

Количественные изменения проонкогенных и опухоль-супрессирующих микроРНК в брыжеечном лимфатическом узле при экспериментальном раке молочной железы и фотодинамической терапии

Кабаков А.^{1*}, Казаков О.¹, Повещенко А.¹, Черкас В.¹, Бодрова Н.³,
Конончук В.^{1, 2}, Гуляева Л.²

¹ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² НИИ молекулярной биологии и биофизики – структурное подразделение ФГБНУ ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

* kabakov_av85@mail.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, miRNA, брыжеечный лимфатический узел, фотодинамическая терапия

Мотивация и цель: По последним данным о глобальном бремени рака, в 2020 г. было зарегистрировано около 2,26 млн случаев рака молочной железы, это позволяет говорить, что рак молочной железы является наиболее часто диагностируемым раком в мире. На уровень смертности могут влиять множество факторов, в том числе задержка в диагностике и отсутствие эффективной терапии [1]. Несмотря на множество доступных инструментов в терапии РМЖ, по-прежнему необходимы новые технологии для лечения на всех стадиях рака молочной железы. Относительно новый терапевтический метод, который может оказаться золотым стандартом в лечении неопластических опухолей в сравнении с традиционными методами терапии, является фотодинамическая терапия [2]. МикроРНК представляют собой класс небольших одноцепочечных некодирующих РНК, играющих важную регуляторную роль в экспрессии генов. МикроРНК могут использоваться в качестве диагностических или прогностических биомаркеров при раке молочной железы [3, 4]. Однако количественные изменения проонкогенных miRNA (-21, -27a, -221) и опухоль-супрессирующей miRNA-429 в отдаленных от первичного опухолевого очага лимфатических узлах при экспериментальном раке молочной железы после проведения фотодинамической терапии по литературным данным не были исследованы, что является актуальной научной задачей.

Целью исследования стал анализ количественных изменений проонкогенных и опухоль-супрессирующей miRNAs в отдаленном от первичного опухолевого очага лимфатическом узле у крыс-самок Вистар после проведения фотодинамической терапии экспериментального рака молочной железы.

Методы и алгоритмы: Работа выполнена на половозрелых самках Вистар ($n = 60$). На момент индукции РМЖ возраст крыс-самок Вистар составлял 3 месяца, вес животных составлял 250–300 граммов. Животные участвующие в эксперименте были разделены на 3 группы: 1-я – интактные крысы ($n = 20$); 2-я – крысы с раком молочной железы (РМЖ) без лечения ($n = 20$); 3-я – крысы с РМЖ после

проведения фотодинамической терапии (РМЖ+ФДТ) ($n = 20$). Индуцирование РМЖ выполнялось 5-кратным подкожным введением N-метил-N-нитрозомочевины (Sigma) с интервалом в 7 дней в область 2-й правой молочной железы. Через 24 недели от начала индукции в 3-й группе крыс-самок Вистар проводилась фотодинамическая терапия РМЖ лазерным аппаратом Российского производства «ЛАХТА-МИЛОН» (группа компаний «МИЛОН»). Процедура ФДТ включает введение в организм тропного к опухоли фотосенсибилизатора. Фотосенсибилизатор «Радахлорин» вводился крысам-самкам Вистар однократно внутрибрюшинно (из расчета 1.2 мг/кг) за 3 ч до проведения лазерного облучения опухоли молочной железы. Световое воздействие на опухоль молочной железы проводили излучением с длиной волны 662 нм в дозе 300 Дж/см². Из эксперимента животных выводили через 27 недель от начала индукции РМЖ под наркозом (40 мг/кг внутрибрюшинно нембутала; Sigma), что обуславливало прижизненный забор лимфы. Забор органов: ткани молочной железы, опухолевой ткани и брыжеечных лимфатических, выполнялся после выведения животных из эксперимента. После проведения иммуногистохимического и гистологического исследования, верифицирован аналог люминального В-типа РМЖ человека [5]. Для определения количества проонкогенных miRNA (-21, -27a, -221) и опухоль-супрессирующей miRNA-429 в биологических образцах проводили ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием реагентов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Lab., USA), в качестве гена сравнения использовали РНК U87 (все реагенты производства «Вектор-Бест», Российская Федерация). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Q1) и верхним (Q3) квантилями, достоверность различия рассчитывали по U-критерию Манна-Уитни, и принимали при значениях $p < 0.05$.

