

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco107182>

# Опосредованное miR-155-5p повышение содержания p53 в клетках меланомы, индуцируемое дакарбазином

Д.А. Дашкова, А.Р. Есимбекова, К.В. Котова, Т.Г. Рукша

Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** Процесс старения клеток представляет собой реакцию на стресс, возникающую, например, в результате воздействия химиотерапевтическими препаратами, которая вызывает остановку клеточного цикла в фазе  $G_0/G_1$  и индуцирует многочисленные изменения, в том числе продукцию секреторного фенотипа, ассоциированного со старением. Известны индукторы таких изменений, одним из которых является онкосупрессор p53, однако механизмы реализации данных процессов остаются не до конца изученными.

**Цель.** Определить механизмы реализации неапоптотических функций белка p53 при воздействии цитостатическим агентом дакарбазином на клетки меланомы.

**Материалы и методы.** Исследование проводили на клеточных линиях меланомы кожи BR0 и SK-MEL-2. Клетки меланомы инкубировали с цитостатическим препаратом дакарбазином, после чего выполняли иммуноцитохимическое исследование для определения доли  $G_0$ -положительных клеток и уровня экспрессии белка опухолевого супрессора p53. Для выявления механизмов регуляции активности p53 были выполнены биоинформатический анализ и оценка уровня экспрессии экзосомальной микроРНК miR-155-5p, геном-мишенью которой является p53.

**Результаты.** Цитостатический препарат дакарбазин увеличивает долю клеток, находящихся в  $G_0$ -фазе клеточного цикла. Онко-микроРНК miR-155-5p экспрессировалась в экзосомах двух исследуемых клеточных линий меланомы BR0 и SK-MEL-2, что подтверждает её наличие в экзосомах, высвобождаемых опухолевыми клетками. Изменения уровня экспрессии p53 коррелируют с изменениями экспрессии miR-155-5p: не было выявлено изменений уровня miR-155-5p и её гена-мишени p53 в BR0, а повышение доли  $G_0$ -положительных клеток может быть связано с активацией других механизмов ареста клеточного цикла в фазе  $G_0/G_1$ . Напротив, в SK-MEL-2 повышение уровня p53 происходило на фоне снижения экспрессии miR-155-5p, что косвенно подтверждает функционирование p53 в качестве гена-мишени данной микроРНК.

**Заключение.** Выявлено разнородное влияние цитостатического препарата дакарбазина на биологическое поведение клеток меланомы. В клетках SK-MEL-2 дакарбазин ингибирует miR-155-5p, что активирует онкосупрессор p53, чего не наблюдалось в линии BR0.

**Ключевые слова:** меланома; микроРНК; экзосомы; p53; клеточное старение; miR-155-5p.

## Как цитировать:

Дашкова Д.А., Есимбекова А.Р., Котова К.В., Рукша Т.Г. Опосредованное miR-155-5p повышение содержания p53 в клетках меланомы, индуцируемое дакарбазином // Российский онкологический журнал. 2022. Т. 27, № 1. С. 21–28. DOI: <https://doi.org/10.17816/onco107182>

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco107182>

## MiR-155-5p-mediated increase in p53 content induced by dacarbazine in melanoma cells

Daria A. Dashkova, Aleksandra R. Esimbekova, Kseniya V. Kotova, Tatiana G. Ruksha

Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

### ABSTRACT

**BACKGROUND:** Cellular senescence is a stress response, triggered by various stimuli such as chemotherapy treatment and causes G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest followed by the production of a senescence associated secretory phenotype. p53 considered to be a modulator of these events although the precise mechanisms of it remains not clear.

**AIMS:** To determine the non-apoptotic functions of the p53 protein — the formation of the senescence associated secretory phenotype of melanoma cells under the treatment of the cytostatic agent dacarbazine.

**MATERIALS AND METHODS:** The study was conducted on BRO and SK-MEL-2 skin melanoma cell lines. Melanoma cells were treated by cytostatic agent dacarbazine. Then immunocytochemical study was performed to determine the proportion of G<sub>0</sub>-positive cells and the expression of the tumor suppressor protein p53. A bioinformatic analysis was accomplished to identify for p53 regulators with determining of miR-155-5p levels in exosomes released by dacarbazine-treated melanoma cells.

