Биомедицинская химия, 2017 том 63, вып. 6, с. 481-498.

ОБЗОР

©Коллектив авторов

РОЛЬ МИКРО-РНК В РЕГУЛЯЦИИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ГЛИОМАХ

О.И. Кит, Д.И. Водолажский, Э.Е. Росторгуев, Д.Х. Поркшеян, С.Б. Панина*

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт,
344037, Ростов-на-Дону, 14-я Линия, 63; эл. почта: tailana703@gmail.com

Глиомы – инвазивные опухоли мозга, характеризующиеся высокими уровнями рецидивирования и смертности. Глиобластома, характеризующаяся практически 100%-ным рецидивированием и неблагоприятным прогнозом для пациентов, относится к наиболее опасным видам глиом. Микро-РНК (miR) – класс коротких некодирующих РНК, способных ингибировать трансляцию путём таргетной деградации мРНК. Цель настоящего обзора – анализ исследований и экспериментальных результатов, касающихся характерных для глиом/глиобластом изменений профилей экспрессии микро-РНК, мишенями которых являются компоненты аберрантно регулируемых в глиомах сигнальных путей Hedgehog, Notch, Wnt, EGFR, TGFβ и HIF1α. Отдельно рассмотрены связи микро-РНК с мишенями 2-гидроксиглутарата, продукта мутантной изоцитратдегидрогеназы (R132H *IDH1*), мутационные изменения которой являются специфичными для патогенеза глиом. Детекция определенных видов микро-РНК в тканях и сыворотке крови может использоваться для диагностики и прогноза, в том числе ответа конкретного пациента на терапию, а также для разработки новых терапевтических стратегий.

Ключевые слова: глиомы, микро-РНК, сигнальные пути, молекулярные маркеры, эпигенетические изменения

DOI: 10.18097/PBMC20176306481

ВВЕДЕНИЕ

Ежегодно с частотой встречаемости 3,5 на каждые 100000 человек диагностируют опухоли центральной нервной системы, что составляет приблизительно 1,9% от всех новых случаев рака и 2,3% летальных исходов от всех онкологических заболеваний в мире [1]. Глиомы – тип опухолей, происходящих в результате злокачественной трансформации глиальных клеток, и поражающих головной и спинной мозг [2]. Согласно классификации ВОЗ, по клинико-патологическим критериям глиомы разделяют на стадии I-IV. Наиболее опасна мультиформная глиобластома – опухоль IV стадии. Морфологически глиомы подразделяют на астроцитомы, олигодендроглиомы и смешанные олиго-астроцитомы [3].

В патогенез глиом вовлечено множество сигнальных путей и молекул. К настоящему времени идентифицированы характерные для глиом генетические изменения и/или аберрантная экспрессия генов и их белковых продуктов. Особый интерес представляют микро-РНК (miR). Это класс широко распространённых коротких (длиной 18-25 нуклеотидов) некодирующих молекул РНК. Эти молекулы способны ингибировать трансляцию путём связывания с мРНК определенных генов с образованием специфических гибридов между 5′-проксимальным “seed”-регионом (позиции 2-8) miR и 3′-UTR мРНК, вызывая их таргетную деградацию или блок трансляции в зависимости от степени комплементарности к мРНК-мишени [4] (рис. 1). Всё большее количество исследований подтверждают тот факт, что экспрессия различных видов микро-РНК может являться полезным клиническим и прогностическим маркером развития глиом. Так, были идентифицированы 26 видов микро-РНК, регуляция которых была нарушена в глиомах по сравнению с неопухолевыми тканями, а 7 из них (miR-21, -128, -132, -134, -155, -210 и -409-5p) позволяют отличить олигодендроглиомы от глиобластом [5].

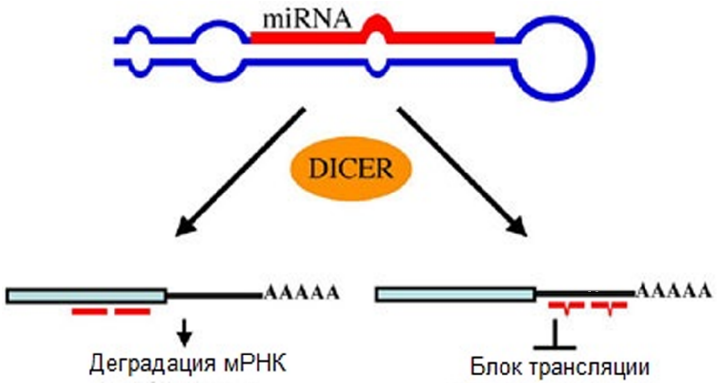

Рисунок 1. Два механизма, используемые микро-РНК для регуляции трансляции. Некоторые miRNA способны полностью комплементарно связываться с таргетными мРНК, что вызывает их деградацию. Микро-РНК также могут быть не полностью комплементарны мишеням, тем самым, трансляция блокируется. Адаптировано из [147].

* - адресат для переписки

Обнаружено значительное количество различных miR, влияющих на процессы злокачественной трансформации клеток и прогрессии глиом [6]. Активно исследуется возможность использования miR в качестве прогностических/диагностических маркеров прогрессии глиом. Например, в исследовании [7] был идентифицирован и валидирован профиль из 9 микро-РНК (miR-124a, -10b, -222, -34a, -182, -148a, -145, -370 и -9), с помощью которого можно эффективно прогнозировать выживаемость больных глиобластомой. Одной из наиболее гиперактивированных miR при глиоме является антиапоптотическая miR-21, экспрессия которой в крови и образцах ткани при глиомах характеризуется высокими значениями специфичности и чувствительности как диагностического теста [8].

Показано, что те микро-РНК, которые гипорегулированы при глиомах по сравнению с нормальными тканями мозга, функционируют как опухолевые супрессоры, напрямую действуя на онкогены *c-Met*, *Notch*, *Bmi-1*, *EGFR* (epidermal growth factor receptor), рецепторные тирозинкиназы, а также гены, связанные с контролем клеточного цикла. Например, гипорегуляция miR-205 оказалась независимым предиктором смертности среди пациентов с глиомами, который может служить значимым прогностическим индикатором для пациентов с глиомами более высокой (III-IV) степени злокачественности по классификации ВОЗ [9]. Активация экспрессии miR-497 в клетках глиомы приводила к уменьшению экспрессии фактора VEGF (vascular endothelial growth factor) и плотности кровеносных сосудов, тем самым, являясь негативным регулятором ангиогенеза. Эта микро-РНК выступает в роли благоприятного прогностического фактора: экспрессия miR-497 была значительно ниже в глиомах с высокой степенью злокачественности, по сравнению с глиомами низкой степени [10].

Продемонстрировано, что эволюционно-консервативный РНК-связывающий белок LIN28, способный блокировать созревание предшественников miR семейства let-7, гиперэкспрессирован у больных глиобластомой с неблагоприятным прогнозом. Снижение уровня LIN28 в культуре клеток глиомы U251 вызывало остановку клеточного цикла в фазе G1, замедление пролиферации и активацию апоптоза [11]. Показано, что miR let-7 способна напрямую регулировать экспрессию таких онкогенов, как *Ras*, *c-Myc*, а также транскрипционного фактора *Stat3* за счёт наличия в 3′-UTR этих генов let-7-связывающих сайтов; let-7 ингибирована при различных видах опухолей [12].

Наряду с этим, микро-РНК с повышенной экспрессией в опухолях могут выступать в роли онкогенов. Так, в клетках глиом была установлена гиперрегуляция таких микро-РНК, как miR-10b, -130a, -221, -125, -9, -21, -25 и -123 по сравнению с нормальной тканью мозга. Увеличение экспрессии miR-10b и miR-210 при глиомах ассоциировано с неблагоприятными исходами [13, 14]. Настоящий обзор рассматривает роль различных микро-РНК в дисрегуляции компонентов сигнальных путей, ассоциированных с патогенезом глиом, включая Hedgehog-, Wnt-, Notch-, EGFR- и TGFβ (transforming growth factor beta)-сигналинг.

1. HEDGEHOG-СИГНАЛИНГ (Hh)

У млекопитающих обнаружено 3 лиганда Hh-пути – Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) и Desert Hedgehog (Dhh). Сигнальный Hh-путь инициирует пролиферацию субпопуляции характерных для глиом опухолевых стволовых клеток (ОСК), экспрессирующих основные компоненты Hh-пути (*GLI1*, *PTCH1*, *SMO*, *SHH*) [15], а также играет роль в развитии медуллобластом [16]. Основными компонентами Shh-пути являются: трансмембранный рецептор patched 1 (PTC1, PTCH1), ассоциированная с ним эффекторная молекула smoothened (SMO), а также активатор транскрипции GLI1. Связывание лиганда Shh с его рецептором patched приводит к снятию ингибирования SMO и транскрипционной активации ряда генов [16].

Глиобластомы с мутацией в гене *IDH1* характеризуются активацией Hh-пути, поэтому потенциально возможно использование ингибиторов Hh в терапии таких опухолей [17]. Известно, что мутации в генах метаболических ферментов *IDH1/2* (наиболее распространена замена R132H гена *IDH1*) – практически уникальная характеристика патогенеза глиом, приводящая к превращению 2-оксоглутарата в онкометаболит 2-гидроксиглутарат и указывающая на более благоприятный прогноз исхода заболевания [18]. Используя специфические антитела к мутантной IDH1 [19] было установлено, что Hh-путь (экспрессия *PTCH1*, *GLI1*) активен в трансформированных клетках глиомы.

1.1. SMO, GLI1, PTCH

Уровень SMO повышен при глиомах и ассоциирован со стадией развития опухоли по классификации ВОЗ и продолжительностью жизни пациентов. Было показано, что экспрессия SMO обратно коррелирует с экспрессией miR-326, являясь её прямой мишенью. Более того, гиперэкспрессия miR-326 снижала пролиферативную активность и стволовые свойства культуры ОСК глиомы U251 [20]. При этом miR-326 способна ингибировать сигнальный путь PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) в клетках глиобластомы [21]. Интересно, что miR-326 является интрагенной микро-РНК, располагающейся в первом интроне гена аррестина β1 (*ARRB1*). Комбинированное введение miR-326 и полифенола куркумина значительно снижало активность Shh/Gli1 пути в клетках глиомы [22]. При ингибировании двух других микро-РНК – miR-125b и miR-324 наблюдались высокие уровни Hh-зависимой генной экспрессии, приводящей к пролиферации глиальных клеток [23]. В группе пациентов с глиобластомами, характеризующимися повышенной экспрессией *Gli1*, 13 miR, включая miR-125b, были гипоактивированы, в то время как 4 miR, в том числе miR-144 – гиперактивированы [24]. При этом, в высокоинвазивной линии ОСК глиомы SU3 была

обнаружена высокая, по сравнению с клеточной линией U251, транскрипционная активность miR-125b и MMP9 (matrix metalloproteinase 9) [25].

Всесторонний анализ (иммуноблоттинг, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), исследование с репортёрным геном и др.) показал, что молекула PTCH1, блокирующая активацию Shh-пути, является мишенью miR-9 при глиобластоме. Поэтому гиперактивация miR-9 может способствовать резистентности к противоопухолевому препарату темозоломиду, а ингибирование miR-9 в этом свете предстает как потенциальный терапевтический способ повышения химиочувствительности [26]. В связи с характерной мутацией R132H *IDH1* можно отметить, что некоторые микро-РНК, регулирующие Hh-сигналинг, а именно miR-9 и miR-324 входят в группу из 23 miR, специфических именно для *IDH1*-мутированных глиобластом, как показало исследование экспрессии микро-РНК 470 образцов глиобластом из базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas). Так, экспрессия miR-9 и miR-324 была значительно выше в тканях глиом с мутацией R132H *IDH1*, по сравнению с опухолями без данной мутации, что ассоциировалось с благоприятным прогнозом [27].

2. NOTCH-СИГНАЛИНГ

В результате исследования биологических функций микро-РНК было обнаружено их участие в процессах глиомогенеза за счёт дисрегуляции компонентов таких сигнальных путей, как Notch, Wnt, TGFβ, EGFR [28]. Рецепторы Notch (Notch1-4) являются трансмембранными гетеродимерными белками. Каноническими лигандами Notch-рецептора являются белки семейства DSL; среди генов транскрипционных факторов, регулируемых Notch, – *NF-κB*, *PPAR*, *Sox-2* и др. [29]. Показано, что Notch-сигналинг активируется в ответ на гипоксию в нормальных и трансформированных клетках, а уровни экспрессии *NOTCH1* и *EGFR* коррелируют при астроцитомах высокой степени злокачественности; при этом *EGFR* находится под транскрипционным контролем NOTCH [29, 30].

