

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ B16 IN VITRO И ТОКСИЧНОСТЬ ИНГИБИТОРА miR-204-5p (LNATM) IN VIVO ПРИ МОДУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ miR-204-5p У МЫШЕЙ

© Н. В. Палкина, А. В. Комина, М. Б. Аксененко, Р. Н. Белоногов, С. Н. Лаврентьев, Т. Г. Рукша*

Кафедра патологической физиологии им. проф. В. В. Иванова Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, Красноярск, 660022;

* электронный адрес: tatyana_ruksha@mail.ru

МикроРНК miR-204-5p относится к онкосупрессорным, и снижение ее уровня выявлено при ряде злокачественных заболеваний. В этой связи целью настоящего исследования являлась оценка влияния ингибирования miR-204-5p на жизнеспособность клеток меланомы, а также оценка токсических эффектов ингибитора miR-204-5p (LNATM) in vivo. Трансфекция ингибитора и аналога miR-204-5p клеток меланомы B16 приводила к соответствующему изменению экспрессии микроРНК. На этом фоне регистрировали снижение пролиферации (жизнеспособности) клеток меланомы через 96 ч после начала эксперимента, что, вероятно, указывает на неспецифичность этих изменений. Биоинформатический анализ показал, что miR-204-5p участвует в регуляции сигнальных каскадов, регулирующих плюрипотентные стволовые клетки, меланогенез, нарушения транскрипции при раке. Применение ингибитора miR-204-5p вещества LNATM in vivo приводило к снижению уровня микроРНК в тканях и не вызывало токсического эффекта.

Ключевые слова: miR-204-5p, ингибиторы LNATM, меланома B16, МТТ, сигнальные пути.

Модуляция активности микроРНК — малых некодирующих молекул РНК — рассматривается в последние годы в качестве одного из перспективных методов изменения жизнедеятельности клетки и регуляции ее основных функций — пролиферации, дифференцировки и апоптоза (Krutzfeldt, 2016). Это стало возможно благодаря появлению новейших молекулярно-диагностических методов на основе гибридизации на чипе, позволяющих одновременно исследовать и сравнивать уровни экспрессии всего спектра изученных к настоящему времени микроРНК в клетках различных видов млекопитающих и человека, а также выявлять изменения уровней экспрессии при различных патологиях (Love, Dave, 2013). Последнее дает основание предполагать роль измененных микроРНК в развитии того или иного патологического процесса. Необходимым условием адекватной оценки значения отдельных микроРНК в регуляции вышеуказанных процессов является последовательное функциональное исследование in vitro и in vivo при модуляции активности исследуемых микроРНК с идентификацией биологических эффектов (Garzon et al., 2010; Chen et al., 2015).

Ранее нами было выявлено, что уровень микроРНК miR-204-5p уменьшался в клетках меланомы по сравнению с нормальными меланоцитами (Komina et al., 2016), что согласуется с другими исследованиями, в которых описывается снижение уровня miR-204-5p при раке щитовидной железы и колоректальном раке (Yin et al., 2014; Liu et al., 2015). Это послужило поводом для дальнейшего исследования роли miR-204-5p клетках мел-

аномы и in vitro, и in vivo с использованием антисмысловых ингибиторов, созданных на основе технологии LNATM (Locked Nucleic Acid). LNATM представляют собой класс высокоаффинных аналогов РНК с модификацией рибозного кольца, позволяющей повысить специфичность связывания ингибитора, стабильность и устойчивость к действию эндонуклеаз (Watts, Corey, 2012; Chen et al., 2015).

Цель настоящей работы — оценка влияния ингибирования miR-204-5p на жизнеспособность клеток меланомы in vitro, а также оценка токсического действия ингибитора LNATM на miR-204-5p in vivo.

Материал и методика

Культивирование клеток и трансфекция. Модуляцию активности miR-204-5p осуществляли на культуре клеток B16 — мышинной меланомы кожи, полученной в НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (Новосибирск). Клетки культивировали в питательной среде RPMI-1640, содержащей L-глутамин (ThermoFisher Scientific, Великобритания), 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Life Technologies, Великобритания) и смесь антибиотика-антимикотика (пенициллин, стрептомицин и амфотерицин В) (Gibco, Life Technologies, Великобритания), при 37 °C и 5 % CO₂ в CO₂-инкубаторе (Sanyo MSO-5AC, Япония). Смену питательной среды осуществляли 1 раз в 3 сут.

Перед проведением трансфекции ингибиторов и имитаторов молекулы микроРНК miR-204-5p клетки культивировали в течение нескольких пассажей, чтобы убедиться в хорошей пролиферативной активности и жизнеспособности культуры. Перед проведением трансфекции клетки рассеивали в лунки 24-луночного культурального планшета в концентрации $(1-5) \cdot 10^5$ кл./мл. Через 24 ч после прикрепления клеток к поверхности лунок питательную среду заменяли на свежую, не содержащую комплекса антибиотик—антимикотик, и осуществляли трансфекцию. Для усиления активности miR-204-5p в клетках меланомы кожи в клетки вводили синтетический аналог (имитатор) исследуемой микроРНК (mirVana® miR-204-5p mimic; Ambion, США), а для ингибирования этой микроРНК осуществляли трансфекцию ингибитора молекулы mmi-miR-204-5p miRCURY LNA™ (Exiqon, Дания). В качестве трансфектанта использовали липофектамин Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Для липофекции имитатора и ингибитора miR-204-5p на каждые 500 мкл питательной среды готовили 50 мкл комплекса липофектамина с вводимым веществом в бессывороточной питательной среде, содержащего 1.5 мкл липофектамина и 3 мкл раствора имитатора или 5 мкл ингибитора, а также соответствующих им отрицательных контролей: для ингибитора — Negative control A miRCURY LNA™ miRNA Inhibitor Control (Exiqon, Дания), для имитатора — miRNA mimic negative control (Ambion, США) в тех же пропорциях (конечная концентрация имитатора в клеточной культуре составляет 0.3 мкМ, ингибитора — 50 мкМ). Приготовленный комплекс вносили в лунки с клеточной культурой и культивировали клетки в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе, после чего меняли питательную среду на свежую и приступали к дальнейшим действиям.

