

3D-клеточная модель (3D-сфероид) является более репрезентативной тест-системой для проверки эффектов микроРНК

Abanoub Shaker 1,2,3, Dmitry Lifanov¹, Evgeniya Shabalina¹, Dulamsuren Zorigt¹, Igor Reshetov⁴, Pavel Karalkin⁵, Elena Petersen¹,@*

1 Institute of Future Biophysics, Institutskiy per., 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701, Russian Federation

2 School of biotechnology, Badr University, Cairo 11829, Egypt

3 Biotechnology program, Faculty of Science, Helwan University, Cairo 11795, Egypt

4 I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), ul. Trubetskaya, 8–2, Moscow, 119991, Russian Federation

5 P. A. Herzen Moscow Research Institute of Oncology, 2 Botkinskiy proezd, 3, Moscow, 125284, Russian Federation

Shaker Abanoub Ashraf Saleh - BD, Biologist, School of biotechnology, Badr University, Cairo 11829, Egypt. E-mail: Shaker.a@phystech.edu ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3025-6504>

Lifanov Dmitry Alekseevich - BD, Biologist, Moscow Institute of Physics and Technology. Address: 9 Institute Lane, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia, 141701. E-mail: lifanov.da@mipt.ru ORCID: -

Shabalina Evgeniya Yurievna – MD, Biologist, Moscow Institute of Physics and Technology. Address: 9 Institute Lane, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia, 141701. E-mail: evgenyashb@mail.ru ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8184-7363>

Dulamsuren Zorigt - MD, Biologist, Moscow Institute of Physics and Technology. Address: 9 Institute Lane, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia, 141701. E-mail: zorigt.d@mipt.ru ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8133-689X>

Reshetov Igor Vladimirovich – D.S., Oncologist, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University. Address: 119991, Moscow, Russia, 8 Trubetskaya St., bld. 2. E-mail: reshetoviv@mail.ru ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3888-8004>

Karalkin Pavel Anatolievich - CSc., Biochemist, Moscow Institute of Physics and Technology. Address: 9 Institute Lane, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia, 141701. E-mail: pkaralkin@gmail.com ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2838-0776>

Petersen Elena Vladimirovna - CSc., Biologist, Moscow Institute of Physics and Technology. Address: 9 Institute Lane, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia, 141701. E-mail: Petersen.ev@mipt.ru ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8150-7553>

РЕЗЮМЕ

Экспрессия маркером эпителиально-мезенхимального перехода (ЕМТ) в аденокарцином немелкоклеточного рака легкого человека является приоритетной областью исследований,

т.к. на данный момент уже установлена корреляция между уровнем экспрессии виментина, Е-кадгерина и иных маркеров с тяжестью текущего заболевания. Приведенные выше данные позволяют рассматривать аденокарциному как приоритетный объект исследования, особенно в контексте ее моделирования на 3D-культурах клеток. Также современные исследования показали, что микроРНК (миРНК) являются важными регуляторами экспрессии генов и участвуют в различных биологических процессах, включая развитие и прогрессирование рака. В этом исследовании мы сравнили уровни экспрессии миРНК и маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) Е-кадгерина, виментина и SNAIL, в 2D и 3D клеточной культурах линии немелкоклеточного рака легкого H1299 до и после трансфекции. В качестве целевой микроРНК для трансфекции была выбрана микроРНК-4443, поскольку данная молекула выступает в качестве супрессора опухоли, предотвращая рост, инвазию и миграцию опухолей при папиллярном раке щитовидной железы, глиобластоме и колоректальном раке. Объединив 3D-культуры клеток и исследование функций микроРНК в одном эксперименте, мы разработали систему 3D-клеточных моделей для адаптации и проверки эффектов различных миРНК. Наши результаты показывают, что 3D-модель клеточной культуры обеспечивает более точное и приближённое микроокружение к условиям *in vivo* по сравнению с 2D-моделью, поскольку она демонстрирует повышение уровня Е-кадгерина и снижение уровня виментина после трансфекции, что коррелирует с клиническими данными, когда на 2D-клеточных моделях были получены неоднозначные результаты. Это даёт повод сделать предположение о потенциальной роли миРНК-22, миРНК-4443 и миРНК-126 в регуляции EMT в клеточной линии H1299. Эти результаты позволяют предположить, что 3D-культуры являются более подходящей и репрезентативной моделью для изучения изменений транскриптомного профиля как вследствие, так и независимо от проверки эффектов микроРНК.

Ключевые слова: микроРНК, эпителиально-мезенхимальный переход, сфероиды, миРНК-4443, миРНК-126, миРНК-22, рак лёгкого.

1. Введение

Рак – сложное и тяжёлое заболевание, которым страдают миллионы людей во всем мире. Среди различных видов рака, рак легких (РЛ) является одной из

наиболее распространенных и смертоносных форм. РЛ является широко распространенной формой рака во всем мире: ежегодно диагностируется более чем у 1,5 миллионов человек [1, 2]. Он является причиной значительного числа смертей, связанных с раком: Всемирная организация здравоохранения сообщила о почти 10 миллионах смертей, связанных с раком, во всем мире в 2020 году (ВОЗ, 2020). Примечательно, что наиболее распространенной причиной смертности от рака в 2020 году был рак легких, на который пришлось 1,8 миллиона смертей [3]. К сожалению, симптомы рака легких часто не проявляются до более поздних стадий, в результате чего примерно 70% случаев диагностируются лишь на поздних стадиях [4]. Эта задержка в выявлении приводит к менее благоприятному прогнозу и пятилетней выживаемости менее 15%. Таким образом, рак легких остается серьезной проблемой общественного здравоохранения, и для улучшения результатов лечения пациентов срочно необходимы новые стратегии раннего выявления и лечения. Рак легких стал одной из наиболее часто диагностируемых форм рака, по причине которой умирают ежегодно около 1,3 миллионов человек. Существует две основные категории рака легких: немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) и мелкоклеточный рак легких (МРЛ), на которые приходится около 85% и 15% случаев соответственно. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) можно разделить на три гистологических подтипа: аденокарцинома (Ad, составляет примерно 50–70% случаев), плоскоклеточный рак (SqCC, около 20–30%) и крупноклеточный рак (LCC, который составляет менее 5% случаев) [5]. Как показано в [63], при оценке экспрессии виментина и Е-кадгерина у пациентов с диагнозом НМРЛ разных типов - Ad обнаруживалась у 52,6% пациентов, что делает её первоочередной мишенью для исследований. Также стоит отметить, что в исследовании [63] была обнаружена корреляция между низкой экспрессией Е-кадгерина и некрозом опухоли ($p = 0,019$). Также наблюдалась тенденция к положительной корреляции между высокой экспрессией Е-кадгерина и общей выживаемостью пациентов, при этом результаты оценки экспрессии

виментина показали значительную отрицательную корреляцию между экспрессией виментина и опухолями I степени (G1). Наконец, существовала значительная отрицательная корреляция между экспрессией виментина и выживаемостью. Приведенные выше данные позволяют рассматривать аденокарциному как приоритетный объект исследования, особенно в контексте ее моделирования на 3D-культурах клеток и оценки уровня экспрессии маркеров ЕМТ, которые также выступают в качестве прогностических маркеров в клинике.

