

на правах рукописи

ПАЛКИНА
Надежда Владимировна

**РОЛЬ МИКРОРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065 И miR-204 В
РЕГУЛЯЦИИ КЛЮЧЕВЫХ МЕХАНИЗМОВ ОПУХОЛЕВОЙ
ПРОГРЕССИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ**

1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

НОВОСИБИРСК – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный консультант:

Рукша Татьяна Геннадьевна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии имени профессора В.В. Иванова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Официальные оппоненты:

Поспелова Татьяна Ивановна — доктор медицинских наук, профессор, проректор по научной работе, заведующая кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии факультета повышения квалификации и профессиональной подготовки врачей Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Молочков Антон Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой дерматовенерологии и дерматоонкологии государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского»;

Гуляева Людмила Федоровна — доктор биологических наук, профессор, руководитель Лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.242.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117
Тел./факс: (383) 333-64-56

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Пальчикова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Меланома кожи — злокачественная опухоль с самым высоким показателем смертности среди дерматологических онкозаболеваний, а также занимающая одно из лидирующих мест по агрессивности и непредсказуемости течения среди других злокачественных новообразований (Имянитов Е.Н., 2012). Меланома кожи характеризуется трудностью дифференциальной диагностики и прогнозирования течения заболевания, быстрым развитием метастазирования, отсутствием эффективной терапии диссеминированных форм, поэтому прогноз для пациентов с метастатической формой данной патологии крайне неблагоприятен (Erdei E., Torres S.M., 2010). Кроме этого, ежегодно продолжает увеличиваться частота развития меланомы не только в России, но и в других странах мира среди лиц со светлым типом кожи (Apalla Z. et al., 2017; Каприн А.Д. и др., 2019). Данные факты говорят о необходимости разработки и создания новых способов лечения данного злокачественного новообразования, а также совершенствования дифференциально-диагностических подходов. В стратегии противоопухолевой терапии метастатической меланомы кожи наряду со стандартной химиотерапией в настоящее время используются подходы, основанные на ингибировании активности тирозинкиназ, моноклональных антител, различных видах вакцин, а также иммунотерапии (Боробова Е.А., Жеравин А.А., 2017). И хотя международные клинические исследования, проводимые на протяжении последних лет, выявили определенные успехи в улучшении контроля над прогрессированием диссеминированной меланомы при иммунотерапии, 5-летняя выживаемость у пациентов с меланомой кожи III и IV стадии составляет лишь 50% и 10-20% соответственно (Ascierto P.A., Marincola F.M., 2014; Чулкова С.В. и др., 2019). В этом аспекте интересны новые научные подходы к диагностике и лечению меланомы кожи, рассматривающие в качестве мишеней открытые в последние десятилетия молекулы микроРНК. Впервые идентифицированные в 1993 году, эти молекулы относятся к классу малых некодирующих РНК, являющихся высокостабильными консервативными соединениями длиной от 19 до 24 нуклеотидов (Комина А.В. и др., 2020). МикроРНК играют важную роль в регуляции выживаемости клеток, пролиферации, дифференцировки посредством посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, вызывая деградацию или изменяя стабильность трансляционной эффективности матричной РНК (мРНК), благодаря спариванию оснований с комплементарными участками на мРНК-мишени (Bartel D.P., 2004; Zhi F. et al., 2013). На сегодняшний день идентифицировано более 2600 видов микроРНК у человека, эти молекулы обладают тканеспецифичностью, а их уровень экспрессии и функциональная активность меняются как в физиологических условиях, так и при патологических процессах и заболеваниях (Alvarez-Garcia I., Miska E.A., 2005; Mumford S.L. et al., 2018).

МикроРНК могут одновременно регулировать экспрессию до 90% генома человека, но при этом пока далеко не все мишени для них определены (Su W. et al., 2014). Молекулы микроРНК являются перспективными из-за возможности применения их особенностей для оптимизации диагностики, прогнозирования течения онкологических заболеваний, в том числе и меланомы кожи, хотя функции микроРНК и их мишени являются объектом дальнейшего уточнения (Liu B. et al., 2014).

Многочисленные исследования показали, что изменения экспрессии микроРНК определяются при различных злокачественных опухолях, включая карциному молочной железы, глиобластому, рак легких, щитовидной железы, толстой кишки и поджелудочной железы (Ha T.Y., 2011; Li Y. et al., 2012). При этом также показано, что соотношение уровней различных микроРНК (профиль микроРНК) в клетках изменяется в процессе малигнизации, становясь специфичным для отдельного заболевания (Lu J. et al., 2005). По своей функциональной роли отдельные микроРНК могут выступать в роли онкогенов и онкосупрессоров, такие микроРНК объединяют в класс так называемых «онко-микроРНК» и интенсивно исследуют для определения возможности их использования в качестве биомаркеров (Zhang Y.C. et al., 2015; Mumford S.L. et al., 2018).

Несмотря на достаточное число публикаций по определению характера экспрессии микроРНК при меланоме кожи, характеризацию экспрессионного профиля микроРНК при данной патологии трудно назвать завершенной и разъясненной. Это обусловлено, с одной стороны, различием методических подходов, с другой стороны – обнаружением новых видов микроРНК, которые не определялись в более ранних работах, а также тем, что имеется мало аналитических работ, касающихся функционирования микроРНК в клетках меланомы (Rojo Arias J.E., Busskamp V., 2019).

В этой связи актуальными являются исследования, основанные на глобальном профилировании микроРНК при меланоме кожи в сравнении с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями кожи с использованием экспрессионного анализа на основе микроэрея, и поиск новых потенциальных терапевтических мишеней с помощью методов биоинформатики среди дифференцированно-экспрессирующихся молекул микроРНК, а также дальнейшее исследование функционирования этих молекул в качестве регуляторов опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи.

Степень разработанности темы исследования

МикроРНК расцениваются не только в качестве перспективных онкомаркеров, так как обладают выраженной тканеспецифичностью и дифференцированным экспрессионным профилем в норме и при патологии, но также и в качестве потенциального «инструмента» для регулирования биологических процессов в клетке, из-за своей способности изменять экспрессию генов (Filipów S., Łaczmanski Ł., 2019). Особенности этой регуляции с многообразием эффектов многочисленного количества видов

микроРНК в различных клетках остаются до конца не исследованными, как и сам профиль микроРНК. Как упоминалось ранее, имеются исследования по определению характера экспрессии микроРНК при различных злокачественных новообразованиях, а также меланоме кожи, но при этом окончательно охарактеризовать экспрессионный профиль и функциональные характеристики большинства видов микроРНК весьма затруднительно из-за различия методических подходов и идентификации новых видов микроРНК, которые не определялись в более ранних работах (Witwer K.W., Halushka M.K., 2016). Кроме того, в отношении меланомы кожи недостаточно аналитических работ, касающихся тщательного анализа функциональной связи молекул микроРНК с механизмами опухолевой прогрессии, а молекулярные механизмы функционирования большинства микроРНК, имеющих дифференцированные уровни экспрессии при меланоме, остаются не установленными, что противоречит требованиям современного направления фундаментальной онкологии – молекулярной онкологии. В последние 10 лет направления исследований в отношении микроРНК не изменились, они выполняются по двум основным направлениям – профилирование микроРНК при различных заболеваниях с дальнейшим сравнительным анализом, а также фундаментальные исследования структуры/строения/механизмов действия микроРНК, идентификации их молекул-мишеней (Takada S., Asahara H., 2012). Сложность регуляторных взаимодействий между молекулой микроРНК и ее прямыми/непрямыми мишенями, описываемая различными авторами, а также установленная в последние годы способность микроРНК участвовать в процессах метилирования ДНК и явлении альтернативного сплайсинга (Xiao M. et al., 2017), не позволяет однозначно спрогнозировать функциональный эффект определенной микроРНК, несмотря на наличие биоинформатических платформ для реализации этих целей, поэтому ниша реальных функциональных свойств и то, насколько они соответствуют прогнозируемым эффектам, остается малоизученной не только при различных онкопатологиях, но и при меланоме кожи в частности. Научная стратегия данного исследования направлена на объединение имеющихся подходов, в том числе с подключением методов биоинформатики, с целью исследования функций новых онко-микроРНК при меланоме кожи *in vitro*, что может служить не только пополнением данных функционального каталога микроРНК при меланоме, но и позволит рассмотреть данные молекулы в качестве новых потенциальных мишеней в диагностических и терапевтических направлениях.

Цель исследования

Провести сравнительный анализ экспрессионного профиля микроРНК при меланоцитарных новообразованиях кожи, установить функции ряда ранее не изученных дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК в отношении регуляции различных параметров опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи *in vitro* и оценить потенциал данных молекул в качестве мишеней для разработки терапевтического воздействия.

Задачи исследования

1. Исследовать методом микрочипирования и сравнить профили экспрессии микроРНК в клетках меланомы кожи с профилями экспрессии данных молекул в клетках доброкачественных меланоцитарных новообразований кожи в архивном материале – биоптатах, фиксированных в формалине и заключенных в парафин, и нативном материале, фиксированном в РНК-стабилизирующем растворе, определить значимость условий хранения и фиксации материала для адекватности отражения профиля микроРНК;
2. Провести оценку валидации микрочипирования методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ);
3. Для совокупности микроРНК, имеющих измененные уровни экспрессии при сравнении экспрессионных профилей меланомы кожи и доброкачественных меланоцитарных новообразований кожи, провести биоинформатический поиск и анализ сигнальных путей, задействованных при развитии меланомы кожи;
4. Осуществить выбор дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК при меланоме кожи с целью дальнейшего исследования функциональной роли на клетках меланомы кожи *in vitro* на основе показателя кратности различий по данным микрочипирования, характера изменения экспрессии (увеличение или снижение), результатов биоинформатического поиска и анализа сигнальных путей и генов-мишеней, регулируемых исследуемыми микроРНК, а также литературных данных об участии в процессах канцерогенеза соответственно;
5. Осуществить трансфекцию специфических модуляторов (ингибиторов/имитаторов) экспрессии отобранных для исследования дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК в клетки меланомы кожи, оценить эффективность трансфекции методом ПЦР-РВ прямым методом (по изменению характера экспрессии исследуемых микроРНК в условиях воздействия специфическими модуляторами экспрессии), а также непрямым (по изменению экспрессии генов-мишеней положительных контролей);
6. Осуществить анализ пролиферации/жизнеспособности, апоптоза, миграции, инвазии, клоногенности клеток меланомы кожи линий BRO и SK-MEL1 после трансфекции в клетки специфических модуляторов экспрессии отобранных дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК;
7. После трансфекции в клетки меланомы кожи модуляторов экспрессии исследуемых микроРНК методом ПЦР-РВ осуществить анализ экспрессии генов-мишеней данных микроРНК, идентифицированных по результатам биоинформатического анализа и являющихся регуляторами канцерогенеза.
8. На основании исследования функциональных свойств отобранных дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК в клетках меланомы кожи определить роли и установить механизмы функционирования данных микроРНК при меланомогенезе в качестве новых аспектов патогенеза меланомы кожи;
9. Оценить отобранные дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК в качестве потенциальных мишеней для регуляции различных

параметров жизнедеятельности клеток меланомы кожи с целью совершенствования подходов диагностики и терапии данного злокачественного новообразования.

Научная новизна исследования

1. Впервые установлено, что однотипные образцы меланомы кожи с разными способами фиксации несопоставимы для сравнения и анализа микроРНК.
2. Впервые исследованы и установлены функциональные роли дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-204 и miR-3065 при меланоме кожи в клетках меланомы кожи *in vitro*.
3. Впервые исследованы параметры опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи (пролиферация/жизнеспособность, апоптоз, миграция, инвазия, клоногенность) в условиях воздействия специфических модуляторов (ингибиторов/имитаторов) экспрессии микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-204, miR-3065 и установлены про-/противоопухолевые эффекты при их применении.
4. Выявлены новые механизмы опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи с участием микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-204 и miR-3065, заключающиеся в регуляции экспрессии онкогенов/онкосупрессоров *APLN*, *FPGS*, *HMGA1*, *RRN3*, *GRP55*, *HIPK1*, *ITGA1*, *BCL2* и *TGFBR1*, являющихся генами-мишенями данных микроРНК.

Теоретическая значимость работы

Исследование носит фундаментальный характер, научные результаты которого, в частности, установленные профили онко-микроРНК при меланоме кожи, их прогностическая и диагностическая значимость, а также новые механизмы опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи с участием микроРНК, могут быть применены и существенно дополняют информацию в области клеточной биологии, а также патофизиологии с целью уточнения механизмов жизнедеятельности опухолевых клеток и патогенеза не только меланомы, но и других злокачественных новообразований. Полученные новые научные знания могут быть использованы в дальнейшем для решения задач оптимизации диагностики злокачественных опухолей, а также являться предпосылкой для разработки новых подходов лечения меланомы кожи с «прицелом» на микроРНК, либо на установленные механизмы при их участии. Также полученная в данном исследовании информация о функциях микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204 в клетках меланомы кожи, является ценным пополнением функционального каталога микроРНК при меланоме.

Практическая значимость работы и внедрение результатов

Результаты исследования полного экспрессионного анализа микроРНК в клетках меланомы кожи и доброкачественных меланоцитарных новообразований кожи были загружены в общедоступное хранилище архивных данных геномики «ArrayExpress» с инвентарным номером E-MTAB-4915 в

соответствии с требованиями сообщества функциональной геномики «FGED» (от англ. The Functional Genomics Data Society) в формате, удобном для независимой проверки и анализа, и могут быть представлены научному исследовательскому сообществу для повторного использования. Результаты проведенного исследования внедрены в учебный процесс кафедры патологической физиологии имени профессора В.В. Иванова федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, учебный процесс кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», а также в практику краевого государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Красноярское краевое патолого-анатомическое бюро».

Методология и методы исследования

Исследование носит экспериментальный характер, материалом которого являются биоптаты меланомы кожи и доброкачественных меланоцитарных новообразований кожи, клеточные культуры меланомы кожи линий BRO и SK-MEL1. Для решения поставленных задач были использованы следующие методы исследования: морфологические (анализ окрашенных гематоксилином и эозином гистологических срезов, макродиссекция), клеточно-биологические (культивирование клеток меланомы кожи, транзиторная трансфекция специфических ингибиторов и имитаторов микроРНК, оценка уровня апоптоза методом проточной цитометрии, пролиферации/жизнеспособности клеток – методом МТТ-теста, миграции и инвазии при помощи миграционных камер, клоногенности – на основе спектрофотометрии), биоинформатические (анализ сигнальных путей, генов-мишеней и генных онтологий), молекулярно-биологические (микроэrray, ПЦР-РВ), статистические.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспрессионные профили микроРНК, определенные на основе микрочипирования в клетках меланомы кожи по сравнению с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями кожи, имеют различия, что указывает на регуляторную роль дифференцированно-экспрессирующихся молекул микроРНК при меланомогенезе. При этом различные способы фиксации материала влияют на результаты профилизации микроРНК, что обуславливает необходимость осуществления единого подхода для выполнения анализа профилей микроРНК с последующей валидацией.
2. Дифференцированно-экспрессирующиеся микроРНК при меланоме кожи регулируют сигнальные пути и гены-мишени, принимающие участие в

канцерогенезе, в частности, в процессах пролиферации, апоптоза, миграции, инвазии.

3. Трансфекция специфических модуляторов экспрессии (ингибиторов/имитаторов) микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204 в клетки меланомы кожи эффективна и оказывает про-/противоопухолевые эффекты на пролиферацию/жизнеспособность, апоптоз, миграцию, инвазию, клоногенность клеток меланомы, а также приводит к изменению экспрессии генов *APLN*, *FPGS*, *HMGA1*, *RRN3*, *GRP55*, *HIPK1*, *ITGA1*, *BCL2* и *TGFBR1*.

