

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

ЗАВИСИМОСТЬ ПРОФИЛЯ микроРНК В МЕЛАНОМЕ КОЖИ ОТ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОПУХОЛИ

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, 660022, г. Красноярск, Россия

Меланома – агрессивное злокачественное новообразование, которое характеризуется быстрым ростом и высокой смертностью больных. На сегодняшний день всесторонние исследования меланомы позволяют помимо стандартной гистологической классификации подразделять ее на формы и подтипы по молекулярно-генетическим и биохимическим характеристикам с целью разработки индивидуальных путей эффективного лечения. Один из таких возможных показателей – экспрессионный профиль микроРНК в клетках опухоли, для которого показано изменение при возникновении и прогрессии опухоли. Цель данного исследования – выявить корреляцию между уровнями микроРНК в клетках меланомы и клинико-морфологическими характеристиками опухоли. В работе проведено сравнение экспрессионных профилей микроРНК в биоптатах меланомы по полу, возрасту больных, толщине опухоли по Бреслоу и клиническим формам. Показано, что пол и возраст больных не оказывают влияния на экспрессию микроРНК в меланоме. Также не выявлено корреляции между уровнями микроРНК и толщиной опухоли по Бреслоу. При этом отмечено значимое различие профилей между клиническими формами меланомы. Выраженное изменение профиля микроРНК регистрировали при поверхностно распространяющейся меланоме в сравнении с другими формами. МикроРНК, измененные при поверхностно распространяющейся меланоме, участвуют в регуляции фундаментальных процессов канцерогенеза, сигнальных путей ErbB, MAPK, TGFβ. Дальнейшее изучение молекулярных особенностей поверхностно-распространяющейся меланомы в совокупности с другими характеристиками могло бы стать новым шагом на пути к персонифицированной медицине.

Ключевые слова: меланома; микроРНК; клиническая форма.

Для цитирования: Комина А.В., Палкина Н.В., Аксененко М.Б., Рукша Т.Г. Зависимость профиля микроРНК в меланоме кожи от клинико-морфологических характеристик опухоли. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2016; 19(5): 266-272. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9588-2016-19-5-266-272>

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

DEPENDENCE OF THE microRNA PROFILE IN CUTANEOUS MELANOMA ON CLINICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE TUMOR

Krasnoyarsk State Medical University n.a. prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

Melanoma is an aggressive skin cancer that is characterized by rapid growth and high invasion. Today extensive studies of melanomagenesis allow to subdivide this tumor into subtypes in accordance to molecular, genetic and biochemical characteristics in addition to standard histological classification for developing personalized approaches of treatment. One of such molecular peculiarities is the expression profile of microRNAs in tumor cells alterations of which were shown during tumor progression. The aim of this study was to identify the correlation between the levels of microRNA in melanoma cells, and the clinical and morphological characteristics of the disease. The comparative study of microRNAs expression profiles in melanoma is made by gender, age of patients, tumor Breslow's thickness and histological subtypes. It was shown that the gender and age of patients have no effect on the expression of microRNA in melanoma. No correlation between the microRNA levels and tumor Breslow's thickness was revealed. But it was observed a significant alteration between the microRNA profiles in the different histological melanoma subtypes. The significant change in the profile of microRNAs for superficial-spreading melanomas compared to other subtypes was shown that was associated with the processes of tumors development, as well as ErbB-, MAPK-, TGF-β-signaling pathways. Further study of the molecular features of the superficial-spreading melanoma in combination with other characteristics might be a new step towards personalized medicine.

Keywords: melanoma; microRNA; histological subtype.

For citation: Komina A.V., Palkina N.V., Aksenenko M.B., Ruksha T.G. Dependence of the microRNA profile in cutaneous melanoma on clinical and morphological characteristics of the tumor. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii Zhurnal Kozhnykh i Venericheskikh Bolezney)*. 2016; 19(5): 266-272. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9588-2016-19-5-266-272>

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

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Received 26 July 2016

Accepted 20 September 2016

Для корреспонденции:

Рукша Татьяна Геннадьевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой патологической физиологии им. проф. В.В. Иванова ГБОУ ВПО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России. 660022, г. Красноярск, Россия. E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru.

For correspondence:

Ruksha Tatyana G., Dr. Sci. Med., Head of Department of pathophysiology, KrasSMU n.a. prof. V.F. Voino-Yasenetsky. E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru.

Information about authors: Komina A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2269-0298>; Palkina N.V., <http://orcid.org/0000-0002-6801-3452>; Aksenenko M.B., <http://orcid.org/0000-0001-7660-700X>; Ruksha T.G., <http://orcid.org/0000-0001-8142-4283>.

Меланома – агрессивное злокачественное новообразование, которое характеризуется быстрым ростом и высокой смертностью больных (до 80% от всех случаев смерти при злокачественных новообразованиях кожи) [1]. Выделяют четыре основных клинических варианта опухоли: поверхностно распространяющаяся, узловая, акрально-лентигинозная и лентиго-меланома [2]. Несмотря на то что изначально такой способ классификации меланомы кожи был основан на морфологических признаках, не затрагивая ни молекулярные особенности, ни прогноз для пациента, на сегодняшний день существуют данные, что течение данного заболевания зависит от клинической формы [3]. В связи с этим вероятно, что клинические формы меланомы могут иметь не только морфологические, но и молекулярно-генетические и биохимические различия [4]. Выявление этих различий может быть важным шагом на пути к персонифицированной терапии заболевания.

