

АНАЛИЗ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ LET-7A-2 У ПАЦИЕНТОВ С РАДОН-ИНДУЦИРОВАННЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

Арипова А.А., Кусаинова А.А.

Aripova001@gmail.com

ЕНУ им. Л.Н.Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

Аннотация. Радон является второй наиболее распространенной причиной развития рака легкого после табакокурения.

Цель. Исследование взаимосвязи между высоким уровнем радона и развитием рака легкого у жителей Республики Казахстан, проживающих на территориях с повышенным содержанием радона и изучение изменения экспрессионного профиля let-7a-2 для создания оптимального метода ранней диагностики данного заболевания.

Методы и материалы: Была измерена активность радона с помощью радиометра. Анализ профиля let-7a-2 проводилось с использованием количественной РТ-ПЦР.

Результаты. Изучение уровня экспрессии свободно-циркулирующих микроРНК в зависимости от гистологического типа опухоли легкого показало, что аденокарцинома характеризуется снижением уровня экспрессии let-7a-2 почти в три раза по сравнению с контролем.

Заключение. Таким образом, свободно-циркулирующее let-7a-2 могут служить перспективными прогностическим биомаркерам у пациентов с радон-индуцированным раком легкого.

Ключевые слова: Радон, let-7a-2 радон-индуцированный рак легкого.

Введение

Рак легких является одной из наиболее частых форм рака и одной из ведущих причин смертности от злокачественных новообразований во всем мире. По оценкам экспертов, число смертей от рака легких увеличится до 3 миллионов в 2035 году [1].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) среди канцерогенных факторов окружающей среды радиоактивный газ - радон является второй причиной развития рака легких после курения [2]. В результате организм подвергается воздействию ионизирующего излучения, что приводит к окислительному повреждению ДНК, белков, липидов и некоторых клеточных метаболитов, происходит разрушение клеток, которые в зависимости от степени повреждения могут утратить способность к делению и погибнуть, либо претерпеть мутации, генетические или эпигенетические изменения. Это может быть начало предраковой или раковой опухоли.

В связи с этим существует потенциальная угроза общественному здравоохранению в радоноопасных областях. Следовательно, необходимы новые методы диагностики данного заболевания, которые позволят диагностировать рак легкого на самых ранних стадиях развития.

Материалы и методы

2.1 Объекты исследования

В исследование были включены 136 человек, которые были разделены на 3 группы в зависимости от уровня экспозиции радона. В первую группу («рак легкого+радон») вошли 49 пациентов, проживающих на территории с высоким уровнем радона в воздухе и состоящие на учете в Акмолинском областном онкологическом диспансере г. Кокшетау. Вторую группу («рак легкого без радона») составили 37 пациентов Онкологического диспансера г.Астана, не подвергавшиеся воздействию высоких доз радона и его ДПР в течение последних 20 лет. Контрольную группу («Контроль») представили лица без патологии легких (50 человек), проживающие на территориях с уровнем радона, соответствующим нормам ПДК.

2.2 Измерение уровня радона

Измерение активности радона проводилось в соответствии с методом быстрого измерения радона и торона с использованием радиометра Canary 222 Digital Electronic Radon Gas Monitor (LR-03) (Corentium AS, Норвегия).

2.3 Расчет риска возникновения радон-индуцированного рака (ERR)

Для населения г. Кокшетау проводился расчет риска возникновения радон-индуцированного рака с использованием моделей: «BEIR VI», «FCZ», «GSF». Значение коэффициентов для всех расчетов согласно Tomasek, 2008 [3].

2.4 Анализ уровня экспрессии let-7a-2 в плазме крови

Выделение РНК осуществляли набором miRNeasy serum/plasma kit (#217184, Qiagen) по протоколу производителя. Концентрацию выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра Thermo Scientific NanoDrop 1000. ОТ-ПЦР. Обратную транскрипцию осуществляли с помощью коммерческого набора miRCURY LNA RT Kit (cat. no. 339340).

Количественную ПЦР в режиме реального времени проводили в амплификаторе CFX96 ToUch™ (Bio-Rad) с использованием Master Mix-miRCURY SYBR Green PCR Kit (#339346) и праймеров let-7a-2, U6 согласно протоколу производителя. Для количественной оценки уровня экспрессии микроРНК использовали метод относительных определений количественных значений $2^{-\Delta\Delta CT}$ [4].

