

УДК 577.151

©Коллектив авторов

## ЭФФЕКТ КСЕНОБИОТИКОВ НА ЭКСПРЕССИЮ микроРНК В ПЕЧЕНИ КРЫС

Л.Ф. Гуляева<sup>1,2\*</sup>, М.Д. Чанышев<sup>1</sup>, С.К. Колмыков<sup>2</sup>, Д.С. Ушаков<sup>1,3</sup>, С.С. Нечкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики,  
ул. Тимакова, 2, 630117 Новосибирск; эл. почта: imbb@niimbb.ru, gulyaeva@niimbb.ru

<sup>2</sup>Новосибирский государственный исследовательский университет, ул. Пирогова, 2, 630090 Новосибирск

<sup>3</sup>Новосибирский государственный педагогический университет, ул. Выборная, 28, 630126 Новосибирск

Исследовано влияние ксенобиотиков на экспрессию микроРНК в печени крыс. С этой целью с помощью биоинформатического анализа были отобраны микроРНК, способные взаимодействовать с 3'-нетранслируемой областью (3'-UTR) мРНК генов цитохрома P450 (CYP) - три микроРНК (miR-21, -221, -222), потенциальными мишенями которых являются мРНК CYP1A1 и две микроРНК (miR-143, miR-152), действующие на мРНК CYP2B1. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени определен уровень экспрессии данных микроРНК в печени крыс после обработки индукторами цитохрома P450 CYP1A и CYP2B - бензо(а)пиреном (БП), фенотарбитаом (ФБ) и ДДТ. Содержание miR-21,-221,-222 в печени крыс, обработанных как БП, так и ДДТ, было в 2-3 раза ниже, чем у контрольных животных, а этоксирезорурфин-О-деэтилазная (ЭРОД) активность CYP1A1 - увеличена в 5,5-8,7 раза. Под действием ФБ экспрессия miR-143 не изменилась, а miR-152 увеличилась в 2 раза, тогда как пентоксирезорурфин-О-деэтилазная (ПРОД) активность CYP2B увеличилась в 10,5 раз. В печени крыс, обработанных ДДТ, активность ПРОД увеличилась в 20,8 раза, экспрессия miR-143 - в 2 раза, а miR-152 не изменилась. Биоинформатический анализ взаимодействий микроРНК-мишень показал, что отобранные микроРНК потенциально способны связывать такие мишени, как мРНК AhR, ESR1, GR, CCND1, PTEN. Таким образом, профиль экспрессии miR-21, -221, -222, -143, -152 может меняться в зависимости от применяемого индуктора CYP. Как показал анализ *in silico*, мишенями исследуемых микроРНК могут быть не только CYP1A/2B, но и другие гены, в том числе вовлечённые в гормональный канцерогенез.

**Ключевые слова:** бензо(а)пирен, фенотарбитал, ДДТ, индукция, цитохром P450, микроРНК

**DOI:** 10.18097/PBMC20166202154

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время не вызывает сомнения, что микроРНК могут вносить существенный вклад в эпигенетические механизмы, связанные с развитием токсичности, а также с канцерогенезом [1]. Убедительно доказано, что спектр микроРНК в опухолевых и нормальных клетках существенно различается [2]. Однако в большинстве случаев причины, вызывающие изменение профиля экспрессии микроРНК, остаются неизвестными. За последние годы показано, что некоторые индукторы или субстраты цитохрома P450 (CYP), окисляющего ксенобиотики, могут влиять на экспрессию микроРНК. Так, хроническое введение крысам канцерогена табачного дыма 4-метилнитрозоамина приводит к изменению экспрессии микроРНК на ранних этапах развития рака лёгкого [3]. Экспрессия микроРНК может меняться под действием как генотоксичных [4], так и негенотоксичных соединений, таких как тетрахлордифенилоксин [5]. Нами показано, что экспрессия некоторых онкогенных микроРНК изменяется в разных органах самок крыс, обработанных индукторами цитохрома P450 [6]. МикроРНК влияют на активность CYP1B1, окисляющего эстрогены, что может приводить к гормональному дисбалансу [7]. Важно подчеркнуть, что микроРНК играют существенную роль в функционировании печени. Они вовлечены

в регенерацию печени [8], дифференцировку гепатоцитов [9], метаболизм желчных кислот [10], а также в гепатоканцерогенез [11]. Экспрессия микроРНК может изменяться под действием таких лекарственных препаратов, как фенотарбитал (ФБ) [12]. Практически все использованные в этой работе соединения влияли на профиль экспрессии микроРНК [12]. Все это говорит о необходимости дальнейшего изучения роли микроРНК в развитии токсичности, вызванной различными ксенобиотиками.