Кроме характеристик самой опухоли, существует ряд достоверных факторов влияния особенностей самого пациента на течение заболевания, таких как его пол или возраст. Известно [5, 6], что больные женского пола имеют более высокие показатели выживаемости при меланоме и более длительное время до возникновения первых метастазов, чем больные мужского пола. Кроме того, у пациентов старшего возраста отмечается ускоренный переход к стадии метастазирования и увеличение устойчивости меланомы к терапии в сравнении с молодыми пациентами [7].

МикроРНК – малые белоккодирующие молекулы РНК, состоящие из 18–24 нуклеотидов и выполняющие в клетке регуляторные функции [8]. На сегодняшний день известны сотни различных микроРНК, которые регулируют экспрессию до 60% генов человека. Многочисленные исследования доказывают участие этих молекул в регуляции большинства клеточных процессов и их роль в развитии заболеваний, в том числе злокачественных новообразований [9]. При этом показано, что соотношение уровней различных микроРНК (профиль микроРНК) в клетках изменяется в процессе малигнизации, становясь специфичным для отдельного заболевания [10]. В частности, было показано изменение уровней экспрессии микроРНК в малигнизированных меланоцитах в сравнении с доброкачественными меланоцитарными невусами [11]. Более того, уровень некоторых микроРНК варьирует при прогрессии опухоли, переходе от стадии к стадии, что указывает на наличие не совсем понятных на сегодняшний день изменений и роли данного типа молекул в развитии опухоли [12].

Учитывая возможность участия микроРНК в большинстве биологических процессов клетки, можно предположить, что и различия в протекании меланомы, обусловленные возрастом, полом пациента или клинико-морфологическими характеристиками самой опухоли, могут иметь отражение в профиле микроРНК, их выявление могло бы стать основой для индивидуализированной терапии заболевания.

Цель данного исследования – определение изменения профилей микроРНК в меланоме кожи в зависимости от пола, возраста, толщины опухоли по Бреслоу и клинической формы новообразования.

Материал и методы

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 59/2014 от 02.12.2014).

Биопсийный материал меланомы ($n = 15$) был предоставлен Красноярским краевым патологоанатомическим бюро. Ткани после оперативного иссечения фиксировали 10% раствором нейтрального формальдегида и заключали в парафин по стан-

Таблица 1
Клинические данные о больных меланомой кожи, включенных в исследование

Пол больного	Возраст, годы	Толщина опухоли по Бреслоу, мм	Локализация опухоли	Клиническая форма
Мужской	46	5,8	Ногтевая фаланга 1-го пальца кисти	Акрально-лентигинозная
Женский	50	4	Ногтевая фаланга 5-го пальца стопы	Акрально-лентигинозная
Мужской	63	3	Стопа (пяточная область)	Акрально-лентигинозная
Мужской	56	6,85	Фаланга кисти	Акрально-лентигинозная
Женский	36	3,62	Спина	Лентиго
Женский	35	4,46	Бедро	Лентиго
Мужской	50	5,8	Предплечье	Лентиго
Женский	81	5	Правое плечо	Метастаз
Женский	41	3,2	Ушная раковина	Поверхностно распространяющаяся
Женский	75	4	Нижняя треть плеча	Поверхностно распространяющаяся
Женский	51	4,27	Передняя брюшная стенка	Поверхностно распространяющаяся
Мужской	66	7,07	Спина	Узловая
Мужской	73	2	Правое плечо	Узловая
Мужской	62	3	Спина	Узловая
Женский	52	2	Левая надлопаточная область	Узловая

дартной методике. После фиксации образцы сохраняли при комнатной температуре. Подтверждение гистологического диагноза меланомы кожи осуществлялось врачом-патологоанатомом. Информация о пациентах, включенных в исследование, представлена в **табл. 1**.

Для выделения РНК образцы подвергали предварительной диссекции на срезы толщиной 15 мкм с помощью микротомы. Диссектированную ткань депарафинизировали ксилолом с дальнейшей отмывкой 96% этанолом, затем ткань высушивали на воздухе и заливали 200 мкл буферного раствора, предназначенного для оптимальной работы протеиназы К (компонент Digestion buffer набора RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation kit, “Ambion”, США). Обработку протеиназой К производили в следующем температурном режиме, рекомендованном для выделения РНК: при температуре 50 °C 15 мин, затем при 80 °C 15 мин.

Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора для выделения нуклеиновых кислот RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation kit (“Ambion”, США) строго в соответствии с протоколом производителя. Для элюции РНК использовали воду без нуклеаз.

Концентрацию микроРНК определяли на приборе Qubit 2.0 (Сингапур) с использованием специфичных к микроРНК реагентов Qubit® microRNA Assay kit (ref. Q32880, “Eugene”, США). Для дальнейшего анализа методом микрочипирования применяли образцы с концентрацией микроРНК не менее 16,5 нг/мкл.

