

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ мРНК MDM2 И NFkB1 В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДВУХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ АРАНОЗЫ

А. В. Пономарев, В. А. Мисюрин, А. А. Рудакова, О. С. Бутова, А. В. Мисюрин, М. А. Барышникова
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Александр Васильевич Пономарев kl8546@yandex.ru

Введение. Проблема резистентности к противоопухолевым препаратам является серьезным препятствием для успешной химиотерапии опухолей. В ряде работ показано, что липосомальные формы противоопухолевых препаратов способны преодолеть множественную лекарственную устойчивость, но механизм, с помощью которого это происходит, до сих пор не известен. Одним из химиопрепаратов, применяемых для лечения меланомы, является араноза из класса нитрозомочевины – метилирующий ДНК агент.

Цель исследования – изучить воздействие лекарственных форм аранозы (липосомальной и «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» (араноза-лио)), а также пустых липосом на экспрессию мРНК p53, MDM2, NFkB1, NFkB2, MyD88 в опухолевых клетках.

Материалы и методы. Исследование проводили на 10 клеточных линиях метастатической меланомы человека, 4 из которых несли мутацию BRAF. Клеточные линии инкубировали 24 ч с лекарственными формами аранозы – аранозой-лио и липосомальной, а также с пустыми липосомами. В количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени исследовали уровень экспрессии генов p53, MDM2, NFkB1, NFkB2, MyD88.

Результаты. Араноза-лио повышает экспрессию мРНК p53 незначительно и только на BRAF-положительных клетках, при этом статистически значимо ($p = 0,0013$) повышает экспрессию мРНК MDM2 – фактора резистентности опухоли к химиотерапии. Экспрессия мРНК белков NFkB2, MyD88 не отличалась при воздействии разных лекарственных форм аранозы и слабо отличалась от контроля. Липосомальная араноза повышает экспрессию мРНК NFkB1 – фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК метилированием.

Выводы. Две лекарственные формы аранозы – липосомальная и араноза-лио – оказывают различное воздействие на внутриклеточные сигнальные пути в клетках метастатической меланомы. Араноза-лио запускает механизмы устойчивости к химиотерапии посредством повышения экспрессии мРНК MDM2. Липосомальная араноза, наоборот, запускает механизмы, способствующие чувствительности клеток к терапии, через повышение экспрессии мРНК NFkB1 – фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК метилированием.

Ключевые слова: араноза, меланома, p53, MDM2, NFkB1

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-52-58

THE INFLUENCE OF DRUG FORMULATIONS ON THE EXPRESSION OF MDM2 AND NFkB1 mRNA IN THE MELANOMA CELL LINES

A. V. Ponomarev, V. A. Misyurin, A. A. Rudakova, O. S. Burova, A. V. Misyurin, M. A. Baryshnikova

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. Chemotherapy is an extremely ineffective and unsatisfactory means of treating malignant melanoma due to drug resistance, which is characteristic of this disease. A number of studies have shown that liposomal forms of anticancer drugs are able to overcome the multidrug resistance, but the mechanism by which this occurs is still remained to be elucidated. Aranoza (DNA-alkylating agent, a derivative of nitrosourea) has been approved for the treatment of patients with metastatic melanoma.

Objective: to examine the influence of liposomal aranoza as well as the empty liposomes and “liophilisate for the preparation of solution for injections” (aranoza-lío) on the expression of mRNA of p53, MDM2, NFkB1, NFkB2, MyD88.

Materials and methods. The study was performed with 10 melanoma cell lines, 4 of which carried the BRAF mutation. The level of p53, MDM2, NFkB1, NFkB2, MyD88 mRNA was investigated by quantitative polymerase chain reaction in real time.

Results. Aranoza-lío increased slightly the expression of p53 mRNA in BRAF-mutated cells. We have observed also the increased expression of MDM2 mRNA ($p = 0.0013$). The expression of NFkB2, MyD88 mRNA did not change significantly as compared to control. Liposomal aranoza increased the expression of NFkB1 mRNA.

Conclusion. Based on the data obtained we conclude that the liposomal aranoza triggers the mechanisms that contribute to sensitivity of cells toward anticancer drugs while aranoza-lío favored the enhancing of the expression of MDM2 mRNA and increase the resistance to chemotherapy.