Эффективность трансфекции оценивали через 24 ч после ее проведения по изменению уровней экспрессии miR-204-5p методом ПЦР в реальном времени.

Пролиферативную активность (жизнеспособность) клеток исследовали при помощи МТТ-теста. Принцип метода заключается в спектрофотометрической оценке поглощения света с длиной волны 560 нм растворимыми метаболитами МТТ (2-(4,5-dimethyltriazol2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) — фиолетовыми кристаллами формазана, которые образуются в процессе жизнедеятельности клеток из нерастворимого МТТ, имеющего насыщенный желтый цвет. Чем больше клеток и выше их метаболическая активность, тем больше метаболита они образуют, что позволяет делать выводы о степени их пролиферативной активности и жизнеспособности. Для проведения МТТ-теста клетки меланомы через 24 ч после трансфекции модуляторов активности miR-204-5p и их отрицательных контролей рассеивали в лунки четырех рядов 96-луночного культурального планшета в концентрации $3 \cdot 10^4$ кл./мл (по одному ряду на каждые сутки исследования). Затем в лунки первого ряда вносили по 15 мкл раствора МТТ в PBS в концентрации 5 мг/мл (конечная концентрация МТТ в лунке 0.5 мг/мл), культивировали в течение 4 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5 % CO₂. По окончании культивирования из лунок первого ряда удаляли питательную среду и добавляли к клеточному монослою с образованными кристаллами формазана по 200 мкл DMSO, инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. После инкубации раствор формазана переносили в отдельный 96-луночный планшет и определяли поглощение

им света при длине волны 560 нм на планшетном спектрофотометре Эфос-9305 (Швабе, Россия). Уровень жизнеспособности (пролиферативной активности) клеток принимали прямо пропорциональным уровню поглощения. МТТ-тест повторяли также через 48, 72 и 96 ч после трансфекции модуляторов активности miR-204-5p и их отрицательных контролей — для второго, третьего и четвертого рядов лунок культурального планшета соответственно. Эксперимент повторяли трижды.

В экспериментах на животных использовали белых беспородных мышей ($n = 15$) — половозрелых самок в возрасте 10—12 нед со средней массой 21.9 г. Животных приобретали в виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Животных содержали в условиях естественного освещения, доступ к еде и воде не ограничивали. На проведение исследований было получено разрешение локального этического комитета Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 70/2016 от 06.06.2016). Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с требованиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных», а также в Декларации прав животных (World Medical Association Declaration of Helsinki: <http://www.who.int/bulletin/archives/79%284%29373.pdf>) и приказе Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Ингибирование miR-204-5p *in vivo*. Использовали синтетический ингибитор miRCURY LNA™ Power microRNA inhibitor (Exiqon, Дания). Данный ингибитор, а также отрицательный контроль для ингибитора, входящий в комплект, вводили подкожно в шейную складку в дозировках 5 и 25 мг на 1 кг массы животного в виде раствора в 0.01M PBS в объеме 100 мкл. Приготовленные растворы вводили 1 раз в 7 сут. Дополнительным отрицательным контролем служило введение PBS в объеме 100 мкл с тем же режимом введения, что и для ингибитора и контроля ингибитора. Случайным образом было сформировано 5 групп животных ($n = 3$), в которых животным вводили: PBS (1), 5 мг/кг отрицательного контроля (2), 25 мг/кг отрицательного контроля (3), а также ингибитор miR-204-5p вещество LNA™ в дозировках 5 мг/кг (4) и 25 мг/кг (5). Воздействие ингибиторов длилось 14 сут, после чего животных выводили из эксперимента декапитацией под хлороформным наркозом.

Оценка внешних параметров животных и их поведения. На всем протяжении эксперимента производили ежедневное взвешивание животных, а также оценку внешнего вида и двигательной активности животных по шкалам в баллах. Шкала оценки изменений окраса: 1 балл — тусклый, 2 — яркий; шкала изменений покрова: 1 балл — выпадение шерсти, 2 — загрязненный покров, 3 — незагрязненный покров. Шкала оценки изменений двигательной активности животных была 5-балльной: 0 — погيبшее животное; 1 — кома с отсутствием активности, обездвиженность и без реакции на тактильные раздражители; 2 — минимальная двигательная активность, активные движения слабые, в основном произвольные, реакция на тактильные раздражители слабая; 3 — животное заторможено, передвигается на несколько шагов лишь при подталкивании, реакция на раздражители тактильного характера «избегательная»; 4 — двигательная активность субнормальная в виде медлен-

ных активных движений по клетке, реакция на раздражители «избегательно-оборонительная» с попытками укусов; 5 — нормальная двигательная активность, перемещение по клетке активное, реакция на раздражители избегательная с выраженными оборонительными реакциями. Кроме того, оценивали аппетит животных по среднему количеству съедаемого корма в граммах и выпитой жидкости в миллилитрах в каждой экспериментальной группе.

Оценка биохимических параметров — маркеров токсического повреждения органов. При декапитации, совершаемой под хлороформным наркозом, собирали кровь в пробирку, затем центрифугированием получали плазму, в которой на биохимическом анализаторе COBAS INTEGRA 400 plus (Roche, Япония) определяли концентрацию АЛТ (аланинаминотрансферазы), АСТ (аспартатаминотрансферазы), креатинина и мочевины при помощи кассет, содержащих системы реагентов для количественного определения *in vitro* концентрации креатинина, мочевины, АЛТ и АСТ (Roche, Германия) согласно инструкции фирмы-производителя.

