

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАДИОХИРУРГИЧЕСКИХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО H1299

Вошедский В.И.¹, Дженкова Е.А.¹, Тимошкина Н.Н.¹, Аллилueв И.А.^{1,2}, Пушкин А.А.¹, Гусарева М.А.¹, Сакун П.Г.¹, Власов С.Г.¹, Шапошников А.В.¹, Енгибарян М.А.¹, Николаева Н.В.¹, Лысенко И.Б.¹

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

²ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, e-mail: alliluev@sfedu.ru

Лучевая терапия является одним из основных методов лечения пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Однако устойчивость опухолевых клеток к радиационному воздействию ограничивает эффективность терапии. Исследования последних лет показали, что изменяющаяся под действием ионизирующего излучения экспрессия микроРНК может оказывать влияние на результат радиотерапии. В связи с этим целью работы стало исследование количества клеток, находящихся на различных стадиях апоптоза, и дифференциальной экспрессии микроРНК при воздействии радиохирургических доз ионизирующего излучения на культуру клеток немелкоклеточного рака легкого H1299. Долю клеток, находящихся на различных стадиях апоптоза, оценивали на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (BD, США) с использованием Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD, США). Методом RT-qPCR была проведена оценка экспрессии микроРНК hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-663 в культуре клеток немелкоклеточного рака легкого H1299 при воздействии ионизирующего излучения в диапазоне от 18 до 24 Гр с шагом 1 Гр. Выявленное изменение экспрессии микроРНК hsa-miR-16-5p, hsa-miR-21-5p и hsa-miR-663 при воздействии радиохирургических доз ионизирующего излучения в культуре клеток немелкоклеточного рака легкого H1299 может свидетельствовать об их возможном участии в ответе на радиационное воздействие.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, H1299, микроРНК, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-663, лучевая терапия.

CHANGES IN MICRORNA EXPRESSION UNDER EXPOSURE TO RADIOSURGICAL DOSES OF IONIZING RADIATION IN THE CULTURE OF NONSMALL CELL LUNG CANCER H1299

Voshedskiy V.I.¹, Dzhenkova E.A.¹, Timoshkina N.N.¹, Alliluyev I.A.^{1,2}, Pushkin A.A.¹, Gusareva M.A.¹, Sakun P.G.¹, Vlasov S.G.¹, Shaposhnikov A.V.¹, Engibaryan M.A.¹, Nikolaeva N.V.¹, Lysenko I.B.¹

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

²Southern Federal University, Rostov-on-Don, e-mail: alliluev@sfedu.ru

Radiation therapy is one of the main treatments for patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). However, the resistance of tumor cells to radiation exposure limits the overall effectiveness of therapy. Recent studies have shown that the expression of microRNA, which changes under the influence of ionizing radiation, can influence the result of radiotherapy. The aim of this work was to study the differential expression of miRNAs under the influence of radiosurgical doses of ionizing radiation in the cell culture of non-small cell lung cancer H1299. The expression of miRNAs hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16a-5p, hsa-miR-17-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-663 was estimated in the culture of H1299 non-small cell lung cancer cells under the influence of doses of ionizing radiation in the range from 18 to 24 Gy with a step of 1 Gy. The revealed change in the expression of microRNA hsa-miR-16a-5p, hsa-miR-21-5p, and hsa-miR-663 under the influence of radiosurgical doses of ionizing radiation in the culture of cells of non-small cell lung cancer H1299 may indicate their potential participation in the cellular response to ionizing radiation.

Keywords: Non-small cell lung cancer, H1299, microRNA, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-663, radiation therapy.

Рак легких является ведущей причиной смерти от онкологических заболеваний в мире. В структуре общей заболеваемости злокачественными новообразованиями в Российской Федерации рак легких входит в тройку ведущих, а среди мужского населения занимает первое место (17,6%). Ежегодно регистрируется более 60 000 первичных случаев рака легкого. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет 80% всех случаев рака легких [1].

