

АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ И НЕКОДИРУЮЩИХ РНК КАК ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЮ РАННИХ БИОМАРКЕРОВ РАДИОИНДУЦИРОВАННОГО ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЯ У МЫШЕЙ

© 2021 г. **В. Ф. Михайлов**¹, Д. В. Салеева^{1, *}, Л. М. Рождественский¹,
Л. В. Шуленина¹, Н. Ф. Раева¹, Г. Д. Засухина^{1, 2}

¹Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна, Москва, 123098 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: dasha_saleeva@inbox.ru

Поступила в редакцию 18.01.2021 г.

После доработки 09.04.2021 г.

Принята к публикации 20.04.2021 г.

Была изучена активность генов и некодирующих РНК у 183 мышей-гибридов (СВА × С57В1) F₁ после пролонгированного низкомоментного облучения (в течение 21 ч в дозе 12.6 Гр, при мощности дозы 10 мГр/мин). Анализ исследуемых показателей проведен в костном мозге мышей на восьмой и десятый месяцы после облучения. На десятый месяц у 14 из 94 животных обнаружены радиоиндуцированные злокачественные лимфомы в печени, брюшной полости и подкожно. Исследуемые молекулярно-генетические показатели были разделены на две группы: онкогены и онкосупрессоры, активация которых сравнивалась на восьмой и десятый месяцы после облучения. Выявлено, что в группах мышей с опухолями активность онкосупрессоров (ген *PTEN* и длинная некодирующая РНК *lncp21*) была ниже по сравнению с группой мышей без новообразований, тогда как активность онкогенов (*NFκB(p65)*, *IκBα*, *iNOS*, *TALI*, *CTCF*, днРНК *NEAT1* и *miR-125b*) повышалась. Исследуемые показатели можно рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров радиоиндуцированного опухолеобразования.

Ключевые слова: биомаркеры, радиоиндуцированное опухолеобразование, длинные некодирующие РНК, микроРНК.

DOI: 10.31857/S0016675821100076

Изменение активности определенных генов и их регуляторов – некодирующих РНК, а также баланса взаимодействия между ними при действии радиации может сопровождаться развитием опухолей. Выявление таких генетических структур может служить пониманию механизмов формирования патологии.

Прикладным аспектом этой проблемы является необходимость создания панели биомаркеров для прогнозирования опухолеобразования в условиях различных радиационных воздействий на человека. Необходимость таких исследований диктуется не только возможностью аварий, подобных Чернобылю или Фукусиме, но и опасностью профессиональных радиационных воздействий, а также некоторых диагностических процедур.

В последние несколько лет для прогноза и понимания механизмов радиационного действия используют профили экспрессии некодирующих РНК: микроРНК (*miR*) и длинных некодирующих РНК (днРНК), которые, обладая разной чувствительностью к радиации, могут регулировать ак-

тивность генов-мишеней, влияя на изменения функций и развитие разных патологий, что может служить показателем тяжести и прогноза заболевания. С этой целью используют профили активности генов, микро- и днРНК и их изменения после радиационного воздействия.

МикроРНК являются классом эндогенных маленьких некодирующих РНК (20–25 нуклеотидов), которые регулируют гены-мишени, влияя на деградацию мРНК или репрессию трансляции. Они включаются в регуляцию клеточных функций (дифференциацию, пролиферацию, апоптоз). Аберрантная экспрессия микроРНК может приводить к активации или ингибированию многочисленных физиологических процессов. Профили экспрессии микроРНК могут отражать особенности различных типов опухолей и потенциально дифференцировать различные дозы гамма-радиации [1–3]. Так была установлена связь уровня экспрессии *miR-26b-5P* и ее мишени *TRPS1* с раком груди у пациентов после аварии в Чернобыле [4]. Циркулирующие микроРНК используют как биомаркер ра-

диационной экспозиции [5]. MiR-122 отражает репрессию трансляции PEG-10 при гепатоцеллюлярной карциноме [6].

днРНК модулируют транскрипцию посттрансляционных процессов, принимая участие в ряде биологических событий (геномный импринтинг, хромосомная дозовая компенсация, хроматиновая модуляция и др.). днРНК состоят более чем из 200 нуклеотидов, которые не транслируются в протеины [7]. Их функции зависят от вида животных, типа тканей и клеток. У человека обнаружено порядка 17000 днРНК [8]. Полагают, что днРНК, подобно губке, связывают разные микроРНК, что может ингибировать их функциональную активность. Отмечена тесная связь активности днРНК с рядом патологий (опухолобразование, аутоиммунные болезни и др.). Анализ профиля экспрессии днРНК дает возможность рассматривать их как потенциальные биомаркеры радиационных осложнений [9, 10]. Было показано, что днРНК PARTICLE модулирует экспрессию опухолевого супрессора MAT2A, регулируя локуспецифическое метилирование. Этот показатель может рассматриваться как возможный биомаркер подавления процессов транскрипции генов при исследовании плазмы пациентов после радиотерапии [11]. Связь между днРНК и микроРНК была исследована в свете патогенеза разных заболеваний и осуществляет регуляцию разных клеточных процессов [12]. Радиационно-индуцированные днРНК являются прекрасной моделью для изучения динамики изменения их экспрессии в различных органах мышей после облучения всего тела [13].

Исходя из вышеперечисленных данных, нами были исследованы в комплексе активность генов, днРНК и микроРНК на восьмой и десятый месяцы в костном мозге мышей линии (СВА × С57В1) F₁ после пролонгированного облучения в дозе 12.6 Гр (в отличие от других авторов, которые исследовали или микроРНК, или днРНК в ответ на действие радиации) [5]. При этом на десятый месяц была исследована активность этих соединений у облученных мышей без опухоли и с образовавшимися опухолями. Эти данные важны, с одной стороны, для понимания механизмов радиоиндуцированного канцерогенеза, а с другой, исследованные гены и некодирующие РНК могут быть использованы в качестве показателей риска развития опухоли, а также могут служить в качестве биомаркеров этого процесса и возможных мишеней для терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В работе использовали 183 самца мышей-гибридов (СВА × С57В1) F₁ массой 20–24 г. Исследования проводили в соответствии с требованиями нормативно-правовых актов.