**RESULTS:** The cytostatic drug dacarbazine increases the proportion of cells residing in the G<sub>0</sub> phase of the cell cycle. Onco-microRNA miR-155-5p was expressed in the exosomes of the two studied cell lines BRO and SK-MEL-2 of skin melanoma. Changes in the expression level of p53 correlate with changes in miR-155-5p microRNA expression. The absence of changes in p53 expression in BRO melanoma cells may be due to the absence of changes in miR-155-5p expression levels. In the BRO cell line, no changes in the expression of the oncosuppressor p53 were observed with an increased percentage of G<sub>0</sub>-positive cells, which may be associated with the activation of other mechanisms of cell cycle arrest in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase.

**CONCLUSIONS:** Heterogeneous effect of the cytostatic agent dacarbazine on melanoma cells was revealed. For the SK-MEL-2 cell line, dacarbazine induces the release of senescence associated secretory phenotype by inhibiting exosomal production of miR-155-5p, which activates the p53 oncosuppressor, which was not observed in the BRO line.

**Keywords:** melanoma; microRNAs; exosomes; p53; cellular senescence; miR-155-5p.

### To cite this article:

Dashkova DA, Esimbekova AR, Kotova KV, Ruksha TG. Dacarbazine induces miR-155-5p-mediated p53 level elevation in melanoma cells. *Russian Journal of Oncology*. 2022;27(1):21–28. DOI: <https://doi.org/10.17816/onco107182>

## ОБОСНОВАНИЕ

Онкологические заболевания лидируют в мире по уровню смертности населения. Согласно данным международного агентства по изучению рака (the International Agency for Research on Cancer), на конец 2020 года было зарегистрировано 19,3 млн новых случаев онкологических заболеваний. Меланома кожи является злокачественным новообразованием с агрессивным течением. За последние 40 лет каждый год отмечается тенденция к приросту заболеваемости [1]. Высокие показатели смертности при данном заболевании связаны с развитием раннего метастазирования и высокой терапевтической резистентностью к противоопухолевым препаратам. Для контроля над прогрессированием заболевания актуален поиск прогностических маркеров, совершенствование терапии, направленной на элиминацию опухолевых клеток [2]. Одним из возможных прогностических факторов могут выступать микроРНК — малые некодирующие РНК. Известно, что микроРНК легко транспортируются экстраклеточными везикулами от опухолевых клеток к клеткам микроокружения, другим опухолевым клеткам. МикроРНК miR-155-5p участвует в регуляции трансляции опухолевых белков, регулирует редокс-зависимые факторы опухолевого микроокружения [3]. Белок p53 является опухолевым супрессором, выполняющим многочисленные функции — индукцию апоптоза, репарацию поврежденной ДНК и остановку клеточного цикла, направленные на ингибирование процессов онкогенеза [4]. Индукция состояния старения клеток при воздействии повреждающих факторов осуществляется благодаря секреторному фенотипу, ассоциированному со старением (senescence associated secretory phenotype, SASP), который формируется под влиянием белка p53 и представляет высвобождение провоспалительных цитокинов, регуляторов межклеточного матрикса [5]. Таким образом, стареющие клетки представляют собой клетки, образующиеся в результате «ареста» клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, вызванного повреждением, например, воздействием химиотерапевтическими препаратами [6]. Стареющие клетки характеризуются длительной и, как правило, необратимой остановкой клеточного цикла. Белок Ki-67 является хорошо известным маркером клеточной пролиферации [7]. Накопление Ki-67 происходит только во время фаз G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> и M, тогда как в фазу G<sub>0</sub> клеточного цикла он деградирует, что позволяет использовать Ki-67 в качестве маркера G<sub>0</sub>-положительных клеток [8].

**Цель исследования** — определить механизмы реализации неапоптотических функций белка p53 при воздействии цитостатическим агентом дакарбазином на клетки меланомы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Клеточные линии и условия культивирования*

В исследовании использовали клеточные линии меланомы кожи человека BRO, полученные в НИИ клинической иммунологии (Новосибирск, Россия), и SK-MEL-2 (ATCC® HTB-68™). Клетки меланомы кожи культивировали в среде RPMI-1640 (НПП «ПанЭко», Россия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, Австрия), 1% антибиотик/антимикотик (Thermo Fisher Scientific, Нидерланды) при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе (Sanyo Electric Co., Япония).

