



© Е.И. Антонова<sup>1</sup>, И.А. Балдуева<sup>2</sup>, А.В. Куницына<sup>1</sup>, Т.Л. Нехаева<sup>2</sup>,  
А.Б. Ачилов<sup>1</sup>, А.К. Королева<sup>1</sup>, Н.В. Фирсова<sup>1</sup>, С.В. Сихарулидзе<sup>3</sup>

## Профилирование miRNAs в аспекте разработки диагностической панели метастазирования меланомы кожи в модели клеточных линий меланомы\*

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», г. Ульяновск, Российская Федерация  
<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>3</sup>Общество с ограниченной ответственностью «ВМ КЛИНИК», г. Ульяновск, Российская Федерация

© Elena I. Antonova<sup>1</sup>, Irina A. Baldueva<sup>2</sup>, Anastasia V. Kunitsyna<sup>1</sup>, Tatjana L. Nekhaeva<sup>2</sup>,  
Atabeg B. Achilov<sup>1</sup>, Anastasia K. Koroleva<sup>1</sup>, Natalia V. Firsova<sup>1</sup>, Sergey V. Sikharulidze<sup>3</sup>

## Profiling miRNAs in Exosomes for the Development of a Diagnostic Panel for Melanoma Metastasis in Melanocyte and Melanoma Cell Line Models

<sup>1</sup>Ulyanovsk State Pedagogical University, Ulyanovsk, the Russian Federation

<sup>2</sup>N.N. Petrov National Medicine Research Center of Oncology, St. Petersburg, the Russian Federation

<sup>3</sup>Multidisciplinary Hospital «VM-Clinic», Ulyanovsk, the Russian Federation

**Введение.** Один из возможных механизмов метастазирования, лежащий в основе онкогенеза меланомы представляет собой изменение экспрессии профиля miRNAs. Характер экспрессии miRNAs в клеточных линиях меланоцитов меланомы оцениваются как потенциальные биологические маркеры этапов метастазирования меланомы.

**Цель.** Определить в клеточных линиях меланомы кожи профиль miRNAs как потенциальных биомаркеров этапов метастазирования меланомы, используя панель из пяти miRNAs (miR-21-5p - miR-149-3p - miR-150-5p - miR-155-5p - miR-193a-5p).

**Материалы и методы.** В клеточной линии меланомы кожи методом qRT-ПЦР в режиме реального времени анализировали уровень экспрессии miRNAs, проводили расчет относительного уровня по методу  $\Delta\Delta Ct$  с определением относительной концентрации (RQ) относительно экзогенного контроля. Параметры определялись в зависимости от пассажа культивирования.

**Результаты.** Анализируемый профиль miRNAs клеточной линии поверхностно распространяющейся меланомы кожи, в зависимости от сроков культивирования выявил, что на более ранних сроках культивирования повышается экспрессия miR-149-3p, miR-21-5p и на более поздних в первую очередь miR-155-5p, далее miR-150-5p, miR-193-5p, как ассоциированные с прогрессированием меланомы.

**Выводы.** Анализируемый профиль miRNAs клеточной линии поверхностно распространяющейся меланомы кожи как ассоциированные с прогрессированием меланомы могут быть предложены в качестве диагностических и/или прогностических биомаркеров, а также могут рассматриваться в качестве потенциальных терапевтических мишеней.

**Ключевые слова:** меланома; miRNA; меланоциты in vitro; диагностика; qRT-ПЦР; метастазирование

**Introduction.** One possible mechanism of metastasis underlying melanoma oncogenesis involves changes in the expression profile of miRNAs. The expression pattern of miRNAs in exosomes of melanoma cell lines can be evaluated as potential biological markers for melanoma metastasis stages.

**Aim.** In cutaneous melanoma cell lines to determine the profile of miRNAs as potential biomarkers of melanoma metastatic stage using a panel of five miRNAs (miR-21-5p, miR-149-3p, miR-150-5p, miR-155-5p and miR-193a-5p).

**Materials and Methods.** The expression level of miRNAs was analysed in a skin melanoma cell line using real-time qRT-PCR. The relative expression level was calculated using the  $\Delta\Delta Ct$  method with determination of the relative quantification (RQ) compared to the exogenous control. Parameters were determined depending on the passage of cultivation.

**Results.** Analysis of the miRNA profile of a superficial melanoma cell line as a function of cultivation time showed that the expression of miR-149-3p, miR-21-5p increased in earlier stages of cultivation and that miR-155-5p, followed by miR-150-5p, miR-193-5p, that were the main miRNAs associated with melanoma progression in later stages.

**Conclusion.** The analysed profile of miRNAs of a superficial spreading skin melanoma cell line as associated with melanoma progression can be proposed as diagnostic and/or prognostic biomarkers and can also be considered as potential therapeutic targets.

**Keywords:** melanoma; miRNA; melanocytes in vitro; diagnosis; qRT-PCR; metastasis

\* С переводом всего текста статьи на английский язык можно ознакомиться в основном печатном выпуске журнала и на сайте.

**Для цитирования:** Антонова Е.И., Балдуева И.А., Куницына А.В., Нехаева Т.Л., Ачилов А.Б., Королева А.К., Фирсова Н.В., Сихарулидзе С.В. Профилирование miRNAs в аспекте разработки диагностической панели метастазирования меланомы в модели клеточных линий меланоцитов меланомы. Вопросы онкологии. 2024; 70(4): 652-660.-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-4-652-660

**For Citation:** Elena I. Antonova, Irina A. Baldueva, Anastasia V. Kunitsyna, Tatjana L. Nekhaeva, Atabeg B. Achilov, Anastasia K. Koroleva, Natalia V. Firsova, Sergey V. Sikharulidze. Profiling miRNAs in exosomes for the development of a diagnostic panel for melanoma metastasis in melanocyte and melanoma cell line models. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2024; 70(4): 652-660. (In Rus).-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-4-652-660

✉ Контакты: Антонова Елена Ивановна, antonov\_67@mail.ru

## Введение

Меланома кожи — клинически многоликое, самое агрессивное и молекулярно гетерогенное заболевание, характеризуется ранним метастазированием, заболеваемость которой растет во всем мире. 10-летняя выживаемость составляет от стадии IA до IV от 95 % до 10–15 % соответственно [1–3].