Оценка морфологических изменений органов. При вскрытии животных производили забор внутренних органов — головного мозга, легких, печени, почек, сердца и селезенки. Оценивали органы визуальном макроскопически, а также определяли массу каждого органа. Далее часть органа фиксировали в растворе 10%-го нейтрального формалина и изготавливали парафиновые блоки, гистологические срезы которых окрашивали гематоксилином-эозином. Оценку изменений, характерных для токсических повреждений, осуществляли с помощью микроскопа Olympus BX-41 с видеонасадкой Olympus u-CMAD3 (Olympus, Япония) при увеличении объектива 20× и 40× в нескольких полях зрения для сердца, почек и печени.

Оценка молекулярных маркеров токсического повреждения печени. Оценивали уровни экспрессии микроРНК по результатам ПЦР в реальном времени после получения тотальной РНК из клеток печени мышей. Оценивали уровень экспрессии miR-122, используя набор для определения уровня экспрессии hsa-miR-122 miRNA TaqMan Assays — Assay ID 002245 (No 4427975, Applied Biosystems, США), а также уровень экспрессии гена *GAPDH* с помощью набора для определения его уровня экспрессии — Gene expression TaqMan Assays Mm99999915_g1 (No1 538448, Applied Biosystems, США).

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени. Небольшие кусочки внутренних органов, изъятых при вскрытии, помещали в криопробирки с раствором для фиксации и сохранения РНК IntactRNA (Evrogen, Россия) и сохраняли в замороженном состоянии при -80°C . Кусочек ткани весом 30 мг гомогенизировали в ступке при помощи жидкого азота, а затем выделяли РНК наборами Рибо-золь С и Рибо-сорб (Амплисенс, Россия). Полученную РНК использовали сразу для дальнейших реакций или сохраняли в замороженном виде при -80°C . С выделенной РНК проводили реакцию обратной транскрипции при помощи набора реагентов MMLV RT kit (Evrogen, Россия). При этом использовали случайные праймеры, входящие в комплект набора для исследования экспрессии матричных РНК, и специфические праймеры для каждого вида микроРНК, предназначенные для проведения реакции обратной транскрипции, входящие в наборы для определения уровней экспрессии микроРНК

TaqMan Assays (Applied Biosystems, США). В реакции обратной транскрипции на 1 мкл РНК приходилось 0.13 мкл праймера, а также 1.13 мкл смеси, содержащей 0.5 мкл ОТ-буфера по 0.25 мкл DTT, смеси dNTPs и безнуклеазной воды и 0.13 мкл фермента ревертазы. Реакцию проводили в течение 50 мин при 37°C , а затем оставляли прогреванием до 70°C в течение 10 мин. Полученную кДНК сохраняли при -20°C . Постановку ПЦР в реальном времени осуществляли на приборе StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Сингапур). Реакционная смесь на 1 лунку 48-луночного планшета объемом 20 мкл состояла из 8 мкл 2.5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии референсного красителя ROX (Синтол, Россия), 1 мкл 20-кратного праймера из наборов для определения уровней экспрессии микроРНК (miRNA TaqMan Assays; Applied Biosystems, Россия) или наборов для определения экспрессии генов Gene Expression TaqMan Assays (Applied Biosystems, США), 2 мкл кДНК для исследования экспрессии матричных РНК либо 1.5 мкл кДНК для исследования уровней экспрессии микроРНК; оставшийся объем восполняли деионизированной водой. В качестве эндогенных контролей для микроРНК использовали праймеры из наборов для определения уровней экспрессии U6 snRNA (Assay ID 001973, No. 4427975) и snoRNA 234 (Assay ID 001234, No. 4427975; Applied Biosystems, США), а для матричных РНК — праймеры для определения экспрессии бета-актина (Actb Mm00446968_m1, No 4331182; Applied Biosystems, США). Программа термоциклирования включала в себя прогрев до 50°C в течение 2 мин, а затем до 95°C в течение 10 мин, после чего следовало 40 циклов, состоящих из режимов 95°C в течение 15 с и затем 60°C в течение 1 мин с детекцией флуоресценции по каналам FAM/ROX и построением кривой флуоресценции. Данные анализировали с использованием метода $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001). При определении уровней экспрессии по двум эндогенным контролям использовали среднее геометрическое от произведения уровней экспрессии, рассчитанных при нормализации по каждому эндогенному контролю. Эксперимент повторяли трижды.

Биоинформатический анализ. Анализ сигнальных путей с участием miR-204-5p проводили при помощи баз данных DIANA miRPath v.3,0 (с применением баз TargetScan v.7,0, miRTarBase, micro T-CDS). Поиск сигнальных путей проведен на основе базы KEGG.

Статистическая обработка. При статистической обработке и анализе данных использовали пакет программного обеспечения Statistica 6.1 (StatSoft, Россия). При сравнении парных независимых выборок использовали непараметрический критерий *U*-тест Манна—Уитни. Результаты считали значимыми при $P < 0.05$. Данные представляли в виде среднего и его стандартной ошибки.

Результаты и обсуждение

По результатам оценки экспрессии микроРНК miR-204-5p через 24 ч после трансфекции ингибитора установлено, что уровень miR-204-5p после ингибирования снижается вплоть до нуля ($P = 0.03$ при сравнении с базовым уровнем и $P = 0.0495$ при сравнении с отрицательным контролем), однако в отрицательном контроле экспрессия этой молекулы не только сохраняется и со-

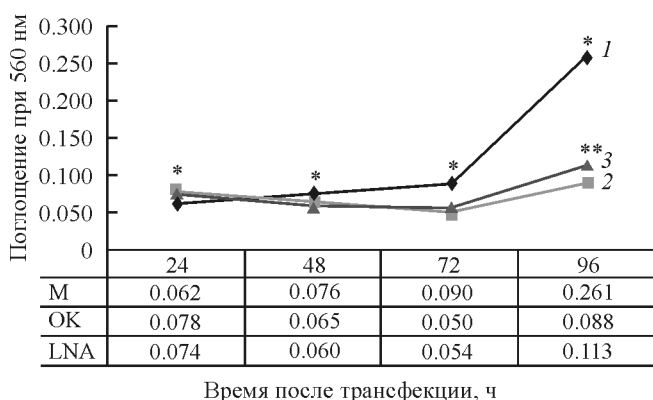


Рис. 1. Динамика пролиферативной активности (жизнеспособности) клеток меланомы B16 после ингибирования микроРНК miR-204-5p веществом LNA™ (LNA). МТТ-тест.

