

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»  
Институт биохимических технологий, экологии и фармации

ОТЧЕТ

**Юрченко Ксении Андреевны**

Грант Государственного Совета Республики Крым среди молодых ученых по  
медицине от 30 января 2023 г. № п653-2/23.

Симферополь, 2023

## **Нарушение пролиферации клеток меланомы мышей, после влияния тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11**

**Цель:** оценить пролиферацию клеток меланомы и дыхательную активность, после воздействия на них тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11.

Наши эксперименты продемонстрировали эффективность антисмыслового олигонуклеотида (АСО) Skeen-11, которая привела к значительной пролиферации и нарушением дыхательной активности раковых клеток в культуре клеток линии мышинной меланомы.

В данном исследовании, оценивали влияние тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 на клеточный цикл, экспрессию гена глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу (Г6ФД), дыхательную активность и сравнение проникновения Skeen-11 с трансфекцией и без неё.

*Ключевые слова: тиофосфатный антисмысловый олигонуклеотид, цитотоксичность, меланома.*

### **ВВЕДЕНИЕ**

Меланома кожи – это злокачественное образование, которое возникает в результате мутаций в клетках меланобластов, меланоцитов и невусных клеток. Она является первым признаком и общего заболевания всей системы меланоцитов в организме человека. Меланома кожи относится к группе агрессивных злокачественных опухолей. На данный момент существует очень мало препаратов, которые бы успешно справлялись с борьбой против меланомы до и после операций. Однако перспективным способом лечения этого заболевания является применение антисмысловых олигонуклеотидов.

Молекулярные и биологические эффекты АСО зависят от последовательности азотистых оснований и от того, как они взаимодействуют с целевыми мишенями. Благодаря этому, мы можем учитывать генетические особенности каждого пациента. Одной из перспективных мишеней для АСО является фермент пентозофосфатного пути.

Наши эксперименты с использованием различных методик подтвердили эффективность блокирования Г6ФД с помощью АСО. Это привело к значительному угнетению роста раковых клеток в исследовательских культурах клеток мышинной меланомы Clone M-3. Эти результаты дают нам основание полагать, что использование АСО может стать прорывным методом лечения меланомы кожи.

Однако перед применением АСО в клинической практике необходимо провести дополнительные исследования и клинические испытания, чтобы убедиться в его безопасности и эффективности. Также будет полезным исследование механизмов действия АСО и их влияние на другие клетки организма.

В целом, наше исследование позволяет проложить путь к новым методам лечения меланомы кожи с использованием антисмысловых олигонуклеотидов. Это может привести к разработке новых препаратов и терапий, которые будут более эффективными и безопасными для пациентов.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Опухолевые клетки**

Для эксперимента мы использовали Clone-M3 Ф.1(СхDBA), Cloudman S91 клеточная линия мышинной меланомы. Клетки культивировали в питательной среде DMEM F-12 с добавлением 1% пенициллин/стрептомициновых антибиотиков, 1% пировиноградной кислоты и 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS).

### **Дизайн и синтез АСО**

Дизайн тиофосфатного АСО Skeep-11 (5'-CTG-AAT-CTC-CG-3') был выполнен независимо на основе геномной последовательности мыши, доступной в GenBank:NM\_008062.3 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Синтез тиофосфатного АСО проводили стандартным фосфорамидитным методом. Соответствие синтезированных фрагментов ДНК определяли с помощью анализатора VastoSCREEN на базе масс-спектрометра MALDI-TOF («Литех», Москва, Россия).

### **Трансфекция клеток**

Клетки меланомы мышей трансфицировали в присутствии трансфицирующего агента PEI 40K (Servicebio, Ухань, Китай). Клетки отбирали с конфлюэнтностью 70-90% и переносили в экспериментальный планшет в питательной среде на ночь для прикрепления. Растворы смешивали согласно инструкциям производителя. Смесь инкубировали 10-15 мин при комнатной температуре. После инкубации подготовленные клетки заменяли нормальными DMEM F-12 с 1% ПВК (без антибиотиков и сыворотки). После инкубации клеток в течение 12-20 часов среду из каждой лунки переливали в пробирку с трансфекционным агентом. Клетки переводили в состояние суспензии после открепления от флакона. Подсчитывали количество живых клеток, а также их жизнеспособность.