Облучение животных. Низкомощностное пролонгированное облучение мышей в дозе 12.6 Гр осуществляли на цезиевой гамма-установке Панорама-3С (с мощностью дозы 10 мГр/мин) в течение 21 ч.

Получение биологического материала. Мышей подвергали эвтаназии методом дислокации шейных позвонков, после чего извлекали бедренные кости. Концы костей удаляли, диафизы дважды промывали 0.8 мл буфера RPMI-1640 с рН 7.2 с содержанием в 0.1 мкл $0.5-2 \times 10^6$ клеток. Полученная суспензия костного мозга хранилась при -70°C до использования.

Определение жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток в экспериментальных группах оценивали с помощью набора Cell Counting Kit-8 (ССК-8) (Dojindo Molecular Technologies, Inc., США). Для этого, не меняя среду, в ячейки планшета к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 10 мкл раствора ССК-8, содержащего водорастворимую тетразолиевую соль WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disul-fophenyl)-2Htetrazolium, monosodium salt] и электронный медиатор. Число живых клеток оценивали спектрофотометрически с помощью микропланшетного ридера Bio Rad Elisa Reader (США) при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 690 нм).

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Общую РНК получали из костного мозга у 89 и 94 мышей на восьмой и десятый месяцы после облучения с использованием наборов фирмы ООО “Лаборатория Изоген” (Россия) по стандартному протоколу фирмы-производителя. Конверсию РНК в кДНК проводили с помощью набора реагентов для проведения реакции обратной транскрипции GenePak RT Core с использованием рандомизированных праймеров. Реакцию обратной транскрипции для микроРНК осуществляли по технологии “stem loop” с использованием праймеров 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACAT-3' для miR-21 и 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCCGCAATTCAGTTGAGTCACAAGT-3' для miR-125b (50 нМ). ПЦР-РВ осуществляли с применением наборов “Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2X)”. В качестве эндогенного контроля экспрессии генов и их регуляторов использовался ген *GAPDH*. Нуклеотидная последовательность праймеров для исследуемых генов, а также условия ПЦР-РВ представлены в табл. 1.

Уровень экспрессии исследуемых показателей нормировали относительно мРНК гена *GAPDH*. Расчет относительной экспрессии исследуемых показателей проводили с использованием метода $\Delta\Delta\text{Ct}$ [14].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы “STATISTICAL7.0”. Для оценки значимости различий приме-

Таблица 1. Температурно-временной режим ПЦР-РВ для мРНК и микроРНК

Показатель	Примеры: прямой (F) и обратный (R), концентрация (нМ)	Условия ПЦР-РВ
<i>P53</i>	F: 5'-TCTGGGACAGCCAACTCTGT-3' (300) R: 5'-GGAGTCTCCAGTGCATGA-3' (300)	Предварительная денатурация (ПД): 95°C – 10 мин; далее 35 циклов: 94°C – 30 с, 51,9°C – 50 с, 72°C – 80 с
<i>P7EN</i>	F: 5'-AATCCCAAGTCCAGAGCGGCTATGT-3' (100) R: 5'-GATTCGCAAGTCCGCCCACTGAACA-3' (100)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 20 с, 64°C – 20 с
<i>TALI</i>	F: 5'-CTGTGTCAATCCAGGTGGTG-3' (300) R: 5'-GATGGGGCTTTGGATAATT-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 94°C – 30 с, 62°C – 30 с
<i>CTCF</i>	F: 5'-CGCGAAGAATGACCCAAAT-3' (300) R: 5'-GACTCCTCCAAATGGCTTC-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 15 с, 51,4°C – 45 с, 72°C – 60 с
<i>TNFr</i>	F: 5'-CCAGCAGTCAGATCAATCTC-3' (300) R: 5'-TTGATGCGAGAGGAGGTT-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 15 с, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с
<i>IAP1</i>	F: 5'-TTCTGTACTGGCCACCTAGTGTTC-3' (300) R: 5'-CATCATTCGGATCCACGTAATAG-3' (300)	ПД: 95°C – 2 мин; далее 40 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 30 с, 70°C – 30 с
<i>IAP2</i>	F: 5'-ATGTCAGAGACAGAGGCATT-3' (300) R: 5'-AGAGACAGTGTATTCGAAAGCAGAT-3' (300)	ПД: 95°C – 2 мин; далее 40 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 30 с, 70°C – 30 с
<i>IkBa</i>	F: 5'-CGCTGTGGACGATCG-3' (300) R: 5'-TTGCTGTACTCCCTCGTCTTC-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 15 с, 59°C – 30 с, 72°C – 30 с
<i>iNOS</i>	F: 5'-CTATCAGGAAGAAATGCAGGAGAT-3' (300) R: 5'-GAGCAGCTGAGTACCTCAAT-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 15 с, 61°C – 30 с, 72°C – 30 с
<i>NFkB(p50)</i>	F: 5'-GAAATCTGTATCCAGACAAAAC-3' (600) R: 5'-ATCACTCAATGGCTCTGTGTAG-3' (600)	ПД: 95°C – 2 мин; далее 40 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 30 с, 70°C – 30 с
<i>NFkB(p65)</i>	F: 5'-CTTCTCAGCCATGGTACTCT-3' (300) R: 5'-CAAGTCTTCATCAGCACTCAATG-3' (300)	ПД: 95°C – 2 мин; далее 45 циклов: 95°C – 30 с, 60°C – 60 с
<i>G-SCF</i>	F: 5'-CTCAACTTCTGCCAGAGG-3' (300) R: 5'-AGCTGGCTTAGGCACCTGTGT-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 15 с, 56°C – 30 с, 72°C – 30 с
<i>NEAT1</i>	F: 5'-GCTCTGGGACCTTCGTGACTCT-3' (100) R: 5'-CTGCCCTGGCTTGGAAATGTA-3' (100)	ПД: 94°C – 10 мин; далее 40 циклов: 94°C – 10 с, 60°C – 45 с
<i>MALAT1</i>	F: 5'-AGCGAGTTGGTGATGAAG-3' (300) R: 5'-TGCCGACCTCAAGGAATGTTAC-3' (300)	ПД: 94°C – 10 мин; далее 45 циклов: 94°C – 10 с, 60°C – 45 с
<i>DINO</i>	F: 5'-GCAATGTGTGCCCTGACTAT-3' (300) R: 5'-ACTTCTGGCTTCCSAGAG-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 5 циклов: 94°C – 15 с, 60°C – 45 с
<i>lncp21</i>	F: 5'-CCTGTCCACTCGCTTC-3' (300) R: 5'-GGAACTGGAGACGGAAATGTC-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 15 с, 50°C – 35 с
<i>miR-21</i>	F: 5'-TGCCCGCTAGCTTATCAGACTG-3' (300) R: 5'-AAGTGCAGGTCGGAGG-3' (300)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 40 циклов: 94°C – 20 с, 57°C – 45 с, 72°C – 45 с
<i>miR-125b</i>	F: 5'-ACATCCAGCTGGTCCCTGAGACCCTAAC-3' (250) R: 5'-CTCAACTGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG-3' (250)	ПД: 94°C – 10 мин; далее 30 циклов: 94°C – 15 с, 60°C – 60 с
<i>GAPDH</i>	F: 5'-CATCACCATCTCCAGGAGCG-3' (100) R: 5'-ACGGACACATGGGGGTAGG-3' (100)	ПД: 95°C – 10 мин; далее 45 циклов: 95°C – 20 с, 60°C – 25 с

