

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор

Соловьев Алексей Вячеславович

канд. биол. наук, заместитель директора, старший научный сотрудник,

доцент

Баранов Александр Валерьевич

бакалавр биол. наук, младший научный сотрудник

Хамбикова Анастасия Владимировна

бакалавр биол. наук, младший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

ПРОФИЛЬ МИКРОРНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ В АСПЕКТЕ РАЗВИТИЯ ПОДХОДОВ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ МЕЛАНОМЫ

Аннотация: в данной работе авторами рассматривается важная особенность развития меланомы кожи – это слабая ответная реакция организма или её полное отсутствие, из-за чего меланома зачастую стремительно прогрессирует. Основной проблемой диагностики заболевания является отсутствие верифицированных маркеров для своевременного выявления заболевания. В настоящем исследовании представлены первичные результаты анализа профилей 5-ти отобранных микроРНК в образцах плазмы пациентов с диагнозом меланома и здоровых пациентов для выявления потенциальных диагностических биомаркеров.

Ключевые слова: меланома, биомаркеры плазмы, микроРНК.

Меланома кожи многие годы является одной из трудно решаемых проблем онкологии, темп роста которой стремительно растет. Ежегодный прирост заболеваемости по данным Национального института рака (США) составляет 3–5%

в год, то есть больше, чем при других злокачественных опухолях [2; 5; 9]. Важность ранней диагностики данного заболевания обуславливается высокой агрессивностью развития, ранним метастазированием опухоли, поражением большей доли лиц молодого и среднего трудоспособного возраста (около 35% человек в возрасте от 35 до 54 лет) и отсутствием удовлетворительных результатов лечения [1; 13].

Исследования последних десятилетий показали, что важными участниками в контроле многих клеточных процессов являются микроРНК, представляющие собой класс коротких некодирующих РНК. МикроРНК за счет обратимой инактивации или деградации мРНК мишеней могут пост-транскрипционно подавлять экспрессию генов [5]. Изменения профиля экспрессии микроРНК обнаружены при развитии большинства злокачественных опухолей, причем микроРНК могут выступать в роли онкогенов, опухолевых супрессоров и являться драйверами злокачественной трансформации [7].

Внеклеточные опухоль-специфичные микроРНК могут использоваться в качестве биомаркеров, что позволит расширить объём диагностической информации.

Следует отметить, что в различных литературных источниках часто приводятся разрозненные сведения об уровнях экспрессии микроРНК в крови и тканях при меланоме, даются разные предположения об их роли в диагностике заболевания [11]. С нашей точки зрения важным при изучении микроРНК в качестве маркеров меланомы учитывать профиль нескольких типов маркеров одновременно (по крайней мере, трёх).

Перечень исследуемых нами микроРНК обусловлен во многом результатами, отраженным в ранее проведенных исследованиях [8], где показано, что hsa-miR-149-3p; hsa-miR-150-5p; hsa-miR-193a-3p являются наиболее перспективными для выявления заболевания. Дополнительно к списку исследуемых микроРНК нами были отобраны hsa-miR-21-5p и hsa-miR-155-5p.

Так, hsa-miR-21-5p участвует в регуляции уровней PTEN, PDCD4, BTG2 и связана с различными патологическими состояниями организма, развитием онкологии и т. д. Данный тип микроРНК может обнаруживаться в различных внеклеточных жидкостях (плазма, сыворотка и пр.). Повышенная регуляция может способствовать росту опухоли, метастазированию и инвазии, уменьшать чувствительность к химиотерапии. Высокий уровень экспрессии hsa-miR-21-5p является негативным предиктором выживания при различных формах рака.

Молекулы hsa-miR-155 играют важную роль в различных физиологических и патологических процессах. Принимает участие в подавлении вирусных инфекций и роста злокачественных образований и т. д. Ценным является то, что данный тип микроРНК может передаваться посредством экзосом. Высвобождаемые из опухоли экзосомные микроРНК играют решающую роль в перепрограммировании микроокружения опухоли. Также прежде было отмечено, что экзосомная hsa-miR-155 участвует в контроле ангиогенеза при меланоме [14].

МикроРНК hsa-miR-105-5p принимает участие в пролиферации клеток, процессах онкогенеза, инвазиях, механизмах снижения чувствительности к некоторым лекарственным препаратам (при повышении концентрации микроРНК эти процессы подавляются). Данный тип микроРНК ассоциирован с процессами образования и развития злокачественных опухолей [16].

К настоящему времени известно, что hsa-miR-150 связана с RISC (РНК-индуцированный комплекс сайленсинга) посредством РНК-интерференции; выполняются функции в гемопоэза, регуляция генов, которые понижают уровень экспрессии продуктов, принимающих участие в дифференциации стволовых клеток (mirbase.org).

Большую роль в процессе клеточной миграции играет hsa-miR-149-3p [6].

MiR-193a-3p является членом семейства miR-193, экспрессия которого связана с мутационным статусом BRAF в тканях меланомы [15].