Используя микроРНК, отобранные на основании биоинформатического анализа, в настоящей работе исследовали влияние ксенобиотиков-индукторов цитохромов P450 подсемейств CYP1A1 (бензо(а)пирен, БП) и CYP2B1 (ФБ и ДДТ) на экспрессию этих микроРНК в печени крыс.

## МЕТОДИКА

В работе использовали самцов крыс Вистар, полученных из вивария ИЦиГ СО РАН. Животных содержали группами по три особи в условиях естественного освещения и при свободном доступе к пище и воде. Животным внутривентрально вводили в течение трёх дней растворённый в 0,5 мл физ. раствора ФБ (5-этил-5-фенилбарбитуровая кислота) из расчёта 80 мг/кг, 75 мг/кг БП (бенз(а)пирена), растворённого в растительном масле –

и однократно 50 мг/кг ДДТ (1,1,1-трихлор-2,2-ди(п-хлорфенил)этан), также растворённого в растительном масле; контрольным крысам вводили по 0,5 мл масла. Животных забивали на третьи сутки после первичного введения индуктора.

#### Определение активности цитохрома P450

Микросомальную фракцию печени выделяли стандартным методом дифференциального центрифугирования. Общее содержание цитохрома P450 определяли спектрофотометрическим методом [13]. Специфические активности CYP1A1/2B1 определяли флуоресцентным методом по скорости О-деалкилирования этокси- (ЭРОД) и пентокси (ПРОД)-резорудинов [14].

#### Выделение микроРНК

Образцы ткани печени весом около 50 мг гомогенизировали в 0,5 мл лизирующего буфера (4 М гуанидинизотиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,3% саркозил, 0,1% 2-меркаптоэтанол, 25 мМ ацетат натрия). Гомогенат центрифугировали в течение 2 мин при 10000 g, затем к супернатанту добавляли равный объём изопропанола. Полученный раствор тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. Далее раствор центрифугировали (10 мин при 10000 g), супернатант удаляли, осадок промывали дважды – первый раз 500 мкл 70% этанола, второй – 300 мкл ацетона. Осадок сушили на воздухе в течение 5 мин, после чего растворяли в 200 мкл mQ-H<sub>2</sub>O.

#### Реакция обратной транскрипции микроРНК

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием специфичных праймеров, образующих 5'-концевую шпильчатую структуру [15]. В результате реакции синтезируется конструкция длиной около 70 нуклеотидов (н), которая может быть "ограничена" праймерами для ПЦР. кДНК получали с помощью обратной транскрипции на матрице микроРНК, выделенной из образцов тканей. Праймеры, приведенные в таблице 1, и набор реагентов, полученный от компании ЗАО "Вектор-бест" (Россия), использовали согласно рекомендациям производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили в следующих условиях: 5 мин, 25°C; 30 мин, 42°C; 2 мин, 95°C. Продукты обратной транскрипции использовали для проведения ПЦР.

#### ПЦР в реальном времени

Для определения уровня экспрессии микроРНК miR-21, -221, -222, -143, -152 проводили ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 ("Bio-Rad Laboratories", США) с использованием технологии TaqMan и реагентов, полученных от компании ЗАО "Вектор-Бест" (Россия), согласно рекомендациям производителя. В качестве референсной РНК использовали малую ядерную РНК U<sub>6</sub>, которая стабильно экспрессируется в тканях животных. В таблице 2 приведены олигонуклеотидные пробы, подобранные для продуктов обратной транскрипции микроРНК и использованные в работе. Для контроля специфичности ПЦР получали кривые плавления после добавления красителя SYBR в реакционную смесь по окончании реакции. Относительный уровень экспрессии микроРНК определяли по значению пороговых циклов Ct с учетом эффективности реакции, которую оценивали по увеличению сигнала за цикл на экспоненциальной стадии амплификации исследуемой микроРНК и референсной РНК U<sub>6</sub>. ПЦР проводили в следующих условиях: предварительный прогрев при 95°C – 3 мин, затем 50 основных циклов: денатурация при 95°C – 15 с, отжиг при 58°C – 20 с., элонгация и сбор данных по флуоресценции при 72°C – 30 с.