Key words: aranoza, melanoma, p53, MDM2, NFkB1

Введение

Химиотерапия — признанный метод лечения онкологических заболеваний, однако к противоопухолевым препаратам часто развивается лекарственная устойчивость, которая приводит к снижению терапевтического эффекта. Поиск способов преодоления лекарственной резистентности является актуальной задачей.

Известно, что липосомальные формы противоопухолевых препаратов способны преодолевать множественную лекарственную устойчивость [1, 2]. Однако механизм, с помощью которого это происходит, до сих пор не изучен. Возможно, липосомы вызывают гибель опухолевых клеток за счет воздействия на сигнальные пути, обеспечивающие защиту этих клеток, в частности на те, в которые вовлечены сигнальные белки p53 и NF-κB (nuclear factor-κB).

NF-κB является индуцибельным транскрипционным фактором, который регулирует экспрессию многих генов, участвующих в регуляции иммунного ответа, апоптоза, ангиогенеза и инвазии опухолевых клеток. Все эти функции указывают на важную роль NF-κB в развитии опухоли.

Механистически NF-κB способствует онкогенезу, вызывая экспрессию различных генов, ответственных за выживание клеток, пролиферацию, миграцию, инвазию. Однако в ряде исследований показано, что высокая экспрессия субъединицы NFκB1, наоборот, может быть связана с противоопухолевыми эффектами [3]. Экспрессия мРНК NFκB1 при многих гематологических заболеваниях примерно в 2 раза ниже по сравнению с образцами здоровых доноров. Клетки, в которых экспрессия NFκB1 низкая, накапливают больше мутаций, индуцированных алкилированием, а у мышей с мутацией гена *NFκB1* лимфомы развиваются чаще, чем у животных с диким типом [4]. Кроме того, у мышей с мутацией гена *NFκB1* наблюдали склонность к хроническим воспалительным заболеваниям и повышенную восприимчивость к бактериальным инфекциям [5].

В исследовании [6] показано, что NFκB1 является эффекторным белком цитотоксического ответа на повреждения ДНК через метилирование. Таким образом, высокая экспрессия NFκB1 необходима для осуществления гибели клеток при повреждениях ДНК.

MyD88 (myeloid differentiation primary response gene (88)) — цитозольный адаптерный белок, участвующий в передаче сигнала от толл-подобных рецепторов (Toll-like receptor, TLR) [7]. TLR2, TLR3 и TLR4 присутствуют на клетках меланомы человека и могут активировать белок MyD88 в ответ на воспалительные стимулы. Активация TLR на клетках меланомы человека индуцируется воспалительными факторами. Экспрессия мРНК MyD88 при этом повышается примерно в 8 раз [8].

p53, «страж генома», является фактором транскрипции, который может связываться с промоторными участками сотен генов, где он либо активирует, либо подавляет экспрессию генов [9]. Таким образом, p53 служит опухолевым супрессором, вызывая остановку клеточного цикла, апоптоз, старение и репарацию ДНК [10]. В нормальных клетках p53 часто не обнаруживается из-за быстрого убиквитинирования MDM2 и последующей протеасомной деградации [11]. Однако при повреждении ДНК и некоторых других стрессах, включая онкогенный стресс, количество p53 увеличивается из-за нарушения его деградации [12]. Примечательно, что инактивация p53 является одной из характеристик рака. Действительно, p53 обладает широким спектром типов мутаций, и примерно в половине всех опухолей p53 обнаруживается мутированным [13]. Еще одним механизмом ухудшения реакции p53 на онкогенный стресс может быть сверхэкспрессия MDM2 [14, 15]. Хотя мутация гена-супрессора опухоли p53 является общей чертой многих типов рака [16], мутационная инактивация p53 при меланоме встречается редко, а p53 дикого типа часто показывает высокие уровни экспрессии [17–19]. Кроме того, увеличение экспрессии p53 не является достаточным фактором для хорошего ответа на лечение меланомы [20]. Таким образом, можно предположить, что p53 дикого типа в меланоме не функционирует в качестве опухолевого супрессора [21].

