

Для цитирования: *Лаврентьев С.Н., Аксененко М.Б., Аверчук А.С., Комина А.В., Палкина Н.В., Рукша Т.Г.* Повышение уровня экспрессии miR-204-5p в клетках меланомы под воздействием дакарбазина. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18(3): 45–53. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-3-45-53.

For citation: *Lavrentiev S.N., Aksenenko M.B., Averchuk A.S., Komina A.V., Palkina N.V., Ruksha T.G.* Increased level of miR-204-5p expression in melanoma cells under the influence of dacarbazine. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18(3): 45–53. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-3-45-53.

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ miR-204-5P В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ДАКАРБАЗИНА

С.Н. Лаврентьев, М.Б. Аксененко, А.С. Аверчук, А.В. Комина, Н.В. Палкина, Т.Г. Рукша

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия
Россия, г. Красноярск, 660022, ул. Партизана Железняка, 1.
E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Аннотация

МикроРНК участвуют в регуляции на эпигенетическом уровне многочисленных критических биологических процессов, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку, миграцию и инвазию, функционируя в качестве онкосупрессоров или онкогенов. Ранее было определено, что микроРНК miR-204-5p характеризуется сниженным уровнем при меланоме. Основной целью данного исследования явилось определение эффектов изменения уровня экспрессии микроРНК при воздействии на клетки меланомы цитостатическим агентом дакарбазином *in vitro*, а также синтетическим аналогом miR-204-5p *in vivo*. Уровень экспрессии miR-204-5p и miR-211 в клетках меланомы оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. Противоопухолевые эффекты *in vivo* определялись при оценке динамики роста опухолевого узла. Токсические эффекты оценивались по поведению животных, потреблению жидкости, корма, а также по уровню АЛТ, АСТ, креатинина, мочевины. На модели меланомы C57BL6 определено, что введение синтетического аналога miR-204-5p не вызвало значимых изменений исследуемой микроРНК в опухолевых клетках. Вместе с тем противоопухолевый препарат дакарбазин в клетках меланомы *in vitro* приводил к повышению уровня исследуемой микроРНК более чем в 20 раз. Полученные результаты исследования указывают на возможность восстановления уровня miR-204-5p под воздействием цитостатической терапии. С учетом выявленного нами ранее ингибирующего эффекта miR-204-5p на пролиферацию клеток меланомы стоит предположить, что данная микроРНК может играть роль в поддержании дормантного состояния опухолевых клеток. Полученные данные требуют дальнейшего разьяснения, так как это может иметь значение для понимания развития метастазирования, а также прогнозирования эффективности противоопухолевой терапии при меланоме.

Ключевые слова: miR-204-5p, miR-211, меланома, дакарбазин, клеточная пролиферация, химиотерапия, культивирование клеток, ПЦР, биоинформатический анализ, химиорезистентность.

INCREASED LEVEL OF MIR-204-5P EXPRESSION IN MELANOMA CELLS UNDER THE INFLUENCE OF DACARBAZINE

S.N. Lavrentiev, M.B. Aksenenko, A.S. Averchuk, A.V. Komina, N.V. Palkina, T.G. Ruksha

Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Russian Federation Ministry of Health Care, Krasnoyarsk, Russia
1, Zheleznyaka Street, 660022-Krasnoyarsk, Russia. E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Abstract

Various types of tissues was analyzed, and the algorithm for summing neutron and photon doses in neutron-MiRNAs are involved in the regulation of numerous critical biological processes, including cell proliferation, differentiation, migration and invasion. They function as oncogenes or tumor suppressors according to the nature of the target. It has been previously determined that miR-204-5p miRNA is characterized by the increased level in melanoma. The aim of this study was to determine the effects of changes in the level of microRNA expression when dacarbazine was exposed to melanoma cells in vitro and synthetic miR-204-5p in vivo. The expression levels of miR-204-5p and miR-211 in melanoma cells were determined by real-time PCR. Antitumor effects in vivo were verified in assessing the growth dynamics of the tumor node. Toxic effects were assessed by animal behavior, fluid intake, feed, and ALT, AST, creatinine, urea levels. In the model of melanoma C57BL/6, it was revealed that the introduction of the synthetic miR-204-5p did not cause significant changes in the investigated microRNA in tumor cells. At the same time, the antitumor effects of dacarbazine in melanoma cells in vitro led to an increase in the level of the investigated microRNA by more than 20 times. The results of the study indicated the possibility of compensating the level of miR-204-5p under the influence of cytostatic therapy. Taking into account the previously revealed miR-204-5p inhibitory effect on the proliferation of melanoma cells, we can assume that this miRNA can play a role in maintaining the dermal state of tumor cells. Further studies are required to understand the metastasis development and predict the response to antitumor therapy for melanoma.

Key words: miR-204-5p, miR-211, melanoma, dacarbazine, cell proliferation, chemotherapy, cell cultivation, PTsR, bioinformation analysis, chemoresistance.

