

Роль микроРНК в развитии радиорезистентности клеток рака предстательной железы (экспериментальное исследование)

М.А. Махоткин¹, Д.А. Чеботарев¹, М.Г. Тютякина¹, А.Н. Машкарин¹, В.А. Тарасов¹, М.И. Коган^{1,2}, Е.А. Черногубова¹

¹ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук»; Россия, 344006 Ростов-на-Дону, проспект Чехова, 41;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 344022 Ростов-на-Дону, переулок Нахичеванский, 29

Контакты: Елена Александровна Черногубова eachernogubova@mail.ru

Введение. Лучевая терапия – один из ведущих методов лечения рака предстательной железы на ранней и поздней стадиях развития. Значительная частота прогрессирования рака предстательной железы после лучевой терапии делает актуальными изучение молекулярных механизмов развития радиорезистентности и выявление прогностических маркеров ее развития.

Цель исследования – идентификация и анализ механизма действия микроРНК, регулирующих радиорезистентность клеток рака предстательной железы на модели андрогеннезависимой клеточной линии DU145.

Материалы и методы. В работе использовали клеточные линии аденокарциномы предстательной железы человека: DU145 – гормоннезависимую клеточную линию рака предстательной железы и DU145-RR – ее радиорезистентный вариант. Дифференциальную экспрессию микроРНК измеряли в культивируемых клетках DU145 и DU145-RR через 1 и 8 сут после однократного γ-облучения в дозе 4 Гр. Для анализа дифференциальной экспрессии микроРНК в исходном и радиорезистентном вариантах клеток DU145 использовали платформу HiSeq 2000 (Illumina Inc., США). Для идентификации микроРНК применяли базу данных miRBase v.21. Для биоинформатического анализа – базы данных miRTarbase 7.0 и KEGG PATHWAY.

Результаты. Результаты исследования показали, что aberrантная экспрессия miR-101-3p, -148a-3p, -21-3p, -532-5p, -92a-3p в клетках DU145-RR повышается по сравнению с таковой в клетках DU145, а miR-125b-5p, -23a-3p, -424-3p – снижается. Показано, что роль этих микроРНК связана с обеспечением функционального взаимодействия между ДНК-метилтрансферазами, транскрипционным регулятором протоонкогенного белка Мус, а также фосфатазой PTEN в регуляции активности протеинкиназных сигнальных каскадов MAPK и PI3K. Конститутивная активация данных каскадов приводит к повышению выживаемости, миграции, пролиферации и росту клеток.

Заключение. Широкий спектр генов-мишеней и существенное изменение экспрессии микроРНК при различных состояниях, включая переход злокачественных клеток в радиорезистентный статус, делают микроРНК перспективными прогностическими маркерами радиорезистентности при раке предстательной железы.

Ключевые слова: рак предстательной железы, радиорезистентность, микроРНК, DU145

Для цитирования: Махоткин М.А., Чеботарев Д.А., Тютякина М.Г. и др. Роль микроРНК в развитии радиорезистентности клеток рака предстательной железы (экспериментальное исследование). Онкоурология 2021;17(4):85–93. DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-4-85-93.

The role of microRNAs in the development of radioresistance of prostate cancer cells (experimental study)

M.A. Makhotkin¹, D.A. Chebotarev¹, M.G. Tyutyakina¹, A.N. Mashkarina¹, V.A. Tarasov¹, M.I. Kogan^{1,2}, E.A. Chernogubova¹

¹Federal Research Centre the Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences; 41 Prospekt Chekhova, Rostov-on-Don 344006, Russia;

²Rostov State Medical University, Ministry of Health of Russia; 29 Nakhichevanskiy Pereulok, Rostov-on-Don 344022, Russia

Contacts: Elena Aleksandrovna Chernogubova eachernogubova@mail.ru

Background. Radiation therapy is one of the leading treatments for early and late stage prostate cancer. Radiation therapy is one of the leading treatments for early and late stage prostate cancer. The significant frequency of prostate cancer progression after radiation therapy makes it relevant to study the molecular mechanisms of the development of radioresistance, to identify prognostic markers of its development.

Objective: identification and analysis of the mechanism of action of microRNAs regulating radioresistance of prostate cancer cells on the model of the androgen-independent DU145 cell line.

Materials and methods. We used human prostate adenocarcinoma cell lines: DU145-hormone-independent prostate cancer cell line and DU145-RR – its radioresistant variant. Differential microRNA expression was measured in cultured DU145 and DU145-RR cells 1, 8 days after a single gamma irradiation at a dose of 4 Gy. To analyze the differential expression of microRNAs in the initial and radioresistant variants of DU145 cells, the HiSeq 2000 platform (Illumina Inc., USA) was used. The miRBase v.21 database was used to identify microRNAs. The miRTarbase 7.0 and KEGG PATHWAY databases were used for bioinformatic analysis

Results. The results of the study showed that the aberrant expression of miR-101-3p, -148a-3p, -21-3p, -532-5p, -92a-3p in DU145-RR cells upregulated compared to that in DU145 cells, and miR-125b-5p, -23a-3p, -424-3p – downregulated. It has been shown that the role of these microRNAs is associated with the provision of functional interaction between DNA methyltransferases, the transcriptional regulator of the proto-oncogenic protein Myc, and PTEN phosphatase in the regulation of the activity of MAPK and PI3K protein kinase signaling cascades. Constitutive activation of these cascades leads to an increase in cell survival, migration, proliferation, and growth.