Notch-сигналинг важен для поддержания пролиферативных свойств субпопуляции ОСК глиомы и ингибирует клеточную дифференцировку [31]. Нокдаун генов рецепторов NOTCH позволил выяснить, что рецепторы NOTCH1 и NOTCH2 вносят различный вклад в рост клеток глиобластомы: NOTCH2 играет более существенную роль [32]. К настоящему времени показана роль нескольких онкосупрессорных микро-РНК в репрессии компонентов Notch-пути. Так, Chen и соавторы [33] показали, что miR-107 ингибирует инвазивность и пролиферацию ОСК глиомы путём снижения уровня NOTCH. В работе [34] была продемонстрирована способность miR-34a подавлять экспрессию множества онкогенов – *NOTCH1*, *NOTCH2*, а также гена протеинкиназы CDK6 (cyclin dependent kinase 6). Как оказалось, miR-326 гипоактивирована в глиомах за счёт сниженной экспрессии гена-“хозяина” этой miR – *ARRB1*. MiR-326 ингибирует *NOTCH1* и *NOTCH2*, и при этом сама способна репрессироваться NOTCH [35]. MiR-33a необходима для поддержания способности к росту и пролиферации опухоль-инициирующих клеток при глиобластоме, она демонстрирует повышенные уровни экспрессии при сравнении с другими клетками глиомы и ассоциирована с худшим прогнозом для пациентов. Среди мишеней miR-33a обнаружена мРНК *UVRAG* (UV radiation resistance-associated gene), известного негативного регулятора Notch-пути [36]. Было показано снижение уровней экспрессии miR-107, -34a и -326 при развитии глиобластомы относительно нормальных тканей мозга [37].

NOTCH1 является прямой мишенью miR-146a, которая уменьшает образование и миграцию ОСК глиомы. Глобальный экспрессионный анализ показывает, что активация *EGFR* и инактивация *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) индуцируют экспрессию miR-146a, представляя собой механизм отрицательной обратной связи, сдерживающий опухолевый рост [38]. Для глиобластом, обработанных ингибиторами miR-148a и miR-31, отмечено снижение темпов пролиферации, стволовых свойств опухолевых клеток, нормализация сосудистой системы, что частично опосредовано общей мишенью данных микро-РНК – *FIH1* (factor inhibiting hypoxia-inducible factor 1) и последующего сигналинга *HIF1α* (hypoxia inducible factor 1 alpha subunit) и Notch [39]. Показано увеличение экспрессии miR-148a при глиобластоме [37].

3. WNT-СИГНАЛИНГ

При отсутствии активации Wnt в ходе Wnt/β-катенин сигналинга, дисрегулированного в ОСК глиом [40], β-катенин подвергается фосфорилированию и деградации при участии комплекса, состоящего из белков GSK3β (glycogen synthase kinase 3 beta), APC, Axin, CK1 (casein kinase 1). Связывание лиганда Wnt со своим клеточным рецептором Frizzled в присутствии ко-рецептора LPR5/6 (low-density lipoprotein receptor related protein) активирует Wnt/β-катенин сигналинг, что приводит к фосфорилированию Dishevelled и инактивации комплекса, осуществляющего деградацию β-катенина. В результате β-катенин транслоцируется в ядро, где активирует транскрипцию ряда генов-мишеней. Антагонистами Wnt сигнального пути являются белки семейства SFRP (soluble Frizzled-related proteins). Комбинированная гипорегуляция *SFRP1* одновременно с гиперрегуляцией *SFRP4* и *FZD7* значительно снижала медиану выживаемости пациентов с глиомами [41]. Эпигенетические изменения играют бóльшую роль в активации Wnt-сигналинга, чем геномные мутации [42].

3.1. CTNNB1 (catenin beta 1)

По сравнению с нормальными клетками мозга, в глиомах повышены уровни внутриклеточного β-катенина, транскрипционного фактора TCF4, экспрессии *WNT3A*. Уровень белка β-катенина

коррелирует со степенью злокачественности астроцитом и экспрессией циклина D1 и *c-Myc* [43]. MiR-577 напрямую подавляет рост глиобластомы путём прямой репрессии компонентов Wnt-пути LPR6 и β-катенина, что было показано в условиях *in vitro* и *in vivo* [44]. Wnt/β-катенин значительно индуцируется в miR-221-экспрессирующих клетках, по сравнению с клетками с нормальным уровнем экспрессии miR-221 [45]. Следует отметить, что роль miR-221/222 в патогенезе глиом/глиобластом активно изучается. С помощью иммуноблоттинга и ОТ-ПЦР было показано, что гиперэкспрессия miR-221/222, характерная для клеток глиом, снижает уровень PTPμ (protein tyrosine phosphatase, receptor type M) – фермента, подавляющего клеточную миграцию [46], и MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase), участвующую в ДНК-репарации. Это, с одной стороны, приводит к усилению темозоломид-индуцированной гибели клеток, но, с другой стороны, к увеличению повреждений ДНК и хромосомных аберраций в клетках мозга [47].

3.2. HBP1 (HMG-box transcription factor 1)

Микро-РНК miR-96 и miR-155 способствуют прогрессированию глиом путём активации Wnt/β-катенин сигналинга, связанного с прямой супрессией этими микро-РНК ингибитора Wnt белка HBP1. MiR-96 и miR-155 гиперэкспрессированы при глиомах, и уровень miR-96 обратно коррелирует с выживаемостью пациентов [48, 49].

3.3. GSK3β

Комбинация биоинформатического и экспериментального подходов позволила продемонстрировать, что GSK3β является прямой мишенью miR-135b. Более того, экспрессия белка GSK3β была снижена, а экспрессия miR-135b повышена в культуре радиорезистентных клеток глиобластомы U87R [50]. Экспрессия miR-135b в тканях глиобластомы, по сравнению с нормальными тканями, снижена [37]. Уровни GSK3β, а также убиквитинированного β-катенина, были гораздо выше в ОСК глиомы, гиперэкспрессирующих miR-34a. Это же исследование [51] показало, что опухоль-супрессивные свойства miR-34a при глиобластоме опосредованы её прямой мишенью – белком Rictor, который оказывает влияние на сигнальные пути Akt/mTOR и Wnt.

4. EGFR

EGFR гиперэкспрессируется приблизительно в 50-60% всех случаев глиобластом. Наиболее распространенная мутантная форма EGFRvIII экспрессируется в 24-67% случаев [52]. Интеграция TCGA-данных по глиобластомам, подходов предикции мишеней miRNA и репортерных экспериментов показала, что *EGFR* наряду с *CDK6* и *Bcl-*x_L является прямой мишенью miR-491-5p. Показано, что гиперэкспрессия miR-491-5p и miR-491-3p ингибирует пролиферацию клеток глиомы и ОСК глиомы, увеличивая тем самым продолжительность жизни ксенографтных мышей [53]. Таким образом, обе зрелые miR-491-5p и miR-491-3p являются опухолевыми супрессорами, а их экспрессия в тканях глиобластомы снижена по сравнению с нормой [37]. Анализ TCGA-данных позволил обнаружить, что при глиобластоме кодирующий miR-491 ген часто подвергается ко-делеции совместно с рядом расположенным локусом гена *CDKN2A* на хромосоме 9p21.3 [53].

В клеточной линии глиобластомы, обработанной супрессорными miR-21-антисенс-олигонуклеотидами, наблюдается снижение экспрессии *EGFR*, активированного Akt, циклина D, *Bcl-2*, независимо от регуляции или мутационного статуса PTEN [54]. Уровень экспрессии miR-21 сильно увеличен в экстраклеточных везикулах цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) пациентов с глиобластомами по сравнению с пациентами без опухолей головного мозга: он был в среднем в 10 раз выше, представляя собой высокочувствительный маркер для детекции глиобластом [55]. Полифенол ресвератрол значительно снижает уровень специфических для глиом онкогенных микро-РНК (miR-21, -30a и -19) и изменяет экспрессию их таргетных генов, включая *EGFR*, *PI3K/Akt/mTOR*, *PTEN* [56]. MiR-146b-5p подавляет трансляцию EGFR, связываясь с 3′-UTR мРНК *EGFR*. Введение miR-146b-5p в клетки линии глиобластомы уменьшает инвазию опухоли и миграцию клеток [57]. Экспрессия miR-146b-5p отрицательно коррелирует со стадией глиомы и экспрессией Ki-67, и положительно коррелирует с выживаемостью пациентов. Прямой мишенью miR-146b-5p является *TRAF6* (TNF receptor associated factor 6) [58].

MiR-7 – прямой супрессор транскрипционных факторов PI3K и Raf-1, участвующих в сигнальных путях PI3K/ATK и Raf/MEK/ERK, запускающихся в ответ на активацию EGFR. Увеличение экспрессии miR-7 значительно снижало экспрессию гена *PI3K*, уровень фосфорилирования Akt и MEK1/2, циклина D1. Биоинформатический анализ показывает, что 3′-UTR EGFR включает высококонсервативный miR-7-связывающий сайт; однако люциферазный тест и иммуноблоттинг показали, что miR-7 регулирует экспрессию PI3K и Raf-1, но не EGFR [59].

5. TGFβ-СИГНАЛИНГ

Фактор роста TGFβ связывается с двумя типами рецепторов (TGFβR1-2), серин/треонин специфическими протеинкиназами. Активация рецептора 1-го типа приводит к фосфорилированию и активации компонентов TGFβ-сигнального каскада белков Smad2,3. После фосфорилирования белки Smad2,3 формируют гетеромерные комплексы с Smad4, затем мигрируют из цитоплазмы в ядро, где совместно с транскрипционными коактиваторами/корепрессорами (Ski, Sno) регулируют транскрипцию таргетных генов. Smad7 предотвращает TGFβ-сигналинг, ингибируя фосфорилирование Smad2,3 [60, 61].

TGFβ представляет собой многофункциональный полипептид: если в нормальных или диспластических клетках он является опухолевым супрессором,

то при малигнизации он превращается в опухолевый промотор. При глиомах высокой степени злокачественности TGFβ-сигналинг высокоактивен и ассоциирован с более плохим прогнозом для пациентов. TGFβ способствует быстрой клеточной пролиферации, инвазии в паренхиму нормальных тканей мозга, развитию гипоксии, ангиогенезу, а также установлению фенотипа ОСК – все эти черты характерны для глиобластом [62]. Увеличение экспрессии TGFβ1-3 коррелирует со степенью злокачественности глиом [60].

TGFβ-сигналинг ингибирует активность циклин-зависимых киназ, что приводит к остановке клеточного цикла в ранней фазе G_1. Показано, что экспрессия белков Smad2 и особенно Smad3, а также уровень фосфорилированного Smad2, были значительно ниже в клеточных линиях глиомы по сравнению с другими линиями опухолевых клеток (A549, карцинома лёгкого) или нормальными астроцитами, при этом TGFβ-сигналинг не влиял на экспрессию Sno, p21, p15, циклина D1 или CDK4 [61].

Снижение экспрессии *Smad4* на генном и протеомном уровнях также коррелировало с более плохим прогнозом для пациентов с глиомой [63]. *Smad4* является прямой мишенью miR-34a, которая, тем самым, регулирует TGFβ-сигналинг при глиобластоме [64]. MiR-34a является опухолевым супрессором; уровень её экспрессии имеет прогностическую значимость для пациентов с глиомами [64].

Роль других микро-РНК в регуляции TGFβ-сигналинга также изучается. Так, было показано снижение уровня miR-146a в TGFβ1-индуцированных клетках глиобластомы линии U87 [65]. MiR-146a ингибировала экспрессию *SMAD4*, но не *pSMAD2*, тем самым блокируя Smad-сигналинг. Это же исследование показало, что гиперэкспрессия miR-146a влияет на TGFβ-индуцированную экспрессию *EGFR* и *MMP9* в клетках U87. Экспрессия miR-148a индуцируется под действием транскрипционного фактора NF-κB, связывающегося с её промотором, и напрямую блокирует 3′-UTR многих генов, которые функционируют как негативные регуляторы TGFβ (в частности, белков QKI, SKP1); это приводит к гиперактивации TGFβ-сигналинга и агрессивному росту глиобластомы [66]. Высокая экспрессия miR-132 является маркером неблагоприятного прогноза для пациентов с глиомами. TGFβ способствовал повышению уровня miR-132, и наоборот, miR-132 модулировала TGFβ-сигналинг, снижая экспрессию *Smad7* за счёт взаимодействия с 3′-UTR Smad7 [67].