Для микрочипирования использовали систему GeneAtlas Microarray System (“Affymetrix”, США). Для каждого микрочипа было взято не менее 130 нг микроРНК образца в объеме 8 мкл. Перед гибридизацией микроРНК предварительно подвергали

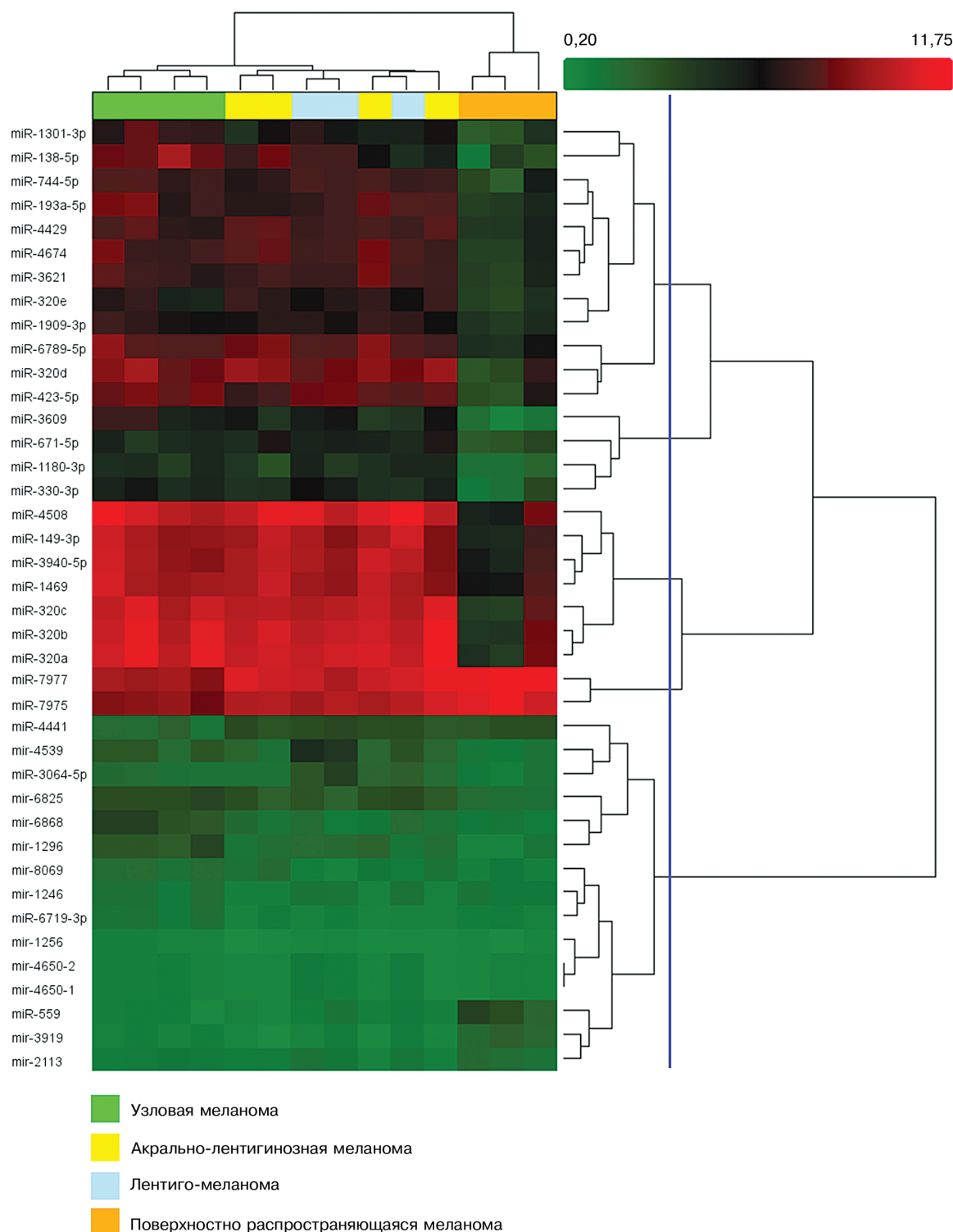


Рис. 1. Иерархическая кластерограмма микроРНК, имеющих значимые различия в уровнях при разных формах меланомы. Синей линией отмечен уровень, на котором было проведено деление на кластеры при анализе данных.

полиаденилированию и биотинилированию с использованием комплекта реагентов Flash TagHSR Biotin Labeling Kit (ref. 901913; “Affymetrix”, США).

МикроРНК, меченные биотином, подвергали гибридизации на микрочип в стрипе Affymetrix miRNA 4.1 ArrayStrip (“Affymetrix”, США) при температуре 48 °C в течение 20 ч. Данный микрочип содержит ячейки для гибридизации и оценки уровня 6599 малых некодирующих РНК человека в соответствии с базой микроРНК версии v.20. По окончании гибридизации проводили

отмывку и окраску микрочипа в автоматическом режиме в модуле Fluidic Station системы GeneAtlas с использованием растворов из комплекта Gene Chip Gene Atlas Hybridization and Stain Module (ref. 902135, “Affymetrix”, США). Детекцию интенсивности свечения биотина в ячейках микрочипа производили в детекционном модуле системы Gene Atlas (Imaging Station). Оценку качества эксперимента проводили с помощью внешних контролей, вводимых в образцы на каждом этапе пробоподготовки и гибридизации: внешние контроли полиаденилирования и биотинилиро-

вания (spike control oligos) (Flash TagHSR Biotin Labeling Kit (ref. 901913, "Affymetrix", США), антисмысловые меченные биотином короткие РНК – контроли гибридизации bioB, bioC, bioD и cre (20X Hybridization controls) и контроль, меченный биотином (Control Oligo B2), из комплекта реагентов Gene Chip Hybridization Control Kit (ref. 900454, "Affymetrix", США).