Эпителиально-мезенхимальный переход (Epithelial-mesenchymal transition - ЕМТ, ЭМП) — биологический процесс, характеризующийся утратой эпителиальных характеристик и приобретением клетками мезенхимальных свойств. Этот переход включает потерю межклеточных соединений, апикально-базальную полярность и изменение формы клеток. ЕМТ регулируется различными факторами, включая клеточный сигналинг, контроль транскрипции, эпигенетическую модификацию и посттрансляционные модификации белков. Сигналы из окружающей среды, такие как трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), семейство факторов роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF) и фактор роста гепатоцитов (HGF), могут запускать или усиливать процесс ЕМТ [6-8]. Элизабет Хэй впервые предложила концепцию ЕМТ в 1968 году как эпителиально-мезенхимальную трансформацию для описания значительных изменений в поведении клеток во время эмбрионального развития [9]. Позже этот термин был изменен на ЕМТ, чтобы отличить его от неопластической трансформации [2, 10].

ЕМТ и противоположный ему процесс, мезенхимально-эпителиальный переход (МЕТ), играют фундаментальную роль в широком спектре физиологических и патологических процессов. При развитии многоклеточных организмов клетки могут подвергаться множественным циклам ЕМТ и МЕТ, что наблюдается при формировании сомитов и сердца.

EMT также участвует в заживлении ран у взрослых [11; 12]. EMT — сложное и многогранное явление, регулируемое различными факторами на разных уровнях. Сигналы, индуцирующие EMT, активируют специфические транскрипционные факторы, называемые EMT-TF, такие как SNAIL, которые взаимодействуют с микроРНК, эпигенетическими модификаторами и посттрансляционными регуляторами для контроля EMT [13]. EMT играет важную роль в прогрессировании рака, особенно при инвазии и метастазировании, обычно наблюдаемых при различных типах солидных опухолей. Он способствует развитию инвазивного потенциала опухолевых клеток, что приводит к образованию мезенхимальных мигрирующих клеток с нарушенными межклеточными контактами и измененной апико-базолатеральной полярностью. Кроме того, EMT запускает активацию антиапоптотических сигналов, способствуя повышению онкогенности и снижению эффективности лечения [14-17]. Лиганды трансформирующего фактора роста- β (TGFB1) или рецепторной тирозинкиназы (RTK) являются известными индукторами EMT, которые активируют несколько сигнальных сетей, включая фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK), члена семейства гомологов Ras A (RhoA) и SRC, что приводит к изменениям в экспрессии генов. Эти изменения приводят к усилению регуляции различных репрессоров транскрипции, таких как SNAIL (SNAI1), SLUG (SNAI2), ZEB1, ZEB2, гомолог фактора транскрипции твиста дрозофилы (TWIST) и E47. Эти репрессоры транскрипции связываются с элементами E-box в регуляторных областях генов ответа, включая промотор гена CHD1, кодирующий E-кадгерин. Медиаторы EMT привлекают деацетилазы гистонов (HDAC) и другие корепрессоры для облегчения конденсации хроматина и репрессии транскрипции CHD1. E-кадгерин также может расщепляться металлопротеазами, что приводит к его истощению [18-20].

Процесс ангиогенеза, который включает рост новых кровеносных сосудов, регулируется специфическими сигнальными факторами в организме.

Химические сигналы координируют деятельность гладкомышечных клеток и эндотелиальных клеток по восстановлению поврежденных кровеносных сосудов и расширению сосудистой системы. Ангиогенез состоит из множества этапов, включая секрецию протеаз, миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, образование сосудистых трубочек, анастомоз вновь образованных трубок, синтез новой базальной мембраны и интеграцию перицитов и гладкомышечных клеток. Протеолитические ферменты секретируются при активации эндотелиальных клеток ангиогенными стимулами, что приводит к разрушению окружающего внеклеточного матрикса и базальной мембраны. Это позволяет эндотелиальным клеткам расти, мигрировать и образовывать первичные ростки. Последующее увеличение полостей этих отростков приводит к образованию капиллярных петель. Процесс продолжается синтезом новой базальной мембраны, и кровеносные сосуды созревают в трубчатые структуры, обеспечивающие кровоток. Физиологический ангиогенез необходим для эмбрионального развития, заживления ран и формирования коллатеральных сосудов для улучшения перфузии органов [21, 22].

Поддержание необходимого уровня кислорода имеет решающее значение для регулирования ангиогенеза в здоровых клетках. Механизмы реакции на уровень кислорода, включая кислородчувствительные НАДФН-оксидазы, эндотелиальную синтазу оксида азота и гем-оксигеназы, присутствуют в эндотелиальных клетках и гладкомышечных клетках [23]. Индуцируемые гипоксией транскрипционные факторы (HIF), особенно изоформы HIF α , взаимодействуют с «сенсорами» уровня кислорода в сосудистых клетках и регулируют экспрессию генов, участвующих в выживании клеток, метаболизме и ангиогенезе [24]. В росте опухоли и локальном росте решающую роль играют кровеносные сосуды, поставляющие кислород и питательные вещества. Кровеносные сосуды транспортируют кислород, необходимый как для роста здоровых, так и для раковых клеток. Эндотелиальные клетки, участвующие в формировании кровеносных

сосудов, становятся активными во время роста рака благодаря высвобождению различных белков, включая EGF, эстроген, FGF, IL-8, простагландины, TNF- α и VEGF. VEGF и bFGF особенно важны для опухолевого ангиогенеза, но этому процессу способствуют и другие проангиогенные факторы [25]. Фармакологические ингибиторы, нацеленные на одиночные ангиогенные факторы, имеют ограниченную эффективность в онкологии из-за огромного множества других проангиогенных факторов, на которые одиночные вещества не могут никак повлиять [25]. Исследования *in vitro* показали, что потребление кислорода необходимо для образования ростков, тогда как исследования *in vivo* продемонстрировали необходимость кислорода для развития функциональной сосудистой сети [24].

На ранних этапах исследования ДНК человека считалось, что только 3% генов кодируют белки, а остальные 97% считались «мусорной» ДНК [26]. Однако со временем мы фундаментально изменили свое понимание человеческого транскриптома. Поскольку до 75% генома человека транслируется в РНК, по данным проекта Энциклопедии элементов ДНК (ENCODE), некодирующие РНК (нкРНК) составляют большую часть транскриптома человека [27, 28]. В 1950-х годах были обнаружены рибосомальная РНК (рРНК) и транспортная РНК (тРНК), две из самых ранних нкРНК. С тех пор было открыто множество нкРНК, причем микроРНК (миРНК) являются наиболее тщательно изученным классом коротких нкРНК [29, 30]. Первая микроРНК, названная *lin-4*, была первоначально описана у прозрачной нематоды *Caenorhabditis elegans* и описана как малая РНК с антисмысловой комплементарностью транскрипту мРНК гена *lin-14* [31]. В настоящее время нам известно более 2500 микроРНК человека. Сейчас очевидно, что контроль и разрушение микроРНК играют роль почти во всех клеточных процессах, независимо от того, являются ли они безвредными или раковыми. Это связано с тем, что микроРНК участвуют в широком спектре внутриклеточных процессов [32-37].