Обнаружено, что TGFβ индуцирует экспрессию miR-182, что приводит к устойчивой активации NF-κB, поскольку miR-182 участвует в супрессии негативного регулятора NF-κB, фермента CYLD (CYLD lysine 63 deubiquitinase). Супрессия CYLD способствует конъюгации компонентов NF-κB-сигнального пути и индукции агрессивного фенотипа клеток глиомы как *in vitro*, так и *in vivo*. Эти результаты согласуются с тем, что в группе образцов глиом наблюдаются значимые корреляции между уровнем miR-182 и гиперактивацией TGFβ [68]. MiR-182 также способна подавлять мРНК *Smad7*, и сайленсинг miR-182 приводит к гиперрегуляции Smad7, что предотвращает TGFβ-индуцированную инвазию опухолевых клеток [69]. На клетках линии глиобластомы U87 экспериментально показано, что miR-205 и miR-195 ингибируют экспрессию белков Smad2 и Smad7; соответственно, при этом высокий уровень экспрессии miR-205 эффективно тормозил пролиферацию и инвазию клеток U87. Уровень miR-205 дозозависимо снижался, а miR-195 повышался под влиянием TGFβ1. В тканях глиомы уровень miR-205 снижен, а уровни miR-195 и TGFβ1 повышены [70]. Также продемонстрирована онкосупрессорная роль miR-205 в специфическом микроокружении глиобластомы: среди мишеней miR-205 обнаружен фактор VEGF-A [71]. Было показано, что в ткани глиобластомы и перитуморальной зоны прослеживается прямая корреляция между уровнями ростовых факторов VEGF-A и TGFβ1 [72].

6. HIF1α-СИГНАЛИНГ. МИШЕНИ 2-ГИДРОКСИГЛУТАРАТА

Мутации в генах *IDH* (isocitrate dehydrogenase) приводят к изменению активности фермента, в мутантной форме превращающего α-кетоглутарат (α-KG) в (R)-2-гидроксиглутарат, (R)-2HG, который по химической структуре схож с α-KG, вследствие чего конкурентно ингибирует функции α-KG-зависимых ферментов, например, JmjC-гистоновых деметилаз, а также TET (ten-eleven translocation) 5-метилцитозин-гидроксилаз, деметилирующих ДНК, и Egln1 (egl-9 family hypoxia inducible factor 1), пролил-4-гидроксилаз [73, 74] (рис. 2).

Гидроксилазы *EGLN* (*EGLN1,2,3*) ответственны за регуляцию фактора HIF1α, участвующего в гипоксия-инициированном ангиогенезе. В присутствии кислорода, Egln гидроксилируют специфические пролиновые остатки HIF1α, которые затем узнаются VHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor) E3-убиквитин-лигазным комплексом, что приводит к полиубиквитинированию HIF1α и его протеасомной деградации. При гипоксии активность Egln ингибирована, поскольку для проявления ферментативной активности Egln в качестве ко-субстрата требуется наличие кислорода [74, 75].

Несмотря на изначальное представление о том, что (R)-2HG ингибирует активность Egln-пролилгидроксилаз, что приводит к увеличенному уровню HIF1α, было показано, что мутация R132H *IDH1* ассоциирована с более низкими уровнями HIF1α и менее агрессивным ходом течения заболевания [74]. Возможность того, что мутация *IDH1* способствует пролиферации на фоне сниженной экспрессии HIF1α, подтверждается несколькими исследованиями. Так, обнаружено, что уровень HIF1α был повышен лишь в небольшом количестве образцов *IDH1*-мутированных глиом, в основном, в участках, близких к областям некроза [76]. Исследование [77] выявило,

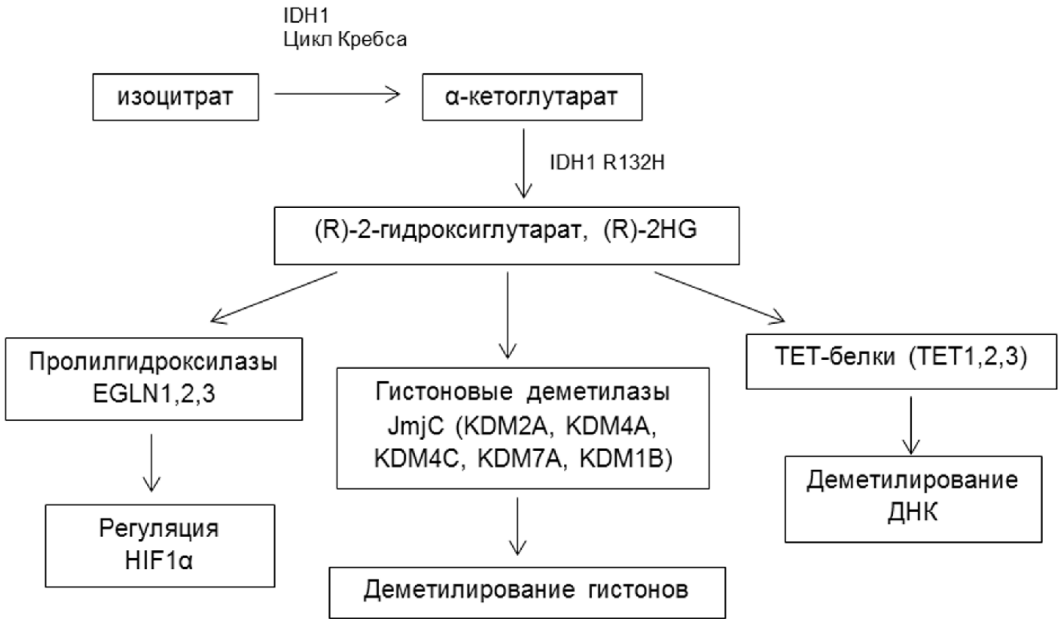

Рисунок 2. Основные мишени онкометаболита (R)-2-гидроксиглутарата, образующегося в результате ферментативной активности мутантной изоцитратдегидрогеназы IDH1.

что энантиомер 2-гидроксиглутарата R-2HG, но не S-2HG, стимулирует активность Egln, снижая уровень HIF1α, что усиливает пролиферацию и рост на агаре культуры астроцитов человека. Необходимо учитывать, что HIF1α и HIF2α могут играть противоположную роль: так, в клетках линии глиомы HIF1α активировал экспрессию hTERT (human telomerase reverse transcriptase), а HIF2α, наоборот, подавлял [78].

Методами глубокого секвенирования транскриптома малых РНК клеточной линии U87MG (глиома IV стадии) до и после гипоксии удалось идентифицировать ряд регулируемых гипоксией микро-РНК: miR-210-3p, -1275, -376c-3p, -23b-3p, -193a-3p, -145-5p (гиперрегулированы) и miR-92b-3p, -20a-5p, -10b-5p, -181a-2-3p, -185-5p (гипорегулированы) гипоксией [79]. В промоторах многих miR, в том числе miR-210-3p, обнаружены HIF1A-связывающие сайты. Уровень miR-210-3p был повышен в образцах ткани глиобластом, что способствовало выживаемости и химиорезистентности клеток, напрямую подавляя негативный регулятор ответа на гипоксию, HIF3A [79]. Люциферазный тест в сочетании с иммуноблоттингом продемонстрировал, что мРНК *VHL* является прямой мишенью miR-23b, уровень которой значительно повышен в образцах глиомы по сравнению с нормальными тканями, а гипорегуляция miR-23b подавляла выживание клеток опухоли за счёт VHL и последующего ингибирования β-катенина/Tcf-4 и HIF1α/VEGF сигнальных путей [80]. Гиперэкспрессия miR-675-5p, ген которой находится внутри lncRNA H19, при нормоксии вызывает гипоксический ответ путём аккумуляции HIF1α в ядре клетки и снижения экспрессии гена *VHL*. Анализ *in vitro* и *in vivo* моделей, при которых экспрессия miR-675-5p блокирована, демонстрирует, что при условии низкого содержания кислорода активность и синтез HIF1α в этом случае снижены, ответ на гипоксию, в том числе ангиогенез, не происходит [81]. MiR-675 модулирует экспрессию кадгерина 13 за счёт прямого связывания с его 3′-UTR [82].

Нокдаун гена *PHB* (prohibitin) в клеточной линии глиобластомы U87 с использованием малых интерферирующих РНК приводил к увеличению фосфорилирования Akt и ERK1/2 и повышению экспрессии HIF1α и VEGF. MiR-26a, усиливающая рост и ангиогенез опухоли, регулирует данные сигнальные пути через свою прямую мишень – *PHB* [83]. Пролилгидроксилаза Egln3, негативно регулирующая HIF1α, может являться потенциальным супрессором опухолевого роста, нормализующим капиллярную архитектуру опухоли, за счёт ослабления прогрессии глиомы [84].

Среди мишеней miR-215 в ОСК глиобластомы имеется мРНК *KDM1B* (lysine demethylase 1B) из семейства JMJC [85]. Следует отметить, что гистоновые деметилазы JMJC могут быть другой патогенетически значимой мишенью (R)-2HG: *in vitro* 2-гидроксиглутарат блокирует многие 2-оксоглутарат-зависимые ферменты, в том числе гистоновые деметилазы KDM2A, KDM4A, KDM4C, KDM7A [74]. Нокдаун *KDM1B* усиливал формирование нейросфер, экспрессию генов, ассоциированных с метаболизмом глюкозы, в субпопуляции ОСК; сниженная экспрессия *KDM1B* в тканях глиобластомы пациентов коррелировала с увеличенной экспрессией *HIF1A* и miR-215 и с неблагоприятным прогнозом. HIF1α, уровень которого увеличивается при гипоксии в ОСК глиобластомы, взаимодействует с Drosha-комплексом pri-miR-215, а сайленсинг HIF1α предотвращает гипоксия-индуцированное увеличение экспрессии miR-215 [85]. Другая деметилаза – KDM1A (lysine demethylase 1A) – является прямой мишенью miR-329 при нейробластоме; при этом уровень этой опухоль-супрессорной miR-329 понижается при нейробластоме [86].

Важно, что недостаток KDM1A увеличивает H3K4-триметилирование локуса онкогена *MYC*, активирующее его экспрессию при глиобластоме, и MYC-опосредованное изменение экспрессии транскрипционных факторов OLIG2 и SOX2 [87].

Семейство 2-оксоглутарат-зависимых ДНК-модифицирующих TET-белков (TET 1,2,3), которые генерируют 5-гидроксиметилцитозин из 5-метилцитозина и тем самым играют роль в деметилировании ДНК, также является мишенью (R)-2HG в клетках *IDH*-мутантных глиом [74]. Так, исследование 131 образца глиом подтвердило, что гиперметилирование CpG-островков тесно ассоциировано с мутациями *IDH1/2* [88]. Каталитическая активность TET2 *in vitro* ингибируется (R)-2HG [74]. При глиомах низкой степени злокачественности с мутациями *IDH1/2* не встречается метилирование промотора гена *TET2*, наоборот, при отсутствии мутаций *IDH1/2* характерно метилирование *TET2*, но не мутации этого гена [89]. Результаты исследования [90] показывают, что TET3 является потенциальным опухолевым супрессором, за счёт ингибирования роста и пролиферации ОСК глиобластомы, при этом транскрипционный фактор TLX регулирует экспрессию *TET3*. Таким образом, характерное для глиобластомы снижение уровня 5-гидроксиметилцитозина может быть объяснено тем, что TLX подавляет экспрессию *TET3*.

Резюмируя данные, представленные в таблице, следует отметить, что количественная оценка экспрессии микро-РНК в образцах проводится с помощью трёх основных подходов – количественная ОТ-ПЦР (qPCR), гибридизация на микрочипах и RNA-seq (технологии NGS, next-generation sequencing). В целом, выбор метода оценки экспрессии микро-РНК в большой степени зависит от цели исследования и возможностей исследователя. Каждый из трёх данных подходов имеет свои преимущества и недостатки. Для исследования небольшого числа микро-РНК в сравнительно небольшом объёме биологического материала больше подходит qPCR, которая часто рассматривается в качестве “золотого стандарта” детекции и количественного определения экспрессии микро-РНК. Тем не менее, быстрый рост числа известных микро-РНК делает qPCR непригодной на полногеномном уровне; этот метод лучше подходит для валидирования уже известных микро-РНК, но не для их скрининга [101].