Кривые: 1 — меланома (М), 2 — отрицательный контроль (ОК), 3 — ингибитор LNA. Одной звездочкой показаны статистически значимые различия между клетками меланомы, не получившими воздействия, и клетками, трансфицированными ОК и LNA ($P = 0.009$), двумя звездочками — между клетками, трансфицированными ОК и LNA ($P = 0.016$).

ставляет $12\ 592.3 \cdot 10^{-4}$ усл. ед., но и статистически значительно увеличивается в 2679.2 раза ($P = 0.03$) по сравнению с базовым уровнем экспрессии ($4.7 \cdot 10^{-4}$ усл. ед.) в клетках меланомы, не получивших воздействия. В другой серии экспериментов после трансфицирования клеток меланомы B16 имитатором miR-204-5p уровень экспрессии микроРНК составил $445\ 949.1 \cdot 10^{-4}$ усл. ед. и увеличился в 94 882.78 раз по сравнению с уровнем в неизмененных клетках меланомы ($P = 0.03$) и в 84 141.3 раза по сравнению клетками меланомы, трансфицированными отрицательным контролем ($P = 0.0495$), уровень экспрессии miR-204 в которых составил $5.3 \cdot 10^{-4}$ усл. ед. Таким образом, можно резюмировать, что трансфекция ингибитора и имитатора miR-204-5p была эффективной.

Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности клеток меланомы B16 в динамике (через 24, 48, 72 и 96 ч) с помощью МТТ-теста показала, что жизнеспособность опухолевых клеток через 96 ч после трансфекции ингибитора и отрицательного контроля снижается в

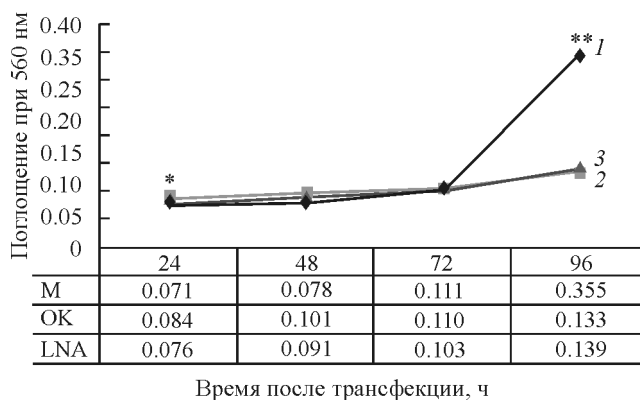


Рис. 2. Жизнеспособность (пролиферативная активность) клеток меланомы B16 после увеличения количества miR-204-5p ее имитатором (MIM). МТТ-тест.

Кривые: 1 — меланома (М), 2 — отрицательный контроль (ОК), 3 — mi-mic miR-204-5p (MIM). Одной звездочкой показаны статистически значимые различия между клетками, трансфицированными ОК и MIM ($P = 0.0495$), двумя звездочками — между клетками меланомы, не получившими воздействия (М), и клетками, трансфицированными ОК и MIM ($P = 0.0495$).

2.5 раза по отношению к клеткам без воздействия, но не различается в клетках, трансфицированных отрицательным контролем и ингибитором miR-204-5p (рис. 1). Вместе с тем через 96 ч после трансфекции зарегистрировано повышение жизнеспособности клеток меланомы B16 при трансфекции ингибитора miR-204-5p в 1.25 раза по сравнению с отрицательным контролем (рис. 1, кривая 3).

После трансфекции имитатора miR-204-5p в клетки меланомы через 96 ч в них более чем в 3 раза снижаются значения МТТ-теста по сравнению с клетками, культивируемыми без воздействия каким-либо веществом (рис. 2).

Результаты МТТ-теста позволяют сделать вывод о том, что трансфекция ингибитора микроРНК (LNA™) и его отрицательного контроля способна оказывать неспецифическое влияние на процессы метаболической активности клеток, заключающееся в модуляции уровня МТТ-теста и выражающееся в незначительном, но достоверном изменении анализируемых показателей.

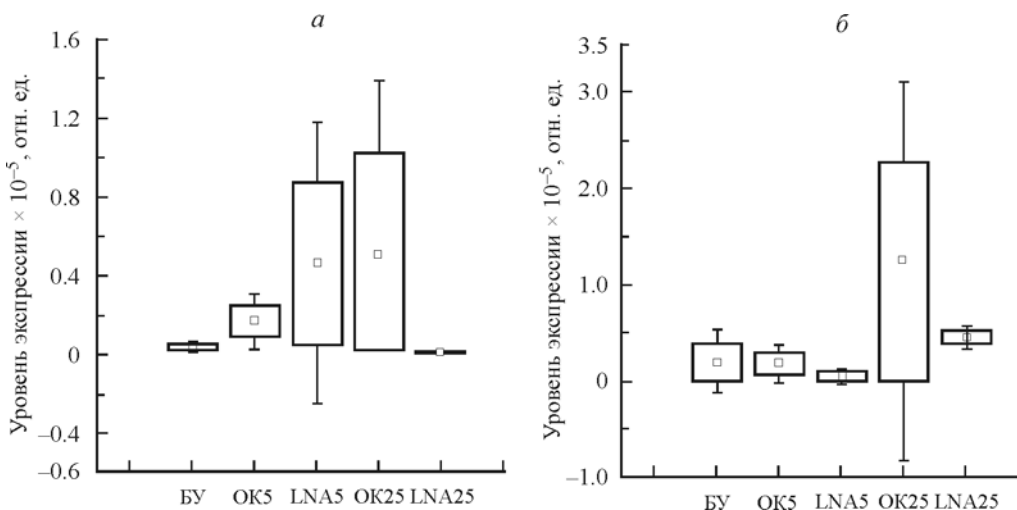


Рис. 3. Относительные уровни экспрессии miR-204-5p в легких (а) и печени (б) мышей.

