

**Л.В. Шуленина¹, В.Ф. Михайлов¹, Е.В. Ледин², Н.Ф. Раева¹,
Г.Д. Засухина³**

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ P53-ЗАВИСИМОЙ СИСТЕМЫ
СОХРАНЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА ПО СОДЕРЖАНИЮ
МИКРОРНК И МРНК В КРОВИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**

L.V. Shulenina¹, V.F. Mikhailov¹, E.V. Ledin², N.F. Raeva¹, G.D. Zasukhina³

**Evaluation of P53-Dependent System of Maintaining the Genome Stability
by Content of MicroRNA and MRNA in Blood of Cancer Patients**

РЕФЕРАТ

Цель: Исследовать содержание зрелых mir125b, mir21, mir34a, mir145, mir 16, let7a, а также мРНК генов P53, MDM2, MDMX, модулирующих активность p53-зависимой системы сохранения стабильности генома, в крови онкологических больных до и после лучевой терапии для оценки прогноза заболевания и выявления наиболее перспективных мишеней для фармакологической коррекции.

Материал и методы: В работе использовали цельную кровь пациентов с диагнозом рак предстательной железы (РПЖ), рак молочной железы (РМЖ), рак головы и шеи (РГШ), полученные до и после курса ЛТ. Контролем служила кровь здоровых доноров. ЛТ проводили на установке «РОКУС» (⁶⁰Co). Суммарная доза облучения за курс лечения составляла около 70 Гр. Содержание зрелых микроРНК и мРНК определяли при помощи количественной обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с ген-специфическими праймерами. Относительная экспрессия рассчитывалась согласно методу $\Delta\Delta C_t$. Статистическая обработка результатов проводилась с применением парного критерия Вилкоксона и непараметрического критерия Манна–Уитни. Данные приведены как медиана и квартили, нормированные к медиане группы «контроль», принятой за 1.

Результаты: В крови у пациентов РПЖ, по сравнению с донорами, выявлена низкая экспрессия MDMX и высокое содержание mir21 и let7a. ЛТ приводила к увеличению mir34a и не влияла на другие показатели. У пациентов РМЖ до ЛТ наблюдали высокие значения mir145, mir21, mir34. Экспрессия MDM2 после ЛТ падала. У больных РГШ обнаруживается существенное превышение уровня mir21, mir145, mir34a относительно контроля, ЛТ приводила к увеличению содержания let7a.

Заключение: Низкая эффективность функционирования P53-зависимой системы поддержания стабильности генома является фактором, обеспечивающим высокую радиорезистентность опухолей. Инактивация p53 в раковых клетках осуществляется за счет мутаций в гене P53, повышения активности его эндогенных ингибиторов MDM2, MDMX и изменения баланса регуляторов системы зрелых mir16, 21, 34, 125, 145. Обнаружено увеличение содержания mir145, mir21, mir34, let7 у пациентов с новообразованиями. Предполагается, что изменения экспрессии этих показателей в периферической крови онкобольных могут иметь информационную значимость для оценки эффективности лечения и разработки фармакологических средств коррективки p53-зависимой системы.

Ключевые слова: лучевая терапия, онкологические больные, стабильность генома, p53-зависимая система сохранения, mir125b, mir21, mir34a, mir145, mir16, let7a, таргетные препараты

ABSTRACT

Purpose: To explore the content of mature mir125b, mir21, mir34a, mir145, let7a, mir16 and mRNA of P53, MDM2, MDMX genes, modulating activity of p53-dependent system of maintaining the genome stability in blood of cancer patients before and after radiotherapy for evaluation of disease prognosis and identification of the most promising targets for pharmacological correction.

Material and methods: We used the whole blood of patients with prostate cancer, breast cancer, head and neck cancer which was received before and after radiation therapy. The control was the blood of healthy donors. Radiation therapy was carried out on the equipment ROCUS (⁶⁰Co). The total dose of irradiation was about 70 Gy. The content of the mature microRNA and mRNA was determined using the quantitative reverse-transcription real-time PCR with gene-specific primers. Relative expression was calculated according to the method $\Delta\Delta C_t$. Statistical analysis of the results was carried out by the Mann–Whitney and Wilcoxon tests. Data are presented as median and quartiles, normalized to median of control group accepted as 1.

Results: The low expression of MDMX and high content of both mir21 and let7a were found in the blood of prostate cancer patients in comparison with blood of donors. Radiotherapy increased mir34a, but did not influence on another indicators. The breast cancer patients have high level mir145, mir21 and mir 34a before radiotherapy. Expression of MDM2 after radiotherapy declined in blood of these persons. The patients with head and neck cancer revealed significantly high level of mir21, mir145, mir34a and radiotherapy caused an extension of let7a.

Conclusion: The low efficiency of functioning P53- dependent system, maintaining the genome stability is the precondition factor of tumors' high radioresistance. Inactivation of p53 in cancer cells is due to mutations in the p53 gene, increased activity of the endogenous inhibitors of MDM2, MDMX and balance of mature mir16, 21, 34, 125, 145. It was found the increase of mir145, mir21, mir34a, and let7a content in blood of oncologic patients. It is presumed that the changes of expression these indicators support the information about the effectivity of therapy and for development of p53-dependent-system-drugs.

Key words: radiotherapy, cancer patients, genome stability, p53-dependent system maintaining mir125b, mir21, mir34a, mir145, mir16, let7a, targeted compounds

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва. E-mail: shulenina2010@mail.ru
² Лечебно-реабилитационный центр Минздрава России, Москва
³ Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, Москва

¹ A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, Moscow, Russia. E-mail: shulenina2010@mail.ru
² Treatment-and-rehabilitation Center of Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia
³ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Введение

В настоящее время ведущими средствами при лечении онкологических заболеваний являются хирургическое вмешательство и комбинированное применение химио- и лучевой терапии. Однако высокая токсичность применяемых химиопрепаратов, не обнаруживаемые при клиническом обследовании пациентов отдаленные метастазы, а также развитие вторичных опухолей после лечения требует совершенствования схем оказания медицинской помощи. В частности, ведется поиск средств, позволяющих усилить действие лучевой и химиотерапии [1].