Лучевая терапия является основным методом лечения злокачественных заболеваний, однако НМРЛ часто обладает высокой радиорезистентностью, что создает серьезное препятствие в лечении опухоли [2]. Лучевая терапия в основном элиминирует чувствительные клетки, оставляя устойчивые к радиотерапии, которые затем могут вызвать рецидив опухоли и метастазирование. Частота местных рецидивов НМРЛ через 2 года после традиционной фракционированной лучевой терапии достигает 60–70% [3].

Одним из способов преодоления радиорезистентности является использование лучевой терапии высокой мощности ионизирующего излучения, которое применяется при стереотаксической радиохирургии и стереотаксической лучевой терапии экстракраниальных образований. По данным проспективных исследований, при стереотаксической лучевой терапии экстракраниальных образований НМРЛ I стадии 3-летний локальный контроль составил примерно 90% [4]. Имеющиеся клинические данные подтверждают высокую эффективность радиохирургии в достижении высокого локального контроля метастазов в головном мозге [5].

Недавние исследования показали, что микроРНК участвуют в реализации механизмов опухолевой радиорезистентности. МикроРНК представляют собой класс коротких нуклеотидных последовательностей (21–27 нуклеотидов) РНК, не принимающих участия в синтезе белка, но участвующих в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Аберрантная экспрессия микроРНК была идентифицирована при многих злокачественных новообразованиях, в том числе НМРЛ [6; 7]. Исследования *in vitro* продемонстрировали, что чувствительность или устойчивость к ионизирующей радиации может изменяться в зависимости от увеличения или снижения экспрессии конкретных микроРНК. Идентификация молекулярных механизмов, лежащих в основе развития радиорезистентности при участии микроРНК, может значительно расширить арсенал терапевтических подходов, что позволит повысить радиочувствительность или ограничить радиорезистентность опухоли, тем самым оказывая более значимые клинические эффекты в ответ на лучевую терапию пациентов с НМРЛ [7].

Цель исследования: оценить влияние воздействия радиохирургических доз ионизирующего излучения с исследованием дифференциальной экспрессии микроРНК при

воздействии радиохирургических доз ионизирующего излучения в культуре клеток немелкоклеточного рака легкого H1299.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили на культуре клеток немелкоклеточного рака легкого H1299. Клеточную линию пассировали во флаконы T25 см² (Corning, USA) по 10×10⁶ клеток в питательную среду DMEM (Gibco, USA), с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Биолот», Россия), 1% раствора пенициллина-стрептомицина («Биолот», Россия), 1% незаменимых аминокислот (Gibco, USA), 1% Glutamax (Gibco, USA). Перед облучением клеточную линию культивировали 24 часа в инкубаторе Binder (Германия) при 37 °С, 5% CO₂. После инкубации декантировали полную питательную среду и вносили DMEM без сыворотки, антибиотиков и добавок. Клетки облучали на линейном ускорителе NovalisTx (Varian, USA) с воздействием доз радиации в диапазоне от 18 до 24 Гр с шагом 1 Гр в 3 повторах. Контрольную группу оставляли без облучения. Экспозиция клеточной линии после воздействия радиации составляла 24 ч в инкубаторе при 37 °С, 5% CO₂. Снятие клеток проводили по стандартной методике раствором трипсин-версена («Биолот», Россия) 1:1. Долю клеток, находящихся на различных стадиях апоптоза, оценивали на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (BD, США) с использованием Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD, США).