### *Определение доли G<sub>0</sub>-положительных клеток*

Для определения содержания клеток в фазе G<sub>0</sub> клеточного цикла было выполнено иммуноцитохимическое исследование с маркером клеточной пролиферации Ki-67. Клетки культивировали в 24-луночных планшетах и обрабатывали дакарбазином в концентрации полумаксимального ингибирования (IC50) в течение 72 ч при 37 °C. IC50 была определена с помощью МТТ-теста, что описано нами ранее [9]. Через 72 ч клетки промывали фосфатно-солевым раствором (PBS) (Helicon, Россия), помещали в свежую среду без цитостатика и инкубировали ещё 48 ч. Затем клетки ещё раз промывали PBS, фиксировали 10% формалином и пермеабилizировали 0,5% раствором Triton X100 (Biotechnik, Германия). После чего клетки инкубировали с первичными кроличьими моноклональными антителами к Ki-67 человека (ab15580; Abcam, США) в концентрации 1:100 с 10% FBS (HyClone, Австрия) при 4 °C в течение ночи. В качестве вторичных антител использовали козы антикроличьи антитела Alexa Fluor 488 IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:200 в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Ядра контрастировали 1 мкг/мл DAPI (AppliChem, Германия) в течение 15 мин. Клетки подсчитывали по меньшей мере в 10 полях зрения с использованием станции визуализации клеток Fluid (Thermo Fisher Scientific, США). Ядра пролиферирующих клеток окрашивались в зелёный и синий цвета, тогда как ядра непролиферирующих живых клеток окрашивались только в синий цвет.

### *Иммуноцитохимическое исследование экспрессии p53*

Определение уровня экспрессии белка p53 проводилось иммуноцитохимическим методом. После инкубации с дакарбазином клетки фиксировали 10% формалином и пермеабилizировали 0,5% раствором Triton X100. В качестве первичных антител были использованы кроличьи Anti-p53 антитела (ab131442; Abcam, США) в концентрации 1:100 с 10% PBS при 4 °C в течение ночи. В качестве вторичных антител использовали козы антикроличьи

антитела Alexa Fluor 488 IgG (H+L) в разведении 1:200 в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Ядра контрастировали 1 мкг/мл DAPI в течение 15 мин. Оценку флуоресценции производили с помощью системы визуализации Fluid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, США) с применением полуколичественного метода оценки.

### Биоинформатический анализ

Для определения регуляторов экспрессии p53 использовали следующие базы данных: MiRDB5.0 (<http://mirdb.org/MIRDB>), TargetScan7.1 (<http://www.targetscan.org>), miRWalk 2.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>).

### Определение экспрессии miR-155-5p

Для определения уровня экспрессии miR-155-5p был использован метод ПЦР в режиме реального времени. Выделение экзосом выполняли с помощью набора Total Exosome Isolation Reagent (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию микроРНК измеряли на флуориметре Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Сингапур) с использованием набора для анализа микроРНК Qubit microRNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Обратную транскрипцию проводили с использованием специфических 5X праймеров из набора TaqMan MicroRNA Assay (кат. №. 4427975; Thermo Fisher Scientific, США) и 5X буфера, обратной транскриптазы из набора MMLV RT kit («Евроген», Россия) и экзосомальной микроРНК. Полученную кДНК

