

МикроРНК как регуляторы выживаемости химиорезистентных клеток меланомы кожи



Палкина Надежда Владимировна

ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России

Рис.1. (А) Результаты МТТ-теста для определения IC_{50} для дакарбазина. (Б) Эффективность трансфекции имитатора miR-204-5p в клетки меланомы, обработанные дакарбазином, уровень miR-204-5p после трансфекции имитатора повысился, а TWF1 (гена-мишени miR-204-5p) снизился.

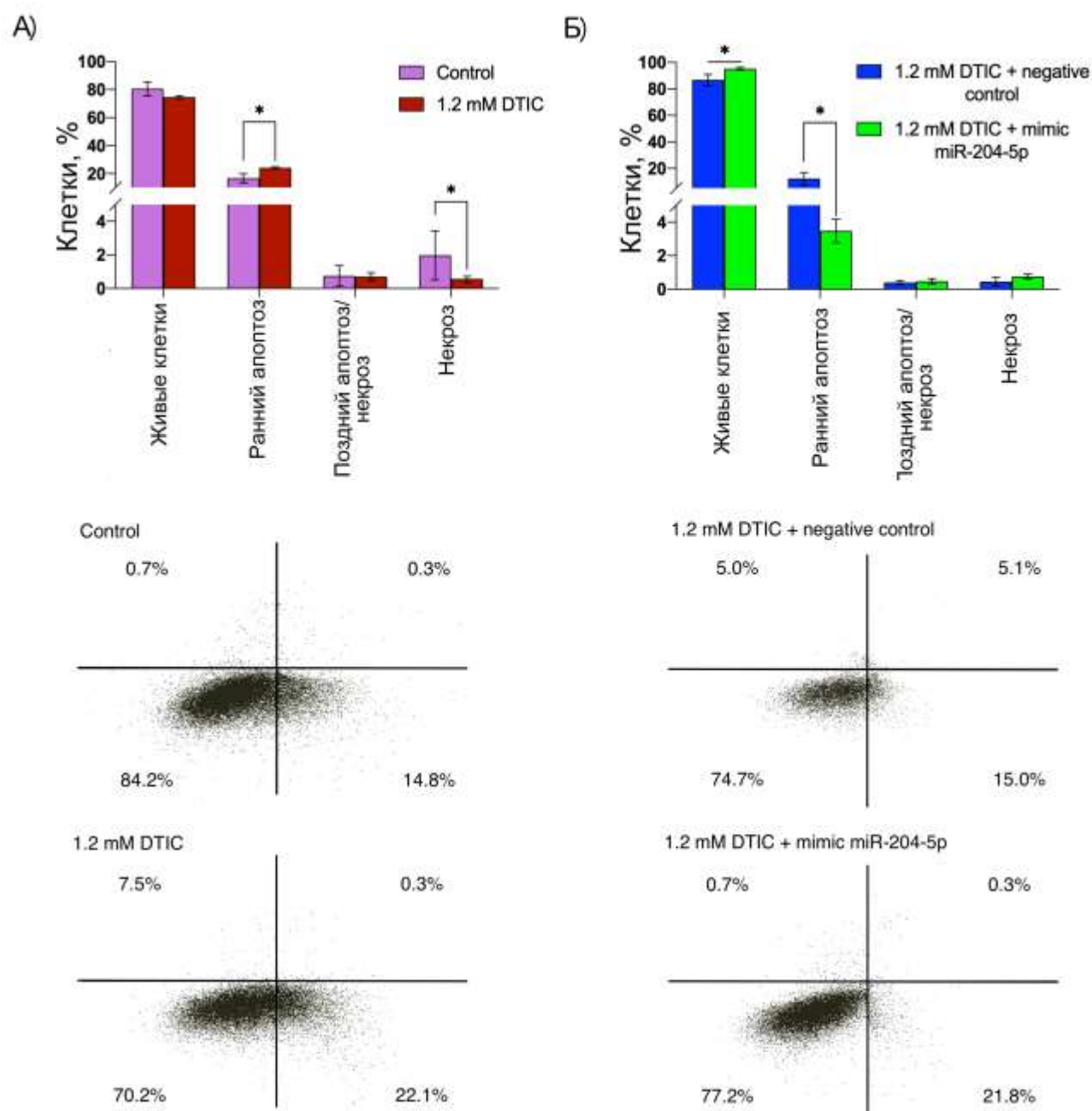
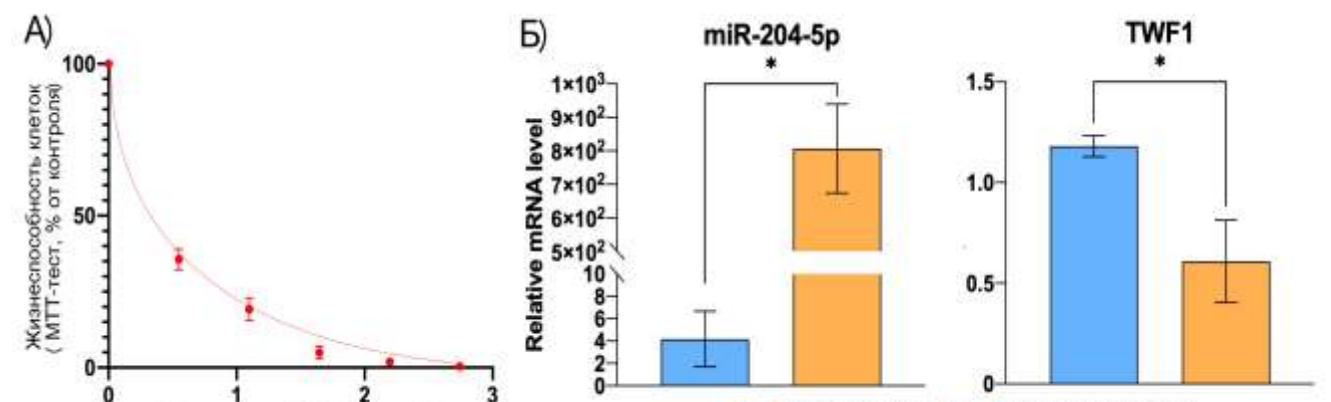