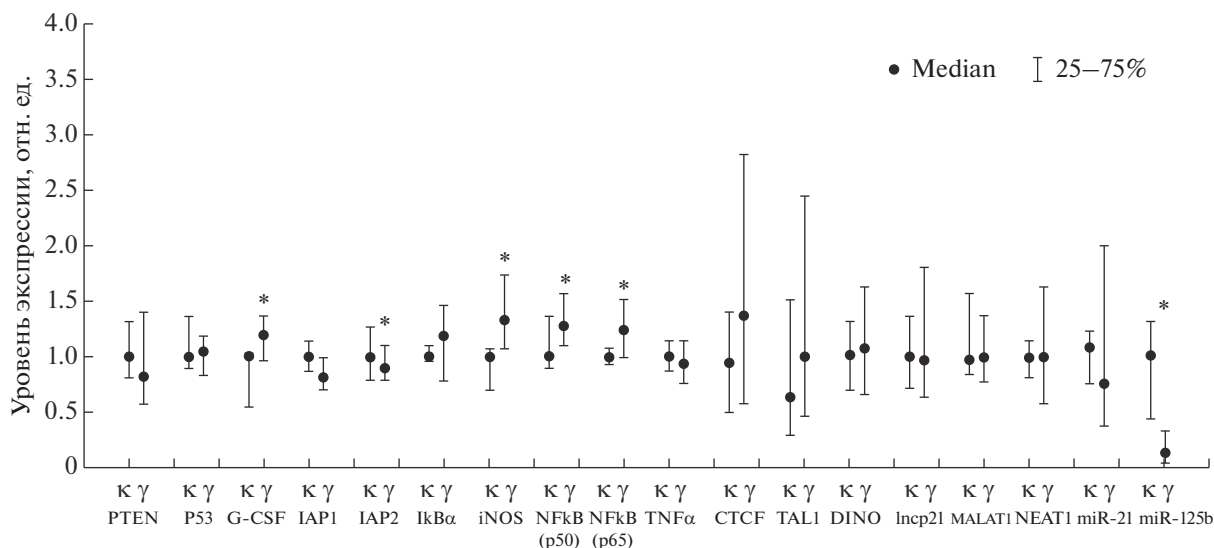


Рис. 1. Содержание мРНК генов, микроРНК и днРНК (медиана и квартили) в костном мозге мышей через восемь месяцев после облучения. к – необлученная группа (“Биоконтроль”), γ – группа облученных мышей (“Облучение”), * – указывает на достоверные статистические изменения ($p < 0.05$) по критерию Манна–Уитни между группами “Облучение” и “Биоконтроль”. Медиана группы “Биоконтроль” принята за единицу.

няли непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали значимыми при уровне показателя $p < 0.05$. Результаты представлены в виде медиан изменения экспрессии показателей в группах “Облучение” и “Облучение + опухоль”, выраженных по отношению к медиане группы “Биоконтроль”, принятой за единицу. В эксперименте “Биоконтроль” представляет собой контрольную группу интактных мышей, “Облучение” – группу мышей, подвергающихся низкоэнергетическому пролонгированному облучению, “Облучение + опухоль” – мышей, у которых на десятый месяц после облучения обнаружены опухоли (14 мышей).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 и 2 представлено относительное содержание мРНК генов, днРНК и микроРНК (медиана и квартили) в группах “Биоконтроль”, “Облучение”, “Облучение + опухоль” в костном мозге мышей на восьмой и десятый месяцы после облучения.

Акцент сделан на особенностях экспрессии отдельно взятых онкогенов и онкосупрессоров.

Из данных на рис. 1 видно, что через восемь месяцев после облучения отмечается статистически значимое повышение экспрессии онкогенов *NFkB(p50)*, *NFkB(p65)* и их генов-мишеней: *G-CSF* и *iNOS* в группе “Облучение” в 1.27, 1.23, 1.19 и 1.32 раза ($p < 0.05$) соответственно, в то время как изменение активности остальных исследуемых генов и некодирующих РНК не выявлено.

Через десять месяцев после облучения у 14 из 94 мышей гистологически были выявлены лим-

фомы в печени, брюшной полости и подкожно. При этом значительно изменялась экспрессия различных генов и их регуляторов. В частности, отмечалось снижение функциональной активности генов *NFkB(p65)* и *iNOS* в 1.15 и 1.17 раз ($p < 0.05$) в группах “Облучение” и “Облучение + опухоль” соответственно, а для гена *iNOS* – в 1.62 раза ($p < 0.05$) в группе “Облучение + опухоль” по отношению к группе “Биоконтроль” (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в нормальных клетках костного мозга мышей независимо от образования опухоли статистически значимо снижалась активность гена *NFkB*.