Таблица. Основные miR, ассоциированные с глиомами/глиобластомами

miR	Метод исследования/ детекции miR	Объект исследования	Количество образцов/ клеточных линий	Экспрессия miR при глиоме	Мишени	Комментарий	Источники
let-7	qPCR, miRNA микрочипы	Клеточные линии глиобластомы (U251, U87) [91, 92]	2	↓	Ras, c-Myc, Stat3, циклин D1	Блокировать созревание let-7 может белок LIN28, повышенный уровень которого ассоциирован с худшей выживаемостью. let-7b может служить маркером резистентности к цисплатину	[11], [12], [91], [92]
miR-7	miRNA микрочипы, qPCR	Клеточные линии глиобластомы (CHG5, TJ899, TJ905) [59] Образцы глиом разной стадии WHO (II-IV) +контроль post mortem [93]	3 25+4	↓	Транскрипционные факторы PI3K и Raf-1, EGFR	Поскольку miR-7 характеризуется очень высоким уровнем тканеспецифичности, она может являться идеальной терапевтической мишенью [59]. Уровень miR-7 значимо снижается в зависимости от стадии WHO [93]	[37], [59], [93]
miR-9	qPCR (Taqman), биоинформатические расчеты	Образцы глиобластом, клеточные линии U87 и T98G, а также линии первичной и рецидивирующей глиобластомы [26]	5 (клеточные линии)	↑↓	PTCH1, SOX2	Потенциальная терапевтическая мишень повышенной химиочувствительности к темозоломиду. Дифференциально экспрессируется в тканях глиом с наличием и без мутации R132H *IDH1*	[26], [27], [37]
miR-10a,b	qPCR	Образцы глиом и тканей мозга в норме [13] Клеточные линии глиом U87, A172, U251, LN229 и др. [94]	128 и 20, соответственно 11	↑	BCL2L11, CDKN2A	Относятся к гипоксия-регулируемым микро-РНК	[13], [37], [79], [94]

Таблица. Основные miR, ассоциированные с глиомами/глиобластомами (продолжение)

miR	Метод исследования/ детекции miR	Объект исследования	Количество образцов/ клеточных линий	Экспрессия miR при глиоме	Мишени	Комментарий	Источники
miR-21	Гибридизация, qPCR	Образцы олигодендроглиом, глиобластом и ткани мозга в норме, а также культуры глиобластомы (U87 и др.) [5] Образцы глиом разной стадии WHO (II-IV) + контроль post mortem [93]	12, 12, 4, соответственно 2 25+4	↑	Несколько таргетных путей, включая EGFR, PI3K/Akt/mTOR, PTEN	Профиль экспрессии отличается при олигодендроглиомах и глиобластомах. Одна из наиболее гиперактивированных miR при глиомах, блокирует апоптоз [5]. Обратно коррелирует со стадией WHO [93]. Медиатор лучевой резистентности глиом [103]	[5], [8], [93], [103]
miR-23b	qPCR	Свежезамороженные и FFPE-образцы глиом I-II, III, IV степени злокачественности + образцы ткани в норме, клеточные линии [80]	26, 33, 34, соответственно +5 5	↑	VHL, PTK2B	Относится к гипоксия-регулируемым микро-РНК. Гипорегуляция miR-23b подавляет пролиферацию опухоли через VHL и ингибирование сигнальных путей β-catenin/Tcf-4 и HIF1α/VEGF	[37], [79], [80]
miR-26a	qPCR	Образцы глиом и ткани в норме [83]	27 и 9 [83]	↑	PHB, PTEN	miR-26a за счёт подавления PHB ингибирует нижележащие пути Akt и ERK. PTEN является специфическим молекулярным маркером глиом, связан с продолжительностью жизни и является онкосупрессором [95]	[37], [83], [95]
miR-33	RT^2 miRNA PCR Array (QIAGEN)	Культуры глиома-инициирующих клеток (GIC), полученных от пациентов	Несколько	↑	UVRAG, негативный регулятор Notch-пути	Ассоциирована с худшим прогнозом для пациентов	[36]
miR-34a	qPCR	Образцы глиом низкой и высокой степени злокачественности + образцы ткани в норме, клеточные линии стволоподобных клеток глиом [34]	13 и 19 +3 2	↓	Notch1, Notch2, циклин-зависимая протеин-киназа-6 (CDK6), белок Rictor (пути Akt/mTOR и Wnt), Smad4	Онкосупрессивная микро-РНК, уровень экспрессии которой имеет прогностическую значимость для пациентов с глиомами	[34], [37], [51], [64]
miR-96	qPCR	Парные образцы тканей опухоль-норма от пациентов с глиомами, клеточные линии (U-87 MG, U-251 MG, U-373 MG, M059J)	24 4	↑	HBP-1	Активация Wnt/β-катенин сигналинга. Уровень miR-96 обратно коррелирует с выживаемостью пациентов	[49]

Таблица. Основные miR, ассоциированные с глиомами/глиобластомами (продолжение)

miR	Метод исследования/ детекции miR	Объект исследования	Количество образцов/ клеточных линий	Экспрессия miR при глиоме	Мишени	Комментарий	Источники
miR-107	qPCR	Образцы глиом, клеточные линии [33]		↓	Notch, SALL4	Ингибирует инвазивность и пролиферацию ОСК глиомы. Подавление SALL4 под действием miR-107 приводит к активации апоптоза (FADD/каспазы), поэтому miR-107 может являться потенциальной терапевтической мишенью	[33], [37], [96]
miR-125b	qPCR	Клеточные линии – U251 (глиобластома), а также линии высокоинвазивных стволовых клеток глиомы [25]	3	↑↓	Hh-сигналинг, CDK6, LIN28, MMP9	miR-125b гипоактивирована при глиомах с повышенной экспрессией *Gli1* по сравнению с другими глиомами. Уровни miR-125b и *MMP9* были значительно выше в культуре высокоинвазивных стволовых клеток глиомы	[25], [37]
miR-132	qPCR	Образцы глиом пациентов – WHO grade I-II и III-IV, образцы ткани в норме, клеточные линии (U87MG) [67]	8 и 12 20 1	↑	Smad7	Высокая экспрессия miR-132 является маркером худшего прогноза для пациентов с глиомами	[37], [67]
miR-135b	qPCR	Образцы глиом пациентов, образцы ткани в норме, клеточные линии (U87, U87R– резистентная к лучевой терапии) [50]	30 30 2	↑	GSK3β	miR-135b увеличивает резистентность клеточной линии глиобластомы U87R к лучевой терапии, а гиперэкспрессия GSK3β - способна обращать этот эффект	[37], [50]
miR-146a	miRNA микрочипы, qPCR	Клеточные линии (U87, иммортализованные астроциты) [38], [65]	2	↑↓	Notch1, Smad4	Уменьшает образование и миграцию ОСК глиомы	[38], [65]
miR-146b	qPCR, биоинформатический анализ данных TCGA	Образцы астроцитарных глиом и ткани мозга в норме (контроль), клеточные линии U87MG, SNB19, U251 [58]	147 20 3	↓	EGFR, TRAF6	Опухоль-супрессивная микро-РНК. Уровень miR-146b обратно коррелирует со степенью злокачественности и положительно - с выживаемостью пациентов	[57], [58]
miR-148a	qPCR	Клеточные линии глиомы (A172, T98G, LN18, LN229 и др.) + культура нормальных астроцитов. FFPE-образцы глиом I-IV степени, образцы контроль [66]	7 +1 167	↑	QKI, SKP1 (негативные регуляторы TGFβ), FIH1	При развитии глиобластомы сигнальные пути NF-κB и TGF-β связаны через miR-148a	[37], [39], [66]

Таблица. Основные miR, ассоциированные с глиомами/глиобластомами (продолжение)

miR	Метод исследования/ детекции miR	Объект исследования	Количество образцов/ клеточных линий	Экспрессия miR при глиоме	Мишени	Комментарий	Источники
miR-155	qPCR	Клеточные линии глиомы (U-87 MG, U-251 MG и др), парные образцы тканей опухоль-норма [49]	4 31	↑	HBP-1, MAPK13, MAPK14	Активация Wnt/β-катенин сигналинга. Экспрессия miR-155 позволяет отличить олигодендроглиому от глиобластомы	[5], [49]
miR-182	qPCR, miRNA-specific TaqMan MiRNA Assay	Клеточные линии глиомы, FFPE-образцы глиом I-IV WHO, замороженные образцы [68]	>15 161	↑	CYLD, Smad7, HIF2A	В клинических образцах глиом наблюдается корреляция между уровнями miR-182, гиперактивацией TGFβ и NF-κB. Активация NF-κB пути может стать новой терапевтической мишенью при глиомах. miR-182 может быть связана с развитием метастазов [69]	[37], [68], [69]
miR-195	qPCR	Образцы глиом + образцы ткани в норме, клеточная линия U87 [70]	1	↑, иногда ↓	Smad2, Smad7	Уровень TGF-β1 прямо коррелирует с уровнем мРНК miR-195 и обратно коррелирует с уровнем мРНК miR-205	[37], [70]
miR-205				↓	Smad2, Smad7, VEGFA	Онкосупрессорная микро-РНК, способная к ингибированию пролиферации и инвазии клеток U87	[9], [70], [71]
miR-210	qPCR	Образцы глиом пациентов WHO I-IV и ткани мозга в норме (контроль) [14]	125 10	↑	HIF3A	Способствует выживаемости и химиорезистентности клеток глиобластомы, ассоциирована с худшим прогнозом. Относится к гипоксия-регулируемым микро-РНК	[14], [79]
miR-215	qPCR array	Ксенографтные клеточные линии глиобластомы, выделенные из образцов пациентов [85]. Образцы глиом, клеточные линии [98]	4 30 3	↑	KDM1B, PCDH9	Показана индукция miR-215 под действием гипоксии именно в глиома-инициирующих клетках. miR-215-5p может являться потенциальной терапевтической мишенью при глиомах	[85], [97], [98]
miR-221/222	miRNA микрочипы, qPCR	Клеточные линии глиом и неопухолевых клеток [46]	8	↑	PTPμ, MGMT, регуляция пути Wnt/β-катенин, RB1, WEE1 (ингибиторы клеточного цикла), APAF1 (проапоптотическая роль), ANXA1, CTCF (транскрипционные репрессоры)	miR-221 и -222 способствуют росту глиомы, по крайней мере, частично путем контроля белковой экспрессии PTPμ. miR-221 модулирует уровень мРНК 602 генов, что подтверждает её способность влиять на множество онкогенных путей [45]. Сайленсинг гена *MGMT* может быть также обусловлен гиперметилированием *CpG*-островков, что характерно для глиом [95]	[45-47], [95]

Таблица. Основные miR, ассоциированные с глиомами/глиобластомами (продолжение)

miR	Метод исследования/ детекции miR	Объект исследования	Количество образцов/ клеточных линий	Экспрессия miR при глиоме	Мишени	Комментарий	Источники
miR-326	miRNA микрочипы, qPCR	Клеточные линии глиом, в том числе культура стволовых клеток глиом [35]	6	↓	SMO, Notch1, Notch2	Опухоль-супрессивная интрагенная miRNA – находится в первом интроне гена аррестина β1. Сниженная экспрессия гена-“хозяина” часто приводит к снижению уровня miR-326. Введение miR-326 может являться новой стратегией терапии [35]. miR-326 ингибируется PI3-киназным каскадом [21]	[20-22], [35], [37]
miR-329	qPCR	Образцы глиом + ткани мозга в норме, клеточные линии глиом [99]	9+3 8	↓	KDM1A, E2F1	Опухоль-супрессивная микро-РНК. miR-329 может подавлять рост нейробластомы частично за счёт блокирования KDM1A [86] и пролиферацию клеток глиомы путём регуляции E2F1-опосредованной супрессии Akt [99]	[37], [86], [99]
miR-491	Small-RNA-seq, биоинформатический анализ данных TCGA	Образцы глиобластомы + ткани в норме, клеточные линии, в том числе астроцитов мыши и стволовых клеток глиомы	20 4	↓	EGFR, CDK6, Bcl-xL	Обе зрелые miR-491-5p и miR-491-3p являются опухолевыми супрессорами. Ген *MIR-491* часто подвергается ко-делеции [100]	[37], [53], [100]
miR-497	qPCR	Парные образцы глиом пациентов + ткани в норме	110	↓	VEGF	Уровень ниже при глиомах более высокой степени злокачественности, ингибитор ангиогенеза. miR-497 может являться благоприятным прогностическим маркером глиом	[10]
miR-577	qPCR (TaqMan MicroRNA Assay)	Образцы глиобластомы + ткани в норме, клеточные линии	40+5 6	↓	LRP6 и β-катенин (Wnt-путь)	miR-577 напрямую ингибирует компоненты сигнального пути LRP6 и β-катенин. miR-577 подавляет рост глиобластомы	[44]
miR-675	qPCR; биоинформатические данных CGGA	Клеточные линии (U251, U87) [81], [82]. Данные пациентов из CGGA – Chinese Glioma Genome Atlas [82]	2 158	↑	VHL, кадгерин 13	miR-675-5p, ген которой находится внутри гена длинной некодирующей РНК H19, играет роль в развитии ответа на гипоксию и гипоксия-опосредованном ангиогенезе [81]	[81], [82]

Примечание: ↑ - увеличение, ↓ - снижение, ↑↓ - может наблюдаться как увеличение, так и снижение

Если для исследования необходимо сделать полногеномный анализ дифференциальной экспрессии транскриптома, то относительно дешёвым и менее подверженным ошибкам методом является гибридизация на микрочипах (miRNA microarray). Плюсами этого подхода является наличие достаточно удобных готовых статистических пакетов, а также тот факт, что некоторые микрочипы позволяют различать отдельные микро-РНК из одного семейства (например, 9 вариантов hsa-let-7a-i). Вместе с тем,

короткая длина зрелых микро-РНК ограничивает дизайн проб [101]. Несомненным преимуществом RNA-seq является возможность глубокого анализа дифференциальной экспрессии, в том числе поиска вариаций (SNP и др.), альтернативных сайтов сплайсинга, новых патогенетически значимых микро-РНК или их изменений. Однако анализ результатов RNA-seq требует от исследователя новых биоинформатических/статистических знаний и навыков. Так, например, методом глубокого секвенирования малых РНК показано, что значение отношения M/P (зрелые miR к miR-предшественникам) для большого количества микро-РНК (в том числе miR-21, -10a, -200, -221 и др.) увеличивается при прогрессировании от нормальной ткани мозга к глиомам низкой, а затем высокой, степени злокачественности [102].