Остается актуальным и создание ранних диагностических маркеров онкозаболевания и маркеров оценки эффективности лечения.

При всем разнообразии нарушений экспрессии генов и эпигенетических изменений при онкотрансформации важнейшими являются сбои функционирования систем, отвечающих за сохранение стабильности генома, пролиферацию клеток и их инвазию. Проявление нестабильности генома является специфическим признаком, присущим раковым клеткам. P53 —зависимая система является основной системой противодействия развитию этого состояния. В нормальных клетках p53 играет центральную роль в регуляции клеточного цикла, апоптоза, репарации ДНК [2]. Транскрипционный фактор p53 в ответ на генотоксическое воздействие накапливается в ядре, регулируя экспрессию генов-мишеней и активацию/инактивацию различных путей для поддержания клеточного гомеостаза, и, в первую очередь, сохранения целостности генома [3–5]. Среди обширного набора механизмов, используемых раковыми клетками для выживания, инактивация p53 — одна из наиболее частых и эффективных стратегий. P53-сигнальный путь находится в неактивном состоянии и является определяющим фактором развития почти всех видов рака человека. Непосредственными причинами инактивации этой сигнальной системы являются мутации в гене P53 [6]. Показано, что ген P53 поврежден в более 50 % всех опухолей, в частности, 20–30 % опухолей молочной железы, 3–42 % предстательной железы и 30–70 % опухолей головы и шеи несут либо точечные мутации, либо делеции P53. Другим механизмом, регулирующим активность онкосупрессора p53, является его взаимодействие с убиквитин-зависимой E3-лигазой mdm2 и её структурным гомологом mdmX [7, 8]. Обнаружено, что функциональный уровень p53 в клетке в нормальных условиях находится под контролем этих белков, определяющих либо протеосомную деградацию p53, либо ингибирование активности p53. Наконец, в последние годы интенсивно изучается возможность изменения функционирования p53-сигнального пути в опухолевых клетках

при помощи микроРНК. МикроРНК — класс малых (18–24 пн) не кодирующих белки РНК, которые включены в регуляцию экспрессии генов-мишеней на посттранскрипционном уровне. МикроРНК могут ковалентно связываться с комплементарными последовательностями 3'-UTR-региона мРНК и репрессировать трансляцию, а могут взаимодействовать с белковыми факторами и обеспечивать стабильность мРНК. МикроРНК управляет многими биологическими процессами, в том числе принимают прямое участие в онкогенезе [9]. Гены микроРНК часто расположены на хрупких геномных участках, нарушение которых наблюдается в раковых клетках при развитии геномной нестабильности [10, 11].

Показано, что miR125b связывается с мРНК гена P53, ингибирует экспрессию этого белка. К числу микроРНК, осуществляющих под влиянием активированного p53 остановку клеточного цикла и индукцию апоптоза, относятся такие микроРНК как miR16, miR34a, miR145 [12, 13]. В роли антогониста действия p53 на эти процессы выступает miR21. В периферической крови микроРНК находятся не только в клетках, но и в составе экзосом, выделяющихся из клеток опухолей [14]. Поэтому микроРНК, выделенные опухолью в периферическую кровь либо в плазму крови, способны быть биомаркерами для обнаружения онкотрансформации и для прогноза эффективности лечения.

Установлено, что опухоли имеют менее инвазивный фенотип после восстановления p53 [15–17]. В настоящее время ведется поиск лечебных средств, приводящих к активации p53-сигнального пути, как одной из перспективных терапевтических стратегий для борьбы с раком. Синтезированы препараты, способные восстанавливать работу инактивированного онкосупрессора p53 при наличии мутаций в кодирующей последовательности [18]. Ингибитор mdm2 — препарат Nutlin-3 прошел стадию клинических испытаний для лечения ретинобластомы [19]. Найдены и ингибиторы молекулы mdmX [20], которые также обладают антиканцерогенным действием. Получены искусственные аналоги онкосупрессорных микроРНК и так называемые «антиМИРы». Разрабатываются способы доставки этих соединений в злокачественные клетки. Многие препараты показали свою перспективность на стадии экспериментальных исследований, некоторые уже готовы к клиническим испытаниям, а часть из них уже прошла их. Очевидно, что при выявлении в опухолях мутаций в гене P53, активации генов, кодирующих ингибиторы этого онкосупрессора, либо наличия дисбаланса содержания зрелых микроРНК, модулирующих работу p53-сигнального пути, необходимы корректирующие воздействия, восстанавливающие систему сохранения стабильности генома. Актуален вопрос о возмож-

ности идентификации нарушений содержания ключевых молекул p53-зависимой системы сохранения стабильности генома при анализе более доступной, по сравнению с опухолями, периферической крови онкологических больных.

Поэтому представляет интерес оценить информационную значимость определения содержания в периферической крови зрелых микроРНК (let7a, mir16, mir21, mir34a, mir125b, mir145) и мРНК генов P53, MDM2, MDMX у онкологических больных, как показателей функционирования p53-зависимой системы сохранения стабильности генома до и после лучевой терапии, что в дальнейшем может помочь в изучении механизмов радиорезистентности опухолей и последующего тестирования таргетных препаратов.