МикроРНК (миРНК) представляют собой небольшие некодирующие молекулы РНК, которые играют решающую роль в посттранскрипционной регуляции генов. Зрелая микроРНК обычно имеет длину 22 нуклеотида и генерируется посредством серии стадий обработки с участием ферментов РНКазы III Drosha и Dicer. После обработки полностью развитая микроРНК может действовать как проводник при комплементарном спаривании оснований с 3'-нетранслируемой областью (3'UTR) молекул-мишеней мРНК. Комплекс микроРНК и целевой мРНК затем связывается с белками Argonaute (AGO), что может привести либо к репрессии трансляции, деаденилированию мРНК, либо к деградации мРНК.

Регуляция экспрессии генов с помощью микроРНК является важным биологическим процессом, который играет решающую роль в развитии, дифференцировке клеток и патогенезе некоторых заболеваний. Нарушение регуляции экспрессии или функции микроРНК связано с такими болезнями человека как рак, сердечно-сосудистые заболевания и неврологические расстройства. Поэтому понимание механизмов, лежащих в основе регуляции генов, опосредованной микроРНК, представляет значительный интерес для исследователей в различных областях, включая биомедицину, молекулярную биологию и генетику [38].

Сложность патогенеза рака очевидна в его развитии и поведении. В 2000 году Ханахан и его коллеги представили подробное описание шести отличительных особенностей рака, которые включали способность поддерживать пролиферативную передачу сигналов, избегать супрессоров роста, активировать инвазию и метастазирование, обеспечивать репликативное бессмертие, индуцировать ангиогенез и сопротивляться гибели клеток. Более десяти лет спустя Ханахан и его команда расширили первоначальные шесть признаков до восьми, включив в них предотвращение разрушения иммунитета и нарушение регуляции клеточной энергетики. Более того, Ханахан и др. рассматривал нестабильность генома и мутации

как две характеристики опухолей, способствующие воспалению. Они также подчеркнули значимость взаимодействия между генетическими предпосылками и эпигенетическими изменениями в каждом процессе биологии рака [39].

МикроРНК-126 (миРНК-126, MiR-126), также называемая miP-126-3p, представляет собой тип микроРНК, обнаруживаемый в эндотелиальных клетках, находящихся в интроне 7 генов EGFL7, расположенных на хромосоме 9 человека [40]. Ткани с высокой васкуляризацией, такие как сердце, легкие, печень и эндотелиальные клетки пупочной вены человека, демонстрируют высокие уровни miP-126, которая играет решающую роль в ангиогенезе и поддержании целостности сосудов [41]. Предыдущие исследования показали, что миРНК-126 подавляет активацию PI3K [42] и АКТ в злокачественной глиоме, которая регулируется путем PTEN/PI3K/АКТ, который управляет различными биологическими процессами, такими как пролиферация клеток, метаболизм, апоптоз и рост клеток.[43] , 44] Более того, недавние исследования показали, что миРНК-126 имеет тесную связь с раком и его прогнозом, особенно при раке легких, поскольку ее уровень снижается в раковых клетках по сравнению с соседними нормальными тканями. Исследователи использовали количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени (qRT-PCR) для анализа экспрессии миРНК-126 между раковыми клетками и соседними нормальными тканями *in vivo* [45]. Из-за недостаточности знаний о прямом влиянии миРНК-126 на клеточный метаболизм и EMT мы не можем предсказать прямой эффект. Как было обнаружено в [64], в SPC-A1 miP-126 влияет на путь PI3K/АКТ/Snail и приводит к повышению экспрессии Е-кадгерина и снижению экспрессии виментина. Влияние на экспрессию Е-кадгерина для клеточной линии H1299 предполагается в текущем исследовании. Тем не менее, мы считаем исследование экспрессии этой микроРНК интересной научной задачей и даем дальнейшее представление о

ее потенциале в качестве терапевтической мишени, особенно после обнаружения снижения влияния миРНК-126 на метастазирование опухоли.

МикроРНК-22-3р (миРНК-22, MiR-22) представляет собой ген, который был впервые обнаружен в клетках HeLa и расположен на хромосоме 17p13.19. Этот ген сохранялся на протяжении всей эволюции и, как известно, играет важную роль в биологии рака [46]. Исследования показали, что миРНК-22 может воздействовать на несколько онкогенов, включая *CRTC1*, *FLT3* и *MYCBP*, что ингибирует пути CREB и MYC и имеет значение для лечения острого миелолейкоза [47]. Недавние исследования также показали, что миРНК-22 может играть решающую роль в ингибировании метастазирования рака прямой кишки и желудка. Это достигается путем прямого воздействия на металлопротеиназу матрикса 14 и *SNAIL*, которая значительно ингибирует процесс EMT и отдаленные метастазы рака [48]. Однако появились противоречивые сообщения относительно роли миРНК-22 в стимулировании пролиферации, миграции и инвазии в клетках рака простаты и молочной железы. Эти результаты подчеркивают сложную и разнообразную роль миРНК-22 при различных видах рака и необходимость дальнейших исследований для полного понимания механизмов ее действия [49, 50]. Снижение уровня миРНК-22 оказывает значительное влияние на стимулирование процесса EMT и инвазии в клетки рака легких за счет повышения уровня *SNAIL*. С другой стороны, когда миРНК-22 сверхэкспрессируется, она препятствует процессу EMT и инвазии в клетки рака легких путем нацеливания и ингибирования *SNAIL* [51]. Это позволяет нам предположить, что клеточная линия H1299 может испытывать тот же эффект и снижение экспрессии *SNAIL*, вызванное повышением регуляции миРНК-22. По причинам, описанным выше, мы считаем микроРНК-22 целевой, поскольку эта молекула непосредственно участвует в процессах EMT, поскольку установлена связь между экспрессией миРНК-22 и маркерами EMT.

МикроРНК-4443 (MiR-4443), расположенная на хромосоме 3p21.31, представляет собой недавно открытую микроРНК, которая играет важную роль в регуляции онкогенеза и метастазирования [52, 53]. Однако уровни экспрессии и регуляторные механизмы миРНК-4443 различаются в разных типах опухолей. Хотя его уровень повышается при раке молочной железы, его уровень снижается при папиллярном раке щитовидной железы и раке яичников. Считается также, что миРНК-4443 действует как супрессор опухоли, предотвращая рост, инвазию и миграцию опухолей, как это наблюдается при папиллярном раке щитовидной железы, глиобластоме и колоректальном раке [54, 55]. Для дальнейшего изучения роли миРНК-4443 при раке легких мы разработали 3D-модель с использованием клеток H1299 для анализа уровня ее экспрессии и ее влияния на маркеры эпителиально-мезенхимального перехода (EMT).

