

Влияние РМЖ и оперативного лечения РМЖ на количество miR-21, miR-27a, miR-221 и miR-429 в тимусе

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

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

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

³ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

* kazakoff_oleg@mail.ru

Ключевые слова: рак молочной железы; тимус, микроРНК, оперативное лечение

Мотивация и цель: Изучение взаимосвязей количества микроРНК в тимусе, как центральном органе иммунной системы, при РМЖ и его лечении может иметь значение для понимания участия микроРНК в регуляции иммунного ответа, воздействии на процессы созревания, пролиферации, дифференцировки и активации клеток иммунной системы. Несмотря на то, что уровни онкогенных miR-21, miR-27a, miR-221 и опухоль-супрессирующей miR-429 экспрессируется во многих системах органов, включая иммунную систему, роль этих микроРНК в иммунном ответе организма на РМЖ и оперативное лечение РМЖ остается мало изученной. Цель исследования – сравнить уровни экспрессии микроРНК (miR-21, miR-27a, miR-221, miR-429) в тимусе при РМЖ и после оперативного лечения РМЖ.

Методы и алгоритмы: Работа выполнена на половозрелых самках крыс Вистар ($n = 60$) с соблюдением принципов надлежащей лабораторной практики и Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях. Исследование одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 180 от 28.04.2023). Возраст крыс на начало эксперимента — 3 мес (масса 250–300 г). Было сформировано 3 группы животных: 1-я — контрольная (интактные крысы, $n=20$), 2-я — РМЖ без лечения ($n=20$), 3-я — оперативное лечение РМЖ ($n=20$). Из эксперимента животных выводили через 6 мес и 3 нед от момента начала индукции РМЖ под наркозом (нембутал, 40 мг/кг внутривенно; Sigma). РМЖ моделировали 5-кратным подкожным введением N-метил-N-нитрозомочевина (Sigma) с интервалом 7 сут в область 2-й молочной железы справа. Оперативное лечение РМЖ проводили через 6 мес от момента начала индукции РМЖ, операция под наркозом (нембутал, «Sigma», 40 мг/кг внутривенно). Забор у животных тимуса выполнялся после выведения их из эксперимента. Тотальную РНК выделяли из ткани вилочковой железы с использованием набора реагентов «Вектор-Бест» по инструкции производителя. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию (ОТ) по матрице микроРНК. Для определения уровней проонкогенных miR-21, miR-27a, miR-221 и опухоль-супрессирующей miR-429 в биологических образцах проводили ОТ-ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Lab), в качестве гена

сравнения использовали малую РНК U6 («Вектор-Бест»). Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 10.0. Меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Q1) и верхним (Q3) квартилем; достоверность различий рассчитывали по *U* критерию Манна–Уитни при $p < 0.05$.

Результаты: В группе РМЖ без лечения, по сравнению с интактной группой, в тимусе уменьшено количество miR-21 в 7.3 раза (контроль – 3.89 (1.0–6.46), РМЖ без лечения – 0.53 (0.37–0.83)), уменьшено количество miR-27a в 10 раз (контроль – 2.0 (0.11–5.3), РМЖ без лечения – 0.19 (0.05–0.32)), уменьшено количество miR-221 в 4.3 раза (контроль – 1.52 (0.5–5.48), РМЖ без лечения – 0.35 (0.09–0.85)). Количество опухоль-супрессирующей miR-429 в тимусе не имеет значимого отличия от показателей интактной группы. Поскольку большинство мишеней miR-21 являются супрессорами опухолей, miR-21 связана с широким спектром раковых заболеваний, включая РМЖ. MiR-21, известная своей онкогенной активностью, также необходима для реализации иммунных ответов против опухоли [1]. По данным литературы, нокаут miR-21 у мышей замедлял пролиферацию как CD4⁺, так и CD8⁺ клеток, снижал выработку ими цитокинов и ускорял рост привитой опухоли. MiR-27a может действовать как супрессор при РМЖ [2]. MiR-27a может нацеливаться на TMEM170B (трансмембранный белок 170B, который участвует в негативной регуляции канонического сигнального пути Wnt), подавлять его, ингибируя сигнальный путь Wnt/ β -катенина и подавляя пролиферацию РМЖ [3]. Уменьшение уровня miR-221 в тимусе при РМЖ может быть обусловлено действием miR-221, которая связываясь с p53-зависимым модулятором апоптоза (PUMA), блокирует индуцированный белком p53 апоптоз, влияя на трансформацию клетки и активацию клеточной пролиферации. После оперативного лечения РМЖ, по сравнению с РМЖ без лечения, увеличение в тимусе количества miR-21 (в 3 раза) и miR-27a (в 3.9 раза) может быть обусловлено удалением основного очага опухоли молочной железы. Стрессовые реакции и хирургические манипуляции, вызванные хирургическим вмешательством, могут усиливать метастазирование опухоли за счет высвобождения ангиогенных факторов и подавления естественных клеток-киллеров (NK) и клеточного иммунитета. По данным литературы miR-27a действует как промотор ангиогенеза. По данным литературы miR-21 может активировать CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки через сигнальный путь PTEN/Akt, что указывает на ключевые функции miR-21 в обеспечении противоопухолевого иммунного ответа. Уровни экспрессии miR-21 на разных стадиях развития Т-клеток указывают на регуляторную функцию в этом процессе: заметно экспрессируются в незрелых тимоцитах (DN), а в более зрелых клетках снижаются [4]. Mir-21 действует как ключевой регулятор развития и функционирования регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) [5], регулирует пролиферацию Treg и экспрессию FOXP3 – транскрипционный фактор, регулирующий транскрипцию генов, ответственных за дифференцировку Т-клеток и экспрессию цитокинов и других факторов, участвующих в супрессии иммунного ответа. Повышенная экспрессия miR-27 в Т-клетках тимуса может отрицательно влиять на индукцию FOXP3 и развитие Treg в тимусе.