Выделение тотальной РНК проводили с использованием автоматической станции QIAcube Connect (Qiagen, Германия) и набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Оценку относительной экспрессии микроРНК проводили по стандартной методике [6]. Зрелые микроРНК, присутствующие в общей РНК (200 нг), сначала полиаденилировали в общем объеме 10 мкл, содержащем 1 мкл 10-кратного поли(А)-полимеразного буфера, 1 мкл 10 мМ АТФ, 2,5 единицы поли(А)-полимеразы. (New England Biolabs, США) в течение 30 мин. при 37 °С. Полиаденилированные микроРНК подвергали обратной транскрипции с использованием универсального обратного праймера, который содержит олиго(dT)-последовательность и адаптерную последовательность на 5'-конце. К реакционной смеси (10 мкл) добавляли 4 мкл 5 × RT буфера, 1 мкл 25 мМ dNTP, 1 мкл 10 мкМ универсального праймера. и 200 единиц обратной транскриптазы M-MuLV («Евроген», Российская Федерация) и доводили объем до 20 мкл водой, свободной от нуклеаз. Обратную транскрипцию проводили при 42 °С в течение 45 минут с последующей инкубацией при 85 °С в течение 5 минут для инактивации обратной транскриптазы. Полученную таким образом комплементарную ДНК (кДНК) разбавляли в 10 раз водой, свободной от РНКаз. 5 мкл разведенной кДНК использовали в реакциях ПЦР-РВ. ПЦР-микс содержал 10x реакционный буфер, 200 нМ dNTP, 1x EvaGreen, 1 ед HSTaqPol («Евроген», Российская Федерация), 250нМ прямого и обратного праймера. ПЦР-РВ проводили в системе для ПЦР CFX96 (Bio-Rad, США)

при следующих условиях: начальная денатурация при 95 °С в течение 3 минут с последующими 40 циклами денатурации (95 °С в течение 10 секунд), отжига (60 °С в течение 30 секунд) и элонгации (72 °С в течение 30 секунд). Специфичность праймеров оценивалась с помощью плавления продуктов ПЦР при диапазоне температур 60-95 °С. Использовалась опция автоматического порога для получения значений Ct. Для оценки изменения относительной экспрессии микроРНК использовался метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$. В качестве референсной РНК использовалась RNU47. Данные ПЦР-РВ представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Статистическая значимость определялась с помощью ANOVA и теста Тьюки. Межгрупповые различия рассматривали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Стереотаксическая лучевая терапия в радиохирургических режимах обеспечивает высокие дозы гомогенно распределённого ионизирующего излучения в опухолевых тканях, вызывая радиационно-индуцированный апоптоз, который является важнейшим фактором, обеспечивающим эффективность лучевой терапии [2].

Определение эффективности воздействия радиохирургических доз ионизирующего излучения заключалось в исследовании апоптоза в культуре клеток НМРЛ Н1299, на которые было оказано воздействие доз радиации в диапазоне от 18 до 24 Гр с шагом 1 Гр (рис. 1).