На протяжении многих десятилетий клеточные тесты и модели широко использовались при разработке лекарств. В прошлом единственным выбором для клеточного скрининга были двумерные (2D) монослойные культуры, которые культивировали на различных плоских подложках. Было продемонстрировано, что они являются подходящим и эффективным методом обнаружения потенциальных кандидатов на лекарства. В настоящее время 2D-модели клеток остаются актуальными, поскольку они могут эффективно прогнозировать реакцию лекарств *in vivo* на различные мишени и пути. Ведь очевидно, что эти 2D-культуры обладают определенными недостатками, связанными с отсутствием тканеспецифичной архитектуры, механических и биохимических сигналов и взаимодействий между клетками и матриксом [56, 57]. Из-за своих ограничений традиционные модели не могут обеспечить точные прогнозы реакции на лекарства при некоторых заболеваниях, таких как рак, что затрудняет разработку эффективных методов лечения.

За последнее десятилетие произошло значительное увеличение использования 3D-культур клеток на ранних стадиях открытия лекарств. Это связано, прежде всего, с необходимостью повышения эффективности фармацевтических исследований и разработок [58-60]. Включая трехмерные клеточные культуры и используя превосходные клеточные модели, такие как стволовые клетки и первичные клетки, можно добиться большей точности в прогнозировании эффективности и потенциальной токсичности лекарств на людях до того, как они вступят в клинические испытания. В результате количество неудачных разработок лекарств может уменьшиться. 3D-культуры клеток и модели совместного культивирования обладают рядом преимуществ, например, позволяют проводить оценку эффективности и безопасности лекарств в среде, которая лучше имитирует условия *in vivo*, чем традиционные 2D-культуры клеток. Кроме того, эти модели устраняют видовые различия, которые часто затрудняют интерпретацию доклинических результатов при использовании моделей на животных, что позволяет проводить испытания лекарств непосредственно на людях [61, 62].

Поскольку в настоящее время известно, что 3D-клеточные модели нормализуют тканеспецифичный профиль транскриптома клеток внутри них по сравнению с 2D-клеточной моделью, для целей данного исследования мы хотели оценить изменения в профиле транскриптома на уровне микроРНК. Также одной из наших целей было установить первоначальные приблизительные ассоциации в профиле экспрессии маркеров ЕМТ клеток H1299 в ответ на изменения профиля экспрессии микроРНК.

Таким образом, объединяя 3D-модели клеток и микроРНК в одном исследовании, мы разрабатываем систему 3D-моделей клеток для адаптации и проверки эффектов различных микроРНК, поскольку большинство микроРНК были изолированы *in vivo*, проанализированы и включены в базы данных. Также стоит добавить, что микроРНК являются многоцелевыми молекулами. При этом они могут служить маркерами как текущих процессов

в клетке, так и ответов клеток на развитие патологического процесса. Таким образом, учитывая вышеизложенное, становится возможным построить первичные ассоциации между патологией и маркером с прямой зависимостью.

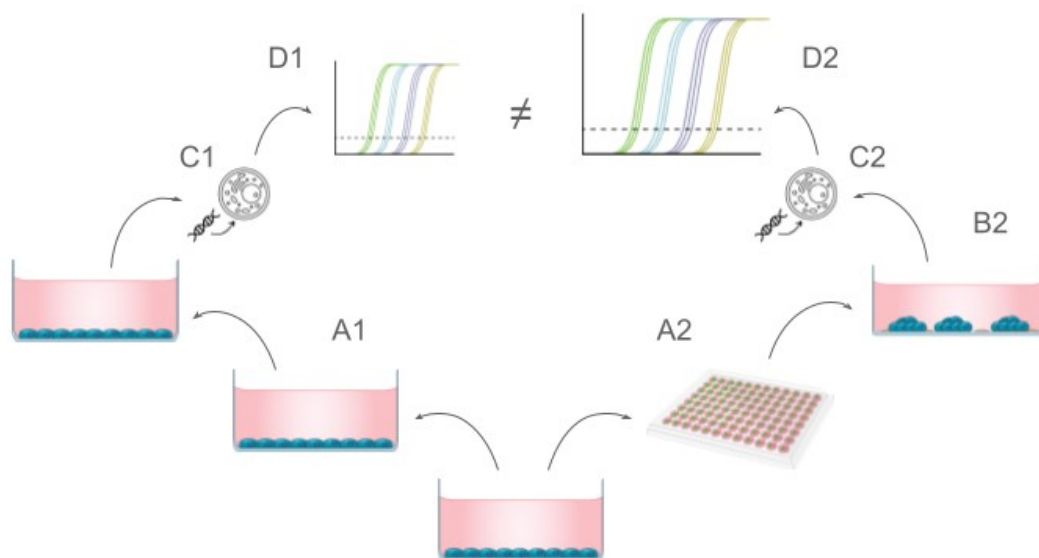


Рисунок 1. Графическая аннотация.

На рисунке 1 представлена графическая аннотация текущей работы. Клетки немелкоклеточного рака легкого H1299 культивировали в виде 2D-монослоя (рис. 1, A1) и 3D-клеточных сфероидов (рис. 1, A2). 3D-сфероиды были высеяны на пластик (B2). Далее микроРНК-4443 вводили в клетки путем трансфекции (рис. 1, C1); в случае 3D-сфероидов процедура проводилась в течение 24 часов после высадки (рис. 1, C2). РНК, выделенную из клеток, оценивали с помощью ПЦР-РВ для оценки экспрессии маркеров ЭМТ (рис. 1, D1-2). В конце эксперимента удалось сделать вывод, что уровень экспрессии клеток различен в 2D и 3D моделях клеток.

2. Результаты

2.1. Экспрессия генов в 3D и 2D моделях в клеточной линии H1299.

Прежде всего, необходимо проанализировать экспрессию нацеливающих молекул в исследуемых моделях клеток, чтобы получить практическую основу, описывающую состояние клеток до трансфекции и принципиально характеризующую 3D-модель клетки. На рисунке 2 показаны уровни экспрессии маркеров ЕМТ в 2D- и 3D-клеточных моделях на основе клеточной линии H1299.

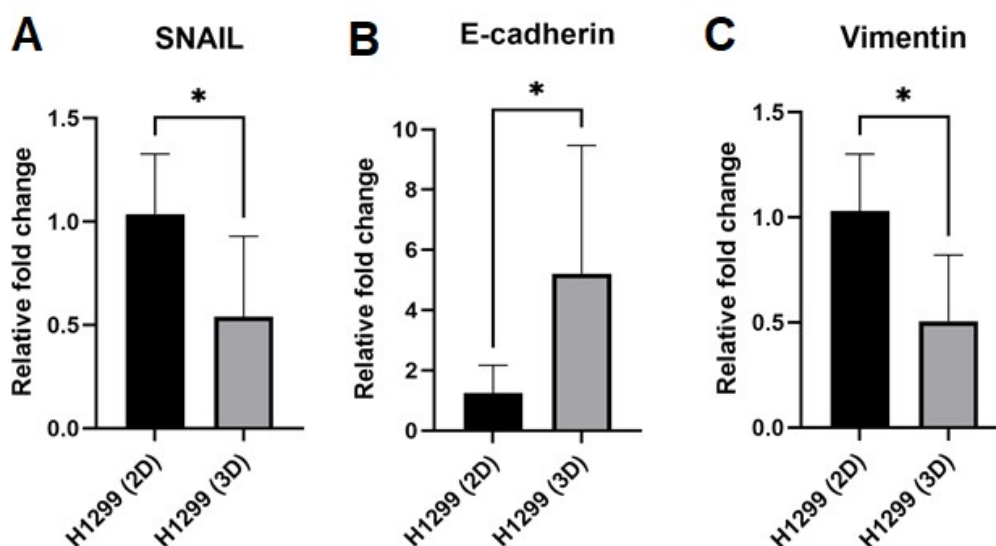


Рисунок 2. Уровни маркеров ЕМТ в клеточной линии H1299, выращенной в 2D-монослоях и 3D сфероидных культурах клеток: (а) SNAIL; (б) Е-кадгерин; (в) Виментин. Значения со значением $p < 0,5$ отмечены *.

