

УДК 616

СОПРЯЖЕННОСТЬ ТКАНЕВОЙ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС WISTAR С ЦИРКУЛИРУЮЩИМИ УРОВНЯМИ МИКРОРНК В КРОВИ И ЛИМФЕ

¹Лыков А.П., ¹Кабаков А.В., ¹Райтер Т.В., ¹Бондаренко Н.А.,
¹Повещенко О.В., ¹Казаков О.В., ¹Повещенко А.Ф., ²Стрункин Д.Н.,
¹Колмыков С.К., ³Чанышев М.Д., ³Гуляева Л.Ф., ¹Коненков В.И.

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии»,
Новосибирск

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии», Новосибирск

³ФГБУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»,
Новосибирск, e-mail: aplykov2@mail.ru

Проведен анализ экспрессии микроРНК тканями молочных желез и их уровнями в крови и лимфе в норме и при раке молочной железы. Показано, что при РМЖ увеличивается экспрессия тканями молочных желез, в сыворотке крови и лимфе микроРНК. Выявлены взаимосвязи между уровнями экспрессии тканями молочных желез микроРНК с их содержанием в крови и лимфе, а также с учетом вида проведенного лечения.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроРНК, сыворотка крови, лимфа.

ASSOCIATION OF TISSUE EXPRESSION OF MICRORNAS IN EXPERIMENTAL BREAST CANCER IN WISTAR RATS WITH CIRCULATING LEVELS OF MICRORNAS IN THE BLOOD AND LYMPH

¹Likov A.P., ¹Kabakov A.V., ¹Raiter T.V., ¹Bondarenko N.A.,
¹Poveshchenko O.V., ¹Kazakov O.V., ¹Poveshchenko A.F., ²Strunkin D.N.,
¹Kolmykov S.C., ³Chanyshv M.D., ³Gulyaeva L.F., ¹Konenkov V.I.

¹FSBNI "Scientific institution of clinical and experimental lymphology";

²FSBNI "Scientific institution of clinical immunology";

³FSBI "Research institute for molecular biology and biophysics" SB RAMS, Novosibirsk,
e-mail: aplykov2@mail.ru

In work was done the analysis of microRNA expression breast tissue and their levels in the blood and lymph in normal and breast cancer. It is shown that expression of microRNA in tumor tissue and levels in blood and in lymph was elevated. The relationships between the expression levels of the breast tissue microRNAs with their content in the blood and lymph, as well as the type of the treatment was established.

Keywords: breast cancer, microRNA, serum, lymph.

Известно, что микроРНК вовлечены в патогенез злокачественных заболеваний, в том числе и при раке молочной железы (РМЖ), а также при развитии стресс индуцированного ответа организма на внеклеточные сигналы, например на N-этил-N-нитрозомочевину [2-8]. Более того, уровни экспрессии микроРНК клетками солидных опухолей различаются в одной и той же опухоли [5]. Имеются сведения о взаимосвязи уровней экспрессии тканью опухоли микроРНК с уровнями микроРНК в крови [7]. Однако нет исследований сопряженности уровней микроРНК тканями опухоли молочных желез при РМЖ с уровнями микроРНК в лимфе грудного протока. Поэтому целью исследования стало изучение уровней экспрессии микроРНК в тканях опухоли при РМЖ, индуцированным N-метил-N-нитрозомочевинной, а также их

взаимосвязи с уровнями микроРНК в крови и лимфе с учетом способа лечения у крыс Wistar.

Материал и методы исследования

Эксперименты на лабораторных животных проведены в соответствии с соблюдением принципов Хельсинской декларации ВМА (2000). Эксперименты выполнены на 25 неполовозрелых крысах-самках линии Wistar. Животные содержались на стандартной лабораторной диете и имели свободный доступ к воде. У 21 крысы РМЖ индуцировали N-метил-N-нитрозомочевинной (30 мг/кг, Sigma-Aldrich, США), а 4 особи составили группу контроля. Через 6 месяцев у 17 крыс оперативно удалили опухоль молочной железы, а 4 особям не проводилось хирургическое вмешательство до завершения курса неoadъювантной полихимиотерапии (ПХТ) и только после этого была проведена резекция опухоли молочной железы. После оперативного вмешательства часть животных получила курс ПХТ (n=5), а также у части животных к