Введение

Современные возможности лечения меланомы представлены различными способами, включая хирургическое вмешательство, химиотерапию, иммунотерапию, применение BRAF-ингибиторов [1]. Одним из стандартных вариантов лекарственной терапии меланомы кожи на протяжении более 30 лет является применение дакарбазина [2]. Препарат относится к группе алкилирующих агентов, его действие заключается в прямом повреждении ДНК [3]. Недавнее внедрение в клиническую онкологию противоопухолевых средств, обладающих способностью ингибирования гистоновых деацетилаз [4], позволяет предполагать возможность целенаправленного воздействия на эпигенетические механизмы с терапевтической целью. МикроРНК – это эволюционно консервативные некодирующие РНК длиной 20–22 нуклеотидов, участвующие практически во всех известных физиологических и патологических процессах, включая канцерогенез [5]. Возможность целенаправленного изменения уровней микроРНК является новым направлением в экспериментальной терапии меланомы кожи.

Цель исследования – изучение влияния модуляции уровня экспрессии miR-204-5p на модели меланомы in vivo, а также в клетках меланомы in vitro.

Материал и методы

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 79/2017 от 22.11.2017). Манипуляции с животными осуществляли в соответствии с правилами, изложенными в Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2008 ред.), а также в «Междуна-

родных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных» и приказе Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 №199н. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Эксперимент по воссозданию меланомы кожи проводили на половозрелых мышках-самках линии C57BL/6 в возрасте 8–9 нед со средней массой тела 18,5 г. Животные были предоставлены ФИЦ ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Температура воздуха в помещении поддерживалась на уровне 20–22 °С. Животные содержались в клетках при естественном освещении с неограниченным доступом к корму и воде.

Перевивка культуры клеток меланомы B16 животным производилась путём подкожного введения 0,5 мл взвеси опухолевой ткани в растворе Хенкса (1:10) по стандартной методике. Все животные были разделены на 3 группы случайным образом. Животным контрольной группы (n=3) на 7-е сут после трансплантации опухолевых клеток в латеральную вену хвоста вводился раствор фосфатно-солевого буфера (VWR Radnor, USA). В группе отрицательного контроля (n=6) применялся негативный контроль имитатора (mirvana™ mirna Mimic Negative Control #1, Ambion, Carlsbad, USA). Вещество вводилось на 7-е сут после трансплантации опухолевых клеток однократно в латеральную вену хвоста. Животным опытной группы (n=5) вводился синтетический аналог (имитатор) miR-204-5p (mirVana® miR-204-5p mimic, Ambion, Carlsbad, USA) однократно в боковую вену хвоста на 7-е сут после перевивки опухолевых клеток в дозировке 1,2 мг/кг в виде раствора 7,4 µM в объеме 200 мкл, в качестве растворителя использовали InvivoFectamine® 3.0 Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA).

Оценка динамики роста опухоли

Линейные размеры опухоли измеряли в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Объём опухоли рассчитывали по формуле

$$V = A \times (B)^2,$$

где А – больший, а В – меньший линейный размер узла. Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле

$$\text{ТРО} = ((V_k - V_0) / V_k) \times 100 \%,$$

где V_k – средний объём опухоли в контрольной группе на определённый срок измерения (мм^3), V_0 – средний объём опухоли в опытной группе на определённый срок измерения (мм^3).

Оценка токсического эффекта синтетического имитатора miR-204-5p на организм животных

Токсический эффект имитатора miR-204-5p оценивался по изменению массы тела мышей, потреблению пищи (в граммах) и воды (в миллилитрах). Животных взвешивали каждые трое суток. Изменение внешних признаков фиксировали ежедневно путем балльной оценки изменения окраса шерсти и волосяного покрова: 1 балл – шерстяной покров тусклый, 2 балла – яркий; изменения двигательной активности: 5 баллов – активное движение животного по клетке, выраженные избегательно-оборонительные реакции; 4 балла – медленные активные движения по клетке, избегательно-оборонительные реакции с попытками укусов; 3 балла – реакция на раздражение избегательная, спонтанная двигательная активность угнетена, стимулированная сохранена, животное передвигается на несколько шагов только при подталкивании; 2 балла – реакция на тактильные раздражители угнетена, минимальная стимулированная двигательная активность животного; 1 балл – кома, отсутствие спонтанной и стимулированной двигательной активности; 0 баллов – животное пало. Животных выводили из эксперимента путем декапитации под хлороформным наркозом на 15-е сут после начала эксперимента.

Изучение морфологических изменений в органах животных

Животные после эвтаназии подвергались визуальному осмотру. Во время вскрытия проводилась оценка внутренних органов животных: цвета, формы, консистенции. Определялась масса внутренних органов.

Определение биохимических параметров – маркеров токсического повреждения органов

Для оценки маркеров возможного токсического повреждения органов оценивалась концентрация АЛТ (аланинаминотрансферазы), АСТ (аспартатаминотрансферазы), креатинина, мочевины на биохимическом анализаторе Cobasintegra 400 plus (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germani).

Выделение РНК

Образцы опухолевых узлов, изъятые при вскрытии, были помещены в криопробирки с раствором для сохранения и фиксации РНК RNeasyLysisSolution (Qiagen, Crawley, UK) и хранились при -80°C . После гомогенизации тканей выделяли РНК с применением наборов реагентов Рибо-золь, Рибо-сорб (Амплисенс, Москва, РФ) согласно инструкции производителя.