Контроль качества (QC) проводили с помощью программного обеспечения Gene Atlas посредством оценки интенсивности свечения ячеек микрочипа, содержащих контрольные молекулы. Анализ данных свечения с преобразованием в уровни экспрессии осуществляли с помощью программы Expression Console ("Affymetrix", США).

Для статистической обработки данных микрочипирования использовали программное обеспечение Transcriptome Analysis Console 3.0 ("Affymetrix", США), использующее непараметрический метод анализа ANOVA. Корректировку значимости различий экспрессионных профилей проводили с помощью критерия false discovery rate (FDR), предложенного Y. Benjamini, Y. Hochberg [13] для множественных сравнений. Различия в данных рассматривали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Анализ сигнальных путей проводили с помощью электронного ресурса Dianami Rpath 2.0 [14]. Единство сигнальных путей оценивали путем построения диаграммы Эйлера-Венна с помощью электронного ресурса Bioinformatics & Evolutionary Genomics (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>).

Результаты

Для оценки взаимосвязи между характером профиля микроРНК в меланоме и возрастом пациента провели сравнение образцов в двух группах: 1-я группа – 9 больных в возрасте до 60 лет включительно (от 35 до 56 лет); 2-я группа – 6 больных в возрасте старше 61 года (от 62 лет до 81 года). При анализе с помощью ANOVA-теста выявлено различие в уровнях 60 микроРНК. Однако корректировка данных по критерию FDR, позволяющему учитывать вероятность ложноположительных результатов, показала отсутствие значимых различий в профилях микроРНК в этих группах (значение p , откорректированное по FDR, составило от 0,54 до 0,65). Сравнение профилей микроРНК в меланоме у 8 мужчин и у 7 женщин также не показало значимых различий (значение p , откорректированное по FDR, составило от 0,52 до 0,65).

Таким образом, возраст и пол пациента не являются факторами, обеспечивающими особенности экспрессии профиля микроРНК.

Значимых различий также не выявлено при оценке взаимосвязи уровней микроРНК в клетках с толщиной опухоли по Бреслоу. Сравнение групп меланомы с толщиной менее 4 мм и более 4 мм показало сходство в них профилей (значение p , откорректированное по FDR, составило 0,96).

Далее была оценена взаимосвязь профиля микроРНК и клинической формы меланомы. Для этого, согласно представленным в табл. 1 данным, образцы разделили на

Таблица 2
МикроРНК, имеющие значимые различия уровня при различных клинических формах меланомы

№ кластера	МикроРНК	Средний относительный уровень экспрессии (log2), отн.ед.				p (ANOVA)	p (FDR)
		поверхностно-распространяющаяся	узловая	акрально-лентигинозная	лентигинозная		
1	hsa-miR-4429	4,17	7,09	7,82	7,13	0,00004	0,012
1	hsa-miR-4674	3,71	7,1	7,83	7,32	0,00013	0,021
1	hsa-miR-6789-5p	4,66	7,63	8,28	7,63	0,00018	0,024
1	hsa-miR-3621	3,97	7,08	7,16	7,04	0,00023	0,024
1	hsa-miR-320e	3,75	5,94	6,94	6,1	0,00028	0,026
1	hsa-miR-1909-3p	4,42	6,5	6,42	6,54	0,00046	0,033
1	hsa-miR-138-5p	2,87	8,04	6,5	7,35	0,00076	0,042
1	hsa-miR-423-5p	3,03	8,17	7,55	8,16	0,00080	0,043
1	hsa-miR-744-5p	3,59	7,4	6,93	7,23	0,00084	0,045
1	hsa-miR-1301-3p	2,72	6,75	5,73	5,82	0,00094	0,048
1	hsa-miR-193a-5p	4,03	7,67	7,1	7,26	0,00095	0,049
1	hsa-miR-320d	3,07	8,4	8,91	8,19	0,00097	0,049
2	hsa-miR-3609	1,28	6,21	4,98	5,68	0,00018	0,024
2	hsa-miR-1180-3p	1,62	4,88	4,4	5,13	0,00064	0,039
2	hsa-miR-330-3p	1,6	5,23	4,52	5,47	0,00071	0,041
2	hsa-miR-671-5p	2,89	4,95	5,74	5,24	0,0008	0,043
3	hsa-miR-1469	5,81	9,26	9,74	9,13	0,00053	0,036
3	hsa-miR-320c	3,82	10,11	9,95	9,55	0,00054	0,036
3	hsa-miR-320a	4,36	10,62	10,43	10,04	0,00056	0,037
3	hsa-miR-320b	4,29	10,47	10,45	9,83	0,00057	0,037
3	hsa-miR-149-3p	5,04	9,17	9,31	9,5	0,00059	0,038
3	hsa-miR-4508	5,42	10,18	10,35	10,77	0,00063	0,038
3	hsa-miR-3940-5p	5,86	9,23	9,7	9,44	0,00099	0,049
4	hsa-miR-7977	11,5	9,25	10,5	10,11	0,00013	0,021
4	hsa-miR-7975	10,82	8,65	9,62	9,76	0,00060	0,038
5	hsa-mir-3919	2,01	0,82	0,4	0,99	0,000001	0,003
5	hsa-miR-559	3,05	0,86	0,82	1,12	0,00009	0,019
5	hsa-mir-6868	1,14	3,35	1,45	1,81	0,00013	0,021
5	hsa-mir-1256	0,44	0,73	0,31	0,42	0,00022	0,024
5	hsa-mir-2113	1,71	1,03	0,89	1,33	0,00028	0,026
5	hsa-mir-1296	0,63	2,73	1,72	1,85	0,00031	0,027
5	hsa-mir-8069	0,8	1,84	1,46	0,87	0,00033	0,028
5	hsa-mir-4650-1	0,7	0,81	0,47	0,98	0,00039	0,031
5	hsa-mir-4650-2	0,7	0,81	0,47	0,98	0,00039	0,031
5	hsa-miR-4441	3,13	1,83	3,01	3,21	0,00040	0,031
5	hsa-mir-4539	1,31	2,77	2,08	4,13	0,00050	0,035
5	hsa-mir-6825	1,64	3,23	2,82	2,82	0,00063	0,038
5	hsa-mir-1246	1,18	1,61	0,77	1,41	0,00074	0,041
5	hsa-miR-3064-5p	1,15	1,71	1,64	2,92	0,00093	0,048
5	hsa-miR-6719-3p	0,9	1,43	0,7	0,68	0,00094	0,048

