

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ БЕНЗ[А]ПИРЕНА НА ЭКСПРЕССИЮ AhR-РЕГУЛИРУЕМЫХ МИКРОРНК В ЛЁГКИХ САМОК И САМЦОВ КРЫС

С.В. Филиппов^{1,2*}, А.А. Ярушкин^{1,3}, А.К. Яковлева^{1,3}, В.В. Козлов^{1,4}, Л.Ф. Гуляева^{1,3}

¹Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, Федеральный исследовательский центр Фундаментальной и трансляционной медицины, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова 2/12; *эл. почта: imbb@niimbb.ru

²Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10

³Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

⁴Новосибирский областной клинический онкологический диспансер, 630000, Новосибирск, ул. Плеханова, 2

Многочисленными клинико-эпидемиологическими исследованиями показано, что курение является основным фактором риска развития рака лёгких, главным образом, из-за наличия в составе табачного дыма нитрозаминов и полициклических ароматических углеводородов, в том числе бенз[а]пирена (БП). Генотоксическое действие БП заключается в высокой ДНК-связывающей способности его метаболитов, в то время как эпигенетические эффекты опосредованы изменением экспрессии генов, кодирующих белки или регуляторные РНК. По данным клинико-эпидемиологических исследований, частота заболеваемости раком лёгких у мужчин и женщин различается. Мы предположили, что это может являться следствием зависимых от пола различий в экспрессии микроРНК, опосредованных пересечением сигнальных путей, активируемых БП и эстрогенами. Для проверки этой гипотезы самцы и самки крыс были подвергнуты острому или хроническому воздействию БП. С помощью анализа *in silico* были выбраны микроРНК, в промоторах генов (или генов-хозяев) которых содержатся сайты связывания арилгидрокарбонowego (AhR) и эстрогеновых (ER) рецепторов. При хроническом воздействии БП было обнаружено, что уровень микроРНК-22-3р, -29а-3р, -126а-3р, -193b-5р достоверно увеличивался в лёгких самцов крыс, тогда как уровень микроРНК-483-3р снижался. У самок под действием БП в лёгких увеличивался уровень микроРНК-483-3р, а уровень других исследуемых микроРНК остался неизменным. В свою очередь, изменения экспрессии микроРНК сопровождалось изменением экспрессии их генов-мишеней, таких как *PTEN*, *EMP2*, *IGF1*, *ITGA6*, *SLC34A2*, причём выявленные изменения отличались для самок и самцов крыс. Таким образом, полученные нами результаты позволяют предположить, что в основе зависимых от пола эпигенетических эффектов БП может лежать различная экспрессия потенциально регулируемых AhR и ER микроРНК.

Ключевые слова: бенз[а]пирен; AhR; ER; микроРНК; половые различия

DOI: 10.18097/PBMC20206603224

ВВЕДЕНИЕ

Бенз[а]пирен (БП) — полициклический ароматический углеводород (ПАУ), канцероген первого класса опасности, являющийся одним из самых токсичных и изученных веществ, образующихся при курении табака. Воздействие БП на организм животных приводит к возникновению химически-индуцированных злокачественных новообразований во многих органах, в том числе и в лёгких [1]. Многочисленными клинико-эпидемиологическими исследованиями было показано, что курение табака на сегодняшний день является основным фактором риска развития рака лёгких. По некоторым оценкам, до 85% людей, имеющих данное заболевание, являются курящими [2]. При этом считается, что среди прочих компонентов табачного дыма, ПАУ являются индукторами преимущественно плоскоклеточного рака, в то время как нитроамины вызывают, прежде всего, аденокарциному лёгких [3].

В последние десятилетия учёные стали всё больше уделять внимание половым различиям токсических эффектов химических соединений. Существуют сведения как о различном риске заболеваемости

раком лёгких, так и о различном распределении гистологических подтипов этого заболевания у курящих женщин и мужчин, что говорит о различных молекулярных механизмах канцерогенеза лёгких разных полов одного биологического вида. На сегодняшний день считается, что основное различие заключается во влиянии женских и мужских половых гормонов на детоксикацию никотинпроизводного нитроамин-кетона. Женские половые гормоны являются более мощными ингибиторами данного процесса, чем мужские, вследствие чего, курящие женщины могут быть более подвержены раку лёгких, чем мужчины [4]. В данной работе мы выдвинули гипотезу о том, что влияние БП на клеточные сигнальные пути, посредством активации которых осуществляется его эпигенетическое действие, также может различаться в зависимости от пола.

Токсическое действие БП обусловлено его участием в регуляции как генотоксических, так и негенотоксических (эпигенетических) механизмов канцерогенеза. Генотоксический механизм действия БП заключается в том, что его высокореакционные метаболиты способны ковалентно связываться с ДНК, в то время как эпигенетические эффекты опосредованы

