

УДК 575.224:616-006.44

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ РЕГУЛЯЦИЮ ГЕМОПОЭЗА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ОПУХОЛЕЙ У ОБЛУЧЕННЫХ МЫШЕЙ

© 2020 г. Д. В. Салеева^{1,*}, В. Ф. Михайлов¹, Л. М. Рождественский¹,
Л. В. Шуленина¹, Н. Ф. Раева¹, Г. Д. Засухина^{1,2}

Представлено академиком РАН Л.А. Ильиным

Поступило 04.12.2019 г.

После доработки 04.12.2019 г.

Принято к публикации 04.12.2019 г.

В опытах на 183 мышах (СВА × С57В1) F1 изучали отдаленные эффекты на 8 и 10 месяцы после воздействия низкоэнергетического пролонгированного γ -облучения в дозе 12.6 Гр (10 мГр/мин). На 8 месяцев в костном мозге (КМ) отмечено увеличение экспрессии транскрипционного фактора (ТФ) NFkB и его генов-мишеней (*iNOS*, *G-SCF*). На 10 месяцев у 14 из 94 мышей отмечено появление злокачественных лимфом в печени, брюшной полости и подкожно. В КМ этих мышей обнаружено ингибирование транскрипции генов *PTEN*, *NFkB*, *iNOS*, а также снижение содержания длинных некодирующих РНК (днРНК) *lnc p21*, *NEAT1* и микроРНК *miR-125b*. На 10 месяцев в КМ облученных мышей без выхода опухолей отмечается ингибирование экспрессии гена *NFkB(p65)* и *miR-125b*. Данные свидетельствуют о дисрегуляции P53-системы поддержания стабильности генома в КМ у облученных мышей. Эти показатели будут исследованы на предмет возможности их использования в качестве маркеров риска развития радиоционно-индуцированных опухолей.

Ключевые слова: P53, NFkB, микроРНК, днРНК, γ -облучение, отдаленные эффекты облучения, лимфома

DOI: 10.31857/S2686738920020225

Применение современных технологий для анализа генома и транскриптома показывает, что онкотрансформация клеток связана со структурными нарушениями генов, кодирующих белки и регуляторные РНК, и изменениями их экспрессии. Актуальной задачей является исследование этих генетических и эпигенетических изменений, поскольку они могут выступать в качестве показателей риска развития опухолей.

В настоящее время показано, что появление в организме злокачественных новообразований, включая солидные опухоли, активирует пластичность клеток в опухолевом микроокружении и КМ, направленную как на стимуляцию врожденного иммунитета, так и защиту новообразований [1].

В процессе онкотрансформации иммунокомпетентных клеток могут принимать участие различные факторы: активные формы кислорода (АФК), регуляторные РНК и цитокины. В литературе описано возникновение лимфом в отдаленные сроки после действия сублетальных доз радиации на мышей [2].

Целью нашей работы явилось изучение изменения экспрессии генов и некодирующих РНК в КМ мышей в отдаленные сроки после воздействия низкоэнергетического пролонгированного облучения.

В работе использовали мышей-гибридов (СВА × С57В1) F1, самцов массой 20–24 г. Исследования проводили в соответствии с требованиями нормативно-правовых актов. Пролонгированное облучение мышей в дозе 12.6 Гр осуществляли на цезиевой гамма-установке Панорама-3С (10 мГр/мин). После облучения определяли профили экспрессии мРНК генов (*p53*, *PTEN*, *TNF α* , *NFkB(p50)*, *NFkB(p65)*, *G-SCF*, *IAP-1*, *IAP-2*, *IkB α* , *iNOS*, *TAL1*, *CTCF*), днРНК (*NEAT1*, *MALAT1*, *DINO*, *lnc p21*) и микроРНК (*miR-21*, *miR-125b*, *miR-145*) в КМ, полученном от 89 и 94 мышей на 8 и 10 месяцы после облучения соответственно.

¹ ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

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

*e-mail: dasha_saleeva@inbox.ru

Таблица 1. Содержание мРНК генов, микроРНК и днРНК (медиана и квартили), имеющих статистически значимые различия между изученными группами в костном мозге мышей на 8 и 10 месяцы после облучения