Материал и методы

Объектом исследования явились образцы крови от 61 пациента с различными онкологическими заболеваниями. 33 пациентам был поставлен диагноз рак предстательной железы с классификацией от T₁N₀M₀ до T₃N₀M₀, 15 пациентам — рак молочной железы от T₁N₀M₀ до T₄N₁M₀, 13 пациентам — рак в области головы и шеи, включающими новообразования носоглотки, гортани, языка и верхнечелюстной пазухи. Больные находились на стационарном лечении в радиотерапевтическом отделении Главного военного клинического госпиталя им.Н.Н. Бурденко в 2010–2011 гг. Дистанционная лучевая терапия проводилась на гамма-терапевтической установке «РОКУС» (источник радионуклид ⁶⁰Co) по стандартным лечебным протоколам. Суммарная очаговая доза за курс лечения составляла около 70 Гр. Взятие крови у пациентов осуществляли дважды: до проведения ЛТ и после ЛТ при выписке больного.

Выделение тотальной РНК проводили тризольным методом с использованием набора Trizol RNA Prep 100 (ООО «Лаборатория Изоген») в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Синтез комплементарной ДНК (кДНК) для генов P53, MDM2, MDMX на выделенной РНК проводили с помощью набора реагентов для реакции обратной транскрипции GenePak RT Core (ООО «Лаборатория Изоген»), содержащего обратную транскриптазу M-MLV, ингибитор РНК-аз RNasin, случайные гекса- и нанонуклеотидные праймеры, дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированную буферную систему.

Суммарная РНК содержала фракцию зрелых микроРНК, которая добавлялась в реакцию обратной транскрипции с использованием готового набора GenePak RT Core (ООО «Лаборатория Изоген»), не содержащего случайные гексамеры, но со специфическими stem-loop-праймерами (НПФ «Литех»

к miR21, mir34a, mir125b, mir145, mir16, let-7a. Обратную транскрипцию осуществляли на амплификаторе «Терцик» (НПФ «ДНК-технология») в следующих условиях: 16 °С/30 мин, 42 °С/30 мин и 85 °С/5 мин. Для оценки специфичности синтеза первой цепи кДНК были использованы отрицательные контроли, не содержащие РНК.

ПЦР в реальном времени осуществляли на амплификаторе DTprime 5M3 (НПО «ДНК-Технология») в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green (Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) или специфического TaqMan-зонда (ООО «ДНК-синтез»). Олигонуклеотидная последовательность праймеров и зондов для человека, а также температурный профиль ПЦР были взяты из зарубежных работ и адаптированы к нашим условиям. Полученные данные анализировали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета статистических программ STATISTICA 6.0 и включала в себя определение медианы и интерквартильного размаха. Каждая ПЦР проводилась не менее двух раз, для оценки достоверности различий применялись непараметрический критерий Манна–Уитни, либо парный критерий Вилкоксона. Значения медианы в контрольной группе были приняты за 1, а значения медианы в исследуемых группах показывали во сколько раз уровень экспрессии гена выше или ниже по отношению к контрольной группе.

Результаты и обсуждение

Поиск в биологических жидкостях маркеров, позволяющих оценить риск развития онкотрансформации, эффективность лечения и прогноз заболевания, ведётся уже в течение нескольких десятилетий. В последние годы для решения этих задач используются современные геномные и постгеномные технологии. В опухолевых клетках и крови определены многие показатели, имеющие отношение к p53-зависимой системе сохранения клеточного гомеостаза. Ниже анализируются данные, полученные в этих исследованиях, которые сопоставляются с изученным нами в крови комплексом молекул, характеризующим активность p53 у больных РПЖ, РМЖ и РГШ, и оценивается их информационная значимость.

Известно, что свободные опухолевые клетки могут обнаруживаться в периферической крови у пациентов с различными онкологическими заболеваниями и являться источником, пригодным для обнаружения мутаций в P53 гене опухолей. Кроме того, в плазме крови циркулирует небольшое количество свободной ДНК, которое увеличивается в присутствии злокачественных новообразований. Показано,

что теоретически этот материал пригоден для обнаружения мутаций в опухолях [21, 22]. В нескольких клинических исследованиях обнаружено, что мутации, выявленные в опухолях, могут также быть определены в циркулирующей ДНК плазмы [23, 24]. Однако возможность определения мутаций в гене P53 в опухолевых клетках при изучении периферической крови, а не новообразований, является проблематичной. Так, при исследовании периферической крови у не имевших онкологических заболеваний лиц, подвергавшихся действию различных генотоксических факторов, включая систематическое курение, обнаружены мутации в «горячих точках» генов P53 и Ras [25]. По-видимому, эти данные свидетельствуют о снижении эффективности функционирования p53-зависимой системы сохранения генома и могут быть использованы для формирования групп риска [26]. Поэтому обнаружение мутации в гене P53 в периферической крови явно недостаточно для заключения о наличии опухолей с мутациями в P53 и для основанных на этих данных рекомендаций к применению препаратов, восстанавливающих функции мутантного онкосупрессора в опухолевых клетках. Очевидна необходимость исследования биоптата. В России общество онкологов-химиотерапевтов (RUSSCO) с 2012 г. развивает крупный лабораторный проект по определению мутаций в генах, являющихся мишенями для уже созданных препаратов у онкологических больных. Тестирование гистологического блока, полученного из клиники, в созданной сети сертифици-

рованных лабораторий помогает определить, какие именно таргетные препараты необходимы больным.

Как ранее было указано, другим механизмом, регулирующим активность онкосупрессора p53, является его взаимодействие с ингибиторами mdm2 и mdmX (рис. 1А). Mdm2 и mdmX связываются с p53 и препятствуют его активации. Mdm2 при низкой концентрации в клетке выводит p53 из ядра в цитоплазму, а при высокой — способствует протеосомной деградации. Увеличение содержания белка p53 приводит к усилению транскрипции гена MDM2. Таким образом, mdm2 необходим для поддержания низкого уровня p53 в клетке. Время жизни mdm2 мало и сопоставимо с временем жизни p53. MdmX обладает большим временем жизни, также препятствует активности p53, но не способствует разрушению онкосупрессора. Наоборот, вступая во взаимодействие с Mdm2, MdmX защищает онкосупрессор от деградации. В связи с этим важно отношение содержания Mdm2 и MdmX. При высокой величине значений отношения Mdm2 / MdmX p53-зависимая система поддержания стабильности генома обладает низкой активностью, при низком соотношении способна эффективно реагировать на действие генотоксических факторов из-за накопления p53 [27]. В онкотрансформированных клетках при высокой активности сигнальных путей ростовых факторов через тирозинкиназные рецепторы и Ras усиливается транскрипционная активность гена MDM2 [28]. Это приводит к увеличению мРНК и белка Mdm2 и снижается активность онкосупрессора p53.