### **Экстракция РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени.**

Тотальную РНК экстрагировали из клеток с помощью набора RNA Extract («Евроген», Москва, Россия), следуя инструкциям производителя. Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием набора MMLV RT («Евроген», Москва, Россия) согласно инструкциям производителя. ПЦР проводили согласно инструкции производителя («Синтол», Москва, Россия) на усилителе реального времени LightCycler96 («Roche», Базель, Швейцария). На 10 мкл 2,5-кратной реакционной смеси, 5 мкл кДНК, 0,5 мкл прямого праймера (5'-ССА-GGC-TGG-TGA-СГА-ТТА-С-3') и 0,5 мкл обратного праймера (5'-А- СAG-TGG-ATG-TCC-TAG-GTG-3'), добавляли 1 мкл MgCl<sub>2</sub> и 8 мкл деионизированной воды. ПЦР проводили при следующем температурном режиме: 1 цикл денатурации при 95°C.0С – 300 секунд, 50 циклов – 95°C – 15 секунд, 59°C – 10 секунд, 72°C – 10 секунд. Полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения LightCycler96.

### **Анализ клеточного цикла**

Влияние АСО на клеточный цикл клона М-3 оценивали с помощью Инструкции производителя набора клеточного цикла Muse™. Клетки отделяли от колбы трипсинизацией. Клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 минут, после чего супернатант собирали и клетки промывали 1X DPBS, затем клетки ресуспендировали и добавляли 1 мл 70% холодного этанола. Клетки инкубировали не менее 3 часов при -20°C.0В. После инкубации клетки в объеме 200 мкл переносят в новую пробирку, затем повторяют этапы 3 и 4. К промытым клеткам добавляли 200 мкл набора Muse™ Cell Cycle. Полученный раствор инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут и анализировали в клеточном анализаторе Muse®.

### **МТТ-анализ**

Дыхательную функцию клеток меланомы коценивали с помощью красителя 3-[4,5-диметилтиазолил-2-эл]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) («Панэко», Москва, Россия). Клетки пассировали в 96-луночном иммунологическом планшете: 10 000 клеток с добавлением 150 мкл среды. Контрольные клетки оставляли незасеянными. Инкубировано 370С при 5% CO<sub>2</sub> с ночевкой. Свежий раствор МТТ готовили в концентрации 5 мг/мл в фосфатно-солевом буфере. В каждую лунку добавляли по 20 мкл раствора МТТ, пипетировали и инкубировали 370С при 5% CO<sub>2</sub> в течение 3 часов (для метаболизма МТТ и восстановления до формазана). Далее удаляли среду и сушили клетки, растворяли образовавшийся формазан в 200 мкл ДМСО и ставили на качалку при 950 об/мин на 5

минут. Снимали оптическую плотность при 560 нм, вычитание фона составило 670 нм. Количество извлеченного продукта измеряли фотометрически при длине волны 560 нм. Выживаемость клеток в группах опыта рассчитывали по формуле:  $(\text{ОП экспериментальных лунок} - \text{ОП среды} / \text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$ , где ОП – оптическая плотность.

### Статистический анализ

Все данные, полученные в ходе исследования, были подвергнуты статистической обработке с использованием программы STATISTICA 10.0. Для расчета сравнения средних использовался t-критерий Стьюдента. Использование методов описательной статистики, средних значений и стандартного отклонения. Различия считали значимыми, если  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Чтобы сравнить влияние Skeep-11 на жизнеспособность клеток Clone M-3, мы трансфицировали олигонуклеотид в клетки, используя набор для трансфекции PEI 40K. В эксперименте участвовали 2 группы клеток, в каждой группе было по  $10^5$  клеток. Первую группу трансфицировали ASO Skeep-11 в концентрации 7000 нг/мкл, а ко второй группе клеток добавляли ASO Skeep-11 в той же концентрации в культуральную среду. В контрольной группе добавляли воду. Жизнеспособность клеток измеряли путем подсчета живых клеток на приборе Luna-II (Logos Biosystems, Южная Корея) (табл. 1).

Таблица 1.

