

УДК 616.5-006.81.04:576.08

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ В16 ПО ФАЗАМ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ДАКАРБАЗИНА

© 2022 г. Е. З. Лапкина¹, А. Р. Есимбекова¹, В. Д. Беленюк², А. А. Савченко², Т. Г. Рукша¹, *

¹Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022 Россия

²Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, 660022 Россия

*E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2022 г.

После доработки 21.07.2022 г.

Принята к публикации 31.08.2022 г.

Одним из механизмов развития лекарственной устойчивости опухолевых клеток является обратимый переход в фазу покоя (G_0) клеточного цикла. В эксперименте был использован цитостатический препарат дакарбазин, которым воздействовали на клетки меланомы линии В16 для изучения распределения клеток по фазам клеточного цикла и способности переходить в фазу G_0 с помощью методов иммуноцитохимии и проточной цитометрии с использованием окрашивания клеток для выявления белка Ki-67. Показано, что при воздействии дакарбазином на клетки меланомы В16 увеличивается пул G_0 -положительных клеток, а также происходит снижение доли клеток в фазах G_1 и G_2 клеточного цикла.

Ключевые слова: меланома В16, дакарбазин, клеточный цикл, фаза G_0 , Ki-67, дормантность клеток, клеточное старение

DOI: 10.31857/S0041377122060074

Меланома – злокачественное новообразование кожи, развивающееся из меланоцитов, клеток нейронального происхождения (McConnell, Zon, 2021). Несмотря на внедрение в клиническую практику BRAF-ингибиторов и модуляторов контрольных точек иммунного ответа опухолевых клеток, терапия меланомы остается сложной задачей для онкологов из-за высокой инвазивности и быстрой диссеминации опухоли, что, в свою очередь, обусловлено рядом факторов (Сугулова et al., 2014). В данном контексте репарация ДНК рассматривается как важный процесс приобретения опухолевыми клетками лекарственной устойчивости (Mattia et al., 2018). Повреждение ДНК может индуцироваться целым рядом стрессовых агентов, в том числе противоопухолевыми препаратами, что вызывает остановку клеточного цикла, инициацию процессов репарации ДНК или гибель клетки. В зависимости от нахождения клетки в той или иной фазе клеточного цикла и активности контрольных точек клеточного цикла может меняться чувствительность к химиотерапевтическому агенту (Shah, Schwartz, 2001). Репарация ДНК опухолевых клеток зависит от функционирования контрольных точек в фазах S и G_2 клеточного цикла.

В выборе стратегии противоопухолевой терапии наиболее привлекательной терапевтической мишенью является таргетное воздействие на контрольную точку фазы G_2 , так как контрольная точка S-фазы способствует лишь замедлению клеточного цикла.

Клетка с поврежденной ДНК может пройти контрольную точку S-фазы до остановки в G_2 . Арест G_2 не позволяет включаться механизмам репарации ДНК, в результате чего клетки переходят в состояние апоптоза (Xu, McArthur, 2016). Опухолевая трансформация меланоцитов сопровождается увеличением пролиферации, что связано с изменениями регуляции клеточного цикла, опосредуемыми многочисленными молекулами. При переходе G_1/S ключевыми белками-регуляторами клеточного цикла являются pRb, p16^{INK4a} (p16), циклин D1, p27^{Kip1} (p27), p53 и p21^{Waf1/Cip1} (p21) (Li et al., 2006). В реализации апоптоза опухолевых клеток участвует сигнальный каскад киназ MAPK, регулирующий активность контрольных точек клеточного цикла, особенно при переходе G_2/M (Manke et al., 2005). Известно, что в основе геномной нестабильности и прогрессирования меланомы лежат дефекты реакции на повреждение ДНК, при этом около 50–75% меланом имеют мутации в гене BRAF, кодирующем компонент сигнального каскада MAPK (Cheng et al., 2018). Экспрессия проонкогенного BRAF может негативно влиять на функциональную активность контрольной точки G_2 в клетках с дефектами p16 и p53, тем самым усиливая нестабильность генома в клетках с повреждением ДНК.

Одним из недавно идентифицированных процессов, который вносит вклад в развитие лекарственной устойчивости клеток меланомы, является переход