4. Дифференцированно-экспрессирующиеся микроРНК при меланоме кожи miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204, как регуляторы экспрессии компонентов сигнальных путей, связанных с канцерогенезом и меланомагенезом, влияют на основные параметры опухолевой прогрессии клеток меланомы кожи (пролиферацию/жизнеспособность, апоптоз, миграцию, инвазию клоногенность), регулируя экспрессию генов онкогенов/онкосупрессоров *APLN*, *FPGS*, *HMGA1*, *RRN3*, *GRP55*, *HIPK1*, *ITGA1*, *BCL2* и *TGFBR1*, являющихся генами-мишенями данных микроРНК, что дает новые представления об аспектах патогенеза меланомы кожи и характеризует данные молекулы в качестве перспективных мишеней для разработки новых диагностических и терапевтических подходов.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные положения и результаты данного диссертационного исследования были представлены и обсуждены на Международном семинаре Европейской организации молекулярной биологии «The EMBO Workshop «Cellular and Molecular Mechanism of Tumour-Microenvironment Crosstalk»» 2015 г., г. Томск, Россия; на XXI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии-2015» 2015 г., г. Санкт-Петербург; на 45-ой ежегодной международной конференции Европейского сообщества экспериментальной дерматологии «45th Annual ESDR Meeting» 2015 г., г. Роттердам, Нидерланды; на Научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Путь в науку» 2016 г., г. Москва; на 46-ой ежегодной международной конференции Европейского сообщества экспериментальной дерматологии «46th Annual ESDR Meeting» 2016 г., г. Мюнхен, Германия; на 47-ой ежегодной международной конференции Европейского сообщества экспериментальной дерматологии «47th Annual ESDR Meeting» 2016 г., г. Зальцбург, Австрия; на 22-ом Международном симпозиуме имени Чарльза Хейдельбергера по исследованию рака «The 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research» 2018 г., г. Томск, Россия; на 23-ем всемирном конгрессе по достижениям в онкологии и 22-ом международном симпозиуме по молекулярной медицине «23nd World Congress on Advances in Oncology and 22nd International Symposium on Molecular Medicine» 2018 г., г. Афины, Греция; на 49-ой ежегодной международной конференции Европейского сообщества экспериментальной дерматологии «49th Annual ESDR Meeting» 2019 г., г.

Бордо, Франция; на заседании проблемной комиссии «Фундаментальная медицина» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол заседания № 1 от 26 ноября 2020 г.

Результаты данного диссертационного исследования представлены в проекте, занявшем I место в направлении «Трансляционная медицина» ежегодного общероссийского научно-практического мероприятия «Эстафета вузовской науки – 2021», проводимого в рамках Международного медицинского форума «Вузовская наука. Инновации».

Научные результаты исследования получены путем реализации современных высокопроизводительных молекулярно-биологических технологий на оптимальном количестве материала, который был подвергнут адекватному статистическому анализу. Все эксперименты выполнены в трех технологических повторах, для микрочипирования использовали спектр контролей качества с автоматизированной оценкой, валидацию его результатов осуществляли методом ПЦР-РВ, по результатам трансфекции специфических модуляторов экспрессии микроРНК проводили анализ эффективности трансфекции на основе ПЦР-РВ (прямым и косвенным способами), а нормализацию результатов ПЦР-РВ осуществляли по двойным эндогенным нормирующим контролям.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационного исследования опубликованы 33 печатные работы, из которых 14 статей – в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, 4 статьи – в зарубежных изданиях, включенных в международные базы цитирования, 1 монография, а также 1 патент РФ на изобретение.

Объём и структура диссертации

Диссертационное исследование изложено на 250 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав, посвященных обзору литературы и описанию материала и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, а также заключения, выводов, практических рекомендаций, списка цитированной литературы, который включает 17 отечественных источников и 325 работ зарубежных авторов, списка публикаций по теме работы и благодарностей. Работа иллюстрирована 22 таблицами и 49 рисунками.

Финансовая поддержка работы

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта фонда Президента РФ для молодых ученых «Молекулярно-генетические маркеры

диагностики и прогнозирования течения меланомы кожи» (МД-901.2013.7, 2013-2014 гг.); гранта РНФ «Экспрессия и роль микроРНК при меланоме кожи» (14-15-00074, 2014-2018 гг.).

Личный вклад соискателя

Все описанные в данном диссертационном исследовании результаты получены лично автором, либо под его руководством. Автору также принадлежит непосредственное участие и ведущая роль в получении исходных данных и осуществлении описанных экспериментальных методик, анализе, обобщении и статистической обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций. Эксперименты с использованием метода «Микроэррей» были выполнены совместно с к.б.н. А.В. Коминой, с использованием проточной цитометрии – с А.В. Мошевым, биоинформатический анализ – совместно с к.м.н. М.Б. Аксененко. Теоретические обобщения и выводы по результатам исследования осуществлялись автором самостоятельно.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования представлен в виде схемы (рис. 1). Исследование выполнено на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии ФЗ от 21.11.2011 № 323-ФЗ (ред. от 29.05.2019) «Об основах охраны здоровья граждан в РФ» после одобрения локальным этическим комитетом (протокол №70/2016 от 06.06.2016 г.).

Меланоцитарные новообразования кожи (МНОК) в виде FFPE-биоптатов (от англ. Formalin Fixation Paraffin Embedding – фиксированные в формалине и заключенные в парафин) являлись архивным материалом краевого государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» и краевого государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Красноярское краевое патологоанатомическое бюро». Из полученных образцов изготавливали гистологические срезы, окрашивали гематоксилином и эозином с целью подтверждения клинического диагноза и определения процентного содержания опухолевой/невусной ткани на срезе. FFPE-биоптаты МНОК включали образцы меланомы кожи (МК) (n=33) и образцы доброкачественных меланоцитарных новообразований кожи (ДМНОК) (n=13). Половозрастные характеристики для МК: мужчины составили 55%, а женщины – 45%, средний возраст больных – $55 \pm 1,34$ лет; для ДМНОК: мужчины – 25%, женщины – 75%, средний возраст пациентов составил $39 \pm 3,03$ лет.

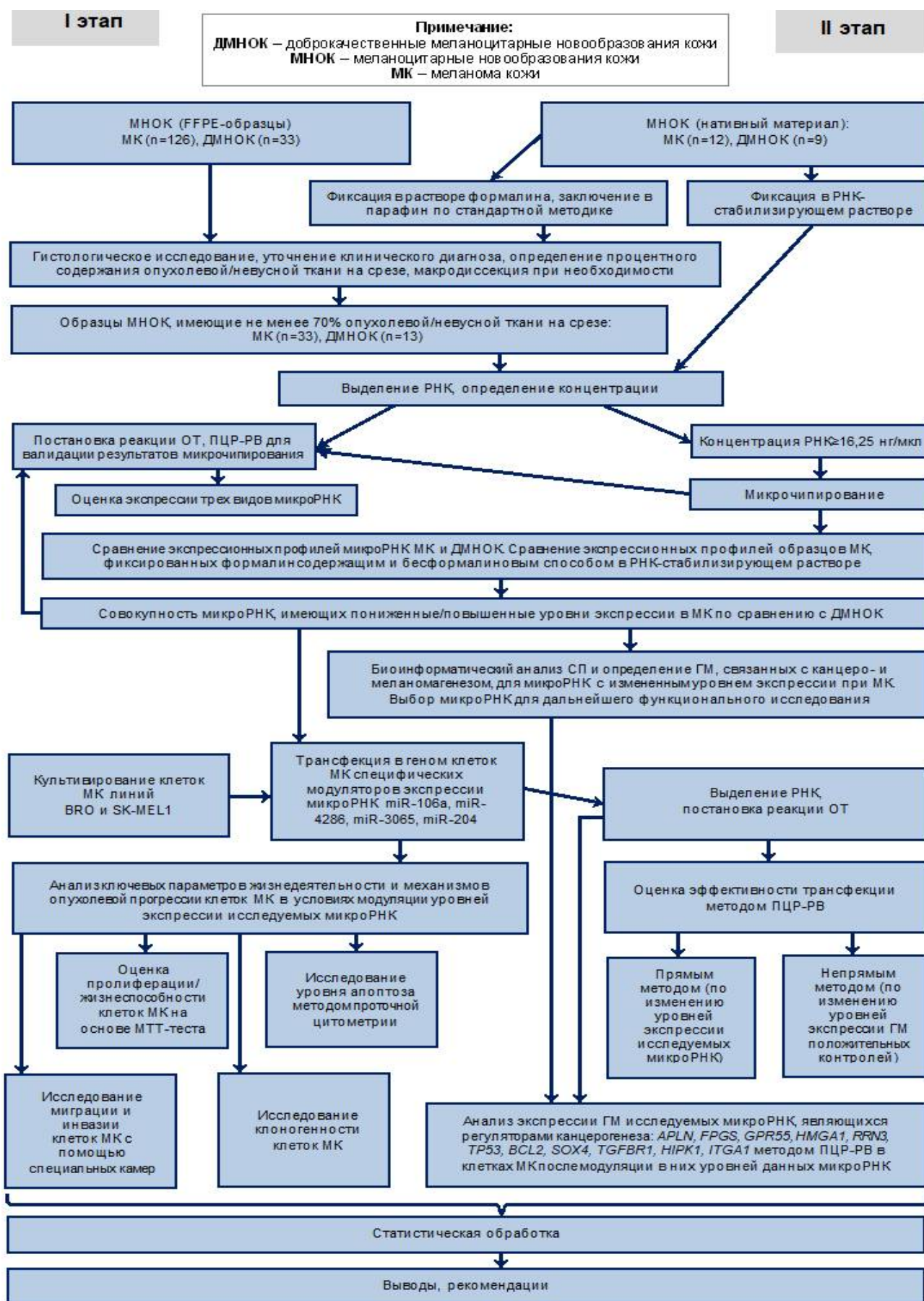


Рисунок 1. Схема дизайна исследования

Нативный материал в виде интраоперационных биоптатов МНОК получен с согласия пациентов в краевом государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Красноярский краевой клинический онкологическом диспансере имени А.И. Крыжановского». Образцы ткани делили на две равные части. Одну часть помещали в раствор стабилизации РНК на основе солей аммония RNAlater Solution (Ambion, США), другую – фиксировали в растворе 10% нейтрального формальдегида и заключали в парафин по стандартной методике (FFPE). Из FFPE-образцов изготавливали гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином с целью подтверждения диагноза и определения процентного содержания опухолевой/невусной ткани в образце. Выборка нативных образцов состояла из образцов МК (n=12) и образцов ДМНОК (n=9). Половозрастные характеристики нативных образцов МК: мужчины составили 42%, а женщины – 58%, средний возраст больных – $56 \pm 2,23$ лет, а нативных образцов ДМНОК: мужчины – 44%, женщины – 56%, средний возраст пациентов – $36 \pm 2,74$ лет.

Клеточные культуры – клетки МК линий BRO и SK-MEL1 (ATCC® HTB67™). Линия BRO была предоставлена федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск), а линия SK-MEL1 – федеральным государственным бюджетным учреждением «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» федерального медико-биологического агентства России (г. Москва). Клетки культивировали в условиях CO₂-инкубатора Sanyo MSO-5AC CO₂ incubator (Sanyo Electric Co., Япония) при 37°C и содержании CO₂ 5%, в питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином (Gibco, LifeTechnologies, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки FBS (Gibco, LifeTechnologies, США) с добавлением комплекса «Антибиотик-антимикотик» Antibiotic-Antimycotic 100x (Gibco, LifeTechnologies, Англия).

Морфологическое исследование биоптатов, макродиссекция

Из FFPE-образцов МНОК изготавливали гистологические срезы толщиной 3-5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином и визуализировали при ув. x100 и x400 с помощью микроскопа Olympus BX-41 с видеодокументирующей системой «Olympus u-CMAD3» (Olympus, Япония) и программного обеспечения «Infinity Capture», «Infinity Analyze Software» v.4.6.0 (Lumenera Corporation, США). По результатам микроскопического определения содержания опухолевых/невусных клеток на всем протяжении гистологического среза для дальнейшего исследования отбирали образцы, содержащие не менее 70% опухолевой/невусной ткани на срезе, либо полностью из нее состоящие. Образцы, содержащие меньшее количество опухолевой/невусной ткани на срезе, подвергали ручной макродиссекции (Hamilton P.W. et al., 2015).

Выделение РНК из FFPE-образцов при помощи набора реагентов RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation kit for FFPE (Invitrogen, LifeTechnologies, США) по протоколу производителя осуществляли после получения серийных срезов толщиной 15 мкм на микротоме, которые депарафинизировали ксилолом 30 мин при 50°C, отмывали этанолом 96% и высушивали при 50°C 30-45 мин. Выделение РНК из нативных образцов МНОК, фиксированных РНК-стабилизирующем растворе, осуществляли при помощи набора RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Германия), а выделение РНК из клеток культур МК – при помощи комплекта реагентов для выделения РНК Рибо-золь-В (Amplisens, Россия), согласно инструкции производителя.

Оценку концентрации тотальной РНК и микроРНК осуществляли флуориметрическим методом на приборе Qubit® 2.0 (Invitrogen, LifeTechnologies, Сингапур) при помощи наборов реагентов Qubit® HS RNA Assay kit (Invitrogen, LifeTechnologies, США) и Qubit® microRNA Assay kit (Invitrogen, LifeTechnologies, США). Наличие примесей белка и фенолов определяли с помощью оценки коэффициентов поглощения при длинах волн 260/280 и 260/230 на спектрофотометре Nano Vue Plus (GE Healthcare, США).

Микроэррей (микрочипирование) образцов осуществляли при помощи системы GeneAtlas® Personal Microarray System (Affymetrix, США) и набора реагентов GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix, США) согласно протоколу производителя. Для этого с 8 мкл раствора очищенной РНК, содержащего не менее 130 нг микроРНК, ставили реакцию полиаденилирования и последующего биотинилирования с использованием набора реагентов FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit (Affymetrix, США) в соответствии с протоколом производителя. Затем меченные биотином молекулы нуклеиновых кислот подвергали гибридизации в течение 20 ч при 48°C на микрочипах GeneChip™ miRNA 4.1 Array Strip (Affymetrix, США), созданных на основе базы данных микроРНК «mirBase» v.20, содержащих ячейки для гибридизации и предназначенных для оценки экспрессионных уровней 2578 зрелых микроРНК человека. Далее производили отмывку микрочипов от несвязавшихся молекул в автоматическом режиме при помощи стационарного модуля системы GeneAtlas® – промывочной станции Fluidic Station и осуществляли их окраску реагентами набора GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit (Affymetrix, США). Детекцию интенсивности флуоресценции в ячейках микрочипа осуществляли в стационарном модуле системы GeneAtlas® – Imaging Station. Обработку данных интенсивности флуоресцентного сигнала, с преобразованием его в относительные экспрессионные уровни молекул микроРНК, производили при помощи программы «Expression Console software» (Build 1.4.0.38) (Affymetrix, США).

Контроль качества микрочипирования на каждом этапе – полиаденилировании, биотинилировании, мечении и гибридизации, а также

квантильную нормализацию и коррекцию на фон осуществляли путем автоматического анализа с помощью программного обеспечения GeneAtlas® внешних и внутренних контролей из комплекта реагентов GeneChip™ Hybridization Control Kit (Affymetrix, США), добавляемых в пробы.

Для валидации результатов микроэрея проводили постановку ПЦР-РВ с определением уровней экспрессии трех видов микроРНК: miR-363-3p, miR-513a, miR-3591-3p, выбранных случайно из групп микроРНК, имеющих различные характеристики, такие как различная кратность и направленность изменения экспрессии микроРНК в исследовании, различная длина, различный гуанин-цитозиновый состав (Benjamini Y., Speed T.P., 2012).