7. МИКРО-РНК КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Многие недавно опубликованные работы подтвердили ассоциацию микро-РНК с химио- и лучевой резистентностью опухолей пациентов [103]. Лучевая резистентность, зачастую обусловленная распространением ОСК глиом, остаётся одной из главных сложностей в терапии глиобластомы.

В контексте лучевой резистентности глиом miR-21 является одной из наиболее активно обсуждаемых микро-РНК. Блокирование данной микро-РНК с помощью anti-miR-21 способствует образованию фосфорилированного гистона γ-H2AX (индикатор двухцепочечных разрывов ДНК) и подавлению экспрессии phospho-Akt, активизации автофагии и апоптоза (в том числе путём ингибирования экспрессии Cdc25A) после облучения в клеточных линиях глиом [103, 104]. MiR-21 также играет значительную роль в химиорезистентности клеток глиобластомы: применение ингибитора miR-21 совместно с темозоломидом усиливало апоптоз ОСК глиомы [105].

Нокдаун miR-135b способен нивелировать лучевую резистентность клеток глиобластомы (U87R), а гиперэкспрессия miR-135b усиливает лучевую резистентность клеток U87 [50]. Высокая экспрессия miR-34a в клетках глиобластомы после облучения в дозе 60 Gy снижает экспрессию p53; таким образом, регуляция экспрессии miR-34a может индуцировать апоптоз даже в клетках глиобластомы, которые приобрели лучевую резистентность [106]. Несколько микро-РНК семейства let-7 были гиперэкспрессированы после облучения клеток глиобластомы линии M059K (let-7 способствует подавлению пролиферации клеток глиом), но гипоэкспрессированы в случае других клеток глиобластомы линии M059J. Отличие двух данных культур клеток в том, что клетки M059J не обладают ДНК-зависимой протеинкиназой, играющей центральную роль в восстановлении двухцепочечных разрывов ДНК, индуцированных ионизирующим излучением. Нехватка ДНК-зависимой протеинкиназы коррелирует с чувствительностью клеток глиобластомы к облучению [107].

Значительное увеличение экспрессии (в 3-4 раза) было обнаружено для miR-24-1 и miR-151-5b, после облучения клеточных линий глиом с использованием доз, обычно применяемых для лечения опухолей мозга – 2 Gy [108]. Повышение экспрессии miR-146b-5p в культуре ОСК глиомы индуцирует апоптоз, дифференцировку клеток и чувствительность к лучевой терапии, снижает жизнеспособность ОСК глиомы, образование нейросфер. Одной из мишеней miR-146b-5p является *ELAVL1* (ELAV like RNA binding protein 1; также известный как *HuR*), что связано со снижением уровня lincRNA-p21, регулятора клеточной пролиферации и апоптоза [109]. Уровень другой микро-РНК – miR-590-3p – был повышен в тканях глиомы и радиорезистентных клетках глиобластомы, показано, что miR-590-3p способствует радиорезистентности путём прямого ингибирования опухолевого супрессора *LRIG1* (leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1) [110].

Обнаружено, что miR-221/222, повышение уровня экспрессии которой неоднократно отмечалось при глиомах, опосредует восстановление повреждений ДНК в клетках глиобластомы, независимо от PTEN, что указывает на её возможность быть потенциальной терапевтической мишенью для увеличения радиочувствительности опухолевых клеток [111]. Гипоксия приводит к увеличению уровня мРНК *HIF2A* и miR-210 в ОСК глиомы, при этом нокдаун miR-210 снижал способность ОСК глиомы к формированию нейросфер, экспрессию маркеров стволовых клеток, индуцировал дифференцировку и остановку клеточного цикла в фазе G_0/G_1 [112]. В клетках глиомы U87MG после облучения уровень miR-181a снижался, при этом временная гиперэкспрессия miR-181a значительно усиливала ответ опухолевых клеток на облучение путём ингибирования антиапоптотического белка Bcl-2 [113].

Наряду с этим, микро-РНК играют большую роль в модулировании химиорезистентности клеток глиом, в том числе к темозоломиду. Так, известно, что синтез цитохрома CYP3A4, который метаболизирует большинство химиопрепаратов, в том числе применяющихся в терапии глиом, повышен при опухолях мозга, и может быть подавлен при участии некоторых микро-РНК, например, miR-148a, -27b и -125b, которые поэтому являются мишенями снижения химиорезистентности глиобластом. Данные микро-РНК подавляют на посттранскрипционном уровне ядерные рецепторы витамина D и PRX [103].

При сравнении двух линий ОСК глиобластомы – $CD133^+$ и $CD133^-$ – было обнаружено, что $CD133^+$ клетки обладают повышенной экспрессией гена *MDR1* (multiple drug resistance gene 1) и miR-9, которая активирует Shh-сигналинг путём снижения уровня *PTCH1*. Нокдаун *Gli1* и *MDR1* с помощью siRNA увеличивает темозоломид-индуцированную гибель клеток [114]. С помощью HiSeq и биоинформатических подходов были идентифицированы определённые длинные некодирующие РНК, уровень которых отличается

у пациентов, резистентных и чувствительных к применению темозоломида, при этом наибольшим дискриминирующим потенциалом обладает lncRNA MALAT1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1) [115]. Более того, высокая экспрессия MALAT1 в сыворотке крови ассоциирована с неблагоприятным ответом на химиотерапию темозоломидом и плохой выживаемостью. MALAT1 подавляет miR-203, одной из мишеней которой является тимидилатсинтаза; ингибирование MALAT1 может являться дальнейшей терапевтической стратегией для подавления резистентности к темозоломиду [115]. Показано, что гиперэкспрессия miR-423-5p придаёт клеткам глиомы устойчивость к темозоломиду и усиливает формирование нейросфер [116]; совершенно противоположными эффектами обладает miR-181b [117].

Следует отметить, что оценка профиля экспрессии нескольких микро-РНК (miRNA-signature), интеграция данных по экспрессии микро-РНК, генов и белков может выявить ценные биомаркеры для диагностики и лечения глиом, характеризующиеся статистической значимостью [118]. Так, 27 дифференциально экспрессирующихся микро-РНК могут служить маркерами инициации, прогрессии глиомы и прогноза; 6 из этих микро-РНК характеризовались большей предиктивной значимостью (чувствительность, специфичность, p) при дифференциации клеток глиомы от неопухолевых тканей. Из этого кластера в тканях глиомы были гиперэкспрессированы miR-15a, -16, -21, -23a, -9, а miR-124 – гипоэкспрессирована. Особенностью двух микро-РНК из данного кластера – miR-124 и miR-9 – является тот факт, что они специфически экспрессируются в мозге [118]. Группа Shi и соавторов показала, что снижение экспрессии miR-124 в опухолевой ткани стимулирует рост, ангиогенез и химиорезистентность глиомы, поэтому miR-124 может являться полезным диагностическим маркером [119].

Циркулирующие miRNA представляют собой новый класс неинвазивных биомаркеров для детекции и прогноза глиом. Так, уровни циркулирующих miR-128, -205 и -451a были ниже в сыворотке крови больных глиомами по сравнению с контролем или пациентами с менингиомой [120-122]. Анализ с использованием микрочипов и qPCR, ROC-кривых показал, что одновременное определение уровня экспрессии miR-15b и miR-21 в сыворотке крови помогает дифференцировать пациентов с глиомами от больных с другими поражениями головного мозга (метастазами и др.) с 90%-ной чувствительностью и 100%-ной специфичностью [123]. Мета-анализ 11 исследований, которые тестировали диагностическую информативность оценки экспрессии различных видов микро-РНК в крови и образцах ткани при глиомах, выявил высокие значения специфичности, чувствительности и AUC (площадь под ROC-кривой) для miR-21; однако, авторы данной работы отмечают, что профили из большего числа микро-РНК помогут ещё больше улучшить диагностическую точность [8]. Действительно, уровни miR-21, -128 и -342-3p в плазме крови пациентов с глиобластомой и здоровых доноров дискриминировали эти выборки с высокой чувствительностью и специфичностью: уровень miR-21 был повышен, а miR-128 и miR-342-3p – понижен при глиобластоме, но не при других видах опухолей мозга. Более того, уровни miR-128 и miR-342-3p положительно коррелировали с гистопатологической стадией глиом [124].

ROC-кривые для уровней miR-497 и miR-125b в сыворотке крови показали высокую значимость при дифференциации глиобластом от опухолей более низкой степени злокачественности – значения AUC достигали значений 0,87 и 0,75 для miR-497 и miR-125b, соответственно. При этом пациенты с глиобластомой имеют достоверно сниженный уровень экспрессии miR-497 и miR-125b, чем пациенты с глиомами низкой степени злокаченности [125]. MiR-210 в сыворотке крови также является перспективным диагностическим и прогностическим биомаркером, который может определяться в периферической крови пациентов с глиомами, поскольку уровень miR-210 в сыворотке при глиобластоме примерно в 7 раз выше по сравнению со здоровыми донорами [126].

Другой потенциальной платформой поиска биомаркеров для терапевтического мониторинга пациентов с глиомами является анализ цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и экстраклеточных везикул, выделенных из плазмы крови или ЦСЖ. Первичные опухоли мозга со склонностью к диссеминации могут выделять в ЦСЖ микро-РНК, имеющие онкогенные свойства, поэтому изучение циркулирующих в ЦСЖ микро-РНК может помочь в диагностике опухолей мозга [127].

В экстраклеточных везикулах ЦСЖ в больших концентрациях присутствует уже неоднократно отмечавшаяся в связи с глиобластомой miR-21; в целом экзосомы ЦСЖ являются главными экстраклеточными компартментами, содержащими микро-РНК [128]. Одновременное тестирование уровней экспрессии miR-15b и miR-21 в ЦСЖ может дифференцировать пациентов с глиомами от здоровых людей и пациентов с лимфомами ЦНС с 90% чувствительностью и 100% специфичностью [129]. SVM (support vector machine, один из алгоритмов машинного обучения) показал, что определение уровней экспрессии 7 микро-РНК в ЦСЖ (miR-10b, -21, -141, -200a, -200b, -200c и -125b) позволяет дифференцировать глиобластомы и метастазы мозга с высокой точностью (91-99%) на тестовом наборе данных. Тем не менее, авторы отмечают, что поиск дополнительных микро-РНК-биомаркеров и последующий анализ больших когорт пациентов помогут увеличить точность подхода [130].