клеток в дормантное (дремлющее) состояние – обратимый переход в фазу покоя (G_0) клеточного цикла (Ruksha, 2019). Показано, что дормантные клетки, устойчивые к действию противоопухолевых агентов, могут избегать апоптоз-индуцирующих стимулов и ответа со стороны системы иммунобиологического надзора (Risson et al., 2020). Таким образом, изучение механизмов инициации перехода опухолевых клеток в фазу покоя клеточного цикла, характеристика фенотипа пула покоящихся клеток имеет потенциальную клиническую значимость в онкологии. Ранее нами было показано, что свойством инициации дормантности обладает в отношении клеток меланомы вемурафениб (Николаева, 2020). Дакарбазин является стандартным химиотерапевтическим средством при диссеминированных формах меланомы, который оказывает противоопухолевое действие в основном за счет алкилирования ДНК, вызывающее остановку клеточного цикла с последующим развитием апоптоза или некроза клеток. К сожалению, лечение дакарбазином неэффективно у большинства пациентов (85–90%) (Huncharek et al., 2001). Только 2% из всех пациентов с метастатической меланомой, получающих это лечение, демонстрируют значительный ответ и только 11.2% демонстрируют частичный ответ (Lui et al., 2007). Устойчивость к дакарбазину связана с активацией антиапоптотических механизмов, аутофагией и репарацией ДНК в опухолевых клетках (Al-Qatati et al., 2017). Несмотря на свои умеренные эффекты, дакарбазин продолжает оставаться стандартным методом лечения метастатической меланомы, поскольку ни одно другое химиотерапевтическое лечение не показало более выраженного эффекта (Domingues et al., 2018). Помимо этого, дакарбазин используется как референсный метод терапии при разработке новых способов лечения диссеминированной формы опухоли (Charman et al., 2011). Известно, что дакарбазин способен вызывать арест клеточного цикла в фазах S и G_2/M клеток меланомы (Olszewska-Słonina et al., 2005).

В связи со сказанным выше, вероятно, что низкая эффективность дакарбазина может быть обусловлена, в том числе, обратимым переходом клеток меланомы в состояние G_0 в качестве механизма избегания апоптоза и в дальнейшем приводить к прогрессии заболевания.

Таким образом, цель настоящей работы заключалась в изучении влияния дакарбазина на распределение клеток меланомы линии В16 по фазам клеточного цикла и способности клеток переходить в дормантное состояние (фазу покоя G_0).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии и условия их культивирования. Использовали клеточную линию меланомы В16, любезно предоставленную НИИ клинической иммуно-

логии (Новосибирск, Россия). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Москва, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (HyClone, GmbH, Parsching, Австрия) и 1% антибиотика/антимикотика (Gibco Life Technologies, Гранд-Айленд, США). Клетки культивировали в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 (Sanyo MSO-5AC, Осака, Япония).

МТТ-тест. Концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}) и максимального ингибирования ($2 \times IC_{50}$) активности клеточного метаболизма на 50 и 100% соответственно противоопухолевым агентом дакарбазин (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) оценивали для клеточной линии меланомы В16 с помощью реакции восстановления соли тетразолия (МТТ-тест). В стерильные 96-луночные планшеты высевали 2×10^4 кл./мл. Через 24 ч меняли питательную среду на среду, содержащую дакарбазин в диапазоне конечных концентраций 0–1000 мкг/мл, и клетки культивировали при 37°C и 5% CO_2 в течение 72 ч. Клетки без добавления препарата служили контролем. Затем клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), добавляли питательную среду с 5 мг/мл реагента МТТ-бромид (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Нидерланды) в каждую лунку, инкубировали еще 4 ч, затем среду осторожно удаляли и добавляли по 100 мкл ДМСО (Helicon, Москва, Россия) в каждую лунку для растворения образовавшихся кристаллов МТТ-формазана. Оптическую плотность (ОП) измеряли при длине волны 560 нм на спектрофотометре Эфос-9305 (Фотосистемы Швабе, Москва, Россия). Значения IC_{50} определяли по калибровочной зависимости метаболической активности от концентрации препарата.

В дальнейшем клетки подвергали воздействию дакарбазином в течение 72 ч в концентрациях, соответствующих $1 \times IC_{50}$ и $2 \times IC_{50}$. После этого культуральную среду, содержащую дакарбазин, заменяли стандартной (указанной выше). Клетки культивировались дополнительно 48 ч с целью преимущественной элиминации апоптотических клеток (согласно данным из литературы о превалирующем развитии апоптоза в первые 48 ч после воздействия повреждающим агентом (Mhaidat et al., 2007)).

Иммуноцитохимия. Клетки, культивируемые в 24-луночных планшетах в течение 72 ч в присутствии дакарбазина и далее в течение 48 часов в RPMI с FBS, 1% антибиотика/антимикотика, но без дакарбазина, в дальнейшем промывали PBS, фиксировали 10%-ным формалином и пермеабелизировали 0.5% Triton X100 (Biotechnik GmbH, Гайберг, Германия) в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали в культуральной среде в течение ночи при 4°C с первичными кроличьими моноклональными антителами к Ki-67 (ab15580; Abcam, США) в разведении 1 : 100 в присутствии 10% FBS. В качестве вторичных антител использовали

козьи антикроличьи антитела Alexa Fluor 488 IgG (H+L) в разведении 1 : 200 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) при комнатной температуре в темноте в течение 1 ч. Ядра окрашивали DAPI (1 мкг/мл; AppliChem GmbH, Дармштадт, Германия) в течение 15 мин. Клетки считали не менее чем в 10 полях зрения с использованием станции визуализации клеток Fluid (Thermo Fisher Scientific, Карлсбад, США). Ядра пролиферирующих клеток окрашивались в зеленый цвет, тогда как ядра непролиферирующих живых клеток окрашивались в синий цвет. Результаты выражали средними значениями количества клеток (%) на стадии G_0 .