ПЦР-РВ

С выделенной РНК осуществляли постановку реакции обратной транскрипции (ОТ) для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) при помощи комплектов реагентов Реверта (Амплисенс, Россия) и MMLV RT kit (Евроген, Россия) по прилагаемым протоколам при 37°C в течение 30 мин. Для реакции ОТ с целью исследования уровней экспрессии мРНК применяли случайные декануклеотидные праймеры, а для ОТ с целью исследования уровней экспрессии микроРНК, вместо случайных праймеров использовали специфичные для каждого вида микроРНК 5х-праймеры, входящие в коммерческие наборы для исследования уровней экспрессии (кат. № 4427975, Applied Biosystems, США). Реакционная смесь для ОТ содержала на каждый мкл раствора очищенной РНК: 0,4 мкл смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, 0,4 мкл ОТ-буфера, 0,15 мкл РНК-элюента и 0,05 мкл ревертазы. Для реакции амплификации с полученными кДНК использовали специфичные 20х-праймеры для каждого вида исследуемых микроРНК и мРНК, входящие в коммерческие наборы, содержащие также зонд и праймеры - TaqMan™ Gene Expression Assay (кат. № 4331182, Applied Biosystems, США) и TaqMan™ MicroRNA & Non-coding RNA Assays (кат. № 4427975 и 4440886 Applied Biosystems, США). Используемые наборы для определения экспрессии мРНК: *HMGA2* (Hs04397751_m1), *TWF1* (Hs00702289_s1), *APLN* (Hs00936329_m1), *GPR55* (Hs00271662_s1), *HMGA1* (Hs00852949_g1), *FPGS* (Hs00191956_m1), *TP53* (Hs01034249_m1), *RRN3* (Hs04398176_m1), *BCL2* (Hs04986394_s1), *SOX4* (Hs04987498_s1), *TGFBR1* (Hs00610320_m1), *HIPK1* (Hs01035212_m1), *ITGA1* (Hs00235006_m1). Используемые наборы для определения экспрессии микроРНК: miR-363-3p (001271), miR-513a (002090), miR-3591-3p (464780_mat), miR-106a (002169), miR-4286 (241500_mat), miR-3065 (242265_mat), miR-204 (000508). Эндогенными нормирующими контролями для исследования экспрессионных уровней мРНК являлись: *ACTB* (Hs01060665_g1) и *HPRT1* (Hs01003267_m1), а для микроРНК – малые некодирующие РНК: U6 snRNA (001973) и RNU6B (001093). Для амплификации с использованием ПЦР-системы StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Сингапур) реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 1 мкл смеси зонда и 20х-

праймеров из наборов TaqMan™, 8 мкл 2,5-кратной реакционной смеси для ПЦР-РВ в присутствии ROX (Синтол, Россия), 2 мкл кДНК для исследования экспрессии мРНК либо 1,33 мкл кДНК для исследования экспрессии микроРНК, безнуклеазную воду. Протокол термоциклирования: 50°C – 2 мин, 95°C – 10 мин, затем 40 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 1 мин, с детекцией флуоресцентного сигнала карбокси-X-родамина (ROX). Данные были проанализированы с использованием методов «ΔCT» (Chan S.H. et al., 2008) и «ΔΔCT» (Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001).

Биоинформатический анализ сигнальных путей (СП) и генов-мишеней (ГМ) с использованием баз данных и программных продуктов был проведен для совокупности дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК при МК с учетом направления (повышение или снижение) изменения уровня экспрессии. Базовые характеристики измененных микроРНК определяли с помощью онлайн-базы данных «miRBase» (Griffiths-Jones S. et al., 2006). Биоинформатический анализ СП в соответствии с Киотской классификацией генов и геномов (KEGG) (Kanehisa M., 2002; Kanehisa M. et al., 2017) при участии микроРНК, имеющих дифференцированные уровни экспрессии при МК в отличие от ДМНОК, проводили с помощью алгоритмов базы данных «DIANA-mirPath» v.2, v.3 (Vlachos I.S. et al., 2012; Vlachos I.S. et al., 2015). Поиск ГМ для исследуемых микроРНК также осуществляли при помощи специализированных онлайн-ресурсов, в качестве мишеней для исследуемых микроРНК для последующего анализа отбирали только гены, идентифицированные алгоритмами одновременно нескольких баз данных (Witkos T.M. et al., 2011) из следующего списка: «TargetScan» v.6.2, v.7.0 (Agarwal V. et al., 2015), «miRWalk» v.2.0 (Sticht C. et al., 2018), «miRTarBase» v.4.5 (Chou C.H. et al., 2018), «DIANA-TarBase» v.7.0, v.8.0 (Vlachos I.S. et al., 2015; Karagkouni D. et al., 2018), а также «miRDB» v.4.0, v.5.0 (Wong N., Wang X., 2015). Данные из различных ресурсов объединяли при помощи кодирования через онлайн-платформу «DIANA-microT-CDS» (Paraskevopoulou M.D. et al., 2013). При анализе ГМ при помощи базы «miRDB» учитывали прогностический индекс «Target score», и для анализа использовали только ГМ со значениями индекса, равными 80-100, что указывает на то, что эти гены могут расцениваться в качестве реальных ГМ (Wong N., Wang X., 2015). Единство СП и ГМ, определенных при помощи различных источников, оценивали путем построения диаграмм Эйлера-Венна с помощью электронного ресурса «Bioinformatics & Evolutionary Genomics». Для интерпретации биологических функций ГМ осуществляли анализ генных онтологий в соответствии с основными разделами международной базы данных генных онтологий «The Gene Ontology Resource» при помощи специализированной интернет-платформы «PANTHER™» v.8.0, v.10.0 (Mi H. et al., 2013).

Транзиторную трансфекцию специфических ингибиторов и имитаторов микроРНК и их контролей в клетки МК линий BRO и SK-MEL1 в

концентрации 1×10^5 /мл осуществляли в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂ в бессывороточной питательной среде. Использовали коммерческие ингибиторы микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065, miR-204 Anti-miR™ miRNA Inhibitors (кат. № AM17000, AM12567, AM17048, AM11116, AM18328, Ambion, США), положительный контроль для ингибиторов Anti-miR™ hsa-let-7c miRNA Inhibitor Positive Control (кат. № 4392431, Invitrogen, США) и отрицательный контроль для ингибиторов Anti-miR™ miRNA Inhibitor Negative Control #1 (кат. № AM17010, Invitrogen, США), а также коммерческие имитаторы микроРНК miR-3065 и miR-204 Invitrogen™ mirVana™ miRNA Mimics (кат. № 4464066, MC11116, MC18328, Invitrogen, США), контроли для имитаторов – положительный контроль mirVana™ miRNA Mimic miR-1 Positive Control (кат. № 4464062, Invitrogen, США) и отрицательный контроль mirVana™ miRNA Mimic Negative Control #1 (кат. № 4464058, Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. В качестве трансфектанта использовали Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent, а также Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen, США). Для оптимизации условий трансфекции предварительно осуществляли раститровку по количеству трансфектанта, ингибиторов и имитаторов с оценкой эффективности трансфекции методом ПЦР-РВ, по результатам которой подобрана оптимальная концентрация вводимых олигонуклеотидных модуляторов в питательной среде, равная 250 наноМоль/л.

Анализ эффективности трансфекции модуляторов экспрессии микроРНК в клетки МК оценивали методом ПЦР-РВ через 24 ч после трансфекции двумя способами: прямым – по однонаправленному изменению уровней экспрессии модулируемых микроРНК в клетках МК, трансфицированных имитаторами/ингибиторами в сравнении с уровнями экспрессии данных микроРНК в клетках МК, трансфицированных одноименными отрицательными контролями, и непрямым – по изменению уровней экспрессии мРНК ГМ для положительных контролей ингибиторов и имитаторов в клетках МК, трансфицированных данными контролями, по сравнению с уровнями экспрессии данных ГМ в клетках, трансфицированных отрицательными контролями. Положительным контролем ингибирования Anti-miR™ hsa-let-7c miRNA Inhibitor Positive Control (кат. № 4392431, Invitrogen, США) является ингибитор микроРНК miR-let-7c, а положительным контролем имитаторов mirVana™ miRNA Mimic miR-1 Positive Control (кат. № 4464062, Invitrogen, США) – имитатор микроРНК miR-1. МикроРНК miR-let-7c и miR-1 являются регуляторами экспрессии генов *HMGA2* (high mobility group AT-hook 2) и *TWF1* (*PTK9*) (twinfilin actin binding protein 1) соответственно (Lee Y.S., Dutta A., 2007; Kinoshita T. et al., 2012). Эффективная трансфекция положительного контроля ингибитора приводит к повышению уровня экспрессии *HMGA2*, поскольку блокирующая его синтез микроРНК ингибирована, а эффективная трансфекция положительного контроля

имитатора – к снижению уровня экспрессии *TWFl*, что связано с РНК-интерференцией.

Оценку пролиферации/жизнеспособности клеток МК через 24 ч после трансфекции специфических модуляторов микроРНК осуществляли на основе МТТ-теста (Mosmann T., 1983). Суспензии опухолевых клеток МК в концентрации 1×10^5 /мл рассеивали в 96-луночные планшеты рядами, соответствующими времени регистрации результатов МТТ-теста с момента трансфекции (24 ч, 48 ч, 72 ч и 96 ч). В очередное время регистрации результатов МТТ-теста в каждую лунку исследуемого ряда вносили по 15 мкл раствора МТТ (Invitrogen, США) в концентрации 5 мг/мл в фосфатном буфере и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 4 ч. Затем удаляли питательную среду, а клеточный осадок вместе с восстановленным, благодаря метаболизму клеток, МТТ (формазаном), приобретающим фиолетовый цвет, растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида (MP Biomedicals, Франция) и измеряли оптическую плотность супернатантов при длине волны 560 нм на планшетном фотометре ЭФОС-9305 (Швабе, Россия). Уровни полученной оптической плотности принимали соответственными уровням пролиферации/жизнеспособности клеток.

Для исследования апоптоза методом проточной цитометрии через 24 ч после трансфекции модуляторов микроРНК клетки МК окрашивали аннексином V-FITC и 7-AAD, входящими в набор реагентов для исследования апоптоза Annexin V-FITC/7-AAD (BeckmanCoulter, Франция), согласно протоколу производителя, а далее анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (BeckmanCoulter, США). Распределение клеток на регионы на двухпараметрических диаграммах (живые клетки, преапоптоз, апоптоз/некроз, некроз) осуществляли в автоматическом режиме на программном обеспечении цитофлуориметра с определением процентного соотношения клеток в каждом регионе.

Исследование миграции и инвазии клеток МК через 24 ч после трансфекции модуляторов экспрессии микроРНК осуществляли с использованием специальных камер и реагентов, входящих в набор CytoSelect™ 24-Well Cell Migration and Invasion Assay (8 µm, Colorimetric Format) (Cell Biolabs, США) в соответствии с прилагаемым протоколом и только на клеточной культуре BRO, так как исследование этих параметров у клеток SK-MEL1 представляет затруднение в силу низкой адгезивной способности и малоинвазивности (Gouon V. et al., 1996). Дно камер-вставок для исследования миграции представлено перфорированной поликарбонатной мембраной с отверстиями диаметром 8 мкм, а для исследования инвазии – дополнительно покрыто слоем матригеля. Оценку миграции осуществляли после внесения клеток в камеры для миграции и инкубации в них при 37°C и 5% CO₂ в течение 22-24 ч. После инкубации непромигрировавшие клетки с

внутренней стороны мембраны удаляли механически, а саму мембрану фиксировали и окрашивали раствором Cell Stain Solution, входящим в набор реагентов, затем промывали и высушивали. Высушенные мембраны с окрашенными клетками помещали в 200 мкл экстракционного раствора Extraction Solution для растворения клеток и измеряли интенсивность окраски лизатов на планшетном фотометре ЭФОС-9305 (Швабе, Россия) при длине волны 560 нм. Оценку инвазии проводили аналогичным образом, но через 48 ч после помещения клеток в камеры, а перед окраской мембран механически удаляли не только непроинвазивировавшие/непротигрировавшие клетки, но и матригель. Уровни миграции и инвазии принимали соответствующими величине поглощения при 560 нм.

Для исследования клоногенности клеток МК, через 24 ч после трансфекции модуляторов экспрессии микроРНК и отрицательных контролей, в лунки 6-луночного планшета одновременно помещали по 1000 клеток. Далее клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 5-10 суток до формирования заметных невооруженным глазом колоний, насчитывающих 50 и более клеток в каждой. Контроль числа клеток в колониях осуществляли ежедневно при визуализации в микроскоп. Эксперимент останавливали при формировании колоний в 50 и более клеток в отрицательных контролях. Колонии в лунках фиксировали 70% этанолом, окрашивали 0,05% раствором генциана фиолетового (Sigma-aldrich, Германия), промывали, высушивали и осуществляли подсчет их количества при визуализации невооруженным глазом. Исследование клоногенности на клетках меланомы SK-MEL1 не проводили из-за их малой адгезивности.

Статистическую обработку результатов ПЦР-РВ, уровней пролиферации/жизнеспособности, апоптоза, миграции, инвазии и клоногенности осуществляли при помощи пакета программного обеспечения «Statistica» v.6.0, v.6.1 (StatSoft, Россия) с использованием *U*-критерия Манна-Уитни. Статистическую обработку данных микрочипирования методом однофакторного дисперсионного анализа «ANOVA» (от англ. ANalysis Of VAriance) и упорядочивание данных, имеющих значимые различия, методом иерархической кластеризации на тепловой карте, осуществляли в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения «Expression Console» и «Transcriptome Analysis Console» v.2.0, v.3.0 (Affymetrix, США). При сравнении профилей микроРНК по результатам микрочипирования применяли коррекцию уровней значимости различий при помощи метода множественного сравнения Бенджамини-Хохберга с использованием коэффициента ложного обнаружения «FDR» (от англ. False Discovery Rate) (Benjamini Y., Hochberg Y., 1995; Storey J.D., Tibshirani R., 2003). Пороговые величины при статистической обработке результатов биоинформатического анализа были определены на статистических модулях соответствующих онлайн-ресурсов с помощью точного критерия Фишера. Различия между всеми

сравниваемыми показателями считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок среднего ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты профилирования микроРНК на основе микрочипирования с последующей валидацией результатов

Для определения и выбора дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК при МК с целью дальнейшего исследования их возможного участия в меланомогенезе был выполнен полный экспрессионный анализ и сравнение профилей экспрессии микроРНК образцов МК и ДМНОК с валидацией результатов микрочипирования методом ПЦР-РВ.

Результаты оценки валидации микрочипирования

При исследовании уровней экспрессии miR-363-3p, miR-513a, miR-3591-3p в FFPE-образцах МК и ДМНОК методом ПЦР-РВ получено, что различий в уровнях экспрессии miR-363-3p и miR-513a между образцами МК и ДМНОК не выявлено, а уровень экспрессии miR-3591-3p в FFPE-образцах МК ниже, чем в образцах ДМНОК ($p = 0,0357$), что также регистрировалось методом микрочипирования. Для образцов МК и ДМНОК с бесформалиновой фиксацией по результатам ПЦР-РВ различий уровней экспрессии для miR-363-3p и miR-3591-3p выявлено не было, однако уровень экспрессии miR-513a в тканях МК был ниже, чем в ДМНОК ($p = 0,0040$), что также полностью согласуется с результатами микрочипирования образцов, фиксированных в РНК-стабилизирующем растворе. Соответствия в уровнях экспрессии микроРНК между образцами, фиксированными при помощи бесформалинового и формалинсодержащего метода нет. Валидация результатов микрочипирования при помощи ПЦР-РВ продемонстрировала полное совпадение двух данных методов и возможность дальнейшего использования результатов, полученных при помощи микрочипирования, а уровни экспрессии микроРНК, определяемые на основе микрочипирования, соответствуют уровням экспрессии микроРНК, определяемых на основе ПЦР-РВ, но только в зависимости от способа фиксации материала.

Результаты сравнения экспрессионных профилей микроРНК образцов МК и ДМНОК

По результатам полного экспрессионного анализа FFPE-образцов МК ($n = 16$) и ДМНОК ($n = 3$), выявлены 1171 из 2578 зрелых микроРНК, экспрессия которых в образцах МК различается в 2 и более раза ($p < 0,05$). В частности, 674 вида микроРНК имеют повышенный уровень экспрессии, а 497 – сниженный. Наибольшие различия в экспрессии имели микроРНК miR-155, miR-1246, miR-let-7i, miR-34a и miR-652-3p, уровни которых были повышены в МК более чем в 60 раз, а также микроРНК miR-211, miR-5196-3p, miR-6804-3p, miR-6809-3p и miR-6736-3p, имеющие пониженные уровни экспрессии более чем в 15 раз соответственно.