Меланома кожи чаще отмечается в гериатрической популяции, средний возраст на момент постановки диагноза — 65 лет, также диагностируется у подростков и молодых людей от 25 до 50 лет [4]. Заболеваемость в мире в разбивке по полу составляет 3,5 % мужчин и 2,9 % женщин, с обратной тенденцией после 40 лет. Молекулярные изменения характеризуются гиперактивацией PI3K/AKT и MAPK пути, инактивацией p53 и изменениями оси CDK4/CDKN2A [5]. УФ-излучение, меланоцитарные и диспластические невусы — два основных фактора риска развития меланомы кожи.

Один из возможных механизмов, лежащий в основе онкогенеза меланомы, представляет собой изменение экспрессии профиля miRNA, в т. ч. и под действием УФ-излучения [6–8]. Присутствуя в экзосомах miRNA участвуют в межклеточных цитокоммуникациях, модулируют характеристики соседних с меланомой клеток или напрямую воздействуют на опухолевую нишу, модифицируя внеклеточную матрицу [5, 9]. Отдельные miRNA позволяют дифференцировать меланому на метастатическую и неметастатическую, при этом проявляют себя как онкогены или супрессоры опухолей с ключевыми функциями в канцерогенезе и прогрессировании рака [7, 8, 10]. Исследования указывают на существование уникального специфического профиля экспрессии miRNAs в различных типах опухолей и на разных стадиях ее развития [8]. Характер экспрессии miRNAs в клеточных линиях меланомы и клинических образцах оценивались как биологический маркер раннего этапа меланомы в 2006 г. [11].

miRNA размером 22–26 нуклеотидов, относятся к классу некодирующих РНК, которые могут регулировать экспрессию генов путем распознавания и специфического связывания с комплементарными последовательностями в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) miRNA и впоследствии приводят к деградации и подавлению трансляции целевого транскрипта и белков.

Реже взаимодействуют с 5'UTR кодирующей или промоторной области [6, 7, 12]. miRNAs экзосом действуют как регуляторы клеточных процессов посредством одновременной модуляции уровней экспрессии сотен miRNAs, таким образом, проявляют плеiotропное модулирование широкого спектра биологических процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, развитие. Способность miRNAs одновременно подавлять несколько мишеней рассматривается как новая фармакологическая стратегия лечения рака [7].

Экзосомы — мембранные нано-везикулы, которые секретируются большинством типов клеток, включая клетки опухоли. Биохимический состав экзосом, включая miRNA представляется «молекулярным профилем» секретирующих их клеток. Экзосомы опухолевого происхождения могут рассматриваться как естественные и биологически стабильные комплексы молекулярных онкомаркеров [13]. Так, в частности, роль miRNA miR-193a-3p при меланоме кожи изучена лишь частично [7]. Во время биогенеза RNA из pre-miR-193a образуются две зрелые miRNA: miR-193a-3p и miR-193a-5p. Обе экспрессируются во всех тканях в физиологических условиях [13], их регуляция нарушается при различных типах рака, при которых они проявляют себя как супрессоры опухолей или онкогены. miRNA miR-21-5p участвует в регуляции уровней PTEN, PDCD4, BTG2 и связана с различными патологическими состояниями организма, включая неоонкогенез [14–16]. Высокий уровень экспрессии miR-21-5p является негативным предиктором выживания при различных формах рака [12]. Отмечена важная роль miR-21-5p в пролиферации клеток, прогрессировании опухоли [17], функционально определяет повышение инвазивности клеток меланомы [18]. miR-155 играют важную роль в различных физиологических и патологических процессах, в контроле ангиогенеза при меланоме [19, 20], угнетая гликолиз, образование АТФ [5, 9]. Большую роль в процессе клеточной миграции играет p53-чувствительная miR-149-3p [21].

3D-модели меланоцитов меланомы *in vitro* позволяют изучать онкогенез опухоли в микро-среде, более близкой к таковой к условиям *in vivo*. Анализ меланоцитов меланомы дает возможность напрямую анализировать спектр miRNA, непосредственно выделенные из опухолей, и, таким образом, смоделировать различные

стадии метастатического процесса. Полученные данные позволят оптимизировать разработку методов лечения, нацеленных на конкретные этапы метастазирования, для улучшения показателей клинического ответа и общей выживаемости больных. Анализируемая в работе панель miRNAs рассматривается в качестве потенциальных диагностических маркеров или мишеней для терапии в будущем. Понимание важной роли miRNA в прогрессировании меланомы будет способствовать развитию таргетной терапии с использованием miRNAs, которые взаимодействуют с наиболее важными регуляторными путями развития и прогрессирования меланомы — MAPK/ERK и PI3K/PTEEN/Akt [22, 23].

В связи с этим целью нашей работы — в клеточных линиях меланоцитов меланомы определить профиль miRNAs, как потенциальных биомаркеров этапов метастазирования меланомы, используя панель из пяти miRNAs: miR-21-5p, miR-149-3p, miR-150-5p, miR-155-5p, miR-193a-5p.

### Материалы и методы

*Сравнительный анализ проводили в модели in vitro.* Биологический материал — клеточные линии меланомы кожи человека, полученные от шести пациентов с поверхностно-распространяющейся меланомой (SSM). Первичная культура получена методом экспланта кожного лоскута размером 2,0 × 5,0 см с информированного согласия каждого пациента во время проведения планового хирургического вмешательства (ООО «ВМ-Клиник» г. Ульяновска). Все работы проводились по протоколу Фрешни [24]. Для получения первичной культуры эксплант механически и химически диспергировали, далее клеточную суспензию помещали в чашки Петри (TPP, Швейцария) и флаконы объемом 25 см<sup>2</sup> (TPP, Швейцария) с питательной средой (RPMI-1640 (Панэко, Россия) с 10 % сывороткой эмбрионов телят (HyClone, США), гентамицином (Панэко, Россия). Инкубацию проводили в мультигазовом инкубаторе CB-53 (BINDER GmbH, Германия), при температуре +37 °С, CO<sub>2</sub> 5 %. Осаждение клеток проводили на центрифуге Allegra X-30R (Beckman Coulter, Германия). Для субкультивирования клетки монослоя переводили в суспензию раствором трипсин-ЭДТА (ПанЭко) и расселяли в новые флаконы и чашки Петри в концентрации 200 тыс./мл на 1 флакон/чашку Петри. Подсчет количества клеток проводили на автоматическом счетчике клеток (BioRad, США) с предварительной окраской трипановым синим. Контроль роста клеточных линий проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа «Axio Vert. A1 FL» с цифровой цветной видеокамерой AxioCam 105 (Carl Zeiss,

Германия). Контролем послужили клеточные линии меланоцитов пигментного невуса.