Из рис. 2 видно, что экспрессия генов *PTEN*, *iNOS*, *CTCF*, *TAL1*, днРНК *Inc21*, *NEAT1* и микроРНК *miR-125b* снижена в группе “Облучение + опухоль” ($p < 0.05$) и подавлялась активность генов *Ikbα*, *TAL1* и микроРНК *miR-125b* в группе “Облучение”.

Снижение экспрессии днРНК *NEAT1* было показано также при раке желудка [15], однако было отмечено и увеличение ее активности при раке гортани [16], что ассоциировалось с неблагоприятным прогнозом и метастазированием опухолей. Это свидетельствует о специфичности ответа на действие радиации.

В клетках костного мозга мышей после пролонгированного облучения отмечалось подавление активности микроРНК. Так, экспрессия *miR-125b* снижалась в 8.3 и в 4.3 раза ($p < 0.05$) на восьмой и десятый месяц соответственно в группе “Облучение” и в 33 раза в группе “Облучение + опухоль” на десятый месяц. В литературе показано, что *miR-125b* проявляет свойства онкосуп-

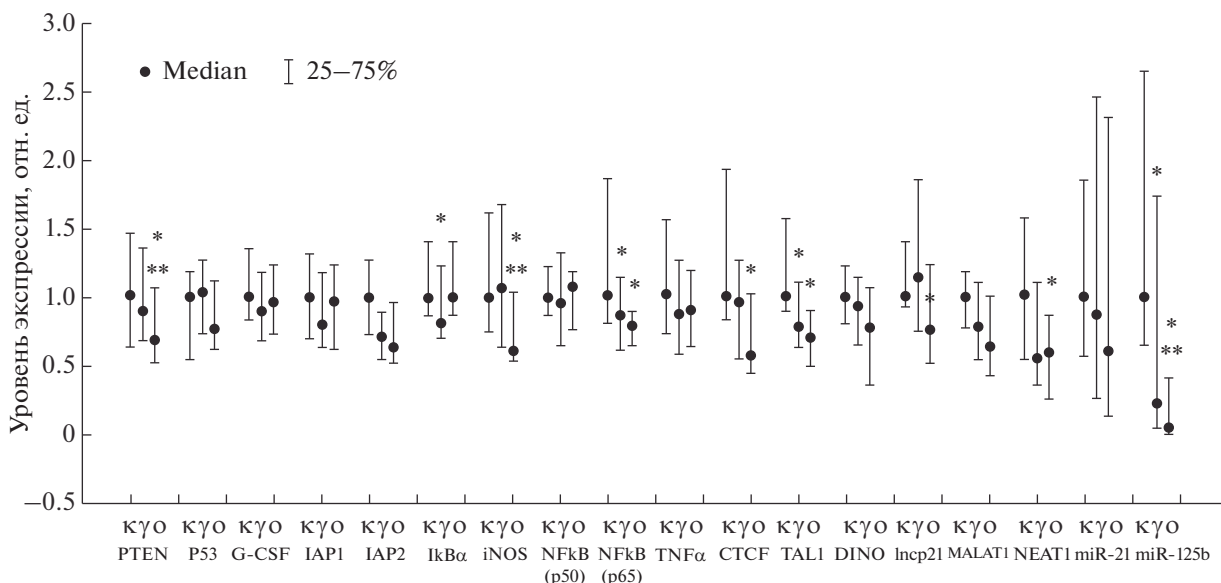


Рис. 2. Содержание мРНК генов, микроРНК и днРНК (медиана и квантили) в костном мозге мышей через десять месяцев после облучения. Для рис. 2, 3: к – необлученная группа (“Биоконтроль”), γ – группа облученных мышей (“Облучение”), о – группа облученных мышей с опухолями (“Облучение + опухоль”), * – указывает на достоверные статистические изменения ($p < 0.05$) по критерию Манна–Уитни между группами “Облучение” и “Биоконтроль” или “Облучение + опухоль” и “Биоконтроль”. ** – указывает на достоверные статистические изменения ($p < 0.05$) по критерию Манна–Уитни между группами “Облучение + опухоль” и “Облучение”. Медиана группы “Биоконтроль” принята за единицу.

прессора при немелкоклеточном раке легкого и раке молочной железы [17]. Наши данные также свидетельствуют о вовлеченности в процесс опухолеобразования miR-125b.

ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из направлений радиобиологических исследований является поиск биомаркеров для ранней диагностики опухолей и оптимизация лучевой терапии при онкопатологиях. Важным вопросом остается определение профиля экспрессии генов и некодирующих РНК как регуляторов, принимающих участие в опухолевом процессе.

На примере активности гена *NFκB* на восьмой и десятый месяцы после облучения можно рассмотреть механизм его изменений и возможность его использования как раннего показателя опухолеобразования. При анализе активности гена *NFκB* в костном мозге мышей нами показано увеличение его экспрессии на восьмой месяц после облучения. Из литературы известно, что транскрипционный фактор (ТФ) *NFκB* может активироваться двумя различными путями. В отсутствие стрессовых сигналов *NFκB* находится в цитоплазме клетки в связанном состоянии с его ингибитором *IκBα*. Активация *NFκB* связана с деградацией *IκBα* за счет фосфорилирования *IκBα*-киназы в ответ на внешние или внутренние воздействия на клетку, такие как провоспалительные цитокины (напри-

мер, $TNF\alpha$), бактериальные и вирусные агенты, а также ионизирующее излучение (ИИ). В ответ на эти воздействия запускается канонический путь передачи сигналов, в результате которого свободный *NFκB* транслоцируется в ядро, где активирует транскрипцию своих генов-мишеней, в том числе гена *IκBα*. Ингибитор *IκBα* по механизму отрицательной обратной связи тормозит транскрипционный ответ *NFκB*, связываясь с его димерами и удерживая их в цитоплазме. Таким образом, запускается активация адаптивного иммунитета, клеточное деление, воспалительные и опухолевые процессы [18]. Второй путь активации *NFκB* осуществляется через протеинкиназу АКТ. АКТ инициируется в PI3K-сигнальном пути и приводит к клеточному росту, образованию белков теплового шока и делению клеток, а также АКТ способна блокировать процессы апоптоза. Это осуществляется за счет фосфорилирования и последующей транспортировки белка *mdm2* внутрь ядра с последующим блокированием активности P53. С другой стороны, киназа АКТ фосфорилирует белок *ikκ*, что приводит к деградации комплекса *NFκB*–*IκBα* и транслокации *NFκB* в ядро. Функционирование *NFκB*-системы контролируют активные формы кислорода, в частности *iNOS*, которая ассоциирована с оксидативным стрессом и генерацией свободных радикалов, оказывающих генотоксическое воздействие и участвующих в онкогенезе [19].