Профилирование микроРНК МК (n=7) и ДМНОК (n=6), фиксированных в РНК-стабилизирующем растворе, выявило 62 вида зрелых микроРНК, уровни которых изменены в МК в 2 и более раза ($p<0,05$). Из них 31 вид микроРНК имеет повышенный уровень экспрессии и 31 – сниженный в МК по сравнению с ДМНОК. Наибольшие различия в экспрессии имели микроРНК miR-3065, miR-155, miR-4701-3p, miR-8071 и miR-3064, уровни которых повышены в МК более чем в 3,5 раза, а также микроРНК miR-508-3p, miR-506-3p, miR-513c, miR-211 и miR-509-3, имеющие пониженные уровни экспрессии в 8 раз и более.

При сравнении профилей микроРНК в образцах МК (n=3), одна часть которых была переведена в FFPE-образцы, а другая - фиксирована в РНК-стабилизирующем растворе, было выявлено изменение уровня экспрессии 454 микроРНК ($p<0,05$), из которых 51 микроРНК имеет пониженный уровень в FFPE-тканях, тогда как другие 403 микроРНК обнаруживаются в повышенных количествах, и лишь 13 из всех изменяющихся микроРНК в клетках МК по сравнению с ДМНОК, изменяются однонаправленно и со схожей кратностью в образцах с разными способами фиксации. В общей сложности 17,61% микроРНК не совпадает при сравнительном анализе профилей экспрессии МНОК в зависимости от способа фиксации материала.

Результаты биоинформатического поиска и анализа СП для дифференцированно-экспрессирующихся микроРНК при МК

Биоинформатический анализ и идентификация СП выявили 52 механизма внутриклеточной сигнализации в меланоме ($p<0,05$), компоненты которых регулируются микроРНК с измененными профилями экспрессии в 2 и более раза в клетках МК по сравнению с ДМНОК (образцы FFPE). Из них статистически наиболее высокозначимыми механизмами передачи сигнала являются сигнальные пути: «Nipро», «Прионные заболевания», «Вирусный канцерогенез», «Гепатит В», «Биосинтез жирных кислот», «Метаболизм жирных кислот», «Адгезионные контакты», а также «Протеогликаны при раке». Биоинформатический анализ СП, в регуляции которых принимают участие микроРНК с измененными уровнями экспрессии в 2 и более раза в клетках МК по сравнению с ДМНОК (образцы с бесформалиновым типом фиксации), выявил значимость изменений при опухолевой трансформации меланоцитов в 48 молекулярных путях сигнальной трансдукции ($p<0,05$). Наиболее статистически высокозначимыми среди них являются СП: «Биосинтез и метаболизм жирных кислот», «FoxO», «Рак поджелудочной железы», «P53», «Хронический миелолейкоз», «Прионные заболевания», «Гепатит В», «Карцинома почки», «ErbB». Общими механизмами сигнальной трансдукции, регулируемые измененными микроРНК в образцах с различными способами фиксации, оказались СП: «Биосинтез и метаболизм жирных кислот», «Прионные заболевания» и «Гепатит В». Предсказанные СП, регулируемые совокупностью микроРНК с измененным профилем экспрессии по результатам микрочипирования образцов с бесформалиновым типом фиксации, имели большую специфичность в отношении канцерогенеза. К таким СП относятся:

«Рак поджелудочной железы», «Карцинома почки» и «Хронический миелолейкоз», что указывает на общность нарушений при канцерогенезе данных заболеваний с МК и универсальность регуляторных ролей измененных микроРНК. К механизмам сигнальной трансдукции, активация либо нарушение в работе которых имеют ключевые роли в возникновении злокачественных опухолей, относят СП «FoxO», «P53» и «ErbB», имеющие общие оси сигнализации и отвечающие за процессы пролиферации, миграции и инвазии клеток, апоптоза (Hynes N.E., MacDonald G., 2009; Farhan M. et al., 2017). Также для совокупности микроРНК, имеющих наибольшие различия в уровнях экспрессии в МК по сравнению с ДМНОК по данным микрочипирования образцов, фиксированных в РНК-стабилизирующем растворе, дополнительно проводили биоинформатический поиск механизмов передачи сигнала, по результатам которого идентифицировано 9 СП ($p < 0,05$): «Взаимодействие рецепторов внеклеточного матрикса», «Протеогликаны при раке», «P53», «Ras», «NF-kappa B», «ErbB», «Деградация лизина», «Убиквитинзависимый протеолиз», «Адгезионные контакты».

Идентификация микроРНК с возможным участием в канцерогенезе с целью оценки их функциональной роли в клетках МК

На первом этапе исследования выбор микроРНК осуществляли по результатам микрочипирования FFPE-образцов, а ключевые регуляторные роли рассматривали для микроРНК, имеющих только повышенную экспрессию при МК, с дальнейшим исследованием их функций в клетках при помощи трансфекции специфических ингибиторов. МикроРНК **miR-106a** (hsa-miR-106a-5p, AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG) имеет повышенный уровень экспрессии в клетках МК в 2,88 раза ($p = 0,0126$), а **miR-4286** (hsa-miR-4286, ACCCCACUCCUGGUACC) – в 17,79 раз ($p = 0,0002$). Известно, что обе микроРНК выступают в качестве онкогенных при различных злокачественных опухолях, miR-106a – при раке желудка (Xiao B. et al., 2009), раке толстого кишечника (Okayama H. et al., 2012) и раке легких (Jiang Y. et al., 2011), а miR-4286 – при раке поджелудочной железы (Frampton A.E. et al., 2013), глиоме (Süslüer S.Y. et al., 2015) и аденокарциноме пищевода (Drahoš J. et al., 2016). В отношении МК также есть данные о том, что уровень miR-106a повышается в клетках МК, имеющих мутантный тип гена *B-RAF* (Couts K.L. et al., 2011), но функциональная роль данной микроРНК не исследована, а Sand M. et al., 2013 включили miR-4286 в список значительно повышенных микроРНК с недостаточно охарактеризованной ролью в меланомагенезе.

На втором этапе исследования выбор микроРНК осуществляли по результатам микрочипирования образцов с бесформалиновой фиксацией среди микроРНК как с повышенной экспрессией, так и с пониженной при МК, а для исследования функциональной роли применяли специфические ингибиторы и имитаторы данных молекул. Максимально повышенный уровень экспрессии в клетках МК в 5,03 раз ($p = 0,0176$) по данным микроэрея имеет **miR-3065** (hsa-miR-3065-5p, UCAACAAAAUCACUGAUGCUGGA). Как и miR-106a и miR-

4286, miR-3065 является микроРНК с ограниченным числом исследований и неустановленной функциональной ролью при МК (Philipone E. et al., 2016), при этом ее экспрессия значительно ниже в метастатических клетках рака предстательной железы по сравнению с неметастизирующими (Watahiki A. et al., 2016), что указывает на то, что данная микроРНК обладает опухольсупрессивным действием, способствуя уменьшению процессов миграции клеток и инвазии тканей. Есть данные о том, что miR-3065 опосредует единые функциональные эффекты совместно с **miR-204** (hsa-miR-204-5p, UUUUUUUUGUCAUCCUAUGCCU) (Philipone E. et al., 2016), которая по данным микроэрея снижена в клетках МК в 3,56 раза ($p=0,0141$). Это наблюдение согласуется и с результатами других исследований функционирования miR-204 при колоректальном раке (Yin Y. et al., 2014), раке щитовидной железы (Liu L. et al., 2015), а также плоскоклеточном раке полости рта (Wang X. et al., 2016), в которых установлено, что данная микроРНК выполняет роль опухолевого супрессора. Аналогично miR-3065, действие miR-204 при МК, вероятно, связано с процессами подавления опухоли, так как показано, что снижение экспрессии данной микроРНК ассоциировано с увеличением метастазирования и снижением общей выживаемости при раке эндометрия и молочной железы (Bao W. et al., 2013; Li W. et al., 2014).

Результаты биоинформатического поиска и анализа СП и ГМ для микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-204, miR-3065

Для miR-106a определено 37 механизмов внутриклеточной сигнализации ($p<0,05$), из которых 10 наиболее высокозначимых статистически отображены в таблице (табл. 1), а для микроРНК miR-4286, miR-3065 и miR-204 – соответственно 6, 5 и 8 механизмов внутриклеточной сигнализации ($p<0,05$), в регуляции компонентов которых принимают участие данные микроРНК (табл. 2-4).

Таблица 1

Механизмы передачи сигнала, регулируемые miR-106a, с наиболее высоким уровнем статистической значимости

№	СП (согласно KEGG)	KEGG ID	P
1	Прионные болезни (Prion diseases)	hsa05020	$1,347313 \times 10^{-21}$
2	Процессинг белка в эндоплазматический ретикулум (Protein processing in endoplasmic reticulum)	hsa04141	$1,608899 \times 10^{-6}$
3	Клеточный цикл (Cell cycle)	hsa04110	$9,577097 \times 10^{-6}$
4	Эндоцитоз (Endocytosis)	hsa04144	0,000121
5	TGF- β (TGF-beta signaling pathway)	hsa04350	0,000238
6	Деградация лизина (Lysine degradation)	hsa00310	0,000366
7	Протеогликаны при раке (Proteoglycans in cancer)	hsa05205	0,000366
8	FoxO (FoxO signaling pathway)	hsa04068	0,000563
9	Циркадные ритмы (Circadian rhythm)	hsa04710	0,000563
10	Сигнальные пути при раке (Pathways in cancer)	hsa05200	0,000563

Таблица 2

Механизмы передачи сигнала, в регуляции которых принимает участие miR-4286, по результатам биоинформатического анализа

№	СП (согласно KEGG)	KEGG ID	P
1	Биосинтез жирных кислот (Fatty acid biosynthesis)	hsa00061	8,206750x10 ⁻⁴⁰
2	Метаболизм жирных кислот (Fatty acid metabolism)	hsa01212	6,154054x10 ⁻¹⁵
3	Метаболизм тирозина (Tyrosine metabolism)	hsa00350	0,003465
4	Гепатит В (Hepatitis B)	hsa05161	0,009325
5	Глиома (Glioma)	hsa05214	0,013562
6	Биосинтез N-гликанов (N-Glycan biosynthesis)	hsa00510	0,044336

Таблица 3

Механизмы передачи сигнала, в регуляции которых принимает участие miR-3065, по результатам биоинформатического анализа

№	СП (согласно KEGG)	KEGG ID	P
1	Адгезионные контакты (Adherens junction)	hsa04520	0,000141
2	Убиквитинзависимый протеолиз (Ubiquitin mediated proteolysis)	hsa04120	0,024838
3	Деградация лизина (Lysine degradation)	hsa00310	0,035545
4	Процессинг белка в эндоплазматический ретикулум (Protein processing in endoplasmic reticulum)	hsa04141	0,035545
5	Регуляция транскрипции генов при раке (Transcriptional misregulation in cancer)	hsa05202	0,047632

Таблица 4

Механизмы передачи сигнала, в регуляции которых принимает участие miR-204, по результатам биоинформатического анализа

№	СП (согласно KEGG)	KEGG ID	P
1	Цитохром P450-зависимый метаболизм ксенобиотиков (Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450)	hsa00980	4,977514x10 ⁻¹⁰
2	Апоптоз (Apoptosis)	hsa04210	0,000956
3	Гемопоэз (Hematopoietic cell lineage)	hsa04640	0,000956
4	Взаимодействие цитокинов с рецепторами (Cytokine-cytokine receptor interaction)	hsa04060	0,002100
5	NF-kappa B (NF-kappa B signaling pathway)	hsa04064	0,018633
6	Jak-STAT (Jak-STAT signaling pathway)	hsa04630	0,024268
7	Метаболизм бутаноата (Butanoate metabolism)	hsa00650	0,038910
8	Химический канцерогенез (Chemical carcinogenesis)	hsa05204	0,047974

Все выбранные микроРНК принимают непосредственное участие в регуляции опухолевого роста, так как среди определенных путей внутриклеточной сигнализации при участии miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204 имеются СП, строго специфичные для процессов канцерогенеза: для miR-106a – «Протеогликаны при раке», «Сигнальные пути при раке», для miR-4286 – «Глиома», для miR-3065 – «Регуляция транскрипции генов при раке», а для miR-204 – «Химический канцерогенез» (табл. 1-4). Кроме того,

функциональная специфика исследуемых микроРНК указывает на возможность регуляции процессов, связанных с канцерогенезом и меланомагенезом, так как miR-106a участвует в регуляции синтеза и метаболизма белка и аминокислот, эндоцитоза, роста клеток, фаз клеточного цикла, циркадных ритмов, miR-4286 регулирует процессы липидного обмена в клетках, метаболизм тирозина и гликанов, жизнедеятельность клеток при инфекционных вирусных процессах, miR-3065 – процессы метаболизма и обмена аминокислот и белка, адгезию, а miR-204 связана с регуляцией пролиферации, апоптоза, метаболизма масляной кислоты и ксенобиотиков, рецепторных взаимодействий, иммунитета и воспаления.

Определено, что мишенями для miR-106a служат 1183 гена, для miR-4286 – 94, а для miR-3065 и miR-204 – 184 и 235 генов соответственно ($p < 0,05$). Мишенивые гены с наибольшим значением прогностического индекса «Target score», равным 99 и 100, имеющие функциональные характеристики, связанные с канцерогенезом, имеются среди ГМ всех 4 видов исследуемых микроРНК. Для miR-106a такими генами являются – *ARID4B*, *BRMS1L*, *ANKRD52*, *TXNIP*, *ARHGAP12*, *STK17B*, *PDCD1LG2*, *PTPN4*, *MAP3K2*, для miR-4286 – *RNF144B*, *KLHL18*, *FOXO4*, играющие ключевые роли в пролиферации клеток и регулирующие апоптотическую гибель, для miR-3065 – *PPM1A*, *PCDH9*, *HMGB1*, *ARID4B*, *AFF4*, *PTPN11*, *RAPGEF2*, ассоциированные с процессами канцерогенеза, в том числе с развитием меланомы кожи, а для miR-204 – *ZCCHC24*, *PTPRD*, *CREB5*, *NBR1*.

Кроме того, определено, что miR-4286, miR-3065 и miR-204 имеют ГМ с высоким значением индекса «Target score», равным 80-98, ответственные за регуляцию важнейших клеточных процессов, связанных с онкогенной трансформацией клеток. Для miR-4286 такими генами, в количестве 35 шт., являются гены *APLN*, *FPGS*, *FTSJ2*, *FURIN*, *HMGAI*, *RAPGEF3*, *RRN3*, *RPS6*, *PIK3C2B*, *MAPK1*, *REL*, *TP53* и *GPR55*, регулирующие процессы пролиферации клеток, метаболизма, апоптотической гибели, гены *PIK3C2B*, *MAPK*, *KSR1* и *RAPGEF3*, регулирующие процессы ангиогенеза, гены *ACBD7*, *APOL6*, *ATP1A3*, *ATP13A4*, *CACNA1E*, *LDLR*, *MAN1A2*, *PGK1*, *PRKAG1*, *RIMS3*, *SCNN1G*, *SLC39A13*, *SLC6A17*, *TMEM151B* и *TRPC4AP*, участвующие в метаболизме глюкозы, липидов, нуклеиновых кислот, аминокислот и транспорте ионов, а также гены *CLDN1*, *SEMA4D* и *SIRPA*, регулирующие процессы адгезии клеток. Для miR-3065 – 17 генов, отвечающих за процессы апоптоза, миграции и инвазии, адгезии и пролиферации, функциональная роль которых связана с опухолевым ростом – *EPT1*, *RAB1A*, *HIPK1*, *MYBL1*, *MYEF2*, *NUFIP2*, *PDP2*, *PCDH9*, *ITGA1*, *PTPN11*, *MAP3K4*, *MEI*, *HMGB1*, *SPATA13*, *SYPL1*, *WASF3*, *ZMYM6*. А для miR-204 – 12 генов, среди которых гены *USP47* и *SOX4*, ответственные за регуляцию процессов пролиферации клеток, ген *TCF4*, регулирующий дифференцировку клеток, гены *EZR* и *COL5A3*, регулирующие адгезию, гены *TGFBR1*, *FOXC1*, *CDH2*, *ANKRD13A*, регулирующие миграцию и инвазию клеток, а также гены *SIRT1*, *BCL2*, *BCL2L2*, продукты которых связаны с регуляцией апоптоза.