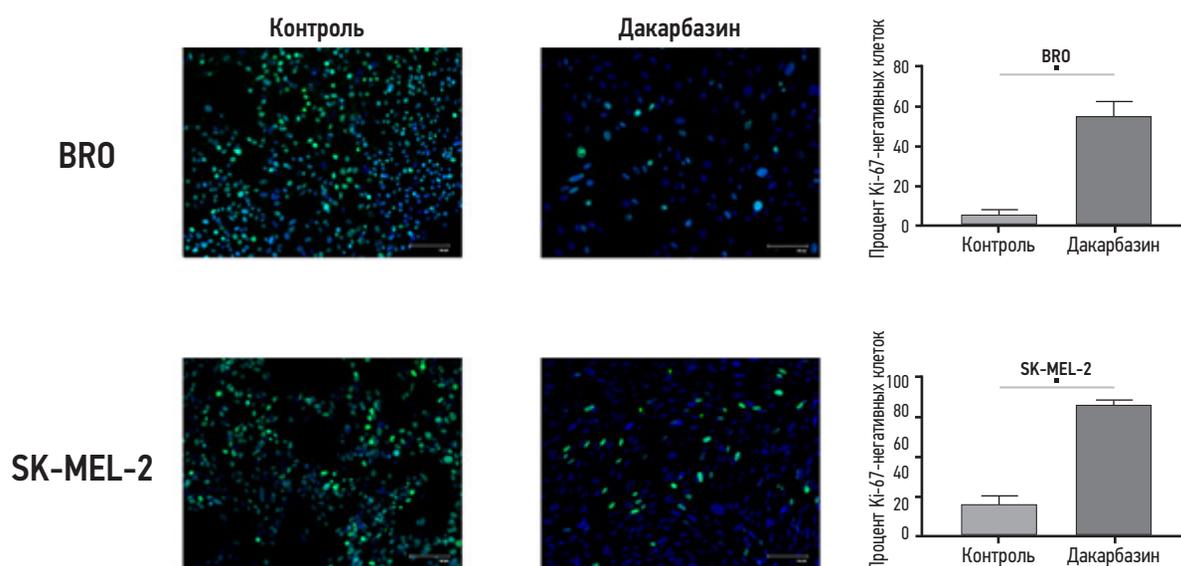
добавляли в ПЦР-коктейль, содержащий реакционную смесь 2.5X RT qPCR с красителем ROX («Синтол», Россия), специфические праймеры 20X и деионизированную воду. В качестве эндогенного контроля использовали U6 snRNA (кат. №. 4427975, Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию RT qPCR проводили методом ПЦР в режиме реального времени с помощью системы StepOne™ (Thermo Fisher Scientific, Сингапур) с использованием следующего протокола циклирования температуры: 50 °C в течение 2 мин, 95 °C в течение 10 мин, затем 40 циклов при 95 °C в течение 15 с и 0 °C в течение 1 мин. Данные проанализированы методом ΔCt.

### Определение концентрации экзосом методом динамического светорассеяния

Вычисление размера наночастиц проводили методом динамического светорассеяния. Интенсивность динамического светорассеяния определяли с помощью анализатора размера частиц и дзета-потенциала Zetasizer Nano ZC (Malvern Panalytical, Великобритания) за четыре повтора длительностью по 60 с каждый.

### Методы статистического анализа данных

Статистическую обработку и анализ данных осуществляли с помощью пакета программного обеспечения Statistica 7 (StatSoft, США). При сравнении парных независимых выборок использовали непараметрический критерий U-тест Манна–Уитни, при  $p \leq 0,05$  результаты считали статистически значимыми.



**Рис. 1.** Иммуноцитохимическое окрашивание антителами Ki-67 и DAPI. \* статистически значимые различия в клетках, подвергнутых воздействию дакарбазина, и в контроле ( $p \leq 0,05$ ).

**Fig. 1.** Immunocytochemical visualization with anti-Ki-67 antibodies and DAPI. \* significant as compared to control ( $p \leq 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

