

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МИКРОРНК MIR-22-3P, MIR-107 И MIR-330-3P В ОЦЕНКЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ГЛИОМАМИ ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

Аллилуев И.А.^{1,2}, Пушкин А.А.¹, Росторгуев Э.Е.¹, Кузнецова Н.С.¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: alliluev@sfnu.ru;

²ФГАОУ ВО Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

Нейроонкогенез может быть вызван рядом генетических и эпигенетических нарушений. Существенная роль в инициации и прогрессии злокачественных процессов отводится микроРНК. МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие РНК, которые могут действовать как опухолевые супрессоры или онкогены. Целью работы стало исследование дифференциальной экспрессии микроРНК и возможности их применения в качестве предикторов выживания пациентов с глиомами высокой степени злокачественности. Методом RT-qPCR была произведена оценка уровня относительной экспрессии микроРНК miR-215-5p, miR-22-3p, miR-122-5p, miR-107, miR-324-5p, miR-34a-5p, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-497-5p, miR-330-3p, miR-146a-5p, miR-92a-1-5p, miR-326 в 30 парных образцах тканей глиом высокой степени злокачественности и условно нормальных тканей мозга по данным МРТ. В опухолевой ткани были идентифицированы микроРНК с достоверно возросшим (miR-155-5p) и, напротив, снизившимся уровнем экспрессии (miR-215-5p, miR-22-3p, miR-107, miR-324-5p, miR-330-3p, miR-326, miR-122-5p). Обнаружено изменение общей выживаемости пациентов в зависимости от уровня экспрессии микроРНК miR-22-3p, miR-107 и miR-330-3p. Уровень экспрессии микроРНК miR-22-3p, miR-107 и miR-330-3p может быть использован как предиктор в оценке выживания пациентов с глиомами высокой степени злокачественности.

Ключевые слова: микроРНК, выживаемость, глиома, нейроонкогенез, miR-22-3p, miR-107, miR-330-3p.

PREDICTIVE SIGNIFICANCE OF MICRORNA MIR-22-3P, MIR-107 AND MIR-330-3P IN THE ESTIMATION OF THE SURVIVAL OF PATIENTS WITH HIGH-GRADE GLIOMAS

Alliluyev I.A.^{1,2}, Pushkin A.A.¹, Rostorguev E.E.¹, Kuznetsova N.S.¹

¹National Medical Research Oncology Center, Rostov-on-Don, e-mail: alliluev@sfnu.ru;

²Southern Federal University, Rostov-on-Don

Neurooncogenesis can be caused by several genetic and epigenetic disorders. MicroRNAs plays an essential role in the initiation and progression of malignant processes. MicroRNAs are small non-coding RNA, which acts as tumor suppressors or oncogenes. The aim of this research was to study the differential expression of microRNAs and the possibility of their use as predictors of survival patients with high-grade gliomas. The relative expression level of miR-215-5p, miR-22-3p, miR-122-5p, miR-107, miR-324-5p, miR-34a-5p, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-497-5p, miR-330-3p, miR-146a-5p, miR-92a-1-5p, miR-326 in 30 paired high grade-glioma and unchanged brain tissue samples according to MRI data was estimated with the RT-qPCR method. MicroRNAs with significantly increased (miR-155-5p) and, on the contrary, decreased expression levels (miR-215-5p, miR-22-3p, miR-107, miR-324-5p, miR-330-3p, miR-326, miR-122-5p) were identified in tumor tissue. A change in the overall survival of patients depending on the expression level of miR-22-3p, miR-107, and miR-330-3p miRNAs was found. The expression level of miR-22-3p, miR-107, and miR-330-3p miRNAs can be used as a predictor in the estimation of the survival of patients with high-grade gliomas.

Keywords: microRNA, survival, glioma, neurooncogenesis, miR-22-3p, miR-107, miR-330-3p.