Результаты: В группе РМЖ без лечения выявлено увеличение количества miRNA-221 в 4.6 раза в сравнении с интактной группой. В группе РМЖ без лечения отмечено снижение количества проонкогенной miRNA-27a в 4.7 раза в сравнении с интактной группой животных. Значимое снижение количества проонкогенной miRNA-27a в группе РМЖ без лечения отмечалось и в лимфе в 2.3 раза (РМЖ без лечения – 0,48 (0.25–0.91) в сравнении с интактными животными – (1.12 (0.56–2.08), $p = 0.005$). Проонкогенная miRNA-221 количественно увеличилась в группе РМЖ без лечения в 5.4 раза в сравнении с интактной группой. В брыжеечном лимфатическом узле количество опухоль-супрессирующей miRNA-429 в группе РМЖ без лечения было снижено в 23.6 раза в сравнении с интактными крысами-самками Вистар. Количество miRNA-21 в группе РМЖ без лечения значимо не изменялось. В брыжеечном лимфатическом узле в группе РМЖ после проведения фотодинамической терапии количество проонкогенной miRNA-21 снизилось в 4.5 раза в сравнении с интактной группой. Количество проонкогенной miRNA-27a значимо не изменялось и оставалось на уровне группы РМЖ без лечения. После проведение ФДТ в брыжеечном лимфатическом узле количество проонкогенной miRNA-221 уменьшилось в 5 раз в сравнении с группой РМЖ без лечения. В брыжеечном лимфатическом узле в группе с фотодинамической терапией количество опухоль-супрессирующей miRNA-429 оставалось сниженным в 16.8 раза в сравнении с интактной группой и имела незначительные количественные изменения в сравнении с группой РМЖ без лечения.

Выводы: таким образом, нами установлено снижение проонкогенных микроРНК (miRNA-21 и miRNA-221) в брыжеечном лимфатическом узле после проведения ФДТ РМЖ. При этом количество проонкогенной miRNA-27a сохранялось сниженным и не отличалось от такового в группе РМЖ без лечения. Количество miRNA-429 в брыжеечном лимфатическом узле после ФДТ также оставалось на уровне группы крыс с РМЖ без лечения.

Quantitative changes in pro-oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in the mesenteric lymph node in experimental breast cancer and photodynamic therapy

Kabakov A.^{1*}, Kazakov O.¹, Poveshchenko A.¹, Cherkas V.¹, Bodrova N.^{1, 3},
Kononchuk V.^{1, 2}, Gulyaeva L.²

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Research Institute of Molecular Biology and Biophysics – structural subdivision of federal state budgetary scientific institution Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

³ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

* kabakov_av85@mail.ru

Key words: breast cancer, miRNA, mesenteric lymph node, photodynamic therapy

Motivation and Aim: According to the latest data on the global burden of cancer, there were approximately 2.26 million cases of breast cancer in 2020, making breast cancer the most commonly diagnosed cancer in the world. Moreover, breast cancer is the leading cause of death from tumor diseases among women around the world. Mortality rates can be influenced by many factors, including delay in diagnosis and lack of effective therapy [1]. Despite the many available tools in breast cancer therapy, new technologies are still needed to treat all stages of breast cancer. A relatively new therapeutic method that may prove to be the gold standard in the treatment of neoplastic tumors in comparison with traditional methods of therapy is photodynamic therapy (PDT) [2]. MicroRNAs are a class of small, single-stranded, noncoding RNAs that play important regulatory roles in gene expression. MicroRNAs can be used as diagnostic or prognostic biomarkers in breast cancer [3, 4]. However, quantitative changes in pro-oncogenic miRNA (-21, -27a, -221) and tumor-suppressive miRNA-429 in lymph nodes distant from the primary tumor site in experimental breast cancer after photodynamic therapy and subsequent surgical treatment have not been studied according to the literature, which is an urgent scientific task.

The aim of the study was to analyze quantitative changes in pro-oncogenic and tumor-suppressive miRNAs in a lymph node distant from the primary tumor site in female Wistar rats after photodynamic therapy for experimental breast cancer.

Methods and Algorithms: The work was performed on sexually mature Wistar females (n=60). At the time of breast cancer induction, the age of female Wistar rats was 3 months, the weight of the animals was 250–300 grams. The animals participating in the experiment were divided into 3 groups: 1-st – intact rats (n = 20); 2-nd – rats with