2.2. Экспрессия генов микроРНК и маркеров ЕМТ.

Также было проведено сравнение уровней экспрессии микроРНК после трансфекции и до трансфекции как в 3D, так и в 2D модели. Мы сравнили уровни экспрессии микроРНК в 2D-культуре клеток и 3D-сфероидной модели клеточной линии H1299 до и после трансфекции. Результаты можно увидеть на рисунке 3.

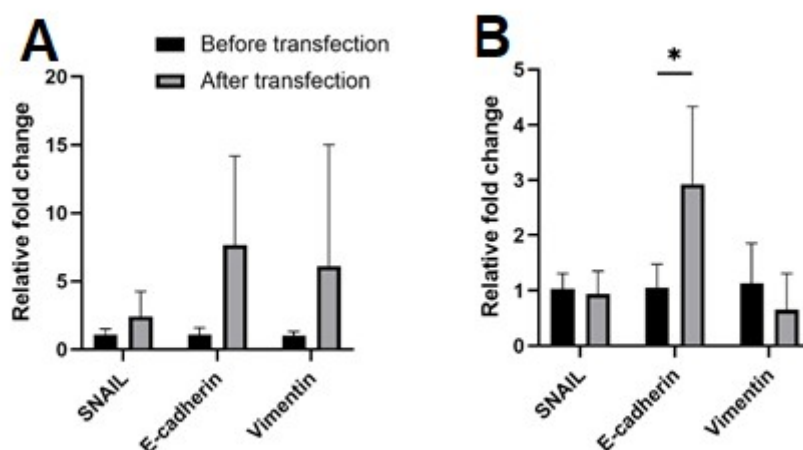


Рисунок 3. Уровни экспрессии маркеров ЕМТ в (а) 2D-монослоях; (б) – 3D-сфероиды до и после трансфекции. Значения со значением $p < 0,5$ отмечены *.

3. Обсуждение результатов

Как можно видеть на рисунке 2С, экспрессия виментина снижается в клетках, культивируемых в 3D-состоянии, тогда как экспрессия Е-кадгерина (рис. 2В) повышается. Поскольку виментин является маркером мезенхимальных клеток, а Е-кадгерин является маркером культур эпителиальных клеток, эти результаты показывают обратный процесс ЕМТ-МЕТ, происходящий в клетках. Клеточная линия Н1299, имеющая паспортизированную эпителиальную природу, усиливает эти характеристики и соответствующее поведение в трехмерной клеточной модели, что, в свою очередь, делает трехмерную клеточную модель более репрезентативной для тканеспецифического клеточного поведения. Также на рисунке 2А можно наблюдать уровень экспрессии SNAIL, который тесно связан с процессами миграции клеток. Как можно видеть, уровень экспрессии SNAIL ниже в 3D-сфероиде, чем в 2D, что, в свою очередь, может быть связано с размерностью культивируемого измерения. Однако для повышения надежности наших результатов мы рекомендуем увеличить количество повторов и повторить эксперименты с другими клеточными линиями.

Наши результаты выявили расширение экспрессии рассматриваемых маркеров ЕМТ в 2D-клеточной модели в разной степени. Значительно увеличилась экспрессия Е-кадгерина, что, как и в условиях до трансфекции, указывает на продолжающийся процесс МЕТ в клетках; однако нет оснований утверждать это однозначно, поскольку также зафиксировано повышение уровня экспрессии виментина – маркера, характерного для мезенхимальных клеток. Эти данные позволяют предположить, что микроРНК-22, микроРНК-4443 и микроРНК-126 потенциально играют роль в регуляции ЕМТ в данной конкретной модели 2D-клеточной культуры, однако, по мнению коллектива авторов, преждевременно говорить о прямой корреляции и влиянии определенных микроРНК на экспрессию маркеров ЕМТ. В заключение, наше исследование показывает, что изменения уровней экспрессии микроРНК после трансфекции связаны с изменениями экспрессии маркера ЕМТ в рамках 2D-модели клеточной культуры. Это указывает на то, что микроРНК-22, микроРНК-4443 и микроРНК-126 могут служить потенциальными мишенями для регуляции ЕМТ в этой модели. В этом исследовании мы исследовали влияние трансфекции на уровни экспрессии микроРНК и маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (ЕМТ) в клеточной линии H1299, выращенной в трехмерной модели клеточной культуры. Результаты представлены на рисунке 3В.

Примечательно, что после трансфекции мы также наблюдали сопутствующее снижение уровня маркеров ЕМТ, таких как SNAIL и виментин, и значительное повышение уровня Е-кадгерина (рис. 3В). Учитывая повышенную экспрессию микроРНК-126 и повышенную экспрессию Е-кадгерина, можно сделать предварительное предположение о взаимосвязи этих фактов, однако этот момент требует более детального исследования, так как вклад повышенной экспрессии микроРНК-22 окончательного изменения профиля экспрессии ЕМТ в данном исследовании не установлено. Также стоит отметить, что только в 3D-клеточной модели, когда экспрессия miR-22 была повышена, наблюдалось снижение экспрессии SNAIL, хотя и

незначительное по сравнению с Е-кадгерином и виментином. В 2D-модели такого ожидаемого соответствия не наблюдалось. Поскольку транскрипционный профиль обеих микроРНК (как miR-126, так и miR-22) изменился в результате трансфекции, делать однозначные корреляции преждевременно. Однако это, в свою очередь, также может доказывать более высокую репрезентативность 3D-клеточной модели как дающей более точный тканеспецифичный ответ, поскольку для 2D-модели были зафиксированы неоднозначные результаты из-за повышенного уровня экспрессии виментина. Однако для повышения надежности наших результатов мы рекомендуем увеличить количество повторов и повторить эксперименты с другими клеточными линиями. В контексте разговора об уровнях экспрессии микроРНК после трансфекции стоит напомнить, что в 2D-модели наблюдалось снижение экспрессии микроРНК-126, в отличие от 3D-модели клеток. Таким образом, мы можем наблюдать различный ответ клеток на трансфекцию онкологического супрессора микроРНК-4443, что еще раз демонстрирует большую репрезентативность 3D-модели клеток и необходимость рассматривать 3D-клеточные конструкции в качестве приоритетного объекта исследований *in vitro*. Это предполагает потенциальную роль микроРНК-22, микроРНК-4443 и микроРНК-126 в регуляции ЕМТ в клеточной линии H1299.

4. Материалы и методы

Все эксперименты требовавшие работы с клеточными культурами проводились в асептических условиях.