стандартной ПХТ была добавлена терапия фрагментированной экзогенной ДНК ($n=5$). Курс ПХТ включал 5-фторурацил (Ebewe, Австрия в дозе 15 мг/кг внутривенно на 1 и 8 день курса терапии), метотрексат (Ebewe, Австрия в дозе 2,5 мг/кг внутривенно на 1 и 8 день курса терапии) и циклофосфан (ОАО «Биохимия», Саранск в дозе 3 мг/кг внутривенно ежедневно однократно 14 дней). Курс терапии фрагментированной ДНК (5мг/кг) проводили внутривенным введением однократно в течение 14 дней через 3 часа после введения циклофосфана. В экспериментах использовали субстанцию препарата Панаген с содержанием фрагментированной ДНК 1,7 мг/мл. Для устранения негативного эффекта цитостатических препаратов, используемых для ПХТ, назначают курс терапии экзогенной ДНК. Кроме этого, показано противоопухолевое действие экзогенной ДНК [1]. Животных из эксперимента выводили через 6,5 месяцев под наркозом (40 мг/кг нембутана внутривенно; Sigma-Aldrich, США), что обуславливалось необходимостью прижизненного сбора лимфы из грудного лимфатического протока. Тотальную РНК выделяли из тканей молочной железы, сыворотки крови и лимфы грудного протока с использованием набора реагентов (ЗАО Вектор-БЕСТ) согласно инструкции. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию по матрице микроРНК с использованием набора реагентов (ЗАО Вектор-БЕСТ) согласно инструкции. Для определения количества микроРНК-21, -221, -222 и 429 в тканях молочной железы, сыворотке крови и лимфе грудного протока

проводили ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием набора реагентов (ЗАО Вектор-БЕСТ) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories). В качестве гена сравнения использовали малую РНК U6. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Lq) и верхним (Hq) квартилями; достоверность различия рассчитывалась по U-критерию Манна-Уитни, и принималась при значениях $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе анализа данных уровней экспрессии тканями опухоли молочных желез микроРНК выявлены статистически значимые различия по некоторым из них в сравнении с уровнями экспрессии микроРНК в тканях молочных желез интактных животных (табл. 1). В силу колебаний значений экспрессии микроРНК-21 тканями молочных желез в различных экспериментальных группах не выявлено статистически значимых различий, хотя имеется тенденция их роста при РМЖ. По уровням экспрессии тканями молочных желез микроРНК-221 в группе особей с РМЖ установлено статистически значимое возрастание по сравнению с другими группами животных ($p < 0,01$).

Таблица 1

Уровни экспрессии микроРНК в тканях молочных желез (Me, Lq-Hq)

Параметры	Интактные	РМЖ	ПХТ
микроРНК-21	0,96 0,73 – 1,31	1,08 0,73 – 2,02	0,82 0,78 – 2,50
микроРНК-221	0,67 0,33 – 0,84	0,72*# 0,60 – 2,89	0,13 0,11 – 0,15
микроРНК-222	0,35 0,13 – 0,69	1,10*# 0,73 – 1,54	0,03* 0,02 – 0,04
микроРНК-429	4,59 2,33 – 5,07	1,40* 0,64 – 2,06	6,96* 2,30 – 11,65

Примечание: * – достоверность различия с интактными животными $p < 0,05$; # – достоверность различия с ПХТ $p < 0,05$; РМЖ – рак молочной железы; ПХТ – неoadьювантная полихимиотерапия.

Уровни экспрессии тканями молочных желез микроРНК-222 были статистически значимо выше в группе особей, получивших хирургическое вмешательство по сравнению с уровнями экспрессии данной микроРНК в группе интактных животных и в группе, особей получивших курс ПХТ ($p < 0,01$). В отношении уровней экспрессии микроРНК-429 выявлено статистически значимое снижение уровней экспрессии тканями молочных желез микроРНК-429 в группе особей, получивших хирургическое вмешательство по сравнению с уровнями экспрессии данного показателя в группе

интактных животных ($p < 0,01$). В тоже время, в группе особей, получившей курс ПХТ, отмечено статистически значимое возрастание уровней экспрессии микроРНК-429 тканями молочных желез в равнении с интактными животными ($p < 0,01$). Между уровнями экспрессии микроРНК тканями молочных желез в экспериментальных группах показана сопряженность уровней экспрессии микроРНК-21 с микроРНК-221 в группе интактных животных ($r=-0,90$; $p<0,05$). В группе особей, получивших курс ПХТ, выявлена прямая и сильная взаимосвязь уровней экспрессии тканями молочных же-

лез микроРНК-221 с уровнями экспрессии микроРНК-222 ($r=0,86$; $p < 0,01$).