Conclusion. A wide range of target genes and a significant change in the expression profiles of microRNAs in various conditions, including the transition of malignant cells to a radioresistant status, makes microRNAs promising prognostic markers of radioresistance in prostate cancer.

Key words: prostate cancer, radioresistance, microRNA, DU145

For citation: Makhotkin M.A., Chebotarev D.A., Tyutyakina M.G. et al. The role of microRNAs in the development of radioresistance of prostate cancer cells (experimental study). *Onkourologiya = Cancer Urology* 2021;17(4):85–93. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-4-85-93.

Введение

Лучевая терапия — один из ведущих методов лечения рака предстательной железы (РПЖ) на ранней и поздней стадиях развития. Значительная частота прогрессирования РПЖ после лучевой терапии делает актуальными изучение молекулярных механизмов развития радиорезистентности, выявление прогностических маркеров ее развития, определение мишеней таргетной терапии и разработку новых стратегий лечения для преодоления радиорезистентности.

Именно развитие радиорезистентности опухолевых клеток часто определяет низкую эффективность лучевой терапии [1, 2]. Радиорезистентность локализованного РПЖ представляет собой серьезную терапевтическую проблему, поскольку у 20–70 % пациентов с РПЖ после лучевой терапии возникает биохимический рецидив [3]. Почти у половины пациентов с биохимическим рецидивом в течение 15 лет развивается клинический рецидив заболевания, а у 1/3 пациентов — метастатический кастрационно-резистентный РПЖ [4]. Согласно клиническим данным опухолевая ткань 50 % больных с рецидивирующим течением РПЖ через 5 лет после проведения лучевой терапии будет обладать выраженной радиорезистентностью [5]. Понимание молекулярных механизмов радиорезистентности опухолевых клеток может позволить решить проблему развития рецидивов после лучевой терапии у больных РПЖ и предотвратить прогрессирование заболевания.

Идентификация и анализ биомаркеров радиорезистентности опухолевых клеток вызывают большой научный интерес. В настоящее время перспективными диагностическими и прогностическими биомаркерами РПЖ с точки зрения изучения являются микроРНК [6]. МикроРНК — малые некодирующие молекулы РНК, которые участвуют в эпигенетической регуляции многих физиологических и патологических процессов, выступают «скульпторами транскриптома», при этом являясь наиболее консервативными по последовательностям и механизмам экспрессии [7–9]. МикроРНК формируют координированную регуляторную систему, которая контролирует такие фундаментальные биологические процессы, как дифференцировка тканей, пролиферация, апоптоз, реакция на стресс и др. В последнем десятилетии появилось большое количество исследований, посвященных роли микроРНК в канцерогенезе. Изменения профилей экспрессии микроРНК были обнаружены при развитии большинства злокачественных опухолей, причем микроРНК могут выступать в роли онкогенов, драйверов злокачественной трансформации и являться опухолевыми супрессорами [10].

Также известно, что при РПЖ экспрессия микроРНК в опухолевых клетках и микроокружении опухоли модулируется ионизирующим излучением [11]. Многочисленные текущие исследования с использованием секвенирования нового поколения (next

generation sequencing, NGS) и технологии микрочипов посвящены анализу экспрессии микроРНК в клетках до и после воздействия ионизирующего излучения. Показано, что при клеточном ответе на радиацию при РПЖ происходит увеличение уровней экспрессии микроРНК miR-9, -9-1, -16, -18b, -22, -24, -25, -29a, -29b, -30a, -34a, -34c, -92a-2, -95, -130a, -146a, -154, -191, -200c, -222, -320a, -365-1, -365-2, -372, -379, -383, -449, -488, -520c, -520f, -548h, -550a, -4521; снижение уровней экспрессии miR-15a, -30d, -100, -106b, -107, -122a, -125a, -133b, -135b, -143, -145, -187, -196a, -197, -199a, -218, -320b, -342, -361, -374a, -487, -501, -521, -671, -3607, -4284; а микроРНК miR-141 и miR-221, отдельные микроРНК семейства let-7 и кластера miR-17-92 демонстрируют как снижение, так и увеличение уровня экспрессии [12–19].

Цель исследования — идентификация и анализ механизма действия микроРНК, регулирующих радиорезистентность клеток РПЖ на модели андрогеннезависимой клеточной линии DU145.

Материалы и методы

Роль микроРНК в развитии радиорезистентности клеток РПЖ изучали в эксперименте на следующих клеточных линиях аденокарциномы предстательной железы человека: DU145 — гормоннезависимой клеточной линии РПЖ и DU145-RR — ее радиорезистентном варианте. Радиорезистентная линия DU145-RR была получена с использованием дробного облучения γ -квантами фракциями по 4 Гр с недельным интервалом между последовательными облучениями, накопленная доза составила 44 Гр [20]. Радиорезистентность исходной и радиорезистентной клеточных линий оценивали с помощью клоногенного теста [20, 21].

Клетки культивировали в среде Игла MEM (БиолоТ, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США) и 50 мкг/мл гентамицина при температуре 37 °C в 5 % атмосфере CO₂. Тотальную РНК и фракции малых РНК выделяли с использованием miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, США) и RNeasy Min Elute Cleanup Kit (QIAGEN, США). Количественное определение тотальной РНК проводили на приборе Qubit 3.0 Fluorometer (Life Science Technologies, США). Оценку спектра микроРНК в исходном и радиорезистентном вариантах клеток DU145 выполняли с помощью секвенирования на платформе HiSeq 2000 (Illumina Inc., США). Для идентификации микроРНК использовали базу данных miRBase v.21 [22].