изменением экспрессии генов, кодирующих белки или регуляторные РНК. Передача клеточного сигнала от БП на транскрипционный аппарат опосредована, в первую очередь, активацией арилгидрокарбонowego рецептора (AhR). БП проникает в клетку и взаимодействует с цитоплазматическим AhR, что приводит к его транслокации в ядро, где он гетеродимеризуется с ARNT (AhR nuclear translocator). Образовавшийся гетеродимер может связываться с диоксин-чувствительными элементами (DRE; dioxin response element) в промоторах генов и активировать их транскрипцию. AhR индуцирует экспрессию множества генов, в частности генов цитохромов P450 (CYP) первого семейства, белковые продукты которых принимают участие в биотрансформации многих субстратов, включая эстрогены и БП [1]. Важно отметить, что у женщин экспрессия ферментов CYP1A/B в норме выше, чем у мужчин. Более того, гиперэкспрессия этих ферментов ассоциирована с повышенным содержанием аддуктов метаболитов эстрогенов с ДНК, что, как и в случае с БП, может свидетельствовать о более высоких рисках генотоксического канцерогенеза у женщин, чем у мужчин [4, 5]. Эстрогены же, в свою очередь, оказывают эффекты на транскрипционный аппарат клетки путём активации эстрогеновых рецепторов (ER); при этом пересечение сигнальных путей, регулируемых ER и AhR, происходит на многих уровнях. Например, показано, что AhR способен взаимодействовать с ER, и образовавшийся гетеродимер может связываться с эстроген-чувствительными элементами (ERE, estrogen response element) в промоторах генов и инициировать транскрипцию генов-мишеней ER даже при отсутствии его лигандов [6]. Также описаны механизмы, при которых происходит ингибирование транскрипционной активности этих рецепторов при их одновременной активации, основанное на стерических затруднениях связывания с DRE и ERE внутри промотора, конкуренции за общие коактиваторы и других механизмах [7].

Таким образом, ввиду различий в содержании и активности ER и их лигандов у особей мужского и женского полов, мы предположили, что в результате активации AhR возможны половые различия в эффектах БП на экспрессию потенциально регулируемых AhR и ER микроРНК, имеющих DRE и/или ERE в своих промоторах. Изменение экспрессии таких микроРНК под действием БП, в свою очередь, может приводить к нарушению уровня мРНК их генов-мишеней [8], что может служить дополнительным стимулом для трансформации клеток в злокачественный фенотип. Для экспериментального подтверждения данной гипотезы самки и самцы крыс линии Вистар были подвергнуты острому и хроническому воздействию БП. Затем с помощью метода ОТ-ПЦР в реальном времени была определена экспрессия выбранных с помощью анализа *in silico* микроРНК-22-3р, -29а-3р, -126а-3р, -193b-5р, -483-3р, в промоторах генов (или генов-хозяев) которых содержатся сайты связывания ER (ERE) и AhR (DRE), а также их генов-мишеней: *EMP2*, *IGF1*, *ITGA6*, *PTEN*, *SLC34A2* (табл. 1).

Таблица 1. Список исследуемых микроРНК, их генов-хозяев и генов-мишеней

Ген-хозяин	микроРНК	Гены-мишени
Межгенная	микроРНК-22-3р	<i>PTEN</i>
Межгенная	микроРНК-29а-3р	<i>EMP2</i> , <i>IGF1</i> , <i>PTEN</i> , <i>SLC34A2</i>
<i>EGFL7</i>	микроРНК-126а-3р	<i>ITGA6</i>
Межгенная	микроРНК-193b-5р	<i>EMP2</i> , <i>SLC34A2</i>
<i>IGF2</i>	микроРНК-483-3р	<i>EMP2</i> , <i>IGF1</i>

МЕТОДИКА

Животные

В работе использовали 56 половозрелых крыс (28 самцов, 28 самок) линии Вистар массой 150–180 г, приобретенных в питомнике Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями “Руководства по содержанию и уходу за лабораторными животными” (ГОСТ 33215-2014). Крысам внутривентрально вводили по 0,5 мл раствора БП (“Sigma-Aldrich”, США) в подсолнечном масле согласно следующим схемам: однократное введение (доза 75 мг/кг) с последующей инкубацией (под инкубацией подразумевается время жизни крыс с момента инъекции и до смерти) в течение 24 ч, 48 ч и 72 ч (n=4); хроническое введение (дозы 10 мг/кг и 50 мг/кг) в течение 12 недель, с периодичностью инъекций 1 раз в неделю (n=4). Крысам контрольных групп (n=4) вводили подсолнечное масло (по 0,5 мл/особь).

ОТ-ПЦР в реальном времени

Выделение тотальной РНК из лёгких крыс проводили с использованием Trizol Reagent (“Invitrogen”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Обратную транскрипцию проводили по матрице РНК с использованием набора ОТ-М-МуLV-RH (“Biolabmix”, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для обратной транскрипции микроРНК использовали специфичные к каждой последовательности “stem-loop” праймеры (табл. 2), для обратной транскрипции мРНК использовали олиго(dT)₁₆ и случайные гексануклеотидные праймеры. ПЦР в реальном времени проводили с использованием наборов БиоМастер UDG HS-qPCR (2×) (“Biolabmix”) и БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (“Biolabmix”) в соответствии с рекомендациями производителя. Реакции выполняли в трёх повторях. Амплификацию проводили на CFX96™ Touch (“Bio-Rad Laboratories”, США) с использованием следующих условий: предварительный прогрев при 95°C в течение 5 мин, затем 40 циклов: денатурация при 95°C в течение 15 с, отжиг праймеров при 61°C в течение 20 с, элонгация при 72°C в течение 30 с. Изменение уровня мРНК и микроРНК оценивали по методу $\Delta\Delta C_t$ с использованием значений пороговых циклов гена сравнения *ACTB* (*Beta-actin*), а также малых ядерных РНК U48 и U87 соответственно.