Глиальные опухоли представляют собой первичные новообразования центральной нервной системы, составляющие 81% злокачественных опухолей головного мозга [1]. Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения глиальные опухоли подразделяют на подтипы на основании морфологических, иммуногистохимических и

генетических маркеров, а именно на высокодифференцированные глиомы – диффузные астроцитомы (IDHmut, IDHwt и NOS) и олигодендроглиомы (IDHmut, 1p/19q коделеция) и низкодифференцированные глиомы – анапластические астроцитомы (IDHmut, IDHwt, NOS), анапластические олигодендроглиомы (IDHmut, 1p/19q коделеция) и глиобластомы (IDHmut, IDHwt, NOS) [2]. Особенностью глиальных опухолей является инвазивный рост с отсутствием четкой границы между опухолью и неизменной тканью мозга, что ограничивает возможность хирургического лечения. Глиобластомы составляют подавляющее большинство глиом, являются интенсивно пролиферирующими опухолями, характеризуются высокой цитологической гетерогенностью и слабым ответом на существующее лечение, заключающееся в циторедуктивной резекции с последующей комбинированной радио- и химиотерапией [3]. Медиана общей выживаемости пациентов с глиомами высокой степени злокачественности составляет 14,6 месяца, а 5-летняя выживаемость равна 9,8% [4].

У 10–15% пациентов со злокачественными глиомами наблюдается феноменальная послеоперационная продолжительность жизни более 3 лет. Высокий уровень 3-летней выживаемости больных с первичной глиобластомой в первую очередь объясняется индивидуальным подходом к лечению. Такая группа пациентов характеризуется молодым возрастом и низким уровнем экспрессии гена *MGMT*, что позволяет им перенести интенсивную многокурсовую химиотерапию [5]. Мутации в гене *IDH1* (особенно R132H) также ассоциированы с лучшей выживаемостью пациентов со злокачественными глиомами [3]. Однако различия между отдельными пациентами диктуют необходимость поиска новых прогностических биомаркеров.

Нейроонкогенез может быть вызван целым рядом генетических и эпигенетических изменений, к основным из которых можно отнести нарушения, связанные с p53, HIF-1 α , EGFR, PI3K, PTEN, mTOR, RAS, RAF, MEK [3, 6]. Однако эти изменения отражают, какие сигнальные пути нарушены в глиомах, но не дают понимания реальных молекулярных механизмов, которые контролируют клеточные процессы, приводящие к образованию и прогрессии опухоли. Идентификация молекулярных механизмов, лежащих в основе развития заболевания, может значительно расширить арсенал терапевтических подходов. На данный момент ведется множество клинических исследований, но их результаты в большинстве случаев не соответствуют научным ожиданиям [7].

Ряд исследований демонстрируют, что профиль экспрессии микроРНК в глиальных опухолях значительно изменяется по сравнению с гистологически не измененной нервной тканью, определяет возможность дальнейшего прогрессирования опухоли и итоговый успех терапии [8, 9]. МикроРНК представляют собой тип коротких некодирующих РНК, которые

играют важную роль в регуляции экспрессии генов. Идентификация aberrантно экспрессируемых микроРНК имеет большое значение для прогноза течения заболевания пациентов с глиомами. Как участники посттранскрипционной и транскрипционной регуляции экспрессии генов микроРНК оцениваются в качестве потенциальных терапевтических агентов при лечении глиальных опухолей головного мозга [9].

В связи с этим целью настоящей работы стало исследование дифференциальной экспрессии микроРНК и возможности их применения в качестве предикторов выживания пациентов с глиомами высокой степени злокачественности.

