

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

Гребнев Д.Ю.^{1,2}, Маклакова И.Ю.^{1,2}, Корнилов Д.О.¹, Симарзина В.М.¹, Тряпицын М.А.¹, Казанцев Ю.А.¹, Зорников Д.Л.¹, Григорьева Ю.В.¹, Фадеев Ф.А.^{1,2}

Ингибирование опухолевого роста в клеточной культуре остеосаркомы с помощью микроРНК mir162a

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620028, Екатеринбург, Россия, ул. Репина д. 3;²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», 620026, Екатеринбург, Россия, ул. Карла Маркса, д. 22А**Цель исследования** – изучение влияния микроРНК mir162a на жизнеспособность опухолевых клеток линии остеосаркомы SAOS-2.**Методика.** Исследования выполнены на клеточной линии SAOS-2. Была произведена трансфекция микроРНК mir162a в дозе 90 пмоль. Через 24, 48 и 72 ч после трансфекции методом флуоресцентной микроскопии производился подсчет жизнеспособных клеток, клеток в состоянии некроза и апоптоза, а также оценивался уровень аутофагии.**Результаты.** Трансфекция клеток SAOS-2 микроРНК mir162a через 24, 48, 72 ч приводила к снижению доли жизнеспособных клеток, увеличению доли клеток с признаками апоптоза и некроза по сравнению с контрольными образцами. Через 24 ч с момента трансфекции процент жизнеспособных клеток в опытных образцах был ниже чем в контрольных на 29,3%, через 48 ч – на 33,9%, через 72 ч – на 47,4%. Трансфекция SAOS-2 микроРНК mir162a приводила к четырехкратному снижению активности аутофагии.**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о наличии у микроРНК mir162a терапевтического потенциала в качестве средства патогенетической терапии злокачественных опухолевых заболеваний.**Ключевые слова:** mTOR; mir162a; SAOS-2; микроРНК; РНК-интерференция; остеосаркома; апоптоз; некроз, жизнеспособность клеток; аутофагия**Для цитирования:** Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Корнилов Д.О., Симарзина В.М., Тряпицын М.А., Казанцев Ю.А., Зорников Д.Л., Григорьева Ю.В., Фадеев Ф.А. Ингибирование опухолевого роста в клеточной культуре остеосаркомы с помощью микроРНК mir162a. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 48-55.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.48-55

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Корнилов Д.О.; сбор и обработка материала – Корнилов Д.О., Тряпицын М.А., Симарзина В.М.; подготовка иллюстративного материала – Симарзина В.М., Казанцев Ю.А., Григорьева Ю.В.; статистическая обработка – Тряпицын М.А., Зорников Д.Л.; написание текста – Корнилов Д.О., Казанцев Ю.А., Зорников Д.Л.; редактирование – Гребнев Д.Ю., Зорников Д.Л., Маклакова И.Ю., Фадеев Ф.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.**Для корреспонденции:** Гребнев Дмитрий Юрьевич, e-mail: dr-grebnev77@mail.ru**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям от 9 июня 2021 г.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.06.2022

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Grebnev D.Ju.^{1,2}, Maklakova I.Ju.^{1,2}, Kornilov D.O.¹, Simarzina V.M.¹, Tryapitsyn M.A.¹, Kazancev Ju.A.¹, Zornikov D.L.¹, Grigoryeva Ju.V.¹, Fadeev F.A.^{1,2}

Inhibition of tumor growth in osteosarcoma cell culture with mir162a microRNA

¹Ural State Medical University, Repina St. 3, Yekaterinburg, 620028, Russian Federation;²Institute of Medical Cell Technologies, Karla Marxa St. 22a, Yekaterinburg, 620026, Russian Federation**Aim.** To study the effect of mir162a microRNA on the viability of SAOS-2 osteosarcoma tumor cells.**Methods.** The study was performed on SAOS-2 cell culture. The mir162a microRNA was transfected at a dose of 90 pmol. At 24, 48, 72 hours, viable, apoptotic, and necrotic cells were counted by fluorescence microscopy in the transfected cell culture. Also, the level of cell autophagy was evaluated.

Results. The transfection of SAOS-2 with mir162a decreased the proportion of viable cells and increased the proportion of apoptotic and necrotic cells at 24-72 hours after the procedure. Compared to the negative control, the proportion of viable cells in the mir162a-transfected SAOS-2 samples was decreased by 29.3%, 33.9%, 47.4% at 24, 48, and 72 hours, respectively. The transfection caused a 75% decrease in the autophagy level.

Conclusion. The results suggest that mir162a microRNA has a therapeutic potential for the pathogenetic therapy of malignant neoplasms.

