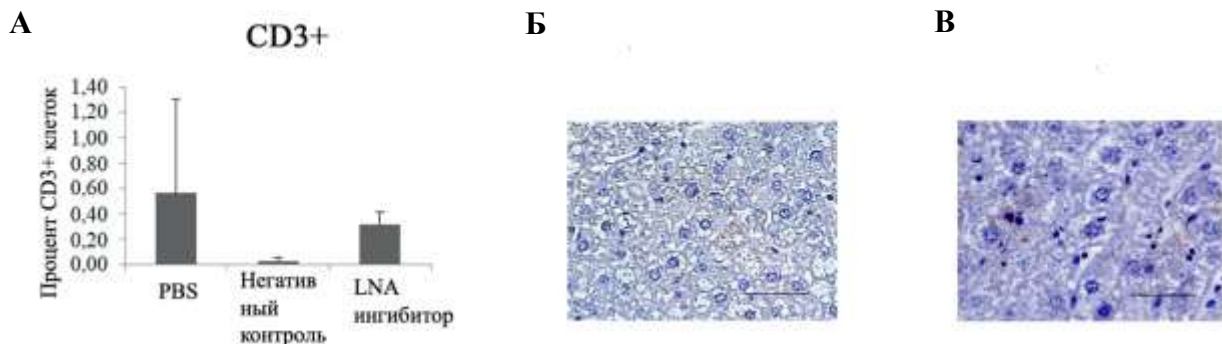


Рисунок 10 – Доля CD3+ клеток после воздействия специфическим ингибитором miR-204-5p. **А** – Процент CD3+ клеток в ткани печени. **Б** – CD3+ в ткани печени животных, подвергнутых воздействию отрицательным контролем, Ув 400. **В** – CD3+ клетки в печени животных, получавших экспериментальную терапию ингибитором микроРНК miR-204-5p. Увеличение $\times 100$.

При определении содержания CD8⁺ клеток в печени животных с трансплантированной меланомой B16 и получавших терапию специфическим ингибитором микроРНК miR-204-5p, получен схожий результат: выявлено отсутствие изменений в процентном содержании CD8⁺ клеток в ткани легкого по сравнению с группой животных, которым вводился отрицательный контроль (рисунок 11).

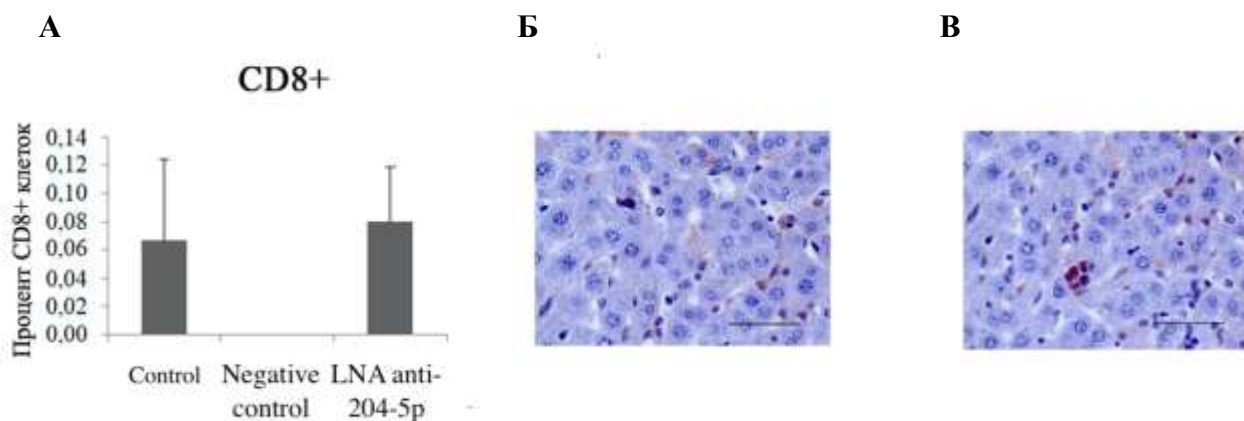


Рисунок 11 – Доля CD8⁺ клеток после воздействия специфическим ингибитором miR-204-5p. **А** – Доля CD8⁺ клеток в ткани печени. **Б** – CD8⁺ клетки в ткани печени животных, получавших отрицательный контроль, Ув. 400. **В** – CD8⁺ в печени животных, подвергнутых воздействию ингибитором микроРНК miR-204-5p. Увеличение $\times 100$.