Рис. 2. Процентное соотношение живых, апоптотических и некротических клеток после обработки (А) 1,2 мМоль DTIC и (Б) после трансфекции miR-204-5p в клетки, предварительно обработанные DTIC, по итогам проточной цитометрии.

Терапия диссеминированной меланомы кожи является малоэффективной, в том числе из-за развития резистентности опухолевых клеток к препаратам, используемым в схемах стандартной терапии данной опухоли, что опосредованно различными механизмами, до конца не исследованными. Приобретение устойчивого фенотипа опухолевых клеток связано не только с генетическими, но с эпигенетическими изменениями, опосредуемыми регуляторными молекулами микроРНК.

Цель: исследовать способность микроРНК miR-204-5p оказывать влияние на изменение клеточного цикла и апоптоза клеток меланомы, устойчивых к химиотерапевтическому алкилирующему агенту дакарбазину (DTIC), применяющемуся в стандартной химиотерапии меланомы кожи.

Методы исследования: культивирование клеток меланомы линии SK-MEL-2 (ATCC® HTB-68™), определение полумаксимальной (50%) ингибирующей концентрации дакарбазина на основе колориметрического метода оценки метаболита 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ), транзиторную трансфекцию в клетки меланомы синтетического аналога микроРНК miR-204-5p (имитатора), исследование фаз клеточного цикла (определение G0-фазы) и детекцию уровня