#### Биоинформатические методы

С целью предсказания, отбора и проверки всех известных микроРНК крыс из miRBase [16], сайты связывания которых представлены в 3'-UTR мРНК интересующих нас генов, проведён поиск возможных сайтов связывания в 3'-UTR мРНК CYP2B и CYP1A при помощи алгоритмов TargetScan, miRDB, miRanda и miRWalk [17]. Для применения алгоритма TargetScan проведено локальное выравнивание нуклеотидных последовательностей 3'-некодирующих областей генов при помощи алгоритма TBA [18]. Информация о структуре зрелых микроРНК взята из miRBase [16].

#### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel. Результаты представлены в виде M±SD, где M – среднее, SD – стандартное отклонение. Статистическую значимость различий между выборками оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров для обратной транскрипции микроРНК

Ген	Праймеры, нуклеотидная последовательность
U6 (малая РНК)	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGCCATGC-3'
miR-21	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACATC-3'
miR-221	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAAACCCA-3'
miR-222	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACCCAGTA-3'
miR-152	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCAAGTTC-3'
rno-miR-143	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGAGCTAC-3'

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров для микроРНК

miRNA	Последовательности праймеров	
U6 (малая РНК)	Прямой	5'-GCCGCATACAGAGAAGATTA-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACGGCCATGC-(BHQ1)-3'
miR-21	Прямой	5'-GCCGCTAGCTTATCAGACT-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTCAACATC-(BHQ1)-3'
miR-221	Прямой	5'-GCCGCAGCTACATTGTCTGC-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACGAAACCCA-(BHQ1)-3'
miR-222	Прямой	5'-GCCGCAGCTACATCTGGC-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACCCAGTA-(BHQ1)-3'
miR-143	Прямой	5'-GCCGCTGAGATGAAGCACT-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTGAGCTAC-(BHQ1)-3'
miR-152	Прямой	5'-GCCGCTCAGTGCATGACA-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACCCAAGTTC-(BHQ1)-3'

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки индуцирующего действия БП, ФБ и ДДТ была определена активность специфических форм СYP (табл. 3).

Таблица 3. Содержание и активность цитохрома P450 в печени крыс при индукции ксенобиотиками

Индуктор	Содержание СYP, (нмоль/мг белка)	ЭРОД активность (СYP1A), (пмоль/(мин мг белка))	ПРОД активность (СYP2B), (пмоль/(мин мг белка))
Контроль	0,56±0,11	116,3±57,0	40,17±32,13
БП	0,96±0,04	1012,0±112,5	38,15±31,67
ФБ	2,05±0,17	156,3±98,0	420,2±47,0
ДДТ	1,11±0,05	646,7±180,6	834,8±161,0

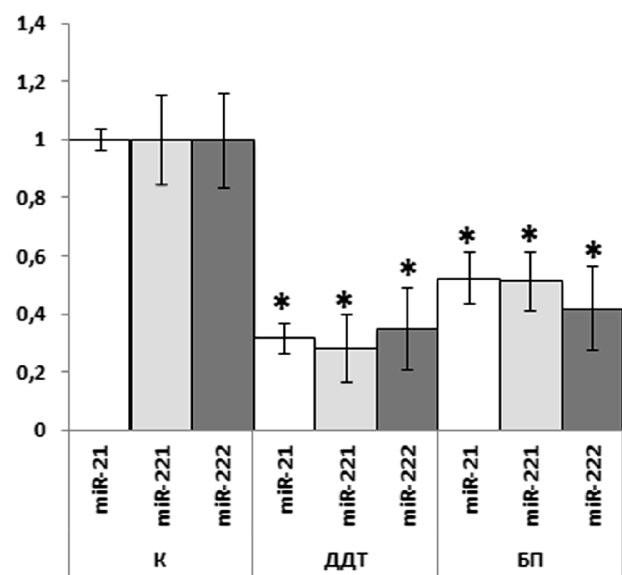
Введение всех использованных ксенобиотиков приводило к 2-3-кратному увеличению общего содержания цитохрома P450 в печени крыс. При индукции БП и ФБ специфические активности ЭРОД (СYP1A) и ПРОД (СYP2B) увеличивались в 8,7 и 10,5 раза соответственно. При индукции ДДТ активности ЭРОД и ПРОД также увеличивались в 5,5 и 20 раз соответственно. Эти результаты подтверждают, что использованные ксенобиотики индуцируют монооксигеназы печени крыс.