Показано, что после ИИ в течение 30 мин димеры NFκB (p50 и p65) транслоцируются в ядро, где активируют свои гены – мишени [20].

С другой стороны, деградация комплекса NFκB–IκBα осуществляется в ответ на активацию MAPK-пути под воздействием ИИ и сопровождается последующей инициацией клеточной пролиферации как нормальных, так и опухолевых клеток [21]. Кроме того, активация NFκB-системы в клетках различных типов рака может быть связана с устойчивостью опухолей к радиотерапии [22], а блокирование активности NFκB в различных клеточных линиях включает процессы апоптоза и снижает рост опухоли [23].

Таким образом, основные процессы, возникающие как результат ответа клеток на пролонгированное облучение, были связаны с изменениями NFκB-системы воспалительного ответа и его генов-мишеней – антиапоптотических генов, таких как *IAP1* и *IAP2*, активирующие процессы прогрессии и развития опухолевых клеток и, кроме того, увеличивающие резистентность злокачественных новообразований к терапии.

Подавление NFκB-активности может быть достигнуто за счет сверхэкспрессии его главного регулятора – IκBα, что увеличивает радиочувствительность опухолей при терапии. Однако через десять месяцев после облучения нами выявлено снижение активности гена *NFκB*. Аналогичные результаты изменения экспрессии гена *NFκB* были выявлены при воздействии повреждающей острой дозы (5 Гр) на нормальные лимфоциты человека и клетки линии Jurkat [24]. Пониженная экспрессия гена *NFκB* также наблюдалась и после радиотерапии рака слизистой оболочки рта, что, скорее всего, было связано со снижением активности процессов деления, поскольку NFκB является ТФ для гена *CCND1*, вовлеченного в процессы клеточного цикла [25]. Следовательно, ген *NFκB* может рассматриваться как ранний показатель опухолеобразования.

Кроме того, к десятому месяцу после облучения было показано снижение содержания мРНК гена *PTEN*. Функциональная инактивация *PTEN* может происходить в раковых клетках посредством точечной мутации, делеции гена или эпигенетических механизмов. Мутации гена также могут влиять на рецепторы тирозинкиназы, факторы роста, Ras и субъединицу PI3K p110, что приводит к аномальной сигнальной активности, характерной для опухолевых клеток. Следовательно, многие из генов и белков этого метаболического пути могут быть мишенями при лечении рака. Помимо этого, *PTEN* взаимодействует с *P53* через различные механизмы. Первый из них заключается в ингибировании геном *PTEN* активности *MDM2*, который в нормальных клетках нацелен на деградацию *P53*. Благодаря внешним воздействиям (например, ИИ)

происходит подавление активности *MDM2*, разрушение его связи с *P53*, следствием чего является активация последнего. Второй путь активируется за счет индукции повреждений ДНК, что приводит к накоплению белка p53 и активации транскрипции *PTEN*, который по механизму положительной обратной связи защищает *P53* от деградации [26]. Таким образом, ген *PTEN* имеет важное значение в процессах опухолеобразования и может являться биомаркером этого процесса.

В работах по изучению днРНК и микроРНК показано, что они играют важную роль в инициации и развитии опухолей, а дисрегуляция экспрессии обнаружена в различных типах рака. Наиболее значимые изменения были описаны для днРНК *lncp21*, *NEAT1* и *miR-125b* [27–29].

В наших экспериментах было показано достоверное повышение экспрессии *lncp21* в костном мозге мышей на десятый месяц после облучения в группе “Облучение” и снижение содержания этой днРНК в группе “Облучение + опухоль” ($p < 0.05$).

Известно, что *lncp21* является прямой мишенью гена *P53*, а ее экспрессия понижается при раке желудка. Кроме того, продемонстрирована сверхэкспрессия *lncp21* после ИИ, что приводило к подавлению пролиферации опухолевых клеток желудка и увеличению радиочувствительности злокачественных клеток. Таким образом, *lncp21* проявляла свойства онкосупрессора [27].

Как видно из рис. 2, экспрессия днРНК *NEAT1* в группе “Облучение + опухоль” снижалась по сравнению с контрольной группой. В литературе показана его роль и как онкогена [16, 28], и как онкосупрессора [30].

В отношении микроРНК *miR-125b* нами отмечено снижение ее экспрессии как на восьмой месяц после облучения (в 8.3 раза) в группе “Облучение”, так и на десятый месяц (в 4.3 и 25 раз) в обеих исследуемых группах “Облучение” и “Облучение + опухоль”. Аналогичные данные были получены при исследовании экспрессии *miR-125b* в клетках рака шейки матки [31]. *MiR-125b* является триггером активации NFκB-патологического пути, который запускает процессы клеточной пролиферации, миграции и инвазии за счет воздействия на PI3K/Akt/mTOR патологический путь [29]. Можно полагать, что *miR-125b* также может служить как показатель ответа на действие радиации.