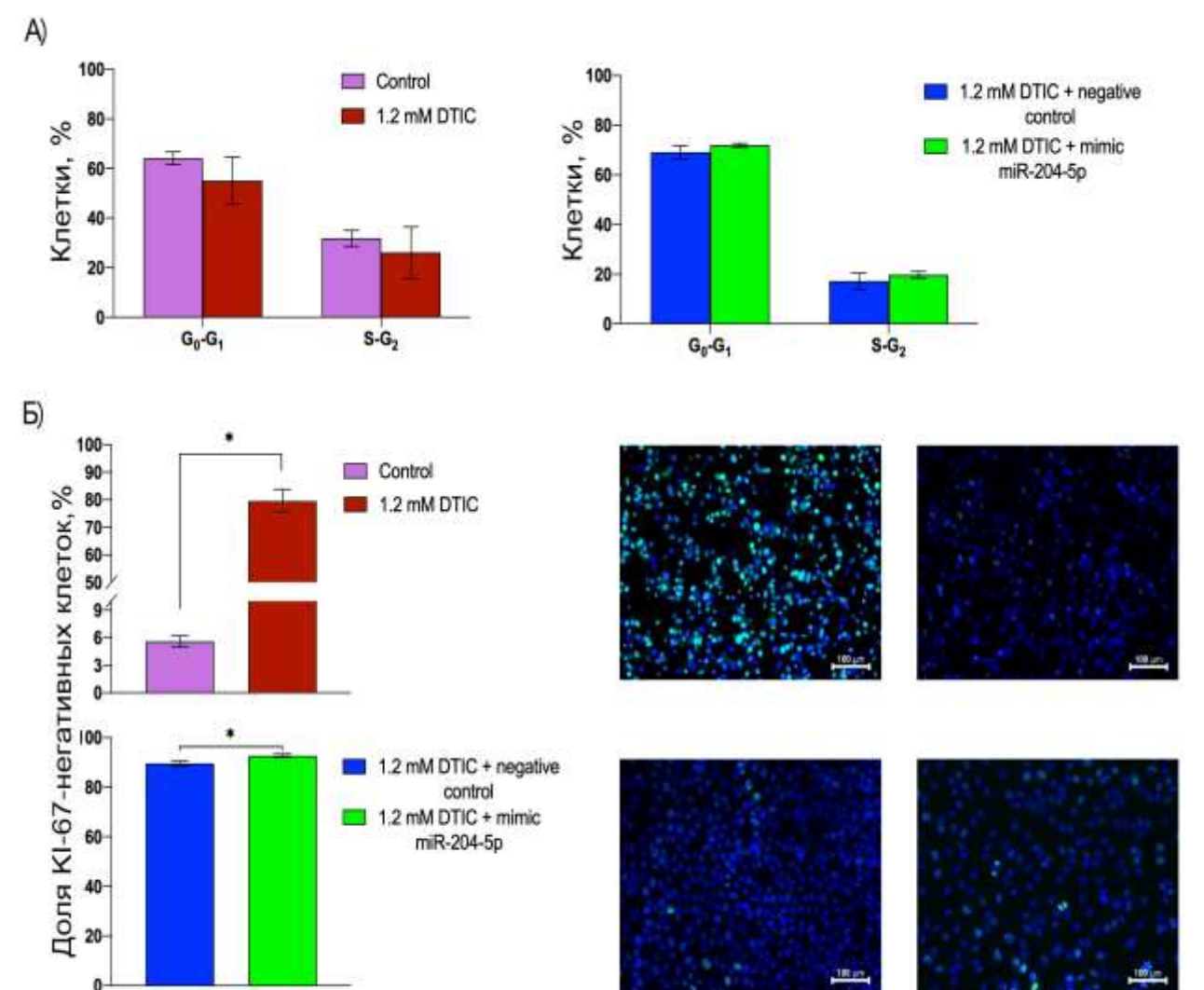


Рис. 3. (А) Доля клеток меланомы в фазах G0/G1 и S/G2 клеточного цикла по результатам проточной цитометрии до и после обработки 1,2 мМоль DTIC, а также после трансфекции miR-204-5p в клетки, предварительно обработанные DTIC. (Б) Уровни Ki-67-негативных клеток до и после обработки 1,2 мМоль DTIC, а также после трансфекции miR-204-5p в клетки по результатам иммуноцитохимического исследования. На микрофотографиях ядра Ki-67-негативных клеток окрашены в темно-синий цвет, при этом бирюзовое свечение не наблюдается.

апоптоза клеток методом проточной цитометрии, иммунофлуоресцентный анализ, оценку экспрессии генов методом ПЦР в режиме реального времени.

Эффективная трансфекция синтетического имитатора микроРНК miR-204-5p в клетки меланомы кожи, получившие воздействие дакарбазином в концентрации $4 \times IC_{50}$ (рис. 1) приводила к увеличению доли клеток, находящихся в апоптозе (рис. 2), что подтверждает вовлечение исследуемой молекулы микроРНК miR-204-5p в регуляцию дакарбазин-индуцированного апоптоза, при этом фазы клеточного цикла G0-G1 и S-G2 выживших клеток не изменялись (рис. 3А). Однако доля химиорезистентных Ki-67-негативных клеток после обработки клеток дакарбазином увеличилась, а дополнительная трансфекция имитатора еще больше повысила этот показатель (рис. 3Б).

Результаты данного исследования продемонстрировали, что микроРНК miR-204-5p может влиять на устойчивость опухолевых клеток меланомы кожи к химиотерапевтическим препаратам, главным образом, посредством модуляции апоптоза. Эти данные позволяют предположить, что модулирование уровней микроРНК miR-204-5p можно рассматривать как обоснованный терапевтический подход для лечения меланомы кожи.

Исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда (№ 19-15-00110П).