

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МИКРОРНК
В ОТВЕТ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО**

Л.А. Умарова, А.А. Пономарева, А.Ю. Добродеев

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Н.В. Чердынцева

Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г.Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: umarova_laura95@mail.ru

**INVESTIGATION OF CHANGES IN LEVEL OF CIRCULATING MICRORNAS
IN RESPONSE TO LUNG CANCER TREATMENT**

L.A. Umarova, A.A. Ponomaryova, A.Yu. Dobrodeev

Scientific supervisor: Prof., Dr. N.V. Cherdyntseva

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: umarova_laura95@mail.ru

Abstract. *Expression levels of cancer-associated microRNAs were reported to be altered in serum/plasma samples from lung cancer patients compared with healthy subjects. The purpose of this study was to estimate the value of 5 selected miRNAs plasma levels as markers of response to antitumor therapy in lung cancer patients. Expression levels of miR-19b, miR-126, miR-25, miR-205, miR-125b have been evaluated by quantitative reverse transcription PCR versus control miR-16 in blood plasma samples from 23 lung cancer (LC) patients. Plasma samples were obtained from LC patients before treatment, within 30 days after completing two courses of chemotherapy and 15 days after surgery. Repeated Measures ANOVA demonstrated that miR-19b expression levels were decreased in PC and increased in PO samples. These changes were characterized by a significant quadratic trend ($P = 0.03$). Expression levels of miR-125b increased both after chemotherapy and again after surgery and demonstrated a significant linear trend ($P = 0.03$). The miR-125b/miR-19b ratio changed during the course of the antitumor treatment with a significant linear trend ($P = 0.04$). Individual analysis in the groups of patients with partial response to chemotherapy and patients with stable or progressive disease showed different trends for miR-19b, miR-125b and miR-125b/miR-19b ratio between the groups. Dynamic change of trends for miR-19b and miR-125b expression levels and miR-125b/miR-19b ratio in the blood plasma have shown a potentiality to discriminate types of response to antitumor therapy in lung cancer patients. Further in-depth investigation is needed to establish a direct link the miRNAs expression levels in blood plasma with therapy response.*

Введение. МикроРНК – это короткие некодирующие молекулы РНК, которые осуществляют посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов. МикроРНК, присутствующие в биологических жидкостях известны как «циркулирующие», они могут играть роль диагностического биомаркера при различных онкологических заболеваниях, в том числе при раке легкого (РЛ) [1]. Известно, что микроРНК в крови обладают высокой стабильностью в плазме и устойчивостью к рибонуклеазам, к неблагоприятным физическим условиям. Такие их свойства позволяют эффективно выделить циркулирующие микроРНК и измерить их с высокой специфичностью и чувствительностью [2]. Показано, что уровень экспрессии некоторых микроРНК, в частности микроРНК-19b, -25, -126, -21, -205,

- 183, -210, -486, -223, -125б, существенно изменяется в плазме/сыворотке крови больных раком легкого (РЛ) по сравнению со здоровыми донорами. Целью настоящего исследования явилась оценка значимости изменений уровня микроРНК-19b, -25, -126, -205, -125б плазмы крови как маркеров ответа на противоопухолевую терапию и маркеров прогноза выживаемости у больных РЛ [3].

Материалы и методы. В исследование было включено 30 больных РЛ (T₃N₁₋₃M₀), с морфологически верифицированным диагнозом, в возрасте 40-75 лет, находившихся на лечении в клинике НИИ онкологии. Материалом для исследования послужила венозная кровь, которая забиралась до лечения, после 2 курсов химиотерапии и на 10-15 сутки после операции. Образцы крови разделяли на плазму и клетки крови. МикроРНК из плазмы крови выделяли с помощью метода, основанного на фенол-хлороформной экстракции [4]. Плазму крови инкубировали с однофазным экстракционным раствором. Тотальную микроРНК очищали на стекловолокнистых фильтрах (BioSilica Ltd, г. Новосибирск, Россия), затем проводили пересаживание РНК с использованием гликогена и растворение в воде (без РНК-аз). Реакцию обратной транскрипции проводили по методике, описанной ранее [5]. Каждую реакцию проводили в конечном объеме 10 мкл, содержащем 3 мкл РНК, 50 нМ специфического праймера для каждой микроРНК, 1 U ингибитора RiboLockRNAse (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 100 U MMLV обратной транскриптазы (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 × MMLV буфер и 250 мкМ dNTP. Условия реакции были следующими: 16°C – 30 мин, 42°C – 30 мин, 70°C – 10 мин. Далее полученную кДНК использовали для постановки количественной TaqMan ПЦР. Каждую реакцию ставили в общем объеме 30 мкл, содержащем компоненты: 2,5 мкл продукта реакции обратной транскрипции, 1,25 U Taq ДНК полимеразы (BiolabMix, Россия), 1× ПЦР-буфер, 4 mM MgCl₂, 250 мкМ dNTP, 600 нМ прямой праймер, 800 нМ универсальный обратный праймер и 300 нМ специфической TaqMan пробы. Амплификацию проводили в течение 50 циклов в следующем режиме: 95°C – 15 сек, 60°C – 60 сек. Уровень экспрессии микроРНК рассчитывали по методу dCt. В качестве внутреннего стандарта использовали микроРНК-16, уровень экспрессии которой относительно стабилен [6].