Оценка активности генов и некодирующих РНК обсуждается при разных патологиях человека в качестве показателей ответа на действие радиации. По этой причине предлагается использовать разные генные структуры в качестве ранних биомаркеров развития патологии, в том числе опухолеобразования, а также ответа на терапию. Некоторые авторы предлагают в качестве чувствительных к радиации мишеней микроРНК. МикроРНК репрезентативны при действии облучения. Так, при исследовании

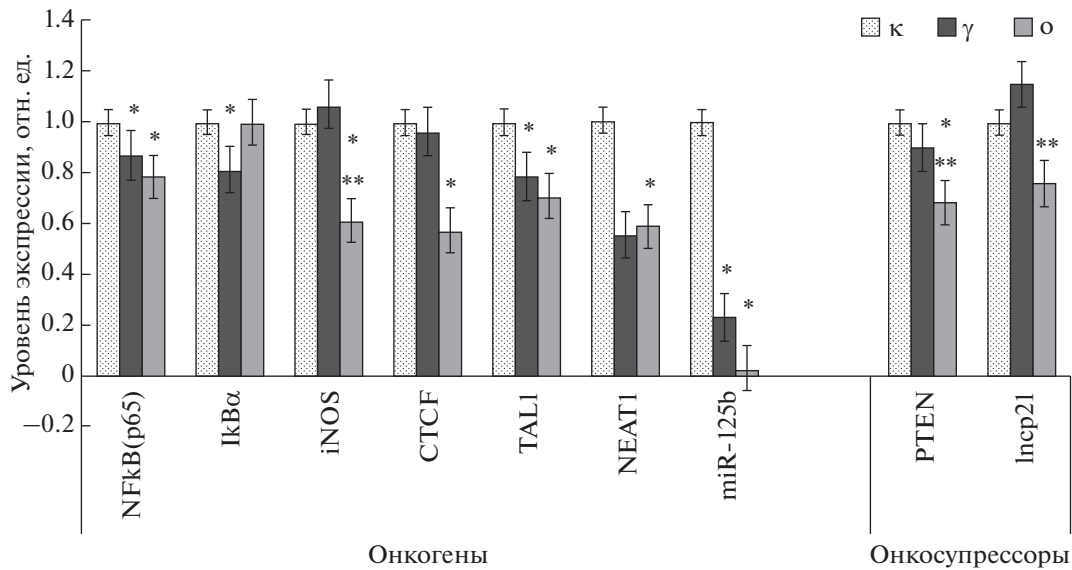


Рис. 3. Содержание мРНК онкогенов и онкосупрессоров (медиана), имеющих статистически значимые различия между изученными группами в костном мозге мышей через десять месяцев после облучения.

довании 576 микроРНК в клетках печени 21 из них могли быть предикторами облучения, что было доказано при использовании девяти разных методов оценки их активности. Преимуществом этих структур является возможность выявления их активности в разных биологических материалах (плазма, слюна, слезы, даже при экстракции из парафинизированных материалов). МикроРНК достаточно стабильны в организме по сравнению с другими молекулами [1].

Другими авторами сделан акцент на днРНК, являющиеся регуляторами генов, поскольку их роль особенно высока в иммунном ответе на радиационное воздействие, что считается главным вкладом в положительные эффекты радиации при разных патологических процессах [10].

Нами использован комплекс генетических структур при анализе изменения экспрессии генов, микроРНК и днРНК как возможных ранних предикторов радиоиндуцированных опухолей.

Исследованные гены и некодирующие РНК были разделены на структуры, обладающие по существу различным представлением онкогенными или супрессорными функциями. На рис. 3 представлены только статистически значимые данные по активности генов, микроРНК и днРНК на десятый месяц после облучения мышей с опухолями и без них.

Суммируя данные по результатам изменения активности исследуемых показателей, можно прийти к выводу о комплексном участии ряда генов, микроРНК и днРНК в радиоиндуцированном опухолеобразовании (рис. 4). За счет активации гена *NFkB* под воздействием ИИ активируются также его гены-мишени (*TNFα*, *G-SCF*, *IAP-1*, *IAP-2*, *IkBα*, *iNOS*, *CTCF*), параллельно с этим происходит по-

давление активности гена *P53* и его мишеней – гена *PTEN* и днРНК *Incp21*. В случае микроРНК *miR-125b* отмечался разнонаправленный эффект. Так, на восьмой месяц после облучения активность гена *NFkB* возрастала, при сниженной активности микроРНК *miR-125b*, проявляющей свойства как онкогена, так и онкосупрессора, однако к десятому месяцу экспрессия гена *NFkB* снижалась, в то время как активность *miR-125b* оставалась пониженной. Такие изменения могут быть связаны не только с ответом клетки на воздействие ИИ, но и с проникновением в костный мозг “онкосом”, выделяемых опухолью.

К восьмому месяцу после облучения 46% онкогенов (6 из 13) проявили свою активность в ответ на действие ИИ (*G-SCF*, *IkBa*, *iNOS*, *NFkB(p50)*, *NFkB(p65)* и *CTCF*) и лишь 31% – подавлялись. Для 60% онкосупрессоров (3 из 5) было характерно ингибирование их экспрессии (*PTEN*, *Incp21*, *miR-125b*). К десятому месяцу после облучения в группе “Опухоль” подавлялись все онкосупрессоры и онкогены (100%). Таким образом, к восьмому месяцу после облучения преобладало число активированных онкогенов, что связано с выходом опухолей к десятому месяцу.

Информация о механизмах действия радиации на генетические структуры может быть использована для создания панели биомаркеров конкретных опухолей. Полученные показатели об изменении генных структур в дальнейшем могут служить мишенью для специфической терапии.