breast cancer (BC) without treatment ($n = 20$); 3-rd – rats with breast cancer after photodynamic therapy (breast cancer + PDT) ($n = 20$). Induction of breast cancer was performed by 5-fold subcutaneous injection of N-methyl-N-nitrosourea (Sigma) with an interval of 7 days into the area of the second right breast. After 24 weeks from the start of induction, photodynamic therapy of breast cancer was carried out in the 3rd group of female Wistar rats using a Russian-made laser device "LAKHTA-MILON" (MILON group of companies). The PDT procedure involves the introduction of a tumor-tropic photosensitizer into the body. The photosensitizer "Radachlorin" was administered to female Wistar rats once intraperitoneally (at a rate of 1.2 mg/kg) 3 hours before laser irradiation of the mammary tumor. Light exposure to the breast tumor was carried out with radiation with a wavelength of 662 nm at a dose of 300 J/cm². Animals were removed from the experiment 27 weeks from the start of breast cancer induction under anesthesia (40 mg/kg intraperitoneal Nembutal; Sigma), which determined intravital lymph collection. Organ sampling: mammary gland tissue, tumor tissue and mesenteric lymphatic tissue was performed after the animals were removed from the experiment. After immunohistochemical and histological studies, an analogue of human luminal B-type breast cancer was verified [4]. To determine the amount of pro-oncogenic miRNA (-21, -27a, -221) and tumor-suppressive miRNA-429 in biological samples, real-time RT-PCR was performed using reagents on a CFX96 amplifier (Bio-Rad Lab., USA), as U87 RNA was used for the reference gene (all reagents produced by Vector-Best, Russian Federation). Statistical processing of the data was carried out using the Statistica 10 software package, measures of central tendency and dispersion are described by the median (Me), lower (Q1) and upper (Q3) quartiles, the significance of the difference was calculated using the Mann-Whitney U test and was accepted at p values < 0.05 .

Results: In the breast cancer group without treatment, an increase in the quantity of miRNA-221 was detected by 4.6-fold compared to the intact group. In the breast cancer group without treatment, there was a 4.7-fold decrease in the quantity of pro-oncogenic miRNA-27a compared to the intact group of animals. A significant decrease in the quantity of pro-oncogenic miRNA-27a in the group of breast cancer without treatment was also observed in the lymph by 2.3-fold (breast cancer without treatment – 0.48 (0.25–0.91) in comparison with intact animals – (1.12 (0.56–2.08), $p = 0.005$). Pro-oncogenic miRNA-221 increased quantitatively in the breast cancer group without treatment by 5.4 -fold compared to the intact group. In the mesenteric lymph node, the quantity of tumor-suppressive miRNA-429 in the breast cancer group without treatment was reduced by 23.6-fold compared to intact female Wistar rats. The quantity of miRNA-21 in the breast cancer group without treatment did not significantly change. In the mesenteric lymph node in the breast cancer group after photodynamic therapy, the quantity of pro-oncogenic miRNA-21 decreased by 4.5-fold compared to the intact group. The quantity of pro-oncogenic miRNA-27a did not significantly change and remained at the level of the breast cancer group without treatment. After PDT in the mesenteric lymph node, the quantity of pro-oncogenic miRNA-221 decreased by 5 times compared to the breast cancer group without treatment. In the mesenteric lymph node in the group with photodynamic therapy, the quantity of tumor-suppressive miRNA-429 remained reduced by 16.8-fold compared to the intact group and had minor quantitative changes compared to the breast cancer group without treatment.

Conclusion: Hereby, the study revealed a decrease in pro-oncogenic microRNAs (miR-21 and miR-221) in the mesenteric lymph node after photodynamic therapy of BC. At

the same time, the quantity of pro-oncogenic miR-27a in this group remained decreased and did not differ from the group with breast cancer without treatment. The quantity of miR-429 in the regional lymph node after PDT of breast cancer remained at the level of the group of rats with breast cancer without treatment.

Список литературы/References

1. Siegel R.L. et al. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7-33. doi 10.3322/caac.21654
2. Li J. et al. Non-invasive biomarkers for early detection of breast cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(10):2767. doi 10.3390/cancers12102767
3. Liang Y.K. et al. MiR-221/222 promote epithelial-mesenchymal transition by targeting Notch3 in breast cancer cell lines. *NPJ Breast Cancer.* 2018;4:20. doi 10.1038/s41523-018-0073-7
4. Казаков О.В., Кабаков А.В., Повешенко А.Ф., Конончук В.В., Стрункин Д.Н., Гуляева Л.Ф., Коненков В.И. Влияние фотодинамической терапии на уровень микроРНК в тканях рака молочной железы крыс-самок Вистар. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2022;173(4):452-455
[Kazakov O.V., Kabakov A.V., Poveshchenko A.F., Kononchuk V.V., Strunkin D.N., Gulyaeva L.F., Konenkov V.I. Effect of photodynamic therapy on the microRNA level in breast cancer tissues of female Wistar rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2022;173(4):444-447]
5. Кабаков А.В., Лыков А.П., Морозов Д.В., Казаков О.В., Повешенко А.Ф., Райтер Т.В., Стрункин Д.Н., Коненков В.И. Фенотипическая характеристика химически индуцированной опухоли молочной железы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2017;163(4):490-493
[Kabakov A.V., Lykov A.P., Morozov D.V., Kazakov O.V., Poveshchenko A.F., Raiter T.V., Strunkin D.N., Konenkov V.I. Phenotypical Characteristics of Chemically Induced Mammary Tumor. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2017;163(4):490-492. doi 10.1007/s10517-017-3835-6]