4 группы по клиническим формам: поверхностно распространяющаяся меланнома, узловая меланнома, лентигинозная меланнома и акрально-лентигинозная меланнома. При анализе данных с учетом FDR было показано наличие значимых различий в профилях микроРНК по 40 микроРНК (значение p , откорректированное по FDR, составило для них от 0,0034 до 0,0493). При построении иерархической кластерограммы (рис. 1) выявлено четкое выделение профилей микроРНК образцов поверхностно распространяющейся меланомы и узловой меланомы, в то время как профили микроРНК лентигинозной меланомы и акрально-лентигинозной меланомы характеризовались схожей картиной.

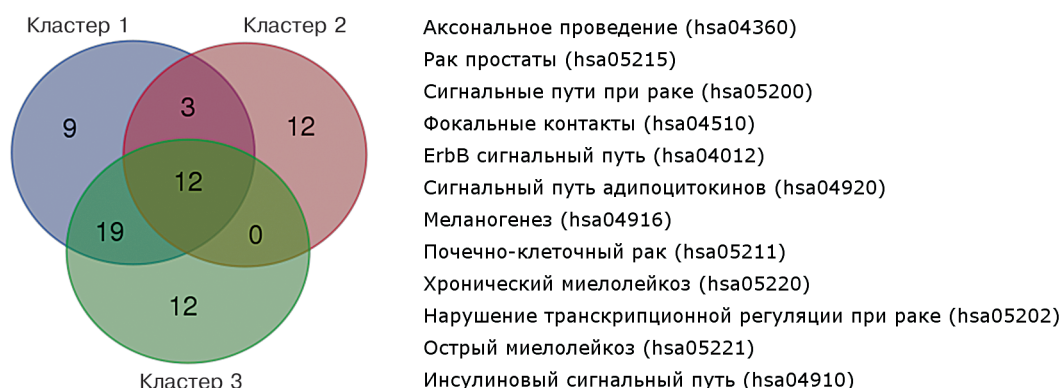


Рис. 2. Диаграмма сигнальных путей Эйлера–Венна, ассоциированных с микроРНК, имеющих уровень экспрессии при поверхностно распространяющейся меланоме, отличный от других форм меланомы, и выделенных в кластеры 1–3. Справа представлен список из 12 сигнальных путей, с которыми ассоциированы микроРНК во всех трех кластерах.

При анализе различающихся микроРНК было выявлено, что большинство из них имеют отличный от других форм уровень экспрессии именно в образцах поверхностно распространяющейся меланомы (табл. 2). При этом различия наблюдаются в уровнях как зрелых микроРНК (29 из 40 видов молекул), так и в предшественниках микроРНК (пре-микроРНК, 11 видов молекул).