Keywords: MTOR; mir162a; SAOS-2, microRNA; RNA interference; osteosarcoma; apoptosis; necrosis; viability; autophagy

For citation: Grebnev D.Ju., Maklakova I.Ju., Kornilov D.O., Simarzina V.M., Tryapitsyn M.A., Kazancev Ju.A., Zornikov D.L., Grigoryeva Ju.V., Fadeev F.A. Inhibition of tumor growth in osteosarcoma cell culture with mir162a microRNA. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 48-55. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.48-55

Authors' contribution: conception and design of the research – Kornilov D.O.; collection and processing of material – Kornilov D.O., Tryapitsyn M.A., Simarzina V.M.; preparation of illustrative material – Simarzina V.M., Kazantsev Ju.A., Grigoryeva Ju.V.; statistical processing – Tryapitsyn M.A., Zornikov D.L.; writing the text – Kornilov D.O., Kazantsev Ju.A., Zornikov D.L.; editing the text – Grebnev D.Ju., Zornikov D.L., Maklakova I.Ju., Fadeev F.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Dmitry Ju. Grebnev**, doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Pathological Physiology of the Ural State Medical University, e-mail: dr-grebnev77@mail.ru

Information about the authors:

Grebnev D.Ju., <https://orcid.org/0000-0002-5698-8404>

Maklakova I.Ju., <https://orcid.org/0000-0002-6895-7947>

Kornilov D.O., <https://orcid.org/0000-0001-5311-1247>

Zornikov D.L., <https://orcid.org/0000-0001-9132-215X>

Financing. The study was carried out with financial support from the Foundation for the Promotion of Innovation of June 9, 2021.

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

Received 20.06.2022

Accepted 26.01.2023

Published 17.03.2023

Введение

МикроРНК – это эволюционно консервативные малые некодирующие молекулы РНК длиной 18 – 25 нуклеотидов, обнаруженные у растений, животных и некоторых вирусов, принимающие участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путем РНК-интерференции. Благодаря уникальным биохимическим и биофизическим свойствам связанного с микроРНК каталитического белкового комплекса RISC (РНК-индуцируемый комплекс нокдаун гена), данные молекулы осуществляют эпигенетическую регуляцию экспрессии поразительно большого количества регуляторных мишеней, в том числе у человека [1].

Имеются данные, что микроРНК может осуществлять экзонный нокдаун эволюционно консервативных генов. В частности, было доказано, что микроРНК растений mir162a подавляет экспрессию mTOR (mTOR у человека) у пчелы медоносной (*Apis mellifera*) при алиментарном потреблении пыльцы, таким образом, останавливая половое созревание

и влияя на определение пчелиной касты как «рабочую» [2].

MTOR – это механическая мишень рапамицина. Является важным регулятором множества неврологических и иммунных процессов. Передача сигналов mTOR вовлечена в процесс старения и инициацию развития многих видов онкологических заболеваний.

Учитывая ключевую роль mTOR в росте и метаболизме клеток, вполне предсказуемо существование связи между активностью пути mTOR и патологическими процессами, включая неопластические. Активация передачи сигналов mTOR участвует в формировании злокачественных новообразований [3]. Передача сигналов mTOR активируется в условиях нарушения регуляции пролиферативных процессов [4]. Изучение способов подавления экспрессии mTOR с помощью микроРНК может иметь большое значение для терапии онкологических заболеваний.

Цель исследования – изучение влияния микроРНК mir162a на жизнеспособность опухолевых клеток линии остеосаркомы SAOS-2.

Методика

Культивирование клеточной линии. В качестве экспериментальной культуры были выбраны клетки остеосаркомы SAOS-2, так как имеются подтвержденные данные о том, что в данной клеточной культуре стабильно наблюдается повышенный уровень экспрессии гена-мишени mTOR [5].

Культивирование проводили в культуральных флаконах T-25 (TPP, Switzerland) в среде, содержащей 88% DMEM, 10% FBS, 0,01% L-глутамин, 0,01% раствора пенициллина и стрептомицина (1:1), в CO₂ инкубаторе (Thermo Scientific 8000, USA) 5% CO₂, при 37 °C. Выполнялся регулярный пересев клеток при достижении 80-100% конfluэнтности по следующей методике: удалялась среда, после трехкратного промывания раствором Хенкса без кальция и магния, во флакон вносили 1 мл 0,25% раствора трипсина с ЭДТА, после чего раствор сразу удалялся. Клетки помещали в CO₂ инкубатор на 3 мин. Затем во флакон вносили 3 мл свежей среды с 15% содержанием FBS. Проводился визуальный контроль отхождения клеток от покрытия флакона с помощью светового инвертированного микроскопа (UNICO IV950, USA). Клеточная суспензия отбиралась в пробирку и центрифугировалась со скоростью 1600 rpm в течение 3 мин. Супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в 12 мл свежей среды (10% FBS), после чего переносили клеточную суспензию в новый культуральный флакон.