К микроРНК относили последовательности, имеющие каноническую длину и не более одной замены нуклеотида. Анализ различий профилей экспрессии микроРНК проводили с использованием модификации точного метода Фишера, реализованного в статистическом пакете edgeR, для нормализации уровня экспрессии сравниваемых вариантов применяли метод TMM (Trimmed Mean of M-values), показатель изменчивости BCV (biological coefficient of variation) принимали равным 0,1 [23]. В анализ были включены микроРНК, представленные хотя бы в одной из сравниваемых секвенированных библиотек комплементарных ДНК 25 и более ридами. Статистически значимыми принимали изменения экспрессии при уровне FDR (false discovery rate) $\leq 0,05$.

Дифференциальную экспрессию микроРНК определяли в культивируемых клетках исходного и радиорезистентного вариантов DU145 на 1-е и 8-е сутки после однократного γ -облучения в дозе 4 Гр.

Для биоинформатического анализа использовали базы данных miRTarbase 7.0 и KEGG PATHWAY [24, 25].

Таблица 1. Спектр aberrantly экспрессирующихся микроРНК в клетках линий DU145 и DU145-RR после γ -облучения

Table 1. Spectrum of aberrantly expressed miRNAs in DU145 and DU145-RR cells after γ -irradiation

Изменение экспрессии микроРНК Change in microRNA expression	МикроРНК MicroRNA	
	Увеличение экспрессии Upregulated of expression	Снижение экспрессии Downregulated of expression
Однонаправленные индуцированные радиацией изменения экспрессии в клетках DU145-RR и DU145 Unidirectional radiation-induced changes of expression in DU145-RR and DU145 cells	miR-99b-5p miR-146a-5p miR-148b-3p miR-181d-5p miR-183-5p miR-191-5p miR-577	let-7d-5p miR-10a-5p miR-15b-5p miR-19a-3p miR-19b-3p miR-21-5p miR-100-5p miR-181a-5p miR-181c-5p miR-424-5p miR-548y miR-744-5p miR-7974

Аберрантно экспрессируемые микроРНК DU145-RR без однонаправленных изменений в клетках исходной линии Aberrantly expressed microRNA of DU145-RR without unidirectional changes in cells of the original line	miR-21-3p miR-92a-3p miR-101-3p miR-148a-3p miR-532-5p	miR-23a-3p miR-125b-5p miR-424-3p
---	--	---

Результаты

Сравнение результатов полного профилирования микроРНК методом высокопроизводительного секвенирования в клетках исходного и радиорезистентного вариантов линии DU145 позволило выделить спектр аберрантно экспрессирующихся микроРНК в клетках линий DU145 и DU145-RR после γ -облучения (табл. 1).

Для дальнейшего анализа отобранны микроРНК без однонаправленных изменений в клетках исходной линии, которые включают как микроРНК, показавшие противоположно направленные изменения индуцированной радиацией аберрантной экспрессии в клетках DU145-RR по сравнению с таковой в клетках DU145, так и микроРНК, аберрантно изменяющиеся в клетках DU145-RR, но не демонстрирующие изменений в клетках DU145 (см. табл. 1). Дифферен-

циальная экспрессия этих микроРНК в клетках DU145-RR по сравнению с DU145 отражает сохраняющиеся в клеточных поколениях изменения метаболизма. Рассмотрены вероятные механизмы приспособлений клеток линий рака к повышенной мутагенной нагрузке с учетом изменения экспрессии именно этой группы микроРНК.

Источником информации о генах-мишенях отобранных нами микроРНК служили результаты, представленные в базе данных miRTarbase 7.0. При этом учитывали только результаты, полученные с использованием «строгих» методов, подтверждающих взаимодействие микроРНК—мишень. В результате KEGG-анализа идентифицированы значимые биологические пути, в которые вовлечены микроРНК, отобранные в клетках DU145-RR (табл. 2).

Таблица 2. Гены-мишени микроРНК, участвующие в процессах регуляции радиорезистентности клеток DU145-RR

Table 2. MicroRNA target genes involved in the regulation of DU145-RR cell radioresistance