Для проведения одного ПЦР-анализа требуемое количество клеток составляет 10<sup>4</sup>–10<sup>6</sup>/1 мл. Для выделения тотальной miRNA культуры клеток использовался набор mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion/Thermo Scientific, Германия). Для этого клеточные линии меланоцитов предварительно снимали с флакона 0,25 % раствором Трипсина–Версена, промывали охлажденным раствором 1xPBS. Перед добавлением лизирующего буфера к суспензии клеток вносили 1 мкл. 0,05 мкМ раствора cel-miR-39-3p на каждый 10<sup>6</sup> клеток/мл в качестве внутреннего контроля. Полученный препарат тотальной miRNA далее отбирали в пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл и хранили при температуре -80 °С.

Для проведения обратной транскрипции использовали набор TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Германия). Для проведения qRT-ПЦР в реальном времени использовалась смесь TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific, Германия), набор для детекции микроРНК TaqMan™ Advanced miRNA Assay (Thermo Scientific, Германия) miR-21-5p, miR-149-3p, miR-150-5p, miR-155-5p, miR-193a-5p. Для всех образцов была выбрана единая величина порогового значения Ct – 0,1 (программа qPCRsoft 3.0), согласно инструкции производителя, как показатель уровня экспрессии анализируемых miRNA. Определяли величину ΔCt, соответствующую количеству циклов, при которых кривая флуоресценции пересекала заданный уровень фона. Каждый эксперимент выполняли в двух технологических повторях с дальнейшим расчетом среднего значения ΔCt<sub>ср.</sub> Расчет относительного уровня проводился по методу ΔΔCt с определением относительной концентрации miRNA (RQ) относительно экзогенного контроля [25]. Нуклеотидные последовательности анализируемых miRNAs (табл. 1) получали из базы данных miRBase (www.mirbase.org).

**Таблица 1. Нуклеотидные последовательности анализируемых miRNAs**

**Table 1. Nucleotide sequences of the analyzed miRNAs**

miRNAs	Нуклеотидная последовательность
miR-155-5p	UUAAUGC UAUCGUGAUAGGGGUU
miR-149-3p	AGGGAGGGACGGGGCUGUGC
miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG
miR-193a-5p	AACUGGCCUACAAAGUCCAGU
miR-21-5p	AUGCUUAUCAGACUGAUGUUGA

qRT-ПЦР анализ проводили по конечной точке в режиме «реального времени» на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США).