Материалы и методы исследования

Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России. В выборку вошли 30 пациентов (14 мужчин и 16 женщин) с первично диагностированной глиальной опухолью головного мозга (26 случаев GIV и 4 случая GIII). Средний возраст составил $59,2 \pm 9,1$ года. В каждом случае было получено добровольное информированное согласие пациента на включение в исследование. Диагноз был подтвержден гистологически в соответствии с классификацией ВОЗ опухолей ЦНС (2016). Точки забора биологического материала определяли с применением Medtronic S7 (Medtronic, Ирландия). Образцы глиом были отобраны интраоперационно. Контрольная точка располагалась на расстоянии 15 мм от границы опухоли по траектории доступа к новообразованию, не затрагивая функционально значимые зоны головного мозга (по данным МРТ). За 2 часа до проведения операционного вмешательства пациенты принимали 5-аминолевулиновую кислоту. Для визуализации границы опухолевой ткани производили оценку флуоресценции модулем Blue 400 микроскопа CarlZeiss OPMI PENTERO (Zeiss AG, Германия). Контрольный биоптат флуоресценции не имел. Фрагменты тканей замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Выделение РНК. Фрагменты ткани помещали в TRIzol (Thermo Fisher, США) и гомогенизировали с помощью MagNALyser (Roshe, Швейцария). Нуклеиновые кислоты выделяли согласно рекомендациям производителя TRIzol (ThermoFisher, США). Очистку РНК проводили с использованием набора miRNA miniKit (Qiagen, Германия). Для удаления геномной ДНК полученные образцы РНК обрабатывали препаратами ДНК-азы 1 (ThermoFisher, США). Концентрацию нуклеиновых кислот оценивали на флуориметре Qubit (Thermo Fisher, США) согласно инструкции производителя. Синтез кДНК осуществляли с использованием MMLV Reverta («Синтол», Россия).

Исследование экспрессии 13 микроРНК (miR-215-5p, miR-22-3p, miR-122-5p, miR-107, miR-324-5p, miR-34a-5p, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-497-5p, miR-330-3p, miR-146a-5p, miR-

92a-1-5p, miR-326) проводили методом RT-qPCR. В качестве референсных использовали последовательности микроРНК miR-191-5p, miR-103a-1-5p и малой ядерной РНК RNU49. Дизайн праймеров для исследуемых микроРНК осуществляли с применением miRBase v.22. ПЦР в реальном времени проводили на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США). Анализ данных количественной ПЦР осуществляли методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Анализ данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ STATISTICA 10 (Statsoft inc., США). Различия экспрессии между опухолевой тканью и условно нормальной тканью рассчитывали с помощью W-критерия Вилкоксона. Анализ влияния экспрессии микроРНК на выживаемость пациентов проводили в программной среде вычислений R 3.6.2. (пакеты «survival» и «survminer»). Для экспрессии микроРНК рассчитывали точку отсечения с использованием стандартизированного лог-рангового критерия. Для визуализации данных выживаемости пациентов применяли метод Каплана–Майера. Значение $p < 0,05$ указывает на статистическую значимость.

Результаты исследования и их обсуждение

МикроРНК играют критически важную роль в регуляции онкогенов и генов супрессоров опухолей. Таким образом, транскрипционный профиль микроРНК может быть использован как высокоточный диагностический и прогностический параметр. Методом RT-qPCR нами была произведена оценка уровня относительной экспрессии микроРНК miR-215-5p, miR-22-3p, miR-122-5p, miR-107, miR-324-5p, miR-34a-5p, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-497-5p, miR-330-3p, miR-146a-5p, miR-92a-1-5p, miR-326 в 30 парных образцах тканей глиом высокой степени злокачественности и условно нормальных тканей мозга. В результате было выявлено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение относительной экспрессии в 2,9 раза для miR-155-5p (73% пациентов). Как тенденция отмечено увеличение экспрессии в 3,8 раза ($p = 0,0581$) для miR-21-5p (67% пациентов). Снижение экспрессии ($p < 0,05$) в 1,9, 1,6, 1,8, 2,2, 11,7, 1,4 и 1,1 раза соответственно было показано для miR-215-5p (73% пациентов), miR-22-3p (63% пациентов), miR-107 (80% пациентов), miR-324-5p (100% пациентов), miR-330-3p (100% пациентов), miR-326 (70% пациентов) и miR-122-5p (83% пациентов) (рис. 1).