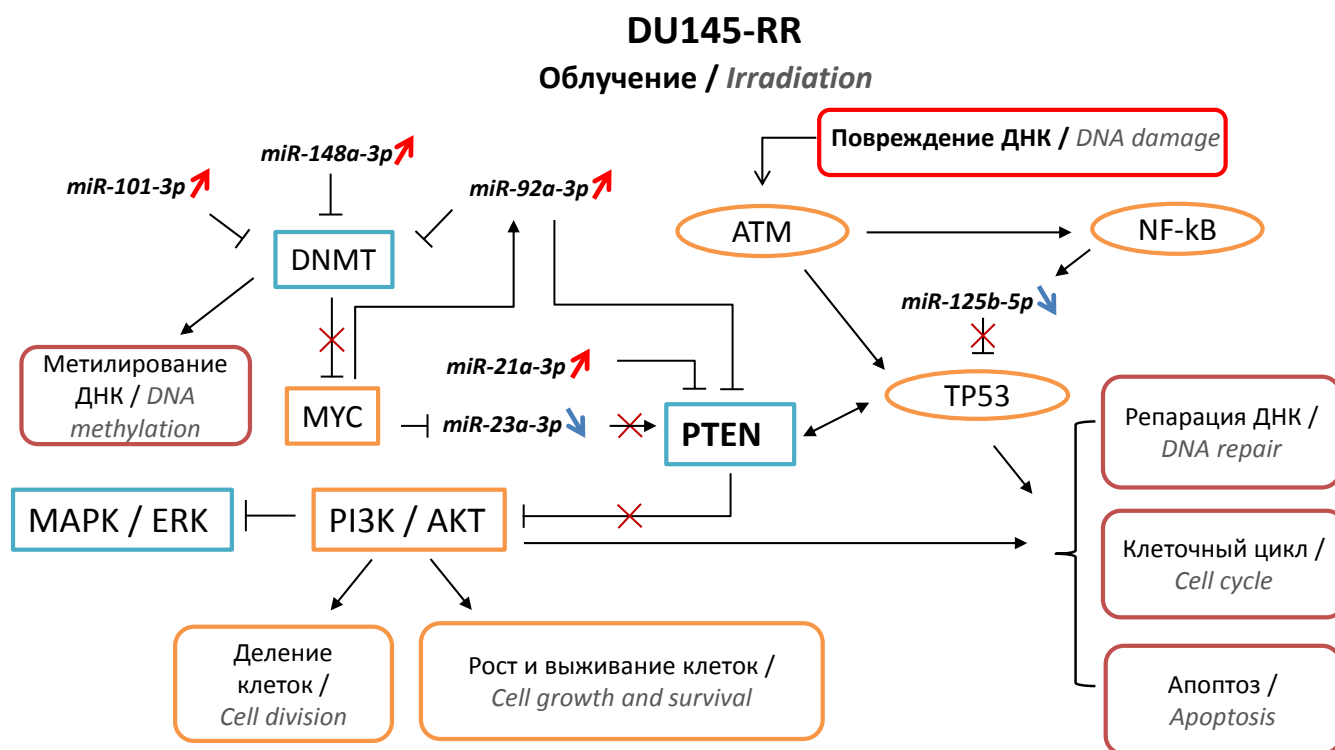
МикроРНК MicroRNA	Уровень экспрессии Level of expression	Гены-мишени Target genes		
		Апоптоз Apoptosis	Клеточный цикл Cell cycle	Репарация ДНК DNA repair
miR-101-3p	Повышен Upregulated	<i>MCL1</i>	<i>CCND1</i>	—
miR-148a-3p	Повышен Upregulated	<i>BCL2, BCL2L11, BAX</i>	<i>CDKN1B, CDC25B</i>	—
miR-21-3p	Повышен Upregulated	—	—	—
miR-532-5p	Повышен Upregulated	—	—	—
miR-92a-3p	Повышен Upregulated	<i>BCL2L11</i>	—	—
miR-125b-5p	Снижен Downregulated	<i>MCL1, BCL2, BAK1, BCL2L2, BBC3</i>	<i>CDKN2A, CDKN2D</i>	—
miR-23a-3p	Снижен Downregulated	—	—	—
miR-424-3p	Снижен Downregulated	—	—	—

Обсуждение

Результаты исследования показали, что aberrantная экспрессия miR-101-3p, -148a-3p, -21-3p, -532-5p, -92a-3p в клетках DU145-RR повышается по сравнению с таковой в клетках DU145, а miR-125b-5p, -23a-3p, -424-3p — снижается (см. табл. 2). Других экспериментальных данных об изменении экспрессии этих микроРНК при клеточном ответе на радиацию при РПЖ нами не обнаружено. Таким образом, участие идентифицированных микроРНК в формировании радиорезистентности в клетках DU145-RR описано впервые.

Далее рассмотрены возможные молекулярные механизмы и сигнальные пути, участвующие в развитии радиорезистентности при РПЖ.

Для miR-21-3p, -23a-3p и -21-5p фосфатаза PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) является мишенью (см. рисунок). Под контролем фосфатазы PTEN находится активность киназы АКТ (serine/threonine-protein kinase), которая катализирует отщепление фосфатной группы в положении 3D-инозитольного кольца фосфатидилинозитол-3-фосфатов, тормозя передачу сигнала по сигнальному



РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ / RADIORESISTANCE

- ↑ Усиление экспрессии гена или активация сигнального пути / Upregulated gene expression or activation of the signaling pathway
- ↓ Подавление экспрессии гена или ингибирование сигнального пути / Downregulated gene expression or inhibition of the signaling pathway
- ✗ Отсутствие регуляции / Lack of regulation
- ↗ МикроРНК с повышенной экспрессией / Upregulated microRNA
- ↘ МикроРНК с пониженной экспрессией / Downregulated microRNA

Участие микроРНК в формировании радиорезистентности в клетках DU145-RR. АКТ — RAC-альфа-серин/треонин-протеинкиназа; DNMT — ДНК-метилтрансфераза; ERK — внеклеточная сигнал-регулирующая киназа; PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназа; PTEN — гомолог фосфатазы и тензина располагается в хромосоме 10; MAPK — митоген-активируемая протеинкиназа; mTOR — мишень рапамицина у млекопитающих. Participation of microRNAs in the formation of radioresistance in DU145-RR cells. AKT — RAC-alpha serine/threonine-protein kinase; DNMT — DNA methyltransferase; ERK — extracellular signal-regulated kinase; PI3K — phosphatidylinositol-3-kinase; PTEN — phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10; MAPK — mitogen-activated protein kinase; mTOR — mammalian target of rapamycin