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла с помощью антител к Ki-67 методом проточной цитометрии. Влияние на распределение фаз клеточного цикла клеток меланомы оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки меланомы V16 культивировали во флаконах объемом 25 см² и подвергали воздействию дакарбазином в течение 72 ч при 37°C; определяли (IC_{50} , $2 \times IC_{50}$). Через 72 ч клетки промывали PBS (Хеликон, Москва, Россия), помещали в свежую питательную среду и культивировали еще 48 ч. Затем клетки промывали PBS, фиксировали 10%-ным формалином, пермеабелизировали 0.1%-ным Тритоном X100 и инкубировали с моноклональными антителами к Ki-67 (SolA15), FITC, eBioscience (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Карлсбад, США) в концентрации 1 : 100 и 100 мкг/мл окрашивающего раствора йодистого пропидия (PI) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Карлсбад, США). Долю клеток в каждой фазе определяли с помощью проточного цитометра Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, Inc.) с использованием программного обеспечения Navios Software v. 1.2 и Kaluza v. 2.1.1 (версия 2.2; Beckman Coulter, Квебек, Канада), используя лазер с длиной волны 488 нм и необходимые фильтры. Полоса пропускания для FITC составляла 530/30 нм и для PI – 610/20 нм. В каждой пробе анализировали не менее 50 тыс. клеток. Гейтирование клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, осуществляли в логарифмическом режиме. Клетки, находящиеся в фазе G_0 , являются негативными по Ki-67 и имеют низкие уровни PI, их гейтирование осуществляли в диапазоне значений до 100 отн. ед. по шкале флуоресценции Ki67-FITC (отрицательный результат) и в диапазоне значений флуоресценции PI 0.7–1.3 отн. ед. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла методом проточной цитометрии проводили в Центре коллективного пользования КНЦ СО РАН.

Статистическая обработка. Все эксперименты повторяли трижды. Полученные значения представлены как средние значения из трех повторностей и их стандартные отклонения. Различия считали статистически значимыми при $P < 0.05$. Статистическую обработку проводили с помощью U-критерия Манна–Уитни в программе Statistica 7.0 (StatSoft, Рос-

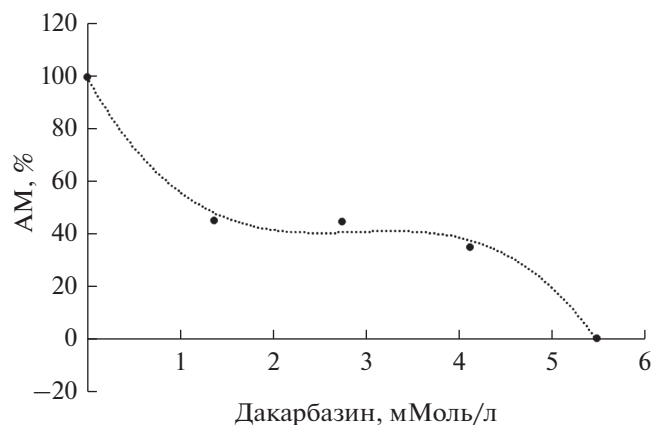


Рис. 1. Изменение активности метаболизма клеток меланомы V16 в зависимости от концентрации дакарбазина после 72-часового воздействия. Результаты МТТ-теста представлены в виде средних значений.

сия). Статистические результаты получены с использованием GraphPad Prism (GraphPad Software, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение значений IC_{50} и $2 \times IC_{50}$ дакарбазина для клеток меланомы проводили на основании МТТ-теста. Результат снижения метаболической активности клеток может являться как следствием их апоптоза, так и перехода в фазу покоя. После воздействия дакарбазина на клетки меланомы V16 наблюдали снижение активности метаболизма при увеличении его концентрации. В ходе анализа МТТ-теста определили ингибирующие клетки V16 концентрации IC_{50} и $2 \times IC_{50}$ дакарбазина, которые составили соответственно 1.86 и 3.73 мМоль/л (рис. 1).

При микроскопическом исследовании культуры клеток после воздействия дакарбазином наблюдали изменения их морфологии: звездчатая форма клеток с соединяющими клетки ламеллоподиями изменялась на веретенообразную удлинненную форму без ламеллоподий с упорядоченным столбчатым расположением (рис. 2). Отмечали большое количество клеток с крупными ядрами, что может косвенно свидетельствовать об увеличении ploидности клеток меланомы V16.

Для разделения клеток в фазах G_0/G_1 и выявления доли G_0 -положительных (покоящихся) клеток в дальнейшем, при изучении распределения клеток по фазам клеточного цикла с помощью проточной цитометрии использовали окрашивание клеток моноклональными антителами к Ki-67, которые позволяют визуализировать клетки, находящиеся во всех фазах клеточного цикла за исключением G_0 .