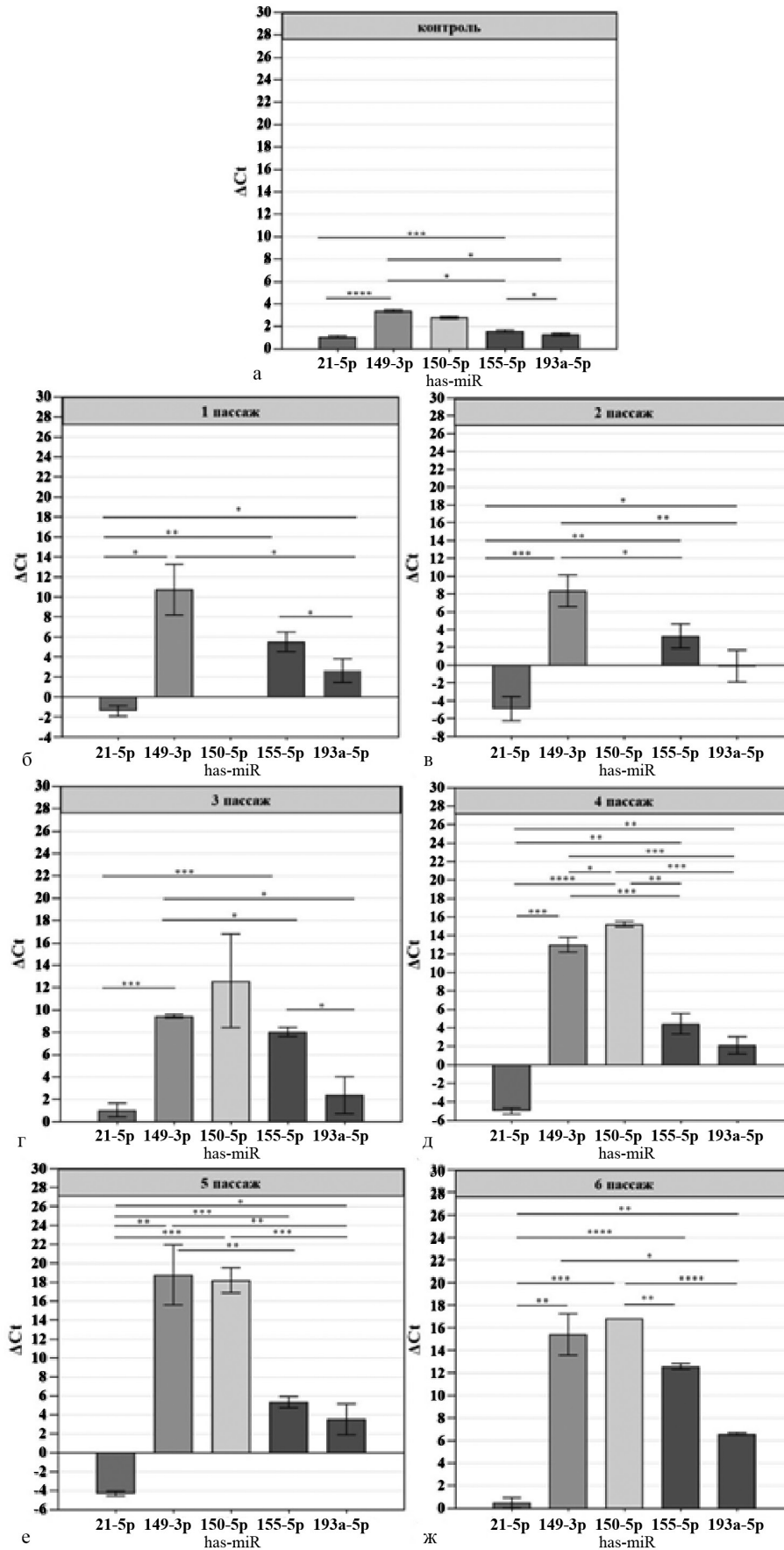


Рис. 1. Показатели  $\Delta C_{tcr}$  уровня экспрессии miRNAs в клеточной линии меланцитов меланомы с первого по шестой пассаж культивирования по результатам qRT-ПЦР в реальном времени  
 Fig. 1.  $\Delta C_{tcr}$  values of miRNAs expression level in melanoma melanocyte cell line from the first to the sixth passage of cultivation by real-time qRT-PCR

**Статистическая обработка.** Для обработки полученных данных использовали Prism 8.0.1 (Graphpad, США). Для определения нормальности распределения данных использовали метод Шапиро-Уилка (SW). Поскольку значение  $p$  (SW) больше 0,05 принималась нулевая гипотеза о нормальном распределении данных и для статистической обработки использованы параметрические методы. На начальном этапе анализа полученных количественных данных использовали методы описательной статистики; для каждой выборки было рассчитано среднее значение (Mean) и среднее квадратичное отклонение (Sd). Статистическую значимость различий значений оценивали с применением  $t$ -критерия Стьюдента. Множественное попарное сравнение  $\Delta Ct_{cp}$  каждой исследуемой miRNA с 1-го по 6-й пассажи проводено с использованием теста Тьюки. При проверке статистических гипотез достоверными считались различия при критическом уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

**Первый пассаж.** Профиль анализируемых видов miRNA выявил, что самый высокий показатель  $\Delta Ct_{cp}$  в анализируемой панели miRNA (рис. 1) отмечен miR-149-3p, самый низкий — miR-193a-5p. При этом не выявлена экспрессия miR-150-5p.

**Второй пассаж.** Характер (рис. 1) показателей анализируемой панели miRNA меланоцитов меланомы второго и первого пассажа проявляют схожие показатели  $\Delta Ct_{cp}$ , с той лишь разницей, что уровень экспрессии miR-149-3p и miR-155-5p несколько ниже, в отличие от уровня экспрессии miR-21-5p, уровень экспрессии которой увеличивается.

**Третий пассаж.** Отличительной особенностью является регистрация экспрессии miR-150-5p (рис. 1), которая проявляет самые высокие показатели среди всех анализируемых miRNAs в данном пассаже.

Несколько ниже показатели  $\Delta Ct_{cp}$  miR-149-3p и miR-155-5p (в отличие от предыдущих

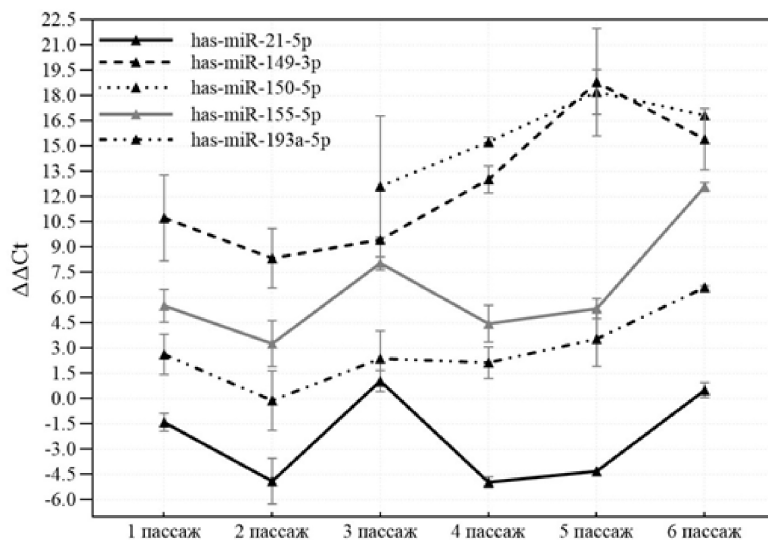


Рис. 2. Межгрупповой анализ относительного уровня экспрессии ( $\Delta\Delta Ct$ ) анализируемой панели miRNAs, с первого до шестого пассажа  
Fig. 2. Intergroup analysis of the relative expression level ( $\Delta\Delta Ct$ ) of the panel of miRNAs analyzed, from the first to the sixth passage

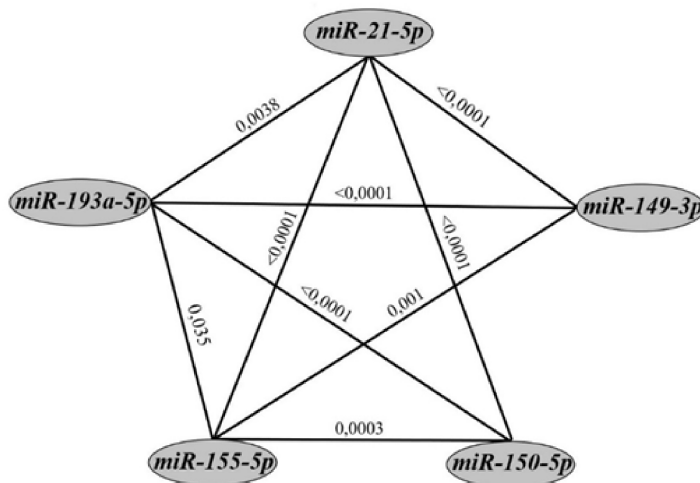


Рис. 3. Множественное попарное сравнение  $\Delta Ct$  исследуемых miRNAs с 1-го по 6-й пассажи (тест Тьюки)  
Fig. 3. Multiple pairwise comparison of the  $\Delta Ct$  of the miRNAs studied from passages 1 to 6 (Tukey's test)

пассажей), самые низкие показатели  $\Delta\text{Ctcr}$  отмечены miR-193a-5p.