К числу химиопрепаратов, применяемых для лечения метастатической меланомы, относятся и производные нитрозомочевины, в том числе араноза. Для лечения меланомы кожи зарегистрирована лекарственная форма аранозы «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» (араноза-лио). В лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина создана новая лекарственная форма аранозы — липосомальная [22, 23]. В исследованиях было показано, что липосомальная араноза *in vitro* оказывает воздействие на клеточные линии, устойчивые к аранозе-лио [24]. Было обнаружено, что лекарственные формы аранозы по-разному воздействуют на клетки меланомы [25, 26].

Целью исследования было изучение воздействия лекарственных форм (липосомальной и аранозы-лио) препарата из класса нитрозомочевины аранозы на изменение экспрессии мРНК ключевых сигнальных белков опухолевых клеток.

Материалы и методы

Клеточные линии. Исследования проводили на 10 клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека из банка клеточных культур лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии

опухолей НИИ ЭДнТО НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [27]. Клеточные линии различались по степени дифференцировки и наличию или отсутствию мутаций BRAF [28–30]. Клеточные линии mel Hn, mel 1br, mel II, mel Is несут мутацию BRAF; mel Cher, mel H, mel Gus, mel Bgf, mel Me, mel Mtp – имеют BRAF дикого типа. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин, пенициллин (25 000 Ед) – стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов, при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ (полная среда). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

Противоопухолевые препараты. В исследовании использованы две лекарственных формы аранозы:

- «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 500 мг» (араноза-лио) производства филиала «Наукопрофи» НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина;
- липосомальная араноза, предоставленная лабораторией разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Кроме того, исследовали воздействие на клетки пустых липосом тех же состава и концентрации, которые использовались для липосомальной аранозы.

Клетки инкубировали с лекарственными формами аранозы в концентрации полумаксимального ингибирования (ИК₅₀) и пустыми липосомами в течение 24 ч.

Подготовка клеточного материала и выделение общей РНК. Клетки снимали с культуральных флаконов 0,02 % раствором Версена объемом 2 мл, содержащим 0,25 % трипсина. Клетки находились в трипсине 2 мин при постоянном наблюдении за их состоянием с помощью микроскопа. Добавляли 10 мл буфера STE (0,1 М NaCl, 1 М трис-НСl рН 8,0, 1 мМ этилендиаминтетраацетата) и центрифугировали в течение 5 мин при 800 об/мин. Удаляли супернатант, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл физиологического раствора и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин. Из полученного осадка клеток далее выделяли РНК.

Выделение РНК из предварительно обработанных образцов проводили по протоколу, предложенному P. Chomczynski и N. Sacchi [31]. Подготовленный клеточный материал лизировали в 0,5 мл гуанидин-тиоцианатного буфера (4 М тиоцианата гуанидина, 25 мМ цитрата натрия, 0,5 % N-лаурилсаркозината натрия и 0,1 М меркаптоэтанола). Во время лизиса материал пропускали через иглу 19G не менее 20 раз. Далее в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (рН 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (рН 4,2), встряхивали и добавляли 0,25 мл

хлороформа. Полученную смесь встряхивали до молочно-белого цвета и центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин и охлаждении до 4 °С. После центрифугирования отбирали 0,65 мл верхней водной фазы, содержащей клеточную РНК, и смешивали с 0,65 мл изопропанола. Инкубирование РНК в изопропаноле проводили в течение 20 ч при температуре –20 °С. После инкубирования РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 12 000 об/мин, удаляли супернатант и 2 раза промывали в 80 % этаноле. После промывок осадок РНК высушивали в термостате в течение 20 мин при 37 °С, растворяли в 20 мкл деионизированной воды и измеряли концентрацию раствора.

Для синтеза кДНК с использованием ревертазы брали 2 мкг матричной РНК, выделенной на предыдущем этапе. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием фермента RevertAid Reverse и коммерческого набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, предложенных фирмой-производителем. Для отжига применяли смесь случайных гексамеров («Синтол», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали рабочую смесь без добавления РНК. Пробу доводили до конечного объема 165 мкл деионизированной водой.

Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием 2-кратной реакционной смеси (40 мМ трис-НСl, 100 мМ KCl, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов и 0,2 мМ β-меркаптоэтанола) и Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу было добавлено 5 мкл кДНК, 250 нМ прямого, 250 нМ обратного праймера и 140 нМ флуоресцентного зонда. Подбор праймеров и флуоресцентных зондов проводили с использованием программы Vector NTI 10 на основе данных нуклеотидных последовательностей генов *p53*, *MDM2*, *NFkB1*, *NFkB2*, *MyD88*, доступных на интернет-ресурсе <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

В каждом образце был исследован уровень экспрессии анализируемых генов. Уровень экспрессии рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

Данный эксперимент проводили на приборе DTLite («ДНК-технология», Россия). Программа проведения реакций была следующей: предварительная обработка в течение 5 мин при 94 °С и 45 циклов денатурации в течение 10 с при 94 °С с последующим отжигом праймеров и синтезом в течение 12 с при 60 °С.

Для детекции флуоресценции был выбран канал Hex. Измерения велись по общепризнанной методике относительно гена *ABL*, уровень экспрессии которого был принят за 100 % [32]. Измерения уровня экспрессии проводили в 3 независимых повторах,

после чего для анализа было рассчитано среднее значение. В качестве положительного контроля использовали векторы рЕТ-15b, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность синтезированных олигонуклеотидных последовательностей подтверждена секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Статистический анализ данных. Для сравнения базового уровня экспрессии p53, MDM2, MyD88, NFkB1, NFkB2 между разными группами клеток линий меланомы, различающихся по наличию мутаций гена *BRAF*, применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Для сравнения эффектов, оказываемых различными формами аранозы на уровень экспрессии p53, MDM2, MyD88, NFkB1, NFkB2, был использован критерий Уилкоксона для связанных выборок. Анализ был проведен в программе Statistica v. 7. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Изменение уровня экспрессии мРНК p53 и MDM2.

Перед изучением уровня экспрессии мРНК клеточные линии метастатической меланомы инкубировали 24 ч с исследуемыми препаратами: аранозой-лио (ИК₅₀), липосомальной аранозой (ИК₅₀), пустыми липосомами (<ИК₁₀), в качестве контроля использовали необработанные клетки.

Араноза-лио вызвала 2-кратное повышение экспрессии мРНК p53 по сравнению с необработанными клетками (рис. 1). Липосомальная араноза и пустые липосомы в данной точке измерения не оказали влияния на экспрессию мРНК p53. Однако когда клетки разделили по наличию или отсутствию мутации *BRAF*, оказалось, что данная тенденция свойственна для *BRAF*-положительных клеток (рис. 2, а). В клеточных линиях с *BRAF* дикого типа экспрессия p53 при воздействии аранозы практически не менялась (рис. 2, б).

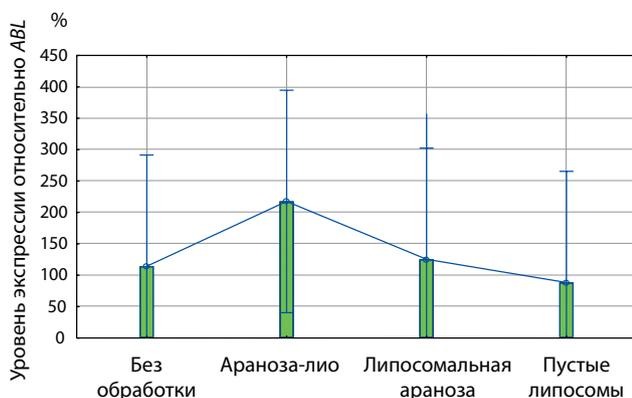


Рис. 1. Изменение уровня экспрессии мРНК p53 после воздействия исследуемыми препаратами