ВЛИЯНИЕ БЕНЗ[А]ПИРЕНА НА МИКРОРНК В ЛЁГКИХ КРЫС

Таблица 2. Последовательности праймеров для ОТ-ПЦР в реальном времени

Наименование	Последовательности праймеров	
U48 (малая ядерная РНК)	ОТ	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACGGTCAG-3'
	Прямой	5'-GCCGCTGAGTGTCTTCGCT-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACACGGTCAG-(BHQ1)-3'
U87 (малая ядерная РНК)	ОТ	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCTCAGTC-3'
	Прямой	5'-GCCGCAGAGAGAATCTTAA-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACGCTCAGTC-(BHQ1)-3'
микроРНК-22-3р	ОТ	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAGTT-3'
	Прямой	5'-GCCGCAAGCTGCCAGTTGAAG-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACAGTT-(BHQ1)-3'
микроРНК-29а-3р	ОТ	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTAACCGAT-3'
	Прямой	5'-GCCGCTAGCACCATCTGAA-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTAACCGAT-(BHQ1)-3'
микроРНК-126а-3р	ОТ	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCGATTAT-3'
	Прямой	5'-GCCGCTCGTACCGTGAGTA-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACCCGATTAT-(BHQ1)-3'
микроРНК-193b-5р	ОТ	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCTCGCCC-3'
	Прямой	5'-GCCGCGGGGTTTTGA-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTCTCGCCC-(BHQ1)-3'
микроРНК-483-3р	ОТ	5'-GTCGTATCCAGTGCACCCTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAAGACG-3'
	Прямой	5'-GCCGCCACTCCTCCCCTGC-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACAAGACG-(BHQ1)-3'
ACTB	Прямой	5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3'
	Обратный	5'-GATGCCGTGCTCGATGGGGT-3'
CYP1A1	Прямой	5'-CTTCACACTTATCGCTAATGG-3'
	Обратный	5'-TTGGGTCTGAGGCTATGG-3'
CYP1B1	Прямой	5'-GAGTTGGTGGCAGTGTG-3'
	Обратный	5'-GCATCGTCGTGGTTGTAC-3'
EGFL7	Прямой	5'-GAATGAAGGGAGTTGCATCC-3'
	Обратный	5'-GACACCTGGCCTCTCCTGTA-3'
EMP2	Прямой	5'-TCGTGTCTACGGCACTCTTG-3'
	Обратный	5'-CTGCATCACAGAGTAACCTGAA-3'
IGF1	Прямой	5'-CGCTTCAGTTTGTCTGTTTCG-3'
	Обратный	5'-GCAGCACTCTTCCACGATG-3'
IGF2	Прямой	5'-CAAATTGCACACCTGGAGACA-3'
	Обратный	5'-TTGCTGGACATCTCCGAAGAG-3'
ITGA6	Прямой	5'-GAAGTGAGGACCCCTTGCTGATG-3'
	Обратный	5'-CGAACCTGTGCCTTAGTGACAA-3'
PTEN	Прямой	5'-ATACCAGGACCAGAGGAAACC-3'
	Обратный	5'-TTGTCAATTATCCGCACGCTC-3'
SLC34A2	Прямой	5'-TGGTTGCCTCCTCCTTGCT-3'
	Обратный	5'-GCAGCCTCCAGAGGTAAGAG-3'

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью MS Office. Результаты представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее, SD — стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости различий между выборками использовали t -критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биоинформатический отбор микроРНК и их генов-мишеней

В настоящей работе мы рассматривали эпигенетические эффекты БП на экспрессию микроРНК и их генов-мишеней в лёгких крыс. Для этого с помощью анализа *in silico*, проведённого ранее [9], были выбраны микроРНК-22-3р, -29а-3р, -126а-3р, -193b-5р, -483-3р в промоторах генов (или генов-хозяев) которых были обнаружены потенциальные сайты связывания AhR и ER. Также с помощью программы TargetScan был произведён поиск генов-мишеней выбранных микроРНК (табл. 1). В результате такого поиска было найдено большое количество возможных кандидатов, и среди них были выбраны гены, белковые продукты которых участвуют в наиболее важных клеточных процессах, включая канцерогенез лёгких. В итоге для анализа были выбраны гены: *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*), белковый продукт которого является негативным регулятором сигнального пути PI3K/AKT/mTOR (гиперактивация этого сигнального пути обнаружена во многих злокачественных опухолях, в том числе и при раке лёгких), даже частичное снижение его экспрессии увеличивает пролиферативный потенциал опухоли [10]; *EMP2* (*Epithelial membrane protein 2*), кодирующий эпителиальный мембранный белок 2, повышенная экспрессия которого обнаружена в опухолях эндометрия и яичников (и в лёгких его экспрессия значительно выше по сравнению с другими тканями) [11]; *IGF1* (*Insulin-like growth factor 1*), кодирующий инсулиноподобный фактор роста 1, высокий уровень экспрессии которого связан с повышенным риском развития злокачественных новообразований [12]; *ITGA6* (*Integrin alpha 6*), кодирующий интегрин $\alpha 6$, который участвует в регуляции пролиферации клеток, а также их формы и подвижности (снижение экспрессии этого гена ассоциировано с усилением метастатического и инвазивного потенциала опухолей) [13]; *SLC34A2* (*Solute carrier family 34 member 2*), кодирующий высокоэкспрессирующийся в лёгких натрий-зависимый переносчик фосфатов типа 2b (NPT2b) [14]. Также мы добавили в эту выборку гены-хозяева микроРНК-126а — *EGFL7* (*Epidermal growth factor like domain 7*) и микроРНК-483 — *IGF2* (*Insulin-like growth factor 2*).