Согласно программному разделению и визуальной оценке различий, микроРНК были выделены в 5 отдельных кластеров микроРНК по уровням экспрессии в клетке. В первых трех кластерах оказались микроРНК, имеющие значимо более низкий уровень в образцах поверхностно распространяющейся меланомы в сравнении с другими формами опухолей. Анализ сигнальных путей, регулируемых микроРНК в этих кластерах, выявил общность их участия в процессах, ассоциированных с развитием рака предстательной железы, почечно-клеточного рака, немелкоклеточного рака легких, хронического и острого миелолейкозов, а также фундаментальных процессов, связанных с прогрессией злокачественных новообразований: «нарушение регуляции транскрипции при раке», «сигнальные пути при раке» (рис. 2). Также данные микроРНК были ассоциированы с регуляцией процессов меланогенеза в клетках. Отмечено участие микроРНК, измененных в образцах поверхностно распространяющейся меланомы, в нарушениях регуляции транскрипции при онкологических заболеваниях (кластеры 1 и 2), p53-сигнальном пути и деградации РНК (кластеры 1 и 3), сигнальных путях митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (кластер 3), трансформирующего фактора роста (TGFβ) (кластер 2). Для микроРНК кластера 3 выявлено участие в сигнальных механизмах, связанных собственно с развитием меланомы («сигнальный путь меланомы» hsa05218; $p = 0,000072$).

В кластере 4 микроРНК miR-7977 и miR-7975 имели повышенный уровень в поверхностно распространяющейся меланоме. На настоящий момент эти микроРНК изучены недостаточно, и потому предположить их участие в формировании той или иной клинической формы меланомы затруднительно.

Кластер 5 объединил микроРНК, которые имеют различные уровни экспрессии при разных формах меланомы. Эти данные имели разрозненный характер и не поддавались систематизации. Отмечено, что именно в кластере 5 расположены предшественники микроРНК.

Обсуждение

Понимание молекулярных механизмов развития опухолей различных подтипов является важным для разра-

ботки методов индивидуальной терапии злокачественных новообразований. При этом в отношении многих онкологических заболеваний отмечается переход от более ранних классификаций, основанных на гистологических признаках [15], к попыткам выделения подтипов опухоли по отдельным гистологическим, а также молекулярным и биохимическим характеристикам [16–19].

В настоящей работе проведен анализ связи между клинико-морфологическими формами меланомы и особенностью протекания в ней молекулярно-биологических процессов.

Подразделение меланомы на гистологические формы определяет поверхностно распространяющуюся меланому как образование, состоящее из бессистемно разбросанных в эпидермальном слое кожи клеток – как одиночных, так и в виде скоплений. На начальном этапе развития опухоль характеризуется радиальным ростом и слабо инвазирует. Однако на более поздних стадиях она переходит в фазу вертикального роста, приобретая сходные черты с узловой формой меланомы и повышая вероятность метастазирования. Данная форма опухоли является самой распространенной и встречается примерно в 75% случаев меланомы кожи, возникая у людей разных возрастов (средний возраст 40–50 лет) и локализуясь на разных участках кожи [20]. В отличие от нее узловая меланома, представляющая 10–15% случаев меланомы кожи, не имеет выраженной фазы радиального роста, сразу распространяясь преимущественно вертикально. При этом в ранних исследованиях скорость дермальной инвазии рассматривали как основное отличие этих двух форм меланомы, тогда как по большинству других признаков их расценивали как сходные [21]. Последние исследования показывают более глубокие различия между данными вариантами меланомы, проявляющиеся в том числе на молекулярном уровне [3, 22]. Полученные нами данные согласуются и расширяют эти знания, указывая на возможную обособленность поверхностно распространяющейся меланомы по патогенезу от других форм меланомы, в первую очередь от акрально-лентигинозной формы и лентигио-меланомы.

В данном исследовании выявлено, что при поверхностно распространяющейся меланоме наблюдается изменение регуляции сигнального пути ErbB-рецептора фактора эпидермального роста клеток. По данным литературы [23], уровни экспрессии рецепторов эпидермального роста в меланомах в фазе радиального роста отличаются от таковых меланом, растущих вертикально, что соотносится с данными микроанализа.

Изменения в сигнальных путях MAPK, TGFβ, регулирующих рост опухоли, пролиферацию клеток, также

могут указывать на особенности в характере роста клеток, поскольку известно, что уровень TGF β изменяется при прогрессии меланомы и переходе в стадию метастазирования [24]. Однако в силу двойственной роли TGF β на разных стадиях меланомы [25] характер его влияния на развитие поверхностно распространяющейся меланомы требует дальнейшего разъяснения.

Мы не нашли различий между клиническими формами в уровнях тех микроРНК, которые представляются характерными маркерами меланомы, «классическими» онкогенами или онкосупрессорами (miR-155, miR-205, miR-21, let-7b1 многих других) [17, 26, 27]. Очевидно, что при наличии значимых различий в профилях фундаментальные механизмы развития меланомы сохраняются однотипными, и различия в большей степени касаются лишь особенностей протекания заболевания. Однако в поверхностно распространяющейся меланоме было отмечено снижение уровня miR-149-3p, которой приписывают участие в формировании иммунного ответа при меланоме [28]. Это позволяет предположить особенности формирования иммунных реакций при поверхностно распространяющейся меланоме. Данные о различиях в функционировании компонентов системы иммунобиологического надзора в зависимости от подтипа меланомы отмечались и ранее. В частности, известно, что узловая форма меланомы характеризуется более низким уровнем опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, что также позволяет предположить различия в характере и выраженности иммунного ответа при разных подтипах опухоли [29].