Культивирование клеток меланомы и воздействие на них дакарбазином

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 73/2016 от 16.12.2016), а также локальным этическим комитетом Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А.И. Крыжановского (протокол № 8 от 14.06.2017). Образцы меланомы кожи 2303-С, 2303-К, 0404-К были получены от пациентов с меланомой кожи, находившихся на лечении в Красноярском краевом онкологическом диспансере, после оперативного удаления меланомы. Фрагменты опухоли были подвергнуты дезагрегации и перенесены в питательную среду для получения клеточной линии. Клетки культивировали в питательной среде RPMI-1640, L-глутамин (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK) и смесь антибиотика-антимикотика (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В) (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK), при 37°C и 5 % CO_2 в CO_2 -инкубаторе (Sanyo MSO-5AC, Osaka, Japan). Смену питательной среды осуществляли один раз в 3 дня. Для проведения исследования клетки рассеивали в 6-луночные планшеты в концентрации 2×10^5 кл/мл. После 24 ч в лунки, согласно протоколу исследования вносили дакарбазин (Sigma, St. Louis, USA) в концентрации 1000 мкг/мл или DMSO (Panreacchimica s.a., Barcelona, Spain) до конечной концентрации 1 %. Через 72 ч клетки трипсинизировались, после чего из полученных клеток выделяли микроРНК при помощи комплекта реагентов RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Life Technologies, Vilnius, Lithuania).

Реакция обратной транскрипции

Реакция обратной транскрипции проводилась с применением набора реагентов MMLV RT kit (Евроген, Москва, РФ). Для определения уровня экспрессии матричных РНК использовался набор случайных праймеров из набора MMLV RT kit (Евроген, Москва, РФ) и специфичные праймеры для каждого вида микроРНК TaqMan Assays hsa-miR-211 (Assay ID 000514, №.4427975, Applied Biosystems, Foster City, USA), TaqMan Assays hsa-

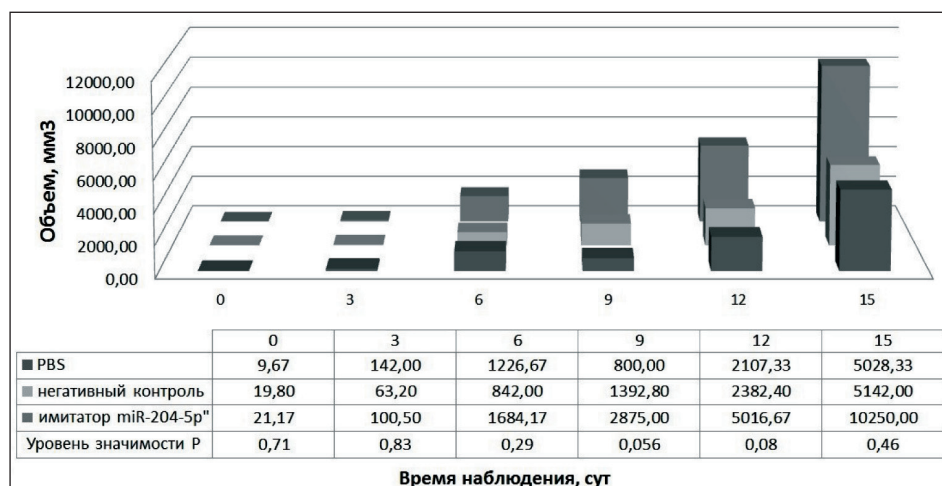


Рис. 1. Динамика объема опухолевых узлов после воздействия имитатором miR-204-5p

miR-204-5p (Assay ID 478491, № A25576, Applied Biosystems, Foster City, USA) TaqManAssays (Applied Biosystems, Foster City, USA).

ПЦР в реальном времени

Реакцию ПЦР в реальном времени проводили на приборе StepOne™ Real-Time PCR-System (Applied Biosystems, Singapore, Singapore). В качестве эндогенных контролей использовали U6 snRNA (Assay-ID 001973, № 4427975, Applied Biosystems, Foster City, USA), SNO 234 (AssayID 001234, № 4427975; Applied Biosystems, Foster City, USA). Эксперимент осуществляли в трех технологических повторах. Анализ данных производили с использованием метода ΔΔCt. Для определения уровня экспрессии выполняли расчет среднего геометрического от произведения уровней экспрессии.

Биоинформатический анализ

Анализ сигнальных путей, регулируемых miR-204-5 и miR-211, осуществляли при помощи программного обеспечения DIANA miRPath v.3.0 на основе базы данных KEGG (с применением баз данных TargetScan v.7.0, TarBase, microT-CDS).

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных был использован пакет программного обеспечения Statistica 6.1 (StatSoft, Москва, Россия). Для многогрупповых сравнений применялся непараметрический критерий Краскела – Уоллиса. Результаты считали значимыми при $p < 0,05$. Данные в таблице представлены в виде среднего значения. Данные на рис. 2, 7, 8 представлены в виде среднего значения, его стандартного отклонения и доверительного интервала.

Результаты

С учетом полученных нами ранее [6] и литературных данных о роли miR-204-5p в регуляции пролиферации опухолевых клеток [7] в данном исследовании было осуществлено введение син-

тетического имитатора данной микроРНК мышам линии C57BL6 с имплантированной меланомой B16 для последующей оценки противоопухолевых и токсических эффектов вышеуказанного модулятора.