Влияние БП на экспрессию классических генов-мишеней AhR

Активацию AhR под действием БП оценивали по изменению экспрессии его генов-мишеней —

CYP1A1, *CYP1B1*. Как при однократном, так и при хроническом введении БП, относительный уровень мРНК *CYP1A1* и *CYP1B1* многократно увеличивался в лёгких самцов и самок крыс (табл. 3). Однократное введение БП приводило к повышению экспрессии *CYP1A1* и *CYP1B1* в лёгких самцов и самок крыс во всех исследуемых группах в 26-73 раза. Хроническое введение БП дозой 10 мг/кг также приводило к повышению экспрессии *CYP1A1* и *CYP1B1* в 1,8-9,5 раз, в то время как введение БП в дозе 50 мг/кг — в 7,9-19 раз. Однако при хроническом введении БП повышение экспрессии происходило в среднем в 5 раз слабее, чем при остром. Сравнивая уровни экспрессии у особей разных полов, мы обнаружили, что экспрессия *CYP1A1* в лёгких самок в среднем в 1,5-2 раза выше, чем у самцов для всех экспериментальных групп.

Влияние однократного введения БП на экспрессию микроРНК-22-3р, -29а-3р, -126а-3р, -193b-5р, -483-3р

Для оценки длительности эффектов БП на экспрессию микроРНК и их генов-мишеней образцы лёгких получали в течение разных промежутков времени (24 ч, 48 ч и 72 ч) после инъекции. При остром воздействии БП максимальный эффект на изменение экспрессии выбранных нами микроРНК наблюдался через 24 ч после инъекции, а спустя 72 ч экспрессия микроРНК в большинстве случаев возвращалась к исходному уровню. Уровень микроРНК-126а-3р снижался у особей обоих полов в 1,7-3,3 раза, тогда как микроРНК-483-3р увеличивался (в 2,1 раза) у самок в первые сутки после инъекций, а затем плавно снижался на третьи сутки (в 1,4 раза). Достоверных различий экспрессии микроРНК-193b-5р при однократном воздействии БП выявлено не было. Уровень микроРНК-29а-3р достоверно снижался в 2,5 раза у самок на первый день после воздействия, однако у самцов статистически значимых различий во временном диапазоне 24-72 ч после введения БП не было обнаружено. Наиболее яркие половые различия были выявлены для микроРНК-22-3р. У самцов её уровень достоверно увеличивался в 1,7-2,4 раза, тогда как у самок в первый день падал (в 2 раза), но потом быстро возвращался к начальному значению.

Влияние хронического введения БП на экспрессию микроРНК-22-3р, -29а-3р, -126а-3р, -193b-5р, -483-3р

При хроническом введении БП наиболее выраженные изменения экспрессии микроРНК происходили у самцов, у самок же изменения были менее выражены или отсутствовали вообще. У самцов обнаружено статистически значимое повышение уровня всех исследуемых микроРНК (в 1,5-2,2 раза) за исключением микроРНК-483-3р, уровень экспрессии которой был в 2,5 раза ниже, чем в контрольной группе. Несмотря на ожидаемые дозозависимые эффекты, мы обнаружили, что у самцов профиль экспрессии исследуемых микроРНК при дозах БП 10 мг/кг и 50 мг/кг практически не отличался. У самок уровень микроРНК-126а-3р имел тенденцию к снижению, а уровень микроРНК-483-3р повышался

Таблица 3. Относительный уровень мРНК CYP1A1, CYP1B1, EGFL7, EMP2, IGF1, IGF2, ITGA6, PTEN, SLC34A2 в лёгких самцов и самок крыс линии Вистар после однократного (доза 75 мг/кг) и хронического (дозы 10 мг/кг и 50 мг/кг) введения БП

мРНК	Однократное введение БП (75 мг/кг)										Хроническое введение БП			
	♂					♀					♂		♀	
	Контроль	24 часа	48 часов	72 часа	Контроль	24 часа	48 часов	72 часа	Контроль	10 мг/кг	50 мг/кг	Контроль	10 мг/кг	50 мг/кг
CYP1A1	1±0,5	53±13**	31±2**	34±5**	1±0,9	46±2**	33±4*	51±17*	1±0,5	1,8±0,09*	7,9±2,8*	1±0,3	9,5±7,6	19±3,8*
CYP1B1	1±0,7	43±20*	26±5*	45±12*	1±0,4	39±9*	32±26	73±17*	1±0,5	1,9±0,5	19±10*	1±0,1	2,4±1,2	9,2±2,2*
EGFL7	1±0,3	2,4±0,9	1,1±0,4	2,4±1,1	1±0,2	0,8±0,1	0,3±0,1*	2,3±1,4	1±0,1	0,3±0,3	0,5±0,05*	1±0,1	0,4±0,1*	0,5±0,2*
EMP2	1±0,07	2,0±0,4*	1,3±0,09*	2,2±0,4*	1±0,06	1,1±0,2	0,8±0,5	2,0±0,5*	1±0,07	1,6±0,4	1,2±0,1	1±0,4	2,1±0,2*	1,4±0,5
IGF1	1±0,4	1,0±0,1	0,9±0,2	1,0±0,3	1±0,3	1,0±0,5	2,4±1,0	3,3±1,4	1±0,5	1,0±0,5	1,6±0,1	1±0,1	0,4±0,1*	0,3±0,1**
IGF2	1±0,3	3,2±0,7*	1,2±0,01	1,6±0,4	1±0,9	1,4±1,0	2,2±0,9	4,3±3,8	1±0,7	0,8±0,6	0,4±0,1	1±0,2	0,4±0,07*	0,3±0,2*
ITGA6	1±0,1	0,5±0,2	0,4±0,1*	0,5±0,1*	1±0,2	0,5±0,1*	0,8±0,3	0,8±0,2	1±0,05	0,5±0,2*	0,3±0,04**	1±0,2	0,6±0,1*	0,5±0,1*
PTEN	1±0,02	0,8±0,3	0,6±0,1*	0,8±0,2	1±0,2	0,8±0,2	1,2±0,04	0,9±0,3	1±0,2	0,4±0,2*	0,6±0,1*	1±0,3	0,5±0,2	0,4±0,2*
SLC34A2	1±0,2	3,7±0,7**	2,4±0,3*	4,2±0,4**	1±0,4	1,9±0,7	2,6±0,5*	3,6±0,6*	1±0,09	1,8±0,5*	0,9±0,3	1±0,4	1,4±0,5	1,0±0,2

Примечание. * — статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** — статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,01$) по критерию Стьюдента.