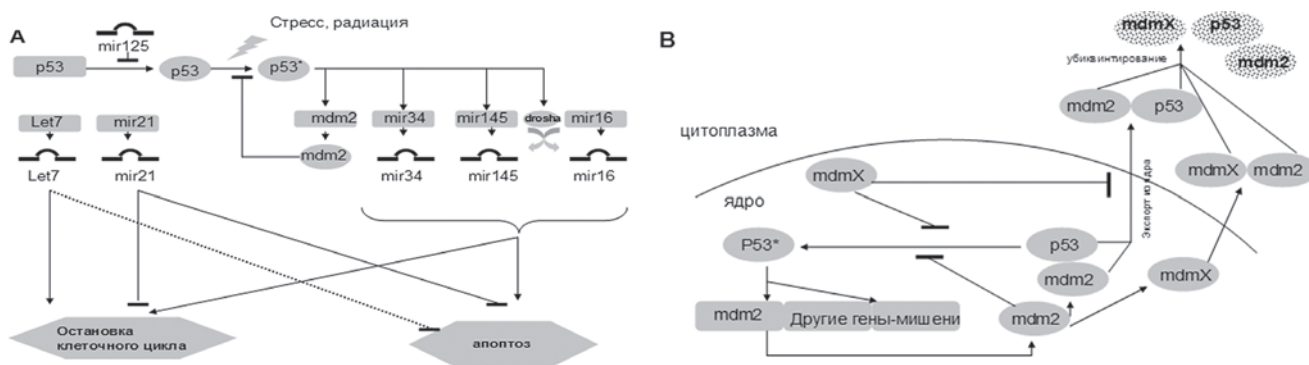


Рис. 1. Упрощенная схема регуляции функциональной активности p53 с помощью микроРНК (А) и mdm2/mdmX-белкового комплекса (В).

□ — ген; ○ — белок; ● — деградированный белок; —| — зрелая микроРНК; → — активация процесса; —| — ингибирование процесса; ...| — ингибирование при высоком содержании; p53* — активный p53

мРНК в крови находятся либо в циркулирующих клетках, либо в плазме в составе экзосом, которые защищают РНК от деградации. Установлено, что различные клетки способны продуцировать экзосомы. К их числу относятся ретикулоциты [29], В и Т лимфоциты [30, 31], эпителиальные клетки [32] и, конечно, клетки опухолей [33].

Из литературы известно, что микроРНК в плазме крови может находиться не только в экзосомах, но и в комплексе с белками Ago2 и липопротеидами высокой плотности HDL [34,35]. Таким образом, определяемая в крови микроРНК несет информацию о состоянии не только циркулирующих клеток, но и клеток опухолей, активно продуцирующих эти сигнальные молекулы, что позволяет надеяться на использование получаемых результатов в качестве показателей онкотрансформации, прогноза и эффективности лечения. На рис. 1В схематично представлено место изученных нами микроРНК в регуляции активности p53-зависимой системе сохранения стабильности генома.

Анализ периферической крови позволил установить, что мРНК могут быть информативны для характеристики опухолей у онкологических больных. Исследование полного транскриптома, состоящего из 1800 мРНК, обнаруживаемых в сыворотке, либо в плазме периферической крови здоровых доноров и онкобольных, показало, что наборы мРНК генов могут быть маркерами заболеваний [36]. Из-за многофакторного характера онкогенеза и индивидуальных различий в качестве наиболее перспективного подхода авторами предлагалось использование панели биомаркеров для получения диагностической и прогностической информации. В проведенных исследованиях показана возможность определения стадий заболевания, начиная с T₁N₀M₀, с возможностью прогноза плоскоклеточного рака гортани. При этом чувствительность и специфичность комбинации маркеров составила 84 %.

Установлено высокое содержание мРНК гена MDM2 в опухолях молочной и предстательной желез [37]. По литературным данным известно, что гиперэкспрессия mdm2 в опухолях является показателем плохого прогноза [38]. Однако при исследовании содержания мРНК гена MDM2 в периферической крови 52 больных раком молочной железы не было выявлено отличий от уровня мРНК этого же гена у здоровых доноров [39]. Следовательно, определение мРНК гена MDM2 в крови не коррелировало с высокими величинами этой мРНК в опухолях.

Содержание мРНК генов P53, MDM2 и MDMX, а также микроРНК в крови у пациентов с диагнозом РМЖ, РПЖ и РГШ, определённые нами, представлено в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что медиана содержания мРНК гена MDM2 в периферической крови пациентов РПЖ, РМЖ и РГШ до ЛТ не отличалась от уровня, наблюдаемого у здоровых доноров. Выявлено существенное снижение медианы содержания мРНК MDMX и увеличение отношения MDM2/MDMX у пациентов с РПЖ как до, так и после ЛТ. Однако вопрос о том, какую информацию может нести снижение MDMX в крови, еще предстоит выяснить. Получение информации об экспрессии mdm2/mdmX неинвазивными методами чрезвычайно важно, поскольку показано, что ингибирование экспрессии MDM2 приводит к антиканцерогенному эффекту и усиливает действие химиотерапии независимо от того, имели ли опухолевые клетки ген P53 дикого или мутантного типа, либо ген P53 отсутствовал [40]. Найдено, что механизмом антиканцерогенного действия препарата XI-011 является ингибирование промотора гена MDMX, которое приводит к уменьшению синтеза мРНК гена MDMX, снижению уровня белка mdmX и активации p53 [41].