8. МИКРО-РНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ

Принцип терапевтического таргетного воздействия на микро-РНК основывается, с одной стороны, на увеличении их экспрессии благодаря введению

синтетических микро-РНК (микро-РНК миметики) для ингибирования онкогенов; с другой стороны – на инактивации эндогенных микро-РНК с помощью ингибиторов (antagomiRs или анти-микро-РНК) с целью увеличения экспрессии опухолевых супрессоров [131]. Эффективное ингибирование с применением анти-микро-РНК требует высокой аффинности к таргетной микро-РНК, устойчивости к деградации нуклеазами, низкой токсичности и эффективной доставки *in vivo*. Наиболее широко используемыми на настоящий день анти-микро-РНК являются модифицированные олигонуклеотиды, несущие так называемые LNA (locked nucleic acid) [37]. Так, применение антисенс-олигонуклеотида ингибитора miR-10b приводило к снижению уровня мишени, ингибировало рост и прогрессию ксенографтных глиобластом, при этом неважен был способ введения (интратуморальные инъекции, внутривенное введение, осмотическое введение) и не наблюдалось явления системной токсичности [132]. Тем не менее, введение антисенс-олигонуклеотидов, так называемых анти-miR, в системный кровоток осложнено их возможной деградацией и наличием гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [133]. Для проникновения через ГЭБ разрабатываются различные способы адресной доставки лекарственного препарата. Так, введение с помощью стереотаксической хирургии олигонуклеотида anti-let-7 ксенографтным животным с глиобластомой показало, что наиболее эффективными способами введения являются интратуморальный и интравентрикулярный способы [133]. Одно из исследований [134] показало, что пептиды R3V6 способны защищать олигонуклеотиды anti-miR-21 от воздействия нуклеаз, при этом anti-miR-21 доставляются в клетку гораздо эффективнее, чем при других модификациях. Применение препарата снижало уровень miR-21 и индуцировало апоптоз в клетках глиобластомы, свидетельствуя о том, что R3V6 может служить “носителем” антисенс-олигонуклеотидов [134].

Альтернативой антисенс-олигонуклеотидам являются так называемые “miRNA sponge” (“губки для микро-РНК”), которые содержат множество связывающих сайтов, специфичных к так называемому seed-региону таргетных микро-РНК [37]. На клеточной линии глиомы и модели лабораторных мышей была продемонстрирована способность такой губки для микро-РНК ингибировать miR-23b, которая функционирует как онкоген при глиобластоме, что приводило к значительному снижению уровня HIF1α, β-катенина, MMP-2, -9, VEGF, ингибировало ангиогенез, миграцию и инвазию клеток опухоли [135].

Синтетические губки для микро-РНК были созданы на основе своего естественного аналога – циклических РНК (circRNA), роль которых в канцерогенезе только начинают изучать. Например, РНК circ-TTBK2 гиперрегулирована в тканях глиомы и клеточных линиях, в то время как линейная TTBK2 не изменяет своего уровня [136]. Circ-TTBK2 действует как губка для miR-217, уровень которой был снижен при глиоме, и мишенью которой является онкогенный белок HNF1β (HNF1 homeobox beta). Нокдаун circ-TTBK2 совместно с гиперэкспрессией miR-217 приводили к регрессии опухоли *in vivo* [136]. Совсем недавно был разработан компьютерный алгоритм-pipeline “UROBORUS” для детекции circRNA, исходя из данных RNA-seq [137]. С помощью такого алгоритма было найдено более 476 циклических РНК, экспрессия которых отличалась в нормальном мозге и в образцах глиом [137]. Другой анализ [138] выявил 1411 дифференциально экспрессирующихся циклических РНК при глиобластоме, из них 206 были гиперактивированы, а 1205 – гипоактивированы. При этом уровень экспрессии circBRAF в нормальном мозге был значительно выше относительно ткани глиомы; был ниже у пациентов с глиомами высокой (III-IV) степени злокачественности. Высокий уровень экспрессии circBRAF являлся независимым биомаркером благоприятного прогноза безрецидивной и общей выживаемости больных глиомой [138].

Микро-РНК-заместительная терапия нацелена на восстановление потерянной функции, особенно активности опухолевых супрессоров, что может достигаться путём введения синтетических миметиков микро-РНК, имеющих последовательности, идентичные естественным [37]. Например, трансфекция миметиков miR-203 в клетки глиобластомы U251, в которых отмечалось снижение уровня miR-203 относительно менее злокачественных глиом или нормы, приводило к ингибированию онкогена *PLD2* (phospholipase D2) – мишени miR-203. Это подавляло пролиферацию и инвазию клеток U251, демонстрируя способность миметиков корригировать дефицит микро-РНК [139].

Адресную доставку синтетических миметиков микро-РНК к клеткам глиомы *in vivo* и ОСК глиомы в культуре могут осуществлять мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из костного мозга, жировой ткани, плаценты [140]. Введение с помощью мезенхимальных стволовых клеток миметиков miR-124 и miR-145 в клетки глиомы, которые экспрессируют весьма низкие уровни этих микро-РНК, показало успешную доставку препаратов в клетки, где они значительно снижали люциферазную активность соответствующих генов-мишеней miR-124 и miR-145 – SCP-1 и Sox2, а также ингибировали миграцию клеток глиомы и самообновление ОСК глиомы [140].

Другим привлекательным подходом в терапии глиом является использование siRNA, коротких интерферирующих двухцепочечных молекул РНК, которые потенциально способны специфически ингибировать сигнальные пути, связанные с развитием и прогрессированием глиобластом, например, гены *EGFR* и β-катенина [141]. Полногеномный скрининг siRNA при глиобластоме показал, что 2 siRNA, мишенью которых являются убиквитин С и disheveled 2, значительно повышают чувствительность ОСК глиомы к воздействию темозоломида [142]. Ингибирование гена транскрипционного фактора *PATZ1* (POZ/BTB and AT

hook containing zinc finger 1) с помощью siRNA увеличивало чувствительность клеточной линии глиомы к апоптотическим стимулам [143]. Обработка клеток глиобластомы вектором гемагглютинирующего вируса HAJ-E, содержащим siRNA, мишенью которой является митотический двигательный белок KIF11 (kinesin family member 11, также известный как EG5), приводила к образованию монополярного веретена деления, остановке клеточного цикла и апоптозу. В результате прямого введения HVJ-E + Eg5 siRNA в ксенографты подкожной/внутричерепной опухоли у всех ксенографтных мышей тормозился рост опухоли [144].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Профили экспрессии определенных видов микро-РНК при глиомах повторяют изменения, характерные для других видов злокачественных новообразований. Так, кластер, включающий miR-96, -21, -135b и -182, характеризовался повышенной экспрессией при развитии злокачественных опухолей толстой кишки [145]. Аналогично собственно генам, подразделяющимся по их влиянию на патогенез опухолей на опухолевые супрессоры и онкогены, к настоящему времени уже можно выделить классы микро-РНК, также играющих противоположные роли в патогенезе и прогрессировании глиом – онкогены (например, miR-21, -96, -155 и др.) и онкосупрессоры (miR-34a, -107, -205 и др.).

Исследования профилей экспрессии микро-РНК расширили наше понимание о механизмах прогрессирования глиом/глиобластом, предоставив ценную информацию о патогенезе этих опухолей и потенциальных терапевтических мишенях (например, ингибирование антиапоптотической miR-21). Детекция и определение количеств ряда видов микро-РНК в тканях и сыворотке крови онкологических больных может иметь диагностическую и прогностическую значимость. Микро-РНК могут также использоваться для прогнозирования ответа конкретного пациента на терапию (например, miR-338-5p сенсибилизирует клетки глиобластомы к воздействию ионизирующего излучения через регуляцию генов, вовлечённых в ответ на повреждение ДНК) [27, 146].

ЛИТЕРАТУРА

1. International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2008. Estimated Incidence, Mortality and 5-Year Prevalence: Both Sexes. Available online: http://globocan.iarc.fr (accessed on 16 October 2013)
2. *Mamelak A.N., Jacoby D.B.* (2007) Expert Opin. Drug Deliv., **4**, 175-186.
3. *Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P.* (2007) Acta Neuropathol., **114**, 97-109.
4. *Bushati N., Cohen S.M.* (2007) Annu. Rev. Cell Dev. Biol., **23**, 175-205.
5. *Lages E., Guttin A., Atifi M.E., Ramus C., Ipas H., Dupre I., Rolland D., Salon C., Godfraind C., deFraipont F., Dhobb M. et al.* (2011) Plos One, **6**(5), e20600. DOI: 10.1371/journal.pone.0020600
6. *Li M., Li J., Liu L., Li W., Yang Y., Yuan J.* (2013) Cancers, **5**, 1306-1331. DOI: 10.3390/cancers5041306
7. *Hayes J., Thygesen H., Tumilson C., Droop A., Boissinot M., Hughes T.A., Westhead D., Alder J.E., Shaw L., Short S.C., Lawler S.E.* (2015) Mol. Oncol., **9**, 704-714.
8. *Qu S., Guan J., Liu Y.* (2015) J. Neurol. Sci., **348**, 181-187.
9. *Hou S-X., Din B-J., Li H-Z., Wang L., Xia F., Du F., Liu L.J., Liu Y.H., Jia J.F., Li L., Wu Z.L., Zhao G., Zhang Z.G., Deng Y.C.* (2013) J. Clin. Neurosci., **20**, 933-937.
10. *Feng F., Kuai D., Wang H., Li T., Miao W., Liu Y., Fan Y.* (2016) Hum. Pathol., **58**, 47-53.
11. *Qin R., Zhou J., Chen C., Xu T., Yan Y., Ma Y., Zheng Z., Shen Y., Lu Y., Fu D., Chen J.* (2014) Plos One, **9**, e86446. DOI: 10.1371/journal.pone.0086446
12. *Wang X., Cao L., Wang Y., Wang X., Liu N., Ou Y.Y.* (2012) Oncol. Lett., **3**, 955-960.
13. *Zhang X., Cheng J., Fu L., Li Q.* (2016) J. Clin. Neurosci., **29**, 59-63.
14. *Lai N.-S., Dong Q.-S., Ding H., Miao Z.-L., Lin Y.-C.* (2014) J. Clin. Neurosci., **21**, 755-760.
15. *Cochrane C.R., Szczepny A., Watkins D.N., Cain J.E.* (2015) Cancers, **7**, 1554-1585.
16. *Raffel C.* (2004) Neoplasia, **6**, 310-322.
17. *Valadez J.G., Grover V.K., Carter M.D., Calcutt M.W., Abiria S.A., Lundberg C.J., Williams T.V., Cooper M.K.* (2013) Cancer Lett., **328**, 297-306.
18. *Cohen A., Holmen S., Colman H.* (2013) Curr. Neurol. Neurosci. Rep., **13**, 345.
19. *Abiria S.A., Williams T.V., Munden A.L., Grover V.K., Wallace A., Lundberg C.J.* (2014) J. Neurooncol., **119**(2), 243-251.
20. *Du W., Liu X., Chen L., Dou Z., Lei X., Chang L., Cai J., Cui Y., Yang D., Sun Y., Li Y., Jiang C.* (2015) Neuro Oncol., **17**, 243-253.
21. *Nawaz Z., Patil V., Paul Y., Hegde A.S., Arivazhagan A., Santosh V., Somasundaram K.* (2016) Mol. Cancer, **15**, 74.
22. *Yin S., Du W., Wang F., Han B., Cui Y., Yang D., Chen H., Liu D., Liu X., Jiang C.* (2016) Cancer Biol. Ther., **7**, DOI: 10.1080/15384047.2016.1250981
23. *Ferretti E., De Smaele E., Miele E., Laneve P., Po A., Pelloni M., Paganelli A., Marcotullio L.D., Caffarelli E., Screpanti I., Bozzoni I., Gulino A.* (2008) EMBO J., **27**, 2616-2627.
24. *Gu W., Shou J., Gu S., Sun B., Che X.* (2014) Int. J. Med. Sci., **11**, 488-493.
25. *Wan Y., Fei X.-F., Wang Z.-M., Jiang D.-Y., Chen H.-C., Yang J., Shi L., Huang Q.* (2012) Chin. J. Cancer, **31**(4), 207-214.
26. *Munoz J.L., Rodriguez-Cruz V., Ramkissoon S.H., Ligon K.L., Greco S.J., Rameshwar P.* (2015) Oncotarget, **6**(2), 1190-1201.
27. *Wang Z., Bao Z., Yan W., You G., Wang Y., Li X., Zhang W.* (2013) J. Exp. Clin. Cancer Res., **32**, 59.
28. *Liu N., Tu Y.* (2015) Cancer Transl. Med., **1**(2), 50-66.
29. *Teodorczyk M., Schmidt M.H.H.* (2014) Front. Oncol., **4**, 341.
30. *Purow B.W., Sundaresan T.K., Burdick M.J., Kefas B.A., Comeau L.D., Hawkinson M.P., Su Q., Kotliarov Y., Lee J., Zhang W., Fine H.A.* (2008) Carcinogenesis, **29**(5), 918-925.
31. *Fan X., Khaki L., Zhu T.S., Soules M.E., Talsma C.E., Gul N., Koh C., Zhang J., Li Y-M., Maciaczyk J., Nikkhah G., DiMeco F., Piccirillo S., Vescovi A.L., Eberhart C.G.* (2010) Stem Cells, **28**(1), 5-16.