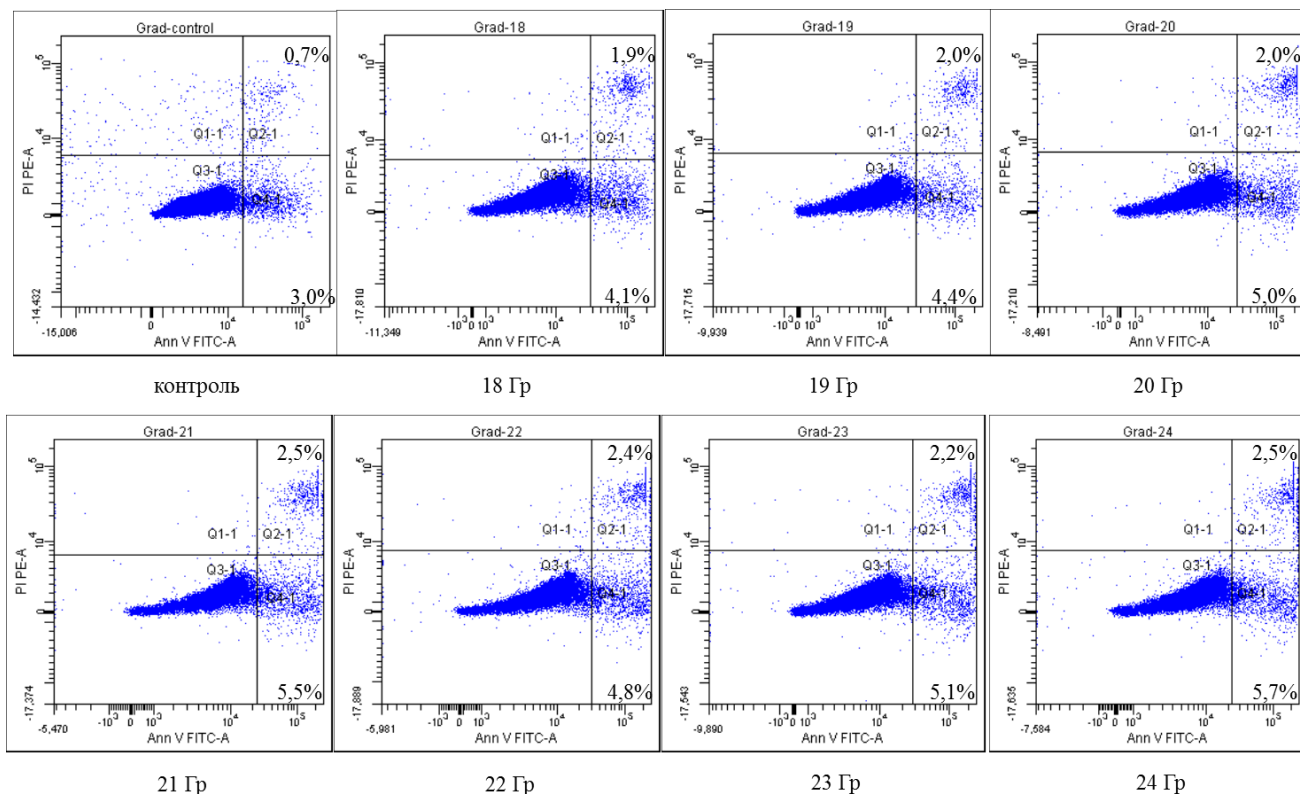


Рис. 1. Процент клеток немелкоклеточного рака легкого H1299, находящихся на разных стадиях радиационно-индуцированного апоптоза. Q1-1 - мертвые клетки; Q2-1 - ранний апоптоз; Q3-1 - живые клетки; Q4-1 - поздний апоптоз

При автоматическом подсчете живых клеток наименьшее количество живых клеток наблюдается при суммарной очаговой дозе от 22 до 24 Гр ($4,5-4,6 \times 10^6$), также отмечается значительное уменьшение количества живых клеток в группах с облучением по сравнению с контрольной группой. При оценке количества клеток, находящихся на стадиях раннего и позднего апоптоза, установлено, что процент клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза, наибольший в группе с очаговой дозой 24 Гр (5,7%), что на 2,7% больше, чем в контрольной группе. Анализ данных о количестве клеток, находящихся на поздней стадии апоптоза, показал, что наибольший эффект наблюдался в диапазоне доз ионизирующего излучения от 21 до 24 Гр.

Другим методом оценки эффективности терапии на ионизирующее излучение была выбрана оценка экспрессии микроРНК. Исследования последних лет показали, что изменяющаяся под действием ионизирующего излучения экспрессия микроРНК может оказывать влияние на результат радиотерапии. Методом RT-qPCR была проведена оценка изменения экспрессии микроРНК hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16a-5p, hsa-miR-17-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-663 в культуре клеток немелкоклеточного рака легкого H1299 при воздействии ионизирующего излучения в диапазоне от 18 до 24 Гр с шагом 1 Гр. Отмечены следующие изменения экспрессии: miR-16a-5p – повышение экспрессии по сравнению с контрольной группой в 4,9 раза ($p=0.0096$), miR-21-5p - повышение экспрессии по сравнению с контрольной группой в среднем в 13 раз ($p=0.05$), miR-663 - снижение экспрессии по сравнению с контрольной группой в среднем в 2,8 раза ($p=0.00011$). Однако значимых отличий в экспрессии микроРНК между экспериментальными группами, подвергнутыми воздействию радиохирургических доз ионизирующей радиации, выявлено не было (рис. 2).