Трансфекция образцов клеточной линии остеосаркомы SAOS-2. Была синтезирована антисмысловая микроРНК mir162a последовательности: 5'ucgaaaaaccucgcauccag3' с соответствующей ей комплементарной смысловой последовательностью (ДНК-синтез, Москва). Положительный контроль трансфекции представлял собой смесь микроРНК с аналогичными последовательностями, меченных FAM (флуоресцеин, 450/520 нм).

Для проведения эксперимента вносили клеточную суспензию в стандартные 6-луночные планшеты с указанной выше средой, после чего планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе до достижения 60-80% конfluэнтности.

Образцы культуры клеток были разделены на опытную группу (маркировки «24», «48», «72»), группу контроля трансфекции (маркировки «Negative 24», «Negative 48», «Negative 72») и группу контроля трансфектанта (маркировки «Transfectant Control 24», «Transfectant Control 48», «Transfectant Control 72»).

Для проведения трансфекции готовили реакционную смесь, содержащую 750 мкл среды Opti-MEM

и 45 мкл трансфектанта Lipofectamine RNAiMAX, (Invitrogen, USA). Согласно протоколу производителя, использовали 9 мкл трансфектанта на 1 лунку 6-луночного планшета, за исключением реакционной смеси для отрицательного контроля, в которой должно использоваться 3 мкл трансфектанта на 1 лунку.

Приготовленную реакционную смесь разливали по 150 мкл в 5 пробирок (рис. 1). После чего в пробирку 1 вносили 10 мкл (90 пмоль) положительного контроля трансфекции (микроРНК, меченая флуоресцентной меткой FAM), разбавленного в 140 мкл среды Opti-MEM. В пробирки 2,3 и 4 вносили по 10 мкл mir162a (90 пмоль), разбавленного в 140 мкл Opti-MEM. В пробирку 5 в качестве сравнительного контроля вносили 10 мкл реагента Silencer Select Negative Control No. 2 siRNA (Invitrogen, USA) (30 пмоль неспецифических микроРНК, не имеющих в человеческих клетках генов-мишеней), разбавленного в 140 мкл Opti-MEM. Все пробирки инкубировали 5 мин при комнатной температуре (Lipofectamine RNAiMAX protocol, Invitrogen, Protocol pub. No MAN0007825 Rev. 1.0) [6].

Далее в лунки с образцами клеток, маркированные «Positive», «24», «48», «72» вносили по 250 мкл смеси из пробирок 1, 2, 3 и 4, соответственно. По 100 мкл содержимого пробирки 5 внесли в три лунки с маркировкой «Negative 24», «Negative 48», «Negative 72». В три лунки с маркировкой «Transfectant Control 24», «Transfectant Control 48», «Transfectant Control 72» вносили по 250 мкл Opti-MEM с целью контроля токсичности трансфектанта (рис. 1).

После процедуры трансфекции клетки культивировали в течение 24, 48, 72 ч в CO₂-инкубаторе 5% CO₂, при 37 °C.

Положительный контроль трансфекции. Положительный контроль трансфекции производили с помощью люминесцентного микроскопа MCX 300 Orchid НВО (Micros, Austria). Через 24 ч после процедуры готовили клеточную суспензию по методике посева клеток, указанной в пункте «Культивирование клеточной линии» (за исключением того, что клетки ресуспендировали в холодном растворе PBS). Далее 10 мкл клеточной суспензии наносили на предметное стекло, высушивали и фиксировали метанолом. Полученный препарат в течение 10 мин обрабатывали DAPI (диапазон 340/425 нм) для визуализации ядер. Через 24 ч в диапазоне 340/425 нм визуализировали ядра клеток, в диапазоне 450/520 нм регистрировали люминесценцию меченой FAM микроРНК в липидных наногранулах в цитоплазме клеток, что свидетельствовало о проникновении mir162a в клетки. Предварительно был проведен отрицательный контроль – при люми-

несцентной микроскопии клеток без DAPI – аутолюминесценции не было обнаружено.

Анализ показателей некроза, апоптоза, жизнеспособности клеток. Клетки для приготовления микроскопических препаратов промывали раствором солей Хенкса без кальция и магния, после чего заливали 1 мл холодного раствора Версена. Далее клетки аккуратно «отскребали» от поверхности лунок цитологическим скребком (так как добавление раствора трипсина может приводить к нарушению целостности мембран исследуемых клеток и, соответственно, к искажению результатов анализа). Отделенные клетки в холодном растворе Версена отбирали в пробирку типа Эппендорф, центрифугировали при 300g 5 мин, после чего удаляли супернатант.