Mir125b соединяется с мРНК гена P53 и инактивирует её, а зрелая mir21 противодействует остановке клеточного цикла, защищает клетки от апоптоза и стимулирует пролиферацию. Остальные изученные нами микроРНК могут проявлять свойства онкосупрессоров. Mir16, mir 34, mir145 являются мишенями для транскрипционного фактора p53, и их зрелые микроРНК способствуют остановке клеточного цикла и индукции апоптоза. Let7 активируют процессы дифференцировки клеток.

Наш анализ изменений микроРНК показывает, что в периферической крови у онкологических больных ещё до проведения ЛТ обнаруживается существенное увеличение количества let7a (РПЖ и РГШ), mir21(РПЖ, РМЖ и РГШ), mir145 (РМЖ и РГШ), mir34a (РМЖ и РГШ) по сравнению с контролем. Литературные данные свидетельствуют о том, что в периферической крови при РПЖ, РМЖ и РГШ может наблюдаться увеличение содержания зрелой let7a [42]. В сыворотке крови у больных РМЖ обнаруживается высокий уровень mir21 и mir34a [43]. У больных РГШ и РПЖ в плазме отмечено увеличение содержания mir21[42,44]. Таким образом, полученные нами результаты по содержанию микроРНК в крови у онкологических больных в целом не противоречат исследованиям других авторов. Важно, что изменение содержания исследованных нами микроРНК, связанных с функционированием p53-зависимой системы поддержания стабильности генома, у больных РПЖ, РГШ и РМЖ различалось. Высокое содержание mir21 у всех онкологических больных свидетельствует о стимуляции пролиферации, с одной стороны, и повышении радиорезистент-

Таблица 1

Уровень мРНК генов P53, MDM2, MDMX и содержания зрелых микроРНК mir21, mir34a, mir125b, mir145, mir16, let-7a в крови онкологических больных с диагнозом рак предстательной железы (РПЖ), рак молочной железы (РМЖ) и рак головы и шеи (РГШ) до и после проведения дистанционной лучевой-терапии

Показатель	РПЖ		РМЖ		РГШ	
	До лучевой терапии	После лучевой терапии	До лучевой терапии	После лучевой терапии	До лучевой терапии	После лучевой терапии
P53	1,6	2,25*	1,5	1,03	1,22	1,5
MDM2	1,03	0,68	1,23	0,35*	0,81	0,93
MDMX	0,09*	0,07*	0,737	0,737	1,11	0,90
MDM2/ MDMX	11,44*	9,7*	1,67	0,47*	0,73	1,03
Let7a	133,23*	216,43*	1,32	2,00	181,02*	724,08*,**
Mir21	13,96*	24,25*	34,3*	21,1*	73,73*	17,76*
Mir16	0,63	0,93	3,24	1,07	2,13	1,74
Mir34a	0,97	6,5*, **	26,20*	24,25*	12,13*	3,29*
Mir125b	1,04	0,94	0,66	0,93	0,59	0,87
Mir145	1,14	4,9	9,85*	10,56*	8,0*	7,46*

Примечание:

Значения нормированы к медиане группы «контроль», принятой за 1,0.

* — отличия от контроля статистически значимы $p < 0,05$.

** — отличия между группами «до лучевой терапии» и «после лучевой терапии» статистически значимы $p < 0,05$

ности опухолей к действию генотоксических факторов, с другой.

Известно, что микроРНК let7a ингибирует экспрессию генов Ras и Muc, снижает пролиферативные процессы и способствует дифференцировке. В опухолевых клетках уровень let7a понижен [45]. Однако ряд исследователей показывает, что часто в опухолях, особенно в процессе лечения, возникает значительное увеличение содержания let7a, не способствующего гибели злокачественных клеток. Оказалось, что при высокой концентрации let7a блокирует экспрессию белка каспазы 3, приводит к подавлению апоптоза и таким образом защищает новообразование от генотоксического действия лекарств [46]. Возможно, что химиотерапия приводила к гибели чувствительных клеток. В результате преобладающими в опухоли становились потомки сохранившихся резистентных стволовых опухолевых клеток, которые эпигенетически отличались высокой экспрессией let7a. Поэтому, в случае очень высокого содержания микроРНК let7a в опухолях необходима коррекция и снижение её уровня. В нашем исследовании значительное превышение уровня let7a наблюдалось у больных РГШ и РПЖ.

Увеличение содержания mir145 приводит к ингибированию пролиферативных процессов и инвазии [47]. В непролиферирующих клетках даже при отсутствии дифференцировки уровень mir145 увеличен [48]. Для пациентов с диагнозом рак прямой кишки

наблюдается снижение количества mir145 в опухолевых клетках. Ингибирование экспрессии mir145 увеличивает пролиферацию клеток рака молочной железы, их миграцию и инвазию. Введение синтетического mir145 в этом случае имело выраженный терапевтический эффект [49]. Результаты нашей работы демонстрируют высокий уровень mir145 в крови у больных РМЖ и РГШ до ЛТ. Возможно, этот рост содержания был обусловлен проведением химиотерапии. Необходимы дальнейшие детальные исследования изменений молекулярных механизмов действия mir145 в опухолях для оценки возможности влияния на этот показатель с целью коррекции функционирования системы сохранения стабильности генома в раковых клетках.