По результатам анализа генных онтологий, ассоциированных с ГМ miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204, установлено, что функциональная роль ГМ исследуемых микроРНК согласно разделу «Биологические процессы» международной базы данных генных онтологий «The Gene Ontology Resource» сходна: более половины ГМ miR-106a в своей функциональной специализации принадлежат к «Регуляторным и клеточным процессам», а также процессам, связанным с «Локализацией» (согласно наименованиям онтологий данного раздела); ГМ miR-4286 принимают участие в биологических процессах, лидирующими по количеству генов из которых являются онтологии «Биологическая регуляция», «Метаболические процессы» и «Клеточные процессы»; Онтологиями биологических процессов, лидирующих по охвату ГМ miR-3065, являются «Клеточные процессы», «Метаболические процессы», «Биологическая регуляция» и «Биогенез клеточных структур». А основными биологическими процессами, затрагиваемыми ГМ miR-204, в своем большинстве, являются «Клеточные процессы», «Локализация», «Метаболические процессы», а также «Процессы развития». Также определено, что ГМ всех исследуемых микроРНК имеют одинаковые молекулярные функции (согласно онтологиям одноименного раздела базы данных), охватывающие большую часть их генов, которыми являются «Связывание» и «Каталитическая активность». Кроме этого, к основным молекулярным функциям ГМ miR-106a и miR-4286 также относятся функции онтологии «Транспорт», а общей онтологией раздела «Молекулярные функции» для ГМ miR-4286, miR-3065 и miR-204 является «Регуляция транскрипции генов». МикроРНК miR-3065 и miR-204 являются взаимосвязанными по молекулярным функциям своих ГМ: ГМ miR-3065 включены в онтологии «Молекулярная регуляция» и «Молекулярные взаимодействия», а ГМ miR-204 относятся к онтологии «Активность молекулярных структур». В отношении раздела «Субклеточная локализация» базы данных генных онтологий определено, что локализация продуктов ГМ исследуемых микроРНК разнообразна. Продукты ГМ miR-106a локализованы, в основном, во внутриклеточных и клеточных структурах, продукты ГМ miR-4286 – внутриклеточно, а также на мембранных структурах. Большинство генных продуктов ГМ miR-3065 и miR-204 принадлежат к клетке, ее структурам и органеллам, а генные продукты ГМ miR-204 локализованы еще и во внеклеточном матриксе и его структурах.

Результаты оценки эффективности трансфекции модуляторов экспрессии микроРНК miR-106, miR-4286, miR-3065 и miR-204 в клетки МК

Для определения непосредственного участия вышеуказанных микроРНК в патогенезе МК было осуществлено функциональное исследование с трансфекцией специфических ингибиторов и имитаторов микроРНК в клетки МК BRO и SK-MEL1. Анализ эффективности трансфекции прямым методом (по изменению уровня экспрессии исследуемых микроРНК) установил, что трансфекция модуляторов экспрессии в клетки BRO и SK-MEL1 была

успешной, так как через 24 ч после трансфекции ингибитора в клетках меланомы BRO экспрессия miR-106a снижается в 15,24 раз, miR-4286 – в 49,83 раз, miR-3065 – в 2,08 раза, miR-204 – в 1,21 раз, а в клетках SK-MEL1 – экспрессия miR-4286 снижается в 4,54 раза, miR-3065 – в 11,20 раз, а miR-204 – в 26,79 раз ($p=0,0495$). Через 24 ч после трансфекции имитатора уровень экспрессии miR-3065 в клетках меланомы BRO повышается в 818427,70 раз, а в клетках меланомы SK-MEL1 – в 7641,26 раза, а уровень экспрессии miR-204 в клетках меланомы BRO увеличивается в 185265,38 раз, а в клетках SK-MEL1 – в 1293,55 раз ($p=0,0495$). Анализ эффективности трансфекции непрямым методом (по изменению экспрессии ГМ положительных контролей) также подтвердил успешность трансфекции. Уровень экспрессии *HMGA2* через 24 ч после трансфекции положительного контроля ингибиторов в клетках меланомы BRO увеличился в 1,31 раз, а клетках меланомы SK-MEL1 – в 1,37 раз ($p=0,0495$), а уровень экспрессии *TWF1* через 24 ч после трансфекции положительного контроля имитаторов снизился в клетках меланомы BRO в 1,41 раз, а клетках SK-MEL1 – в 3,48 раз ($p=0,0495$).

Эффекты исследуемых микроРНК на пролиферацию/жизнеспособность клеток МК

МикроРНК miR-4286 в клетках МК выступает в качестве активатора пролиферации/жизнеспособности, так как установлен антипролиферативный эффект после трансфекции в клетки МК ее ингибитора:

ингибирование miR-4286 снижает пролиферацию/жизнеспособность клеток меланомы BRO через 24 ч с момента трансфекции, которая сохраняется в динамике, к 96 ч с момента трансфекции уровень пролиферации снижается в 1,70 раз по сравнению с контролем ($p=0,0495$) (рис. 2).

Ингибирование miR-4286 в клетках меланомы SK-MEL1 также снижает пролиферацию/жизнеспособность клеток, но лишь к 96 ч с момента трансфекции в 1,38 раз по сравнению с контролем ($p=0,0495$) (рис. 2).

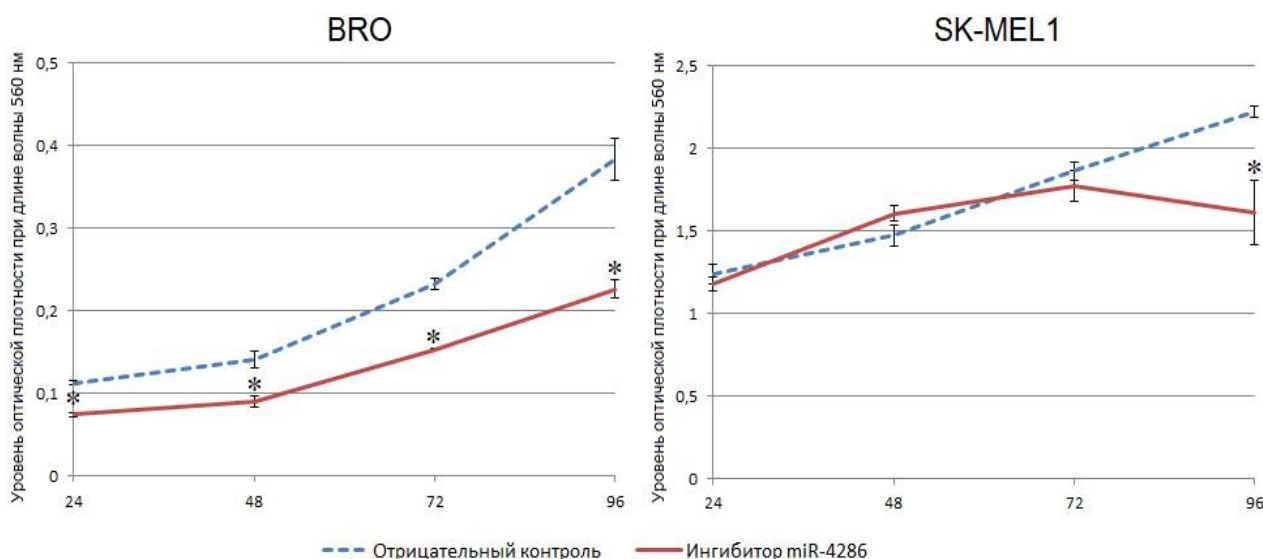


Рисунок 2. Результаты исследования пролиферативной активности клеток МК после трансфекции ингибитора miR-4286, * – статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

МикроРНК miR-204 и miR-3065 в отношении регуляции пролиферации/жизнеспособности клеток МК функционируют однонаправленно, проявляя плейотропные свойства и имея антипролиферативные эффекты вне зависимости от направления модуляции уровней после трансфекции ингибиторов и имитаторов данных молекул: ингибирование miR-3065 в клетках меланомы BRO приводит к снижению пролиферации/жизнеспособности, регистрируемому через 24 ч после трансфекции и сохраняющемуся в динамике. К 96 ч с момента трансфекции уровень пролиферации/жизнеспособности снижается в 1,54 раза по сравнению с контролем ($p=0,0495$) (рис. 3).

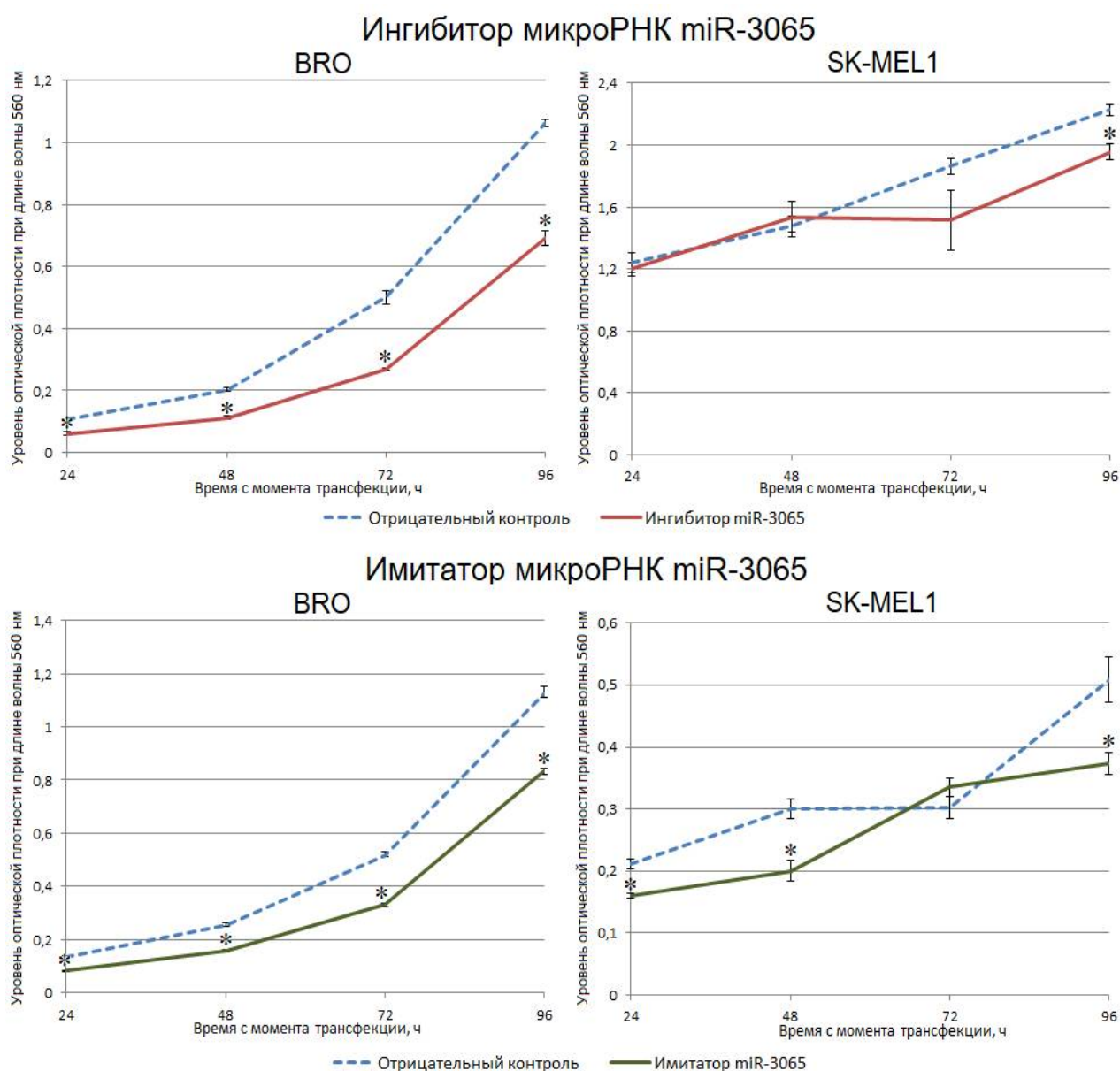


Рисунок 3. Результаты исследования пролиферативной активности клеток МК после трансфекции специфических модуляторов экспрессии miR-3065, * – статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

В клетках меланомы SK-MEL1 ингибирование miR-3065 также приводит к снижению пролиферации/жизнеспособности клеток в 1,14 раз по сравнению контролем ($p=0,0495$), но регистрируемому позже, только к 96 ч с момента трансфекции (рис. 3).

Введение имитатора miR-3065 в клетки меланомы BRO, аналогично ингибитору, приводит к снижению жизнеспособности/пролиферации клеток через 24 ч после трансфекции, сохраняющемуся далее в динамике. К 96 ч уровень пролиферации снижается в 1,35 раз по сравнению с контролем ($p=0,0495$) (рис. 3).

Введение имитатора miR-3065 клетки SK-MEL1 приводит к снижению уровня пролиферации/жизнеспособности, регистрируемому через 24, 48 и 96 ч с момента трансфекции клеток, а к 96 ч кратность снижения уровня пролиферации/жизнеспособности по сравнению с контролем составляет 1,37 раз ($p=0,0495$) (рис. 3).

Ингибирование miR-204 в клетках меланомы BRO приводит к снижению пролиферации/жизнеспособности клеток через 24 ч после трансфекции, которое сохраняется далее в динамике. К 96 ч уровень пролиферации снижается в 1,66 раз по сравнению с контролем ($p=0,0495$), а в клетках SK-MEL1 – вызывает непродолжительное снижение пролиферации/жизнеспособности клеток в 1,13 раз ($p=0,0495$), регистрируемое только через 72 ч после трансфекции, которое пропадает к 96 ч (рис. 4).

Усиление экспрессии miR-204 в клетках меланомы BRO и SK-MEL1 при помощи трансфекции имитатора также приводит к снижению пролиферации/жизнеспособности клеток обеих линий через 24 ч, регистрируемой в динамике (через 72 ч у клеток меланомы BRO и через 48 ч у клеток SK-MEL1), к 96 ч с момента трансфекции имитатора miR-204 пролиферация/жизнеспособность клеток BRO снижается в 1,18 раз по сравнению с контролем ($p=0,0495$), а клеток SK-MEL1 – в 1,23 раза ($p=0,0495$) (рис. 4).

Функционирование miR-106a с регуляцией процессов пролиферации в клетках МК не связано, так как установлено, что ингибирование данной микроРНК не оказывает влияния на уровень пролиферативной активности/жизнеспособности клеток меланомы BRO.