Для выявления клеток с индуцированным апоптозом, некрозом, жизнеспособных клеток использовали набор Apoptosis/Necrosis Assay Kit (blue, red, green) (Abcam, UK). Была приготовлена реакционная смесь согласно протоколу производителя (Ab176750 Apoptosis/Necrosis Detection Kit (blue, red, green) protocol, Abcam, Version 2c Last Updated 12 December 2018) [8], в которой ресуспендировали образец клеток и инкубировали 60 мин при комнатной температуре. После чего 10 мкл суспензии с окрашенными клетками переносили на предметное стекло, высушивали и фиксировали метанолом.

После испарения метанола препараты микроскопировали в каналах FITC (диапазон 450/520 нм) для анали-

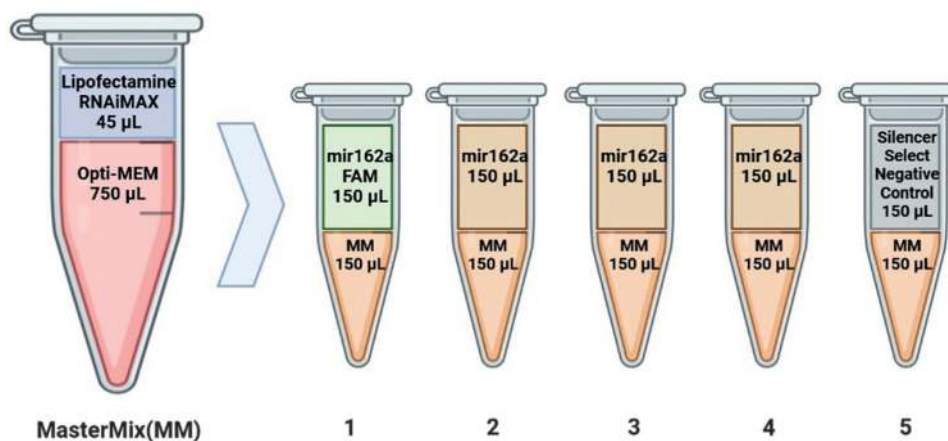


Рис. 1. Схема приготовления реакционных смесей для трансфекции.

Fig. 1. Scheme of preparation of reaction mixtures for transfection.

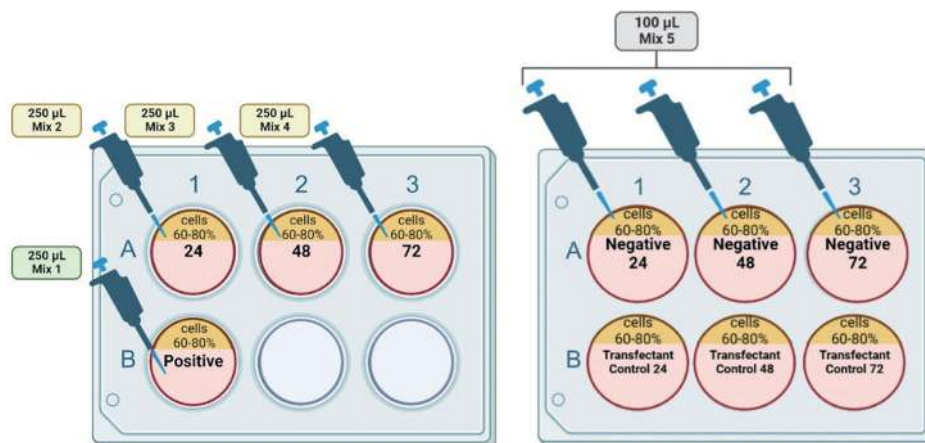


Рис. 2. Схема трансфекции экспериментальной микроРНК mir162a в культуру клеток SAOS-2.

Fig. 2. Scheme of transfection of experimental mir162a microRNA into SAOS-2 cell culture.

за Aproxin Green Indicator (клетки с индуцированным апоптозом), TRITC (диапазон 630/660 нм) для анализа 200X 7-AAD (клетки с индуцированным некрозом) и Violet (диапазон 340/425 нм) для анализа Cyto Calcein Violet 450 (жизнеспособные клетки). В 10 полях зрения (одинаковые 10 полей для всех трех длин волн), меняя светофильтр, подсчитывали количество клеток с индуцированным апоптозом, некрозом и жизнеспособных клеток (микроскоп MCX 300 Orchid HBO, Micros, Austria).

Анализ показателя индуцированной аутофагии. Препараты клеток для оценки аутофагии получали таким же способом как для оценки апоптоза, некроза, жизнеспособности. Для выявления клеток с индуцированной аутофагией был использован набор Autophagy Assay Kit (Merck, Germany), содержащий МАК-138 согласно протоколу производителя с 30-минутной инкубацией (МАК138 Autophagy Assay Kit Technical bulletin, Sigma-Aldrich, Merck, Germany, last updated 2020) [9]. С помощью микроскопа MCX 300 Orchid HBO (Micros, Austria) в 10 полях зрения подсчитывали количество клеток с индуцированной аутофагией в канале Violet (диапазон 340/425 нм) и общее количество клеток в проходящем свете.