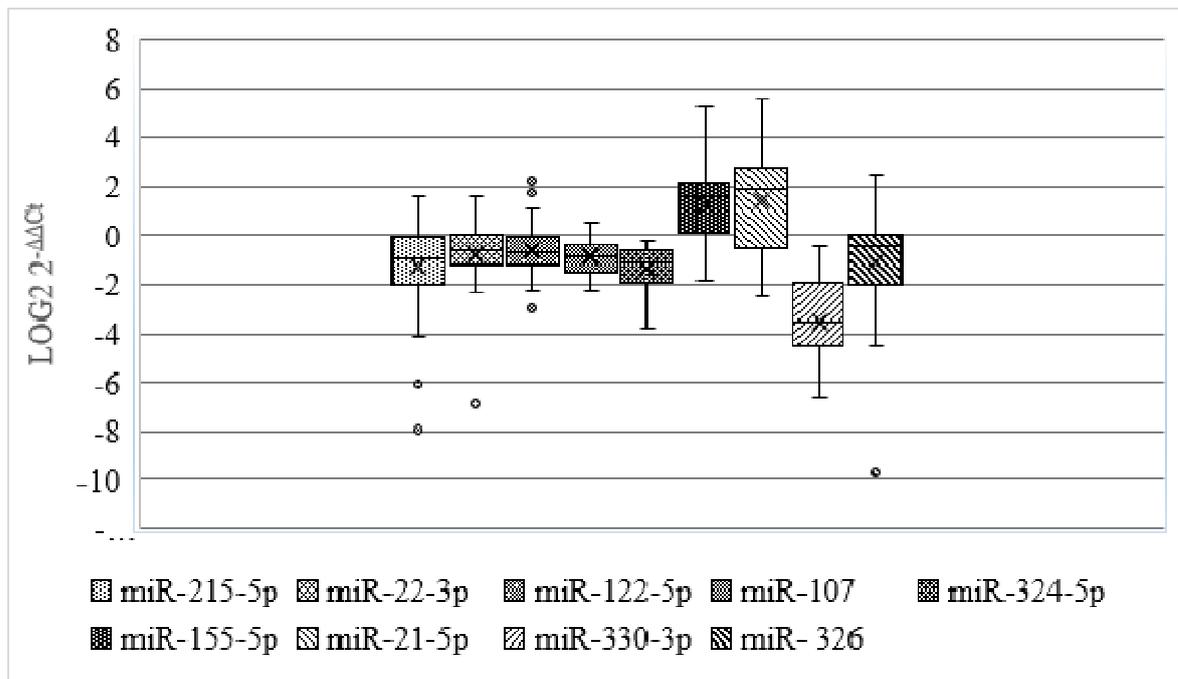


Рис. 1. Изменение относительной экспрессии исследуемых микроРНК в образцах злокачественных глиом по отношению к неизменной ткани мозга

В результате в глиомах высокой степени злокачественности было идентифицировано две группы микроРНК с возросшим (miR-155-5p, miR-21-5p) и, наоборот, снизившимся уровнем экспрессии (miR-215-5p, miR-22-3p, miR-107, miR-324-5p, miR-122-5p, miR-330-3p, miR-326) по сравнению с неизменной тканью мозга.

В представленной работе мы предприняли попытку определить прогностическую значимость микроРНК в качестве возможных предикторов выживания пациентов с глиомами высокой степени злокачественности на основании клинических данных и паттерна экспрессии 13 микроРНК. Анализ транскрипционной активности микроРНК выявил, что изменение экспрессии miR-22-3p, miR-107 и miR-330-3p в глиомах головного мозга тесно связано со снижением выживаемости пациентов и свидетельствует о негативном прогнозе течения онкологического заболевания. Снижение экспрессии miR-22-3p, miR-107 или miR-330-3p приводило к повышению медианы общей выживаемости приблизительно в 6 ($p=0,038$), 4 ($p=0,048$) и 4 ($p=0,0088$) раза соответственно (рис. 2).