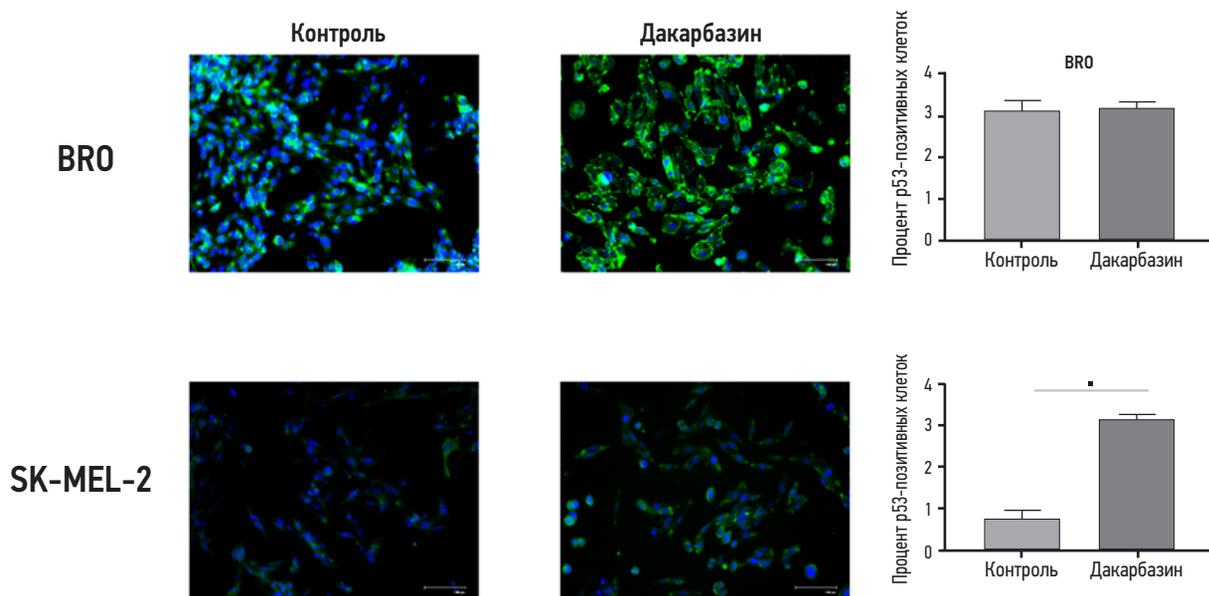
По результатам иммуноцитохимического исследования с маркером клеточной пролиферации Ki-67 и DAPI (рис. 1) было выявлено увеличение доли G<sub>0</sub>-положительных (Ki-67 негативных) клеток под воздействием цитостатического препарата дакарбазин в 8,8 раза в клеточной линии BR0 и в 2,5 раза — в клеточной линии SK-MEL-2.

Опухолевый супрессор p53 экспрессировался в клеточных линиях BR0 и SK-MEL-2 по данным иммуноцитохимического окрашивания с антителами p53 и DAPI (рис. 2), что свидетельствует об отсутствии мутаций в гене TP53, кодирующем белок p53. Под воздействием алкилирующего агента дакарбазина не наблюдалось статистически значимого изменения экспрессии p53 в клетках меланомы BR0.

В клеточной линии SK-MEL-2 уровень белка p53 увеличился на 12,5% ( $p=0,049$ ), что свидетельствует о повышении экспрессии данного белка.

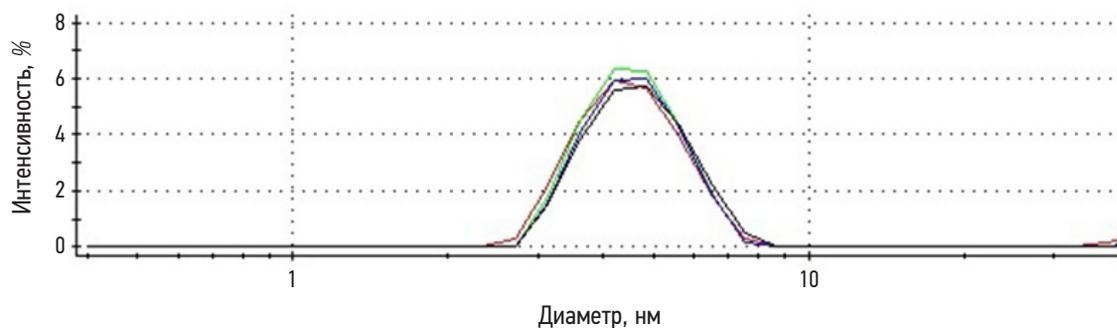
Эффективность выделения экзосом из культуральной среды была подтверждена на основе метода динамического светорассеяния (рис. 3). Среднее значение дзета-потенциала составило  $153,2 \pm 54,6$  нм; индекс полидисперсности — 0,402.