По горизонтали: базовый уровень (БУ), отрицательный контроль в дозах 5 (ОК5) и 25 (ОК25) мг/кг, ингибитор miR-204-5p в дозах 5 (LNA5) и 25 (LNA25) мг/кг. Показаны средние значения (центр столбцов), их ошибка (размер столбцов) и стандартные отклонения (вертикальные отрезки). Звездочка показывает статистически значимое отличие по сравнению с ОК25 и БУ (введение PBS) ($P = 0.0495$).

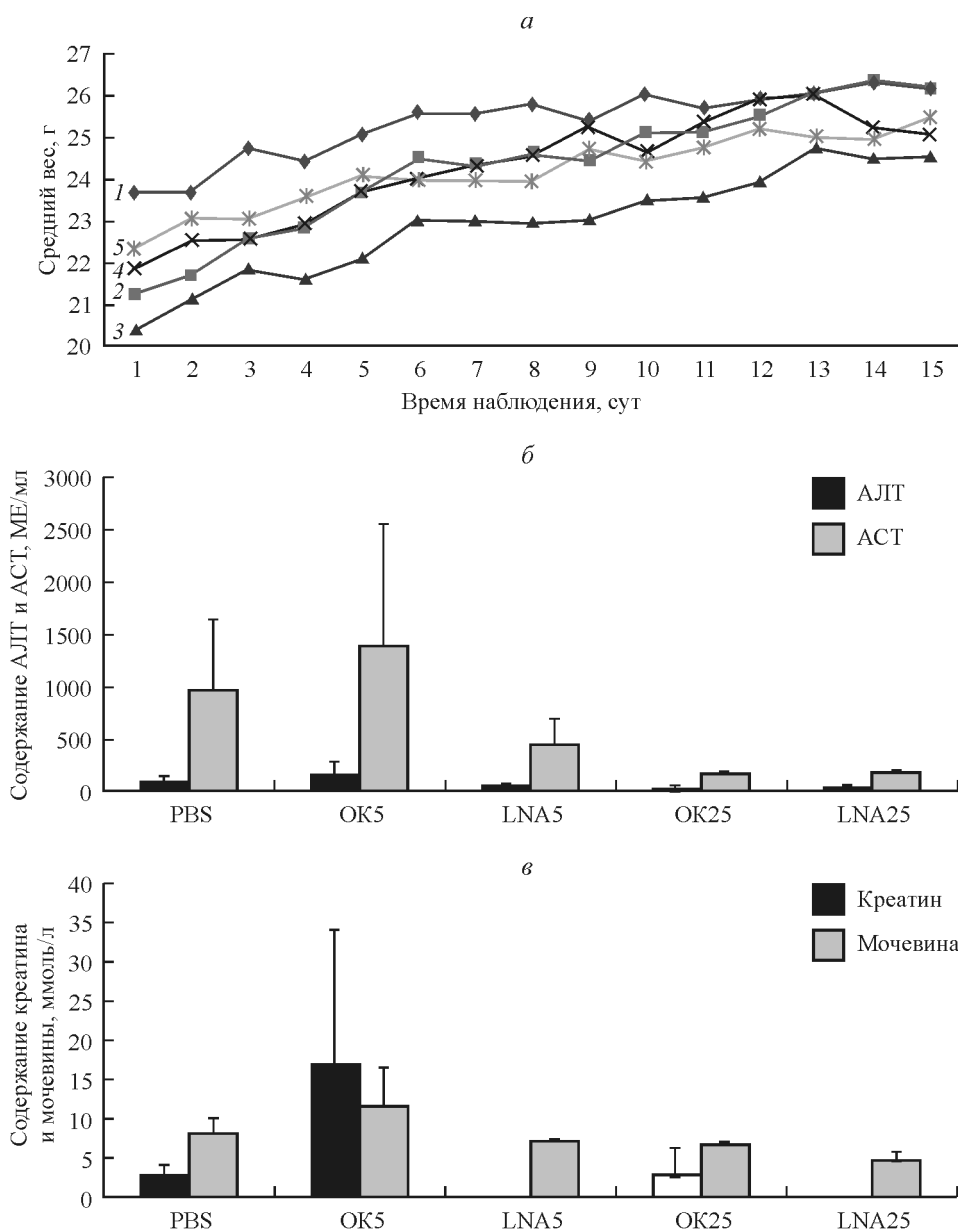


Рис. 4. Изменения массы тела (а) и содержания в плазме крови аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) (б), а также креатина и мочевины (в) в группах мышей 1—5 на протяжении экспериментального воздействия.

а — мышам вводили: 1 — PBS; 2, 3 — отрицательный контроль в дозах 5 (OK5) и 25 (OK25) мг/кг соответственно; 4, 5 — ингибитор miR-204-5p в дозах 5 (LNA5) и 25 (LNA25) мг/кг соответственно.

Учитывая онкосупрессорную роль miR-204-5p и данные из литературы, указывающие на участие этой микроРНК в регуляции таких фундаментальных физиологических процессов, как окислительный стресс и аутофагия (Sumbul et al., 2014; Wu et al., 2017), мы исследовали действие ингибитора LNA™ *in vivo*. По данным из литературы известно, что в норме miR-204-5p экспрессируется в легочной ткани (Courboulin et al., 2011). В этой связи после введения LNA™ мышам оценивали уровень miR-204-5p в легких. Выявлено снижение экспрессии этой микроРНК в легочной ткани у животных после воздействия ингибитора в дозе 25 мг/кг по сравнению с группой, получившей инъекции отрицательного контроля в той же дозе, а также группой с введением PBS (базовый уровень экспрессии) (рис. 3, а). Значимых различий по уровню экспрессии miR-204-5p в легких у других

групп животных (см. раздел «Материал и методика») между собой не выявлено. В печени введение ингибитора в дозе 5 и 25 мг/кг не привело к статистически значимым изменениям уровня экспрессии miR-204-5p (рис. 3, б). Таким образом, эффективное ингибирование miR-204-5p ингибитором LNA™ *in vivo* наступает при его дозе 25 мг/кг.