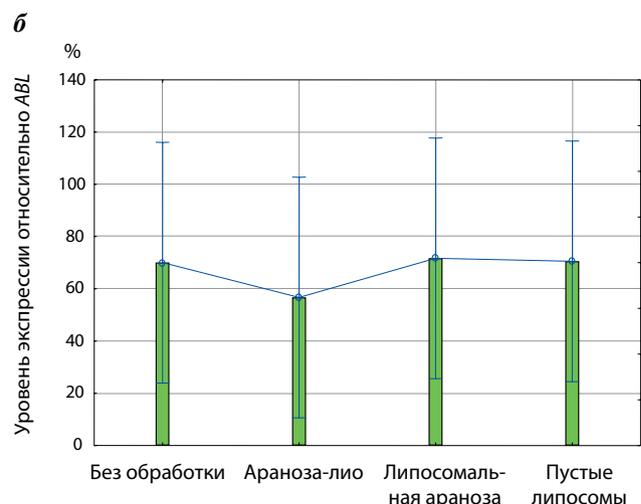
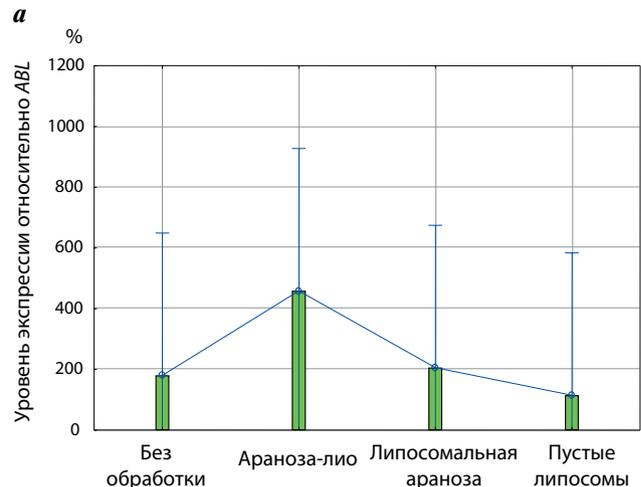


Рис. 2. Изменения уровня экспрессии мРНК p53 после инкубации с исследуемыми препаратами в зависимости от наличия мутации *BRAF*: а – клеточные линии с мутацией *BRAF*; б – клеточные линии с *BRAF* дикого типа

Изучили изменение уровня экспрессии мРНК MDM2, который обычно повышается вслед за p53. Мы увидели, что уровень экспрессии MDM2 повысился после инкубации со всеми исследуемыми лекарственными формами, а также с пустыми липосомами, но статистически значимо было только повышение после воздействия аранозы-лио ($p = 0,0013$) (рис. 3). Возможно, это говорит о том, что p53 уже повышался в клетках, обработанных липосомальной аранозой или пустыми липосомами, а к моменту, когда были сняты данные результаты, снизился.

При разделении клеток в зависимости от наличия мутации *BRAF* оказалось, что, в отличие от результатов по p53, в группе клеток с *BRAF* дикого типа уровень экспрессии мРНК MDM2 статистически значимо ($p = 0,0304$) повышался так же, как и в группе с *BRAF*-мутациями (рис. 4).

Существует много мнений по поводу причин повышенной экспрессии MDM2 в опухолевых

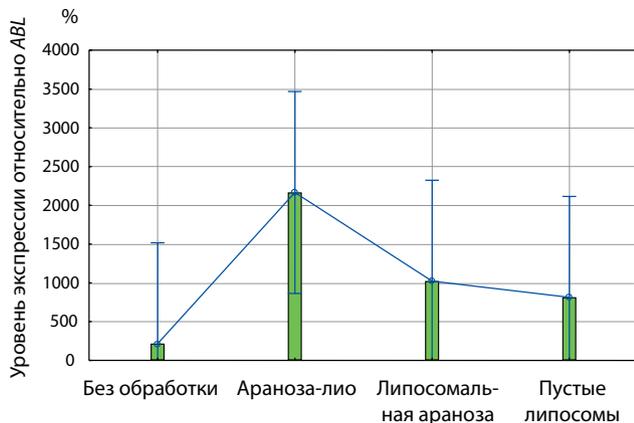


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии мРНК MDM2 после воздействия исследуемыми препаратами