Известно, что между уровнями экспрессии микроРНК тканями опухолей и уровнями циркулирующей микроРНК имеется взаимосвязь, поэтому следующим этапом нашей работы стало изучение уровней циркулирующей микроРНК в крови и лимфе грудного протока [7].

Результаты исследований уровней микроРНК в крови представлены в таблице 2. В контрольной группе животных по РМЖ нами отмечено статистически значимое снижение уровней микроРНК-21 в сравнении с контрольной группой животных ($p < 0,05$). Более того, на фоне ПХТ и сочетания оперативного вмешательства с последующим курсом ПХТ также выявлено статистически значимое снижение уровней микроРНК-21 ($p < 0,05$). В тоже время, на фоне только оперативного лечения или сочетания опера-

тивного удаления опухоли с последующим курсом ПХТ дополненным терапией экзогенной ДНК, отмечено статистически значимое увеличение уровней микроРНК-21 ($p < 0,05$). В отношении сывороточных уровней микроРНК-221 отмечено статистически значимое увеличение уровней в группах животных, получивших только оперативное вмешательство, так и в сочетании с ПХТ дополненной экзогенной ДНК по сравнению с интактными животными и группой сравнения по РМЖ ($p < 0,05$). Что же касается уровней в сыворотке крови микроРНК-222, то установлено статистически значимое увеличение их в группе животных подвергшихся оперативному вмешательству по поводу РМЖ ($p < 0,05$). Также, выявлено статистически значимое снижение в сыворотке крови уровней микроРНК-429 в группе животных с РМЖ по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$).

Таблица 2

Уровни микроРНК в сыворотке крови крыс линии Wistar при РМЖ (Me, Lq-Hq)

Параметры	микроРНК-21	микроРНК-221	микроРНК-222	микроРНК-429
1. Интактные	1,09 0,68 – 1,46	1,06 0,51 – 1,30	0,71 0,26 – 0,92	0,70 0,50 – 2,23
2. РМЖ	0,52* 0,09 – 1,30	2,45 0,90 – 6,03	0,80 0,56 – 2,98	0,07* 0,06 – 0,16
3. РМЖ-операция	1,37*#.^ 0,63 – 2,26	3,59*#.^ 1,90 – 6,45	2,65*#.^ 0,48 – 5,12	0,20 0,01 – 13,02
4. РМЖ-операция+ПХТ	0,46*.\$ 0,21-0,91	2,029*#.^ 1,40 – 3,02	0,59\$ 0,29 – 1,60	0,27 0,08 – 2,70
5. РМЖ+ПХТ	0,22* 0,00 – 0,82	0,64 0,29 – 1,70	0,35 0,03 – 0,70	0,11* 0,04 – 0,42
6. РМЖ-операция+ПХТ+фрДНК	1,22*#.^ 0,31 – 1,98	5,999*#.^ 1,85 – 13,91	1,14*#.^ 0,56 – 1,23	0,19* 0,01 – 0,61

Примечание: РМЖ – рак молочной железы, индуцированный нитрозомочевинной; ПХТ – полихимиотерапия; операция – проведено оперативное удаление опухоли молочной железы; фрДНК – терапия фрагментированной ДНК из плаценты человека; * – достоверность различия с интактными животными; # – достоверность различия с РМЖ; \$ – достоверность различия с группой, получавшей только оперативное лечение; ^ – достоверность различия с группой, получавшей только ПХТ; $p < 0,05$.