Изменение экспрессии miR-330 может оказывать влияние на злокачественный процесс. В исследовании Qu S., Yao Y., Shang C., et al. были выявлены онкогенная роль miR-330 в клетках глиобластомы человека и ее связь с геном SH3GL2. Было показано, что сверхэкспрессия miR-330 может активировать пролиферацию, способствовать миграции и инвазии, а также ингибировать апоптоз клеток U87 и U251 [10].

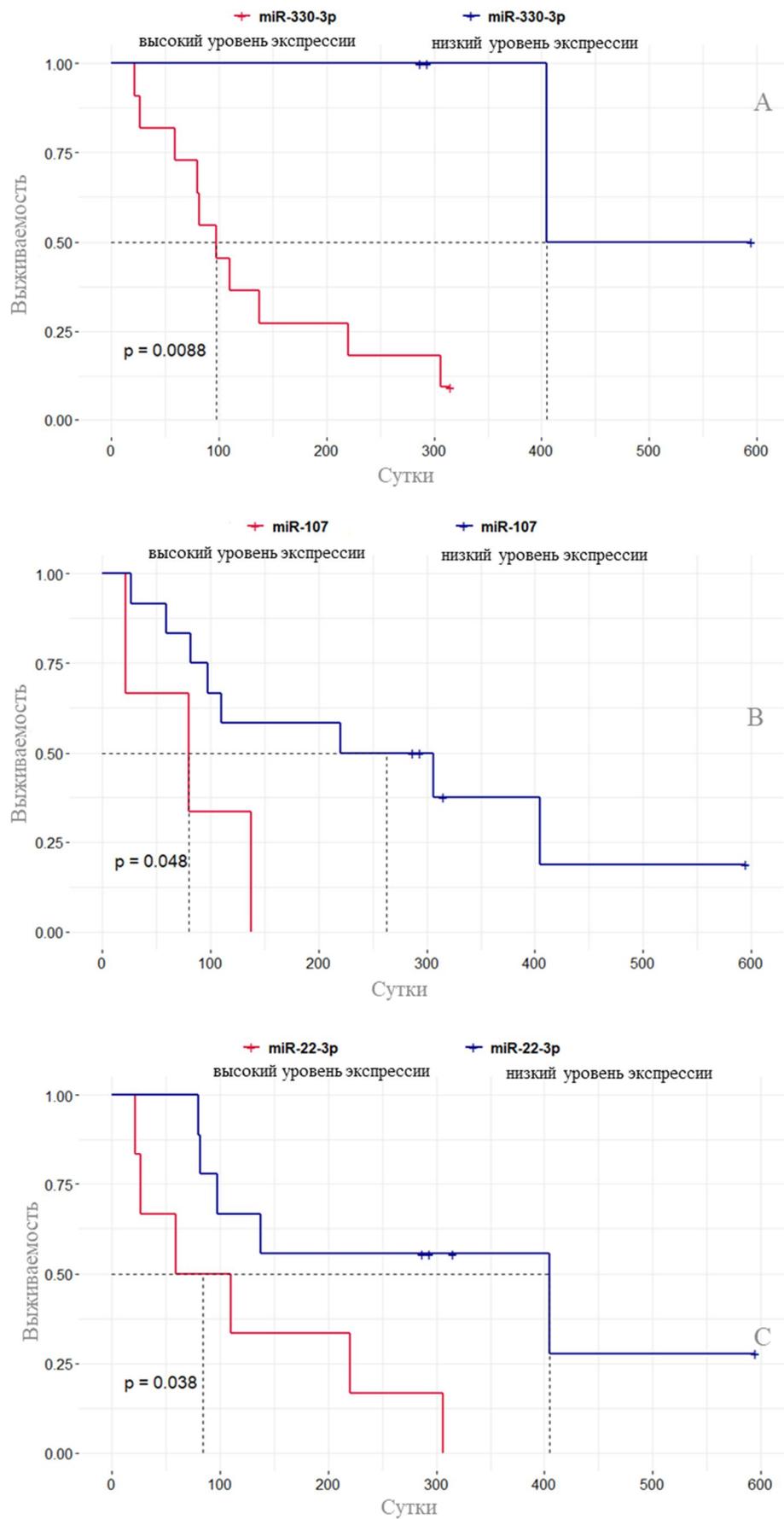


Рис. 2. Изменение выживаемости пациентов со злокачественными глиомами в зависимости от экспрессии микроРНК miR-330-3p (A), miR-107 (B), miR-22-3p (C)