Результаты. Согласно полученным данным установлено, что изменения уровня экспрессии микроРНК-19б в плазме крови пациентов на этапах динамического наблюдения при проведении противоопухолевой терапии характеризуются значимым квадратичным трендом ($p = 0,03$). Уровень экспрессии микроРНК-125б значимо повышается и характеризуется линейным трендом ($p = 0,03$) (табл. 1).

Таблица 1

Сравнение уровня циркулирующих микроРНК в плазме крови больных РЛ до и после проведенного лечения методом ANOVA: Тест внутрисубъектных эффектов и анализ трендов

МикроРНК	dCt средние значения (а-б-в)*	Тест внутрисубъектных эффектов (сферичность)		Анализ трендов (линейный)		Анализ трендов (квадратичный)	
		F	P	t	P	t	p
микроРНК-19б	1,3 – 2,7 – 1,5	4,28	0,03	0,54	0,60	-2,48	0,03
микроРНК-126	1,3 – 1,2 – 1,1	0,36	0,70	-0,66	0,52	0,29	0,77
микроРНК-25	2,2 – 1,9 – 1,9	0,53	0,60	-0,78	0,45	0,61	0,55

микроРНК-205	9,4 – 9,1 – 8,8	0,61	0,55	-1,10	0,29	0,01	0,99
микроРНК-125b	12 – 11 – 11	4,23	0,03	-2,44	0,03	1,43	0,18
микроРНК-125b/микроРНК-196	11 – 8,6 – 9,0	3,33	0,05	-2,27	0,04	1,50	0,16

Примечание: * - средние значения dCt для исследуемых микроРНК, рассчитанные для образцов плазмы крови больных РЛ до лечения (а), после химиотерапии (б) и после операции (в); p - уровень значимости.

Отношение микроРНК-125b/196 значительно изменяется в образцах плазмы крови, собранных после химиотерапии и после операции, и при этом характеризуется линейным трендом ($p = 0,04$). В ходе анализа отдельных групп пациентов в зависимости от ответа на химиотерапию (с частичной регрессией – группа 1 и со стабилизацией или прогрессией – группа 2) выявлены также разные тренды экспрессии микроРНК-196, -125b и микроРНК-125b/микро-196 между этими группами. Кроме того, выявлена значимая положительная корреляция между изменениями уровня экспрессии циркулирующих микроРНК-25 и микроРНК-205 в плазме крови больных РЛ (общая группа) ($r = 0,751$, $p < 0,0001$). Показана ассоциация изменений отношения микроРНК-125b/микро-196 с показателями общей выживаемости у больных РЛ (long-rang тест, $p < 0,04$).

Заключение. Таким образом, динамические изменения трендов уровня экспрессии микроРНК-196, микроРНК-125b и микроРНК-125b/микро-196 свидетельствуют о потенциальной возможности использования данных показателей как маркеров предсказания ответа на противоопухолевое лечение. Представляются перспективными дальнейшие исследования с целью оценки прямой связи между уровнем экспрессии микроРНК в плазме крови с ответом на терапию и выживаемостью у больных РЛ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Monteys A. M., Spengler R. M., Wan J., Tecedor L., Lennox K. A., Xing Y., Davidson L. (2010) Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *Rna*, no. 16(3), pp. 495–505.
2. Allegra A., Alonci A., Campo S., Penna G., Petrunaro A., Gerace D., Musolino C. (2012) Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *International Journal of Oncology*, no. 41(6), pp. 1897–1912.
3. Xing L., Su J., Guarnera M. A., Zhang H., Ling C., Zhou R., Sanford A. (2015) microRNA biomarkers for identifying lung cancer in indeterminate solitary pulmonary nodules. *Clinical Cancer Research*, no. 21(2) pp. 484–489.
4. Wu C., Cao Y., He Z., He J., Hu C., Duan H., Jiang J. (2014) Serum levels of miR-19b and miR-146a as prognostic biomarkers for non-small cell lung cancer. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, no. 232, pp 85-95.
5. Boldrini L., Giordano M., Servadio A., Ali G., Cocco A., Lucchi M., Bertoglio P., Melfi F., Mussi F., Fontanini G. (2014) Prognostic role of miR-205 in early stage (T1N0) non-small cell lung cancer. *Advances in lung cancer*, no. 3, pp. 45-51.
6. Ulivi P., Zoli W. (2014) miRNAs as non-invasive biomarkers for lung cancer diagnosis. *Molecules*, no. 19, pp. 8220-8237.