Что касается уровней микроРНК в лимфе грудного протока при РМЖ у крыс Wistar, то они представлены в таблице 3. Так, отмечено статистически значимое увеличение уровней микроРНК-21 в лимфе грудного протока при РМЖ в сравнение с интактными особями ($p < 0,05$). Кроме этого, выявлено статистически значимое снижение уровней микроРНК-21 в лимфе грудного протока крыс линии Wistar, получавших ПХТ без оперативного вмешательства и в группе крыс, получавших сочетание ПХТ с дополнительным лечением фрагментированной ДНК после хирургического удале-

ния опухоли молочной железы по сравнению с контрольной группой крыс с раком молочной железы ($p < 0,05$). Установлено статистически значимое снижение уровней микроРНК-222 в лимфе грудного протока у особой подвергшимся ПХТ в любых вариациях в сравнении с интактными животными ($p < 0,05$). Также, отмечено статистически значимое снижение уровней микроРНК-222 в лимфе грудного протока особей, получавших ПХТ в любых вариациях и в группе, получившей хирургическое лечение по сравнению с контрольной группой по РМЖ ($p < 0,05$). В лимфе грудного протока крыс,

получавших ПХТ после удаления опухоли молочной железы, выявлено статистически значимое снижение уровней микроРНК-222 в сравнении с крысами, получавшими хирургическое лечение ($p < 0,05$). Что же касается уровней микроРНК-429 в лимфе грудного протока, то было установлено статистически значимое увеличение уровней в группе крыс, получивших сочетание хирургического и терапевтического вида лечения дополненного введением экзогенной ДНК в

сравнении с интактными особями ($p < 0,05$). Кроме этого, данная группа крыс имела статистически значимо большие уровни микроРНК-429 в лимфе грудного протока по сравнению с контрольной группой по РМЖ и группой крыс, получивших только ПХТ ($p < 0,05$). Также в группе крыс, получивших только ПХТ уровни микроРНК-429 в лимфе грудного протока, были статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой крыс по РМЖ ($p < 0,05$).

Таблица 3

Уровни микроРНК в лимфе крыс линии Wistar при раке молочной железы (Me, Lq-Hq)

Параметры	микроРНК-21	микроРНК-221	микроРНК-222	микроРНК-429
1. Интактные	3,10 0,02-5,25	0,55 0,45-3,16	0,78 0,53-1,87	1,71 0,06-36,27
2. РМЖ	39,38* 24,25-15,40	0,47 0,06-1,96	1,43 1,29-2,08	1,02 0,29-10,81
3. РМЖ-операция	18,38* 0,20-34,41	1,50 0,06-6,84	0,42# 0,05-1,00	11,08 2,98-78,04
4. РМЖ-операция+ПХТ	35,00* 1,27-182,42	0,41 0,25-0,59	0,06*#,\$ 0,01-0,21	1,00 0,04-52,95
5. РМЖ+ПХТ	16,12*# 9,89-21,90	0,24 0,17-0,64	0,21*# 0,10-0,29	32,02# 20,16-46,31
6. РМЖ-операция+ПХТ+фрДНК	19,55*# 11,18-30,26	0,41 0,32-0,77	0,39*# 0,12-0,46	49,29*#,#^ 42,60-60,34

Примечание: * – достоверность различия с интактными животными $p < 0,05$; # – достоверность различия с РМЖ $p < 0,05$; \$ – достоверность различия с группой, получавшей только оперативное лечение $p < 0,05$; ^ – достоверность различия с группой, получавшей только ПХТ $p < 0,05$; РМЖ – рак молочной железы, индуцированный нитрозомочевинной; ПХТ – полихимиотерапия; операция – проведено оперативное удаление опухоли молочной железы; фрДНК – лечение фрагментированной ДНК из плаценты человека.

Корреляционный анализ уровней экспрессии микроРНК тканями молочных желез и уровней, циркулирующих микроРНК в крови и лимфе, выявил наличие сопряженности между ними той или иной направленности и силы. Так, в группе интактных особей показана обратная и сильная зависимость уровней микроРНК-222 в крови с аналогичным параметром в тканях молочных желез ($r = -0,90$; $p = 0,04$). Больше всего взаимосвязей между тканевыми и циркулирующими уровнями микроРНК имеются в группе животных, получивших хирургическое лечение по поводу РМЖ. В частности, тканевые уровни микроРНК-222 имели прямую и сильную сопряженность с аналогичным показателем в лимфе грудного протока ($r = 0,89$; $p = 0,02$), а с уровнями в крови они носили обратную и высокую зависимость ($r = -0,90$; $p = 0,04$). В отношении микроРНК-429 показано наличие прямой и сильной взаимосвязи тканевых уровней с уровнем их в сыворотке крови ($r = 0,54$;