MiR-22-3p играет существенную роль в инициации и прогрессировании различных типов опухолей. MiR-22-3p идентифицирована как мощная онкогенная микроРНК, способствующая пролиферации и инвазии клеток рака простаты [11]. Недавно было обнаружено, что miR-22-3p активируется в спинальной диффузной астроцитоме, где она способствует клеточной инвазии путем подавления TIMP2 (Tissue inhibitor of metalloproteinases 2) [12]. В исследовании Han M., Wang S., Fritah S., et al. было показано, что miR-22-3p активно транскрибируется в клетках глиобластомы, где изменение ее экспрессии было связано с негативными для пациента клиническими исходами [13].

МикроРНК miR-107 участвует в регуляции жизненно важных процессов, таких как клеточное деление, миграция и ангиогенез. Изменение экспрессии miR-107 вызывает развитие множества новообразований. miR-107 действует как опухолевый супрессор, вызывая остановку клеточного цикла при раке легкого и глиоме путем подавления экспрессии CDK6 [14]. Однако miR-107 может выступать в качестве онкогена, способствующего инвазии и метастазированию при раке груди и желудка посредством регуляции экспрессии DICER1 [15].

На многие важные вопросы, касающиеся функций микроРНК в реализации противоопухолевого эффекта, еще предстоит ответить. Однако возможность использования микроРНК в качестве прогностических маркеров и в будущих терапевтических подходах представляет перспективное направление. Возможное участие miR-330-3p, miR-22-3p, miR-107 в нейроонкогенезе делает их привлекательными инструментами таргетной терапии.

Заключение

Уровень экспрессии микроРНК miR-22-3p, miR-107 и miR-330-3p может быть использован как предиктор в оценке выживания пациентов с глиомами высокой степени злокачественности. Обнаруженное изменение общей выживаемости пациентов в зависимости от уровня экспрессии микроРНК miR-22-3p, miR-107 и miR-330-3p делает их привлекательными инструментами генной терапии онкопатологии, не имеющей в настоящее время эффективных методов лечения. Однако наличие возможных побочных эффектов, а также нестрогая специфичность действия микроРНК требуют дальнейшего изучения.

Исследование выполнено в рамках госзадания «Молекулярно-генетические маркеры глиом».

Список литературы

1. Ostrom Q.T., Bauchet L., Davis F.G., Deltour I., Fisher J.L., Langer C.E., Pekmezci M., Schwartzbaum J.A., Turner M.C., Walsh K.M., Wrensch M.R., Barnholtz-Sloan J.S. The

epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro-oncology*. 2014. vol. 16. no.7. P. 896–913. DOI: 10.1093/neuonc/nou087.

2. Wesseling P., Capper D. WHO 2016 classification of gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2018. vol. 44. no. 2. P. 139–150. DOI: 10.1111/nan.12432.

3. Bastien J.I., McNeill K.A., Fine H.A. Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer*. 2015. vol. 12. no. 4. P. 502–516. DOI: 10.1002/cncr.28968.

4. Stupp R., Hegi M.E., Mason W.P., van den Bent M.J., Taphoorn M.J.B., Janzer R.C., Ludwin S.K., Allgeier A., Fisher B., Belanger K., Hau P., Brandes A., Gijtenbeek J., Marosi C., Vecht C.J., Mokhtari K., Wesseling P., Villa S., Eisenhauer E., Gorlia T., Weller M., Lacombe D., Cairncross J.G., Mirimanoff R. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*. 2009. vol. 10. no. 5. P. 459–466. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.