4.1 2D-культуры

Линию клеток H1299 культивировали в среде DMEM/F12, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), 2 mM L-глутамина и пенициллин-стрептомицина. Культуральную среду заменяли каждые 2-3 дня или при необходимости.

4.2 Подготовка агарозных форм для получения сфероидов

Формы с 2% агарозой были подготовлены с помощью силиконового шаблона MicroTissues 3D Petri Dish (на 35 больших сфероидов). После застывания агарозы и перенесения формы в чашки Петри туда добавляли среду для культивирования клеток и инкубировали не менее 30 минут перед добавлением клеток.

4.3 3D-культуры

Для получения 3D-сфероидов из клеточной линии H1299, клетки добавляли в подготовленные агарозные формы пропитанные питательной средой - из расчета по 2000 клеток на сфероид. Инкубация проводилась при 37°C, 5% CO₂, 3-4 дня. Среду меняли каждые 2 дня.

4.4 Выделение РНК

Для выделения РНК из клеточной линии H1299 в обоих случаях 2D- и 3D-культур использовали набор Biolabmix для РНК и микроРНК (LRU-100-50) согласно протоколу. Качество выделенной РНК проверяли спектрофотометрически (Nanodrop 2000C).

4.5 ОТ-ПЦР

Для проведения экспериментов использовали OneTube RT-PCR SYBR («Евроген», Москва, Россия) согласно протоколу. Последовательности праймеров перечислены в таблицах 1 и 2. В качестве внутреннего стандарта использовали малую ядерную РНК U6 и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (ГАФД). Количественные ПЦР проводили следующим образом: обратную транскрипцию проводили при 52°C в течение 15 минут с последующей активацией полимеразы при 95°C в течение 1 минуты. Затем проводили денатурацию при 95°C в течение 0,15 с, отжиг при 62°C в течение 20 с, элонгацию и измерение флуоресценции при 72°C в течение 1 мин, всего 45 циклов.

Определение порогового цикла (Ct) и расчёт уровня экспрессии генов проводился относительно уровня GAPDH методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. $2^{-\Delta\Delta Ct}$, как соотношение экспрессии целевого гена в опытной и контрольной группах. Расчёт производился по формуле: $\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ (целевой ген)} - Ct \text{ (референсный ген)}] \text{ экспериментальная группа} - [Ct \text{ (целевой ген)} - Ct \text{ (референсный ген)}] \text{ контрольная группа}$. Эксперимент проводился в трёх повторах

Таблица 2: Последовательности праймеров маркеров ЕМТ

Ген	Последовательность праймера
SNAIL	Forward: 5'-GACCACTATGCCGCGCTCTT-3'
	Reverse: 5'-TCGCTGTAGTTAGGCTTCCGATT-3'
Е-Кадгерин	Forward: 5'-GAGAACGCATTGCCACATACA-3'
	Reverse: 5'-ACCTTCCATGACAGACCCCTTAA-3'
Виментин	Forward: 5'-TGTCCAAATCGATGTGGATGTTTC-3'
	Reverse: 5'-TTGTACCATTCTTCTGCCTCCTG-3'
GAPDH (референсный ген)	Forward: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
	Reverse: 5'-GAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

4.6 Трансфекция микроРНК

Использовали имитатор онкологического супрессора Hsa-Mir-4443, меченный флуорофором. Последовательности микроРНК перечислены в таблице 3.

РНК-мимик	Последовательность
Has-miRNA-4443	5'-UUGGAGGCGUGGGUU-3'

Перед трансфекцией среду в культуре H1299 заменяли на бессывороточную DMEM/F12. Процесс трансфекции проводили с использованием реагента Lipofectamine 3000 в соответствии с инструкциями производителя. Разбавленные растворы добавляли к клеточным линиям и инкубировали в инкубаторе еще 6 часов. Затем в каждую лунку добавляли среду DMEM/F12, содержащую FBS (с конечной концентрацией FBS 15%), и клетки инкубировали в тех же условиях.

4.7 Статистический анализ

В этом исследовании каждая точка данных выражалась как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Статистическую значимость между двумя группами определяли с использованием как ANOVA, так и непарного двустороннего t-критерия Стьюдента. ANOVA специально использовался для сравнения уровней экспрессии до и после трансфекции, тогда как непарный t-критерий использовался для других сравнений. Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.5. Корреляционный анализ был проведен для изучения взаимосвязи между микроРНК и маркерами EMT с использованием программного обеспечения JASP. Значение p менее 0,05 считалось статистически значимым.

5. Заключение

Известно, что в онкологических исследованиях разные специалисты выбирают в качестве основополагающих разные особенности опухоли. Для врачей определяющим признаком является степень дифференциации раковых клеток и злокачественность опухоли в целом, тогда как клеточных биологов часто интересуют тканевые источники клеток, например, эффективность стволовых клеток в качестве первичных раковых клеток, которые провоцируют развитие самой опухоли. Чтобы полностью интегрировать данные с разных точек зрения при рассмотрении текущих научных задач в онкологии, необходимо совершенствовать и развивать 3D-клеточные тест-системы как модели микротканей и потенциальный приоритет в области тканеспецифического клеточного ответа, получаемого *in vitro*.

Технический уровень исследований в области разработки индивидуализированных подходов к подбору терапии постоянно повышается. В настоящее время установлены однозначные корреляции между экспрессией маркеров ЕМТ и тяжестью прогрессирования рака и выживаемостью пациентов. Как указано в [63], повышенная экспрессия виментина коррелирует с более тяжелыми стадиями и неблагоприятным диагнозом, т.е. маркеры ЕМТ могут и уже могут выступать в качестве иммуногистохимических диагностических маркеров в онкологии.

В то же время уже показано, что микроРНК могут выступать регуляторами экспрессии генов в клетках. Таким образом, научившись контролировать профили экспрессии клеток с помощью микроРНК, можно будет добиться ингибирования злокачественного новообразования опухоли за счет приобретенного фенотипа мезенхимальных клеток посредством ЕМТ. Однако для достижения полного понимания происходящих процессов необходимо разработать клеточные тест-системы, способные вызывать более сходный тканеспецифичный ответ на *in vivo*. Примером таких моделей являются 3D-модели клеток. Как следствие, необходимо перестать

пренебрегать особенностями реакций метаболических путей в зависимости от размерности изучаемой модели и сосредоточиться на изучении влияния микроРНК на поведение клеток в 3D клеточных тест-системах.

В данном исследовании мы стремились разработать модельную систему для оценки профиля транскриптома и активности миграции клеток под влиянием системы доставки на основе микроРНК. Результаты дают новое представление о регуляции уровней экспрессии микроРНК в клетках НМРЛ и их влиянии на маркеры ЕМТ.