Mir16 участвует в регуляции процессов пролиферации и апоптоза. Эффект зависит от типа клеток. Так, в раковых клетках человека аденокарциномы линии A549 и линии SW480, молочной железы линии MCF-7, HeLa, почек линии НЕК-293 mir16 подавлял экспрессию одного из ключевых в пролиферативных процессах MAP7 гена (microtubule-associated protein 7), а увеличение этой зрелой микроРНК приводило к терапевтическому эффекту [50]. В нашем случае у всех пациентов содержание mir16 не отличалось от уровня нормы как до, так и после проведения лучевой терапии.

Содержание mir34 в клетках определяется активностью онкосупрессора p53 [51]. В большинстве ра-

ковых клеток наблюдается дефицит этой микроРНК [52]. Показано, что при достижении необходимого уровня miR34a в раковых клетках подавляются такие процессы, как неконтролируемая пролиферация, метастазирование, химио- и радиорезистентность. В настоящее время подготовлен липосомный препарат и проведены его исследования на клеточном уровне и на животных с гепатоцеллюлярной карциномой, доказавшие его противораковую эффективность и позволяющие проводить его клинические испытания [53]. Однако следует учитывать результаты других работ, в которых показано, что у больных РМЖ очень высокое содержание miR34 в крови не было обусловлено клетками крови и указывало на прогрессию канцерогенеза, наличие метастазов [43]. Более того, установлено, что высокая экспрессия miR34a наблюдается во многих типах злокачественных клеток [54]. Полученное в нашем исследовании увеличение уровня miR34a у больных РМЖ и РГШ до лечения может иметь двоякий характер. Поэтому для использования липосомного miR-34 препарата в клинической практике также необходимы четкие критерии показаний к его применению, основанные на данных маркеров, характеризующих индивидуальное состояние p53-зависимой системы сохранения стабильности генома у пациента.

Mir125b может выполнять функцию как онкогена, так супрессора опухолей. Обнаружено, что при раке яичников, мочевого пузыря, меланоме, молочной железы miR125b понижен, в то время как при раке предстательной и поджелудочной желез сверхэкспрессия miR125b способствует пролиферации и инвазии клеток [55]. Tang et al. показали, что miR125b стимулирует метастазы раковых клеток молочной железы [56]. В проведенных нами экспериментах изменений количества miR125b не наблюдалось для групп РПЖ, РМЖ и РГШ как до, так и после лечения по сравнению с контрольной группой. Таким образом, полученные результаты исследования miR125b в крови у пациентов РМЖ, РПЖ и РГШ не позволяют оценить перспектив использования этого показателя.

Многочисленные работы посвящены исследованию экспрессию микроРНК после воздействия радиации. В большинстве из них оценивали содержание различных микроРНК через 0–24 ч после воздействия ионизирующего излучения в дозе от 0,1 до 40 Гр [12]. Известно, что экспрессия исследованных нами микроРНК также изменяется после радиационного воздействия. Увеличивается содержание miR 34a в ответ на радиационное повреждение ДНК. Показано, что let7a обычно подавлен при облучении, но его сверхэкспрессия может увеличивать радиочувствительность *in vivo* в различных опухолях [57]. После облучения экспрессия miR21 обычно повыше-

на, инактивация этой микроРНК способствует радиационно-индуцированному апоптозу [58].

В этой работе определяли экспрессию микроРНК, модулирующие активность p53, в периферической крови онкологических больных до и после полного курса ЛТ. Показано, что ЛТ приводит к достоверному увеличению содержания зрелой let7a у больных РГШ и miR34 — у больных РПЖ. Эти данные на сегодняшний день могут говорить пока только о различиях в функционировании p53-системы у пациентов в зависимости от вида заболевания, от схемы лучевой терапии. Поэтому при проведении ЛТ необходим строгий контроль p53-зависимой системы сохранения стабильности генома, предусматривающий возможность различной фармакологической коррекции с учетом изменений микроРНК.

Понятно, что для восстановления сбалансированного функционирования системы сохранения генома у больных РМЖ, РГШ и РПЖ необходимы различные схемы воздействия, затрагивающие различные виды микроРНК.

Синтезирован комплекс соединений, способных восстановить полноценное функционирование p53 зависимой системы сохранения стабильности генома в клетках. Низкомолекулярные молекулы MI-319, TDP66-5759, RITA ингибируют активность MDM2, SJI72550 инактивирует MDMX, а пептиды CP-3139, WR 1065, PRIMA-1/MIRA-1, Phikan083, SCH529074 действуют только на клетки с мутантным геном P53, поскольку связываясь с дефектным онкосупрессором они восстанавливают его функции [18]. Однако для их применения необходима разработка адресной доставки препаратов к раковым клеткам и выявление доступных маркеров, способных определять гены-мишени для терапии. Для восстановления нормальной активности p53-зависимой системы сохранения стабильности генома, изучение мутаций p53, экспрессии MDM2, MDMX и содержания микроРНК, модулирующих работу этой системы, является обоснованным. Поэтому практическая ценность определения зрелых микроРНК mir21, miR34a, miR125b, miR145, miR16, let7a и других показателей состояния p53-зависимой системы сохранения стабильности генома в периферической крови несомненна. Необходимы дальнейшие исследования механизмов взаимодействия перечисленных соединений в модельных экспериментах на различных клеточных линиях, животных, а также в клинике, используя периферическую кровь и биоптаты опухолей для выявления показателей, характеризующих мутации в генах p53-зависимой системы поддержания стабильности генома и функциональной регуляции p53.