Жизнеспособность клеток Clone M-3 с трансфекцией и без

Часы инкубации	Skeep-11 с трансфекцией	Skeep-11 без трансфекции	Контроль (вода)
12	48.09 ± 1.4%	51.02 ± 1.1%	98.08 ± 1.4%
16	34.12 ± 1.8%	36.04 ± 1.6%	92.06 ± 1.1%
24	26.08 ± 2.1%	30.01 ± 1.5%	99.01 ± 1.4%
36	23.01 ± 2%	22.07 ± 1.4%	96.08 ± 1.6%

Для изучения антисмыслового подавления экспрессии гена Г6ФД в клетках меланомы мышей, Skeen-11 вводили в культуральную среду в виде свободного олигонуклеотида в 2 различных концентрациях: 1000 нг/мкл, и 2000 нг/мкл в количестве 10 мкл на 10<sup>6</sup> клеток для каждой концентрации. Экспрессия значительно менялась с увеличением концентрации тиофосфатного олигонуклеотида, что позволяет предположить, что ингибирование было специфичным для последовательности. Концентрация мРНК Г6ФД была в 1,6±0,8 раза и в 3,5±1,2 раза ниже по сравнению с контрольной группой (p<0,05), в группах с 10 000 и 20 000 нг Skeen-11 соответственно. LC50 составляет от 10 000 до 20 000 нг.

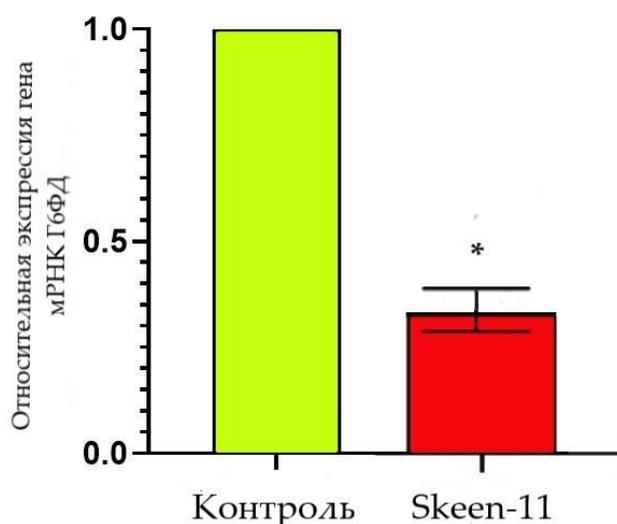
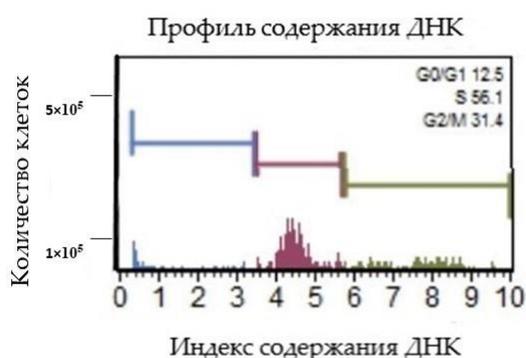


Рисунок 1. Skeen-11 ингибирует экспрессию гена Г6ФД в зависимости от концентрации в клеточной линии Clone M-3 в течение 12 часов после обработки Skeen-11 (красный): а – 10 000 нг, б – 15 000 нг, в – 20 000 нг. Представлены данные и стандартные ошибки концентрации мРНК для 6 повторов по сравнению с контрольной группой. Контрольные (зеленые) значения равны 1 (100%). \* — разница достоверна по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

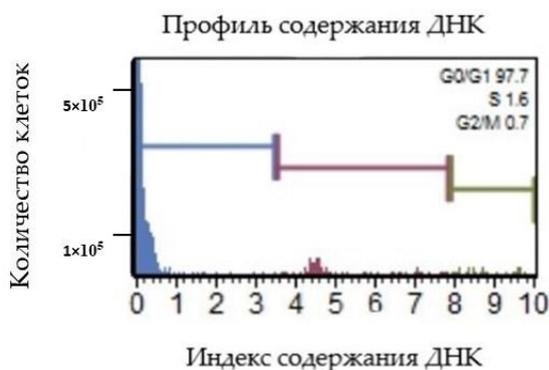
В эксперименте с дыхательной активностью клеток меланомы мы провели МТТ-анализ. При расчете процента дыхательной активности контрольную группу клеток (клетки без олигонуклеотида) принимали за 100%. При концентрации 2000 нг/мкл Skeen-11 дыхательная активность клеток составила 63%±1,6%, при концентрации 7000 нг/мкл дыхательная активность клеток составила 42,5%±2,1%. При этой концентрации клетки пересекают границу LC50. При концентрации 10 000 нг/мкл процент респираторной активности составил 16% ±1,2%, что ближе к летальному респираторному значению LC100. На практике такого результата не происходит, поскольку некоторая часть реагента