По результатам иммуноцитохимического окрашивания доля Ki-67-негативных, G_0 -позитивных,

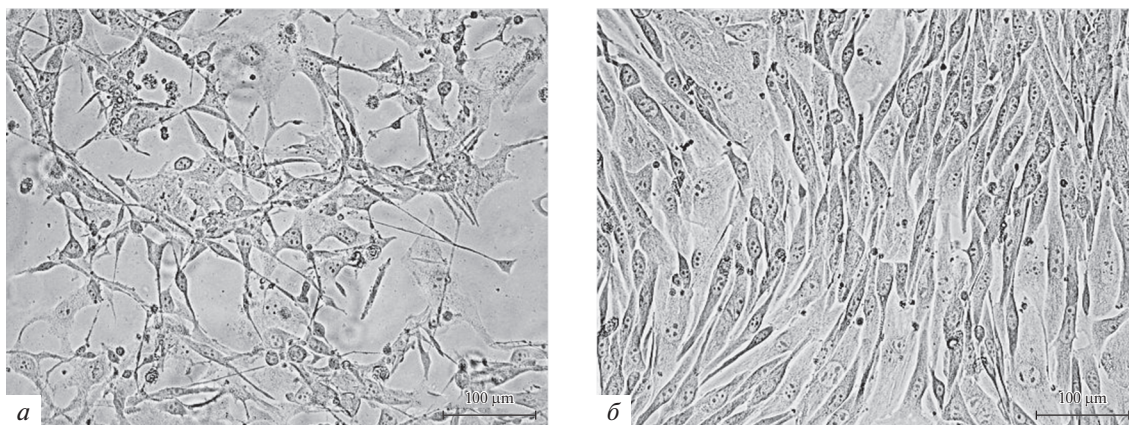


Рис. 2. Клетки меланомы V16 в контроле (а) и после воздействия дакарбазина в концентрации полумаксимального ингибирования (1.86 ммоль/л; б) в течение 72 ч.

клеток увеличивалась в 2 раза при воздействии дакарбазином в концентрации 3.73 мМоль/л, соответствующей $2 \times IC_{50}$ (рис. 3).

При воздействии на клетки меланомы дакарбазином в концентрации 340 мкг/мл, соответствующей IC_{50} , по результатам проточной цитометрии отмечали увеличение доли клеток в фазах G_0 и в S в 1.95 и в 2.44 раза соответственно, а доли клеток, находящихся в фазах G_1 и G_2 снижались в 1.44 и 3.22 раза соответственно. В негативной популяции присутствовали клетки с содержанием ДНК, превышающем значения, характерные для фаз G_0/G_1 , что, может быть также связано с дефектом митотической сегрегации и повышением доли анеуплоидных клеток под действием препарата, описанным ранее (Reyes-Reyes et al., 2013). После воздействия дакарбазином на клетки меланомы V16 в концентрации 680 мкг/мл, что соответствовало $2 \times IC_{50}$, отмечали увеличение доли клеток в фазах G_0 и S в 3.43 и 2.50 раза соответственно, снижение в 2.58 раза доли клеток в фазе G_1 и в 1.70 раза в фазе G_2 (рис. 4).

Таким образом, установлено увеличение пула G_0 -положительных клеток при воздействии цитостатическим препаратом дакарбазин.

ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку в литературе есть данные о присутствии в гетерогенной популяции опухолевых клеток G_0 -положительных клеток, а также о возможности перехода опухолевых клеток в фазу покоя под воздействием разнообразных стрессовых факторов (Carpel et al., 2018), мы осуществили культивирование клеток меланомы в присутствии противоопухолевого препарата дакарбазин с последующей оценкой доли покоящихся (G_0 -положительных) опухолевых клеток и динамики ее изменений.

Алкилирующие агенты, к которым относится дакарбазин, широко применяются в терапии злокаче-

ственных новообразований, в том числе меланомы кожи, на протяжении нескольких десятков лет. Установлено, что дакарбазин вызывает остановку клеточного цикла преимущественно в фазах G_2/M с последующим развитием клеточного старения и апоптоза. Однако ранее выполненные нами исследования показали, что определенная доля клеток меланомы (10–15%) сохраняет жизнеспособность после воздействия дакарбазина, что, в свою очередь, может быть связано с развитием лекарственной устойчивости (Tumentseva et al., 2021). Известно, что дакарбазин характеризуется низкой эффективностью в отношении меланомы, хотя точные механизмы этого остаются до сих пор неясными.

В первую очередь, при воздействии дакарбазином на клетки мышинной меланомы V16 наблюдали очевидные визуальные изменения морфологии клеток. В частности, клетки приобретали веретенообразную форму с отсутствием ламеллоподий. Действительно, целый ряд публикаций указывает на то, что алкилирующие агенты вызывают изменения цитоскелета в опухолевых клетках, связывая это с меняющейся способностью к миграции и инвазии опухолевых клеток (Wang et al., 2016; Avci et al., 2020).