2.7 Статистическая обработка данных

Данные анализировали с использованием t-критерия Стьюдента (значения $P < 0,05$ считались значимыми; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). Для статистической обработки полученных результатов использовалась программа GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, США).

Результаты

Недавние исследования на клеточных линиях бронхиального эпителия человека и на животной модели показали уменьшение уровня экспрессии let-7a-2 под воздействием радона [5]. Однако, подобные исследования на человеческой популяции не проводились и данные об ассоциации профиля свободно циркулирующей let-7a-2 у лиц, подвергшихся воздействию радона отсутствуют. В связи, с чем задачей нашего исследования стало изучение уровня экспрессии онкосупрессора let-7a-2 в плазме крови пациентов, с диагнозом рак легкого для идентификации данной микроРНК как потенциального диагностического биомаркера радон-индуцированного рака легкого.

Полученные нами данные действительно указывают на снижение уровня относительной экспрессии микроРНК let-7a-2 в обеих группах больных раком легкого по сравнению с контролем (рисунок 1,2 и таблица 1).

Анализ профиля экспрессии свободно циркулирующей let-7a-2 у больных с различными гистологическими типами рака легкого показал, что аденокарцинома характеризуется снижением уровня экспрессии let-7a-2 почти в три раза по сравнению с контролем (таблица 2). В качестве калибратора в данном случае использовалась группа контроля, состоящая из лиц, не имеющих легочной патологии. В отношении других гистологических типов рака легкого не выявлено статистически достоверных изменений в профиле экспрессии указанной микроРНК.

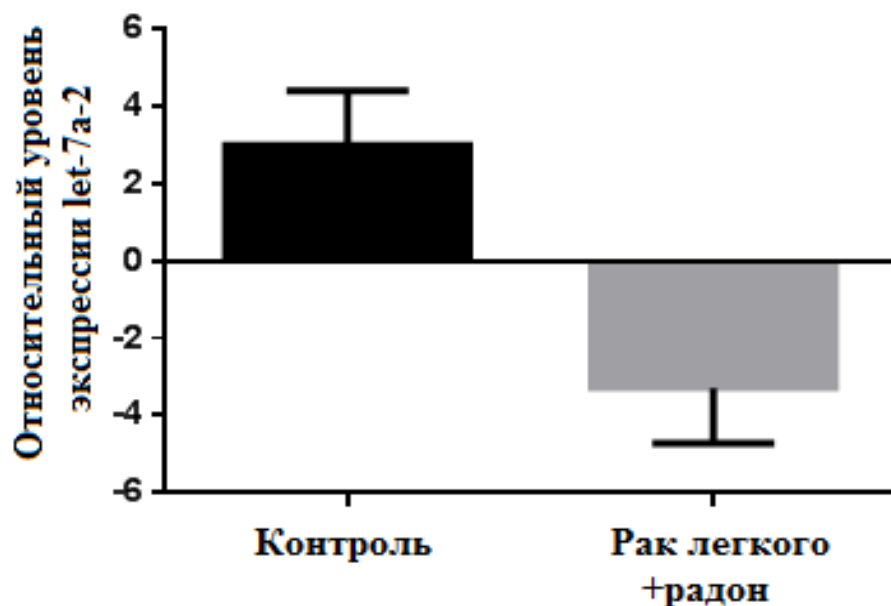


Рисунок 1 - Относительный уровень экспрессии микроРНК let-7a-2 у пациентов группы «рак легкого +радон» в сравнении с контролем

В связи с вышеизложенным, микроРНК let-7a-2 представляется весьма перспективным биомаркером для ранней диагностики радон-индуцированного рака легкого. Более того, экспрессия let-7a-2 характеризуется зависимостью от гистологического типа рака легкого.