*Четвертый пассаж.* Также, как и на третьем пассаже (рис. 1), отмечается высокий уровень экспрессии miRNA miR-150-5p и miR-149-3p, самые низкие показатели  $\Delta\text{Ctcr}$  miR-193a-5p.

*Пятый пассаж.* По-прежнему отмечен самый высокий уровень экспрессии (рис. 1) miR-150-5p и miR-149-3p. Ниже экспрессия  $\Delta\text{Ctcr}$  miR-155-5p. В пределах данного пассажа miR-21-5p и miR-193a-5p проявили самый низкий уровень экспрессии.

*Шестой пассаж.* В отличие от пятого пассажа помимо высоких показателей экспрессии (рис. 1) miR-150-5p, miR-149-3p, отмечены высокие показатели экспрессии miR-155-5p. Также отличительной особенностью данного пассажа является выраженное увеличение экспрессии, в сравнении с другими пассажами miR-193a-5p.

Относительно контрольных показателей (меланоциты пигментного невуса) межгрупповое сравнение выявило (рис. 2) значимое увеличение уровня экспрессии ( $\Delta\text{Ctcr}$ ) анализируемой панели miRNA. Так, в частности, экспрессия miR-21-5p значимо увеличивается на первом пассаже на 27 %, на остальные пассажи более чем в 4 раза. Экспрессия miR-149-3p значимо увеличивается на первом пассаже в 3,2 раза, на втором и третьем — более, чем в 2 раза, на четвертом — в 3,8 раз, на пятом и шестом — более, чем в пять раз. Экспрессия miR-150-5p значимо увеличивается с четвертого по шестой пассаж более, чем в пять раз. Экспрессия miR-155-5p значимо увеличивается на первом, четвертом пассаже более, чем 3 раза, самое выраженное увеличение экспрессии отмечено на пятом пассаже (в 5 раз) и на шестом — более, чем в семь раз. Экспрессия относительно контроля miR-193a-5p значимо увеличивается только на шестом пассаже в пять раз.

Множественное попарное сравнение (рис. 3)  $\Delta\text{Ctcr}$  от первого к шестому пассажи выявил, что все анализируемые типы miRNAs значимо отличаются по степени экспрессии за исключением в паре miR-149-3p и miR-150-5p.

### Обсуждение

Учитывая, наличие уникального специфического профиля экспрессии miRNAs на разных стадиях развития меланомы кожи [8], нами выявлены особенности экспрессии анализируемой панели miRNAs.

Так, в частности, экспрессия miRNA miR-155-5p с первых пассажей культивирования и к шестому увеличивалась в 7 раз, это самый высокий уровень экспрессии среди анализируемых miRNA. Известно miR-155-5p играют важную роль в различных физиологических и патологических процессах, входят в состав экзосом, участвуя в контроле ангиогенеза при меланоме [19], играют решающую роль в пере-

программировании микроокружения опухоли, в ингибировании процессов пролиферации и индукция апоптоза [9]. Хотя опухолевый ангиогенез модулируется различными факторами, экзосомальная miR-155-5p может быть потенциальной мишенью для контроля ангиогенеза меланомы и использоваться для разработки новых стратегий лечения.

Отличительной особенностью miR-150-5p в нашем эксперименте является отсутствие экспрессии с первого по третий пассаж и высокие показатели экспрессии с четвертого по шестой. Следует отметить, что по уровню повышения экспрессии miR-150-5p на втором месте после miR-155. miR-150-5p является одной из наиболее изученных miRNAs и играет важную роль в процессах онкогенеза меланомы — подавляет пролиферацию, определяет реструктуризацию цитоскелета, инвазию клеток, ингибирует экспрессию гена SIX1, нацеливаясь на его 3'-UTR, угнетая гликолиз, образование АТФ и определяет развитие механизмов снижения чувствительности к некоторым лекарственным препаратам [20]. Гликолиз, регулируемый miR-150-5p/SIX1, имеет решающее значение для регуляции роста опухоли, апоптоза, прогнозирования метастазирования и выживания клеток как *in vitro*, так и *in vivo* [5]. miR-150-5p нацелена на широкий спектр онкогенов или генов-супрессоров опухоли, факторы транскрипции, такие как ZEB1, HMG2, FOXO4 и c-MYB, а также ключевые сигнальные пути, включая wnt/ $\beta$ -катенин и TGF $\beta$ , воздействуя на множество эффекторов, включая матриксные металлопротеиназы (MMP14 и MMP13), молекулы клеточной адгезии (ITGA3, ITGA6). Считается, что TGF $\beta$  оказывает подавляющее опухоль действие на начальных стадиях рака, предотвращая пролиферацию клеток и способствуя апоптозу, однако TGF $\beta$  стимулирует метастазирование опухоли на поздней стадии опухоли [26], что мы и наблюдали в ходе нашего исследования. Также отмечено, что miR-150-5p регулирует транскрипционный фактор KLF2, принимающий активное участие в моделировании воспалительных хемокинов в клетках иммунной системы, и, может использоваться в качестве прогностических и диагностических маркеров регуляторов дифференцировки и активации иммунных клеток, которые участвуют во врожденных и адаптивных иммунных реакциях. Отмечается, что высокая экспрессия miR-150-5p в образцах опухолей пациента указывает на лучший прогноз и лучший ответ на адьювантную химиотерапию.