По результатам биоинформатического анализа p53 является геном-мишенью микроРНК miR-155-5p. Под воздействием дакарбазином уровень miR-155-5p в экзосомах клеточной линии BR0 оставался без изменений по отношению к контролю. В экзосомах клеточной линии SK-MEL-2 уровень онко-микроРНК miR-155-5p снижался на 2,5% ( $p=0,049$ ) (рис. 4).



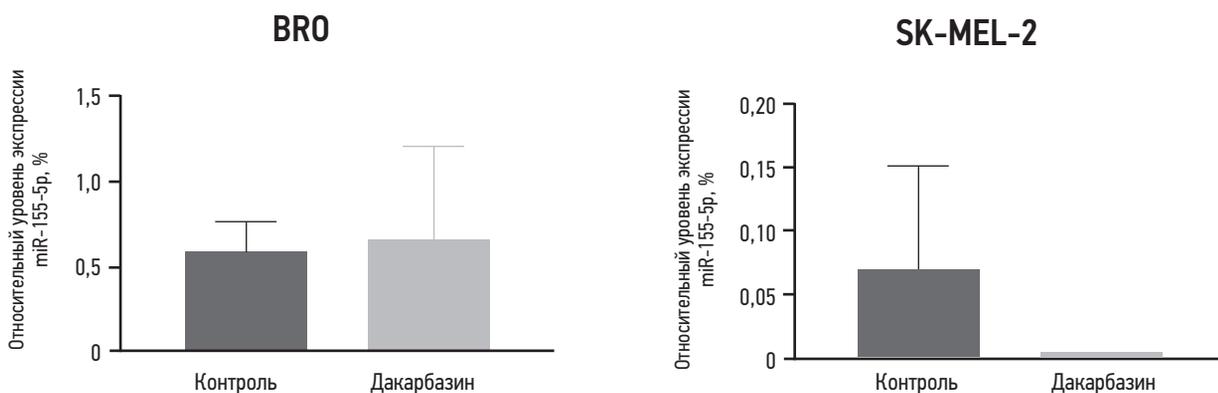
**Рис. 2.** Иммуноцитохимическое окрашивание антителами p53 и DAPI. \* статистически значимые различия между клетками, подвергнутыми воздействию дакарбазина, и контролем ( $p \leq 0,05$ ).

**Fig. 2.** Immunocytochemical visualization with anti-p53 antibodies and DAPI. \* significant as compared to control ( $p \leq 0,05$ ).



**Рис. 3.** Распределение диаметра частиц по интенсивности динамического светорассеяния.

**Fig. 3.** Microvesicles distribution in accordance to intensity of dynamic light scattering.



**Рис. 4.** Уровень экспрессии miR-155-5p по результатам ПЦР в реальном времени. \* статистически значимые различия между клетками, подвергнутыми воздействию дакарбазина, и контролем ( $p \leq 0,05$ ).

**Fig. 4.** miR-155-5p expression estimated by qPCR real-time. \* significant as compared to control ( $p \leq 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Алкилирующий агент с цитостатическим действием дакарбазин увеличивает долю клеток, находящихся в G<sub>0</sub>-фазе клеточного цикла. Онко-микроРНК miR-155-5p экспрессировалась в экзосомах двух исследуемых клеточных линий BRO и SK-MEL-2 меланомы кожи, что подтверждает в целом её наличие в экзосомах опухолевых клеток. Изменения уровня экспрессии p53 были противоположны изменениям экспрессии микроРНК miR-155-5p, что косвенно свидетельствует о функциональной связи этих молекул. Таким образом, отсутствие изменения экспрессии p53 в клетках меланомы линии BRO может быть связано с отсутствием изменения уровня miR-155-5p в этих клетках. В клеточной линии BRO не наблюдалось изменений экспрессии онкосупрессора p53 при увеличенном проценте G<sub>0</sub>-положительных клеток, что может быть связано с активацией других механизмов ареста клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

### Резюме основного результата исследования

Установлено противоопухолевое действие алкилирующего цитостатического агента дакарбазина на клетки меланомы линии SK-MEL-2, что выражается в увеличении экспрессии опухолевого супрессора p53. Под воздействием дакарбазина в клетках меланомы SK-MEL-2 также происходит снижение экспрессии микроРНК miR-155-5p в экзосомах, геном-мишенью которой является p53. Таким образом, в клетках меланомы SK-MEL-2 под действием цитостатического препарата происходит снижение активации онкогенеза с формированием фенотипа стареющих клеток за счёт miR-155-опосредуемого увеличения экспрессии опухолевого супрессора p53.