Исследование выполнено на базе Научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова».

Материалом для исследования послужили образцы плазмы крови пациентов ГУЗ Областной онкологической диспансер г. Ульяновска, Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» (г. Санкт-Петербург). Образцы венозной крови были собраны от 14 человек, 7 из которых имели подтвержденный диагноз. Информация об обследуемых пациентах представлена в таблице 1.

Таблица 1

Данные об исследуемых группах пациентов

<i>Группа с подтвержденным диагнозом</i>				<i>Контрольная группа</i>		
<i>№</i>	<i>Пол</i>	<i>Возраст</i>	<i>Диагноз</i>	<i>№</i>	<i>Пол</i>	<i>Возраст</i>
П 1	М	69	Меланома кожи	К 1	М	69
П 2	Ж	42	Узловая эпителиоидно-клеточная меланома кожи	К 2	М	59
П 3	Ж	37	Меланома кожи	К 3	Ж	58
П 4	Ж	71	Меланома кожи	К 4	Ж	33
П 5	М	68	Меланома кожи передней брюшной стенки	К 5	М	48
П 6	Ж	45	Меланома кожи левой голени	К 6	Ж	39
П 7	Ж	68	Меланома кожи левой голени	К 7	Ж	39

Забор крови осуществляли в вакуумные пробирки с ЭДТА (более 1 мл). Непосредственно сразу после взятия крови образцы центрифугировали при 4°C в течение 10 минут при 1900 x g. Далее отбирали плазму в стерильные пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл и хранили её при температуре -80°C. Для проведения одного анализа требовалась плазма крови объемом 200 мкл. В качестве экзогенного контроля добавляли синтетическую микроРНК cel-miR-39-3p. Объем контроля составлял 2 мкл 0,05 мкМ раствора на 200 мкл плазмы. Для выделения miRNA из плазмы крови использовали набор mirVana miRNA

Isolation Kit (Ambion / Thermo Scientific). Для проведения обратной транскрипции использовали набор TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали смесь TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific), набор для детекции микроРНК TaqMan™ Advanced miRNA Assay (Thermo Scientific) hsa-miR-21-5p, hsa-miR-149-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-193a-3p. Постановку каждой пробы производили в трех повторностях с расчетом среднего значения. Для всех образцов была выбрана величина порогового значения C_t – 0,1 (программа qPCRsoft 3.0).

Расчет относительного уровня проводился по методу $\Delta\Delta C_t$ [10].

Статистическую обработку данных осуществляли, используя t-критерий Стьюдента, показатели считались значимыми при $p \leq 0,05$.

При анализе полученных данных в группе больных меланомой кожи было идентифицировано 3 из 5 исследуемых микроРНК – hsa-miR-21-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155-5p. Причиной отсутствия детекции hsa-miR-149-3p и hsa-miR-193a-3p может служить их малое содержание, то есть чувствительность тест-системы оказалась не достаточной, либо их полное отсутствие в образцах плазмы крови (таблица 2).

В обеих группах – контрольной и группе пациентов с меланомой - идентифицирована 1 из 5 исследуемых микроРНК – hsa-miR-21-5p. Показатель $\Delta C_{t_{cp}}$ данной микроРНК составил $-4,92 \pm 3,22$ в контрольной группе и $-3,37 \pm 3,11$ у пациентов с меланомой (таблица 2). Широкий разброс значений в обеих группах, высокое стандартное отклонение не позволяют рассматривать данный тип микроРНК в качестве информативной. Вероятно, различия в уровне данной микроРНК, в том числе у обследуемых внутри группы, связаны с другими факторами. Отсутствием детекции hsa-miR-149-3p и hsa-miR-193a-3p может быть связано с их малым содержанием в плазме крови и низкой чувствительностью тест-системы или полным отсутствием данных типов микроРНК в плазме. От-

мечены высокие значения у hsa-miR-150-5p и hsa-miR-155-5p у пациентов с диагнозом меланомы, по сравнению с контрольной группой (таблица 2).

Таблица 2

Показатели микроРНК в исследуемых группах

МикроРНК	Группа с подтвержденным диагнозом		Контрольная группа	
	ΔCt_{cp}	Коэффициент вариации	ΔCt_{cp}	Коэффициент вариации
hsa-miR-21-5p	-3,37±3,11	92,24%	-4,92±3,22	65,44%
hsa-miR-149-3p	не выявлено	-	не выявлено	-
hsa-miR-150-5p	2,23±1,81	81,14%	не выявлено	-
hsa-miR-155-5p	5,99±2,49	41,63%	не выявлено	-
hsa-miR-193a-3p	не выявлено	-	не выявлено	-

Примечания: $p \leq 0,05$ – критерий Стьюдента

Таким образом, было установлено, что особую ценность для диагностики меланомы представляют hsa-miR-150-5p и hsa-miR-155-5p. Данные микроРНК вовсе не были выявлены в плазме в контрольной группе, тогда как относительная концентрация (RQ) относительно экзогенного контроля составила 129,32 и 7,11, соответственно. МикроРНК hsa-miR-149-3p, hsa-miR-193a-3p и hsa-miR-21-5p пока рассматриваются как неинформативные в плане диагностики меланомы. Следует отметить, что предыдущие исследования Фогли с соавторами [8] показали повышение уровня hsa-miR-149-3p у пациентов с меланомой, что не было продемонстрировано нашими исследованиями.