Уровень экспрессии miR-149-3p плавно нарастал от первого к шестому пассажи, также следует отметить, что по уровню повышения экспрессии miR-149-3p на третьем месте после miR-150-5p и miR-155-5p. Уровень экспрессии miR-149-3p играет большую роль в процессе клеточной миграции и прогрессировании опухоли [21]. Отмечается, что p53-чувствительная miR-149\*, сверхэкспрес-

сируется в изолятах метастатической меланомы человека и нацеливается на glycogen synthase kinase-3 alpha (GSK3 $\alpha$ ), вызывая устойчивость клеток меланомы к апоптозу за счет увеличения экспрессии Mcl-1, регулируют циклин-независимые белки клеточного цикла [27]. Было обнаружено, что множественные первичные меланомы имеют более высокую экспрессию семейства miR-149-3p, по сравнению с одиночными меланомами кожи и невусами, что также отмечено и в ходе нашего исследования. Пути TGF- $\beta$ 2, Wnt/ $\beta$ -катенин, Hippo, TWEAK/EGFR и IL-6/STAT3 являются основными сигнальными путями регуляции экспрессии miR-149-3p. По результатам TARGET SCAN [28], предполагается, что miR-149-3p проявляет анти-ОС-способности, инактивируя путь PI3K/Akt.

Отмеченное нами плавное устойчивое нарастание экспрессии miRNA miR-21-5p, отражает нарушение в регуляции сигнальных путей опухолевых белков-супрессоров PTEN, PDCD4, BTG2, развитие патологического состояния организма, включая неоонкогенез, может способствовать росту опухоли, метастазированию и инвазии, снижению чувствительности к химиотерапии. Высокий уровень экспрессии miR-21-5p является негативным предиктором выживания при различных формах рака [12], который увеличивается в зависимости от длительности культивирования. Важно отметить, что роль miR-21-5p в пролиферации клеток, прогрессировании опухоли за счет сверхэкспрессии в тканях меланомы значительно выше, по сравнению с доброкачественными опухолями, в нашем случае в сравнении с пигментным невусом, вследствие этого может выступать в качестве прогностического биомаркера [17].

miR-21-5p функционально повышает инвазивность клеток меланомы путем ингибирования тканевого ингибитора металлопротеиназ 3 (MMP-3) [18]. Большое количество исследований указывают на нарушение регуляции клеточного цикла в точке рестрикции G<sub>1</sub>/S, S и G<sub>2</sub>/M фазе практически для всех виды опухолей человека, включая меланому, при этом регуляторная роль miR-21-5p в этом случае, вероятно, осуществляется путем влияния на ген CDKN2C меланомы кожи с последующим эффектом усиления пролиферации на уровне перехода G<sub>1</sub>/S клеточного цикла [12].

Подавление экспрессии miR-21-5p ингибировало рост и метастатический потенциал меланомы за счет активации апоптоза, а также повышало химио- или радиочувствительность меланомы кожи человека, что указывает на потенциал применения miR-21-5p в терапевтических целях.

По уровню повышения экспрессии miR-21-5p на четвертом месте после miR-155-5p, miR-150-5p и miR-149-3p.

В нашем исследовании не выявлена на первых пассажах культивирования (ранних этапах)

повышения экспрессии miR-193-5p, что также отмечено в других исследованиях [7, 15]. В то же время резкое увеличение экспрессии miR-193-5p на шестом пассаже культивирования определяет значительное снижение жизнеспособности клеток, экспрессию генов, участвующих в пролиферации (ERBB2, KRAS, PIK3R3 и MTOR) и апоптозе (MCL1 и NUSAP1), подавление путей Akt и Erk, угнетение действия антиапоптотических факторов и экспрессии лиганда апоптоза PD-L1. Таким образом, создается возможность «ухода» меланомы от факторов иммунной системы [29]. Полученные результаты экспрессии miR-193a-5p, могут представлять собой новый метод лечения пациентов с меланомой кожи, с учетом и того факта, что экспрессия miR-193 сопряжена с мутационным статусом гена BRAF в тканях меланомы [14].

Нами отмечено, что панель анализируемых miRNAs меланоцитов меланомы могут предоставить новые биомаркеры, прогнозирующие реакцию пациента на ингибирование иммунных контрольных точек, и разумно предположить, что объединение miRNAs с различными мишенями иммунных контрольных точек может имитировать и, возможно, улучшить эффект комбинированной терапии блокады иммунных контрольных точек. Таргетная терапия и иммунотерапия значительно улучшили исход больных меланомой на поздних стадиях, но часто возникают резистентность и токсичность, а также неполный терапевтический ответ. Анализ профиля miRNAs в качестве клинических биомаркеров более корректно проводить непосредственно из клеток опухоли с позиции анализа механизмов метастазирования, нежели циркулирующих в крови по таким причинам как наличие клеточного детрита, гемолиз и другие факторы, которые потенциально могут влиять на воспроизводимость и чувствительность.

## Заключение

В исследовании рассмотрена модель развития метастазирования меланомы на примере длительности культивирования меланоцитов поверхностно распространяющейся меланомы в корреляции с уровнем экспрессии панели из пяти анализируемых miRNAs. Анализируемый профиль miRNAs, в зависимости от сроков культивирования выявил, что на более ранних сроках культивирования повышается экспрессия miR-149-3p, miR-21-5p и на более поздних, в первую очередь, miR-155-5p, далее miR-150-5p, miR-193-5p, как ассоциированные с прогрессированием меланомы и могут быть предложены в качестве диагностических и/или прогностических биомаркеров, а также могут рассматриваться в качестве потенциальных терапевтических мишеней.

*Конфликт интересов*

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Conflict of interest*

The authors declare no conflict of interest.

*Соблюдение правил биоэтики*

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА в редакции 2013 г. Заседание Этического комитета ООО «ВМ-Клиник» г. Ульяновска, одобрявшего исследование и утвердившего форму информированного согласия от 11.09.2023 г., протокол № 21. Материал для исследования получен из ООО «ВМ-Клиник» (г. Ульяновск). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

*Compliance with the rules of bioethics*

The study was carried out in accordance with the WMA. Declaration of Helsinki as amended in 2013. The meeting of the Ethics Committee of the Ulyanovsk «VM-Clinic» approved the study and the informed consent form on 11 September 2023, Protocol No. 21. The research material was obtained from the multiprofile hospital «VM-Clinic», Ulyanovsk. All patients gave written informed consent to participate in the study.