Таблица 1- Относительный уровень экспрессии let-7a-2 у больных раком легкого в сравнении с контролем

	let-7a-2	U6	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Разница в уровне экспрессии let-7a-2
Контроль	34,68±0,2	31, 8±0,5	2,88±0,55	0,00±0,55	1 (0,68-1,5)
Рак легкого+радон	36,3±0,7	32,9±0,8	3,3±1,2	0,42±0,641	0,7 (1,2-2,1)
Рак легкого без радона	35,5±0,5	32,5±0,5	3±0,8	0,11±0,516	0,9 (0,7-1,4)

Таблица 2 – Относительный уровень экспрессии let-7a-2 зависимости от гистологического типа рака легкого

	let-7a-2	U6	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Разница в уровне экспрессии let-7a-2
Контроль	34,68±0,2	31, 8±0,5	2,88±0,55	0,00±0,55	1 (0,68-1,5)
Аденокарцинома	36,01±1	31,4±0,33	4,64±1,3	1,76±1,3	0,29

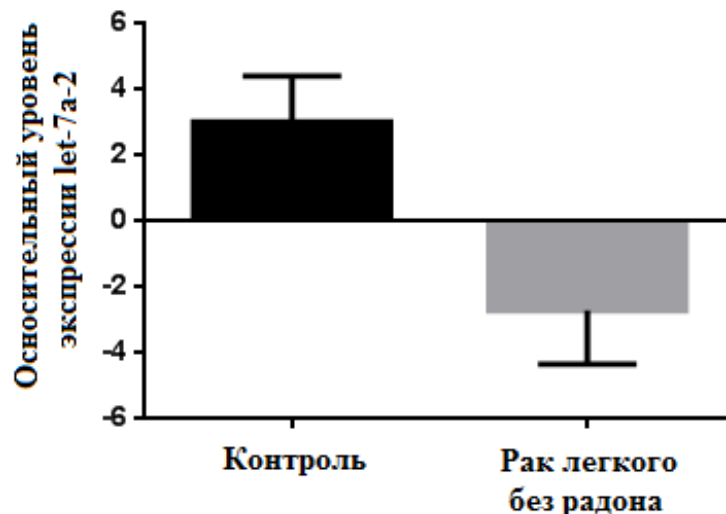


Рисунок 2 - Относительный уровень экспрессии микроРНК let-7a-2 у пациентов группы «рак легкого без радона» в сравнении с контролем

Обсуждение

Впервые ассоциация уровня экспрессии микроРНК с раком легкого была отмечена в 2004 году [6]. Takamizawa и др. [7] показали, что сниженная экспрессия let-7, связана с более короткой послеоперационной выживаемостью. Они подтвердили эти результаты, трансфецируя let-7 в клеточную линию аденокарциномы легкого A549. Наблюдаемая сверхэкспрессия заканчивалась торможением роста клеток линии A549. Более того, сверхэкспрессия let 7a приводила к остановке клеточной пролиферации не только *in vitro*, но и *in vivo* [8].

Изучение уровня экспрессии свободно-циркулирующих микроРНК в зависимости от гистологического типа опухоли легкого показало, что аденокарцинома характеризуется снижением уровня экспрессии let-7a-2 почти в три раза по сравнению с контролем. В свою очередь let-7a-2 позиционируются, как супрессоры опухолей. В связи с чем, данные микроРНК были выбраны в качестве кандидатов для детекции молекулярных изменений, происходящих при патогенезе радон-индуцированного рака легкого.

Список использованных источников

1. Barta, J.A., Powell, C.A., Wisnivesky, J.P. Global epidemiology of lung cancer. *Ann. Glob. Health* 2019, 85, 1–16.
2. World Health Organization. WHO handbook on indoor radon: a public health perspective, 2018.
3. Tomasek L., Roge A., Laurier D. and Tirmarche M. Dose conversion of radon exposure according to new epidemiological findings // *Radiation Protection Dosimetry*. – 2008. - Vol. 130. - P. 98–100.
4. K.J. Livak, T.D. Schmittgen Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method // *Methods*. 2001. P. 402-408.
5. Feng-Mei, et al. Tong Radon-induced alterations in micro-RNA expression profiles in transformed BEAS2B cells // *J Toxicol Environ Health A*. — 2013. — Vol. 76(2). — P. 107-119.
6. Johnson S.M., Grosshans H., Shingara J., Byrom, M., Jarvis R., Cheng A., Labourier E., Reinert K.L., Brown D., and Slack F.J. RAS is regulated by the let-7 microRNA family // *Cell*. — 2005. — Vol. 120(5). — P. 635–647.
7. Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K. et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival // *Cancer Research*. — 2004. — Vol. 64(11). — P. 3753–3756.

8. He X., Duan C., Chen J., Ou-Yang X., Zhang Z. Let-7a elevates p21/ WAR1 levels by targeting of NIRF and suppresses the growth of A549 lung cancer cells // FEBS Letters. — 2009. — Vol. 583(21). — P. 3501-3507.