Для оценки возможного токсического влияния используемого ингибитора на организм животного нами оценивались такие показатели, как динамика массы тела животных, их внешний вид и двигательная активность. Животные исследуемых групп равномерно увеличивались в массе тела к концу эксперимента, значимых различий в массе тела, а также в динамике набора массы не выявлено (рис. 4, а). Потребление воды и пищи в исследуемых группах также значимо не изменилось. При оценке

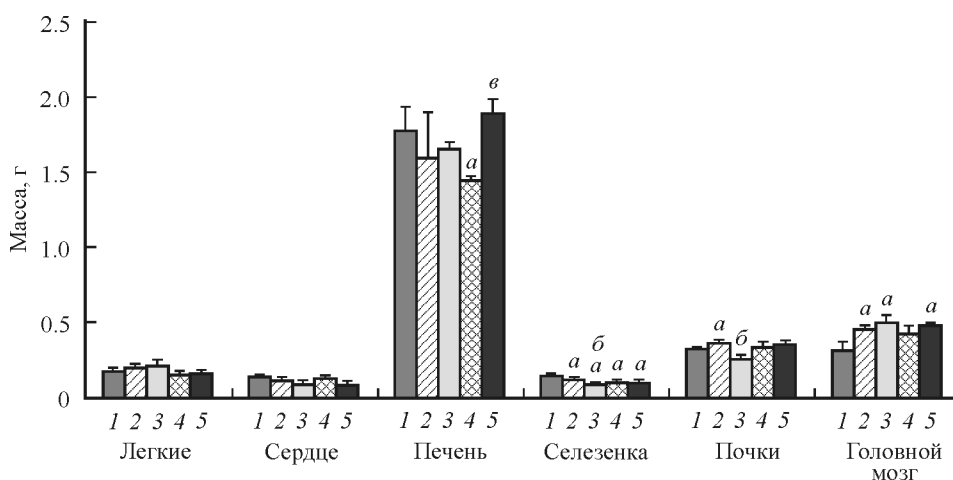


Рис. 5. Массы внутренних органов мышей в группах 1—5 после вскрытия.

Мышам вводили: 1 — PBS, 2 — 5 мг/кг ОК, 3 — 5 мг/кг ингибитора LNA, 4 — 25 мг/кг ОК, 5 — 25 мг/кг LNA. Статистическая значимость различий по сравнению: *a* — с инъекцией PBS (1); *b*, *в* — с инъекцией ОК в дозе 5 (2) или 25 (4) мг/кг ($P = 0.0495$).

по шкалам внешнего вида и двигательной активности животные всех групп имели яркий, незагрязненный кожный покров и характеризовались нормальной двигательной активностью с выраженными избегательно-оборонительными реакциями в ответ на раздражители на всем протяжении эксперимента.

Кроме того, мы оценивали уровни некоторых биохимических показателей в плазме крови животных, указывающих на гепато- и нефротоксичность, — АЛТ, АСТ, креатинина и мочевины. Значимых количественных различий этих показателей также не зарегистрировали (рис. 4, *б*, *в*). Оценка состояния внутренних органов при вскрытии (головного мозга, легких, печени, почек, сердца и селезенки) значимых макроскопических морфологических изменений не выявила. Однако обнаружены статистически достоверные неспецифические изменения массы печени, селезенки, почек и головного мозга у животных, которым вводили ингибитор и отрицательный контроль в обеих дозировках (по сравнению с животными в группе введения PBS), а также специфическое статистически значимое уменьшение массы селезенки и почек в группе введения ингибитора в дозе 5 мг/кг и увеличение печени при ингибировании в дозе 25 мг/кг (рис. 5).

При микроскопическом исследовании на срезах ткани печени наблюдали сохранение балочного и долькового строения во всех группах животных, за исключением группы ингибирования в дозе 25 мг/кг и группы введения отрицательного контроля в дозе 25 мг/кг: в этих группах наблюдали частичную потерю балочности строения органа. Содержание гликогена во всех исследуемых группах было одинаковым. Гистологические препараты ткани печени в группах введения ингибитора и отрицательного контроля в дозе 25 мг/кг показывают диффузную гидропическую дистрофию различной степени выраженности (рис. 6, *а*, *б*).

На гистологических препаратах ткани почек во всех группах животных клубочки имеют резко выраженное полнокровие капиллярных петель. В группах введения ингибитора и отрицательного контроля в дозе 25 мг/кг отмечается диффузное венозно-капиллярное полнокровие с эритростазами. В группе введения фосфатно-солевого раствора преобладают сосуды слабого кровенапол-

нения. Дистрофические изменения в ткани не определялись. Гистологическая картина препаратов ткани сердца всех исследуемых групп была одинаковой. Кардиомиоциты тонкие, с подчеркнутой исчерченностью, токсических