*Финансирование*

Исследования выполнены за счет субсидий из федерального бюджета Министерства просвещения РФ на финансовое обеспечение выполнения государственного задания № 073-00037-2302 от 31.07.2023 г. (регистрационный номер 1023012300024-4-1.6.4).

*Financing*

The research was conducted on the basis of grants from the federal budget of the Ministry of Education of the Russian Federation for financial support of the fulfilment of the state task No. 073-00037-2302 dated 31.07.2023 (registration No. 1023012300024-4-1.6.4).

*Участие авторов*

Антонова Е.И. — идея публикации, написание текста статьи; Антонова Е.И., Куницына А.В. — отбор исследований; Куницына А.В., Ачилов А.Б., Королева А.К. — внесение информации об исследованиях и проведение анализа; Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Фирсова Н.В., Сихарулидзе С.В. — редактирование статьи.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразил (и) согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

*Authors' contributions*

Antonova E.I. — suggested the idea for the publication, wrote the manuscript; Antonova E.I., Kunitsyna A.V. — chose material for the study; Kunitsyna A.V., Achilov A.B., Koroleva A.K. — introduced information about the study and analyzed the data; Baldueva I.A., Nekhaeva T.L., Firsova N.V., Sikharulidze S.V. — edited the article.

All authors have approved the final version of the article prior to publication and have agreed to take responsibility for all aspects of the work, including the proper investigation and resolution of issues relating to the accuracy or integrity of any part of the paper.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2022; 252.-ISBN: 978-5-85502-280-3. [Malignant neoplasms In Russia in 2021: incidence and mortality. Ed. by

Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Shahzadova A.O. Moscow: P.A. Herzen MROI - branch of the FSBOI «NMR Radiological Centre» of the Ministry of health of the Russian Federation. 2022; 252.-ISBN: 978-5-85502-280-3. (in Rus)].

2. Leiter U., Keim U., Garbe C. Epidemiology of skin cancer: Update 2019. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1268.-DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-46227-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-46227-7_6). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32918216>.

3. Sun W., Zhao F., Hu T., et al. Oncogenic alterations reveal key strategies for precision oncology in melanoma treatment. *Ann Transl Med.* 2022; 10(22): 1246.-DOI: <https://doi.org/10.21037/atm-22-5346>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36544693>.

4. MicroRNA in human malignancies. 1st ed. Ed. by Negrini M., Calin G.A., Croce C.M. *Elsevier.* 2022; 418.-DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822287-4.09993-X>. -URL: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128222874/microrna-in-human-malignancies>.-ISBN: 9780128222874.

5. Ghafouri-Fard S., Gholipour M., Taheri M. MicroRNA signature in melanoma: biomarkers and therapeutic targets. *Front Oncol.* 2021; 11: 608987.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.608987>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33968718>.

6. Петкевич А.А., Шубина И.Ж., Абрамов А.А., et al. Особенности экспрессии микроРНК в меланоцитах и клетках меланомы человека. *Рос биотерапевт ж.* 2018; 17(3): 6-11.-ISSN: 1726-9784.-DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2018-17-3-6-11>. URL: <https://bioterapevt.elpub.ru/jour/article/view/1095>. [Petkevich A.A., Shubina I.Zh., Abramov A.A., et al. Features of MicroRNA expression in human melanocytes and melanoma cells. *Russian Journal of Biotherapy.* 2018; 17(3): 6-11.-ISSN: 1726-9784.-DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2018-17-3-6-11>. URL: <https://bioterapevt.elpub.ru/jour/article/view/1095>. (in Rus)].

7. Polini B., Carpi S., Doccini S., et al. Tumor suppressor role of hsa-miR-193a-3p and -5p in Cutaneous Melanoma. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(17): 6183.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21176183>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32867069>.

8. Antonova E., Hambikova A., Shcherbakov D., et al. Determination of common microRNA biomarker candidates in stage IV melanoma patients and a human melanoma cell line: a potential anti-melanoma agent screening model. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(11): 9160.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24119160>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37298110>.

9. Gajos-Michniewicz A., Czyz M. Role of MiRNAs in melanoma metastasis. *Cancers J (Basel).* 2019; 11(3): 326.-DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers11030326>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30866509>.

10. Антонова Е.И., Соловьев А.В., Баранов А.В., Хамбикова А.В. Профиль микроРНК в плазме крови в аспекте развития подходов ранней диагностики меланомы. Материалы II всероссийской научной конференции с международным участием: тезисы. Чебоксары: Среда. 2019; 7-12.-EDN: EVEUCR. URL: <https://elibrary.ru/eveucr?ysclid=lq4wwzau do921400154>. [Antonova E.I., Solovyov A.V., Baranov A.V., Khambikova A.V. The profile of microRNAs in blood plasma in the aspect of the development of approaches to early diagnosis of melanoma. Materials of the II all-russian scientific conference with international participation: abstracts. Cheboksary: Sreda. 2019; 7-12.-EDN: EVEUCR. URL: <https://elibrary.ru/eveucr?ysclid=lq4wwzau do921400154>. (in Rus)].

11. Zhang L., Huang J., Yang N., et al. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103(24): 9136-9141.-DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0508889103>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16754881>.

12. Yang Z., Liao B., Xiang X., Ke S. miR-21-5p promotes cell proliferation and G1/S transition in melanoma by targeting CDKN2C. *FEBS Open Bio.* 2020; 10(5): 752-760.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febsopen.2020.05.008>.