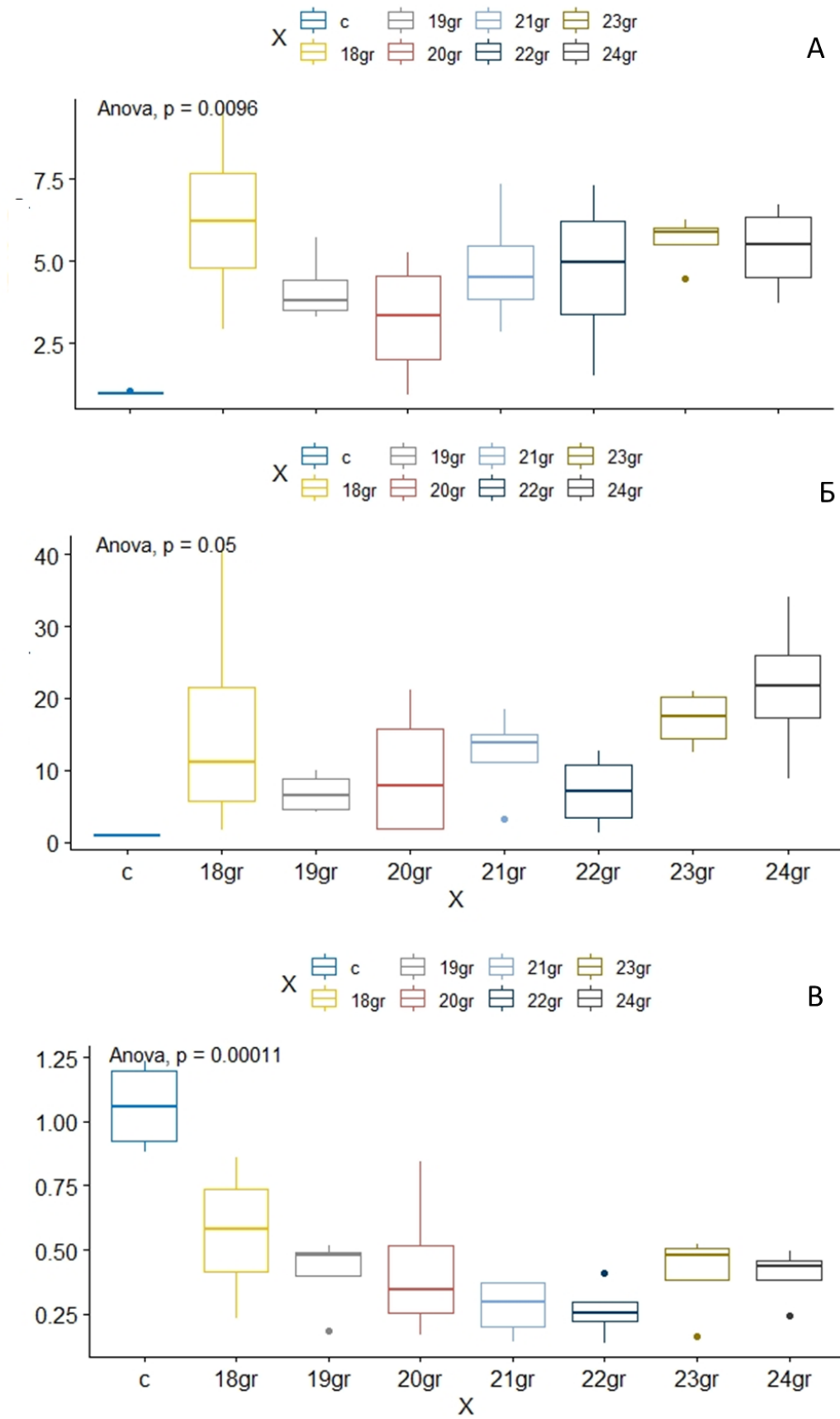


Рис. 2. Изменение относительной экспрессии микроРНК miR-16a-5p (А), miR-21-5p (Б) и miR-663 (В)