Противоопухолевые эффекты синтетического аналога miR-204-5p, оцениваемые по динамике торможения роста опухоли и объема опухолевого узла под воздействием исследуемого синтетического аналога miR-204-5p, не наблюдались (рис. 1). Уровень miR-204-5p в клетках опухолевого узла в группе животных, получавших имитатор miR-204-5p, не отличался от контрольной группы (рис. 2).

Для определения возможного токсического воздействия используемого мимика на животных были оценены следующие показатели: динамика массы тела, внешний вид и двигательная активность животных в течение эксперимента. Динамика массы тела в исследуемых группах за период эксперимента значимо не различалась (рис. 3). Значимых изменений потребления животными воды и корма за период наблюдения в ходе эксперимента также отмечено не было. Кроме того, в ходе эксперимента все животные характеризовались выраженными

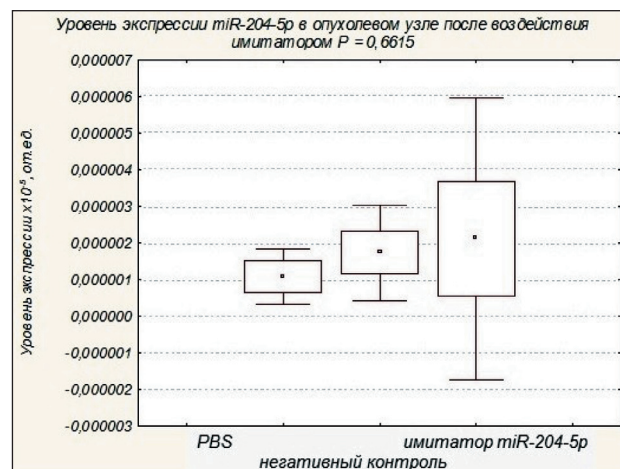


Рис. 2. Уровень экспрессии miR-204-5p в опухолевом узле после воздействия имитатором miR-204-5p



Рис. 3. Динамика массы тела животных после воздействия имитатором miR-204-5p

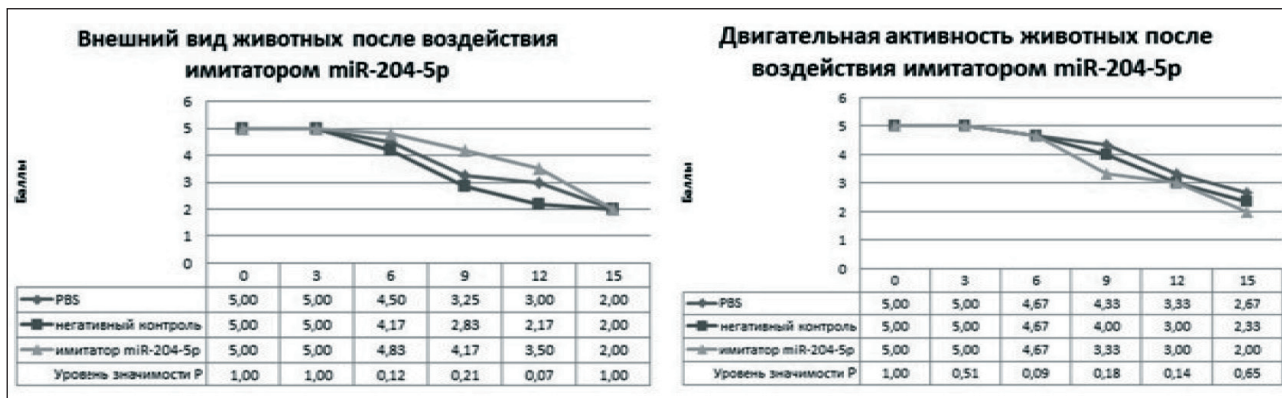


Рис. 4. Внешний вид и двигательная активность животных после воздействия имитатором miR-204-5p