Методы статистического анализа. Для сравнения доли клеток с индуцированным апоптозом, некрозом,

жизнеспособных клеток, клеток с индуцированной аутофагией в опытных и контрольных образцах рассчитывали двусторонний критерий Фишера в свободно распространяемой программе WinPepi 11.65. Различия считали статистически значимыми при уровне $\alpha=0,05$.

Результаты

Через 24 ч после трансфекции в диапазоне 450/520 нм регистрировали люминесценцию липидных наногранул с меченой FAM микроРНК в цитоплазме клеток, что свидетельствовало об успешной трансфекции образцов клеток.

Визуализация клеток представлена на **рис. 3**.

Для опытных и контрольных образцов (контроль трансфекции и контроль трансфектанта) SAOS-2 подсчитывали количество клеток с индуцированным апоптозом, некрозом и жизнеспособных клеток в 10 полях зрения для каждого образца перед трансфекцией и через 24, 48, 72 ч. Далее в каждом исследуемом образце рассчитывали долю клеток с индуцированным апоптозом, некрозом и жизнеспособных клеток от их общего количества в наблюдаемых полях зрения (**рис. 4, 5**).

Непосредственно перед трансфекцией отмечали одинаковый процент жизнеспособных клеток, клеток с индуцированным апоптозом и некрозом в опытном образце и образце культуры клеток SAOS-2, трансфицированных Silencer Select Negative Control No. 2. Через 24, 48 и 72 ч после трансфекции фиксировали значительно меньшую долю жизнеспособных клеток в опытных образцах. Уже через 24 ч с момента трансфекции доля жизнеспособных клеток была на 29,3% ниже чем в контрольном образце ($p<0.001$), через 48ч – на 33,9% ($p<0.001$), через 72ч – на 47,7% ($p<0.001$). Соответственно, в трансфицированных mir162a образцах увеличивались доли клеток с индуцированным апоптозом и некрозом. Соответственно, в трансфицированных mir162a образцах увеличивались доли клеток с индуцированным апоптозом и некрозом. Через 24 ч отмечали на 16,5% большую долю клеток с апоптозом, через 48 ч – на 13% большую долю клеток с апоптозом и на 20,8% большую долю клеток с некрозом, через 72 ч – на 40,8% большую долю клеток с некрозом (все различия статистически значимы, $p<0,05$).

Учитывая разные количества микроРНК и липофектамина, использованные при трансфекции mir162a и Silencer Select Negative Control No. 2, был проведен дополнительный контроль токсичности трансфектанта. В качестве данного контроля (контроля трансфектанта) использовали образцы клеток в среде Opti-MEM свободные от липофектамина

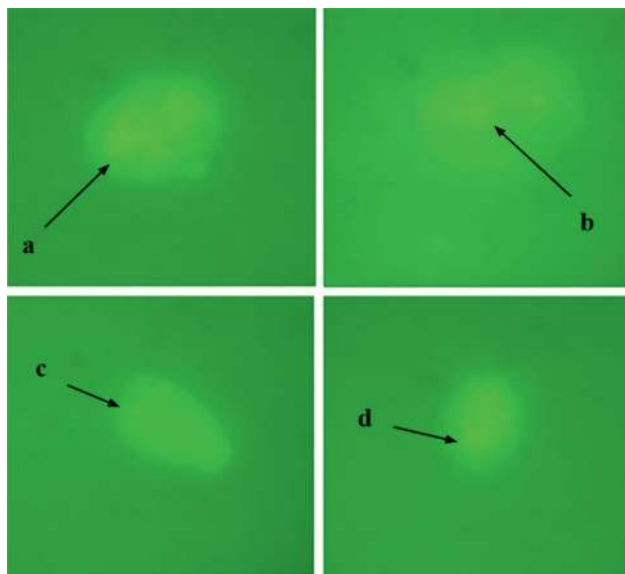


Рис. 3. Люминесценция липидных наногранул с меченой FAM микроРНК в цитоплазме трансфицированных клеток (a, b, c, d) (ув.1000, диапазон 450/520 нм).

Fig. 3. Luminescence of lipid nanogranules with FAM-labeled microRNA in the cytoplasm of transfected cells (a, b, c, d) (1000 magnification, 450/520 nm range).

и экспериментальных микроРНК. Отсутствие значимых различий по показателям жизнеспособности клеток в образцах SAOS-2, трансфицированных Silencer Select Negative Control No. 2 (контроль трансфекции) и в образцах SAOS-2 без трансфекции (контроль трансфектанта) свидетельствует об отсутствии влияния трансфектанта Lipofectamine RNAiMAX и реагента Silencer Select Negative Control No. 2 на жизнеспособность исследуемых клеток.