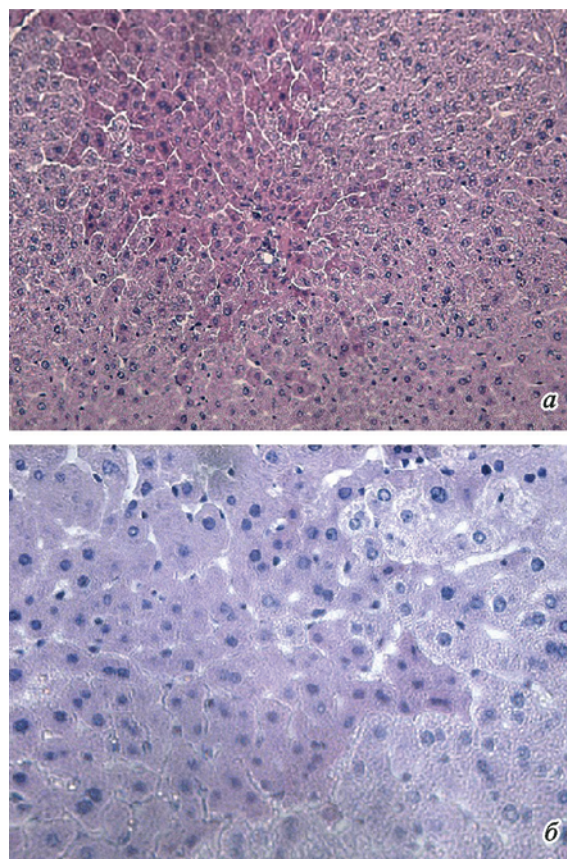


Рис. 6. Гистологический срез ткани печени мыши после воздействия ингибитора LNA в дозе 25 мг/кг при разном увеличении.

a — в центре виден неизменный участок печени, на периферии видны гепатоциты с признаками дистрофии; *б* — на периферии видны гепатоциты с включением вакуолей в цитоплазме. Окраска гематоксилин-эозином. Об.: 20× (*a*) и 40× (*б*).

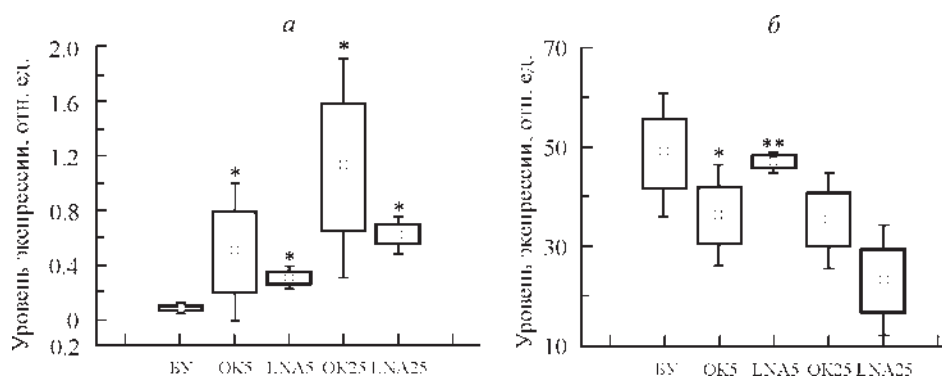


Рис. 7. Относительный уровень экспрессии *miR-122* (а) и *GAPDH* (б) в печени животных после экспериментального воздействия.

По горизонтали: базовый уровень (БУ), отрицательный контроль в дозах 5 (OK5) и 25 (OK25) мг/кг, ингибитор *miR-204-5p* в дозах 5 (LNA5) и 25 (LNA25) мг/кг. Показаны средние значения (центр столбцов), их ошибка (размер столбцов) и их стандартные отклонения (вертикальные отрезки). Одна звездочка показывает статистически значимое отличие по сравнению с БУ ($P = 0.0495$), две звездочки — по сравнению с OK25 ($P = 0.0495$).

некрозов не выявлено. Часть сосудов с явлениями вазодилатации и перивасальными кровоизлияниями.

В работе оценивали уровни мРНК молекулярных маркеров токсического повреждения гепатоцитов — *miR-122* и *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), так как снижение экспрессии *miR-122* и повышение экспрессии *GAPDH* в клетках печени указывают на явления цитотоксичности на более ранних этапах, чем регистрация изменений биохимических показателей в сыворотке (Girard et al., 2008; Lardizabal et al., 2012; Thakral, Ghoshal, 2015). Нами показаны изменения, противоположные изменениям при токсичности, а именно увеличение экспрессии *miR-122* во всех группах, получивших ингибитор и отрицательный контроль, по сравнению с базовым уровнем у мышей, получивших PBS (рис. 7, а), а также значимое снижение экспрессии *GAPDH* по сравнению с отрицательным контролем, но незначимое по сравнению с базовым уровнем в печени у животных, получивших PBS (рис. 7, б).

Таким образом, по результатам оценки внешних параметров животных и их двигательной активности, микро- и макроскопических изменений в органах, а также показателей биохимических и молекулярных маркеров токсического повреждения организма после воздействия на организм лабораторных животных ингибитором *miR-204* в исследуемых концентрациях, можно сделать заключение о том, что критических изменений на уровне целого организма, а также отдельных органов, тканей и клеток, указывающих на выраженную токсичность и ограничивающих применение LNA™ в качестве модификатора активности микроРНК, в частности *miR-204-5p*, не происходит.

Биоинформатический анализ сигнальных путей, регулируемых *miR-204-5p*, определил несколько сигнальных каскадов, принимающих участие в процессах канцерогенеза, в том числе сигнальный путь эстрогенов, регуляция плюрипотентных стволовых клеток, меланогенез, нарушения транскрипции при раке (см. таблицу). Эти результаты согласуются с данными из литературы, показывающими, что *miR-204-5p* усиливает дифференцировку мезенхимных стволовых клеток в жировой ткани (He et al., 2015), участвует в перепрограммировании ацинарных клеток поджелудочной железы в инсулинопродуцирующие (Teichenne et al., 2015). Помимо этого, многочисленные исследования указывают на участие *miR-204-5p* в канцерогенезе посредством различных механизмов (Yin et al., 2014; Liu et al., 2015; Wang et al., 2016). Таким образом, функциональная значимость *miR-204-5p* требует дальнейшего изучения для понимания ее роли как в физиологических, так и в патологических процессах. Использование специфических модуляторов микроРНК позволяет выявлять фактические эффекты этих молекул. Оценка показателей токсического влияния модуляторов микроРНК важна с точки зрения возможности использования микроРНК в качестве терапевтических мишеней.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00074П).