32. *Chen J., Kesari S., Rooney C., Strack P.R., Chen J., Shen H., Wu L., Griffin J.D.* (2010) Genes Cancer, **1**(8), 822-835.
33. *Chen L., Chen X.R., Zhang R., Li P., Liu Y., Yan K., Jiang X.D.* (2013) J. Neurooncol., **112**(1), 59-66.
34. *Li Y., Guessous F., Zhang Y., Dipierro C., Kefas B., Johnson E., Marcinkiewicz L., Jiang J., Yang Y., Schmittgen T.D., Lopes B., Schiff D., Purow B., Abounader R.* (2009) Cancer Res., **69**(19), 7569-7576.
35. *Kefas B., Comeau L., Floyd D.H., Seleverstov O., Godlewski J., Schmittgen T., Jiang J., DiPierro C.G., Li Y., Chiocca E.A., Lee J., Fine H., Abounader R., Lawler S., Purow B.* (2009) J. Neurosci., **29**(48), 15161.
36. *Wang H., Sun T., Hu J., Zhang R., Rao Y., Wang S., Chen R., McLendon R.E., Friedman A.H., Keir S.T., Bigner D.D., Li Q.J., Wang H., Wang X.F.* (2014) J. Clin. Invest., **124**, 4489-4502.
37. *Shea A., Harish V., Afzal Z., Chijioke J., Kedir H., Dusmatova S., Roy A., Ramalinga M., Harris B., Blancato J., Verma M., Kumar D.* (2016) Cancer Med., **5**(8), 1917-1946.
38. *Mei J., Bachoo R., Zhang C.-L.* (2011) Mol. Cell. Biol., **31**(17), 3584-3592.
39. *Wong H.-K., Fatimy R.E., Onodera C., Wei Z., Yi M., Mohan A., Gowrisankaran S., Karmali P., Marcusson E., Wakimoto H. et al.* (2015) Mol. Ther., **23**(7), 1234-1247.
40. *Sandberg C.J., Altschuler G., Jeong J., Strømme K.K., Stangeland B., Murrell W., Grasmo-Wendler U.H., Myklebost O., Helseth E., Vik-Mo E.O., Hide W., Langmoen I.A.* (2013) Exp. Cell Res., **319**(14), 2230-2243.
41. *Kierulf-Vieira K.S., Sandberg C.J., Grieg Z., Gunther C.-C., Langmoen I.A., Vik-Mo E.O.* (2016) Exp. Cell Res., **340**(1), 53-61.
42. *Lee Y., Lee J.-K., Ahn S.H., Lee J., Nam D-H.* (2016) Lab. Invest., **96**, 137-150.
43. *Denysenko T., Annovazzi L., Cassoni P., Melcarne A., Mellai M., Schiffer D.* (2016) Cancer Genomics Proteomics, **13**, 31-46.
44. *Zhang W., Shen C., Li C., Yang G., Liu H., Chen X., Zhu D., Zou H., Zhen Y., Zhang D., Zhao S.* (2016) Mol. Carcinog., **55**(5), 575-585.
45. *Lupini L., Bassi C., Ferracin M., Bartonicek N., D'Abundo L., Zagatti B., Callegari E., Musa G., Moshiri F., Gramantieri L., Corrales F.J., Enright A.J., Sabbioni S., Negrini M.* (2013) Front. Genet., **4**, 64.
46. *Quintavalle C., Garofalo M., Zanca C., Romano G., Iaboni M., del Basso De Caro M., Martinez-Montero J.C., Incoronato M., Nuovo G., Croce C.M., Condorelli G.* (2012) Oncogene, **31**(7), 858-868.
47. *Quintavalle C., Mangani D., Roscigno G., Romano G., Diaz-Lagares A., Iaboni M., Donnarumma E., Fiore D., De Marinis P., Soini Y., Esteller M., Condorelli G.* (2013) PLoS One, **8**(9), e74466. DOI: 10.1371/journal.pone.0074466
48. *Yan Z., Wang J., Wang C., Jiao Y., Qi W., Che S.* (2014) FEBS Lett., **588**, 3038-3046.
49. *Yan Z., Che S., Wang J., Jiao Y., Wang C., Meng Q.* (2015) Tumor Biol., **36**(7), 5323-5331.
50. *Xiao S., Yang Z., Lv R., Zhao J., Wu M., Liao Y., Liu Q.* (2014) Plos One, **9**(9), e108810. DOI: 10.1371/journal.pone.0108810
51. *Rathod S.S., Rani S.B., Khan M., Muzumdar D., Shiras A.* (2014) FEBS Open Bio., **4**, 485-495.
52. *Heimberger A.B., Suki D., Yang D., Shi W., Aldape K.* (2005) J. Transl. Med., **3**, 38.
53. *Li X., Liu Y., Granberg K.J., Wang Q., Moore L.M., Ji P., Gumin J., Sulman E.P., Calin G.A., Haapasalo H., Nykter M., Shmulevich I., Fuller G.N., Lang F.F., Zhang W.* (2015) Oncogene, **34**(13), 1619-1628.
54. *Zhou X., Ren Y., Moore L., Mei M., You Y., Xu P., Wang B., Wang G., Jia Z., Pu P., Zhang W., Kang C.* (2010) Lab. Invest., **90**(2), 144-155.
55. *Akers J.C., Ramakrishnan V., Kim R., Skog J., Nakano I., Pingle S., Kalinina J., Hua W., Kesari S., Mao Y. et al.* (2013) Plos One, **8**(10), e78115. DOI: 10.1371/journal.pone.0078115
56. *Wang G., Dai F., Yu K., Jia Z., Zhang A., Huang Q., Kang C., Jiang H., Pu P.* (2015) Int. J. Oncol., **46**(4), 1739-1747.
57. *Katakowski M., Zheng X., Jiang F., Rogers T., Szalad A., Chopp M.* (2010) Cancer Invest., **28**(10), 1024-1030.
58. *Liu J., Xu J., Li H., Sun C., Yu L., Li Y., Shi C., Zhou X., Bian X., Ping Y., Wen Y., Zhao S., Xu H., Ren L., An T., Wang Q., Yu S.* (2015) Oncotarget, **6**(30), 29129-29142.
59. *Liu Z., Jiang Z., Huang J., Huang S., Li Y., Yu S.* (2014) Int. J. Oncol., **44**(5), 1571-1580.
60. *Kaminska B., Kocy M., Kijewska M.* (2013) Adv. Exp. Med. Biol., **986**, 171-187.
61. *Zhang L., Sato E., Amagasaki K., Nakao A., Naganuma H.* (2006) J. Neurosurg., **105**, 119-128.
62. *Joseph J.V., Balasubramaniyan V., Walenkamp A., Kruyt F.A.E.* (2013) Biochem. Pharmacol., **85**, 478-485.
63. *He S.-M., Zhao Z.-W., Wang Y., Zhao J.-P., Wang L., Hou F., Gao G.-D.* (2011) J. Exp. Clin. Cancer Res., **30**(1), 70.
64. *Genovese G., Ergun A., Shukla S.A., Campos B., Hanna J., Ghosh P., Quayle S.N., Rai K., Colla S., Ying H. et al.* (2012) Cancer Discov., **2**(8), 736-749.
65. *Lv S., Sun B., Dai C., Shi R., Zhou X., Lv W., Zhong X., Wang R., Ma W.* (2014) Mol. Neurobiol., **52**(3), 1257-1262.
66. *Wang H., Pan J.-Q., Luo L., Ning X.-J., Ye Z.-P., Yu Z., Li W.-S.* (2015) Mol. Cancer, **14**, 2.
67. *Wang Z.-H., Zhang Q.-S., Duan Y.-L., Zhang J.-L., Li G.-F., Zheng D.-L.* (2015) Biochem. Biophys. Res. Commun, **463**, 187-192.
68. *Song L., Liu L., Wu Z., Li Y., Ying Z., Lin C., Wu J., Hu B., Cheng S.Y., Li M., Li J.* (2012) J. Clin. Invest., **122**(10), 3563-3578.
69. *Yu J., Lei R., Zhuang X., Li X., Li G., Lev S., Segura M.F., Zhang X., Hu G.* (2016) Nat. Commun., **7**, 13884.
70. *Duan Y., Chen Q.* (2016) Oncol. Rep., **36**, 1837-1844.
71. *Yue X., Wang P., Xu J., Zhu Y., Sun G., Pang Q., Tao R.* (2012) Oncol. Rep., **27**(4), 1200-1206.
72. *Кит О.И., Франциянц Е.М., Росторгуев Э.Е., Балязин-Парфенов И.В., Черярина Н.Д., Козлова Л.С., Погорелова Ю.А.* (2016) Опухоли головы и шеи, №6, 27-33.
73. *Kickingereder P., Sahm F., Radbruch A., Wick W., Heiland S., van Deimling A., Bendszus M., Wiestler B.* (2015) Sci. Rep., **5**, 16238.
74. *Losman J.-A., Kaelin W.G.* (2013) Genes Dev., **27**(8), 836-852.
75. *Semenza G.L.* (2004) Physiology, **19**, 176-182.
76. *Williams S.C., Karajannis M.A., Chiriboga L., Golfinos J.G., von Deimling A., Zagzag D.* (2011) Acta Neuropathol., **121**, 279-281.
77. *Koivunen P., Lee S., Duncan C.G., Lopez G., Lu G., Ramkissoon S., Losman J.A., Joensuu P., Bergmann U., Gross S. et al.* (2012) Nature, **483**, 484-488.
78. *Lou F., Chen X., Jalink M., Zhu Q., Ge N., Zhao S., Fang X., Fan Y., Björkholm M., Liu Z., Xu D.* (2007) Mol. Cancer Res., **5**(8), 793-800.
79. *Agrawal R., Pandey P., Jha P., Dwivedi V., Sarkar C., Kulshreshtha R.* (2014) BMC Genomics, **15**, 686.
80. *Chen L., Han L., Zhang K., Shi Z., Zhang J., Zhang A., Wang Y., Song Y., Li Y., Jiang T., Pu P., Jiang C., Kang C.* (2012) Neuro-Oncol., **14**(8), 1026-1036.