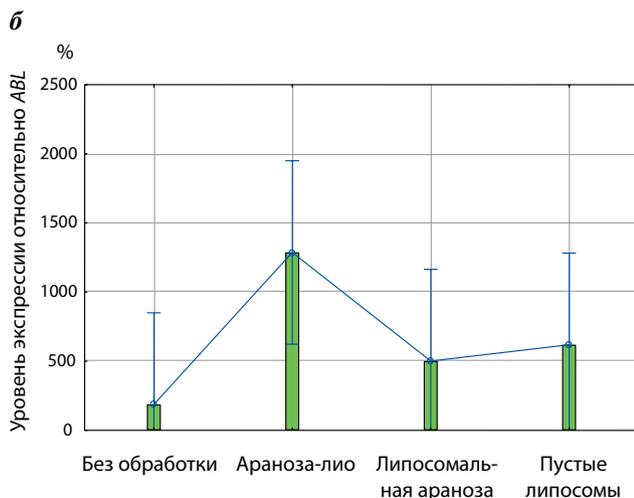
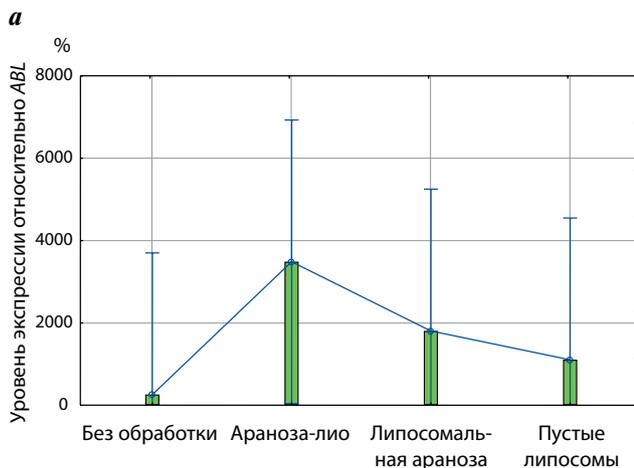


Рис. 4. Изменения уровня экспрессии мРНК MDM2 после инкубации с исследуемыми препаратами в зависимости от наличия мутации BRAF: а – клеточные линии с мутацией BRAF; б – клеточные линии с BRAF дикого типа

клетках. Но в данном случае можно предположить, что p53 позитивно регулирует экспрессию MDM2.

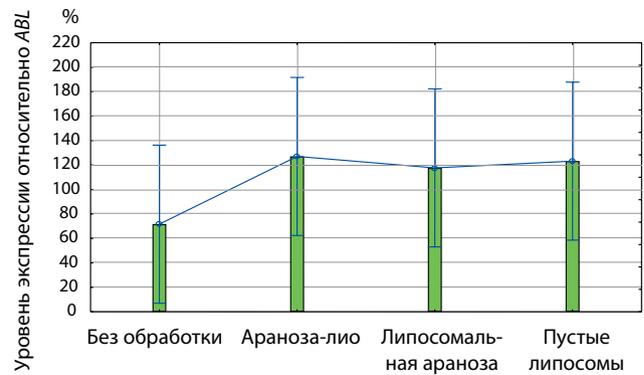


Рис. 5. Изменение уровня экспрессии мРНК MyD88 после воздействия исследуемыми препаратами

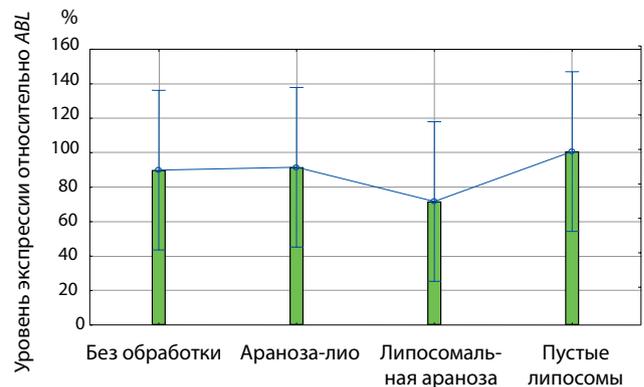


Рис. 6. Изменение уровня экспрессии мРНК NFkB2 после воздействия исследуемыми препаратами

Стоит отметить, что повышение MDM2 может способствовать резистентности к химиотерапии [33, 34].

Изменение уровня экспрессии мРНК MyD88, NFkB2 и NFkB1. На рис. 5 показано, что после воздействия лекарственных форм аранозы происходит небольшое повышение уровня экспрессии мРНК MyD88, которое говорит о том, что TLR задействованы слабо. Возможно, на них влияют компоненты умерших клеток.

Уровень экспрессии мРНК NFkB2 не сильно изменялся: снижался на 20 % после инкубации с липосомальной аранозой и повышался при воздействии пустых липосом (рис. 6).