$p = 0,04$). Более того, уровень тканевой экспрессии микроРНК оказывал существенный эффект на проводимую медикаментозную терапию у животных после резекции опухоли молочных желез. Между тканевой экспрессией микроРНК-221 тканями молочных желез при РМЖ и уровнем в крови микроРНК-221 показана обратная и сильная зависимость ($r = -0,52$; $p = 0,05$), что, скорее всего, свидетельствует о низкой эффективности ПХТ. Необходимо отметить тот факт, что уровни в тканях молочных желез микроРНК-429 находились в обратной и сильной сопряженности с уровнями микроРНК-429 в лимфе грудного протока особей, получивших сочетание курса ПХТ с фрагментированной ДНК ($r = -0,72$; $p = 0,01$). Это может быть результатом защитного действия экзогенной ДНК в случаях наличия метастазов в регионарных лимфатических узлах. Об эффективности проводимой ПХТ можно также судить и на основании выявленных взаимосвязей в группе особей,

которые получали ее до проведения хирургического лечения. Так, в частности на основании тканевой экспрессии микроРНК-222 и ее уровнем в крови, которая носила обратную и сильную сопряженность можно судить о резистентности клеток опухоли молочной железы к данному курсу ПХТ ($r = -0,82$; $p = 0,01$). Более того, наличие обратной и сильной взаимосвязи тканевой экспрессии микроРНК-429 и ее концентрации в лимфе грудного протока в данной группе животных, также свидетельствует о низкой терапевтической эффективности ПХТ ($r = -0,83$; $p = 0,04$). В тоже время, уровни тканевой экспрессии микроРНК-429 в группе особей, получившей ПХТ до резекции опухолевой ткани, была в прямой и сильной связи с уровнями микроРНК-429 в крови ($r = 0,89$; $p = 0,02$), что, скорее всего, отражает различия в скорости накопления микроРНК в грудном протоке.

Полученные нами результаты исследования уровней микроРНК в тканях опухоли молочных желез, крови и лимфе, не противоречат литературным данным. Показано, что между уровнями микроРНК в тканях опухолей и в крови имеется связь, а также о падение уровней микроРНК на фоне нескольких курсов ПХТ при РМЖ у женщин [2-3, 7-8].

Заключение

Таким образом, при РМЖ у крыс Wistar установлена связь тканевых уровней микроРНК с их количеством в крови и лимфе, а также с клинической эффективностью ПХТ.

Список литературы

1. Беседнова Н.Н., Федянина Л.Н. Противоопухолевое действие экзогенной дезоксирибонуклеиновой кислоты // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2009. – № 3. – С. 12-18.
2. Gezer U., Keskin S., Igcı A. Abundant circulating microRNAs in breast cancer patients fluctuate considerably during neoadjuvant chemotherapy // Oncology letters. – 2014. – Vol. 8. – P. 845-848.
3. Hui C., Yujie F., Lijia Y. et al. MicroRNA-34a and microRNA-21 play roles in the chemopreventive effects of 3,6-dihydroxyflavone on 1-methyl-1-nitrosourea-induced breast carcinogenesis // Breast Cancer Research. – 2012. – Vol. 14. – P. 80-91.
4. Krichevsky A.M., Gabriele G. MiR-21: a small multifaceted RNA // J. Cell Mol. Med. – 2009. – Vol. 13. – P. 39-53.
5. Raychaudhuri M., Schuster T., Buchner T. et al. Intratumoral heterogeneity of microRNA expression in breast cancer // J. Mol. Diagn. – 2012. – Vol. 4. – P. 376-384.
6. Shah M.Y., Calin G.A. MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer // Genome Medicine. – 2011. – Vol. 3. – P. 56-59.
7. Waters P.S., McDermott A.M., Wall D. et al. Relationship between circulating and tissue microRNAs in a murine model of breast cancer // PLoS ONE. – 2012. doi:10.1371/journal.pone.0050459.
8. Yao Y., Chen S., Zhou X. et al. 5-FU and ixabepilone modify the microRNA expression profiles in MDA/MB-453 triple-negative breast cancer cells // Oncology letters. – 2014. – Vol. 7. – P. 541-547.