Для оценки индуцированной аутофагии в опытных и контрольных образцах SAOS-2 аналогичным образом рассчитывали количество и процент клеток в 10 полях

зрения для каждого образца перед трансфекцией и через 24, 48, 72 часа после (рис. 6, а).

Непосредственно перед трансфекцией и через 24 ч от момента процедуры фиксировали сопоставимые проценты клеток с индуцированной аутофагией в опытных и контрольных образцах. Через 48 и 72 ч доля клеток с индуцированной аутофагией в образцах SAOS-2, трансфицированных mir162a, была значимо ниже таковой в контрольных образцах. Так, через 72 ч в опытном образце регистрировали четырехкратно меньший процент клеток с индуцированной аутофагией (76% против 19% в образце группы контроля трансфекции).

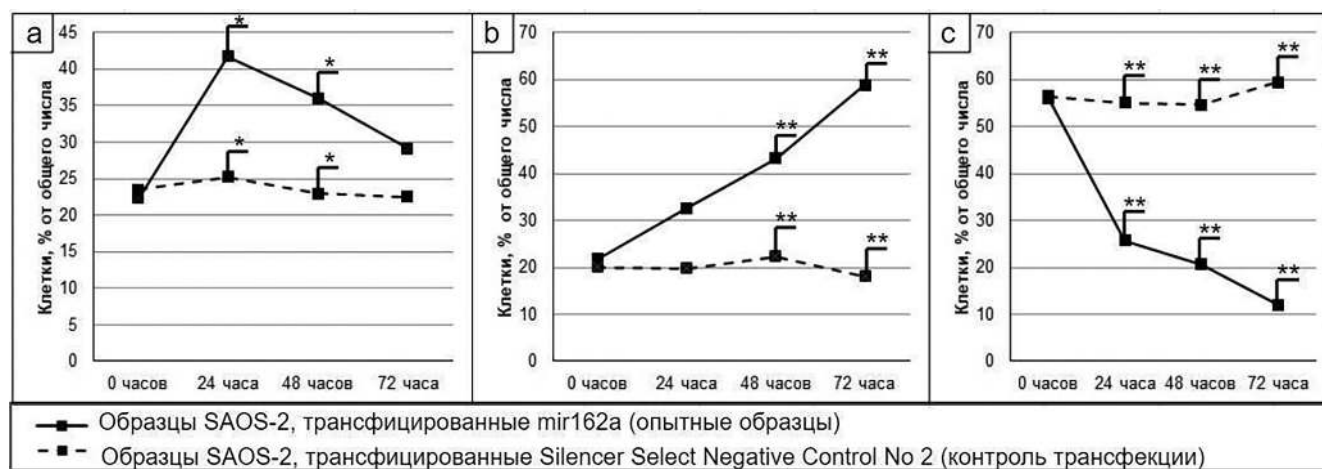


Рис. 4. Показатели индуцированного апоптоза (а), некроза (б) и жизнеспособности (с) в образцах культуры клеток SAOS-2, трансфицированных mir162a и Silencer Select Negative Control No. 2. * Различия статистически значимы при $p < 0.05$, ** Различия значимы при $p < 0.001$.

Fig. 4. Induced apoptosis (a), necrosis (b), and viability (c) indices in SAOS-2 cell culture samples transfected with mir162a and Silencer Select Negative Control No. 2. * Differences are statistically significant at $p < 0.05$, ** Differences are significant at $p < 0.001$.

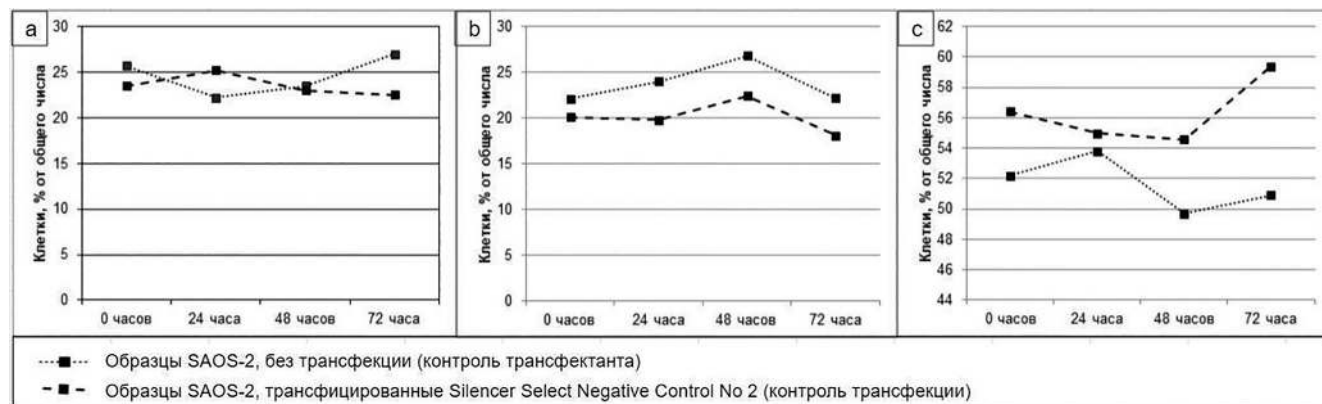


Рис. 5. Показатели индуцированного апоптоза (а), некроза (б) и жизнеспособности (с) в образцах культуры клеток SAOS-2, без трансфекции и трансфицированных Silencer Select Negative Control No. 2.