Интересные данные получены при изучении изменения экспрессии мРНК NFkB1. Из рис. 7 видно, что липосомальная араноза вызвала многократное повышение уровня экспрессии NFkB1. В ряде исследований показано, что опухолевые клетки отличаются от нормальных пониженной экспрессией NFkB1, что помогает им в выживании [4]. В исследовании [6] было показано, что NFkB1 является эффекторным белком цитотоксического ответа на повреждения ДНК через метилирование. Известно, что действие аранозы как производного нитрозомочевины

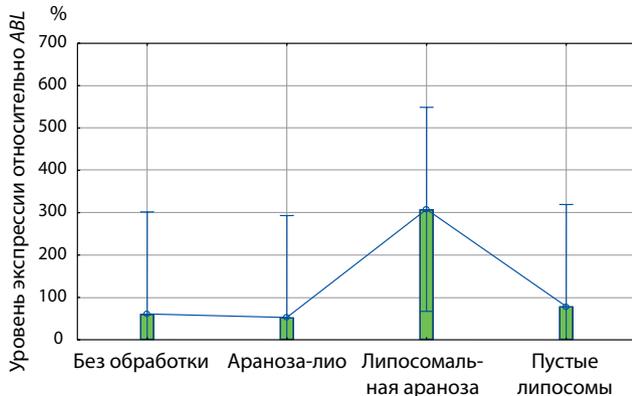


Рис. 7. Изменение уровня экспрессии мРНК NFκB1 после воздействия исследуемыми препаратами

реализуется через метилирование ДНК. В ответ на метилирование ДНК NFκB1 вызывает ингибирование экспрессии антиапоптотических генов, находящихся под контролем NFκB. Интересно, что мы наблюдаем эффект повышения экспрессии NFκB1 от липосомальной формы аранозы, а не от свободной

аранозы-лио. Возможно, этот аспект следует оценить в динамике. Можно предположить, что липосомальная форма позволяет доставить большее количество аранозы непосредственно в ядро клетки, где реализуется наблюдаемый нами эффект, тогда как араноза в свободной форме частично взаимодействует с белками цитоплазмы и в меньшем количестве доходит до ядра.

Заключение

Таким образом, из полученных результатов можно видеть, что 2 лекарственных формы аранозы — липосомальная и араноза-лио — оказывают различное воздействие на внутриклеточные сигнальные пути в клетках метастатической меланомы. Араноза-лио запускает механизмы устойчивости к химиотерапии через повышение экспрессии мРНК MDM2. Липосомальная араноза, наоборот, запускает механизмы, способствующие чувствительности клеток к терапии, через повышение экспрессии мРНК NFκB1 — фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):41–53.
- Шоуа И.Б., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Действие липосомального доксорубина на клетки линии, экспрессирующие активный Pgp170. *Российский биотерапевтический журнал* 2004;3(1):20–3.
- Cartwright T., Perkins N.D., L Wilson C. NFκB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J* 2016;283(10):1812–22. DOI: 10.1111/febs.13627. PMID: 26663363.
- Voce D.J., Schmitt A.M., Uppal A. et al. Nfkb1 is a haploinsufficient DNA damage-specific tumor suppressor. *Oncogene* 2015;34(21):2807–13. DOI: 10.1038/onc.2014.211. PMID: 25043302.
- Ishikawa H., Claudio E., Dambach D. et al. Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p) 105 precursor (NF-κappaB1) but expressing p50. *J Exp Med* 1998;187(7):985–96. PMID: 9529315.
- Schmitt A.M., Crawley C.D., Kang S. et al. p50 (NF-κB1) is an effector protein in the cytotoxic response to DNA methylation damage. *Mol Cell* 2011;44(5):785–96. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.09.026. PMID: 22152481.
- Lu Y.C., Yeh W.C., Ohashi P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008;42(2):145–51. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.01.006. PMID: 18304834.
- Goto Y., Arigami T., Kitago M. et al. Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors. *Mol Cancer Ther* 2008;7(11):3642–53. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0582. PMID: 19001446.
- Копнин Б.П., Копнин П.Б., Хромова Н.В. и др. Многоликий p53: разнообразие форм, функций, опухольсупрессирующих и онкогенных активностей. *Клиническая онкогематология* 2008;1(1):2–9.
- Green D.R., Chipuk J.E. p53 and metabolism: Inside the TIGAR. *Cell* 2006;126(1):30–2. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.032. PMID: 16839873.
- Blagosklonny M.V. Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene* 1997;15(16):1889–93. DOI: 10.1038/sj.onc.1201374. PMID: 9365234.
- Lavin M.F., Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 2006;13(6):941–50. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401925. PMID: 16601750.
- Roemer K. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem* 1999;380(7–8):879–87. DOI: 10.1515/BC.1999.108. PMID: 10494837.
- Houben R., Hesbacher S., Schmid C.P. et al. High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. *PLoS One* 2011;6(7):e22096. DOI: 10.1371/journal.pone.0022096. PMID: 21760960.
- Michael D., Oren M. The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12(7):53–9. PMID: 11790555.
- Soussi T., Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001;1(3):233–40. DOI: 10.1038/35106009. PMID: 11902578.
- Gwosdz C., Scheckenbach K., Lieven O. et al. Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas. *Int J Cancer*