Повышающая регуляция микроРНК-22 и микроРНК-126 и понижающая регуляция микроРНК-4443 в модели 3D-культуры клеток по сравнению с моделью 2D-культуры клеток указывает на то, что 3D-микроокружение может играть роль в регуляции экспрессии этих микроРНК в клетке Н1299. линия. мы наблюдали изменения уровня экспрессии микроРНК после трансфекции, связанные с изменением уровня экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (ЕМТ). Кроме того, мы наблюдали изменения в уровнях экспрессии маркеров ЕМТ в ответ на генетические манипуляции с микроРНК как в 2D, так и в 3D моделях клеточных культур, что указывает на то, что клеточная линия Н1299 реагирует на генетические манипуляции. Пластичность раковых клеток и их способность реагировать на сигналы микроокружения могут быть отражены в наблюдаемых уровнях экспрессии маркеров ЕМТ в клеточной линии Н1299. Эти результаты позволяют предположить, что генетические манипуляции с микроРНК могут влиять на процесс ЭМП в клетках НМРЛ и что клеточная линия Н1299 может быть полезной модельной системой для изучения ЭМП при раке легких. Эти результаты могут иметь важное значение для понимания биологии НМРЛ и разработки потенциальных терапевтических вмешательств.

Поведение клеточной линии Н1299 в различных микроокружениях и в ответ на генетические манипуляции дает представление о ее биологии. Результаты исследования показывают, что клеточная линия Н1299 реагирует на

изменения микроокружения, обеспечиваемые трехмерной моделью клеточной культуры и генетическими манипуляциями посредством трансфекции микроРНК.

Однако исследование имеет некоторые ограничения, такие как небольшой размер выборки и отсутствие экспериментов *in vivo*. Необходимы дальнейшие исследования с большим размером выборки, чтобы подтвердить значение этих результатов для биологических характеристик этой клеточной линии и изучить влияние этих микроРНК на другие типы клеток рака легких. В целом, наше исследование дает ценную информацию о влиянии систем доставки на основе микроРНК на профиль транскриптома и активность миграции клеток. Используя как 2D, так и 3D модели клеточных культур, мы расширили наше понимание регуляции микроРНК и ее связи с маркерами ЕМТ. Эти результаты способствуют развитию исследований рака и открывают перспективы для будущих терапевтических вмешательств.

Приложение

Таблица 4: Значения *p* для графиков

Рисунок	Экспрессия гена	P-value
Рисунок 2	SNAIL	0.0312
	Е-Кадгерин	0.0496
	Виментин	0.011
Рисунок 3А	SNAIL	0.97
	Е-Кадгерин	0.27
	Виментин	0.48
Рисунок 3В	SNAIL	0.99
	Е-Кадгерин	0.027
	Виментин	0.83

Вклад авторов:

Концептуализация, авторский надзор, администрирование проекта, - Елена Петерсен.

Формальный анализ, валидация, написание — подготовка оригинального проекта — Абануб Шакер, Дмитрий Лифанов;

Написание — подготовка оригинального черновика, написание — рецензирование и редактирование — Евгения Шабалина, Дуламсурен Зоригт;

Курирование, привлечение финансирования - Решетов Игорь, Каралкин Павел.

Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: При поддержке гранта Российского научного фонда № 21-15-00411.

Благодарности: Исследование выполнено при поддержке Фонда прикладной генетики МФТИ (грант поддержки 075-15-2021-684) и проекта № 730000F.99.1.BV10AA00006.

Конфликты интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники литературы.

1. Blanco-Prieto, S., Barcia-Castro, L., Páez de la Cadena, M., Rodríguez-Berrocal, F. J., Vázquez-Iglesias, L., Botana-Rial, M. I., Fernández-Villar, A., & De Chiara, L. (2017). Relevance of matrix metalloproteases in non-small cell lung cancer diagnosis. BMC Cancer, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3842-z>.
2. Yang, L., Zhang, F., Wang, X., Tsai, Y., Chuang, K.-H., Keng, P. C., Lee, S. O., & Chen, Y. (2016). A FASN-TGF- β 1-FASN regulatory loop contributes to

- high EMT/metastatic potential of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(34), 55543–55554. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10837>
3. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
 4. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>
 5. Zhuang, J., Tang, X., Du, Z., Yang, M., & Zhou, Y. (2016). Prediction of biomarkers of therapeutic effects of patients with lung adenocarcinoma treated with gefitinib based on progression-free-survival by metabolomic fingerprinting. *Talanta*, 160, 636–644. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.007>
 6. Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), 131–142. <https://doi.org/10.1038/nrm1835>
 7. Williams, E. D., Gao, D., Redfern, A., & Thompson, E. W. (2019). Controversies around epithelial–mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 19(12), 716–732. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0213-x>
 8. Zavadil, J., & Böttinger, E. P. (2005). TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, 24(37), 5764–5774. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208927>
 9. Hay, E.D. (1968). Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo. *Epithelial-Mesenchymal Interactions* ; 18th Hahneemann Symposium, 1968. <https://cir.nii.ac.jp/crid/export-6533a6e1-0dde-4248-a3c6-81685f17f49f.bib?lang=en>
 10. Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>Nieto, M.

- A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
11. Lim, J., & Thiery, J. P. (2012). Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*, 139(19), 3471–3486. <https://doi.org/10.1242/dev.071209>
 12. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
 13. Ye, X., & Weinberg, R. A. (2015). Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends in Cell Biology*, 25(11), 675–686. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.012>
 14. Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>
 15. Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., & Ford, H. L. (2010). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(2), 117–134. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9178-9>
 16. Takeyama, Y., Sato, M., Horio, M., Hase, T., Yoshida, K., Yokoyama, T., Nakashima, H., Hashimoto, N., Sekido, Y., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Kondo, M., & Hasegawa, Y. (2010). Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. *Cancer Letters*, 296(2), 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.04.008>
 17. Vega, S., Morales, A. V., Ocaña, O. H., Valdés, F., Fabregat, I., & Nieto, M. A. (2004). SNAIL blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & Development*, 18(10), 1131–1143. <https://doi.org/10.1101/gad.294104>

18. Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). SNAIL, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, 7(6), 415–428. <https://doi.org/10.1038/nrc2131>
19. Cowden Dahl, K. D., Symowicz, J., Ning, Y., Gutierrez, E., Fishman, D. A., Adley, B. P., Stack, M. S., & Hudson, L. G. (2008). Matrix Metalloproteinase 9 Is a Mediator of Epidermal Growth Factor–Dependent E-Cadherin Loss in Ovarian Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 68(12), 4606–4613. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5046>
20. Heuberger, J., & Birchmeier, W. (2010). Interplay of Cadherin-Mediated Cell Adhesion and Canonical Wnt Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2), a002915–a002915. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002915>
21. Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6(4), 389–395. <https://doi.org/10.1038/74651>
22. Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), 671–674. <https://doi.org/10.1038/386671a0>
23. Ward, J. P. T. (2008). Oxygen sensors in context. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.10.010>
24. Helmlinger, G., Endo, M., Ferrara, N., Hlatky, L., & Jain, R. K. (2000a). Formation of endothelial cell networks. *Nature*, 405(6783), 139–141. <https://doi.org/10.1038/35012132>
25. Hansen-Algenstaedt, N., Stoll, B. R., Padera, T. P., Dolmans, D. E., Hicklin, D. J., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2000a). Tumor oxygenation in hormone-dependent tumors during vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade, hormone ablation, and chemotherapy. *Cancer Research*, 60(16), 4556–4560.
26. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. (2004). *Nature*, 431(7011), 931–945. <https://doi.org/10.1038/nature03001>
27. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. (2012). *Nature*, 489(7414), 57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>

28. Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., Xue, C., Marinov, G. K., Khatun, J., Williams, B. A., Zaleski, C., Rozowsky, J., Röder, M., Kokocinski, F., Abdelhamid, R. F., ... Gingeras, T. R. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489(7414), 101–108. <https://doi.org/10.1038/nature11233>
29. Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
30. Palazzo, A. F., & Lee, E. S. (2015). Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00002>
31. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
32. Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006b). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 857–866. <https://doi.org/10.1038/nrc1997>
33. Gross, N., Kropp, J., & Khatib, H. (2017). MicroRNA Signaling in Embryo Development. *Biology*, 6(4), 34. <https://doi.org/10.3390/biology6030034>
34. Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation. *The Cancer Journal*, 18(3), 215–222. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318250c001>
35. Nieto-Diaz, M., Esteban, F. J., Reigada, D., Muñoz-Galdeano, T., Yunta, M., Caballero-López, M., Navarro-Ruiz, R., Águila, Á. del, & Maza, R. M. (2014). MicroRNA dysregulation in spinal cord injury: causes, consequences and therapeutics. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00053>
36. Tan, L., Yu, J.-T., & Tan, L. (2015). Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 51(3), 1249–1262. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8803-9>
37. Zhang, C. (2008). MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. *Clinical Science*, 114(12), 699–706. <https://doi.org/10.1042/CS20070211>

38. Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 99–110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
39. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
40. Ebrahimi, F., Gopalan, V., Smith, R. A., & Lam, A. K.-Y. (2014). miR-126 in human cancers: Clinical roles and current perspectives. *Experimental and Molecular Pathology*, 96(1), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.12.004>
41. Wang, S., Aurora, A. B., Johnson, B. A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J. A., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2008). The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Developmental Cell*, 15(2), 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.07.002>
42. DA SILVA, N. D., FERNANDES, T., SOCI, U. P. R., MONTEIRO, A. W. A., PHILLIPS, M. I., & DE OLIVEIRA, E. M. (2012). Swimming Training in Rats Increases Cardiac MicroRNA-126 Expression and Angiogenesis. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 44(8), 1453–1462. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31824e8a36>
43. Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W., & Leal, J. (2008). The PTEN/PI3K/AKT Signalling Pathway in Cancer, Therapeutic Implications. *Current Cancer Drug Targets*, 8(3), 187–198. <https://doi.org/10.2174/156800908784293659>
44. Luan, Y., Zuo, L., Zhang, S., Wang, G., & Peng, T. (2015). MicroRNA-126 acts as a tumor suppressor in glioma cells by targeting insulin receptor substrate 1 (IRS-1). *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 10345–10354.
45. Chen, S.-W., Wang, T.-B., Tian, Y.-H., & Zheng, Y.-G. (2015). Down-regulation of microRNA-126 and microRNA-133b acts as novel predictor biomarkers in progression and metastasis of non small cell lung cancer.

International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 8(11), 14983–14988.

46. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>
47. Jiang, X., Hu, C., Arnovitz, S., Bugno, J., Yu, M., Zuo, Z., Chen, P., Huang, H., Ulrich, B., Gurbuxani, S., Weng, H., Strong, J., Wang, Y., Li, Y., Salat, J., Li, S., Elkahloun, A. G., Yang, Y., Neilly, M. B., ... Chen, J. (2016). miR-22 has a potent anti-tumour role with therapeutic potential in acute myeloid leukaemia. *Nature Communications*, 7(1), 11452. <https://doi.org/10.1038/ncomms11452>
48. Zuo, Q.-F., Cao, L.-Y., Yu, T., Gong, L., Wang, L.-N., Zhao, Y.-L., Xiao, B., & Zou, Q.-M. (2015). MicroRNA-22 inhibits tumor growth and metastasis in gastric cancer by directly targeting MMP14 and SNAIL. *Cell Death & Disease*, 6(11), e2000–e2000. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.297>
49. Budd, W. T., Seashols-Williams, S. J., Clark, G. C., Weaver, D., Calvert, V., Petricoin, E., Dragoescu, E. A., O'Hanlon, K., & Zehner, Z. E. (2015). Dual Action of miR-125b As a Tumor Suppressor and OncomiR-22 Promotes Prostate Cancer Tumorigenesis. *PLOS ONE*, 10(11), e0142373. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142373>
50. Song, S. J., Poliseno, L., Song, M. S., Ala, U., Webster, K., Ng, C., Beringer, G., Brikbak, N. J., Yuan, X., Cantley, L. C., Richardson, A. L., & Pandolfi, P. P. (2013). MicroRNA-Antagonism Regulates Breast Cancer Stemness and Metastasis via TET-Family-Dependent Chromatin Remodeling. *Cell*, 154(2), 311–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.026>
51. Zhang K, Li XY, Wang ZM, Han ZF, Zhao YH. MiR-22 inhibits lung cancer cell EMT and invasion through targeting SNAIL. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(16):3598-3604.
52. Ebrahimi, S. O., & Reisi, S. (2019). Downregulation of miR-4443 and miR-5195-3p in ovarian cancer tissue contributes to metastasis and tumorigenesis.

Archives of Gynecology and Obstetrics, 299(5), 1453–1458.
<https://doi.org/10.1007/s00404-019-05107-x>

53. Meerson, A., & Yehuda, H. (2016). Leptin and insulin up-regulate miR-4443 to suppress NCOA1 and TRAF4, and decrease the invasiveness of human colon cancer cells. *BMC Cancer*, 16(1), 882. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2938-1>
54. Chen, X., Zhong, S., Lu, P., Wang, D., Zhou, S., Yang, S., Shen, H., Zhang, L., Zhang, X., Zhao, J., & Tang, J. (2016). miR-4443 Participates in the Malignancy of Breast Cancer. *PLOS ONE*, 11(8), e0160780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160780>
55. Zuo, X., Sun, H., Fang, H., Wu, Y., Shi, Q., & Yu, Y. (2021). miR-4443 targets TRIM14 to suppress metastasis and energy metabolism of papillary thyroid carcinoma (PTC) in vitro. *Cell Biology International*, 45(9), 1917–1925. <https://doi.org/10.1002/cbin.11631>
56. Bissell, M. J., Rizki, A., & Mian, I. S. (2003). Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 753–762. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.016>
57. Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., & Yamada, K. M. (2001). Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science*, 294(5547), 1708–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1064829>
58. Kola, I., & Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8), 711–716. <https://doi.org/10.1038/nrd1470>
59. Pammolli, F., Magazzini, L., & Riccaboni, M. (2011). The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(6), 428–438. <https://doi.org/10.1038/nrd3405>
60. Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., & Schacht, A. L. (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), 203–214. <https://doi.org/10.1038/nrd3078>

61. Breslin, S., & O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(5–6), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>
62. Yamada, K. M., & Cukierman, E. (2007). Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell*, 130(4), 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.006>
63. Tsoukalas N. et al. Epithelial–mesenchymal transition in non small-cell lung cancer // *Anticancer Research*. – 2017. – T. 37. – №. 4. – C. 1773-1778. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11510>
64. Jia Z. et al. miR-126 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis by targeting PI3K/AKT/Snail signaling of lung cancer cells // *Oncology letters*. – 2018. – T. 15. – №. 5. – C. 7369-7375.