Fig. 5. Induced apoptosis (a), necrosis (b), and viability (c) indices in SAOS-2 cell culture samples without transfection and transfected with Silencer Select Negative Control No. 2.

Отсутствие значимых различий по показателям индуцированной аутофагии в образцах SAOS-2, трансфицированных Silencer Select Negative Control No. 2 (контроль трансфекции) и в образцах SAOS-2 без трансфекции (контроль трансфектанта) свидетельствовало об отсутствии влияния трансфектанта Lipofectamine RNAiMAX и реагента Silencer Select Negative Control No. 2 на уровень индуцированной аутофагии в исследуемых клетках (рис. 6, b).

Обсуждение

Полученные результаты могут быть связаны с ролью mTOR в пролиферации опухолевых клеток. В частности, ингибирование mTOR с помощью микроРНК miR162a приводит к снижению синтеза ДНК, снижает пролиферацию и подавляет пластический обмен, способствуя инициации апоптоза [7].

Статистически значимое снижение жизнеспособности трансфицированных клеток на третьи сутки может свидетельствовать о значительном нокдауне гена-мишени mTOR.

Зарегистрированное снижение уровня аутофагии опухолевых клеток SAOS-2 в течение 48-72 ч после трансфекции miR162a может свидетельствовать о подавлении mTOR зависимой аутофагии. Учитывая возможную роль mTOR-зависимой аутофагии в активации пролиферации опухолевых клеток [10], снижение аутофагии в результате трансфекции miR162a может являться одним из механизмов, приводящих к гибели опухолевых клеток.

Увеличение числа клеток с индуцированным некрозом на фоне пропорционального снижения количества апоптотизированных клеток через 48-72 ч с момента трансфекции может быть связано с особенностью работы тест-системы. Краситель 7-AAD, используемый для визуализации клеток с индуцированным некрозом, обнаруживает клетки связываясь с ДНК при повышении проницаемости клеточной мембраны. Следовательно, данный реактив детектирует и некротизированные клетки, и клетки с индуцированным апоптозом по прошествии достаточного периода времени для нарушения целостности клеточных мембран [8].

Исследование онкосупрессорных микроРНК в диагностике и лечении остеосаркомы имеет большое прикладное значение. Ранее, при остеосаркоме исследователями изучались онкосупрессорные свойства микроРНК miR-410, мишенью которой является ген TRIM44 в клетках остеосаркомы; miR-410 подавляла пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток, что было выяснено методом иммуногистохимии [11].

Другие исследователи отмечали ингибирование экспрессии гена HMGB1 в клетках остеосаркомы методом проточной цитометрии, что приводило к снижению их пролиферации [12]. Имеются сведения об ингибировании пролиферации и инвазии клеток остеосаркомы путем нокдауна гена ZEB2 микроРНК miR-101 [13]. Однако использование микроРНК растительного происхождения в качестве средств патогенетической терапии остеосаркомы ранее не рас-

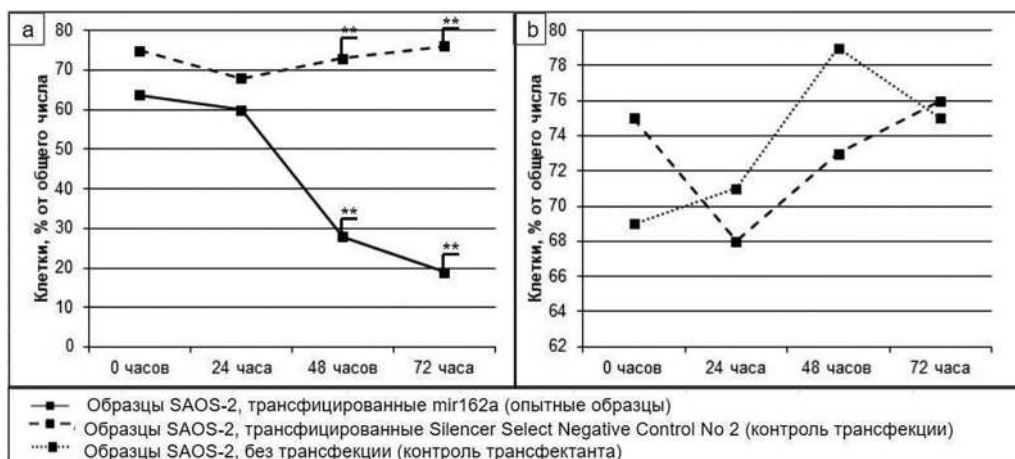


Рис. 6. Доля клеток с индуцированной аутофагией в образцах культуры клеток SAOS-2, трансфицированных miR162a и Silencer Select Negative Control No. 2. (a), без трансфекции и трансфицированных Silencer Select Negative Control No. 2. (b); ** – различия статистически значимы, $p < 0.001$.