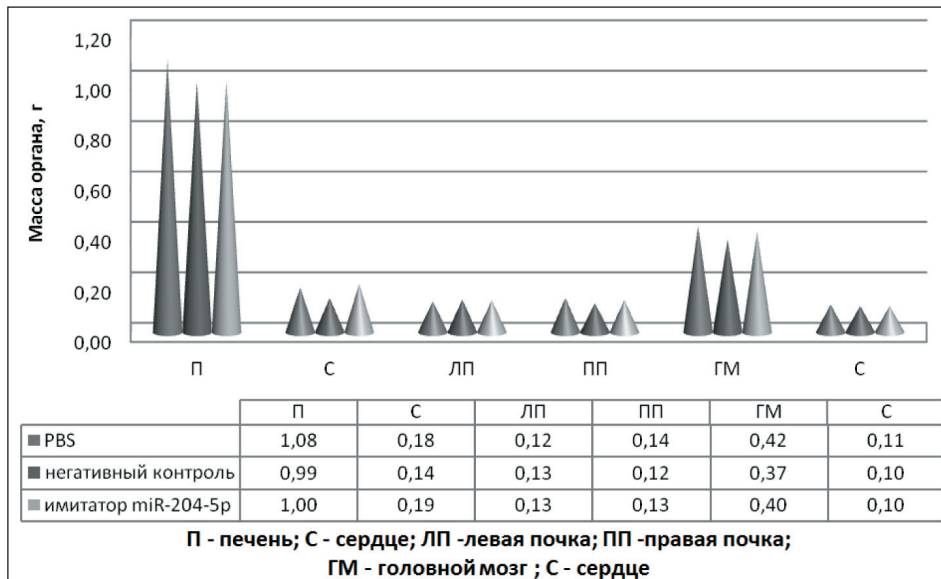


Рис. 5. Массы органов животных после воздействия имитатором miR-204-5p

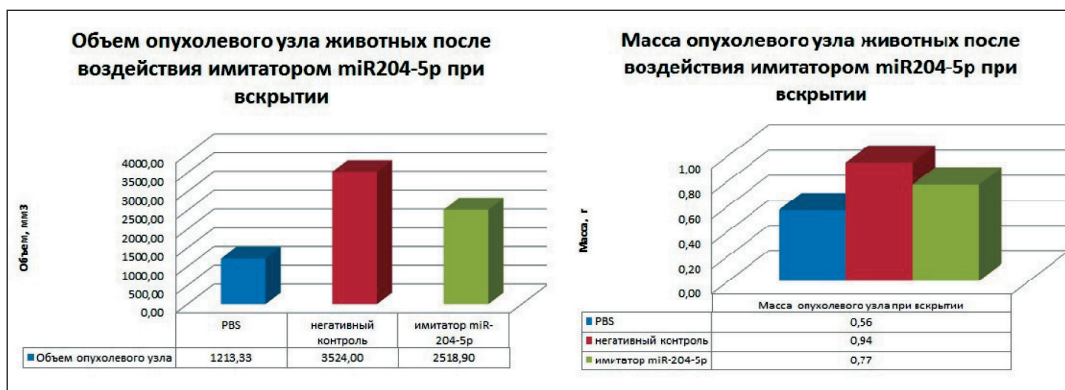


Рис. 6. Объем и масса опухолевых узлов после воздействия имитатором miR-204-5p

избегательно-оборонительными реакциями и нормальной двигательной активностью (рис. 4).

По результатам оценки морфологических изменений внутренних органов (головного мозга, печени, селезенки, почек, сердца, легких) при вскрытии животных всех групп не было отмечено дистрофических изменений. Масса исследуемых органов, объем и масса опухолевых узлов также не различались в исследуемых группах (рис. 5, 6).

Для анализа возможного гепато- и нефротоксического эффектов используемого имитатора определялись уровни АЛТ, АСТ, креатинина, мочевины, значимых различий которых в исследуемых группах выявлено не было (таблица). Изменений морфологического (головной мозг, печень, селезенка, почки, сердце, легкие), физиологического характера (масса тела, количество потребляемой жидкости и корма), поведенческих реакций выявлено не было.

Таблица

Биохимические параметры токсичности после воздействия имитатором miR-204-5p

Параметр	Группа			Уровень значимости
	PBS	Негативный контроль	Имитатор miR-204-5p	
АЛТ	57,63	56,48	57,01	p=0,97
АСТ	473,13	578,12	559,83	p=0,59
Креатинин	4,00	2,40	3,40	p=0,80
Мочевина	9,88	7,49	8,74	p=0,33

Для проведения дальнейшего этапа исследования, учитывая литературные данные о позитивной индукции уровня данной микроРНК противоопухолевыми агентами [8], осуществляли модуляцию экспрессии miR-204-5p дакарбазином. С этой целью в клетках меланомы, полученных из

первичной опухоли, оценивали уровни miR-204-5p и гомологичной ей miR-211 после воздействия вышеуказанным веществом в течение 72 ч в концентрации 1000 мкг/мл. Регистрировалось 20-кратное и более повышение уровней miR-204-5p, miR-211 (рис. 7, 8) у клеточной культуры, полученной из краевого участка опухоли (2303-К) в отличие от клеточных линий, полученных из центральной части (2303-С и 0404-С).

Следующим этапом был проведен биоинформатический анализ генов-мишеней вышеуказанных микроРНК, который определил, что miR-204-5 и miR-211 принимают участие в регуляции сигнальных механизмов, участвующих в процессах жизнеобеспечения клетки, процессов апоптоза и формирования опухоли, таких как сигнальный путь NF-каппа В, сигнальный путь JAK-stat. Полученные результаты согласуются с литературными данными об участии miR-204-5p и miR-211 в канцерогенезе [9, 10].

Обсуждение

Так как микроРНК-гомологи miR-204-5p и miR-211 по результатам нескольких исследований были определены как одни из минимально экспрессирующихся при меланоме, предполагается, что повышение их уровня может иметь значение в терапии [11]. Как было выявлено нами ранее [6] и что также согласуется с другими исследованиями [12], применение имитатора данной микроРНК in vitro снижает пролиферативную активность и жизнеспособность клеток опухоли. В этой связи на первом этапе исследования нами было осуществлено введение имитатора miR-204-5p мышам C57BL6 с имплантированной меланомой В16 с целью оценки противоопухолевого действия, а также токсических эффектов.