5. Мацко М.В., Мацко Д.Е., Волков Н.М., Улитин А.Ю., Моисеенко В.М., Имянитов Е.Н., Иевлева А.Г. Морфологические и молекулярно-генетические особенности первичных глиобластом у пациентов с необычно высокой продолжительностью жизни // *Сибирский онкологический журнал*. 2019. Т.18. №3. С. 34-44. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-3-34-44.

6. Кит О.И., Пушкин А.А., Росторгуев Э.Е., Тимошкина Н.Н., Кузнецова Н.С., Кавицкий С.Е., Нальгиев А.М. Дифференциальная экспрессия 15-ти генов в глиальных опухолях различной степени злокачественности // *Современные проблемы науки и образования*. 2019. №5. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=29039> (дата обращения: 15.09.2020). DOI: 10.17513/spno.29039.

7. Rajesh Y., Pal I., Banik P., Chakraborty S., Borkar S.A., Dey G., Mukherjee A., Mandal M. Insights into molecular therapy of glioma: Current challenges and next generation blueprint. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2017. vol. 38. no 5. P. 591–613. DOI: 10.1038/aps.2016.167.

8. Zhang Y., Chen J., Xue Q., Wang J., Zhao L., Han K., Zhang D., Hou L. Prognostic significance of MicroRNAs in glioma: A systematic review and meta-analysis. *BioMed Research International*. 2019. vol. 2019, Article ID 4015969. DOI: 10.1155/2019/4015969.

9. Shea A., Harish V., Afzal Z., Chijioke J., Kedir H., Dusmatova S., Roy A., Ramalinga M., Harris B., Blancato J., Verma M., Kumar D. MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics. *Cancer medicine*. 2016. vol. 5. no. 8. P. 1917–1946. DOI: 10.1002/cam4.775.

10. Qu S., Yao Y., Shang C., Xue Y., Ma J., Li Z., Liu Y. MicroRNA-330 is an oncogenic factor in glioblastoma cells by regulating SH3GL2 gene. *PloS one*. 2012. vol.7. no. 9. e46010. DOI: 10.1371/journal.pone.0046010.

11. Budd W.T., Seashols-Williams S.J., Clark G.C., Weaver D., Calvert V., Petricoin E., Dragoescu E.A., O'Hanlon K., Zehner, Z.E. Dual action of miR-125b as a tumor suppressor and oncomiR-22 promotes prostate cancer tumorigenesis. *PloS one*. 2015. vol. 10. no. 11. e0142373. DOI: 10.1371/journal.pone.0142373.
12. Ohnishi Y.I, Iwatsuki K, Ishihara M, Ohkawa T., Kinoshita M., Shinzawa K. , Fujimoto Y., Yoshimine T. Promotion of astrocytoma cell invasion by micro RNA-22 targeting of tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *Jornal of Neurosurgery Spine*. 2017. vol. 26. no 3. P.396-403. DOI: 10.3171/2016.8.SPINE16248.
13. Han M., Wang S., Fritah S., Wang X., Zhou W., Yang N., Ni S., Huang B., Chen A., Li G., Miletic H., Thorsen F., Bjerkvig R., Li X., Wang J. Interfering with long non-coding RNA MIR22HG processing inhibits glioblastoma progression through suppression of Wnt/ β -catenin signalling. *Brain: a journal of neurology*. 2020. vol. 143. no. 2. P. 512–530. DOI: 10.1093/brain/awz406.
14. Chen L., Zhang R., Li P., Liu Y., Qin K., Fa Z., Liu Y., Ke Y., Jiang X. P53-induced microRNA-107 inhibits proliferation of glioma cells and down-regulates the expression of CDK6 and Notch-2. *Neuroscience Letters*. 2013. vol. 534. no. 1. P. 327-332. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.11.047.
15. Li X., Zhang Y., Shi Y., Dong G., Liang J., Han Y., Wang X., Zhao Q., Ding J., Wu K., Fan, D. MicroRNA-107, an oncogene microRNA that regulates tumour invasion and metastasis by targeting DICER1 in gastric cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011. vol. 15. no. 9. P. 1887–1895. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01194.x.