в 1,9 раз при введении БП дозой 10 мг/кг. Уровень остальных микроРНК у самок под действием БП, вопреки ожиданиям, оказался неизменным в сравнении с контрольной группой.

Влияние БП на экспрессию генов EGFL7, EMP2, IGF1, IGF2, ITGA6, PTEN, SLC34A2

В результате однократного введения БП наиболее выраженные изменения экспрессии исследуемых генов-мишеней как у самок, так и у самцов выявлены для SLC34A2 (повышение в 2,4-4,2 раза), EMP2 (повышение в 1,3-2,2 раза) и ITGA6 (снижение в 2-2,5 раз). Уровень экспрессии гена IGF1 достоверно не изменился ни в одной группе, тогда как у самцов при введении БП происходило понижение уровня экспрессии гена PTEN в 1,7 раз спустя 48 ч после инъекций. Экспрессия генов-хозяев микроРНК-126а и -483 изменялась только у некоторых групп по сравнению с контролем, а именно: EGFL7 только у самок (понижилась в 3,3 раза) спустя 48 ч, а IGF2 — только у самцов (повысилась в 3,2 раза) спустя 24 ч после введения БП.

В результате хронического введения БП наиболее выраженные изменения экспрессии исследуемых генов наблюдались у самок: происходило снижение экспрессии большинства из них (EGFL7, IGF1/2, ITGA6, PTEN) в 1,7-3,3 раза. Исключение составили гены: EMP2 — уровень его экспрессии был повышен в 2,1 раза при дозе 10 мг/кг и SLC34A2 — экспрессия этого гена у самок не изменилась. Хроническое введение БП самцам крыс приводило к снижению экспрессии генов EGFL7, ITGA6 и PTEN в 1,7-3,3 раза при дозах 10 мг/кг и 50 мг/кг, а также к повышению SLC34A2 в 1,8 раз при дозе 10 мг/кг. Относительный уровень остальных исследуемых генов, по сравнению с контролем, остался неизменным.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рак лёгких является основной причиной смерти от онкологических заболеваний по всему миру [2]. Накапливается все больше данных о том, что у мужчин и женщин патогенез и заболеваемость раком лёгких различаются [4, 5]. Ключевым фактором риска развития рака лёгких является курение [2]. Компоненты табачного дыма включают в себя продукты неполного сгорания углеводородов, самыми опасными из которых в контексте канцерогенеза являются нитрозоамины и ПАУ, в том числе БП [1]. В настоящей работе рассматривается гипотеза о том, что в основе различий в токсических эффектах БП у женщин и мужчин может лежать разница в уровне эстрогенов и экспрессии их рецепторов. В результате пересечения сигнальных путей, регулируемых рецепторами к эстрогенам (ER) и БП (AhR), могут проявляться физиологические последствия их одновременной активации у разных полов, что может приводить к молекулярным различиям канцерогенного действия БП.

Многочисленными исследованиями показано, что паттерн экспрессии микроРНК при патологиях отличается от такового в нормальных тканях [15-17].

Биогенез микроРНК начинается с запуска транскрипции их генов при-микроРНК, которые могут быть межгенными (имеют собственный промотор) или внутригенными (транскрибируются вместе с геном-хозяином) [8]. Целью нашей работы была оценка влияния БП на экспрессию микроРНК в лёгких самок и самцов крыс при остром и хроническом воздействии данного соединения.

Активацию AhR под действием БП оценивали по изменению экспрессии его классических генов-мишеней *CYP1A1*, *CYP1B1*. Как при однократном, так и при хроническом введении БП уровень экспрессии *CYP1A1* и *CYP1B1* многократно увеличивался в лёгких самцов и самок крыс по сравнению с контролем (табл. 3). Однако при хроническом введении исследуемого канцерогена повышение экспрессии данных генов происходило в среднем в 5 раз слабее, чем при остром. Подобные эффекты могут быть следствием вовлечения реципрокных компенсаторных механизмов, подавляющих гиперактивацию AhR для контроля индукции *CYP1A1/B1*. Более того, известно, что лиганды AhR активируют его протеасомную деградацию [18]. Таким образом, можно ожидать, что у курящих людей транскрипционная активность этого рецептора в лёгких будет существенно снижена. Сравнивая уровни экспрессии у особей разных полов, мы обнаружили, что экспрессия *CYP1A1* в лёгких самок в среднем в 1,5-2 раза выше, чем у самцов во всех экспериментальных группах. Эти данные могут указывать на более высокие шансы риска заболевания раком лёгких у женщин, чем у мужчин. Изменения в активности данных цитохромов ассоциированы с повышением риска развития гормонозависимых онкологических заболеваний ввиду повышенной скорости метаболизма эстрогенов, а учитывая тот факт, что они также метаболизируют и БП до его генотоксичных метаболитов, то и химически индуцированных опухолей [4]. Однако нельзя не принять во внимание тот факт, что в цепочке метаболических превращений БП принимают участие и другие ферменты, такие как эпоксидгидролазы, пероксидазы и альдокеторедуктазы. Также метаболиты БП могут подвергаться конъюгации с глюкуронидом и сульфатом, в результате чего происходит их детоксикация [19]. Поэтому конечный генотоксический эффект БП может быть учтён только по количеству аддуктов с ДНК.