- 2006;118(3):577–82.
DOI: 10.1002/ijc.21366.
PMID: 16094622.
18. Sparrow L.E., Soong R., Dawkins H.J. et al. p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res* 1995;5(2):93–100. PMID: 7620345.
 19. Soto J.L., Cabrera C.M., Serrano S., López-Nevot M.A. Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: *TP53*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, and *CDKN2B*. *BMC Cancer* 2005;5:36.
DOI: 10.1186/1471-2407-5-36.
PMID: 15819981.
 20. Li W., Sanki A., Karim R.Z. et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology* 2006;38(4):287–301.
DOI: 10.1080/00313020600817951.
PMID: 16916716.
 21. Avery-Kiejda K.A., Bowden N.A., Croft A.J. et al. P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. *BMC Cancer* 2011;11:203.
DOI: 10.1186/1471-2407-11-203.
PMID: 21615965.
 22. Козеев Г.С. Разработка липосомальной лекарственной формы противоопухолевого препарата аранозы. Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М., 2013.
 23. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Полозкова С.А., Оборотова Н.А. Разработка наноструктурированной липосомальной формы аранозы. Российский биотерапевтический журнал 2012;11(2):24.
 24. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы. Российский биотерапевтический журнал 2012;11(2):24.
 25. Афанасьева Д.А., Мисюрин В.А., Пономарев А.В. и др. Изменение уровня экспрессии гена *CD95/FAS* в клетках линий меланомы под воздействием липосомальной аранозы. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(3):34–9.
DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-34-39.
 26. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Хоченкова Ю.А. и др. Липосомальная араноза не индуцирует аутофагию. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):15–8.
 27. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник РАМН* 2005;7:37–40.
 28. Рябая О.О., Цыганова И.В., Сидорова Т.И. и др. Влияние активирующих мутаций V600 гена *B-RAF* на способность клеток меланомы к аутофагии. *Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи* 2013;3:68–72.
 29. Emelyanova M., Ghukasyan L., Abramov I. et al. Detection of BRAF, NRAS, KIT, GNAQ, GNA11 and MAP2K1/2 mutations in Russian melanoma patients using LNA PCR clamp and biochip analysis. *Oncotarget* 2017;8:52304–20.
DOI: 10.18632/oncotarget.17014.
PMID: 28455977.
 30. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. *Сибирский онкологический журнал* 2010;37(1):29–39.
 31. Chomczynski P., Sacchi N. The singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty something years on. *Nat Protoc* 2006;1(2):581–5. PMID: 17406285.
 32. Moore F.R., Rempfer C.B., Press R.D. Quantitative BCR-ABL1 RQ-PCR fusion transcript monitoring in chronic myelogenous leukemia. *Press Methods Mol Biol* 2013;999:1–23.
DOI: 10.1007/978-1-62703-357-2_1.
PMID: 23666687.
 33. Hientz K., Mohr A., Bhakta-Guha D. et al. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* 2017;8(5):8921–46.
DOI: 10.18632/oncotarget.13475.
PMID: 27888811.
 34. Buolamwini J.K., Addo J., Kamath S. et al. Small molecule antagonists of the MDM2 oncoprotein as anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5(1):57–68.
DOI: 10.2174/1568009053332672.
PMID: 15720190.