Наряду с активностью изоформ цитохрома P450, в печени контрольных и обработанных БП и ДДТ

крыс определяли экспрессию трёх микроРНК – miR-21, -221, -222. Выбор этих микроРНК обусловлен, с одной стороны, их ролью в канцерогенезе [19], а с другой – потенциальной способностью связываться с 3'-концом мРНК СYP1A1 [20]. Введение животным как БП, так и ДДТ, приводило к статистически значимому содержанию (в 2-3 раза) miR-21, -221, -222 в печени (рис. 1).

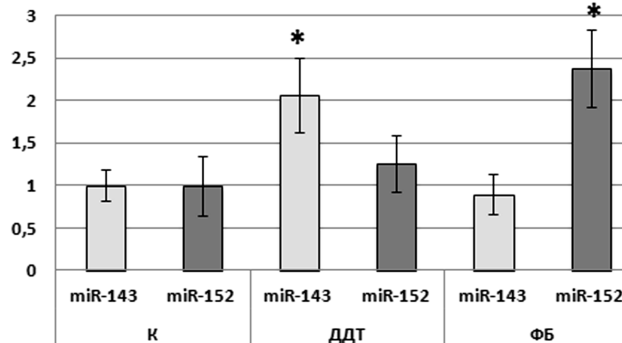
Для определения экспрессии микроРНК при индукции ФБ необходимо было выбрать микроРНК, мишенью которых была мРНК СYP2B. С этой целью проведен биоинформатический анализ, который выявил 15 потенциальных сайтов образования дуплексов микроРНК-мРНК. Из них отобрали высококомплементарные сайты, расположенные на консервативных участках 3'-UTR мРНК СYP2B1/2 крысы, а также сайты с наименьшими значениями свободной энергии дуплексов микроРНК-мРНК. Значения свободной энергии дуплексов miR-143 и miR-152 с мРНК-мишенью составляли 19,1 и -23,8 ккал/моль соответственно. Экспрессию этих микроРНК измерили экспериментально (рис. 2). Как следует из полученных результатов, экспрессия miR-143 в печени крыс не изменилась под действием ФБ, но увеличилась в 2 раза при введении ДДТ по сравнению с контрольными животными. Экспрессия miR-152 увеличилась в 2 раза при введении ФБ и не изменилась при обработке ДДТ.

Полученные результаты свидетельствуют о различиях во влиянии индукторов цитохрома P450 на экспрессию выбранных микроРНК. Так, ДДТ и БП снижали уровень экспрессии miR-21, -221, -222 (рис. 1).