В результате однократного введения БП было выявлено, что эффект данного соединения на уровень микроРНК в лёгких проявляется через сутки после инъекции, а затем постепенно возвращается к начальному уровню. Наиболее яркие половые различия в экспрессии микроРНК в лёгких крыс при остром воздействии БП проявлялись для микроРНК-22-3р: у самцов происходило повышение, в то время как у самок понижение на первый день после воздействия БП. Показано, что уровень этой микроРНК зависит от активности ER, более того, одной из её мишеней является мРНК *ESR1* [20, 21]. Возможно, что наблюдаемые половые различия в экспрессии этой микроРНК при остром воздействии БП являются гормонозависимыми.

Курящие люди, как правило, подвергаются воздействию табачного дыма регулярно, поэтому мы считаем, что модель хронической экспозиции БП более достоверно отражает изменения экспрессии микроРНК, чем однократное введение данного вещества. В результате хронического воздействия проявляются долгосрочные токсические эффекты и количество факторов, регулирующих экспрессию генов или микроРНК, может существенно измениться. Более того, учитывая обнаруженные нами половые различия в уровнях транскрипционной активности AhR, физиологические особенности экспрессии эстрогеновых рецепторов и то, что лиганды AhR оказывают провоспалительный эффект [22], исследование токсических эффектов на выбранной нами модели позволит лучше экстраполировать наблюдаемые эффекты с животных на человека.

Несмотря на наличие ERE в промоторах генов выбранных нами микроРНК, большинство наблюдаемых эффектов при хроническом воздействии БП свидетельствуют об отсутствии прямой транскрипционной регуляции этих микроРНК ER. Однако полученные результаты хорошо соотносятся с данными мировой литературы. Например, Yoshimoto и соавт. показали, что базальная экспрессия микроРНК-22 не отличалась в культурах клеток рака молочной железы с разным статусом экспрессии эстрогеновых рецепторов [17]. Zhang и соавт. показали, что уровень микроРНК-29a в печени мышей под действием тетрахлорида углерода изменялся только у самцов, тогда как у самок оставался неизменным [23]. Мы предполагаем, что отсутствие эффектов БП на уровень исследуемых нами микроРНК у самок может быть следствием более выраженной регуляции экспрессии ER-зависимых генов.

Что касается микроРНК-483-3р, то в нашем эксперименте было выявлено отсутствие коэкспрессии с её геном-хозяином — *IGF2*, что возможно, согласно данным литературы [16]. Также нами ранее было выявлено наличие DRE в предполагаемом собственном промоторе микроРНК-483 [24], и мы предполагаем, что данная микроРНК может регулироваться AhR напрямую, независимо от гена-хозяина, однако данное предположение требует дальнейшей проверки экспериментальными методами.

Гендер-специфичные различия были выявлены в экспрессии микроРНК-29a-3р, -193b-5р и -126a-3р (табл. 4). Уровень экспрессии микроРНК-29a-3р повышался у самцов, но понижался у самок, это может быть связано с различным уровнем эстрадиола у самок и самцов [5]. Что касается микроРНК-193b-5р, то повышение её экспрессии при хронической экспозиции БП у самцов может быть связано с развитием воспалительных процессов. Уровень данной микроРНК может регулироваться фактором транскрипции STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5), который активируется провоспалительными цитокинами [25]. Более того, существуют сведения о том, что метаболиты БП способны активировать STAT5 напрямую и способствовать его транслокации в ядро [26].

Таблица 4. Относительный уровень микроРНК-22-3р, -29а-3р, -126а-3р, -193б-5р, -483-3р в лёгких самцов и самок крыс Вистар после однократного (доза 75 мг/кг) и хронического (дозы 10 мг/кг и 50 мг/кг) введения БП

микроРНК	Однократное введение БП (75 мг/кг)										Хроническое введение БП			
	♂					♀					♂		♀	
	Контроль	24 часа	48 часов	72 часа	Контроль	24 часа	48 часов	72 часа	Контроль	10 мг/кг	50 мг/кг	Контроль	10 мг/кг	50 мг/кг
микроРНК-22-3р	1±0,07	2,4±0,2**	1,7±0,04**	1,44±0,3	1±0,02	0,5±0,01**	1,0±0,1	1,1±0,3	1±0,05	1,7±0,2*	2,0±0,2*	1±0,1	1,0±0,1	1,2±0,4
микроРНК-29а-3р	1±0,06	1,1±0,1	0,9±0,1	1,3±0,04	1±0,03	0,4±0,04**	1,0±0,02	0,9±0,1	1±0,1	2,2±0,7*	2,0±0,2*	1±0,2	1,0±0,2	0,9±0,1
микроРНК-126а-3р	1±0,02	1,0±0,1	0,6±0,1*	1,1±0,2	1±0,06	0,3±0,05**	0,8±0,3	0,7±0,2	1±0,05	1,6±0,5	1,5±0,1*	1±0,2	0,8±0,08	0,7±0,08
микроРНК-193б-5р	1±0,1	0,9±0,1	0,9±0,1	0,9±0,2	1±0,1	0,8±0,2	1,1±0,2	1,3±0,3	1±0,2	1,7±0,3*	1,7±0,5	1±0,3	1,0±0,2	1,0±0,2
микроРНК-483-3р	1±0,3	1,3±0,3	1,4±0,6	0,7±0,2	1±0,04	2,1±0,2**	0,8±0,4	0,7±0,04*	1±0,2	1,1±0,4	0,4±0,1*	1±0,2	1,9±0,2*	1,1±0,5

Примечание. * — статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** — статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,01$) по критерию Стьюдента.