пути PI3K/AKT/mTOR [26]. На молекулярном уровне PTEN противодействует функциям фосфо-инозитид-3-киназы (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K), которая способствует пролиферации и выживанию клеток частично за счет активации киназы mTOR (mammalian target of rapamycin) [26]. Результаты функциональных исследований показали, что PTEN является высокоэффективным супрессором опухолей, но он часто мутирует, делетирован или эпигенетически подавляется при различных онкологических заболеваниях человека, включая РПЖ [27–29]. Инактивация и делеция *PTEN*, которые часто возникают при метастатическом РПЖ, приводят к активации AKT [30]. По крайней мере у 70 % пациентов с РПЖ наблюдается потеря или изменение одного аллеля *PTEN*, что может привести к активации пути PI3K/AKT [31]. Потеря активности PTEN играет роль в устойчивости опухоли к химиотерапевтическим и противоопухолевым агентам [32, 33]. Поскольку мутации и делеции *PTEN* могут приводить к аномальной активации AKT, полагают, что он играет важную роль в устойчивости РПЖ к радиотерапии [34]. Аномальная экспрессия PTEN в клетках РПЖ отмечается в 42 % случаев [35]. Таким образом, показано, что при локализованном РПЖ PTEN-зависимые и независимые от PTEN механизмы активации AKT играют важную роль в нарушении регуляции сигнального пути PTEN/PI3K/AKT. При этом PTEN выступает в качестве переключателя между протеинкиназными сигнальными каскадами PI3K/AKT и MAPK/ERK [36]. Все данные указывают на то, что PTEN играет ключевую роль в регуляции чувствительности к радиотерапии в клетках РПЖ и может использоваться в качестве терапевтической мишени для терапии РПЖ.

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR участвует в процессах клеточного цикла и способствует возникновению и развитию опухолей, играет важную роль в регуляции роста и выживании клеток, особенно при прогрессировании и метастазировании [37]. Кроме этого, известно, что экспрессия белка теплового шока 90 (HSP90) значительно возрастает при РПЖ, а HSP90-опосредованный PI3K/AKT/mTOR-путь идентифицирован в качестве основного пути, связанного с радиорезистентностью клеток РПЖ [38]. Новые данные показывают, что сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR, аутофагия, эпителиально-мезенхимальный переход и раковые стволовые клетки участвуют в метастазировании РПЖ, а также играют ведущую роль в развитии радиорезистентности и являются причиной рецидива опухоли после лучевой терапии [39–43].

Необходимо отметить, что протеинкиназные сигнальные каскады MAPK и PI3K участвуют в контроле радиационной чувствительности клеток. Так, с одной стороны, ингибирование PI3K/AKT/mTOR-пути снижает резистентность клеток линий РПЖ к действию ионизирующего излучения, с другой — изменение

активности MAPK/ERK-пути может влиять на радиочувствительность клеток [5, 43]. Это связано с тем, что оба пути участвуют в регуляции ключевых процессов, определяющих чувствительность клеток к воздействию радиации, — апоптоза, прохождения клеточного цикла и репарации ДНК. Результаты KEGG-анализа показали, что мишенями отобранных в клетках DU145-RR микроРНК являются гены, прямо или косвенно включенные в контроль этих процессов (см. табл. 2). Обращает на себя внимание отсутствие микроРНК, связанных с процессами репарации ДНК в клетках DU145-RR. Повидимому, участие микроРНК в формировании радиорезистентности клеток DU145 связано не с репарацией ДНК, а с модуляцией процессов апоптоза и прохождения клеточного цикла. Ключевую роль в ответе клеток на индукцию повреждений ДНК играет транскрипционный фактор p53. PTEN активирует экспрессию p53, защищая от деградации, опосредованной *MDM2* (mouse double minute chromosome amplified oncogene) [44].

Следствием увеличения экспрессии miR-21-3p и miR-92a-3p, геном-мишенью которых является *PTEN*, также считается блокирование транскрипционной активности *TP53* в клетках DU145-RR [45, 46]. В результате за счет ингибирующего фосфорилирования Raf-1 (RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase) происходят активация PI3K/AKT-сигнального пути и подавление MAPK/ERK-каскада (см. рисунок). С другой стороны, снижение экспрессии miR-125b-5p, для которой мишенью также является ген *p53*, может способствовать микроРНК-зависимой посттранскрипционной активации экспрессии *p53* в DU145-RR [47].

Дифференциальная чувствительность клеток к действию ионизирующего излучения определяется как традиционными мутациями, так и эпигенетическими изменениями генома, модулирующими функцию генов, прямо или косвенно влияющих на радиорезистентность. Метилирование ДНК является одним из главных эпигенетических механизмов, лежащих в основе радиорезистентности при РПЖ [48]. Ионизирующее излучение вызывает сайт-специфическое гипер- и гипометилирование, играющее ключевую роль в aberrантной экспрессии микроРНК, индуцированной радиацией и сохраняющейся в ряду клеточных поколений [21, 22]. Метилирование ДНК обеспечивается специфическими ферментами ДНК-метилтрансферазами (DNA methyltransferase, DNMT). В связи с этим обращает на себя внимание, что в клетках DU145-RR отмечено увеличение экспрессии miR-101-3p, -148a-3p и -92a-3p, репрессирующих функцию ДНК-метилтрансфераз DNMT1, DNMT3A и DNMT3B (см. рисунок) [49, 50].

Экспрессия микроРНК зависит от транскрипционной активности их генов и посттранскрипционного дифференциального созревания. Ключевую роль в регуляции экспрессии микроРНК наряду с p53 играет

транскрипционный регулятор Мус. Мус и p53 участвуют в контроле регуляции экспрессии микроРНК как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровне [51]. Увеличение экспрессии miR-101-3p и miR-148a-3p в клетках DU145-RR может приводить к подавлению активности ДНК-метилтрансфераз и, соответственно, к активации транскрипции гена Мус, что, в свою очередь, увеличивает экспрессию miR-92a-3p, участвующей в регуляции PTEN (см. рисунок).