Вместе с тем динамика роста опухоли в экспериментальной и опытной группах была идентич-

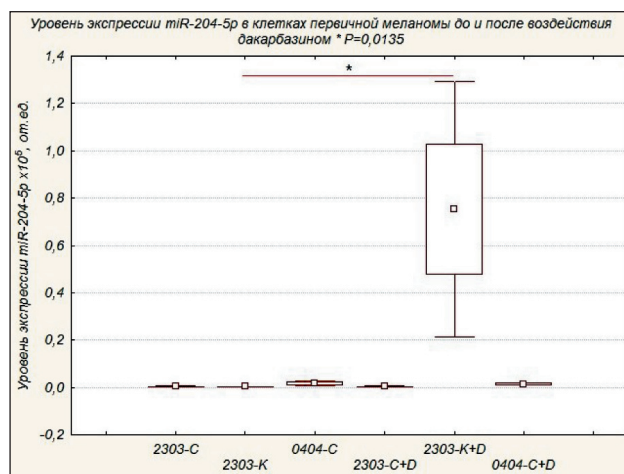


Рис. 7. Уровень экспрессии miR-204-5p в клетках первичной меланомы.

Примечание: * – статистически значимые различия до и после воздействия дакарбазином (p=0,0135)

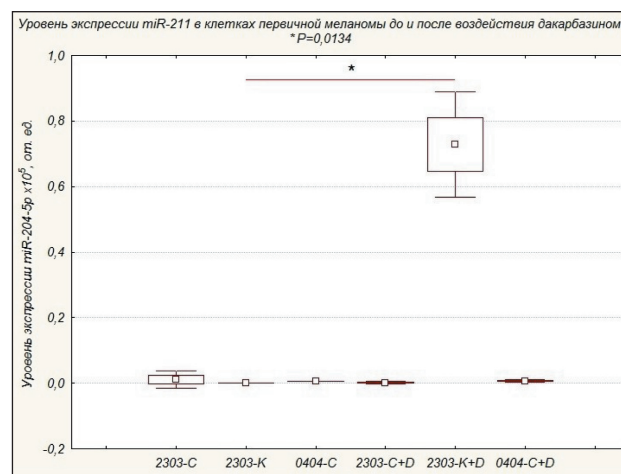


Рис. 8. Уровень экспрессии miR-211 в клетках первичной меланомы.

Примечание: * – статистически значимые различия до и после воздействия дакарбазином (p=0,0134)

ной, что может быть обусловлено недостаточной дозой введенного имитатора, его разрушением под воздействием нуклеаз периферической крови или нивелированием эффектов имитатора факторами, вызывающими снижение экспрессии данных микроРНК в клетках меланомы. Доза препарата определялась согласно рекомендациям производителя (Insert PN 4457172 Rev. C, Ambion by Life Technologies, Carlsbad, USA). Стабильность олигонуклеотидов является одной из ключевых проблем их применения в медицине. Существует множество работ, описывающих проблемы и решение вопросов адресной доставки лекарственных веществ [13, 14]. Выделяют несколько направлений решения, включая в случае опухолей кожи, регионарное введение препарата, а также введение препарата посредством различных решений: связывания с полимером, наночастицами, липосомами, вирусными частицами. Вместе с тем данные способы имеют ограничения в виде токсичности, низкой специфичности, вариабельной биодegradуемости средств доставки [15].

В связи с тем, что одна микроРНК может регулировать сразу несколько генов-мишеней, но также большое количество разновидностей микроРНК могут осуществлять регуляцию экспрессии одного гена, стоит предположить, что при ингибировании/усилении микроРНК одного типа, другие микроРНК могут оказывать регуляторные влияния на ген-мишень. МикроРНК miR-204-5p и miR-211 имеют отличия в строении только на один нуклеотид, в связи с чем предполагается, что большинство генов-мишеней данных микроРНК идентичны. В этой связи стоит предположить, что при воздействии имитатором miR-204-5p супрессивное воздействие на соответствующие гены-мишени может продолжать оказывать miR-211, нивелируя действие имитатора. При этом стоит отметить, что токсических эффектов на фоне введения олигонуклеотидов выявлено не было.

При выполнении полногеномного секвенирования РНК клеток меланомы, в том числе резистентных к BRAF-ингибитору вемурафенибу, Diaz-Martines et al. выявили, что miR-204-5p и miR-211 были в числе четырех микроРНК, различия в уровнях которых были максимальными в двух вышеуказанных группах. Одним из механизмов этого авторы определили изменение уровня транскрипционного фактора STAT. Последний также принимает участие в регуляции чувствительности опухолевых клеток к алкилирующим агентам [16]. В этой связи на следующем этапе исследования клетки меланомы, полученные из первичных опухолей, инкубировались с дакар-

базином. Выполнение ПЦР в реальном времени позволило определить более чем 20-кратное увеличение уровня miR-204-5p, miR-211. Можно предположить, что изученные клеточные линии испытывают различную степень деградации генетического материала при действии дакарбазина и, следовательно, проявляют различные механизмы адаптации к нему, что свидетельствует о генетической гетерогенности материнской опухоли.

Ряд авторов в своих публикациях выделяют и доказывают действенность нескольких факторов, влияющих на клетки одной опухоли и вызывающих явление генетической гетерогенности: воздействие экстрацеллюлярного матрикса, клеточные и неклеточные компоненты стромы опухоли, васкуляризация центральной и краевых опухолевых участков и метаболические особенности малигнизированных клеток и микроокружения, гипоксия и снижение pH, возникающие в результате недостаточности кровоснабжения и трофики центральной части опухоли [17, 18]. Изменение генетического профиля под действием перечисленных факторов, возможно, проявляется в активации синтеза белков-транспортеров, глутатион S-трансферазы и белка MGMT, которые увеличивают резистентность к действию дакарбазина [19–21]. Чрезмерной экспрессии MGMT способствует активируемый гипоксией фактор (HIF)-1 α [19]. Гипоксия и ацидоз снижают чувствительность опухоли к действию препарата, что может радикально изменить биологию рака. Опухолевые клетки при гипоксии приобретают стволовые функции, они более инвазивны и устойчивы к лекарственным средствам, чем их нормоксичные аналоги.