Таким образом, исходя из полученных результатов, в контексте анализа эпигенетических механизмов, следует, что токсические эффекты от введения БП в контексте микроРНК-29а-3р и -193б-5р проявляются у самок, а не у самок крыс. При хроническом введении БП уровень экспрессии микроРНК-126а-3р снижался у самок, но не у самцов (табл. 4). Данная микроРНК у крыс регулируется непосредственно ER и не содержит в промоторе мотив DRE [9]. Возможно, в регуляции экспрессии микроРНК-126а участвует микроРНК-22, которая способна связываться с 3'-нетранслируемой областью мРНК ERα и подавлять его экспрессию [20]. Снижение экспрессии ERα может приводить к снижению экспрессии *EGFL7* и микроРНК-126а соответственно. Важно отметить, что уровень микроРНК-126а-3р понижен в клетках немелкоклеточного рака лёгких человека [15], что говорит о существовании механизмов, ведущих к снижению уровня данной микроРНК в лёгких.

Для оценки биологических эффектов, вызванных изменениями в уровнях экспрессии исследуемых микроРНК, нами был определен относительный уровень экспрессии их генов-мишеней (табл. 3). Экспрессия гена *EMP2* повысилась при остром воздействии БП, причем в лёгких самцов увеличение происходило во всех временных интервалах. Белок *EMP2* в настоящее время является предметом активного исследования: он участвует в важных для жизнедеятельности эпителиальных клеток процессах, таких как пролиферация, передача клеточных сигналов, ангиогенез, а также клеточная адгезия и миграция [11]. Экспрессия *IGF1* снижалась в лёгких самок при хроническом воздействии БП. Повышенный уровень *IGF1* ассоциирован с более высоким риском развития злокачественных новообразований, а также с прогрессией уже существующих опухолей [12]. Относительный уровень экспрессии *ITGA6* снижался практически во всех исследуемых группах, что согласуется с данными Brantley и соавт., которые показали, что под действием агонистов AhR, в частности аминифлавона, происходит понижение экспрессии данного интегрин [13]. При введении БП происходило снижение экспрессии *PTEN* в лёгких, как самцов, так и самок, при этом достоверные различия получены, главным образом, при хроническом воздействии исследуемого соединения. Подавление экспрессии онкосупрессорного гена *PTEN* приводит к активации PI3K-киназного пути [10]. Следует заметить, что имеются данные о вовлечении этого сигнального каскада в патогенез немелкоклеточного рака лёгких, хотя точные механизмы, за исключением инактивирующих мутаций в *PTEN*, пока не известны [27]. В результате введения БП экспрессия *SLC34A2* заметно увеличилась как при однократном, так и при хроническом введении БП. Существуют данные о том, что уровень белкового продукта гена *SLC34A2* (NPT2b) повышен в тканях аденокарциномы лёгкого человека, более того, его рассматривают в качестве терапевтической мишени при данном заболевании [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В основе эпигенетического механизма токсического действия БП лежит одновременная активация AhR и ER, в результате которой может происходить как индукция, так и ингибирование экспрессии их генов-мишеней, в том числе и микроРНК. Мы показали, что паттерн экспрессии потенциально регулируемых AhR и ER микроРНК в лёгких самок и самцов крыс различается при хроническом воздействии БП. Несмотря на это, профиль экспрессии их генов мишеней не имеет ярко выраженных половых различий, что может являться следствием более сложной регуляции их экспрессии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Центру коллективного пользования “Протеомный анализ” (Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, Федеральный исследовательский центр Фундаментальной и трансляционной медицины) за предоставленное оборудование.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данное исследование было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-415-540002).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, проводимые в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения или принятой практике для таких исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *International Agency for Research on Cancer* (2012) Chemical agents and related occupations, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Humans, **100F**, 111-138.
2. *Warren G., Cummings K.* (2013) Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book, pp. 359-364.
3. *Hoffmann D., Djordjevic M.V., Hoffmann I.* (1997) Prev. Med., **26**(4), 427-34.
4. *Stapelfeld C., Dammann C., Maser E.* (2019) Int. J. Cancer, **146**(9), 2376-2382.
5. *Siowikowski B., Lianeri M., Jagodziński P.* (2017) Mol. Biol. Rep., **44**(1), 35-50.
6. *Ohtake F., Takeyama K., Matsumoto T., Kitagawa H., Yamamoto Y., Nohara K., Tohyama C., Krust A., Mimura J., Chambon P., Yanagisawa J., Fujii-Kuriyama Y., Kato S.* (2003) Nature, **423**, 545-550.
7. *Matthews J., Gustafsson J.* (2006) Nucl. Recept. Signal., **4**, e016. DOI: 10.1621/nrs.04016
8. *Gulyaeva L., Kushlinskiy N.* (2016) J. Transl. Med., **14**(1), 143-153.
9. *Ovchinnikov V., Antonets D., Gulyaeva L.* (2018) J. Bioinform. Comput. Biol., **16**(1), 1750029. DOI: 10.1142/S0219720017500299
10. *Gkoutakos A., Sartori G., Falcone I., Piro G., Ciuffreda L., Carbone C., Tortora G., Scarpa A., Bria E., Milella M., Rosell R., Corbo V., Pilotto S.* (2019) Cancers (Basel), **11**(8), 1141. DOI:10.3390/cancers11081141
11. *Wang Y., Cheng H., Ding Y., Chou L., Chow N.* (2017) Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer, **1868**(1), 199-211.
12. *Salisbury T., Tomblin J.* (2015) Front. Endocrinol. (Lausanne), **6**, 12. DOI:10.3389/fendo.2015.00012
13. *Brantley E., Callero M., Berardi D., Campbell P., Rowland L., Zylstra D., Amis L., Yee M., Simian M., Todaro L., Loaiza-Perez A., Soto U.* (2016) Cancer Lett., **376**(1), 53-61.
14. *Hong S., Minaei-Tehrani A., Chang S., Jiang H., Lee S., Lee A., Seo H., Chae C., Beck G. Jr., Cho M.* (2013) PLoS One, **8**(10), e77121. DOI: 10.1371/journal.pone.0077121.
15. *Liu R., Zhang Y., Zhang S., Cheng Z., Yu J., Zhou S., Song J.* (2019) Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., **23**(2), 679-689.
16. *Pepe F., Visone R., Veronese A.* (2018) Cancers (Basel), **10**(6), 181. DOI:10.3390/cancers10060181
17. *Yoshimoto N., Toyama T., Takahashi S., Sugiura H., Endo Y., Iwasa M., Fujii Y., Yamashita H.* (2011) Breast Cancer Res. Treat., **130**(1), 331-339.
18. *Pollenz R., Buggy C.* (2006) Chem. Biol. Interact., **164**(1-2), 49-59.
19. *Jiang H., Gelhaus S.L., Mangal D., Harvey R.G., Blair I.A., Penning T.M.* (2007) Chem. Res. Toxicol., **20**(9), 1331-1341.
20. *Pandey D., Picard D.* (2009) Mol. Cell Biol., **29**(13), 3783-3790.
21. *Schweisgut J., Schutt C., Wüst S., Wietelmann A., Ghesquière B., Carmeliet P., Dröse S., Korach K., Braun T., Boettger T.* (2017) EMBO J., **36**(9), 1199-1214.
22. *Shi Q., Godschalk R., van Schooten F.* (2017) Mutat. Res., **774**, 12-24.
23. *Zhang Y., Wu L., Wang Y., Zhang M., Li L., Zhu D., Li X., Gu H., Zhang C., Zen K.* (2012) J. Biol. Chem., **287**(18), 14851-14862.
24. *Филиппов С.В., Ярушкин А.А., Калинина Т.С., Овчинников В.Ю., Князев Р.А., Гуляева Л.Ф.* (2019) Биохимия, **84**(10), 1197-1203. [Filippov S., Yarushkin A., Kalinina T., Ovchinnikov V., Knyazev R., Gulyaeva L. (2019) Biochemistry (Moscow), **84**(10), 1197-1203.]
25. *Haetscher N., Feuermann Y., Wingert S., Rehage M., Thalheimer F., Weiser C., Bohnenberger H., Jung K., Schroeder T., Serve H., Oellerich T., Hennighausen L., Rieger M.* (2015) Nat. Commun., **6**, 8928. DOI: 10.1038/ncomms9928
26. *Rodríguez-Fragoso L., Melendez K., Hudson L., Lauer F., Burchiel S.* (2009) Toxicol. Appl. Pharmacol., **235**(3), 321-328.
27. *Pérez-Ramírez C., Cañadas-Garre M., Molina M., Faus-Dáder M., Calleja-Hernández M.* (2015) Pharmacogenomics., **16**(16), 1843-1862.