Сведения о miR-424-3p ограничены. Низкая экспрессия miR-424-3p тесно связана с агрессивным фенотипом РПЖ [52]. Роль miR-532-5p при РПЖ в настоящее время также мало изучена. Предполагают, что высокая экспрессия miR-532-5p в экзосомах мочи является предиктором рецидива РПЖ, но молекулярные механизмы развития рецидива все еще не ясны [53]. Таким образом, изменение экспрессии miR-424-3p и miR-532-5p, по-видимому, связано с развитием агрессивных форм РПЖ. Это позволяет предположить, что снижение экспрессии miR-424-3p и увеличение экспрессии miR-532-5p в клетках DU145-RR являются маркерами развития радиорезистентности.

Таким образом, результаты исследования позволяют предположить, что участие идентифицированных микроРНК в формировании радиорезистентности в клетках DU145-RR связано с регуляцией активности сигнальных каскадов PI3K/AKT и MAPK/ERK, обеспечивающих выживание и рост клеток (см. рисунок).

Заключение

В настоящее время известны основные факторы, определяющие чувствительность к ионизирующему излучению: уровень воздействия активных форм кислорода, продолжительность клеточного цикла, состояние систем активации апоптоза, активность механизмов репарации повреждений ДНК и др. Однако значительная частота развития рецидивов онкологических заболеваний при радиотерапии делает актуальным дальнейшее изучение молекулярных механизмов развития радиорезистентности. Актуальными задачами современной биомедицины в преодолении радиорезистентности являются выявление прогностических маркеров развития и определение мишеней таргетной терапии.

Нами идентифицированы микроРНК, изменение профиля экспрессии которых играет роль в развитии радиорезистентности клеток гормоннезависимой линии РПЖ DU145, проанализированы клеточные процессы и сигнальные пути, модификация которых, по-видимому, лежит в основе клеточного ответа на ионизирующее облучение при РПЖ.

Широкий спектр генов-мишеней и существенное изменение профилей экспрессии микроРНК при различных состояниях, включая переход злокачественных клеток в радиорезистентный статус, делают микроРНК перспективными кандидатами для поиска таких маркеров и мишеней.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Chaiswing L., Weiss H.L., Jayswal R.D. et al. Profiles of radioresistance mechanisms in prostate cancer. *Crit Rev Oncog* 2018;23(1–2):39–67. DOI: 10.1615/CritRevOncog.2018025946.
2. Kamran S.C., D'Amico A.V. Radiation therapy for prostate cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2020;34(1):45–69. DOI: 10.1016/j.hoc.2019.08.017.
3. Callaris G., Marra G., Dalmasso E. et al. Is it worth to perform salvage radical prostatectomy for radio-recurrent prostate cancer? A literature review. *World J Urol* 2019;37(8):1469–83. DOI: 10.1007/s00345-019-02749-z.
4. Nakabayashi M., Xie W., Buckle G. et al. Long-term follow-up of a phase II trial of chemotherapy plus hormone therapy for biochemical relapse after definitive local therapy for prostate cancer. *Urology* 2013;81(3):611–6. DOI: 10.1016/j.urology.2012.12.025.
5. Chang L., Graham P.H., Hao J. et al. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways. *Cell Death Dis* 2014;5(10):e1437. DOI: 10.1038/cddis.2014.415.
6. Долотказин Д.Р., Шкурников М.Ю., Алексеев Б.Я. Роль микроРНК в диагностике рака предстательной железы. *Онкоурология* 2020;16(4):172–80. [Dolotkazhin D.R., Shkurnikov M.Yu., Alekseev B.Ya. The role of microRNA in the diagnosis of prostate cancer. *Onkourologiya* = *Cancer Urology* 2020;16(4):172–80. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9776-2020-16-4-172-180.
7. Федянин М.Ю., Игнатова Е.О., Тюляндин С.А. Роль микроРНК при солидных опухолях. Злокачественные опухоли 2013;(1):3–14. [Fedyanin M.Yu., Ignatova E.O., Tyulyandin S.A. Role of microRNAs in solid tumors. *Zlokachestvennyye opuholi* = *Malignant Tumours* 2013;(1):3–14. (In Russ.)]. DOI: 10.18027/2224-5057-2013-1-3-14.
8. Запороженко И.А., Рыкова Е.Ю., Лактионов П.П. Основы биологии микроРНК: строение, биогенез и регуляторные функции (обзорная статья). *Биоорганическая химия* 2020;46(1):3–17. [Zaporozhchenko I.A., Rykova E.Y., Laktionov P.P. The fundamentals of miRNA biology: structure, biogenesis, and regulatory functions. *Bioorganicheskaya khimiya* = *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2020;46(1):3–17. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S106816202001015X.
9. Bartel D.P. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 2018;173(1):20–51. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.006.
10. Farazi T.A., Hoell J.I., Morozov P., Tuschl T. MicroRNAs in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 2013;774:1–20. DOI: 10.1007/978-94-007-5590-1_1.
11. Labbé M., Hoey C., Ray J. et al. MicroRNAs identified in prostate cancer: correlative studies on response to ionizing radiation. *Mol Cancer* 2020;19(1):63. DOI: 10.1186/s12943-020-01186-6.
12. Xu C.G., Yang M.F., Fan J.X., Wang W. MiR-30a and miR-205 are downregulated in hypoxia and modulate radiosensitivity of prostate cancer cells by inhibiting autophagy via TP53INP1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016;20(8):1501–8.
13. Tao Z., Xu S., Ruan H. et al. MiR-195/-16 family enhances radiotherapy via T cell activation in the tumor microenvironment