### Обсуждение основного результата исследования

Цитостатический препарат дакарбазин оказывал различное действие на клеточные линии меланомы

кожи BRO и SK-MEL-2. Данные результаты можно связать с феноменом клеточной гетерогенности опухоли. Активация синтеза экзосомальной микроРНК говорит об усиленной секреторной активности клеток после повышения в них доли G<sub>0</sub>-положительных клеток, характерной для SASP-фенотипа опухоли. Инициация стареющего фенотипа происходит в результате ингибирования онко-микроРНК miR-155-5p. Так, в клетках меланомы SK-MEL-2 под действием дакарбазина происходит снижение активации онкогенеза и формирование фенотипа стареющих клеток за счёт miR-155-опосредуемого увеличения экспрессии опухолевого супрессора p53. Небольшой процент увеличения экспрессии p53 может свидетельствовать о том, что клеточная линия BRO имеет другие, более сложные механизмы защиты от воздействия противоопухолевого препарата и более прогрессивное течение заболевания, которое требует дальнейшего детального изучения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлено разнородное влияние цитостатического агента дакарбазина на фенотип различных клеточных линий меланомы кожи. Для клеточной линии SK-MEL-2 дакарбазин служит активатором секреторного типа, ассоциированного со старением, путём ингибирования экзосомальной выработки miR-155-5p, что активирует онкосупрессор p53. Активация экспрессии белка p53 с формированием SASP-фенотипа может способствовать снижению развития опухолевого роста. При этом на клеточную линию BRO дакарбазин не оказывал данных изменений. В связи с этим имеется необходимость более персонализированно подходить к терапии злокачественных новообразований.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00110 от 23.04.2019).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** Д.А. Дашкова — проведение экспериментальной работы, составление черновика рукописи. А.Р. Есимбекова — проведение экспериментальной работы, статистическая обработка результатов исследования. К.В. Котова — редактирование статьи, Т.Г. Рукша — разработка концепции и анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания, написание и редактирование статьи.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Funding source.** The research was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project № 19-15-00110 dated 23.04.2019).

**Conflict of interests.** The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Authors contribution.** D.A. Dashkova — conducting experimental work, drafting a manuscript. A.R. Esimbekova — conducting experimental work, statistical processing of research results. K.V. Kotova — editing the article, T.G. Ruksha — concept development and analysis of scientific work, critical revision with the introduction of valuable intellectual content, writing and editing the article.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview // *Int J Cancer*. 2021. Vol. 149, N 4. P. 778–789. doi: 10.1002/ijc.33588
2. Michielin M., Akkooi A.C.J., Ascierto P.A., et al. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // *Ann Oncol*. 2019. Vol. 30, N 12. P. 1884–1901. doi: 10.1093/annonc/mdz411
3. Aksenenko M.B., Palkina N.V., Sergeeva O.N., et al. miR-155 overexpression is followed by downregulation of its target gene, NFE2L2, and altered pattern of VEGFA expression in the liver of melanoma B16-bearing mice at the premetastatic stage // *Int J Exp Pathol*. 2019. Vol. 100, N 5–6. P. 311–319. doi: 10.1111/iep.12342
4. Loureiro J.B., Raimundo L., Calheiros J., et al. Targeting p53 for melanoma treatment: counteracting tumour proliferation, dissemination and therapeutic resistance // *Cancers*. 2021. Vol. 13, N 7. P. 1648–1671. doi: 10.3390/cancers13071648