Выводы: При РМЖ снижение количества микроРНК (miR-21, miR27a, miR-221) в тимусе может быть обусловлено иммунной реакцией на рост опухоли и акцидентальной инволюцией тимуса. Удаление основного очага опухоли

молочной железы, по сравнению с РМЖ без лечения, вызывает увеличение в тимусе количества miR-21 и miR-27a. Экспрессия опухоль-супрессирующей miR-429 как в группе с РМЖ без лечения, так и после оперативного лечения РМЖ остается на уровне показателей интактной группы.

Influence of breast cancer and surgical treatment of breast cancer on the amount of miR-21, miR-27a, miR-221 and miR-429 in the thymus

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

* kazakoff_oleg@mail.ru

Key words: mammary cancer; thymus; microRNA; surgical treatment

Motivation and Aim: In breast cancer and its treatment, studying the relationship between the number of microRNAs in the thymus, as the central organ of the immune system, can be important for understanding the participation of microRNAs in the regulation of the immune response, the influence of microRNAs on the processes of maturation, proliferation, differentiation and activation of cells of the immune system. Despite the fact that the levels of oncogenic miR-21, miR-27a, miR-221 and tumor-suppressive miR-429 are expressed in many organ systems, including the immune system, the role of these microRNAs in the body's immune response on the breast cancer and surgical treatment of breast cancer remains little studied. The purpose of the study was to compare the expression levels of microRNAs (miR-21, miR-27a, miR-221, miR-429) in the thymus of breast cancer and after surgical treatment of breast cancer.

Methods and Algorithms: This work was carried out on mature female Wistar rats ($n = 60$), in compliance with the principles of good laboratory practice and Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council on the protection of animals used for scientific purposes. The local ethics committee (protocol No. 180 of April 28, 2023) approved this study. The age of the rats at the beginning of the experiment was 3 months (weight 250–300 g). 3 groups of animals were formed: 1st – control (intact rats, $n = 20$), 2nd – breast cancer without treatment ($n = 20$), 3rd – surgical treatment of breast cancer ($n = 20$). The animals were removed from the experiment after 6 months and 3 weeks from the start of breast cancer induction under anesthesia (Nembutal, 40 mg/kg intraperitoneally; Sigma). Breast cancer was modeled by 5-fold subcutaneous injection of N-methyl-N-nitrosourea (Sigma) with an interval of 7 days into the area of the 2nd breast on the right. Surgical treatment of breast cancer was carried out 6 months from the start of breast cancer induction, surgery under anesthesia (Nembutal, Sigma, 40 mg/kg intraperitoneally). The thymus was taken away from animals after they were

removed from the experiment. Total RNA was isolated from thymus tissue using the Vector-Best reagent kit according to the manufacturer's instructions. To obtain cDNA, reverse transcription (RT) was performed from the microRNA template. To determine the levels of pro-oncogenic miR-21, miR-27a, miR-221 and tumor-suppressive miR-429 in biological samples, real-time RT-PCR was performed on a CFX96 amplifier (Bio-Rad Lab), small RNA U6 was used as a reference gene ("Vector-Best"). Statistical processing of the results was carried out using the Statistica 10.0 program. Measures of central tendency and dispersion are described by median (Me), lower (Q1) and upper (Q3) quartiles; The significance of differences was calculated using the Mann–Whitney U test at $p < 0.05$.