Основная функция микроРНК заключается в эпигенетической регуляции экспрессии генов. В литературе подчеркивается, что микроРНК регулируют апоптоз на разных уровнях. Предполагается возможность селективно контролировать гибель клеток посредством изменения экспрессии микроРНК [7].

Семейство miR-15, включая miR-15a, miR-15b и miR-16, оказывает влияние на радиочувствительность различных опухолей человека, таких как рак груди, рак шейки матки и НМРЛ [8; 9] При НМРЛ происходит повышение экспрессии hsa-miR-16-5p, что значительно подавляет жизнеспособность клеток и усиливает апоптоз, тогда как ингибиторы hsa-miR-16-5p оказывают противоположный эффект [10].

Экспрессия микроРНК hsa-miR-663 снижается при воздействии радиохирургических доз ионизирующего излучения. В исследовании Zhi-Yong L. et al. было показано, что hsa-miR-663 высоко экспрессируется у пациентов с раком легких. hsa-miR-663 влияет на пролиферацию клеток рака легких, прямо или косвенно регулируя TGF β 1, P53, Вах и Fas [11]. Дополнительно miR-663 регулирует апоптоз, влияя на проницаемость внешней митохондриальной мембраны посредством PUMA / BCL2 и BCL2L1 [12].

МикроРНК hsa-miR-21-5p сверхэкспрессируется практически во всех типах опухолей человека [13]. Следует отметить, что hsa-miR-21 активируется в резистентных к радиотерапии клетках НМРЛ по сравнению с радиочувствительными аналогами [14]. Подавление hsa-miR-21-5p в радиорезистентных клетках НМРЛ A549 снижает колониеобразующую способность и пролиферацию после воздействия ионизирующего излучения. Более того, подавление hsa-miR-21-5p усиливает индуцированный радиацией апоптоз клеток A549 [15]. Дальнейший анализ мишеней hsa-miR-21-5p представляет значительный интерес, поскольку они могут выявить новые стратегии лучевой сенсibilизации для радиорезистентного НМРЛ.

Заключение

Эффективность лучевой терапии зависит от радиочувствительности опухоли. При наличии повреждений ДНК, вызванных действием ионизирующей радиации, и нарушении репарации происходит элиминация поврежденной клетки путем апоптоза. К сожалению, опухолевые клетки уже имеют или могут приобрести радиорезистентные характеристики, которые позволяют им избежать гибели клеток. Выявленное изменение экспрессии микроРНК hsa-miR-16-5p, hsa-miR-21-5p и hsa-miR-663 при воздействии радиохирургических доз ионизирующего излучения в культуре клеток немелкоклеточного рака легкого H1299 может свидетельствовать об их возможном участии в ответе на радиационное воздействие.