Анализ представленных результатов позволяет сделать предварительный вывод о том, что оценка активности генетических показателей (*NFkB(p65)*, *iNOS*, *CTCF*, *TAL1*, днРНК *Incp21*, *NEAT1* и *miR-*

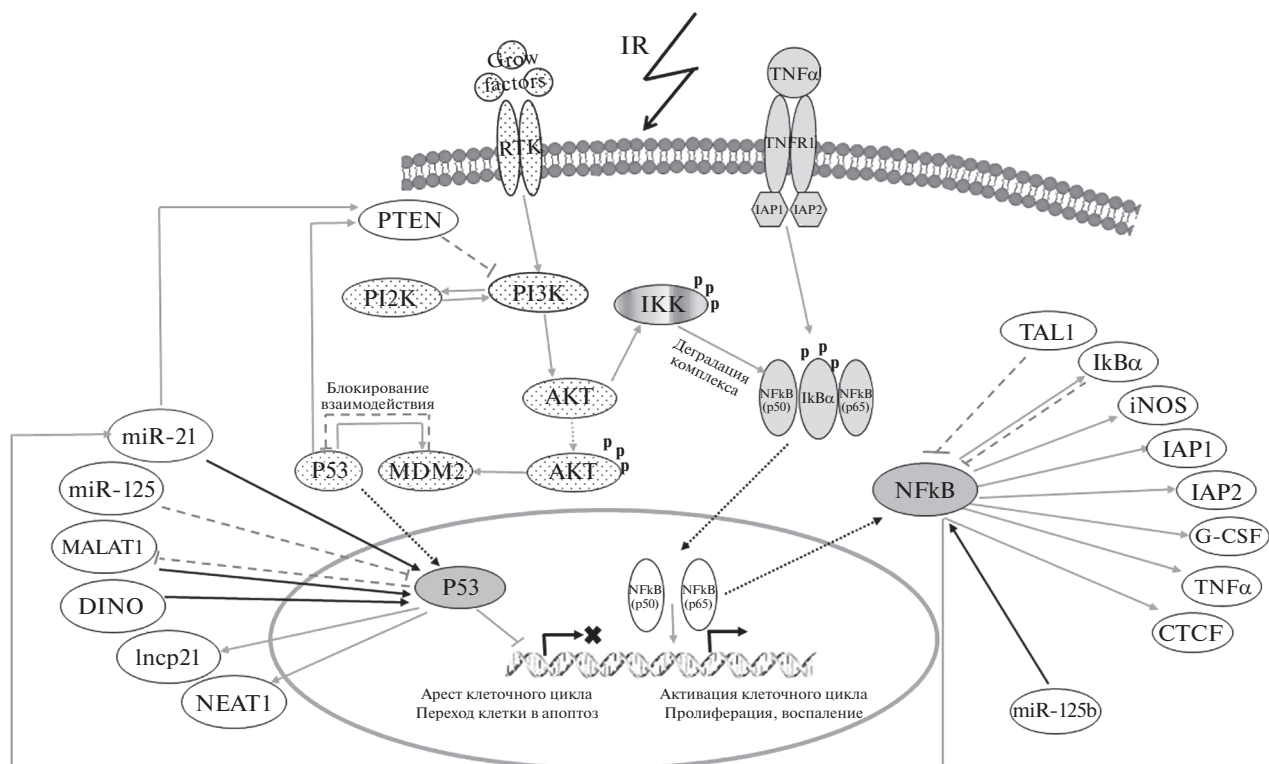


Рис. 4. Формирование патологических путей генов *P53* и *NfκB* при действии радиации в опухолевых клетках. Овалы с черными точками – PI3K-путь, светло-серые – NFκB-путь, серые – активированные гены *P53* и *NfκB*, белые – мишени/активаторы генов *P53* и *NfκB*. p – фосфорилированный продукт. Черные стрелки – пути активации *P53* и *NfκB*, серые стрелки – мишени генов *P53* и *NfκB*, серые штриховые линии – блокирование транскрипции и экспрессии гена, прерывистые линии – активация гена с транслокацией в/из ядра.

125b) может быть использована для раннего прогноза радиоиндуцированного опухолеобразования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы развития ядерной медицины “АО Наука и инновации” ГК Росатом и по теме Института общей генетики им Н.И. Вавилова РАН (госзадание № 0112-2019-0002).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Duale N., Eide D.M., Amberger M.L. et al. Using prediction models to identify miRNA-based markers of low dose rate chronic stress // *Science Total Environment*. 2020. V. 717. № 137068. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137068>
2. Gai C., Camussi F., Broccoletti R. et al. Salivary extracellular vesicle-associated miRNAs as potential biomarkers in oral squamous cell carcinoma // *B.M.C. Cancer*. 2018. V. 18. № 439. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4364-z>
3. Tomasik B., Chalubinska-Fendler J., Chowdhury D., Fendler W. Potential of serum microRNAs as biomarkers of radiation injury and tools for individual of radiotherapy // *Transl. Res*. 2018. V. 201. P. 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.06.001>
4. Wilke C.M., Hess J., Klymenko S.V. et al. Expression of miRNA-26B-5P and its target TRPS1 is associated with radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer // *Int. J. Cancer*. 2018. V. 142. № 3. P. 573–583. <https://doi.org/10.1002/ijc.31072>
5. Melachowska B., Tomasik B., Stawiski K. et al. Circulating microRNA as biomarkers of radiation exposure: A systematic review and meta-analysis // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2020. V. 106. № 2. P. 390–402. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.10.028>
6. Shyu Y.C., Lee T.-L., Lu M.-J. et al. miR-122-mediated translational repression of PEG10 and its suppression in human hepatocellular carcinoma // *J. Transl. Med.* 2016. V. 14. № 200. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0956-z>
7. Zampetaki A., Albrecht A., Steinhilber K. Long non-coding RNA structure and function: Is there a link? // *Front. Physiol.* 2018. V. 9. № 1201. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01201>