В ряде работ по исследованию влияния дакарбазина на клеточный цикл есть сведения об эффектах дакарбазина на процессы некроза, апоптоза клеток меланомы и остановку клеточного цикла в фазах S и G_2/M (Huang et al., 2017). Дакарбазин и другие алкилирующие агенты продемонстрировали способность индуцировать блок клеточного цикла в фазах G_1 и G_2 . Установлено, что клетки после блока G_2/M более восприимчивы к индукции апоптоза по сравнению с более устойчивыми клетками после остановки клеточного цикла в фазе G_1 , которые способны обратимо выходить из клеточного цикла, переходить в фазу G_0 или развивать стресс эндоплазматического ретикулума, что приводит к деградации поврежденных белков и сохранению жизнеспособности опухолевых

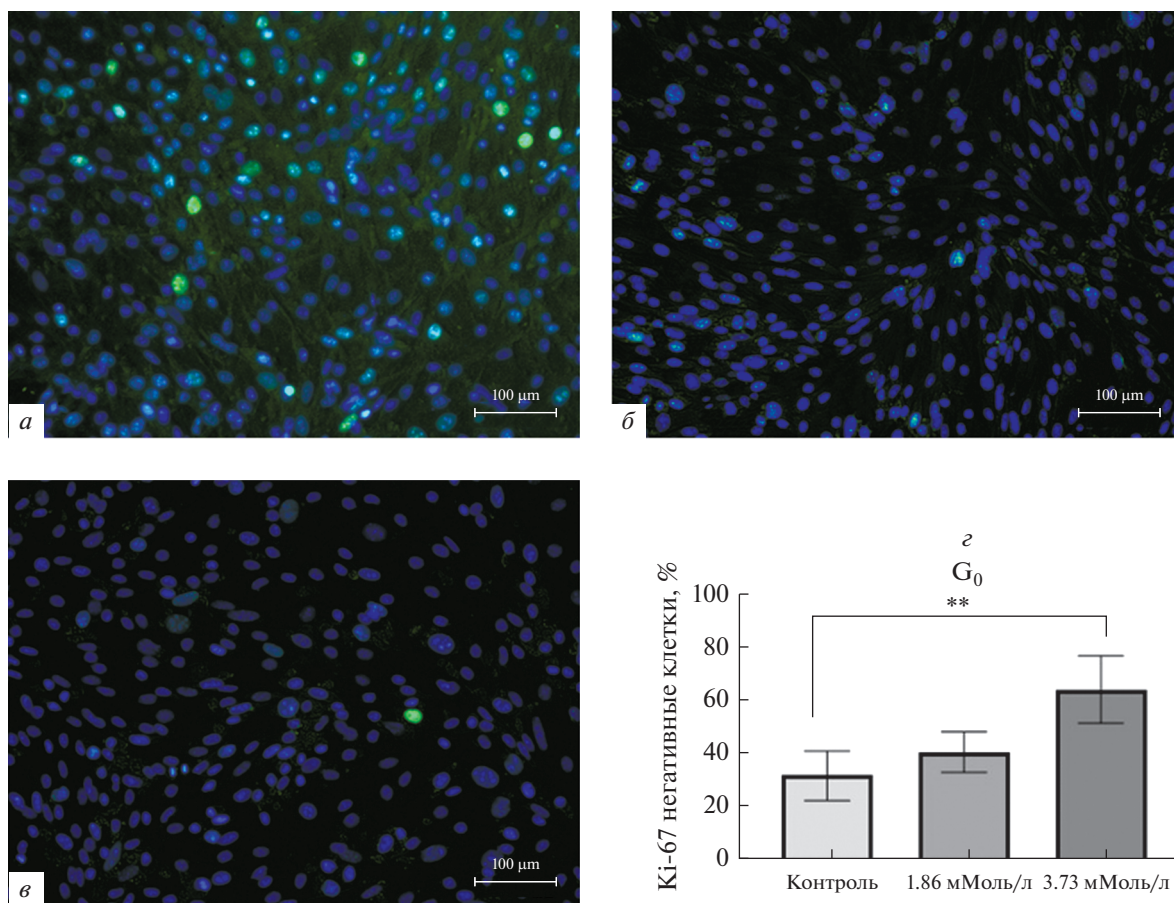


Рис. 3. Клетки меланомы линии В16, окрашенные флуоресцентно мечеными антителами к Ki-67 через 48 ч после прекращения действия дакарбазина. *а* – Контроль (К), *б* – дакарбазин в концентрации 1.86 мМоль/л (IC50), *в* – дакарбазин (Д) в концентрации 3.73 мМоль/л ($2 \times IC_{50}$); ядра Ki-67-положительных клеток окрашены в зеленый цвет, ядра Ki-67-негативных (G_0 -позитивных) клеток – в синий (окраска DAPI). *з* – Графическое отображение полученных результатов; указана концентрация дакарбазина; (**) – различия между контролем и действием 3.73 мМоль/л дакарбазина достоверны при $P \leq 0.05$.