Анализ профиля экспрессии мРНК определил четыре подтипа меланомы в зависимости от экспрессионного паттерна: «высокоиммунный», «обычный», «пигментный, связанный с высокой экспрессией MITF», а также «пролиферативный, ассоциированный с низкой экспрессией MITF» [18]. Обсуждается практическая значимость подобной классификации, а также ее соотнесение с молекулярной классификацией, созданной в ходе выполнения международного проекта «Атлас ракового генома», где выделены три формы меланомы: «иммунный», «кератиновый», «ассоциированный с низкой экспрессией MITF» [30]. Важность распределения больных меланомой в соответствии с молекулярными подтипами обусловлена не только отличиями в течении заболевания, но и сопряжена с индивидуализированным подбором противоопухолевой терапии. В частности, указывается, что больные «высокоиммунным» подтипом опухоли характеризуются более высокими показателями выживаемости и могут являться группой выбора для терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа.

В нашем исследовании не было выявлено связи между молекулярным типом опухоли и возрастом/полом больного, что указывает на возможное отсутствие влияния данных признаков на молекулярные механизмы развития опухоли.

Е. Chan и соавт. [4] показали изменение уровней ряда микроРНК в акральном-лентигинозной меланоме в сравнении с другими клиническими вариантами опухоли.

В нашем исследовании таких различий не выявлено, однако оба исследования указывают на возможную взаимосвязь между клинической формой меланомы и особенностями экспрессионного профиля микроРНК.

Таким образом, разделение меланом по клинико-морфологическим типам может быть ассоциировано с особенностями экспрессионного профиля микроРНК. Дальнейшее исследование молекулярных подтипов опухоли на основе особенностей различных молекулярных изменений является необходимым для более эффективного прогнозирования развития и течения данного заболевания,

а также использования стратегий персонифицированной терапии.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00074).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология опухолей кожи. *Практическая онкология*. 2012; 13(2): 61–8.
- Швецова Ю.И., Палкина Н.В., Аксененко М.Б., Рукша Т.Г. Изменения экспрессии микроРНК при меланоцитарных новообразованиях кожи. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2015; 18(3): 6–9.

Остальные источники литературы см. в References.

REFERENCES

- Imyanitov E.N. Epidemiology and biology of skin tumors. *Practical oncology. Russian Journal (Prakticheskaya onkologiya)*. 2012; 13(2): 61–8. (in Russian).
- Liu V., Mihm M.C. Pathology of malignant melanoma. *Surg. Clin. North Am.* 2003; 83(1): 31–60.
- Greenwald H.S., Friedman E.B., Osman I. Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities: a challenge to the linear progression model. *Melanoma Res.* 2012; 22(1): 1–8.
- Chan E., Patel R., Nallur S., Ratner E., Bacchicocchi A., Hoyt K., et al. MicroRNA signatures differentiate melanoma subtypes. *Cell Cycle*. 2011; 10(11): 1845–52.
- Joosse A., de Vries E., Eckel R., Nijsten T., Eggermont A.M., Hölzel D., et al. Gender differences in melanoma survival: female patients have a decreased risk of metastasis. *J. Invest. Dermatol.* 2011; 131(3): 719–26.
- Mervic L. Time course and pattern of metastasis of cutaneous melanoma differ between men and women. *PLoS ONE*. 2012; 7(3): e32955.
- Kaur A., Webster M.R., Marchbank K., Behera R., Ndoye A., Kugel C.H., et al. sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. *Nature*. 2016; 532(7598): 250–4.
- Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116(2): 281–97.
- Ha T.Y. MicroRNAs in human diseases: from cancer to cardiovascular disease. *Immune Netw.* 2011; 11(3): 135–54.
- Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435(7043): 834–8.
- Shvetsova Yu.I., Palkina N.V., Akseenenko M.B., Ruksha T.G. Changes in microRNA expression in skin melanocytic tumors. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii Zhurnal Kozhnykh i Venericheskikh Boleznei)*. 2015; 18(3): 6–9. (in Russian)
- Xu Y., Brenn T., Brown E.R., Doherty V., Melton D.W. Differential expression of microRNAs during melanoma progression: miR-200c, miR-205 and miR-211 are downregulated in melanoma and act as tumour suppressors. *Br. J. Cancer*. 2012; 106(3): 553–61. doi: 10.1038/bjc.2011.568.
- Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B.* 1995; 57(1): 289–300.
- Vlachos I.S., Kostoulas N., Vergoulis T., Georgakilas G., Reczko M., Maragkakis M., et al. DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res.* 2012. <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=mirpath> (дата обращения 04.07.2016).
- Clark Jr. W.H., From L., Bernardino E.A., Mihm M.C. Histogenesis and biological behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969; 29(3): 705–27.