Таким образом, под воздействием цитостатического препарата в живых клетках регистрировалось повышение уровня анализируемых микроРНК. Стоит отметить, что в подобных условиях остаются жизнеспособными клетки с низким пролиферативным потенциалом, имеющие значение в развитии феномена дормантности. В проведенных нами ранее исследованиях мы определили, что *in vitro* имитатор miR-204-5p вызывает снижение пролиферативной активности в клетках.

Заключение

На основании выполненного исследования можно предположить, что микроРНК miR-204-5p и miR-211 могут участвовать в обеспечении «сдвига» пролиферирующих опухолевых клеток в дормантное состояние, а повышение уровня данных микроРНК может играть роль в развитии химиорезистентности и метастазирования.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Maverakis E., Cornelius L.A., Bowen G.M., Phan T., Patel F.B., Fitzmaurice S., He Y., Burrall B., Duong C., Kloxin A.M., Sultani H., Wilken R., Martinez S.R., Patel F.* Metastatic Melanoma – a review of current and future treatment options. *Acta Derm Venereol.* 2015 May; 95(5): 516–24. doi: 10.2340/00015555-2035.

2. *Xin Y., Huang Q., Zhang P., Yang M., Hou X.Y., Tang J.Q., Zhang L.Z., Jiang G.* Meta-Analysis of the Safety and Efficacy of Interferon Combined With Dacarbazine Versus Dacarbazine Alone in Cutaneous Malignant Melanoma. *Medicine (Baltimore).* 2016 Apr; 95(16): e3406. doi: 10.1097/MD.0000000000003406.

3. Hafeez A, Kazmi I. Dacarbazine nanoparticle topical delivery system for the treatment of melanoma. *Sci Rep*. 2017 Nov 28; 7(1): 16517. doi: 10.1038/s41598-017-16878-1.
4. Zwerge C, Giulia S, Valente S, Mai A. Histone Deacetylase Inhibitors: Updated Studies in Various Epigenetic-Related Diseases. *J Clin Epigenet*. 2016 Mar; 2(1/7): 1–15. doi: 10.21767/2472-1158.100015.
5. Lujambio A, Lowe S.W. The microcosmos of cancer. *Nature*. 2012 Feb 15; 482(7385): 347–55. doi: 10.1038/nature10888.
6. Palkina N, Komina A, Aksenenko M, Ruksha T. MicroRNA 204-5p decreases proliferation/viability and the ability to form colonies in melanoma cells. *J Clin Invest Dermatol*. 2017 Oct; 137(10/2): 29. doi: 10.1016/j.jid.2017.07.777.
7. Yin Y, Zhang B, Wang W, Fei B, Quan C, Zhang J, Song M, Bian Z, Wang Q, Ni S, Hu Y, Mao Y, Zhou L, Wang Y, Yu J, Du X, Hua D, Huang Z. MiR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating RAB22A. *Clin. Cancer Res*. 2014 Oct 7; 20: 6187–99. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1030.
8. Diaz-Martinez M, Benito-Jardón L, Alonso L, Koetz-Ploch L, Hernando E, Teixidó J. miR-204-5p and miR-211-5p Contribute to BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Cancer Res*. 2018 Feb 15; 78(4): 1017–30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1318.
9. Gao W, Wu Y, He X, Zhang C, Zhu M, Chen B, Liu Q, Qu X, Li W, Wen S, Wang B. MicroRNA-204-5p inhibits invasion and metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma by suppressing forkhead box C1. *J Cancer*. 2017 Jul 21; 8(12): 2356–68. doi: 10.7150/jca.19470.
10. Xia B, Yang S, Liu T, Lou G. miR-211 suppresses epithelial ovarian cancer proliferation and cell-cycle progression by targeting Cyclin D1 and CDK6. *Mol Cancer*. 2015 Mar 11; 14: 57. doi: 10.1186/s12943-015-0322-4.
11. Galasso M, Morrison C, Minotti L, Corrà F, Zerbinati C, Agnoletto C, Baldassari F, Fassan M, Bartolazzi A, Vecchione A, Nuovo G, Di Leva G, D'Atri S, Alvino E, Previali M, Nickoloff B.J, Croce C.M., Volinia S. Loss of miR-204 expression is a key event in melanoma. *Mol Cancer*. 2018 Mar 9; 17(1): 71. doi: 10.1186/s12943-018-0819-8.
12. Liu L, Wang J, Li X, Ma J, Shi C, Zhu H, Xi Q, Zhang J, Zhao X, Gu M. MiR-204-5p suppresses cell proliferation by inhibiting IGFBP5 in papillary thyroid carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2015 Nov 3; 457: 621–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.037.
13. Lou S, Zhao Z, Dezort M, Lohneis T, Zhang C. Multifunctional Nanosystem for Targeted and Controlled Delivery of Multiple Chemotherapeutic Agents for the Treatment of Drug-Resistant Breast Cancer. *ACS Omega*. 2018 Aug 31; 3(8): 9210–19. doi: 10.1021/acsomega.8b00949.
14. Tian F, Dahmani F.Z, Qiao J, Ni J, Xiong H, Liu T, Zhou J, Yao J. A targeted nanopatform co-delivering chemotherapeutic and antiangiogenic drugs as a tool to reverse multidrug resistance in breast cancer. *Acta Biomater*. 2018 Jul 15; 75: 398–412. doi: 10.1016/j.actbio.2018.05.050.
15. Drusco A, Croce C.M. MicroRNAs and Cancer: A Long Story for Short RNAs. *Adv Cancer Res*. 2017; 135: 1–24. doi: 10.1016/bs.acr.2017.06.005.
16. Happold C, Roth P, Silginer M, Florea A.M., Lamszus K, Frei K, Deenen R, Reifemberger G, Weller M. Interferon- β induces loss of spherogenicity and overcomes therapy resistance of glioblastoma stem cells. *Mol Cancer Ther*. 2014 Apr; 13(4): 948–61. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0772.
17. Marusyka A, Polak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan; 1805(1): 105. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.11.002.
18. Tlsty T, Coussens L. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu. Rev. Pathol*. 2006. 1: 119–50. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100224.
19. Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, Persano L, Puppa D, Frasson C, Sarto E, Scienza R, D'avella D, Basso G. Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells*. 2010 May; 28(5): 851–62. doi: 10.1002/stem.415.
20. Attaoua C, Vincent L, Jaoued A, Hadj-Kaddour K, Baï Q, De V, Vian L, Cuq P. Differential involvement of glutathione S-transferase mu 1 and multidrug resistance protein 1 in melanoma acquired resistance to vinca alkaloids. *Fundam Clin Pharmacol*. 2014 Oct; 29(1): 62–71. doi: 10.1111/fcp.12093.
21. Cabrini G, Fabbri E, Nigro L, Dechecchi M, Gambari R. Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review). *Int J Oncol*. 2015 May; 47(2): 417–428. doi: 10.3892/ijo.2015.3026.