- by blocking the PD-L1 immune checkpoint. *Cell Physiol Biochem* 2018;48(2):801–14. DOI: 10.1159/000491909
14. Mao A., Liu Y., Wang Y. et al. miR-449a enhances radiosensitivity through modulating pRb/E2F1 in prostate cancer cells. *Tumour Biol* 2016;37(4):4831–40. DOI: 10.1007/s13277-015-4336-8.
15. Mao A., Zhao Q., Zhou X. et al. MicroRNA-449a enhances radiosensitivity by downregulation of c-Myc in prostate cancer cells. *Sci Rep* 2016;6:27346. DOI: 10.1038/srep27346
16. Mercatelli N., Coppola V., Bonci D. et al. The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PLoS One* 2008;3(12):e4029. DOI: 10.1371/journal.pone.0004029.
17. Wang F., Mao A., Tang J. et al. microRNA-16-5p enhances radiosensitivity through modulating Cyclin D1/E1-pRb-E2F1 pathway in prostate cancer cells. *J Cell Physiol* 2019;234(8):13182–90. DOI: 10.1002/jcp.27989.
18. Li B., Shi X.B., Nori D. et al. Down-regulation of microRNA 106b is involved in p21-mediated cell cycle arrest in response to radiation in prostate cancer cells. *Prostate* 2011;71(6):567–74. DOI: 10.1002/pros.21272.
19. McDermott N., Meunier A., Wong S. et al. Profiling of a panel of radioresistant prostate cancer cells identifies deregulation of key miRNAs. *Clin Transl Radiat Oncol* 2017;2:63–8. DOI: 10.1016/j.ctro.2017.01.005.
20. Чеботарев Д.А., Махоткин М.А., Набока А.В. и др. Получение радиорезистентных вариантов клеток линий HeLa и DU145. *Наука Юга России* 2017;13(4):101–6. [Chebotarev D.A., Makhotkin M.A., Naboka A.V. et al. Obtaining of radioresistant variants of HeLa and DU145 cell lines. *Nauka yuga Rossii = Science of the South of Russia* 2017;13(4):101–6. (In Russ.)]. DOI: 10.23885/2500-0640-2017-3-4-101-106.
21. Чеботарев Д.А., Махоткин М.А., Набока А.В. et al. Участие микроРНК в регуляции радиорезистентности клеток HeLa и DU145. *Генетика* 2019;55(9):1011–20. [Chebotarev D.A., Makhotkin M.A., Naboka A.V. et al. Involvement of MicroRNAs in regulation of radioresistance of HeLa and DU145 Cells. *Genetika = Russian Journal of Genetics* 2019;55(9):1011–20. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S1022795419090047.
22. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;39:D152–7. DOI: 10.1093/nar/gkq1027.
23. McCarthy D.J., Chen Y., Smyth G.K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* 2012;40(10):4288–97. DOI: 10.1093/nar/gks042.
24. Chou C.H., Shrestha S., Yang C.D. et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 2018;6(D1):D296–302. DOI: 10.1093/nar/gkx1067.
25. Kanehisa M., Furumichi M., Tanabe M. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* 2017;45(D1):D353–61. DOI: 10.1093/nar/gkw1092.
26. Sansal I., Sellers W.R. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 2004;22(14):2954–63. DOI: 10.1200/JCO.2004.02.141.
27. Sircar K., Yoshimoto M., Monzon F.A. et al. PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer. *J Pathol* 2009;218(4):505–13. DOI: 10.1002/path.2559.
28. De Muga S., Hernandez S., Agell L. et al. Molecular alterations of EGFR and PTEN in prostate cancer: association with high-grade and advanced-stage carcinomas. *Mod Pathol* 2010;23:703–12. DOI: 10.1038/modpathol.2010.45.
29. Reid A.H., Attard G., Ambrosini L. et al. Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. *Br J Cancer* 2010;102:678–84. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605554.
30. Wang S., Gao J., Lei Q. et al. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 2003;4(3):209–21. DOI: 10.1016/s1535-6108(03)00215-0.
31. Gray I.C., Stewart L.M., Phillips S.M. et al. Mutation and expression analysis of the putative prostate tumour-suppressor gene PTEN. *Br J Cancer* 1998;78(10):1296–300. DOI: 10.1038/bjc.1998.674
32. Faratian D., Goltsov A., Lebedeva G. et al. Systems biology reveals new strategies for personalizing cancer medicine and confirms the role of PTEN in resistance to trastuzumab. *Cancer Res* 2009;69(16):6713–20. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0777.
33. Mao C., Liao R.Y., Chen Q. Loss of PTEN expression predicts resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2010;102(5):940. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605575.
34. Zafarana G., Ishkanian A.S., Malloff C.A. et al. Copy number alterations of c-MYC and PTEN are prognostic factors for relapse after prostate cancer radiotherapy. *Cancer* 2012;118(16):4053–62. DOI: 10.1002/cncr.26729.
35. Teng D.H., Hu R., Lin H. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57(23):5221–5.
36. Zhou J., Du T., Li B. et al. Crosstalk between MAPK/ERK and PI3K/AKT signal pathways during brain ischemia/reperfusion. *ASN Neuro* 2015;7(5):1759091415602463. DOI: 10.1177/1759091415602463.
37. Xu F., Na L., Li Y., Chen L. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci* 2020;10:54. DOI: 10.1186/s13578-020-00416-0.
38. Chang L., Ni J., Beretov J. et al. Identification of protein biomarkers and signaling pathways associated with prostate cancer radioresistance using label-free LC-MS/MS proteomic approach. *Sci Rep* 2017;7:41834. DOI: 10.1038/srep41834.
39. Burgio S.L., Fabbri F., Seymour I.J. et al. Perspectives on mTOR inhibitors for castration-refractory prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2012;12(8):940–9. DOI: 10.2174/156800912803251234.
40. Griffin C., McNulty J., Pandey S. Pancratistatin induces apoptosis and autophagy in metastatic prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2011;38(6):1549–56. DOI: 10.3892/ijo.2011.977.
41. Nauseef J., Henry M. Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle? *Nat Rev Urol* 2011;8(8):428–39. DOI: 10.1038/nrurol.2011.85.
42. Li H., Tang D.G. Prostate cancer stem cells and their potential roles in metastasis. *J Surg Oncol* 2011;103(6):558–62. DOI: 10.1002/jso.21806.
43. Chang L., Graham P.H., Hao J. et al. Emerging roles of radioresistance in prostate cancer metastasis and radiation therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2014;33(2–3):469–96. DOI: 10.1007/s10555-014-9493-5.
44. Nakanishi A., Kitagishi Y., Ogura Y., Matsuda S. The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer. *Int J Oncol* 2014;44(6):1813–9. DOI: 10.3892/ijo.2014.2377.
45. Xu J., Zhang W., Lv Q., Zhu D. Overexpression of miR-21 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells via the inhibition of PTEN. *Oncol Rep* 2015;33(6):3108–16. DOI: 10.3892/or.2015.3931.
46. Riley K.J., Rabinowitz G.S., Yario T.A. et al. EBV and human microRNAs co-target oncogenic and apoptotic viral and human genes during latency. *EMBO J* 2012;31(9):2207–21. DOI: 10.1038/emboj.2012.63.
47. Nagpal V., Rai R., Place A.T. et al. MiR-125b is critical for fibroblast-