Необходимо проведение дальнейших исследований с большим числом обследуемых, что позволит соотнести профиль отдельных микроРНК с конкретными данными пациентов, в том числе выявить корреляцию профиля микроРНК со стадией заболевания. Перспективным является включение дополнительных микроРНК в перечень исследуемых, а также повышение чувствительности используемой тест-системы.

Список литературы

1. Барчук А.С. Хирургическое лечение меланомы // Практическая онкология. – 2001. – №4. – С. 30–36.
2. Белякова Н.И. Факторы риска и диагностика метастатического поражения регионарных лимфатических узлов у больных меланомой кожи туловища и конечностей / Н.И. Белякова, Э.А. Жаврид, М.С. Абрамович [и др.] // Онкологический журнал. – 2008. – Т. 2, №3. – С. 31–37.
3. Швецова Ю.И. Анализ экспрессии микроРНК при меланоме кожи / Ю.И. Швецова, Н.В. Палкина, М.Б. Аксененко [и др.] // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2014. – Т. 2, №3. – С. 43–46.
4. Almeida, M.I. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers / M.I. Almeida, R.M. Reis, G.A. Calin // Mutation Research. – 2011. – №1–2. – Vol. 717. – P. 1–8.
5. Armstrong, B.K. Cutaneous melanoma / B.K. Armstrong, A. Kricger // Cancer Surveys. – 1994. – Vol. 19–20. – P. 219–240.
6. Silva, B.O. MicroRNA Profiling of the Effect of the Heptapeptide Angiotensin in A549 Lung Tumor Cells Reveals a Role for miRNA149–3p in Cellular Migration Processes / B.O. Silva, K.F. Lima, L.R. Gonçalves, M.B. Silveira Moraes K.C.M. // PLoS One. – 2016. – Vol. 11 (9). e0162094.
7. Farazi, T.A. MicroRNAs in human cancer. / T.A. Farazi, I.H. Jessica, P. Morozov, T. Tuschl // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2013. -Vol. 774. – P. 1–20.
8. Fogli, S. Identification of plasma microRNAs as new potential biomarkers with high diagnostic power in human cutaneous melanoma / S. Fogli, B. Polini, S. Carpi, B. Pardini, A. Naccarati, N. Dubbini, M. Lanza, M.C. Breschli, A. Romanini, P. Nieari // Tumor Biology. – 2017. – P. 1–8.
9. Jemal, A. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2001, with a special feature regarding survival / A. Jemal, L.X. Clegg, E. Ward // Cancer. – 2004. – Vol.101. – P. 3–27.

10. Livak, K.J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – Vol. 25, Is. 4. – P. 402–408.

11. Mitchell, P.S. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection / P.S. Mitchell, R.K. Parkin, E.M. Kroh // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2008. – Vol. 105. – P. 10513–10518

12. Sozzi, G. Potential biomarkers for lung cancer screening / G. Sozzi, M. Boeri // *Translational Lung Cancer Research*. – 2014. Vol. 3, №3. P. 139–148.

13. Varughese, B.E. Genes and signaling pathways affecting the pathogenesis of melanoma / B.E. Varughese, R.S. Tarapore // *Journal of Postdoctoral Research*. – 2013. – Vol. 1. – P. 51–67.

14. Zhou, X. Melanoma cell-secreted exosomal miR-155–5p induce proangiogenic switch of cancer-associated fibroblasts via SOCS1/JAK2/STAT3 signaling pathway / X. Zhou, T. Yan, C. Huang, Z. Xu, L. Wang, E. Jiang, H. Wang, Y. Chen, K. Liu, Z. Shao, Z. Shang // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2018. – Vol. 37. – P.242.

15. Yong, F.L., Law C.W., Wang C.W. Potentiality of a triple microRNA classifier: miR-193a-3p, miR-23a and miR-338–5p for early detection of colorectal cancer / F.L. Yong, C.W. Law, C.W. Wang // *BMC Cancer*. – 2013. – Vol. 13: 280.

16. Zhang, J. MicroRNA-105 inhibits human glioma cell malignancy by directly targeting SUZ12 / J. Zhang, W. Wu, S. Xu, J. Zhang, J. Zhang, Q. Yu, Y. Jiao, Y. Wang, A. Lu, Y. You, J. Zhang, X. Lu // *Tumor Biology*. – 2017. – Vol. 39 (6). – P. 152–167.