Получена/Received 03.10.18
Принята в печать/Accepted 19.11.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Лаврентьев Семен Николаевич, аспирант кафедры патологической физиологии, Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (г. Красноярск, Россия). Researcher ID (WOS): Q-5615-2017 ORCID: 0000-0002-2214-1336.

Аксененко Мария Борисовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии, Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (г. Красноярск, Россия). SPIN-код: 6958-9122. Researcher ID (WOS): V-1055-2017. Author ID (Scopus): 55330015100. ORCID: 0000-0001-7660-700X.

Аверчук Антон Сергеевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры патологической физиологии, Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (г. Красноярск, Россия). SPIN-код: 7276-8713. Researcher ID (WOS): I-1075-2018. ORCID: 0000-0002-1284-6711.

Комнина Анна Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры патологической физиологии, Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (г. Красноярск, Россия). SPIN-код: 1172-2769. Researcher ID (WOS): O-9770-2015. Author ID (Scopus): 55596122500. ORCID: 0000-0002-2269-0298.

Палкина Надежда Владимировна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры патологической физиологии, Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (г. Красноярск, Россия). SPIN-код: 7534-4443. Researcher ID (WOS): P-1585-2015. Author ID (Scopus): 56126629300. ORCID: 0000-0002-6801-3452.

Рукша Татьяна Геннадьевна, доктор медицинских наук, заведующая кафедрой патологической физиологии, Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (г. Красноярск, Россия). SPIN-код: 5412-2148. Researcher ID (WOS): A-4801-2014. Author ID (Scopus): 23009925600. ORCID: 0000-0001-8142-4283.

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00074П).

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Semen N. Lavrentev, Postgraduate, Department of Pathophysiology, V.F. Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University (Krasnoyarsk, Russia). Researcher ID (WOS): Q-5615-2017. ORCID: 0000-0002-2214-1336.

Maria B. Aksenenko, MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathophysiology, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University (Krasnoyarsk, Russia). Researcher ID (WOS): V-1055-2017. Author ID (Scopus): 55330015100. ORCID: 0000-0001-7660-700X.

Anton S. Averchuk, PhD, Associate Professor, Department of Pathophysiology, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University (Krasnoyarsk, Russia). Researcher ID (WOS): I-1075-2018. ORCID: 0000-0002-1284-6711.

Anna V. Komina, PhD, Research Scientist, Department of Pathophysiology, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University (Krasnoyarsk, Russia). Researcher ID (WOS): O-9770-2015. Author ID (Scopus): 55596122500. ORCID: 0000-0002-2269-0298.

Nadezhda V. Palkina, MD, PhD, Department of Pathophysiology, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University (Krasnoyarsk, Russia). Researcher ID (WOS): P-1585-2015. Author ID (Scopus): 56126629300. ORCID: 0000-0002-6801-3452.

Tatiana G. Ruksha, MD, DSc, Head of the Department of Pathophysiology, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University (Krasnoyarsk, Russia). Researcher ID (WOS): A-4801-2014. Author ID (Scopus): 23009925600. ORCID: 0000-0001-8142-4283.

Funding

The study was supported by the grant from the Russian Science Foundation (project №14-15-00074).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.