Список литературы

- Chen Y., Gao D. Y., Huang L. 2015. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 81 : 128—141.
- Courboulin A., Paulin R., Giguère N. J., Saksouk N., Perreault T., Meloche J., Paquet E. R., Biardel S., Provencher S., Cote J., Simard M. J., Bonnet S. 2011. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J. Exp. Med.* 208 : 535—548.
- Garzon R., Marcucci G., Croce C. M. 2010. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 : 775—789.
- Girard M., Jacquemin E., Munnich A., Lyonnet S., Henriot-Caude A. 2008. MiR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J. Hepatol.* 48 : 648—656.
- He H., Chen K., Wang F., Zhao L., Wan X., Wang L., Mo Z. 2015. miR-204-5p promotes the adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by modulating DVL3 expression and suppressing Wnt/ β -catenin signaling. *Int. J. Mol. Med.* 35 : 1587—1595.

Сигнальные пути с участием *miR-204-5p*

Название сигнального пути (по базе данных: DIANA miRPath v.3.0.)	Уровень статистической значимости
Эстрогены	1.13130429166e-06
Деградация лизина	1.04389541541e-05
Регуляция плюрипотентных стволовых клеток	0.0100778947069
Меланогенез	0.0175111418782
Нарушение транскрипции при раке	0.0464362540365

- Komina A., Palkina N., Aksenenko M., Tsyrenzhapova S., Ruksha T. 2016. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of miR-4286 inhibition in melanoma cells. PLoS ONE. 11 : e0168229. Doi: 10.1371/journal.pONE.0168229.
- Krützfeldt J. 2016. Strategies to use microRNAs as therapeutic targets. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 30 : 551—561.
- Lardizábal M. N., Nocito A. L., Daniele S. M., Ornella L. A., Palatnik J. F., Veggi L. M. 2012. Reference genes for real-time PCR quantification of microRNAs and messenger RNAs in rat models of hepatotoxicity. PLoS ONE. 7 : e36323. Doi: 10.1371/journal.pONE.0036323.
- Liu L., Wang J., Li X., Ma J., Shi C., Zhu H., Xi Q., Zhang J., Zhao X., Gu M. 2015. MiR-204-5p suppresses cell proliferation by inhibiting IGFBP5 in papillary thyroid carcinoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. 457 : 621—626.
- Livak K. J., Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods. 25 : 402—408.
- Love C., Dave S. 2013. MicroRNA expression profiling using microarrays. Methods Mol. Biol. 999 : 285—296.
- Sümbül A. T., Göğebakan B., Ergün S., Yengil E., Batmac C. Y., Tonyal Ö., Yıldız M. 2014. MiR-204-5p expression in colorectal cancer: an autophagy-associated gene. Tumour Biol. 35 : 12 713—12 719.
- Teichenne J., Morró M., Casellas A., Jimenez V., Tellez N., Legeer A., Bosch F., Ayuso E. 2015. Identification of miRNAs involved in reprogramming acinar cells into insulin producing cells. PLoS ONE. 10 : e0145116. Doi: 10.1371/journal.pone.0145116.
- Thakral S., Ghoshal K. 2015. MiR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. Curr. Gene Ther. 15 : 142—150.
- Wang X., Li F., Zhou X. 2016. MiR-204-5p regulates cell proliferation and metastasis through inhibiting CXCR4 expression in OSCC. Biomed. Pharmacother. 82 : 202—207.
- Watts J. K., Corey D. R. 2012. Gene silencing by siRNAs and antisense oligonucleotides in the laboratory and the clinic. J. Pathol. 226 : 365—379.
- Wu C., Liu Z., Ma L., Pei C., Qin L., Gao N., Li J., Yin Y. 2017. MiRNAs regulate oxidative stress related genes via binding to the 3' UTR and TATA-box regions: a new hypothesis for cataract pathogenesis. BMC Ophthalmol. 17 : 142. Doi: 10.1186/s12886-017-0537-9.
- Yin Y., Zhang B., Wang W., Fei B., Quan C., Zhang J., Song M., Bian Z., Wang Q., Ni S., Hu Y., Mao Y., Zhou L., Wang Y., Yu J., Du X., Hua D., Huang Z. 2014. MiR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating RAB22A. Clin. Cancer Res. 20 : 6187—6199.

Поступила 31 X 2017

VIABILITY OF MELANOMA B16 CELLS *IN VITRO* AND TOXICITY EVALUATION
AFTER miR-204-5p (LNATM) INHIBITOR APPLICATION FOR THE miR-204-5p
EXPRESSION MODULATION IN MICE *IN VIVO*

N. V. Palkina, A. V. Komina, M. B. Aksenenko, R. N. Belonogov,
S. N. Lavrentiev, T. G. Ruksha*

Krasnoyarsk State Medical University, Department of Pathophysiology,
Krasnoyarsk, 660022;

* e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

MiR-204-5p belongs to oncosuppressive microRNAs which levels were diminished in various cancer types. Therefore the aim of this study was to evaluate miR-204-5p inhibition on melanoma cells viability as well as to determine whether miR-204-5p LNATM-inhibitors application lead to toxic effects *in vivo* studies. MiR-204-5p mimic/inhibitor application resulted to a slight most likely nonspecific modulation of melanoma cells proliferation after 96 h. Bioinformatic analysis revealed that miR-204-5p implicated in estrogen signaling pathway, lysine degradation, signaling pathways regulating pluripotency of stem cells, melanogenesis, transcriptional misregulation in cancer, miR-204-5p LNATM-inhibitor injection into mice within two weeks weakly did not result to toxic effects but resulted in miR-204-5p levels diminishing.

Key words: miR-204-5p, LNATM-inhibitors, melanoma B16, MTT, signal pathways.