**Рисунок 1.** Относительный уровень экспрессии miR-21, -221, -222 в печени контрольных и обработанных ДДТ и БП крыс. На оси Y приведено соотношение количества микроРНК в индуцированной и контрольной группе животных. Приведены средние значения  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). Результаты нормированы на контрольную группу животных. \* - статистическая значимость различий по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Можно предположить, что снижение экспрессии данных микроРНК в печени дает “зелёный свет” синтезу белка, что важно для метаболизма ксенобиотиков, окисляемых CYP1A1. Эти результаты подтвердили полученные нами ранее данные по снижению экспрессии miR-21, -221, -222, и -429 в печени самок крыс, обработанных различными ксенобиотиками [6]. Таким образом, мы не выявили зависимых от пола изменений в профиле экспрессии данных микроРНК при индукции БП и ДДТ. Ранее, при проведении биоинформатического анализа мы не разделяли микроРНК, специфичные к мРНК CYP2B/1A [6]. В настоящей работе такой анализ проведен с учётом свободной энергии дуплексов микроРНК-мРНК. Подтверждено, что miR-21, -221, -222 с большей вероятностью могут взаимодействовать с 3'-UTR мРНК CYP1A1. Выявлены новые микроРНК для CYP2B, которые и стали предметом исследования. Не выявлено снижения экспрессии микроРНК miR-143, -152, потенциальных регуляторов мРНК CYP2B, как это наблюдалось в случае микроРНК, регулирующих CYP1A. Уровень экспрессии miR-152 и miR-143 неодинаково увеличивался при введении крысам ФБ и ДДТ (рис. 2). Можно предположить, что максимальная индукция CYP2B ФБ и ДДТ осуществляется по классическому CAR-регулируемому транскрипционному и посттранскрипционному механизмам. В таком случае miR-152 и miR-143 в зависимости от применяемого ксенобиотика могут ингибировать негативный регулятор экспрессии гена *CYP2B*, в промоторе которого имеется сайт связывания (NE) [21]. Интересно, что выявлена индуктор-специфичная экспрессия именно гена *CYP2B*,



**Рисунок 2.** Относительный уровень экспрессии miR-143, -152 в печени контрольных и обработанных ДДТ и ФБ крыс. По оси Y отмечено соотношение количества микроРНК в индуцированной и контрольной группе животных. Приведены средние значения  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). Результаты нормированы на контрольную группу животных. \* - статистическая значимость различий по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

механизм которой остается неизвестным [22]. Возможно, что активация специфичных микроРНК может быть одной из причин различного действия химических соединений на экспрессию *CYP2B*. В целом, анализируя регуляцию экспрессии *CYP2B1*, можно предположить, что микроРНК либо вообще не участвуют непосредственно в посттранскрипционной регуляции его индукции, либо участвуют опосредованно, ингибируя негативный регулятор экспрессии гена. Не исключено также, что для поиска прямых негативных регуляторов мРНК *CYP2B1* нужно расширить панель микроРНК, выбранных *in silico*. Без сомнения, для подтверждения таких потенциальных механизмов необходимы дальнейшие и теоретические, и экспериментальные исследования.

Особый интерес представляют молекулярные механизмы, приводящие к изменению профиля экспрессии микроРНК под действием ксенобиотиков. Одним из таких механизмов могут быть изменения в метилировании ДНК, как это показано при введении животным ДДТ [23]. Другим механизмом может быть изменение экспрессии меж- и внутригенных генов микроРНК, в промоторе которых есть сайты связывания с ядерными рецепторами AhR и CAR. Однако эти механизмы остаются неизученными и нуждаются в экспериментальном подтверждении.

Выявленные изменения в экспрессии микроРНК при индукции цитохрома P450, в свою очередь, могут приводить к изменению экспрессии многочисленных генов, участвующих в канцерогенезе. Поэтому следующим шагом нашей работы было выявление с помощью методов *in silico* предполагаемых мРНК-мишеней, с которыми могут взаимодействовать исследуемые микроРНК (табл. 4).

Показано, что miR-21, -221, -222, -143, -152 могут взаимодействовать не только с мРНК цитохрома P450, но с другими мишенями, среди которых можно отметить мРНК ряда важных факторов транскрипции, таких как AhR (Aryl hydrocarbon Receptor), ESR1 (Estrogen Receptor 1), GR (Glucocorticoid

Таблица 4. Результаты предсказания мРНК-мишеней исследуемых микроРНК

Мишени микроРНК	МикроРНК				
	21	221	222	143	152
CYP19A1	-	+	+	-	+
CYP1A1	-	+	+	-	+
CYP2B1	-	-	-	++	++
AhR	+	-	-	+	+
ESR1	-	+	+	-	+
PXR	+	+	+	+	+
CAR	-	+	-	-	-
GR	++	+	+	++	++
Pgr	+	+	-	+	+
PTEN	-	+	+	+	++
CCND1	+	+	-	+	+

Примечание: (-) - нет взаимодействия; (++) - возможность образования дуплекса мРНК-микроРНК показана >2 методами из четырёх; (+) - ≤2 методами *in silico*.