8 месяц после облучения									
Мыши	NFkB(50)	NFkB(p65)	G-SCF	iNOS	IAP-1	miR-125b			
Контрольные	1.00 [0.9–1.37]	1.00 [0.93–1.07]	1.00 [0.55–1.04]	1.00 [0.71–1.07]	1.00 [0.87–1.15]	1.00 [0.44–1.32]			
Облученные	1.27* [1.11–1.57]	1.23* [1.00–1.52]	1.19* [0.97–1.37]	1.32* [1.07–1.74]	0.81* [0.71–1.00]	0.12* [0.04–0.33]			
10 месяц после облучения									
Мыши	PTEN	NFkB (p65)	IkBa	iNOS	NEAT1	Lnc p21	CTCF	TAL1	miR-125b
Контрольные	1.00 [0.64–1.46]	1.00 [0.81–1.87]	1.00 [0.87–1.41]	1.00 [0.76–1.62]	1.00 [0.55–1.57]	1.00 [0.93–1.41]	1.00 [0.84–1.93]	1.00 [0.9–1.57]	1.00 [0.66-2.64]
Облученные	0.9 [0.68–1.37]	0.87* [0.62–1.15]	0.81* [0.70–1.23]	1.07 [0.64–1.68]	0.55 [0.37–1.11]	1.15 [0.76–1.87]	0.87 [0.59–1.27]	0.78* [0.64–1.11]	0.23* [0.05-1.74]
Облученные, с опухолями	0.64*,** [0.45–0.78]	0.79* [0.66–0.90]	1.11 [0.74–1.28]	0.62*,** [0.54–1.04]	0.42* [0.24–0.84]	0.76** [0.52–1.24]	0.58* [0.45–1.04]	0.71* [0.5–0.9]	0.04*,** [0.01-0.41]

Примечание. * – Отличия показателей в группах “Контроль” и “Облучение” или “Контроль” и “Опухоль” статистически значимы ($p < 0.05$). ** – отличия показателей между группами “Облучение” и “Опухоль” статистически значимы ($p < 0.05$). Медианы групп контроля (необлученные мыши) на 8 и 10 месяцы после облучения приняты за единицу.

Общую РНК и кДНК получали с использованием наборов фирмы ООО “Лаборатория Изоген” (Россия), ПЦР-РВ осуществляли с применением наборов “Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)” и специфических праймеров. Последовательность праймеров подбирали с помощью базы данных NCBI, а условия проведения ПЦР – экспериментальным путем. Уровень экспрессии исследуемых показателей нормировали относительно мРНК гена GAPDH.

Расчет относительной экспрессии исследуемых показателей проводили по методу $\Delta\Delta Ct$. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы “STATISTICA7.0”. Для оценки достоверности различий применяли непараметрический критерий Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0.05$.

Статистически значимые отличия показателей на 8 и 10 месяцы после облучения от данных необлученного контроля представлены в табл. 1. На 8 месяц наблюдалось увеличение содержания мРНК в КМ у облученных мышей для генов *NFkB(p50)*, *NFkB(p65)*, *G-SCF* и *iNOS*.

NF-кВ индуцирует экспрессию цитокинов, а также гена *MDM2* и miR-21, которые ингибируют активность p53-зависимой системы сохранения стабильности генома и, таким образом, способствуют увеличению жизнеспособности облученных клеток с поврежденным геномом и сохранению их пролиферативной активности [3].

Индукцибельная синтаза оксида азота (iNOS) генерирует свободные радикалы, оказывающие

генотоксическое действие и участвующие в развитии рака [4].

На 8 месяц отмечается увеличение экспрессии NFkB и его генов – мишеней (*iNOS*, *G-SCF*), контролирующих пролиферацию и сохранение клеток с поврежденным геномом, что помогает злокачественным клеткам сохранять способность к выживанию. Следует отметить, что активацию NFkB в клетках КМ наблюдали уже на 6 месяц после облучения (1 Гр) мышей [5].

Таким образом, увеличение экспрессии изученных генов в КМ на 8 месяц может способствовать развитию состояния нестабильности генома, и, как следствие, выступать в качестве предикторов онкотрансформации клеток.

У 14 из 94 мышей, проанализированных на 10 месяц, гистологически были выявлены лимфомы в печени, брюшной полости и подкожно. В КМ мышей с опухолями отмечается значительное снижение экспрессии мРНК генов *NFkB(p65)*, *iNOS*, *CTCF*, *TAL1*, днРНК *NEAT1* и miR-125b по сравнению с показателями группы контроля и мРНК генов *PTEN*, *iNOS*, днРНК *lnc p21* и miR-125b по отношению к группе облученных животных без опухолей.

Следует отметить, что к 10 месяцу в КМ мышей с опухолями гены и микроРНК, обладающие свойствами онкогенов (*NFkB(p65)*, *TAL1*, *lnc NEAT1* и miR-125b), либо онкосупрессоров (*PTEN*, *lnc p21*) снижают свою активность. У таких животных изменение экспрессии РНК показателей может быть связано не только с облуче-

нием, но и проникновением в КМ выделяемых опухолями “онкосом”.