Заключение

Низкая эффективность функционирования Р53-зависимой системы поддержания стабильности генома является одним из факторов, обеспечивающих высокую радиорезистентность опухолей. Инактивация р53 в раковых клетках осуществляется за счет мутаций в гене р53, повышения активности его эндогенных ингибиторов mdm2, mdmX и изменения баланса регуляторов системы: зрелых микроРНК mir16, 21, 34, 125, 145, let7 и других. Применение средств, нормализующих активность системы сохранения генома в трансформированных клетках, способно усилить действие химиотерапии и ЛТ. МикроРНК и мРНК в периферической крови несут информацию о циркулирующих клетках и о клетках опухолей, активно продуцирующих эти сигнальные молекулы в составе экзосом, что позволяет надеяться на использование получаемых результатов в качестве показателей онкотрансформации, прогноза и эффективности лечения. В изученной нами системе р53-зависимого клеточного ответа получено увеличение содержания mir145, mir34a, mir21 и let7a в периферической крови пациентов с РГШ, РПЖ и РМЖ по сравнению с донорами, в то время как ЛТ приводила к увеличению let7a в крови только у больных РГШ, а mir34a — только у больных РПЖ. Обнаружено отсутствие изменений в количестве mir16 и mir125b у всех больных до и после ЛТ. Предполагается, что изменения экспрессии этих показателей в периферической крови онкологических больных могут иметь информационную значимость для оценки эффективности лечения и разработки фармакологических средств коррективы р53-зависимой системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Begg A.C., Stewart F.A., Vens C.* Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. // *Nature Reviews. Cancer*, 2011, **11**, P. 239–253.
2. *Желтухин А.О., Чумаков П.М.* Повседневные и индуцированные функции гена Р53. // *Успехи биол. химии*, 2010, **50**, С. 447–516.
3. *Maltzman W., Czyzyk L.* UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. // *Mol. Cell. Biol.*, 1984, **4**, No. 9, P. 1689–1694.
4. *Kastan M.B., Onykwere O., Sidransky D. et al.* Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. // *Cancer Res.*, 1991, **51**, P. 6304–6311.
5. *Graeber T.G., Peterson J.F., Tsai M. et al.* Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. // *Mol. Cell. Biol.*, 1994, **14**, No. 9, P. 6264–6277.
6. *Feki A., Irminger-Finger I.* Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2004, **52**, No. 2, P. 103–116.
7. *Momand J., Jung D., Wilczynski S., Niland J.* The MDM2 gene amplification database. // *Nucleic Acids Res.*, 1998, **26**, No. 15, P. 3453–3459.
8. *Shvarts A., Steegenga W.T., Riteco N. et al.* MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. // *EMBO J.*, 1996, **15**, No. 19, P. 5349–5357.
9. *Колесников Н.Н., Тумов С.Е., Веряскина Ю.А. и соавт.* МикроРНК, эволюция и рак. // *Цитология*, 2013, **55**, № 3, С. 159–164.
10. *Calin G.A., Liu C.G., Sevignani C. et al.* MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, **101**, No. 32, P. 11755–11760.
11. *Zhao J.J., Yang J., Lin J. et al.* Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis. // *Childs Nerv. Syst.*, 2009, **25**, No. 1, P. 13–20.
12. *Tenzin W., Lhakhang, Chaudhry M.A.* Interactome of radiation-Induced microRNA-predicted target genes. // *Compar. Func. Genomics*, 2012, ID 569731, P. 12.
13. *Halimi M., Mohsen Asghari S., Sariri R. et al.* Cellular response to ionizing radiation: A microRNA story. // *IJMCM.*, 2012, **11**, No. 4, P. 178–184.
14. *Valadi H., Ekstrom K., Bossios A. et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. // *Nat. Cell. Biol.*, 2007, **9**, No. 6, P. 654–659.
15. *Olivier M., Eeles R., Hollstein M. et al.* The IARCTP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. // *Hum. Mutat.*, 2002, **19**, No. 6, P. 607–614.
16. *Ventura A., Kirsch D.G., McLaughlin M.E. et al.* Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. // *Nature*, 2007, **445**, P. 661–665.
17. *Suad O., Rozenberg H., Brosh R. et al.* Structural basis of restoring sequence-specific DNA binding and transactivation to mutant p53 by suppressor mutations. // *J. Mol. Biol.*, 2009, **385**, No. 1, P. 249–265.
18. *Mandinova A., Lee S.W.* The p53 Pathway as a Target in Cancer Therapeutics: Obstacles and Promise. // *Sci. Transl. Med.*, 2011, **3**, No. 64, P. 1–13.
19. *Secchiero P., Bosco R., Celeghini C., Zauli G.* Recent advances in the therapeutic perspectives of Nutlin-3. // *Curr. Pharm. Des.*, 2011, **17**, No. 6, P. 569–577.
20. *Reed D., Shen Y., Shelat A.A. et al.* Identification and characterization of the first small molecule inhibitor of MDMX. // *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, P. 10786–10796.
21. *Sorenson G.D., Pribish D.M., Valone F.H. et al.* Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy

- genes in human blood. // *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 1994, **3**, No. 1, P. 67–71.
22. *Wagner J.* Free DNA — new potential analyte in clinical laboratory diagnostics? // *Biochem. Med. (Zagreb)*, 2012, **22**, No. 1, P. 24–38.
 23. *Ziegler A., Zangemeister-Wittke U., Stahel R.A.* Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? // *Cancer Treat. Rev.*, 2002, **28**, No. 5, P. 255–271.
 24. *Friel A.M., Corcoran C., Crown O'Driscoll L.* Relevance of circulating tumor cells, extracellular nucleic acids, and exosomes in breast cancer. // *Breast Cancer Res. Treat.*, 2010, **123**, No. 3, P. 613–625.
 25. *Gormally E., Vineis P., Matullo G. et al.* TP53 and KRAS2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence. A Prospective Study // *Cancer Res.*, 2006, **66**, No. 13, P. 6871–6876.
 26. *Михайлов В.Ф., Ушенкова Л.Н., Шагурова Ж.М., Шуленина Л.В.* Исследование мутаций в онкогенах и генах супрессорах опухолей как подход к изысканию способов индивидуального прогноза отдаленных последствий облучения. // *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2010, **50**, № 2, С. 128–133.
 27. *Dongsheng P., Zhang Y., Zheng J.* Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and MdmX. // *Oncotarget*, 2012, **3**, No. 3, P. 228–235.
 28. *Manfredi J.J.* The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. // *Genes. Dev.*, 2010, **24**, No. 15, P. 1580–1589.
 29. *Pan B.T., Johnstone R.M.* Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor. // *Cell*, 1983, **33**, No. 3, P. 967–978.
 30. *Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W. et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. // *J. Exp. Med.*, 1996, **183**, No. 3, P. 1161–1172.
 31. *Blanchard N., Lankar D., Faure F. et al.* TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. // *J. Immunol.*, 2002, **168**, No. 7, P. 3235–3241.
 32. *Van Niel G., Raposo G., Candalh C. et al.* Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. // *Gastroenterology*, 2001, **121**, No. 2, P. 337–349.
 33. *Mears R., Craven R.A., Hanrahan S. et al.* Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. // *Proteomics*, 2004, **4**, No. 12, P. 4019–4031.
 34. *Vickers K.C., Remaley A.T.* Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. // *Curr. Opin. Lipidol.*, 2012, **23**, No. 2, P. 91–97.
 35. *Arroyo J.D., Chevillet J.R., Kroh E.M. et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, **108**, No. 12, P. 5003–5008.
 36. *Li Y., Elashoff D., Oh M. et al.* Serum circulating human mRNA profiling and Its utility for oral cancer detection. // *J. Clin. Oncol.*, 2006, **24**, No. 11, P. 1754–1776.
 37. *Wakuma T., Lozano G.* MDM2, an introduction. // *Mol. Cancer Res.*, 2003, **1**, No. 14, P. 993–1000.
 38. *Lukas J., Gao D.Q., Keshmeshian M. et al.* Alternative and aberrant messenger RNA splicing of the MDM2 oncogene in invasive breast cancer. // *Cancer Res.*, 2001, **61**, No. 7, P. 3212–3219.
 39. *Owringi B., Habibagahi M., Hosseini A. et al.* MDM2, E-cadherin, Survivin and Her2 mRNA Status in Peripheral Blood of Patients with Breast Cancer. // *Middle East J. Cancer*, 2013, **4**, No. 1, P. 7–14.
 40. *Zhang Z., Li M., Wang H. et al.* Antisense therapy targeting MDM2 oncogene in prostate cancer: Effects on proliferation, apoptosis, multiple gene expression, and chemotherapy. // *PNAS*, 2003, **100**, No. 20, P. 11636–11641.
 41. *Wang H., Yan C.* A Small-Molecule p53 activator induces apoptosis through Inhibiting MDMX expression in breast cancer cells. // *Neoplasia*, 2011, **13**, No. 7, P. 611–619.
 42. *Yaman A.F., Kovancilar M., Dizdar Y. et al.* Investigation of miR-21, miR-141 and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. // *Tumour Biol.*, 2011, **32**, No. 3, P. 583–588.
 43. *Roth C., Rack B., Muller V. et al.* Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. // *Breast Cancer Res.*, 2010, **12**, No. 6, P. 1–8.
 44. *Komatsu S., Ichikawa D., Takeshita H. et al.* Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. // *Brit. J. Cancer*, 2011, **105**, No. 1, P. 104–111.
 45. *Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K. et al.* Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. // *Cancer Res.*, 2004, **64**, No. 11, P. 3753–3756.
 46. *Wing Pui Tsang, Tim Tak Kwok.* Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3. // *Apoptosis*, 2008, **13**, No. 10, P. 1215–1222.
 47. *Feng Y., Zhu J., Ou C. et al.* MicroRNA-145 inhibits tumour growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fascin-1. // *Brit. J. Cancer*, 2014, **110**, P. 2300–2309.
 48. *Rocca G., Shi Bin, Audia A. et al.* Regulation of microRNA-145 by growth arrest and differentiation. // *Exper. Cell Res.*, 2011, **317**, No. 4, P. 488–495.

49. *Seok-Jun Kim, Ji-Sun Oh, Ji-Young Shin et al.* Development of microRNA-145 for therapeutic application in breast cancer. // *J. Controlled Release*, 2011, **155**, No. 3, P. 427–434.
50. *Xin Yan, Hongwei Liang, Ting Deng et al.* The identification of novel targets of miR-16 and characterization of their biological functions in cancer cells. // *Mol. Cancer*, 2013, **12**, No. 1, P. 1–11.
51. *He L., He X., Lim L.P. et al.* A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. // *Nature*, 2007, **447**, No. 7148, P. 1030–1038.
52. *Rokavec M., Li H., Jiang L., Hermeking H.* The p53/miR-34 axis in development and disease. // *J. Mol. Cell. Biol.*, 2014, **6**, No. 3, P. 214–230.
53. *Bader A.G.* miR-34 — a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. // *Front Genet.*, 2012, **3**, No. 120, P. 1–9.
54. *Dutta K.K., Zhong Y., Liu Y. et al.* Association of microRNA-34a overexpression with proliferation is cell type-dependent. // *Cancer Sci.*, 2007, **98**, No. 12, P. 1845–1852.
55. *Sun Y.-M., Lin K.-Y., Chen Y.-Q.* Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. // *J. Hematol. & Oncol.*, 2013, **6**, No. 6, P. 1–8.
56. *Tang F., Zhang R., He Y. et al.* MicroRNA-125b induces metastasis by targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. // *PLoS One*, 2012, **7**, No. 5, e35435
57. *Oh J.S., Kim J.J., Byun J.Y., Kim I.A.* Lin28-let7 modulates radiosensitivity of human cancer cells with activation of K-Ras. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2010, **76**, No. 1, P. 5–8.
58. *Zhu Y., Yu X., Fu H. et al.* MicroRNA-21 is involved in ionizing radiation-promoted liver carcinogenesis. // *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2010, **3**, No. 3, P. 211–222.

Поступила: 14.11.2014

Принята к публикации: 19.12.2014