- org/10.1002/2211-5463.12819. URL: [https://www.researchgate.net/publication/339452672\\_MiR-21-5p\\_promotes\\_cell\\_proliferation\\_and\\_G1S\\_transition\\_in\\_melanoma\\_by\\_targeting\\_CDKN2C](https://www.researchgate.net/publication/339452672_MiR-21-5p_promotes_cell_proliferation_and_G1S_transition_in_melanoma_by_targeting_CDKN2C).
13. Khordadmehr M., Shahbazi R., Sadreddini S., Baradaran B. miR-193: A new weapon against cancer. *J Cell Physiol.* 2019; 234(10): 16861-16872.-DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.28368>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30779342>.
  14. Yong F.L., Law C.W., Wang C.W. Potentiality of a triple microRNA classifier: miR-193a-3p, miR-23a and miR-338-5p for early detection of colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2013; 13: 280.-DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-280>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23758639>.
  15. Tsai K.W., Leung C.M., Lo Y.H., et al. Arm selection preference of microRNA-193a varies in breast cancer. *Sci Rep.* 2016; 6: 28176.-DOI: <https://doi.org/10.1038/srep28176>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27307030>.
  16. Whiteside T.L. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015; 15(10): 1293-1310.-DOI: <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1071666>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26289602>.
  17. Babapoor S., Wu R., Kozubek J., et al. Identification of microRNAs associated with invasive and aggressive phenotype in cutaneous melanoma by next-generation sequencing. *Lab Invest.* 2017; 97: 636-648.-DOI: <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.5>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28218741>.
  18. del Campo S.E.M., Latchana N., Levine K.M., et al. MiR-21 enhances melanoma invasiveness via inhibition of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 expression: in vivo effects of MiR-21 inhibitor. *PLoS One.* 2015; 10(1): e0115919.-DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115919>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25587717>.
  19. Zhou X., Yan T., Huang C., et al. Melanoma cell-secreted exosomal miR-155-5p induce proangiogenic switch of cancer-associated fibroblasts via SOCS1/JAK2/STAT3 signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018; 37(1): 242.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0911-3>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30285793>.
  20. Zhang J., Wu W., Xu S., et al. MicroRNA-105 inhibits human glioma cell malignancy by directly targeting SUZ12. *Tumour Biol.* 2017; 39(6): 1010428317705766.-DOI: <https://doi.org/10.1177/1010428317705766>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28618952>.
  21. Silva B.O., Lima K.F., Gonçalves L.R., et al. MicroRNA profiling of the effect of the heptapeptide angiotensin-(1-7) in A549 lung tumor cells reveals a role for miRNA149-3p in cellular migration processes. *PLoS One.* 2016; 11(9): e0162094.-DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162094>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28618952>.
  22. Weidle U.H., Ausländer S., Brinkmann U. Micro RNAs promoting growth and metastasis in preclinical in vivo models of subcutaneous melanoma. *Cancer Genomics & Proteomics.* 2020; 17(6): 651-667.-DOI: <https://doi.org/10.21873/cgp.20221>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33099468>.
  23. Poniewierska-Baran A., Śluczana-Głąbowska S., Małkowska P., et al. Role of miRNA in melanoma development and progression. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(1): 201.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24010201>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36613640>.
  24. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. Перевод 5-го английского издания. М.: Бинном. Лаборатория знаний. 2010; 691.-EDN: QKTJKZ.-ISBN: 978-5-94774-596-2. [Freshni R.J. Culture of animal cells. Practical guide. Translation of the 5th English edition. Moscow: Binom. Laboratory of Knowledge. 2010; 691.-EDN: QKTJKZ.-ISBN: 978-5-94774-596-2. (in Rus)].
  25. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-408.-DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609>.
  26. Ameri A., Ahmed H.M., Pecho R.D.C., et al. Diverse activity of mir-150 in tumor development: shedding light on the potential mechanisms. *Cancer Cell Int.* 2023; 23(261).-DOI: <https://doi.org/10.1186/s12935-023-03105-3>. URL: [https://www.researchgate.net/publication/375283802\\_Diverse\\_activity\\_of\\_miR-150\\_in\\_Tumor\\_development\\_shedding\\_light\\_on\\_the\\_potential\\_mechanisms](https://www.researchgate.net/publication/375283802_Diverse_activity_of_miR-150_in_Tumor_development_shedding_light_on_the_potential_mechanisms).
  27. Jin L., Hu W.L., Jiang C.C., et al. MicroRNA-149\*, a p53-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 15840-15845.-DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1019312108>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21896753>.
  28. TargetScanHuman. Prediction of microRNA targets. Version 7.1 (June 2016). Whitehead Institute for Biomedical Research. Bioinformatics and Research Computing. 2006-2016. URL: [www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert\\_71/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir\\_c=miR-149-5p&mir\\_sc=&mir\\_nc=&sortType=cs&allTxs=&incl\\_nc=100](http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_c=miR-149-5p&mir_sc=&mir_nc=&sortType=cs&allTxs=&incl_nc=100), (28.11.2021).
  29. Rodrigues D.V.S., Monteiro V.V.S., Navegantes-Lima K.C., et al. MicroRNAs in cell cycle progression and proliferation: molecular mechanisms and pathways. *Non-coding RNA Investigation* 2. 2018; 1-19.-DOI: <https://doi.org/10.21037/ncri.2018.04.06>. URL: [https://www.researchgate.net/publication/325214553\\_MicroRNAs\\_in\\_cell\\_cycle\\_progression\\_and\\_proliferation\\_molecular\\_mechanisms\\_and\\_pathways](https://www.researchgate.net/publication/325214553_MicroRNAs_in_cell_cycle_progression_and_proliferation_molecular_mechanisms_and_pathways).

Поступила в редакцию / Received / 04.12.2023

Прошла рецензирование / Reviewed / 13.02.2024

Принята к печати / Accepted for publication / 22.02.2024

#### Сведения об авторах / Author's information / ORCID

Елена Ивановна Антонова / Elena I. Antonova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3686-9686>, SPIN-код 4863-9977.

Ирина Александровна Балдуева / Irina A. Baldueva / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7472-4613>, SPIN-код 7512-8789.

Анастасия Владимировна Куницына / Anastasia V. Kunitsyna / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1962-7992>, SPIN-код 3959-9980.

Татьяна Леонидовна Нежаева / Tatjana L. Nekhaeva / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7826-4861>, SPIN-код 5366-8969.

Атабег Батырович Ачилов / Atabeg B. Achilov / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5478-0415>, SPIN-код 9243-7612.

Анастасия Константиновна Королева / Anastasia K. Koroleva / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7180-5442>.

Наталья Викторовна Фирсова / Natalia V. Firsova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9907-8857>, SPIN: 9810-2814.

Сергей Владимирович Сихарулидзе / Sergey V. Sikharulidze / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3053-8421>.