16. Crowson A.N., Magro C.M., Mihm M.C. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Modern Pathol.* 2006; 19(Suppl. 2): S71–87.
17. Mueller D.W., Rehli M., Bosserhoff A.K. miRNA expression profiling in melanocytes and melanoma cell lines reveals miRNAs associated with formation and progression of malignant melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2009; 129(7): 1740–51.
18. Jönsson G., Busch Ch., Knappskog S., Geisler J., Miletic H., Ringnér M., et al. Gene Expression Profiling–Based Identification of Molecular Subtypes in Stage IV Melanomas with Different Clinical Outcome. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16(13): 3356–67.
19. Scolyer R.A., Longa G.V., Thompson J.F. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol. Oncol.* 2011; 5(2): 124–36.
20. Smoller B.R. Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Modern Pathol.* 2006; 19(Suppl. 2): S34–40.
21. Barnhill R.L., Mihm M.C. The histopathology of cutaneous malignant melanoma. *Seminars Diagn. Pathol.* 1993; 10(1): 47–75.
22. Polisenio L., Haimovic A., Segura M.F., Hanniford D., Christos P.J., Darvishian F., et al. Histology-specific microRNA alterations in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2012; 132(7): 1860–8.
23. Feinmesser M., Veltman V., Morgenstern S., Tobar A., Gutman H., Kaganovsky E., et al. Different patterns of expression of the erbB family of receptor tyrosine kinases in common nevi, dysplastic nevi, and primary malignant melanomas: an immunohistochemical study. *Am. J. Dermatopathol.* 2010; 32(7): 665–75.
24. Van Belle P., Rodeck U., Nuamah I., Halpern A.C., Elder D.E. Melanoma-associated expression of transforming growth factor β isoforms. *Am. J. Pathol.* 1996; 148(6): 1887–94.
25. Pardali K., Moustakas A. Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1775(1): 21–62.
26. Caramuta S., Egyházi S., Rodolfo M., Witten D., Hansson J., Larsson C., et al. MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2010; 130(8): 2062–70.
27. Sand M., Skrygan M., Sand D., Georgas D., Gambichler Th., Hahn S.A., et al. Comparative microarray analysis of microRNA expression profiles in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases, and benign melanocytic nevi. *Cell Tissue Res.* 2013; 351(1): 85–98.
28. Segura M.F., Greenwald H.S., Hanniford D., Osman I., Hernandez E. MicroRNA and cutaneous melanoma: from discovery to prognosis and therapy. *Carcinogenesis.* 2012; 33(10): 1823–32.
29. Lin R.L., Wang T.J., Joyce C.J., Mihm M.C., Murphy G.F., Lian C.G., Lin J.Y. Decreased tumor-infiltrating lymphocytes in nodular melanomas compared with matched superficial spreading melanomas. *Melanoma Res.* 2016; 26(5): 524–7. doi: 10.1097/CMR.0000000000000253.
30. Lauss M., Nsengimana J., Staaf J., Newton-Bishop J., Jönsson G. Consensus of melanoma gene expression subtypes converges on biological entities. *J. Invest. Dermatol.* 2016. pii: S0022-202X(16)31363-X. doi: 10.1016/j.jid.2016.05.119.

Поступила 11.07.16

Принята к печати 20.09.16

КЛИНИКА, ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ДЕРМАТОЗОВ

Ionescu Marius-Anton¹, Feuiolley Marc², Enault Jérémy², Wolkenstein Pierre³, Robert Geraldine⁴, Lefeuvre Luc⁴

ACNE, THE MICROBIOME AND INNATE IMMUNITY

¹Dermatology Outpatient Clinic, University Hospital «Saint-Louis», University Paris VII, Paris;

²Laboratoire de microbiologie, signaux et microenvironnement EA 4312, Université de Rouen;

³Dermatology Department, University Hospital «Henry Mondor», University Paris XII, Créteil; ⁴R&D – Laboratoires Dermatologiques d'Uriage, Neuilly-sur-Seine, France.

In the last years several articles focalized on human microbiome – the microorganisms from skin, mucosae, bowel – and on its role in chronic inflammatory diseases of the skin as acne, rosacea, atopic dermatitis, seborrheic dermatitis. In this article the authors present an update on particular acne skin's microbiome, on innate immunity in acne and new physiopathology mechanisms described in inflammatory process in acne, and at the end we present in vitro, ex vivo and in vivo studies on the microbiome modulation and microbiome of pathogenic ribotypes of P.acnes leading to a significant improvement of acne in a series of 74 acne patients.

Key words: acne; the microbiome; innate immunity.

Ribotypes of *Propionibacterium acnes*, microbiome and inflammation

The skin is a complex habitat for a vast body of microorganisms numbering about 1 million per cm² consisting of bacteria, viruses, fungi, yeasts and even mites such

as *Demodex*. It's the second microbiota in size after the digestive tract and the least well-known. This microbiota forms at birth and therefore depends on our birth conditions. It evolves around the physiology of its host and adapts to different skin types, whether it is in moist areas (such as the armpits or the groin), greasy areas, rich with sebaceous glands (such as the forehead and the side of the nose), and even dry areas, subject to environmental changes (such as the arms and legs).

25% of the microbiota is located deeply in the thickness of the skin. At this level, the concentration of oxygen is only 3%, which has an effect on the development of microaerophilic or anaerobic bacteria, such as *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*).

Corresponding author:

Dr Marius-Anton Ionescu, MD, PhD
Dermatology Outpatient Clinic
University Hospital « Saint-Louis »- Paris VII
1, Avenue Claude Vellefaux
75745 Paris cedex 10
France
dr.toni.ionescu@gmail.com.