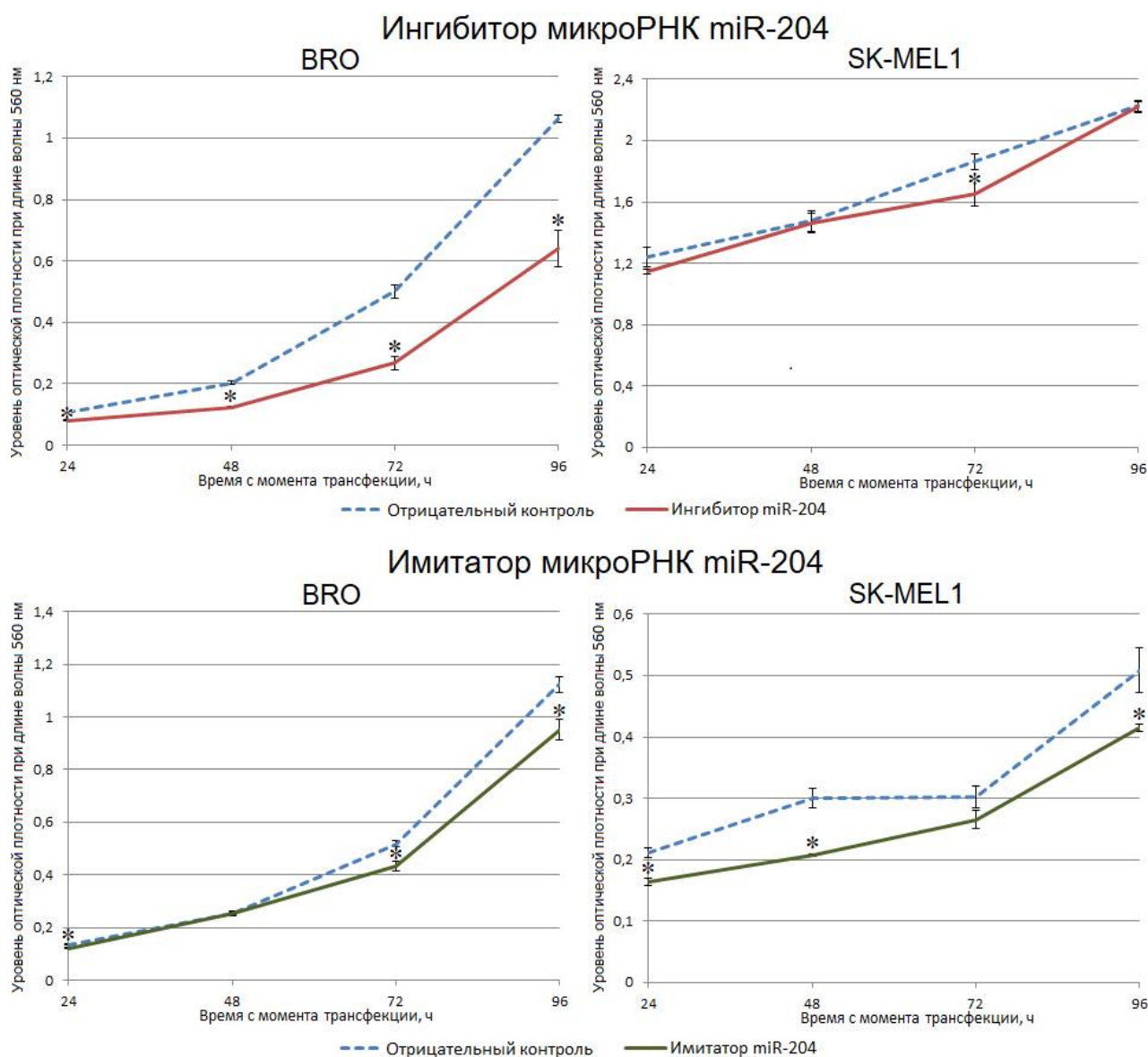


Рисунок 4. Результаты исследования пролиферативной активности клеток МК после трансфекции специфических модуляторов экспрессии miR-204, * – статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

Эффекты исследуемых микроРНК на апоптоз клеток МК

МикроРНК miR-4286 снижает процессы апоптотической гибели клеток МК, так как установлено, что ее ингибирование в клетках меланомы BRO увеличивает долю клеток, находящихся в апоптозе/некрозе в 2,64 раза ($p=0,0495$), но не влияет на долю клеток, находящихся в преапоптозе, а в клетках меланомы SK-MEL1 – не оказывает влияние на процентное соотношение клеток, находящихся на различных стадиях апоптотической гибели (рис. 5).

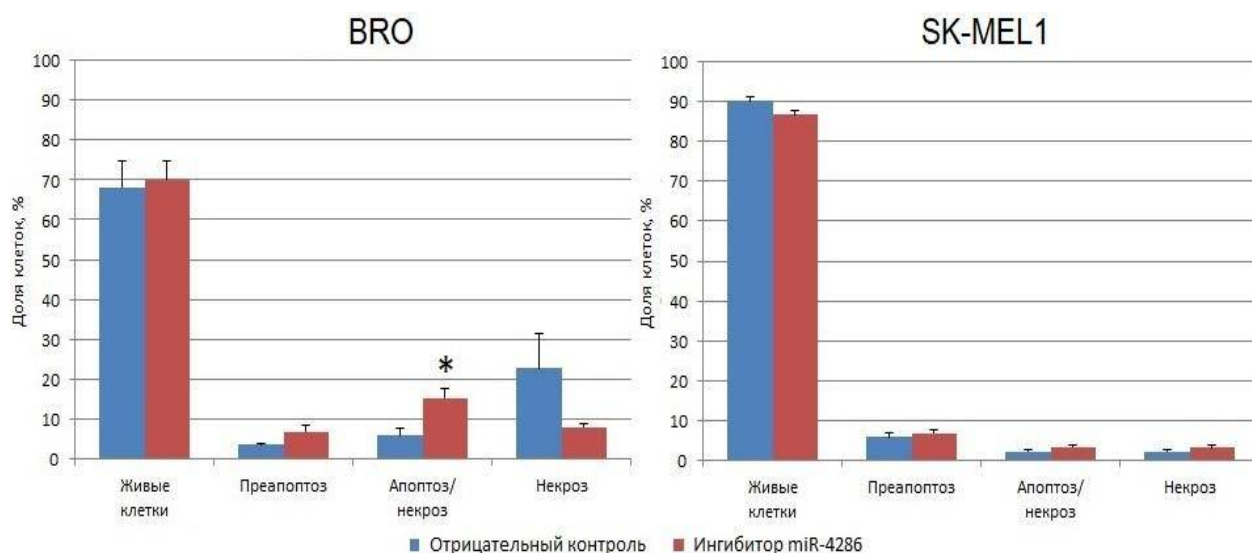


Рисунок 5. Результаты исследования апоптоза клеток МК методом проточной цитометрии после трансфекции ингибитора miR-4286, * – статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

Функционирование микроРНК miR-204, miR-3065 и miR-106a в клетках МК не затрагивает регуляцию процессов апоптотической гибели, так как выявлено, что как ингибирование микроРНК miR-3065 и miR-204, так и увеличение экспрессии данных молекул при помощи трансфекции имитатора, в клетках меланомы BRO и SK-MEL1 не оказывают влияния на процессы апоптотической гибели, однако увеличение экспрессии микроРНК miR-204 приводит к небольшому снижению доли живых клеток на 4,50% ($p=0,0495$).

Ингибирование микроРНК miR-106a также не оказывает влияние на апоптоз клеток меланомы BRO.

Модуляция уровней экспрессии микроРНК miR-106a, miR-204 и miR-3065 не оказывает влияния на апоптоз клеток МК.

Эффекты исследуемых микроРНК на миграцию и инвазию клеток МК

МикроРНК miR-3065 в клетках МК сдерживает миграцию клеток, но имеет плейотропные свойства в отношении инвазии, приводя к ее усилению вне зависимости от направления модуляции уровней после трансфекции ингибитора и имитатора, так как установлено, что ингибирование miR-3065 увеличивает миграционную активность клеток меланомы BRO в 1,45 раз ($p=0,0495$), а трансфекция имитатора miR-3065 приводит к противоположному эффекту – снижению уровня миграции клеток в 1,20 раз ($p=0,0495$) (рис. 6).

Как ингибирование, так и трансфекция имитатора miR-3065 в клетки меланомы BRO приводит к увеличению уровней инвазии клеток в 1,30 и 1,44 раза соответственно ($p=0,0495$) (рис. 6).

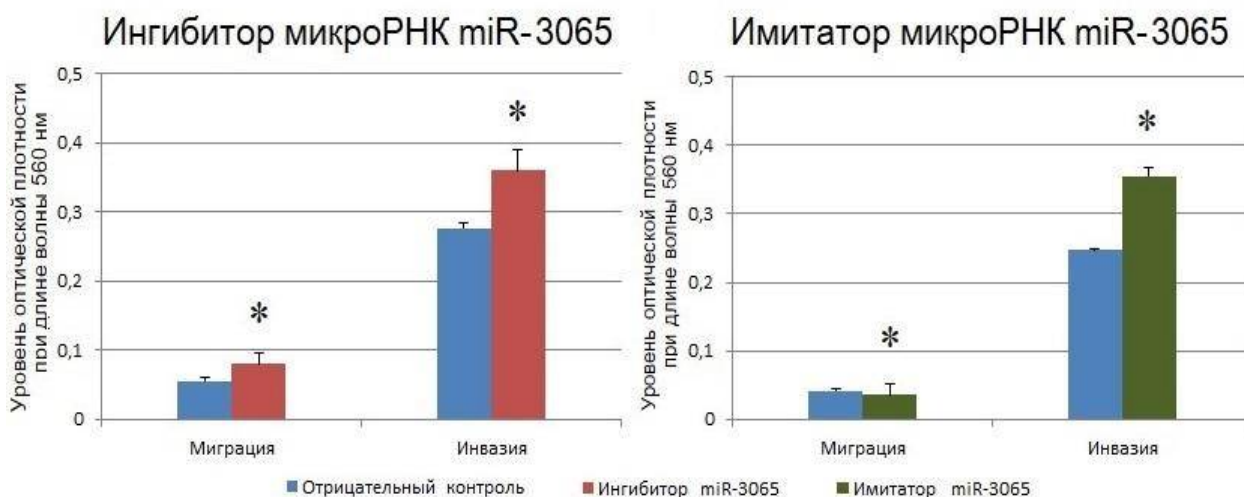


Рисунок 6. Результаты исследования миграции и инвазии клеток МК после трансфекции специфических модуляторов экспрессии miR-3065, * – статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

В отношении регуляции процесса миграции клеток выявлен однонаправленный функциональный эффект miR-204 с miR-3065, заключающийся в способности miR-204 снижать миграцию клеток МК, однако, в отличие от miR-3065, miR-204 не является регулятором процессов инвазии клеток МК, так как получено, что ингибирование miR-204 приводит к усилению миграции клеток в 1,55 раз ($p=0,0495$), но не влияет на уровень инвазии клеток (рис. 7). Трансфекция имитатора miR-204 в клетки меланомы BRO не оказывает влияние на процессы миграции и инвазии клеток (рис. 7).

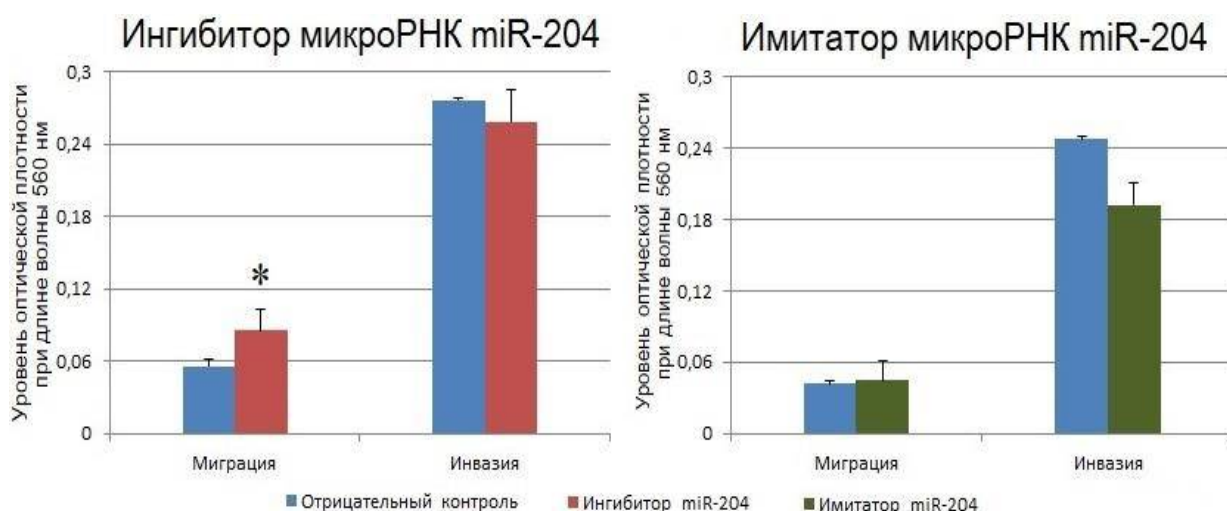


Рисунок 7. Результаты исследования миграции и инвазии клеток МК после трансфекции специфических модуляторов экспрессии miR-204, * – статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

МикроРНК *miR-106a* усиливает инвазивную способность клеток МК, но не является регулятором процессов миграции, так как получено, что ингибирование *miR-106a* не приводит к изменению уровня миграции клеток меланомы BRO, однако усиливает их способность к инвазии в 1,30 раз ($p=0,0495$) (рис. 8).

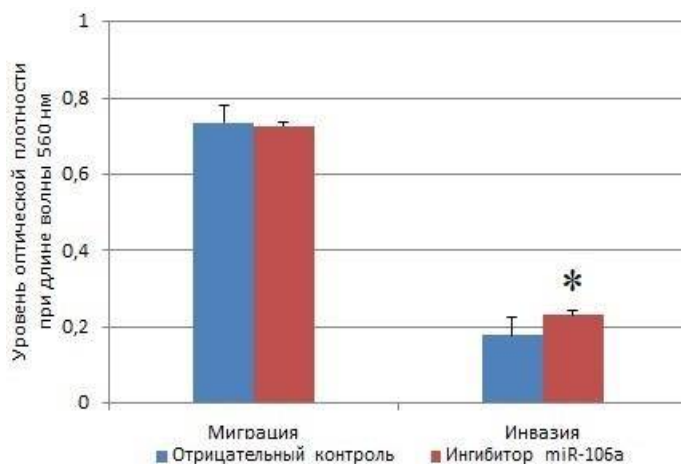


Рисунок 8. Результаты исследования миграции и инвазии клеток МК после трансфекции ингибитора *miR-106a*, * – статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

Функционирование *miR-4286* в клетках МК не связано с регуляцией миграционной и инвазивной способности клеток, так как ингибирование данной микроРНК не оказывает влияние на показатели миграции и инвазии клеток меланомы BRO.

Эффекты исследуемых микроРНК на клоногенность клеток МК

В клетках МК все исследуемые микроРНК способствуют снижению клоногенности клеток, так как установлено, что ингибирование *miR-106a* увеличивает способность клеток меланомы BRO образовывать колонии в 1,15 раз ($p=0,0495$) (рис. 9, А), а ингибирование *miR-4286* приводит к усилению клоногенности клеток в 1,19 раз ($p=0,0495$) (рис. 9, Б).

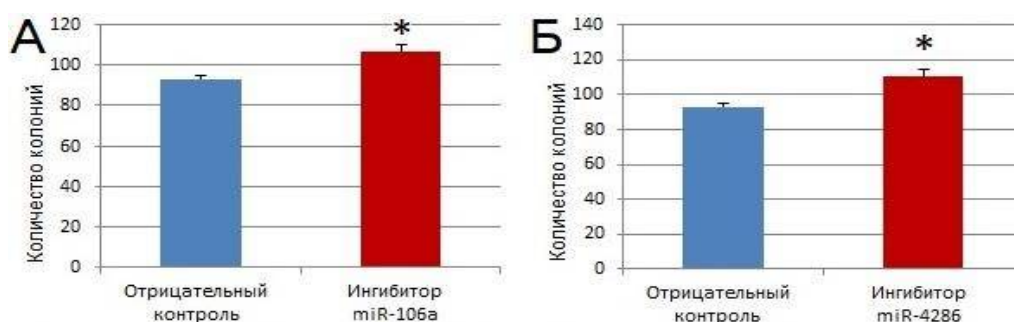


Рисунок 9. Результаты исследования клоногенности клеток МК после трансфекции ингибитора *miR-106a* (А), и ингибитора *miR-4286* (Б), * –

статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

Ингибирование miR-3065 не оказывает влияния на клоногенность клеток меланомы BRO, а трансфекция имитатора данной микроРНК приводит к снижению количества формируемых колоний в 1,17 раз по сравнению с контролем ($p=0,0495$) (рис. 10).