Receptor), а также циклин D1 (CCND1) и онкосупрессорная фосфатаза PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog). Во многих гормонозависимых опухолях репродуктивной сферы существенно изменена экспрессия генов этих факторов [24]. Не исключено, что микроРНК могут вносить свой вклад и в изменение экспрессии генов-мишеней гормонального канцерогенеза.

Таким образом, ксенобиотики могут воздействовать на сигнальные клеточные пути с использованием различных механизмов. Они способны связываться с рецепторами-ксеносенсорами (CAR, AhR), вызывая их транслокацию в ядро и активацию транскрипции генов-мишеней, в том числе CYP1A и CYP2B [25]. Ксенобиотики могут также влиять экспрессию микроРНК, которые коэкспрессируются либо с “геном-хозяином”, либо независимо, что характерно для межгенных микроРНК. В свою очередь, изменение экспрессии микроРНК может сопровождаться изменением экспрессии регулируемых ими генов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Профиль экспрессии микроРНК, важных посттранскрипционных регуляторов экспрессии многих генов, меняется при развитии патологических процессов, в том числе при онкологических заболеваниях. Считается, что к таким изменениям может приводить действие ксенобиотиков. Поэтому мы определили экспрессию некоторых микроРНК в печени крыс, обработанных ксенобиотиками, способными индуцировать цитохромы P450. На основании биоинформатического анализа были выявлены микроРНК miR-21, -221, -222 и miR-152, -143, потенциальными мишенями которых являются мРНК CYP1A и CYP2B соответственно.

Экспериментально подтверждено, что экспрессия этих микроРНК изменяется при введении ксенобиотиков. Экспрессия miR-21, -221, -222 снижается в 2 раза при обработке БП. При индукции ФБ экспрессия miR-143 не менялась, а miR-152 увеличивалась в 2 раза. Напротив, под действием ДДТ экспрессия miR-143 увеличивалась в 2 раза, а экспрессия miR-152 существенно не менялась. Анализ *in silico* взаимодействий исследуемых микроРНК и их потенциальных мишеней показал, что мишенями miR-21, -221, -222, -152, -143 могут быть мРНК AhR, ESR1, GR, CCND1, PTEN, экспрессия которых изменена во многих гормонозависимых опухолях. Таким образом, мы показали, что ферменты метаболизма ксенобиотиков, а также гены-мишени гормонального канцерогенеза, могут регулироваться микроРНК, экспрессия которых меняется под действием ксенобиотиков.

Работа поддержана грантом РФФИ №15-03-01700.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lin S., Gregory R.I. (2015) Nat. Rev. Cancer, **15**(6), 321-333.
2. Jansson M.D., Lund A.H. (2012) Mol. Oncol., **6**, 590-610.
3. Kalscheuer S., Zhang X., Zeng Y., Upadhyaya P. (2008) Carcinogenesis, **29**(12), 2394-2399.
4. Li Z.G., Branham W.S., Dial S.L., Wang Y., Guo L., Shi L., Chen T. (2010) BMC Genomics, **11**, 609.
5. Moffat I.D., Boutros P.C., Celius T., Linden J., Pohjanvirta R., Okey A.B. (2007) Toxicol. Sci., **99**, 470-487.
6. Chanyshiev M.D., Kosorotikov N., Titov S.E., Kolesnikov N.N., Gulyaeva L.F. (2014) Life Sci., **103**(2), 95-100.
7. Tsuchiya Y., Nakajima M., Takagi S., Taniya T., Yokoi T. (2006) Cancer Res., **66**(18), 9090-9098.
8. Chen H., Sun Y., Dong R., Yang S., Pan C. (2011) PLoS ONE, **6**(5), 20238.
9. Gailhouse L., Gomez-Santos L., Hagiwara K., Hatada I., Kitagawa N. (2013) Hepatology, **58**(3), 1153-1165.
10. Trajkovski M., Hausser J., Soutschek J., Bhat B., Akin A., Zavolan M., Heim M.H., Stoffel M. (2013) Nature, **474**, 649-653.
11. Koufaris C., Gooderham N.J. (2013) Toxicol Sci., **131**(2), 337-342.
12. Koufaris C., Wright J., Osborne M., Currie R.A., Gooderham N.J. (2013) Toxicology, **314**(2-3), 247-253.
13. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2370-2378.
14. Burke M.D., Thompson S., Elcombe C., Halpert J., Haaparanta T., Mayer R.T. (1985) Biochem. Pharmacol., **34**, 3337-3345.
15. Kramer M.F. (2011) Curr. Protoc. Mol. Biol., Chapter 15: Unit 15.10.
16. Kozomara A., Griffiths-Jones S. (2014) Nucleic Acids Res., **42**, D68-D73.
17. Hamzeiy H., Allmer J., Yousef M. (2014) Methods Mol. Biol., **1107**, 207-210.
18. Blanchette M., Kent J.W., Riemer C., Elnitski L., Smit A.F., Roskin K.M., Baertsch R., Rosenbloom K., Clawson H., Green E.D. (2004) Genome Res., **14**, 708-715.
19. Chan E., Prado D.E., Weidhaas J.B. (2011) Trends Mol. Med., **17**(5), 235-243.
20. Гуляева Л.Ф., Чанышев М.Д., Колмыков С.К., Колесников Н.Н. (2014) Вестник НГУ. Сер. Биология, клиническая медицина, **12**(1), 119-124.