Профилирование мРНК

После приведённого анализа профиля мРНК в легких получен следующий результат: после введения специфического ингибитора miR-204-5p, в сравнении с отрицательным контролем, в легких определялись измененные уровни 3262 мРНК. Повышение мРНК регистрировалось в отношении 1891 генов. В последующем были определены сигнальные пути, регулируемые генами с измененной экспрессией в легких после воздействия специфическим ингибитором miR-204-5p (таблица 2).

К наиболее низкоэкспрессируемым статистически значимым можно отнести следующие гены: *CDH1*, *TGFb1*, *ITGA*, *Scgb1a1*, *Sftpc*, *Sftpb*, *Cyp2f2*, *Chil3*, *Cbr2*, *Sftpa1*, *Slc34a2*, *Inmt*, *Cxcl15*.

Повышение экспрессии в ткани легких животных с меланомой B16 после введения им специфического ингибитора miR-204-5p было зарегистрировано в отношении мРНК 1371 гена.

Самыми высокоэкспрессируемыми статистически значимыми генами были: *FGFs* (*Fgf12*, *Fgf13*, *Fgf14*), *Snap25*, *Slc6a11*, *Cdr1*, *Nefl*, *Plp1*, *Gria2*, *Tmem130*, *AF357355*, *Sst*.

В целом, изменения механизмов передачи сигнала после ингибирования miR-204-5p связаны с дисрегуляцией процессов фокальной адгезии,

хемокиновой сети, функционирования В- и Т-клеточных рецепторов и фактора некроза опухоли α .

Таким образом, при введении ингибитора микроРНК miR-204-5p мышам линии C57Bl6 с трансплантированной меланомой B16 *in vivo* наблюдалось изменение экспрессии генов-мишеней данной микроРНК в дистантных органах – в печени и легких.

Таблица 2 – Сигнальные пути, насыщенные измененными транскриптами в клетках легочной ткани после воздействия ингибитором miR-204-5p

№	Наименования сигнальных путей (согласно биоинформатическому ресурсу KEGG pathway)	Число измененных генов	Уровень значимости, p
1	XPodNet - protein-protein interactions in the podocyte expanded by STRING	192	0
2	Focal Adhesion-PI3K-Akt-mTOR-signaling pathway	56	0,000013
3	PodNet: protein-protein interactions in the podocyte	54	0,008952
4	Focal Adhesion	51	0,000282
5	Non-odorant GPCRs	50	0,00016
6	Calcium Regulation in the Cardiac Cell	49	0,000021
7	Myometrial Relaxation and Contraction Pathways	45	0,001549
8	Chemokine signaling pathway	44	0,000065
9	B Cell Receptor Signaling Pathway	40	0,000065
10	T Cell Receptor Signaling Pathway	35	0,000034
11	Insulin Signaling	34	0,000002
12	Regulation of Actin Cytoskeleton	34	0
13	MAPK signaling pathway	34	0
14	MAPK signaling pathway	34	0
15	TNF-alpha NF-kB Signaling Pathway	22	0,000643

На основании полученных данных можно сделать вывод, что ингибиторы микроРНК на основе антисмысловых олигонуклеотидов с замкнутыми

нуклеиновыми кислотами в большей степени кумулируются в паренхиматозных органах, чем первичной опухоли, что может быть обусловлено наличием в опухоли более эффективных систем выведения химических веществ, инактивацией мишеней, развитием биологического феномена васкулогенной мимикрии. Вместе с тем, в дистантных органах, являющихся органами-мишенями метастазирования меланомы, определялось изменение экспрессии генов-мишеней miR-204-5p и в легких, и в печени.

В представленном исследовании определено, что изменение уровня miR-204-5p не влияет на выраженность метастазирования в органы-мишени. Вместе с тем, характер изменений в дистантных органах в зависимости от наличия/отсутствия в них метастазов включал изменение уровня экспрессии VEGFA, экспрессии CD31, являющегося маркером эндотелиоцитов. В дистантных органах, в которых определялись метастазы, наблюдалась активация фибробластов.

Профилирование ткани легких в зависимости от ингибирования miR-204-5p определило изменение экспрессии генов и сигнальных каскадов, связанных с реализацией воспаления, иммунного ответа.