5. Birch J., Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues // *Genes Dev*. 2020. Vol. 34, N 23–24. P. 1565–1576. doi: 10.1101/gad.343129.120
6. Gorgoulis V., Adams P.D., Alimonti A., et al. Cellular senescence: defining a path forward // *Cell*. 2019. Vol. 179, N 4. P. 813–827. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.005
7. Yang C., Zhang J., Ding M., et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy // *Clin Transl Oncol*. 2018. Vol. 20, N 5. P. 570–575. doi: 10.1007/s12094-017-1774-3
8. Graefe C., Eichhorn L., Wurst P., et al. Optimized Ki-67 staining in murine cells: a tool to determine cell proliferation // *Mol Biol Rep*. 2019. Vol. 46, N 4. P. 4631–4643. doi: 10.1007/s11033-019-04851-2
9. Komina A., Palkina N., Aksenenko M., et al. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of MiR-4286 inhibition in melanoma cells // *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11, N 12. P. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0168229

## REFERENCES

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview. *Int J Cancer*. 2021;149(4):778–789. doi: 10.1002/ijc.33588
2. Michielin M, Akkooi ACJ, Ascierto PA, et al. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30(12):1884–1901. doi: 10.1093/annonc/mdz411
3. Aksenenko MB, Palkina NV, Sergeeva ON, et al. miR-155 overexpression is followed by downregulation of its target gene, NFE2L2, and altered pattern of VEGFA expression in the liver of melanoma B16-bearing mice at the premetastatic stage. *Int J Exp Pathol*. 2019;100(5–6):311–319. doi: 10.1111/iep.12342
4. Loureiro JB, Raimundo L, Calheiros J, et al. Targeting p53 for melanoma treatment: counteracting tumour proliferation, dissemination and therapeutic resistance. *Cancers*. 2021;13(7):1648–1671. doi: 10.3390/cancers13071648
5. Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev*. 2020;34(23–24):1565–1576. doi: 10.1101/gad.343129.120
6. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, et al. Cellular senescence: defining a path forward. *Cell*. 2019;179(4):813–827. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.005
7. Yang C, Zhang J, Ding M, et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2018;20(5):570–575. doi: 10.1007/s12094-017-1774-3
8. Graefe C, Eichhorn L, Wurst P, et al. Optimized Ki-67 staining in murine cells: a tool to determine cell proliferation. *Mol Biol Rep*. 2019;46(4):4631–4643. doi: 10.1007/s11033-019-04851-2
9. Komina A, Palkina N, Aksenenko M, et al. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of MiR-4286 inhibition in melanoma cells. *PLoS ONE*. 2016;11(12):1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0168229

## ОБ АВТОРАХ

**\* Рукша Татьяна Геннадьевна**, д.м.н., профессор;  
адрес: Россия, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1;  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8142-4283>;  
eLibrary SPIN: 5412-2148;  
e-mail: [tatyana\\_ruksha@mail.ru](mailto:tatyana_ruksha@mail.ru)

**Дашкова Дарья Александровна**;  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4104-5785>;  
e-mail: [dashkova\\_dasha2001@mail.ru](mailto:dashkova_dasha2001@mail.ru)

**Есимбекова Александра Рашидовна**;  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6363-5941>;  
eLibrary SPIN: 4261-2987;  
e-mail: [aleksandra.esimbekova.96@mail.ru](mailto:aleksandra.esimbekova.96@mail.ru)

**Котова Ксения Витальевна**;  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9868-5017>;  
e-mail: [ksuhry@mail.ru](mailto:ksuhry@mail.ru)

## AUTHORS' INFO

**\* Tatiana G. Ruksha**, MD, Dr. Sci. (Med.);  
address: 1 Partizana Zheleznyaka street, 6600221 Krasnoyarsk,  
Russia;  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8142-4283>;  
eLibrary SPIN: 5412-2148;  
e-mail: [tatyana\\_ruksha@mail.ru](mailto:tatyana_ruksha@mail.ru)

**Daria A. Dashkova**;  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4104-5785>;  
e-mail: [dashkova\\_dasha2001@mail.ru](mailto:dashkova_dasha2001@mail.ru)

**Aleksandra R. Esimbekova**, MD;  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6363-5941>;  
eLibrary SPIN: 4261-2987;  
e-mail: [aleksandra.esimbekova.96@mail.ru](mailto:aleksandra.esimbekova.96@mail.ru)

**Kseniya V. Kotova**, MD;  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9868-5017>;  
e-mail: [ksuhry@mail.ru](mailto:ksuhry@mail.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author