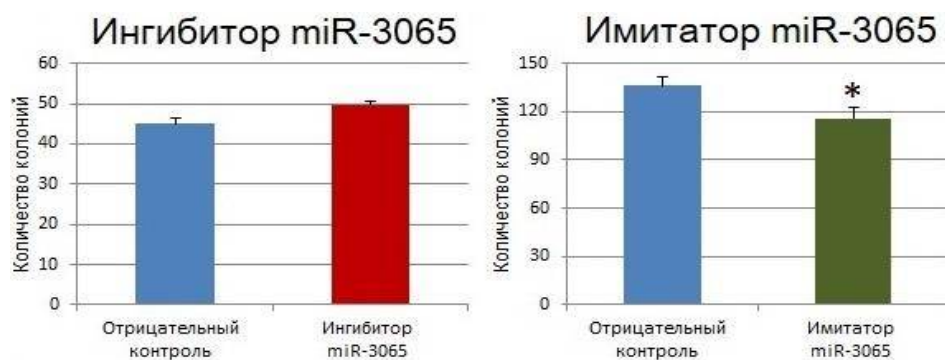


Рисунок 10. Результаты исследования клоногенности клеток МК после трансфекции модуляторов экспрессии miR-3065, * – статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

Увеличение уровня miR-204 в клетках меланомы BRO снижает клоногенность клеток в 1,20 раз в сравнении с контролем ($p=0,0495$), в то же время ингибирование данной микроРНК не влияет на этот показатель (рис. 11).



Рисунок 11. Результаты исследования клоногенности клеток МК после трансфекции модуляторов экспрессии miR-204, * – статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

Влияние исследуемых микроРНК на экспрессию ГМ

Ингибирование miR-4286 в клетках меланомы BRO приводит к увеличению уровня экспрессии *APLN* в 1,38 раз, *FPGS* в 1,92 раза, *HMGA1* в 1,63 раза, *RRN3* в 2,71 раза ($p=0,0495$), а также снижению уровня экспрессии *GRP55* в 1,52 раза ($p=0,0495$), но не оказывает влияния на уровень экспрессии *TP53*, а в клетках SK-MEL1 – приводит к противоположным изменениям в

отношении экспрессии *FPGS*, что проявляется снижением уровня экспрессии данного гена в 1,67 раз ($p=0,0495$), при этом на уровни экспрессии остальных ГМ не влияет (рис. 12).

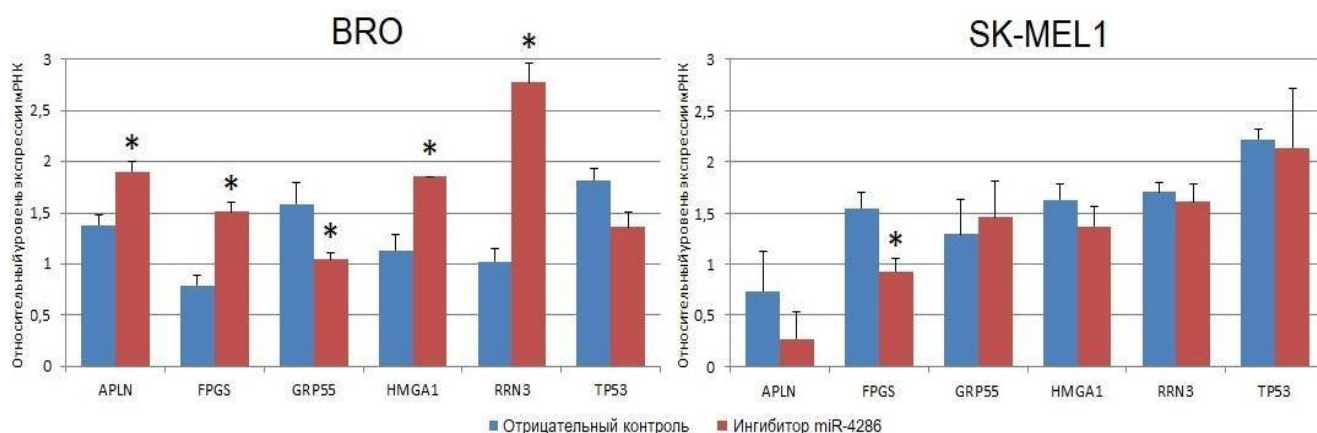


Рисунок 12. Уровни экспрессии ГМ *miR-4286* в клетках МК после трансфекции ингибитора данной микроРНК, * – статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

*Таким образом, функционирование *miR-4286* в клетках МК связано с регуляцией экспрессии генов *APLN*, *FPGS*, *HMGA1*, *RRN3*, которые являются прямыми мишенями для *miR-4286*, а также гена *GRP55*, который является непрямым мишенью. Ген *TP53* не является мишеневым для *miR-4286* в клетках МК.*

Ингибирование *miR-3065* в клетках меланомы BRO снижает экспрессию *HIPK1* и *ITGA1* в 4,67 и 2,17 раз соответственно ($p=0,0495$), а в клетках SK-MEL1, наоборот, повышает в 1,54 и 1,56 раз соответственно ($p=0,0495$). Усиление экспрессии *miR-3065* при помощи имитатора в клетках меланомы BRO снижает экспрессию *HIPK1* в 1,16 раз и повышает *ITGA1* в 1,36 раз ($p=0,0495$), а в клетках SK-MEL1 – повышает экспрессию *HIPK1* в 1,41 раз, ($p=0,0495$), но не влияет на уровень *ITGA1* (рис. 13).

*На основании полученных результатов можно резюмировать, что функционирование *miR-3065* в клетках МК связано с регуляцией экспрессии генов *HIPK1* и *ITGA1*, которые являются непрямыми ГМ для данной микроРНК.*

Ингибирование *miR-204* в клетках МК BRO снижает экспрессию *BCL2* и *TGFBR1* в 2,31 и 3,07 раза соответственно ($p=0,0495$), но не влияет на экспрессию данных ГМ в клетках SK-MEL1. Увеличение уровня *miR-204* в клетках BRO снижает только экспрессию *TGFBR1* в 1,83 раза ($p=0,0495$), но не влияет на экспрессию других ГМ, а в клетках SK-MEL1 – снижает экспрессию *BCL2* и *TGFBR1* в 2,21 и 1,80 раз соответственно ($p=0,0495$) (рис. 14).

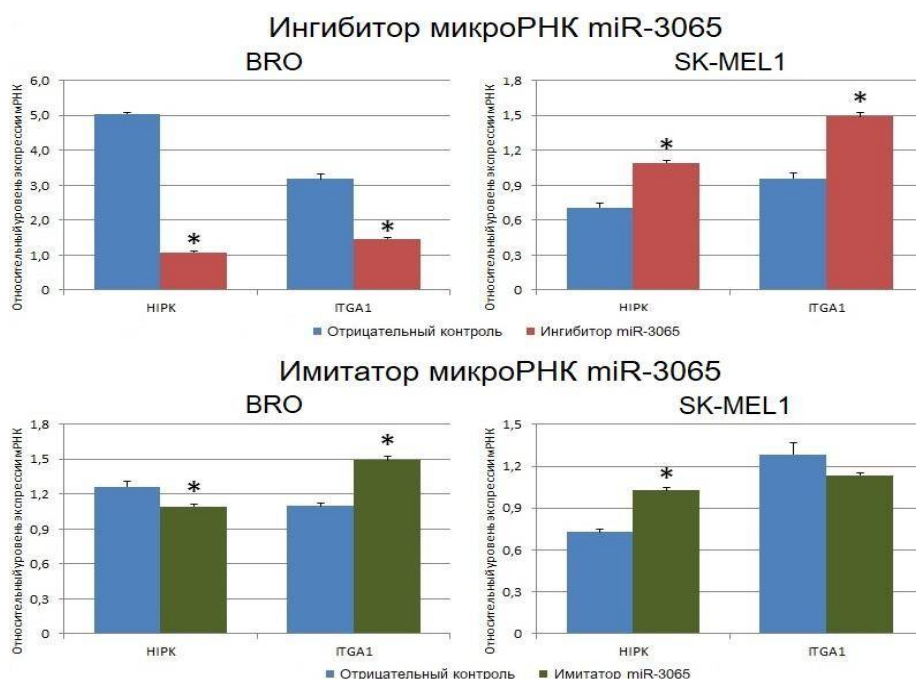


Рисунок 13. Уровни экспрессии ГМ miR-3065 в клетках МК после трансфекции модуляторов экспрессии данной микроРНК, * – статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

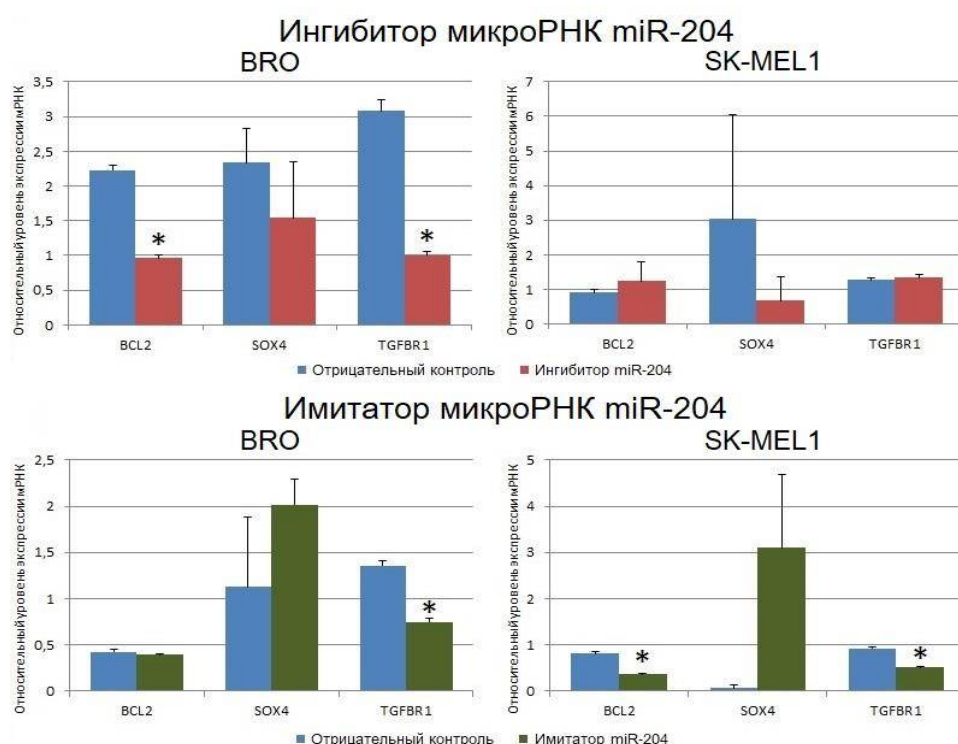


Рисунок 14. Уровни экспрессии ГМ miR-204 в клетках МК после трансфекции модуляторов экспрессии данной микроРНК, * – статистически значимо по сравнению с отрицательным контролем, критерий Манна-Уитни

Модуляция экспрессии miR-204 не влияет на экспрессию *SOX4* в обеих культурах МК (рис. 14).

Можно заключить, что гены BCL2 и TGFBR1 в клетках МК являются непрямymi мишенями, а ген SOX4 не является мишеневым для miR-204 в клетках МК.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия 1171 вида зрелых микроРНК различается в 2 и более раза в FFPE-образцах меланомы кожи по сравнению с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями кожи, в частности, среди микроРНК с измененной экспрессией 674 вида имеют повышенный уровень экспрессии, а 497 – сниженный. Экспрессия 62 видов зрелых микроРНК различается в 2 и более раза в образцах меланомы кожи по сравнению с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями кожи, фиксированных в РНК-стабилизирующем растворе, при этом среди микроРНК с измененными экспрессионными уровнями 31 вид имеет повышенный уровень экспрессии, а другие 31 - сниженный. Уровень экспрессии 454 видов зрелых микроРНК (17,61%) не совпадает при сравнительном анализе профилей экспрессии в меланоцитарных новообразованиях кожи в зависимости от метода фиксации материала, поэтому однотипные образцы тканей, фиксированные формалиновым и бесформалиновым методом, не сопоставимы для анализа микроРНК.
2. Уровни экспрессии микроРНК, определяемые на основе микрочипирования, соответствуют уровням экспрессии микроРНК, определяемым с помощью ПЦР-РВ, при условии соблюдения одинакового способа фиксации материала. Однотипные образцы ткани с разными способами фиксации для сравнения и анализа микроРНК несопоставимы.
3. Совокупность микроРНК, имеющих измененный уровень экспрессии в 2 и более раза в клетках меланомы кожи по сравнению с доброкачественными меланоцитарными новообразованиями кожи, участвует в регуляции механизмов сигнальной трансдукции, активация либо нарушение в работе которых, играют ключевые роли в возникновении и прогрессии меланомы кожи и других злокачественных новообразований.
4. Дифференцированно-экспрессирующиеся микроРНК при меланоме кожи miR-106a, miR-4286, miR-306, имеющие повышенные уровни экспрессии в 2,88, 17,79 и 5,03 раз соответственно, и микроРНК miR-204, имеющая пониженный уровень экспрессии в 3,56 раз, по результатам биоинформатического анализа сигнальных путей и генов-мишеней, а также анализа литературных данных, обладают функциональным потенциалом, связанным с регуляцией процессов канцеро- и меланомагенеза.
5. Трансфекция специфических модуляторов экспрессии микроРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065, miR-204 и их положительных и отрицательных

контролей в клетки меланомы кожи BRO и SK-MEL1 расценена как эффективная, так как внедрение в геном ингибиторов исследуемых микроРНК приводит к снижению экспрессии данных микроРНК в среднем в 15,84 раз и увеличению экспрессии *HMGA2* в среднем в 1,34 раз, а специфических имитаторов – к увеличению уровня экспрессии исследуемых микроРНК в среднем в 253156, 97 раз и снижению уровня экспрессии *TWF1* в среднем в 2,45 раза.

6. Снижение уровня микроРНК miR-106a приводит к увеличению инвазии и клоногенности клеток меланомы BRO, а микроРНК miR-4286 – к снижению пролиферации/жизнеспособности клеток меланомы BRO и SK-MEL1 и усилению апоптоза и клоногенности клеток меланомы BRO. Снижение уровня микроРНК miR-3065 вызывает снижение пролиферации/жизнеспособности клеток меланомы BRO и SK-MEL1 и усиление миграции и инвазии клеток меланомы BRO, а повышение уровня данной микроРНК снижает пролиферацию/жизнеспособность клеток меланомы BRO и SK-MEL1, а также уменьшает миграцию, клоногенность и усиливает инвазию клеток меланомы BRO. Снижение уровня микроРНК miR-204 приводит к снижению пролиферации/жизнеспособности клеток меланомы BRO и SK-MEL1 и усилению миграции клеток меланомы BRO, а повышение уровня данной микроРНК – к снижению пролиферации/жизнеспособности клеток меланомы BRO и SK-MEL1 и клоногенности клеток меланомы BRO.

7. Модуляция экспрессии микроРНК miR-4286, miR-3065 и miR-204 в клетках меланомы кожи приводит к изменению экспрессии генов-мишеней данных микроРНК, идентифицированных по результатам биоинформатического анализа и являющихся регуляторами канцерогенеза: снижение уровня микроРНК miR-4286 вызывает увеличение экспрессии *APLN*, *FPGS*, *HMGA1*, *RRN3* и снижение *GRP55* в клетках меланомы BRO, а также снижение экспрессии *FPGS* в клетках меланомы SK-MEL1; снижение уровня микроРНК miR-3065 приводит к снижению экспрессии *HIPK1* и *ITGA1* в клетках меланомы BRO, но повышению – в клетках меланомы SK-MEL1, в то время как повышение уровня данной микроРНК снижает экспрессию *HIPK1*, повышает *ITGA1* в клетках меланомы BRO и повышает экспрессию *HIPK1* в клетках меланомы SK-MEL1; снижение уровня микроРНК miR-204 приводит к снижению экспрессии *BCL2* и *TGFBR1* в клетках меланомы BRO, а повышение уровня – к снижению экспрессии *TGFBR1* в клетках меланомы BRO и снижению экспрессии *BCL2*, *TGFBR1* в клетках меланомы SK-MEL1. Модуляция уровня микроРНК miR-4286 в клетках меланомы BRO и SK-MEL1 не влияет на экспрессию *TP53*, а уровня микроРНК miR-204 – на экспрессию *SOX4*.