- to-myofibroblast transition and cardiac fibrosis. *Circulation* 2016;133(3):291–301. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018174.
48. Macedo-Silva C., Benedetti R., Ciardiello F. et al. Epigenetic mechanisms underlying prostate cancer radioresistance. *Clin Epigenet* 2021;13(1):125. DOI: 10.1186/s13148-021-01111-8.
49. Jili S., Eryong L., Lijuan L., Chao Z. RUNX3 inhibit laryngeal squamous cell carcinoma malignancy under the regulation of miR-148a-3p/DNMT1 axis. *Cell Biochem Funct* 2016;34(8):597–605. DOI: 10.1002/cbf.3233.
50. Zhang J., Yang C., Wu C. et al. DNA Methyltransferases in cancer: biology, paradox, aberrations, and targeted therapy. *Cancers (Basel)* 2020;12(8):2123. DOI: 10.3390/cancers12082123.
51. Bui T.V., Mendell J.T. Myc: maestro of microRNAs. *Genes Cancer* 2010;1(6):568–75. DOI: 10.1177/1947601910377491.
52. Richardsen E., Andersen S., Al-Saad S. et al. Low expression of miR-424-3p is highly correlated with clinical failure in prostate cancer. *Sci Rep* 2019;9(1):10662. DOI: 10.1038/s41598-019-47234-0.
53. Kim M.Y., Shin H., Moon H.W. et al. Urinary exosomal microRNA profiling in intermediate-risk prostate cancer. *Sci Rep* 2021;11(1):7355. DOI: 10.1038/s41598-021-86785-z.

Вклад авторов

М.А. Махоткин: биоинформатический анализ, написание текста рукописи;
Д.А. Чеботарев: проведение экспериментальных исследований, анализ полученных данных;
М.Г. Тютякина, А.Н. Машкарин: проведение экспериментальных исследований;
В.А. Тарасов: разработка дизайна исследования, научное руководство;
М.И. Коган: разработка концепции статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
Е.А. Черногубова: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи.

Authors' contributions

M.A. Makhotkin: bioinformatics analysis, article writing;
D.A. Chebotarev: experimental research, analysis of the obtained data;
M.G. Tyutyakina, A.N. Mashkarina: experimental research;
V.A. Tarasov: developing the research design, scientific leadership;
M.I. Kogan: developing the research concepts, analysis of the obtained data, article writing;
E.A. Chernogubova: reviewing of publications of the article's theme, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.А. Махоткин / M.A. Makhotkin: <https://orcid.org/0000-0001-6757-7662>
Д.А. Чеботарев / D.A. Chebotarev: <https://orcid.org/0000-0003-3474-9311>
М.Г. Тютякина / M.G. Tyutyakina: <https://orcid.org/0000-0003-2983-997X>
А.Н. Машкарин / A.N. Mashkarina: <https://orcid.org/0000-0002-0802-6841>
М.И. Коган / M.I. Kogan: <https://orcid.org/0000-0002-1710-0169>
Е.А. Черногубова / E.A. Chernogubova: <https://orcid.org/0000-0001-5128-4910>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук» (номер государственной регистрации 01201363192).

Financing. The study was performed as part of the State assignment of the Federal Research Centre the Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (state registration number 01201363192).

Статья поступила: 09.08.2021. Принята к публикации: 20.10.2021.

Article submitted: 09.08.2021. Accepted for publication: 20.10.2021.