ВЫВОДЫ

1. Ингибирование miR-204-5p на модели меланомы B16 *in vivo* вызывает изменение уровня ее генов-мишеней в органах-мишенях метастазирования меланомы – в легких, печени;
2. После введения специфического ингибитора микроРНК miR-204-5p в клетках меланомы B16 повышается процент Ki-67-положительных клеток, что свидетельствует о регуляции miR-204-5p пролиферации клеток меланомы;
3. В ткани печени и легких мышей с меланомой B16 определено снижение экспрессии генов-мишеней микроРНК miR-204-5p *SIRT1* и *BCL-2*, являющимися функциональными мишенями miR-204-5p в клетках меланомы;
4. Показано, что при введении специфического ингибитора miR-204-5p не происходит изменений уровня CD8⁺ и CD3⁺ клеток в дистантных органах – легких и печени мышей C57B16/B16;
5. Профилирование мРНК легочной ткани мышей линии C57B16/B16 показало, что после введения специфического ингибитора miR-204-5p происходит изменение экспрессии генов, связанных с регуляцией процессов воспаления и функционирования системы иммунобиологического надзора.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лаврентьев С.Н. Снижение жизнеспособности клеток меланомы и повышение уровня микроРНК miR-204-5p после воздействия дакарбазином / С.Н. Лаврентьев, Д.С. Земцов, А.С. Аверчук, Ю.А. Рыбников, Т.Г. Рукша // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т.9, №3s1. – С.45. (ВАК, K1).
2. Рукша Т.Г. Молекулярные механизмы развития резистентности при целевом воздействии на молекулярные мишени на примере меланомы кожи / Т.Г. Рукша, Д.С. Земцов, С.Н. Лаврентьев, Н.В. Палкина, А.Р. Есимбекова // Молекулярная медицина. – 2020. – Т.18, №6. – С.11-18. (ВАК, K2).

3. Земцов Д.С. Антисмысловые олигонуклеотиды в онкологии: перспективы и ограничения использования в клинической практике / Д.С. Земцов, А.Р. Есимбекова, И.С. Зинченко, Т.Г. Рукша // Онкология. Журнал им. П.А.Герцена. – 2021. – Т.10, №4. – С.59-65. (ВАК, К1).

4. Палкина Н.В. Ингибирование микроРНК miR-204-5p вызывает увеличение пролиферации клеток меланомы в модели меланомы B16 / Н.В. Палкина, Д.С. Земцов, И.С. Зинченко // Современные проблемы науки и образования = Modern problems of science and education. – 2021. – №6. – С.36. (ВАК, К2).

5. Палкина Н.В. Характер ремоделирования легких и печени зависит от метастазирования и уровня Ki-67-негативных клеток в меланома B16 / Н.В. Палкина, Д.С. Земцов, А.Н. Наркевич, Я.В. Бардецкая, А.К. Кириченко, Т.Г. Рукша Т.Г // Молекулярная медицина. – 2022. – Т.20, №1. – С.40-45. (ВАК, К2).

6. Palkina N.V. MiR-204-5p in vivo inhibition cause diminished CD45RO cells rate in lungs of melanoma B16-bearing mice / N.V. Palkina, M.B. Aksenenko, D.S. Zemtsov, S.N. Lavrentev, I.S. Zinchenko, V.D. Belenyuk, A.K. Kirichenko, A.A. Savchenko, T.G. Ruksha // Non-coding RNA Research. – 2022. – Vol.7, №3. – P.133-141. (SCOPUS, Q1).

7. Земцов Д.С. Оценка уровней экспрессии генов-мишеней *BCL2* и *SIRT1* на модели меланомы B16 in vivo на фоне воздействия ингибитором miR-240-5p / Д.С. Земцов // Современные проблемы науки и образования = Modern problems of science and education. – 2023. – №6. (ВАК, К2).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

BRAF –серин/треониновая протеинкиназа B-raf

CD3 (cluster of differentiation) - кластер дифференцировки 3

CD8 (cluster of differentiation) - кластер дифференцировки 8

CD31 (cluster of differentiation) - кластер дифференцировки 31

FGFs - факторы роста фибробластов

Ki-67 – маркер пролиферативной активности опухолевой клетки

miR – микроРНК

TGFβ – трансформирующий фактор роста бета

VEGF (vascular endothelial growth factor) – фактор роста сосудистого эндотелия

α -SMA (alpha-smooth muscle actin) – альфа-актин гладких мышц

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МК – меланома кожи

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Земцов Данил Сергеевич

**РОЛЬ микроРНК miR-204-5p В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ
ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ C57Bl6
С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ B16**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Омск – 2024

Подписано в печать 23.05.2024
Формат 60 × 84 ¹/16. Усл. печ. л. 1,0.
Способ печати оперативный
Тираж 100 экз.