МТТ восстанавливается внеклеточными ферментами; поэтому за LC100 условно можно принять дыхательную активность менее 10%. Учитывая влияние Skeep-11 на фермент Г6ФД, играющий центральную роль в ПФП для образования клеточного НАДФН, оно значительно ниже в клетках Clone M-3 после воздействия Skeep-11, что доказывает, что АСО Skeep -11 Skeep-11 ингибирует комплекс НАДН-дегидрогеназа.

В наших предыдущих исследованиях [15] мы оценивали апоптоз с использованием реагентов Muse™ Annexin V и мертвых клеток на проточном цитометре Guava Muse (Luminex). Мы показали, что после обработки Skeep-11 индуцировал апоптотические процессы в  $93,9\% \pm 0,33$  клетках, тогда как в контроле апоптотические процессы имели  $9,2\% \pm 0,56$  клеток. Часть клеток ( $5 \times 10^5$ ), после тестирования на апоптоз, был выбран для анализа клеточного цикла. Было показано, что Skeep-11 ингибирует прогрессирование клеточного цикла. Наши данные показали, что обработка клеток Skeep-11 значительно уменьшала долю клеток в фазах S и G2/M и увеличивала долю клеток в фазе G0/G1. Skeep-11 индуцирует остановку клеточного цикла в клетках клона M-3. Чтобы определить, связано ли влияние Skeep-11 на ингибирование пролиферации клеток клона M-3 с остановкой клеточного цикла, количество клеток в фазах G0/G1, S и G2/M оценивали с помощью проточной цитометрии. Лечение Skeep-11 действительно ингибировало прогрессирование клеточного цикла в клетках меланомы мыши Clone M-3. Как показано на фигуре, процент клеток, обработанных Skeep-11, находился в фазе G0/G1 и был значительно увеличен на 97,7% по сравнению с необработанным контролем. Кроме того, Skeep-11 ( $p > 0,05$ ) снижал процент клеток в S-фазе на  $1,6\% \pm 0,96$  и G2/M на  $0,07\% \pm 0,01$  по сравнению с необработанной контрольной группой. Эти результаты согласуются с результатами апоптотического анализа (рис. 2 а,б).



а



б

Рисунок 2. Клеточный цикл культуры клеток Clone-M3 после воздействия Skeep-11: а – контроль; б - Skeep -11.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данного исследования показывают перспективность использования АСО Skeep-11 для инициации апоптотических процессов в клетках меланомы. Полученные данные по сравнению проникновения этого олигонуклеотида в клетки с трансфекцией и без нее не показали существенной разницы. Было показано, что Skeep-11 ингибирует прогрессирование клеточного цикла. Кроме того, Skeep -11 значительно снизил процент клеток в S-фазе. Блокирование гена G6PD с помощью природной молекулы полидатына вызывало блокировку 50% клеток в S-фазе и около 50% апоптоза. Таким образом, тиофосфатный АСО Skeep -11 показывает перспективность для лечения меланомы кожи и согласуется с результатами других ученых.

## ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о выраженном антипролиферативном действии АСО Skeep-11, который блокирует экспрессию целевого гена G6PD в  $1,6 \pm 0,8$  раза при концентрации 10 000 нг/мкл и в  $3,5 \pm 1,2$  раза при концентрации 20 000 нг/мкл. Показано, что АСО Skeep -11 ингибирует комплекс НАДН-дегидрогеназа и снижает его активность на 62,5, 43 и 16% в концентрациях 2000 нг/мкл, 7000 нг/мкл и 10000 нг/мкл соответственно по сравнению с контролем (100% дыхательной активности). Также

апоптотические процессы связаны с блокировкой клеточного цикла в S-фазе, в которой происходит репликация ДНК.

Это исследование предполагает, что ASO Skeen-11 обладает многообещающей цитотоксической активностью против клеток меланомы. В целом цитотоксический эффект осуществляется за счет индукции апоптоза и зависит от дозы. Skeen-11 участвует не только в регуляции экспрессии гена Г6ФД, но также ингибирует комплекс НАДН-дегидрогеназа и оказывает выраженный антипролиферативный эффект.