С другой стороны, ниши, с поврежденным геномом возникшие в гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) и сохранившиеся на 8 и 10 месяцев после облучения и возникающий из них пул прогениторных клеток в отдаленные сроки после облучения при выходе из КМ, увеличивают риск возникновения периферических новообразований.

Применение регрессионного анализа показало, что уровень экспрессии NFκB, определяемый на 8 месяц в КМ облученных мышей коррелировал с последующим выходом лимфом на 10 месяц после воздействия радиации ($R = 0.9$; $p < 0.05$).

Ген *PTEN*, lnc p21 и NEAT1 являются мишенями ТФ белка Р53. Мутации в гене *p53* или его связывание с MDM2 могут ингибировать транскрипционную активность p53 и снижать экспрессию этих его мишеней [6].

PTEN является онкосупрессором и контролирует процессы образования АФК, клеточной пролиферации и стабильность генома, а также влияет на развитие Т- и В-клеток [7].

Уровень экспрессии miR-125b в КМ важен для регуляции ранних этапов дифференцировки кроветворных клеток. Высокая экспрессия miR-125b наблюдается в ГСК и необходима для сохранения их пула. Нарушение процессов самообновления и дифференцировки ГСК могут способствовать онкотрансформации [8].

Lnc p21 подавляет пролиферацию клеток и индуцирует апоптоз. Ее взаимодействие с MDM2 приводит к активации ТФ Р53. Наблюдаемый нами на 10 месяц в КМ пониженный уровень lnc p21 формируется и в лимфомах, и может служить прогностическим маркером.

Таким образом, изменение активности генов, днРНК и микроРНК, участвующих в гемопоэзе,

может свидетельствовать о пластичности клеток не только в микроокружении опухоли, но и в КМ. Изучение экспрессии генов и некодирующих РНК и их взаимодействия важно для понимания процессов канцерогенеза, и в перспективе может быть использовано в качестве показателей риска развития лимфом и терапевтических мишеней для лечения новообразований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке программы развития ядерной медицины “АО Наука и инновации” ГК Росатом.

ИНФОРМАЦИЯ О КОНФЛИКТЕ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giles A., Chien C., Reid C., et al. // *Pharmacology & Therapeutics*. 2016. V. 168. P. 53–60.
2. Ina Y., Tanooka H., Yamada T., et al. // *Radiation Research*. 2005. V. 163. № 2. P. 153–158.
3. Wang W., Subhasree A., Zhang R. // *Curr. Med. Chem.* 2015. V. 22. № 2. P. 264–289.
4. Bignon E., Rizza S., Filomeni G., et al. // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2019. V. 17. P. 415–429.
5. Jangiam W., Udomtanakunchai C., Reungpatthanaphong P., et al. // *Doze-Response*. 2018. V. 16. № 4.
6. Михайлов В., Шуленина Л., Васильева И., и др. // *Усп. совр. Биол.* 2018. V. 138. № 5. P. 427–445.
7. Martelli A., Paganelli F., Fazio A., et al. // *Cancers*. 2019. V. 11. № 5. P. 629.
8. Shao L., Luo Y., Zhou D. // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014. V. 20. № 9. P. 1447–1462.

ANALYSIS OF CHANGES IN THE PARAMETERS INVOLVED IN THE REGULATION OF HEMATOPOIESIS IN THE FORMATION OF TUMORS IN IRRADIATED MICE

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

^a State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

^b The Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*e-mail: dasha_saleeva@inbox.ru

Presented by Academician of the RAS L.A. Il'in

We studied the long-term effects that occur in 183 mice (CBA × C57Bl) F1 at 8 and 10 months after low-power prolonged irradiation with dose of 12.6 Gy (10 mGy/min). It has been shown an increasing of expression of transcription factor NFκB and its target genes (*iNOS*, *G-SCF*) in cells of bone marrow at 8 month after radiation. At 10 month we discovered lymphomas in the liver, abdominal region, and subcutaneously (14 mice) and noticed an inhibition of transcription of the *PTEN*, *NFκB*, *iNOS* genes and long non-coding

RNA (lncRNA) lnc p21, NEAT1 and miRNA (miR-125b). It has been established an inhibition of expression of *NFkB* and miR-125b in mice cells of bone marrow without tumors at 10 month after irradiation. The data confirms the indication of dysregulation of the P53-system functioning for maintaining genome stability in bone marrow in irradiated mice. These indicators can be used as molecular biomarkers to determine the risk of developing radiation-induced tumors.

Keywords: P53, NFkB, microRNA (miR), long non-coding RNA (lncRNA), irradiation, long-term effects of irradiation, lymphoma