81. *Lo Dico A., Costa V., Martelli C., Diceglie C., Rajata F., Rizzo A., Mancone C., Tripodi M., Ottobrini L., Alessandro R., Conigliaro A.* (2016) Theranostics, **6**(8), 1105-1118.
82. *Shi Y., Wang Y., Luan W., Wang P., Tao T., Zhang J., Qian J., Liu N., You Y.* (2014) Plos One, **9**(1), e86295. DOI: 10.1371/journal.pone.0086295
83. *Qian X., Zhao P., Li W., Shi Z.-M., Wang L., Xu Q., Wang M., Liu N., Liu L.Z., Jiang B.H.* (2013) CNS Neurosci. Ther., **19**, 804-812.
84. *Sciorra V.A., Sanchez M.A., Kunibe A., Wurmser A.E.* (2012) Plos One, **7**(8), e40053. DOI: 10.1371/journal.pone.0040053
85. *Hu J., Sun T., Wang H., Chen Z., Wang S., Yuan L., Liu T., Li H.R., Wang P., Feng Y. et al.* (2016) Cancer Cell, **29**, 49-60.
86. *Yang H., Li Q., Zhao W., Yuan D., Zhao H., Zhou Y.* (2014) FEBS Lett., **588**(1), 192-197.
87. *Kozono D., Li J., Nitta M., Sampetrean O., Gonda D., Kushwaha D.S., Merzon D., Ramakrishnan V., Zhu S., Zhu K. et al.* (2015) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **112**(30), E4055-4064.
88. *Christensen B.C., Smith A.A., Zheng S., Koestler D.C., Houseman E.A., Marsit C.J., Wiemels J.L., Nelson H.H., Karagas M.R., Wrensch M.R., Kelsey K.T., Wiencke J.K.* (2011) J. Natl. Cancer Inst., **103**(2), 143-153.
89. *Kim Y.-H., Pierscianek D., Mittelbronn M., Vital A., Mariani L., Hasselblatt M., Ohgaki H.* (2011) J. Clin. Pathol., **64**(10), 850-852.
90. *Cui Q., Yang S., Ye P., Tian E., Sun G., Zhou J., Sun G., Liu X., Chen C., Murai K. et al.* (2016) Nature Com., **7**, 10637.
91. *Lee S.T., Chu K., Oh H.J., Im W.S., Lim J.Y., Kim S.K., Park C.K., Jung K.H., Lee S.K., Kim M., Roh J.K.* (2011) J. Neurooncol., **102**(1), 19-24.
92. *Guo Y., Yan K., Fang J., Qu Q., Zhou M., Chen F.* (2013) J. Exp. Clin. Cancer Res., **32**, 41.
93. *Koshkin P.A., Chistiakov D.A., Nikitin A.G, Konovalov A.N., Potapov A.A., Usachev D.Y., Pitskhelauri D.I., Kobyakov G.L., Shishkina L.V., Chekhonin V.P.* (2014) Clin. Chim. Acta, **430**, 55-62.
94. *Gabriely G., Yi M., Narayan R.S., Niers J.M., Wurdinger T., Imitola J., Ligon K.L., Kesari S., Esau C., Stephens R.M., Tannous B.A., Krichevsky A.M.* (2011) Cancer Res., **71**(10), 3563-3572.
95. *Семенова Е.В., Филатов М.В.* (2013) Цитология, **55**(5), 290-299.
96. *He J., Zhang W., Zhou Q., Zhao T., Song Y., Chai L., Li Y.* (2013) Int. J. Biochem. Cell Biol., **45**, 1962-1973.
97. *Hu J., Wang X-F.* (2016) Cell Cycle, **15**(15), 1939-1940.
98. *Wang C., Chen Q., Li S., Li S., Zhao Z., Gao H., Wang X., Li B., Zhang W., Yuan Y., Ming L., He H., Tao B., Zhong J.* (2017) Oncotarget, **8**(6), 10287-10297.
99. *Xiao B., Tan L., He B., Liu Z., Xu R.* (2013) J. Transl. Med., **11**, 172.
100. *Moore L.M., Zhang W.* (2015) Oncoscience, **2**(10), 825-826.
101. *Git A., Dvinge H., Salmon-Divon M., Osborne M., Kutter C., Hadfield J., Bertone P., Caldas C.* (2010) RNA, **16**(5), 991-1006.
102. *Moore L.M., Kivinen V., Liu Y., Annala M., Cogdell D., Liu X., Liu C-G., Sawaya R., Yli-Harja O., Schmulevich I., Fuller G.N., Zhang W., Nykter M.* (2013) J. Pathol., **229**(3), DOI: 10.1002/path.4109
103. *Koshkin Ph.A., Chistiakov D.A., Chekhonin V.P.* (2013) Biochemistry (Moscow), **78**(4), 429-441.
104. *Gwak H.S., Kim T.H., Jo G.H., Kim Y.J., Kwak H.J., Kim J.H., Yin J., Yoo H., Lee S.H., Park J.B.* (2012) PLoS One, **7**(10), e47449. DOI: 10.1371/journal.pone.0047449
105. *Zhang S., Wan Y., Pan T., Gu X., Qian C., Sun G., Sun L., Xiang Y., Wang Z., Shi L.* (2012) J. Mol. Neurosci., **47**(2), 346-356.
106. *Sasaki A., Udaka Y., Tsunoda Y., Yamamoto G., Tsuji M., Oyamada H., Oguchi K., Mizutani T.* (2012) Anticancer Res., **32**, 4709-4714
107. *Chaudhry M.A., Sachdeva H., Omaruddin R.A.* (2010) DNA Cell Biol., **29**(9), 553-561.
108. *Niemoeller O.M., Niyazi M., Corradini S., Zehentmayr F., Li M., Lauber K.* (2011) Radiat. Oncol., **6**, 29.
109. *Yang W., Yu H., Shen Y., Liu Y., Yang Z., Sun T.* (2016) Oncotarget, **7**(27), 41505-41526.
110. *Chen L., Wang W., Zhu S., Jin X., Wang J., Zhu J., Zhou Y.* (2017) Exp. Ther. Med., **14**, 1818-1824.
111. *Li W., Guo F., Wang P., Hong S., Zhang C.* (2014) Curr. Mol. Med., **14**(1), 185-195.
112. *Yang W., Wei J., Guo T., Shen Y., Liu F.* (2014) Exp. Cell Res., **326**(1), 22-35.
113. *Chen G., Zhu W., Shi D., Lu L., Zhang C., Liu P., Hu W.* (2010) Oncol. Rep., **23**, 997-1003.
114. *Munoz J.L., Rodriguez-Cruz V., Rameshwar P.* (2015) J. Cancer Stem Cell Res., **3**, e1003.
115. *Chen W., Xu X.-K., Li J.-L., Kong K.-K., Li H., Chen C., He J., Wang F., Li P., Ge X.-S., Li F.-C.* (2017) Oncotarget, **8**(14), 22783-22799.
116. *Li S., Zeng A., Hu Q., Yan W., Liu Y., You Y.* (2017) Neuro Oncol., **19**(1), 55-65.
117. *Li P., Lu X., Wang Y., Sun L., Qian C., Yan W., Liu N., You Y., Fu Z.* (2010) J. Biomed. Res., **24**(6), 436-443.
118. *Ye X., Wei W., Zhang Z., He C., Yang R., Zhang J., Wu Z., Huang Q., Jiang Q.* (2017) Oncotarget, **8**(16), 26394-26403.
119. *Shi Z., Chen Q., Li C., Wang L., Qian X., Jiang C., Liu X., Wang X., Li H., Kang C., Jiang T., Liu L.Z., You Y. et al.* (2014) Neuro Oncol., **16**, 1341-1353.
120. *Sun J., Liao K., Wu X., Huang J., Zhang S., Lu X.* (2015) Int. J. Clin. Exp. Med., **8**(1), 456-463
121. *Yue X., Lan F.M., Hu M., Pan Q., Wang Q., Wang J.H.* (2016) J. Neurosurg., **124**, 122-128.
122. *Zhao S., Yue S., Yang Q., Cai W., Jin C., Gao G., Jin B., Zhao X.* (2016) Int. J. Clin. Exp. Pathol., **9**(3), 3678-3682.
123. *D'Urso P.I., D'Urso O.F., Gianfreda C.D., Mezzolla V., Storelli C., Marsigliante S.* (2015) Curr. Genomics, **16**, 304-311.
124. *Wang Q., Li P., Li A., Jiang W., Wang H., Wang J., Xie K.* (2012) J. Exp. Clin. Cancer Res., **31**, 97.
125. *Regazzo G., Terrenato I., Spagnuolo M., Carosi M., Cognetti G, Cicchillitti L., Sperati F., Villani V., Carapella C., Piaggio G., Pelosi A., Rizzo M.G.* (2016) J. Exp. Clin. Cancer Res., **35**, 124.
126. *Lai N.-S., Wu D.-G., Fang X.-G., Lin Y.-C., Chen S.-S., Li Z.-B., Xu S.-S.* (2015) Br. J. Cancer, **112**, 1241-1246.
127. *Shalaby T., Grotzer M.A.* (2015) Int. J. Mol. Sci., **16**(12), 29103-29119.
128. *Akers J.C., Ramakrishnan V., Kim R., Phillips S., Kaimal V., Mao Y., Hua W., Yang I., Fu C.-C., Nolan J., Nakano I., Yang Y., Beaulieu M., Carter B.S., Chen C.C.* (2015) J. Neurooncol., **123**(2), 205-216.
129. *Baraniskin A., Kuhnhenn J., Schlegel U., Maghnouj A., Zollner H., Schmiegel W., Hahn S., Schroers R.* (2012) Neuro Oncol., **14**(1), 29-33.
130. *Tepluyk N.M., Mollenhauer B., Gabriely G., Giese A., Kim E., Smolsky M., Kim R.Y., Saria M.G., Pastorino S., Kesari S., Krichevsky A.M.* (2012) Neuro-Oncol., **14**(6), 689-700.
131. *Short S.C.* (2016) Clin. Oncol., **28**, 543-546.

132. *Teplyuk N.M., Uhlmann E.J., Gabriely G., Volfovsky N., Wang Y., Teng J., Karmali P., Marcusson E., Peter M., Mohan A. et al.* (2016) EMBO Mol. Med., **8**, 268-287.
133. *Kim D.G., Kim K.H., Seo Y.J., Yang H., Marcusson E.G., Son E., Lee K., Sa J.K., Lee H.W., Nam D-H.* (2016) Oncotarget, **7**(20), 29400-29411.
134. *Song H., Oh B., Choi M., Oh J., Lee M.* (2015) J. Drug Target, **23**, 360-370.
135. *Chen L., Zhang K., Shi Z., Zhang A., Jia Z., Wang G., Pu P., Kang C., Han L.* (2014) Oncol. Rep., **31**, 1573-1580.
136. *Zheng J., Liu X., Xue Y., Gong W., Ma J., Xi Z., Que Z., Liu Y.* (2017) J. Hematol. Oncol., **10**, 52.
137. *Song X., Zhang N., Han P., Moon B.S., Lai R.K., Wang K., Lu W.* (2016) Nucl. Acids Res., **44**(9), e87.
138. *Zhu J., Ye J., Zhang L., Xia L., Hu H., Jiang H., Wan Z., Sheng F., Ma Y., Li W., Qian J., Luo C.* (2017) Transl. Oncol., **10**, 271-279
139. *Chen Z., Li D., Cheng Q., Ma Z., Jiang B., Peng R., Chen R., Cao Y., Wan X.* (2013) Mol. Med. Rep., **9**(2), 503-508.
140. *Lee H.K., Finniss S., Cazacu S., Bucris E., Ziv-Av A., Xiang C., Bobbitt K., Rempel S.A., Hasselbach L., Mikkelsen T., Slavin S., Brodie C.* (2013) Oncotarget, **4**(2), 346-361
141. *Wang K., Park J.O., Zhang M.* (2013) J. Gene Med., **15**(1), 42-50.
142. *Himes B.* (2013) SiRNA therapy in glioblastoma stem cells: identification of target genes and potential therapeutic implications. A thesis submitted to the Yale University School of Medicine
143. *Tritz R., Mueller B.M., Hickey M.J., Lin A.H., Gomez G.G., Hadwiger P., Sah D.W., Muldoon L., Neuwelt E.A., Kruse C.A.* (2008) Cancer Ther., **6**(B), 865-876.
144. *Matsuda M., Yamamoto T., Matsumura A., Kaneda Y.* (2009) Gene Ther., **16**, 1465-1476.
145. *Тарасов В.А., Матишов Д.Г., Шин Е.Ф., Бойко Н.В., Тимошкина Н.Н., Махоткин М.А., Ломоносов А.М., Кирпий А.А., Кит О.И., Максимов А.Ю.* (2014) Генетика, **50**(10), 1232-1244.
146. *Besse A., Sana J., Lakomy R., Kren L., Fadrus P., Smrcka M., Hermanova M., Jancalek R., Reguli S., Lipina R., Svoboda M., Slampa P., Slaby O.* (2016) Tumor Biol., **37**(6), 7719-7727.
147. *Vella M.C., Slack F.J.* (2005) in WormBook, The *C. elegans* Research Community. DOI:10.1895/wormbook.1.26.1

Поступила: 23. 05. 2017.
Принята к печати: 23. 08. 2017.

THE ROLE OF MICRO-RNA IN THE REGULATION OF SIGNAL PATHWAYS IN GLIOMAS

O.I. Kit, D.I. Vodolazhsky, E.E. Rostorguev, D.H. Porksheyan, S.B. Panina

Rostov Research Institute of Oncology,
63 14th Liniya str., Rostov-on-Don, 344037 Russia; e-mail: tailana703@gmail.com

Gliomas are invasive brain tumors with high rates of recurrence and mortality. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most deadly form of glioma with nearly 100% rate of recurrence and unfavorable prognosis in patients. Micro-RNAs (miR) are the class of wide-spread short non-coding RNAs that inhibit translation via binding to the mRNA of target genes. The aim of the present review is to analyze recent studies and experimental results concerning aberrant expression profiles of miR, which target components of the signaling pathways Hedgehog, Notch, Wnt, EGFR, TGFβ, HIF1α in glioma/glioblastoma. Particularly, the interactions of miR with targets of 2-hydroxyglutarate (the product of mutant isocytrate dehydrogenase, R132H *IDH1*, which is specific for the glioma pathogenesis) have been considered in the present review. Detecting specific miRNAs in tissue and serum may serve as a diagnostic and prognostic tool for glioma, as well as for predicting treatment response of an individual patient, and potentially serving as a mechanism for creating personalized treatment strategies

Key words: gliomas, miR, signaling pathways, molecular markers, epigenetic changes