клеток (Hill et al., 2014; Beaumont et al., 2016). Наши результаты проточной цитометрии подтверждают способность дакарбазина снижать долю клеток в фазах G_1 и G_2 клеточного цикла с параллельным повышением доли клеток в фазе G_0 клеточного цикла.

Часто генетическим и эпигенетическим изменениям при онкологических заболеваниях подвергаются регуляторы клеточного цикла, такие как циклин D1/CDK4/pRb. Известно, что сигнальный каскад циклин D/p16–CDK4/6-Rb нарушен в 90% меланом и, следовательно, является очевидной терапевтической мишенью для этого заболевания. Основным результатом активации CDK4 является фосфорилирование Rb. Кроме того, CDK4 непосредственно фосфорилирует другие белки, которые способствуют прогрессии клеточного цикла и ингибируют клеточное старение и апоптоз (Sheppard, McArthur, 2013). Основываясь на роли CDK4 и CDK1 в развитии клеточного цикла, можно предположить, что их ингибирование под воздействием химиотерапевти-

ческих препаратов может вызывать остановку клеток в G_1 или G_2 (Joshi et al., 2007).

Для определения доли G_0 -положительных клеток меланомы В16 после воздействия дакарбазином мы использовали маркер пролиферации опухолевых клеток Ki-67. Распределение Ki-67 резко меняется во время прогрессии клеточного цикла, что связано с различными его функциями. Во время интерфазы он необходим для распределения гетерохроматинных антигенов и ядрышковой ассоциации гетерохроматина, а во время митоза – для формирования перихромосомного слоя, рибонуклеопротеиновой оболочки, покрывающей хромосомы. В фазе G_0 клетки становятся отрицательными по антигену Ki-67, в то время как во всех других фазах клеточного цикла этот антиген присутствует (Sun et al., 2018).

Как отмечалось выше, арест клеточного цикла, переход клеток в G_0 с последующим развитием апоптоза наблюдается через 72 ч культивирования в присутствии дакарбазина (Mhaidat et al., 2007; Sun et al., 2018; Pawlowska, 2018). Мы оценивали распре-