8. МикроРНК miR-106a в клетках меланомы кожи является онкосупрессором и подавляет процессы инвазии и клоногенности. МикроРНК miR-4286 в клетках меланомы кожи проявляет как онкогенные свойства (способствует увеличению пролиферации/жизнеспособности клеток и снижению апоптоза), так и онкосупрессивные (подавляет клоногенность

клеток), за счет регуляции экспрессии генов *APLN*, *FPGS*, *HMGAI*, *RRN3*, которые являются прямыми мишенями для miR-4286, а также гена *GRP55*, который является непрямым мишенью. МикроРНК miR-3065 в клетках меланомы кожи функционирует преимущественно в качестве онкосупрессора (подавляет пролиферацию/жизнеспособность, миграцию и клоногенность), но при этом обладает и онкогенными свойствами (усиливает инвазию клеток), за счет регуляции экспрессии *HIPK1* и *ITGA1*, которые являются непрямыми генами-мишенями для данной микроРНК. МикроРНК miR-204 функционирует односторонне с микроРНК miR-3065 в клетках меланомы кожи, проявляя онкосупрессивные свойства (подавляет пролиферацию/жизнеспособность, миграцию и клоногенность клеток) за счет участия в регуляции экспрессии генов *BCL2* и *TGFBR1*, которые в клетках меланомы кожи являются непрямыми мишенями для микроРНК miR-204.

9. МикроРНК miR-106a, miR-4286, miR-3065 и miR-204, за счет установленных в данном исследовании способностей регулировать ключевые механизмы опухолевой прогрессии клеток меланомы, могут не только пополнить функциональный каталог микроРНК для меланомы кожи, но и быть рассмотрены в качестве перспективных молекул с целью направленной регуляции «биологического поведения» опухолевых клеток меланомы кожи, что, в свою очередь, может являться предпосылкой разработки «таргетных» подходов в диагностике и лечении меланомы кожи на основе изменения уровня данных микроРНК, либо определенных механизмов при их участии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для оценки полного экспрессионного анализа микроРНК в меланоцитарных новообразованиях кожи рекомендуется использование микроэрея, результаты которого соответствуют уровням экспрессии микроРНК, определяемым с помощью ПЦР-РВ, при условии соблюдения одинакового способа фиксации материала.
2. Для решения задач молекулярной диагностики с целью исследования экспрессии микроРНК на основе микрочипирования и ПЦР-РВ, во избежание искажения результатов экспрессионного анализа и ошибок и заблуждений в дальнейшей интерпретации результатов, рекомендуется использовать однотипные образцы ткани, имеющие одинаковый способ фиксации.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Экспериментальная дерматология для начинающих исследователей : монография / Т. Г. Рукша, М. Б. Аксененко, А. В. Комина, **Н. В. Палкина**. – Москва : Литтерра, 2018. – 192 с.
2. Анализ экспрессии микроРНК при меланоме кожи / Ю. И. Швецова, **Н. В. Палкина**, М. Б. Аксененко, Т. Г. Рукша // Онкология. Журнал имени П. А. Герцена. – 2014. – Т. 2, № 3. – С. 43–46. (Перечень ВАК)

3. Изменения экспрессии микроРНК при меланоцитарных новообразованиях кожи / Ю. И. Швецова, **Н. В. Палкина**, М. Б. Аксененко, Т. Г. Рукша // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015. – Т. 18, № 3. – С. 6–9. (Перечень ВАК)
4. Особенности экспрессионного профиля микроРНК в клетках меланомы кожи и опухолевого микроокружения / А. В. Комина, М. Б. Аксененко, **Н. В. Палкина**, С. А. Артемьев, Т. Г. Рукша // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – № 5. – С. 67–73. (Перечень ВАК)
5. Сравнительный анализ микрочипирования микроРНК в образцах меланомы кожи в зависимости от способа фиксации материала / А. В. Комина, **Н. В. Палкина**, М. Б. Аксененко, Т. Г. Рукша. – DOI 10.18821/1560-9588-2016-19-4-200-205 // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2016. – Т. 19, № 4. – С. 200–205. (Перечень ВАК)
6. Анализ профилей микроРНК у пациентов с меланоцитарными новообразованиями кожи / М. Б. Аксененко, А. В. Комина, **Н. В. Палкина**, Т. Г. Рукша. – DOI 10.17116/onkolog20176123-27 // Онкология. Журнал им. П. А. Герцена. – 2017. – Т. 6, № 1. – С. 23–27. (Перечень ВАК)
7. Зависимость профиля микроРНК в меланоме кожи от клинико-морфологических характеристик опухоли / А. В. Комина, **Н. В. Палкина**, М. Б. Аксененко, Т. Г. Рукша. – DOI 10.18821/1560-9588-2016-19-5-266-272 // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2016. – Т. 19. – № 5. – С. 266–272. (Перечень ВАК)
8. Снижение миграционной активности и пролиферации клеток меланомы кожи BRO при ингибировании микроРНК-4286 / С. В. Цыренжапова, Е. Ю. Сергеева, М. Б. Аксененко, **Н. В. Палкина**, А. В. Комина, Т. Г. Рукша. – DOI 10.18821/1560-9588-2017-20-4-196-200 // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2017. – Т. 20, № 4. – С. 196–200. (Перечень ВАК)
9. Проопухолевые эффекты ингибирования микроРНК miR-106a в клетках меланомы кожи in vitro / **Н. В. Палкина**, А. В. Комина, М. Б. Аксененко, Т. Г. Рукша // Цитология. – 2016. – Т. 58, № 9. – С. 679–687. (Перечень ВАК, включен в международные базы цитирования)
Переводная версия: The pro-oncogenic effect of microRNA inhibition in melanoma cells in vitro / **N. V. Palkina**, A. V. Komina, M. B. Aksenenko, T. G. Ruksha. – DOI 10.1134/S1990519X17010072 // Cell and Tissue Biology. – 2017. – Vol. 11, № 1. – P. 1–8.
10. Молекулы микроРНК как инструмент диагностики заболеваний головы и шеи, сопровождающихся неопластическим ростом / К. П. Аникин, Т. Г. Рукша, С. Л. Бакшеева, Т. В. Казанцева, **Н. В. Палкина**, Т. Л. Маругина // В мире научных открытий. – 2017. – Т. 9, № 4. – С. 77–95. (Перечень ВАК)
11. Анализ биологических свойств клеток меланомы кожи на разных этапах опухолевой прогрессии и метастазирования / **Н. В. Палкина**, А. В. Комина, М. Б. Аксененко, Т. Г. Рукша. – DOI 10.25208/0042-4609-2017-93-6-60-66 // Вестник дерматологии и венерологии. – 2017. – № 6. – С. 60–66. (Перечень ВАК)

12. Повышение уровня экспрессии miR-204-5p в клетках меланомы кожи под воздействием дакарбазина / С. Н. Лаврентьев, М. Б. Аксененко, А. С. Аверчук, А. В. Комина, **Н. В. Палкина**, Т. Г. Рукша. – DOI 10.21294/1814-4861-2019-18-3-45-53 // Сибирский онкологический журнал. – 2019. – Т. 18, № 3. – С. 45–53. (Перечень ВАК, включен в международные базы цитирования)
13. МикроРНК как регуляторы эффектов ультрафиолетового излучения в клетках кожи / Т. Г. Рукша, Е. Ю. Сергеева, **Н. В. Палкина**, М. Б. Аксененко, А. В. Комина, Г. М. Климина, Р. Н. Белоногов // Цитология. – 2016. – Т. 58, № 10. – С. 733–743. (Перечень ВАК, включен в международные базы цитирования)
14. Жизнеспособность клеток меланомы B16 *in vitro* и токсичность ингибитора miR-204-5p (LNATM) *in vivo* при модуляции экспрессии miR-205-5p у мышей / **Н. В. Палкина**, А. В. Комина, М. Б. Аксененко, Р. Н. Белоногов, С. Н. Лаврентьев, Т. Г. Рукша. – DOI 10.31116/tsitol.2018.03.04 // Цитология. – 2018. – Т. 60, № 3. – С. 180–187. (Перечень ВАК, включен в международные базы цитирования)
- Переводная версия: Toxicity of miR-204-5p inhibition for melanoma B16 cells *in vitro* and mice *in vivo* / **N. V. Palkina**, A. V. Komina, M. B. Aksenenko, R. N. Belonogov, S. N. Lavrentev, T. G. Ruksha. – DOI 10.1134/S1990519X18040077 // Cell and Tissue Biology. – 2018. – Vol. 12, № 4. – P. 307–314.
15. Молекулярные механизмы развития резистентности при целевом воздействии на молекулярные мишени на примере меланомы кожи/ Т. Г. Рукша, Д. С. Земцов, С. Н. Лаврентьев, **Н. В. Палкина**, А. Р. Есимбекова // Молекулярная медицина. – 2020. – Т. 18, № 6. – С. 11–18. (Перечень ВАК)
16. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of miR-4286 inhibition in melanoma cells / A. Komina, **N. Palkina**, M. Aksenenko, S. Tsyrenzhapova, T. Ruksha. – DOI 10.1371/journal.pone.0168229 // PLOS One. – 2016. – Vol. 11, № 12. – P. e0168229. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article/authors?id=10.1371/journal.pone.0168229> (date of access: 21.05.2020). (Включен в международные базы цитирования)
17. MiR-204 and miR-3065 exert antitumor effect on melanoma cells / **N. Palkina**, A. Komina, M. Aksenenko, A. Moshev, A. Savchenko, T. Ruksha. – DOI 10.3892/ol.2018.8443 // Oncology Letters. – 2018. – Vol. 15, № 6. – P. 8269–8280. (Включен в международные базы цитирования)
18. Melanoma Incidence mortality rates and clinico-pathological types in the Siberian area of the Russian Federation / S. N. Gyrylova, M. B. Aksenenko, D. V. Gavrilyuk, **N. V. Palkina**, Y. A. Dyhno, T. G. Ruksha, I. P. Artyukhov. – DOI 10.7314/apjcp.2014.15.5.2201 // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2014. – Vol. 15, № 5. – P. 2201–2204. (Включен в международные базы цитирования)
19. Ruksha, T. G. MicroRNA in skin diseases / T. G. Ruksha, A. V. Komina, **N. V. Palkina**. – DOI 10.1684/ejd.2017.3024 // European Journal of Dermatology. – 2017. – Vol. 27, № 4. – P. 343–352. (Включен в международные базы цитирования)
20. Differences in microRNA expression between melanoma and healthy adjacent skin / M. Aksenenko, **N. Palkina**, A. Komina, L. Tashireva, T. Ruksha. – DOI

- 10.1186/s12895-018-0081-1 // BMC Dermatology. – 2019. – Vol. 19, № 1. – P. 1–9. (Включен в международные базы цитирования)
21. Патент № 2560711 Российская Федерация, МПКG01N 33/50 (2006.01). Способ дифференциальной диагностики меланоцитарных новообразований кожи : № 2014123570/15 : заявл. 06.09.2014 : опубл. 20.08.2015 / Ю. И. Швецова, **Н. В. Палкина**, Т. Г. Рукша ; патентообладатель ГБОУ ВПО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ». – Бюл. № 23.
22. Характер экспрессии онко-микроРНК при меланоцитарных новообразованиях кожи и в экспериментальной модели меланомы кожи при развитии метастазирования / Т. Г. Рукша, Ю. И. Швецова, **Н. В. Палкина**, М. Б. Аксененко // Евразийский онкологический журнал. – 2014. – № 3. – С. 118–119.
23. MiR-4286 inhibition alters proliferation and apoptosis in melanoma cells / **N. Palkina**, A. Komina, M. Aksenenko, T. Ruksha // Journal of Investigative Dermatology. – 2016. – Vol. 136, № 9S (Suppl. 2). – P. S241. (Включен в международные базы цитирования)
24. MicroRNA 204-5p decreases proliferation/viability and the ability to form colonies in melanoma cells / **N. Palkina**, A. Komina, M. Aksenenko, T. Ruksha. – DOI 10.1016/j.jid.2017.07.777 // Journal of Investigative Dermatology. – 2017. – Vol. 137, № 10 (Suppl. 2). – P. S291. (Включен в международные базы цитирования)
25. MiR-204-5p modulators application in vitro and in vivo in melanoma cells / M. Aksenenko, **N. Palkina**, A. Komina, T. Ruksha. – DOI 10.1016/j.jid.2019.07.549 // Journal of Investigative Dermatology. – 2019. – Vol. 139, № 9. – P. S300. (Включен в международные базы цитирования)
26. MiR-204-5p expression in cutaneous melanoma: Inhibition and target genes / М. Б. Аксененко, А. В. Комина, **Н. В. Палкина**, R. N. Belonogov, T. G. Ruksha // International Journal of Molecular Medicine. – 2018. – Vol. 42, № S1. – P. 250. (Включен в международные базы цитирования)
27. MicroRNA expression alterations during melanoma progression and metastasis development / A. Komina, **N. Palkina**, S. Tsyrenzhapova, M. Aksenenko, Y. Shvetsova, T. Ruksha // Journal of Investigative Dermatology. – 2015. – Vol. 135, № 2. – P. S25. (Включен в международные базы цитирования)
28. Ruksha, T. MicroRNA signature differs in melanoma microenvironment and tumor cells / T. Ruksha, A. Komina, **N. Palkina**. – DOI 10.1016/j.ejcsup.2015.08.084 // European Journal of Cancer Supplements. – 2015. – Vol. 13, № 1. – P. 47.
29. Комина, А. В. Анализ профилирования микроРНК при меланоме кожи и меланоцитарных новообразованиях кожи / А. В. Комина, **Н. В. Палкина**, С. В. Цыренжапова // Актуальные проблемы патофизиологии : XXI Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием (8-9 апреля 2015 года). – Санкт-Петербург : Из-во СПбГМУ, 2015. – С. 75–77.
30. **Палкина, Н. В.** Исследование экспрессионного профиля меланомы кожи и функциональной роли онкомикроРНК miR-106a и miR-4286 / Н. В. Палкина, А. В. Комина // Материалы V Студенческой научно-практической конференции

с международным участием «Путь в науку» (Москва, 21 апреля 2016 г.). – Москва : Изд-во Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, 2016. – С. 29–30.

31. MicroRNA expression in tumor and surrounding non-cancerous melanoma tissue / M. B. Aksenenko, **N. V. Palkina**, A. V. Komina, T. G. Ruksha // The 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research : proceedings of the International Symposium (Tomsk, Russia, Sept. 17-19, 2018). – Tomsk : Publishing house of Tomsk University, 2018. – P. 6–7.

32. Melanoma cell growth and migration alterations under miR-204-5p inhibitor application / S. N. Lavrentev, M. B. Aksenenko, **N. V. Palkina**, A. V. Komina, T. G. Ruksha // The 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research : proceedings of the International Symposium (Tomsk, Russia, Sept. 17-19, 2018). – Tomsk : Publishing house of Tomsk University, 2018. – P. 63–65.

33. MiR-204-5p inhibitor application affects melanoma cell proliferation rates and immunocompetent cells presence in melanoma metastasis target organ / **N. V. Palkina**, A. V. Komina, M. B. Aksenenko, A. S. Moshev, A. A. Savchenko, T. G. Ruksha // The 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research : proceedings of the International Symposium (Tomsk, Russia, Sept. 17-19, 2018). – Tomsk: Publishing house of Tomsk University, 2018. – P. 81–82.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ГМ – гены-мишени

ДМНОК – доброкачественные меланоцитарные новообразования кожи

кДНК – комплементарная ДНК

МК – меланома кожи

МНОК – меланоцитарные новообразования кожи

мРНК – матричная РНК

ОТ – обратная транскрипция

ПЦР-РВ – количественная полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени

СП – сигнальные пути

FFPE – (от англ. Formalin Fixation Paraffin Embedding) фиксированные в формалине и заключенные в парафин образцы ткани

KEGG – (от англ. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Киотская энциклопедия генов и геномов

Соискатель:



Н.В. Палкина