8. Gencode V 37 release EMBL-EBI. 2020. URL: <https://www.encodegenes.org/human/stats.html> (дата обращения: 15.03.2021 г.).
9. Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Васильева И.М. и др. Профили экспрессии генов и некодирующих РНК в биоптатах тканей и клетках крови пациентов с разной патологией после радиационного воздействия // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2019. № 1. С. 103–111.
10. Qi Z., Guo S., Li C. et al. Integrative analysis for the roles of lncRNAs in the immune responses of mouse PBMC exposed to low-dose ionizing radiation // Dose-Response. 2020. V. 18. № 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.1177/1559325820913800>
11. O'Leary V.B., Ovsepian S.V., Carrascosa L.G. et al. PARTICLE, A triplex-forming long ncRNA, regulates locus-specific methylation in response to low-dose irradiation // Cell Rep. 2015. V. 11. № 3. P. 474–485. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.043>
12. Bayoumi A.S., Sayed A., Broskova Z. et al. Crosstalk between long noncoding RNAs and microRNAs in health and disease // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. № 3. P. 356. <https://doi.org/10.3390/ijms17030356>
13. Aryankalayil M.J., Chopra S., Levin J. et al. Radiation-induced long noncoding RNAs in a mouse model after whole-body irradiation // Radiat. Res. 2018. V. 189. № 3. P. 251–263. <https://doi.org/10.1667/RR14891.1>
14. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // Methods (San Diego, Calif.). 2001. V. 25. № 4. P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
15. Jiang Y., Jin S., Tan S. et al. Long noncoding RNA NEAT1 regulates radio-sensitivity via microRNA-27b-3p in gastric cancer // Cancer Cell Intern. 2020. V. 20. № 581. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01655-4>
16. Салеева Д.В., Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В. и др. Функционирование регуляторных РНК, влияющих на развитие опухолевых клеток, у больных раком гортани // Патол. физиология и эксперим. терапия. 2018. Т. 62. № 4. С. 67–74. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.04.67-74>
17. Vo D.T., Karanam N.K., Ding L. et al. MiR-125ba-5p functions as tumor suppressor microRNA and is a marker of locoregional recurrence and poor prognosis in head and neck cancer // Neoplasia. 2019. V. 21. № 9. P. 849–862. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2019.06.004>
18. Karin M., Greten F.R. NFkB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression // Nat. Rev. Immunol. 2005. V. 5. № 10. P. 749–759. <https://doi.org/10.1038/nri1703>
19. Simon P.S., Sharman S.K., Lu C. et al. The NF-kB p65 and p50 homodimer cooperate with IRF8 to activate iNOS transcription // В.М.С. Cancer. 2015. V. 15. № 770. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1808-6>
20. Chishti A.A., Baumstark-Khan C., Koch K. et al. Linear energy transfer modulates radiation-induced NF-kappaB activation and expression of its downstream target genes // Radiat. Res. 2018. V. 189. № 4. P. 354–370. <https://doi.org/10.1667/RR14905.1>
21. Suzuki K., Kodama S., Watanabe M. Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells // Cancer Res. 2001. V. 61. № 14. P. 5396–5401.
22. Orlowski R.Z., Baldwin A.S. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer // Trends. Mol. Med. 2002. V. 8. № 8. P. 385–389. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(02\)02375-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(02)02375-4)
23. Tang G., Minemoto Y., Dibling B. et al. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes // Nature. 2001. V. 414. № 6861. P. 313–317. <https://doi.org/10.1038/35104568>
24. Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Раева Н.Ф. и др. Влияние малых доз ионизирующей радиации на экспрессию генов и некодирующих РНК в нормальных и злокачественных клетках человека // Цитология. 2019. Т. 61. № 6. С. 427–438. <https://doi.org/10.1134/S0041377119060051>
25. Sonis S.T. The pathobiology of mucositis // Nat. Rev. Cancer. 2004. V. 4. P. 277–284. <https://doi.org/10.1038/nrc1318>
26. Trotman L.C., Pandolfi P.P. PTEN and p53: Who will get the upper hand? // Cancer Cell. 2003. V. 3. № 2. P. 97–99. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00022-9](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00022-9)
27. Chen L., Yuan D., Yang Y., Ren M. LincRNA-p21 enhances the sensitivity of radiotherapy for gastric cancer by targeting the beta-catenin signaling pathway // J. Cell Biochem. 2018. V. 120. № 4. P. 6178–6187. <https://doi.org/10.1002/jcb.27905>
28. Li S.F., Li J.M., Chen C. et al. Pan-cancer analysis of long non-coding RNA NEAT1 in various cancers // Genes Dis. 2018. V. 5. № 1. P. 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.11.003>
29. Zheng Z., Qu J.-Q., Yi H.-M. et al. MiR-125b regulates proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma by targeting A20/NF-kB signaling pathway // Cell Death & Disease. 2017. V. 8. P. e2855. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.211>
30. Zeng C., Liu S., Lu S. et al. The c-Myc-regulated lncRNA NEAT1 and paraspeckles modulate imatinib-induced apoptosis in CML cells // Mol. Cancer. 2018. V. 17. № 1. P. 130. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0884-z>
31. Pedroza-Torres A., Campos-Parra A.D., Millan-Catalan O. et al. MicroRNA-125 modulates radioresistance through targeting p21 in cervical cancer // Oncol. Rep. 2018. V. 39. № 3. P. 1532–1540. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6219>

Activity of Genes and Non-Coding RNA as an Approach to Early Biomarkers Determination of Radiation-Induced Cancer in Mice

V. F. Mikhailov^{a, †}, D. V. Saleeva^{a, *}, L. M. Rozhdestvensky^a,
L. V. Shulenina^a, N. F. Raeva^a, and G. D. Zasukhina^{a, b}

^aBurnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, 123098 Russia

^bVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: dasha_saleeva@inbox.ru

The activity of genes and non-coding RNAs was studied in 183 hybrid mice (CBA × C57Bl) F₁ after low-power prolonged irradiation (during 21 hours with a dose of 12.6 Gy, with a dose rate of 10 mGy/min). The parameters in the bone marrow of mice at eight and ten months after irradiation were analyzed. After ten months, 14 of the 94 studied animals were found to have radiation-induced lymphomas in the liver, abdominal cavity and subcutaneously. Genetic parameters were divided into two groups: oncogenes and tumor suppressors, the activation of which was compared at eight and ten months after irradiation. We found out, that the activity of tumor suppressors (*PTEN* and *lncp21*) in the groups of mice with tumors was lower in comparison with the group of mice without cancer, while the activity of oncogenes (*NFκB (p65)*, *IκBa*, *iNOS*, *TAL1*, *CTCF*, *lncRNA NEAT1* and *miR-125b*) increased. These parameters can be considered as potential biomarkers of radiation-induced cancer.

Keywords: biomarkers, radiation-induced cancer, long non-coding RNAs, microRNAs.