Поступила в редакцию: 17. 12. 2019.
После доработки: 08. 05. 2020.
Принята к печати: 13. 05. 2020.

EFFECT OF BENZO(A)PYRENE ON THE EXPRESSION OF AhR-REGULATED MICRORNA
IN FEMALE AND MALE RAT LUNGS

S.V. Filippov^{1,2}, A.A. Yarushkin^{1,3}, A.K. Yakovleva^{1,3}, V.V. Kozlov^{1,4}, L.F. Gulyaeva^{1,3}*

¹Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, 2/12 Timakova str., Novosibirsk, 630117 Russia; *e-mail: imbb@niimbb.ru;

²Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Lavrentyeva ave., Novosibirsk, 630090, Russia

³Novosibirsk State University, 1 Pirogova str.; Novosibirsk, 630090 Russia

⁴Novosibirsk Regional Oncology Center, 2 Plahotnogo str., Novosibirsk, 630000 Russia

Smoking is the main risk factor for lung cancer, mainly due to presence of nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons, including benzo[a]pyrene (BP) in tobacco smoke composition. The genotoxic effect of BP is based on the high DNA-binding ability of its metabolites, while the epigenetic effects are mediated by a change in the expression of cancer related genes or regulatory RNAs. It has been shown that women have a higher risk to develop lung cancer upon smoking rather than men. We hypothesized that crosstalk between signaling pathways activated by BP and estrogens could underlie the sex-dependent differences in miRNAs expression. To test this hypothesis, male and female rats were subjected to short-term or long-term BP exposure. Using *in silico* analysis, miRNAs containing the ER- and AhR-binding sites in the promoters of the genes (or host genes) were selected. During chronic exposure of BP the expression of miR-22-3p, -29a-3p, -126a-3p, -193b-5p in the lungs of male rats were significantly increased, while the level of miRNA-483-3p were decreased. Expression of miRNA-483-3p was up-regulated during chronic BP exposure in the lungs of female rats and the levels of other studied miRNAs were unchanged. In turn, changes in the expression of miRNAs were followed by changes in the expression of their target genes, including PTEN, EMP2, IGF1, ITGA6, SLC34A2, and the observed changes in female and male rat lungs were varied. Thus, our results suggest that sex-dependent epigenetic effects of BP may be based on different expression of AhR- and ER- regulated miRNAs.

Key words: benzo(a)pyrene; AhR; ER; microRNA; sex differences

Funding. This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-415-540002).

Received: 17.12.2019, revised: 08.05.2020, accepted: 13.05.2020.