Results: In the breast cancer group without treatment, compared with the intact group, the amount of miR-21 in the thymus was reduced by 7.3 times (control – 3.89 (1.0–6.46), breast cancer without treatment – 0.53 (0.37–0.83)), the amount of miR-27a in 10 times (control – 2.0 (0.11–5.3), breast cancer without treatment – 0.19 (0.05–0.32)), the amount of miR-221 was reduced by 4.3 times (control – 1.52 (0.5–5.48), breast cancer without treatment – 0.35 (0.09–0.85)). The amount of tumor-suppressive miR-429 in the thymus does not differ significantly from the indicators of the intact group. Because most miR-21 targets are tumor suppressors, miR-21 is associated with a wide range of cancers, including breast cancer. MiR-21, known for its oncogenic activity, is also required for the implementation of immune responses against tumors [1]. Knockout of miR-21 in mice slowed down the proliferation of both CD4+ and CD8+ cells, reduced their production of cytokines, and accelerated the growth of the grafted tumor, according to the literature. MiR-27a may act as a suppressor in breast cancer [2]. MiR-27a can target TMEM170B (transmembrane protein 170B, which is involved in the negative regulation of the canonical Wnt signaling pathway) suppress it, inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway and suppressing breast cancer proliferation [3]. A decrease in the level of miR-221 in the thymus in breast cancer may be due to the action of miR-221, which, by binding to the p53-dependent modulator of apoptosis (PUMA), blocks p53 protein-induced apoptosis, affecting on transformation cell and activation of cell proliferation. After surgical treatment of breast cancer, compared with breast cancer without treatment, removal of the main focus of the breast tumor may be condition an increase in the amount of miR-21 (3 times) and miR-27a (3.9 times) in the thymus. Stress responses and surgical manipulations induced by surgery may enhance tumor metastasis by releasing angiogenic factors and suppressing natural killer (NK) cells and cellular immunity. MiR-27a acts as a promoter of angiogenesis according to the literature. MiR-21 can activate CD4+ and CD8+ T cells through the PTEN/Akt signaling pathway, indicating the key functions of miR-21 in mediating the antitumor immune response. The expression levels of miR-21 at different stages of T cell development indicate a regulatory function in this process: are noticeably expressed in immature thymocytes (DN), and in more mature cells decreases [4]. Mir-21 acts as a key regulator of the development and functioning of regulatory T lymphocytes (Treg) [5], regulates the proliferation of Treg and the expression of FOXP3 – a transcription factor that regulates the transcription of genes responsible for the differentiation of T cells and the expression of cytokines and other factors involved in suppression of the immune response. Increased expression of miR-27 in thymic T cells may negatively influence on induction FOXP3 and development Treg in the thymus.

Conclusion: In breast cancer, a decrease in the amount of microRNAs (miR-21, miR27a, miR-221) in the thymus may be due to an immune response to tumor growth and

accidental involution of the thymus. Removal of the main focus of the breast tumor, compared to breast cancer without treatment, causes an increase in the amount of miR-21 and miR-27a in the thymus. The expression of tumor-suppressive miR-429 both in the group with breast cancer without treatment and after surgical treatment of breast cancer remains at the level of the intact group.

Список литературы/References

1. Ward L.D., Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D877-D881. doi 10.1093/nar/gkv1340
2. He W., Wang C., Mu R. et al. MiR-21 is required for anti-tumor immune response in mice: an implication for its bi-directional roles. *Oncogene.* 2017;36(29):4212-4223. doi 10.1038/onc.2017.62
3. Li X., Xu M., Ding L., Tang J. MiR-27a: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target in Tumors. *J Cancer.* 2019;10(12):2836-2848. doi 10.7150/jca.31361
4. Li M., Han Y., Zhou H. et al. Transmembrane protein 170b is a novel breast tumorigenesis suppressor gene that inhibits the Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Death Disease.* 2018;9(2):91. doi 10.1038/s41419-017-0128-y
5. Kunze-Schumacher H., Winter S.J., Imelmann E., Krueger A. miRNA miR-21 Is Largely Dispensable for Intrathymic T-Cell Development. *Front Immunol.* 2018;9:2497. doi 10.3389/fimmu.2018.02497
6. Hippen K.L., Loschi M., Nicholls J., MacDonald K.A., Blazar B.R. Effects of MicroRNA on Regulatory T Cells and Implications for Adoptive Cellular Therapy to Ameliorate Graft-versus-Host Disease. *Front Immunol.* 2018;9:57. doi 10.3389/fimmu.2018.00057