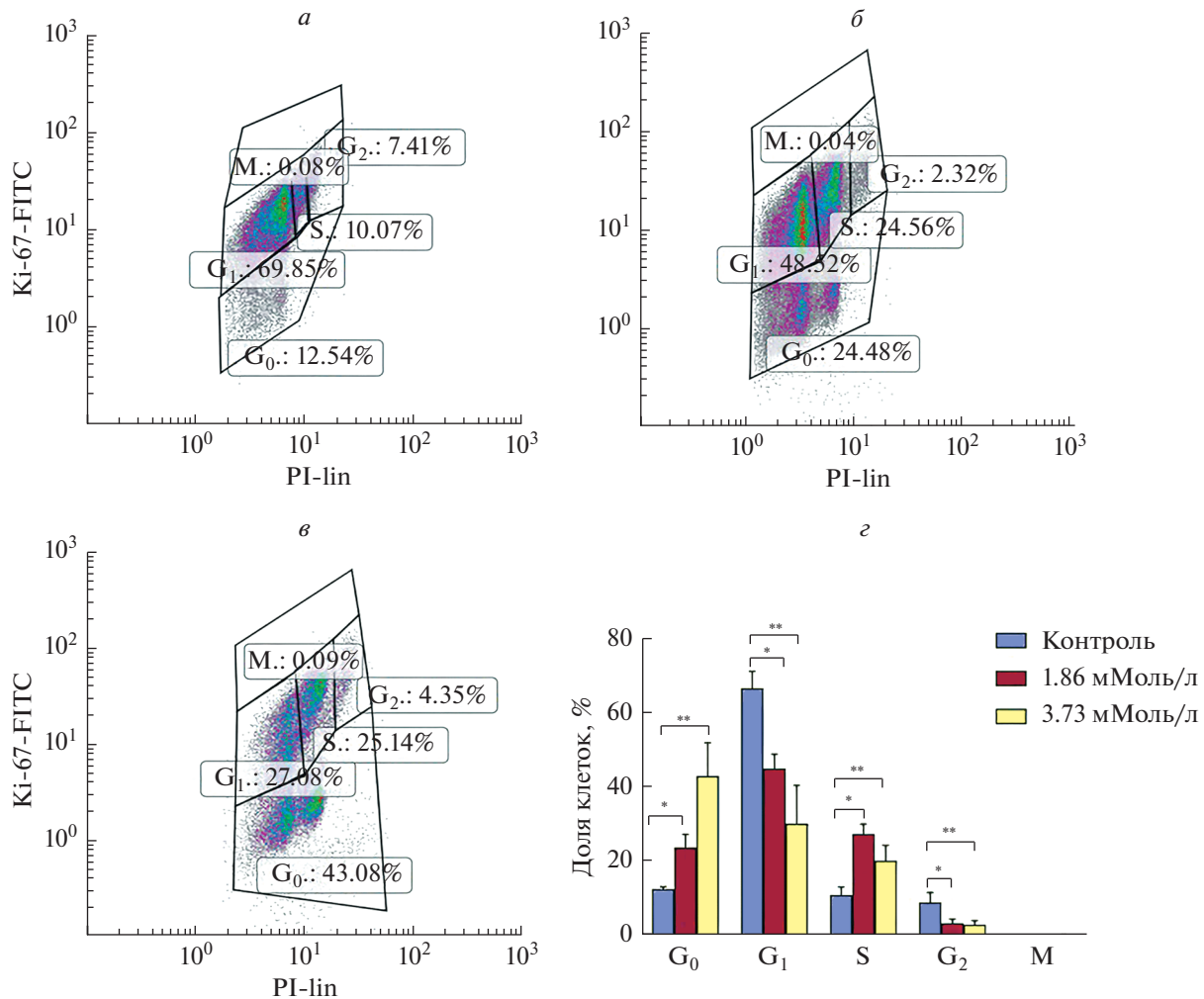


Рис. 4. Распределение клеток меланомы В16 по фазам клеточного цикла через 48 ч после прекращения действия дакарбазина. Проточная цитометрия. По горизонтали и вертикали – интенсивность флуоресценции йодида пропидия (PI) и анти-Ki-67 моноклональных антител соответственно. G₀-позитивные клетки находятся в нижнем квадранте. а – Контроль (без воздействия), б – 1.86 мМоль/л (IC₅₀) дакарбазина, в – 3.73 мМоль/л (2 × IC₅₀) дакарбазина. г – Процентное распределение клеток по фазам клеточного цикла до и после воздействия дакарбазина; показаны средние значения и их ошибки; различия между контролем и действием 1.86 мМоль/л (*) или 3.73 мМоль/л (**) дакарбазина достоверны при P ≤ 0.05.

деление клеток меланомы по фазам клеточного цикла после воздействия дакарбазином через 5 сут с помощью проточной цитометрии (72 ч культивирования с дакарбазином и 48 ч культивирования в стандартной среде после элиминации апоптических клеток). Повышение доли G₀-положительных клеток может рассматриваться как механизм перепрограммирования опухолевых клеток под действием повреждающего фактора, которым в данном случае является дакарбазин, накопления мутаций и транскрипционного перепрофилирования, позволяющего обеспечить выживаемость опухолевых клеток.

Увеличение доли клеток в фазе G₀ под воздействием дакарбазина может свидетельствовать о снижении активности сигнального пути MAPK-ERK1/2 и PI3K/AKT (Ossowski et al., 2010). Регуляция хода клеточного цикла осуществляется соотно-

шением сигнальных путей киназ ERK1/2 и p38. Высокий уровень активности ERK1/2 способствуют пролиферации, тогда как повышенная активность MAP-киназы p38 активирует ответ каскада белков, способствуя аресту клеточного цикла и сохранению жизнеспособности клеток (Fares et al., 2020).

При иммуноцитохимическом анализе было также выявлено увеличение доли G₀-положительных клеток после воздействия дакарбазином, что соотносится с результатами проточной цитометрии. В митотических клетках Ki-67 локализуется в области перихромосомного слоя, что выражено характерным ярким зеленым окрашиванием. При вступлении клеток в раннюю фазу G₁ наблюдается фокальный характер экспрессии Ki-67 в ядрах клеток, что при иммунофлуоресцентной микроскопии выраже-

но в виде единичных зеленоватых вкраплений (Matheson, Kaufman, 2017).