Fig. 6. Proportion of cells with induced autophagy in SAOS-2 cell culture samples transfected with miR162a and Silencer Select Negative Control No. 2. (a), without transfection and transfected with Silencer Select Negative Control no. 2. (b); ** – differences are statistically significant, $p < 0.001$.

смачивалось. Таким образом, в исследовании были впервые описаны онкосупрессорные свойства растительной микроРНК miR162a в клетках остеосаркомы SAOS-2.

Выводы

Трансфекция микроРНК miR162a образцов клеток остеосаркомы SAOS-2 приводила к статистически значимому снижению жизнеспособности клеток по сравнению с контрольными образцами через 24, 48 и 72 ч.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у микроРНК miR162a терапевтического потенциала в качестве средства патогенетической терапии злокачественных опухолевых заболеваний.

Литература/References

- Cheng C., Wang Q., You W.; et al. MiRNAs as Biomarkers of Myocardial Infarction: Meta-Analysis. *PLoS One*. 2014; 9(2): e88566.
- Zhu K., Liu M., Fu Z., et al. Plant microRNAs in larval food regulate honey bee caste development. *PLoS genetics*. 2017; 13(8): e1006946.
- Weichhart T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology*. 2017; 84(2): 127–34.
- Schreiber K., Kennedy B. When lamins go bad: nuclear structure and disease. *Cell*. 2013; 152: 1365–75.
- Lemma Silvia, Avnet Sofia Meade M. Validation of Suitable Housekeeping Genes for the Normalization of mRNA Expression for Studying Tumor Acidosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(10): 2930.
- Yang H.L., Thiagarajan V., Shen P.C., Mathew D.C., Lin K.Y., Liao J.W.; et al. Anti-EMT properties of CoQ0 attributed to PI3K/AKT/NFKB/MMP-9 signaling pathway through ROS-mediated apoptosis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019; 38(1): 186.
- Tian T., Li X., Zhang J. mTOR signaling in cancer and mTOR inhibitors in solid tumor targeting therapy. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(3): 755.
- Gao X., Liu J., Cho K.B., Kedika S., Guo B. Chemopreventive Agent 3,3'-Diindolylmethane Inhibits MDM2 in Colorectal Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(13): 4642.
- Liu Y., Jiang Y., Li W., Han C., Qi Z. MicroRNA and mRNA analysis of angiotensin II-induced renal artery endothelial cell dysfunction. *Exp Ther Med*. 2020; 19(6): 3723–37.
- Zubova S. The diversity of autophagy and its controversial role in biological processes. *Scientific journal "Cytology"*. 2019; 61(12): 941–50.
- Wang H., Fang Z.L., Zhang G.H., Ma X. TRIM44, a crucial target of miR-410, functions as a potential oncogene in osteosarcoma. *Oncotargets Ther*. 2018; 11: 3637–47.
- Li G., Liu F., Miao J., Hu Y. miR-505 inhibits proliferation of osteosarcoma via HMGB1. *FEBS Open Bio*. 2020; 10(7): 1251–60.
- Lin H., Zheng X., Lu T., Gu Y., Zheng C., Yan H. The proliferation and invasion of osteosarcoma are inhibited by miR-101 via targeting ZEB2. *Biosci Rep*. 2019; 39(2): BSR20181283

Сведения об авторах:

Гребнев Дмитрий Юрьевич, доктор мед. наук, зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России; ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», e-mail: dr-grebnev77@mail.ru;

Маклакова Ирина Юрьевна, канд. мед. наук, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России;

Корнилов Даниил Олегович, студент 5-го курса педиатрического факультета, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: danilovkornil@gmail.com;

Симарзина Вероника Михайловна, студентка 5-го курса педиатрического факультета, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: beatle-eye@yandex.ru;

Тряпцын Михаил Андреевич, студент 5-го курса педиатрического факультета, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: misha.tryapitsyn@yandex.ru;

Казанцев Юрий Антонович, студент 6-го курса лечебно-профилактического факультета, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: jk1999@yandex.ru;

Зорников Данила Леонидович, канд. мед. наук, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: zornikov.rus@gmail.com;

Григорьева Юлия Витальевна, канд. биол. наук, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: gjv66@yandex.ru;

Фадеев Федор Алексеевич, канд. биол. наук, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России; ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», e-mail: fdf79@mail.ru