Список литературы

1. Мерабишвили В.М., Арсеньев А.И., Тарков С.А., Барчук А.А., Щербаков А.М., Демин Е.В., Мерабишвили Э.Н. Заболеваемость и смертность населения от рака легкого, достоверность учета // Сибирский онкологический журнал. 2018. Т. 17. №. 6. С. 15-26. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-15-26.
2. Willers H., Azzoli C.G., Santivasi W.L., Xia F., Lindblom E., Dasu A., Toma-Dasu I. Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer. *Cancer journal* (Sudbury, Mass.). 2013. Vol. 19. №. 3. P. 200-207. DOI: 10.1097/PPO.0b013e318292e4e3.
3. Zimmermann F.B., Molls M., Jeremic B. Treatment of recurrent disease in lung cancer. *Seminars in surgical oncology*. Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. 2003. Vol. 21. №. 2. P. 122-127. DOI: 10.1002/ssu.10029.
4. Abreu C.E.C.V., Ferreira P.P.R., Moraes F.Y.D., Neves W.F.P., Gadia R., Carvalho H.D.A. Stereotactic body radiotherapy in lung cancer: an update. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2015. Vol. 41. P. 376-387. DOI: 10.1590/S1806-37132015000000034.
5. Кит О.И., Вошедский В.И., Сакун П.Г., Гусарева М.А., Власов С.Г., Мусейко К.Н., Командиров М.А., Култышева Ю.А. Опыт применения радиохирургического комплекса Novalis Tx в практике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России // Южно-Российский онкологический журнал. 2020. № 1 (4). С. 32-37. DOI: 10.37748/2687-0533-2020-1-4-4.
6. Аллилуев И.А., Пушкин А.А., Росторгуев Э.Е., Кузнецова Н.С. Прогностическая значимость микроРНК miR-22-3p, miR-107 и miR-330-3p в оценке выживаемости пациентов с глиомами высокой степени злокачественности // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=30122> (дата обращения: 08.07.2021).
7. Florczuk M., Szpechcinski A., Chorostowska-Wynimko J. miRNAs as biomarkers and therapeutic targets in non-small cell lung cancer: current perspectives. *Targeted oncology*. 2017. Vol. 12. №. 2. P. 179-200. DOI: 10.1007/s11523-017-0478-5.
8. Lan F., Yue X., Ren G., Li H., Ping L., Wang Y., Xia T. miR-15a/16 enhances radiation sensitivity of non-small cell lung cancer cells by targeting the TLR1/NF-κB signaling pathway. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2015. Vol. 91. №. 1. P. 73-81. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.09.021.
9. Mei Z., Su, T., Ye J., Yang C., Zhang S., Xie C. The miR-15 family enhances the radiosensitivity of breast cancer cells by targeting G2 checkpoints. *Radiation research*. 2015. Vol. 183. №. 2. P. 196-207. DOI: 10.1667/RR13784.1.
10. Wang Q., Chen Y., Lu H., Wang H., Feng H., Xu J., Zhang B. Quercetin radiosensitizes non-small cell lung cancer cells through the regulation of miR-16-5p/WEE1 axis. *IUBMB life*. 2020. Vol. 72. №. 5. P. 1012-1022. DOI: 10.1002/iub.2242.

11. Zhi-Yong L., Guang-Ling Z., Mei-Mei W., Ya-Nan X., He-Qin C. MicroRNA-663 targets TGFB1 and regulates lung cancer proliferation //Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2011. Vol. 12. №. 11. P. 2819-2823.
12. Fiori M.E., Villanova L., Barbini C., De Angelis M.L., De Maria R. miR-663 sustains NSCLC by inhibiting mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) through PUMA/BBC3 and BTG2. Cell death & disease. 2018. Vol. 9. №. 2. P. 1-13. DOI: 10.1038/s41419-017-0080-x.
13. Croce C.M. miRNAs in the spotlight: understanding cancer gene dependency. Nature medicine. 2011. Vol. 17. №. 8. P. 935-936. DOI: 10.1038/nm0811-935.
14. Salim H., Akbar N.S., Zong D., Vaculova A.H., Lewensohn R., Moshfegh A., Viktorsson K., Zhivotovsky B. miRNA-214 modulates radiotherapy response of non-small cell lung cancer cells through regulation of p38MAPK, apoptosis and senescence. British journal of cancer. 2012. Vol. 107. №. 8. P. 1361-1373. DOI: 10.1038/bjc.2012.382.
15. Ma Y., Xia H., Liu Y., Li M. Silencing miR-21 sensitizes non-small cell lung cancer A549 cells to ionizing radiation through inhibition of PI3K/Akt. BioMed research international. 2014. DOI: 10.1155/2014/617868.