21. Kemper B. (1998) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **61**, 23-64.
22. Yamada H., Ishii Y., Yamamoto M., Oguri K. (2006) Curr. Drug Metab., **7**(4), 397-409.
23. Collotta M., Bertazzi P.A., Bollati V. (2013) Toxicology, **307**, 35-41.
24. Gibson D.A., Saunders P.T. (2014) Endocr. Relat. Cancer, **21**(2), T13-31.
25. Zelko I., Negishi M. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun., **277**(1), 1-6.

Поступила: 02. 10. 2015.  
Принята к печати: 11. 03. 2016.

## EFFECT OF XENOBIOTICS ON microRNA EXPRESSION IN RAT LIVER

**L.F. Gulyaeva<sup>1,2</sup>, M.D. Chanyshv<sup>1</sup>, S.K. Kolmykov<sup>2</sup>, D.S. Ushakov<sup>1,3</sup>, S.S. Nechkin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Biophysics,  
2/12 Timakov str., Novosibirsk, 630117 Russia; e-mail: imbb@niimbb.ru, gulyaeva@niimbb.ru

<sup>2</sup>Novosibirsk State University, 2 Pirogova str., Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>3</sup>Novosibirsk State Pedagogical University, 28 Vybornaya str., Novosibirsk, 630126 Russia

Using bioinformatics analysis we selected microRNAs which could bind 3'-UTR-region of cytochrome P450 (CYP) genes. Three microRNA miR-21, -221, -222, their potential targets might be mRNA for CYP1A1, and two microRNA miR-143, miR-152 for CYP2B1 accordingly were selected for experimental verification. Expression level of these microRNAs in rat liver upon benzo(a)pyrene (BP), phenobarbital (PB), and DDT induction was determined using RT-qPCR method. In rats treated by both BP, and DDT the hepatic content of miR-21, -221, -222 significantly demonstrated a 2-3-fold decrease. The decrease in miR expression was accompanied by a considerable (5.5-8.7-fold) increase in the CYP1A1-mediated EROD activity. The expression of miR-143 remained unchanged after the PB treatment, while the expression of miR-152 increased by 2 times, however, the (10.5-fold) increase in PROD activity of CYP2B was much higher. In the DDT-treated liver PROD activity increased by 20 times, the expression of miR-152 didn't change, and the expression of miR-143 increased by 2 times. The bioinformatics analysis of interactions between microRNAs and targets showed that the studied miRs can potentially bind 3'-end of AhR, ESR1, GR, CCND1, PTEN mRNA. Thus, the expression profile of miR-21, -221, -222, -143, -152 might change under the xenobiotics exposure. *In silico* analysis confirmed, that microRNAs target not only cytochrome P450 mRNA but also other genes, including those involved in hormonal carcinogenesis, they also can be regulated with studied miRs.

**Key words:** benzo(a)pyrene, phenobarbital, DDT, induction, cytochrome P450, microRNA