Таким образом, при воздействии дакарбазином на клетки меланомы В16 в клеточном цикле увеличивается доля G_0 -положительных клеток, а также происходит снижение доли клеток в фазах G_1 и G_2 . С учетом сохраняющейся способности покоящихся G_0 -положительных клеток к пролиферации, феномен перехода в G_0 , в равной степени как и сама популяция таких клеток, может быть целенаправленным объектом в рамках противоопухолевой терапии. Помимо этого, ранее мы наблюдали схожие изменения в клетках меланомы после воздействия таргетным препаратом вемурафениб, ингибитора белка BRAF (Николаева, 2020), что может указывать на универсальность подобных изменений вне зависимости от действующего лекарственного средства, и подчеркивает необходимость разработки целенаправленных стратегий в отношении G_0 -положительных клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Результаты работы методом проточной цитометрии получены в Центре коллективного пользования Красноярского научного центра СО РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00110, <https://rscf.ru/project/19-15-00110/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зинченко И.С., Палкина Н.В., Рукша Т.Г. 2022. Изменение профиля микроРНК в клетках меланомы, резистентных к действию дакарбазина. Цитология. Т. 64. № 1. С. 26. (Zinchenko I.S., Palkina N.V., Ruksha T.G. 2022. Changes in miRNA profile in melanoma cells resistant to dacarbazine. Tsitologiya. V. 64. № 1. S. 26.)
- Николаева Е.Д., Дубовцева И.Ю., Белоногов Р.Н., Наркевич А.Н., Мошев А.В., Савченко А.А., Рукша Т.Г. 2020. Вемурафениб индуцирует повышение уровня дормантных (Ki-67-негативных) клеток при BRAF-негативном статусе меланомы. Цитология. V. 62. № 11. С. 793. (Nikolaeva E.D., Dubovtseva I.Yu., Belonogov R.N., Narkevich A.N., Moshev A.V., Savchenko A.A., Ruksha T.G. 2020. Vemurafenib induces an increase in dormant (Ki-67-negative) cells in BRAF-negative melanoma. Tsitologiya. V.62. № 11. P. 793.)
- Al-Qatati A., Aliwaini S. 2017. Combined pitavastatin and dacarbazine treatment activates apoptosis and autophagy resulting in synergistic cytotoxicity in melanoma cells. Oncol. Letters. V. 14. P. 7993.
- Avci N.G., Ebrahimzadeh-Pustchi S., Akay Y.M., Esquenazi Y., Tandon N., Zhu J.J., Akay M. 2020. NF- κ B inhibitor with Temozolomide results in significant apoptosis in glioblastoma via the NF- κ B(p65) and actin cytoskeleton regulatory pathways. Sci. Rep. V. 10. P. 13352.
- Beaumont K.A., Hill D.S., Daignault S.M., Lui G., Sharp D.M., Gabrielli B., Weninger W., Haass N.K. 2016. Cell cycle phase-specific drug resistance as an escape mechanism of melanoma cells. J. Invest. Dermatol. V. 136. P. 1479.
- Cappel S.D., Mark K.G., Garbett D., Pack L.R., Rape M., Meyer T. 2018. EMI1 switches from being a substrate to an inhibitor of APC/C^{CDH1} to start the cell cycle. Nature. V. 7709. P. 313
- Chapman P.B., Hauschild A., Robert C., Haanen J.B., Ascierto P., Larkin J., Dummer R., Garbe C., Testori A., Maio M., Hogg D., Lorigan P., Lebbe C., Jouary T., Schadendorf D. et al. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. New England J. Med. V. 364. P. 2507.
- Cheng L., Lopez-Beltran A., Massari F., MacLennan G.T., Montironi R. 2018. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. Mod. Pathol. V. 31. P. 24.
- Domingues B., Lopes J.M., Soares P., Populo H. 2018. Melanoma treatment in review. Immunotargets Ther. V. 7. P. 35–49.
- Fares J., Fares M.Y., Khachfe H.H., Salhab H.A., Fares Y. 2020. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. Signal Transd. Targeted Ther. V. 5. P. 28.
- Gyrylova S.N., Aksenenko M.B., Gavriluk D.V., Palkina N.V., Dyhno Y.A., Ruksha T.G., Artyukhov I.P. 2014. Melanoma incidence mortality rates and clinico-pathological types in the Siberian area of the Russian Federation. Asian Pac. J. Cancer Prev. V. 15. P. 2201.
- Huncharek M., Caubet J.F., McGarry R. 2001. Single-agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta-analysis of 3273 patients from 20 randomized trials. Melanoma Res. V. 11. P. 75.
- Huang X., He J.X., Zhang H.T., Sun K., Yang J., Wang H.J., Zhang H.X., Guo Z.Z., Zha Z.G., Zhou C.R. 2017. Effect of dacarbazine on CD44 in live melanoma cells as measured by atomic force microscopy-based nanoscopy. Int. J. Nanomed. V. 12. P. 8867.
- Hill D.S., Lovat P.E., Haass N.K. 2014. Induction of endoplasmic reticulum stress as a strategy for melanoma therapy: is there a future? Melanoma Manag. V. 2. P. 127.
- Joshi K.S., Rathos M.J., Mahajan P., Wagh V., Shenoy S., Bhatia D., Sharma S. 2007. P276-00, a novel cyclin-dependent inhibitor induces G_1 – G_2 arrest, shows antitumor activity on cisplatin-resistant cells and significant in vivo efficacy in tumor models. Mol. Cancer Ther. V. 6. P. 926.
- Li W., Sanki A., Karim R.Z., Thompson J.F., Lee C.S., Zhuang L.Q., Zhuang L., McCarthy S.W., Scolyer R.A. 2006. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. Pathol. V. 38. P. 287.
- Lui P., Cashin R., Machado M., Hemels M., Corey-Lisle P.K., Einarson T.R. 2007. Treatments for metastatic melanoma:

- synthesis of evidence from randomized trials. *Cancer Treat. Rev.* V. 33. P. 665.
- Manke I.A., Nguyen A., Lim D., Stewart M.Q., Elia A.E., Yaffe M.B. 2005. MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G₂/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol. Cell.* V. 17. P. 37.
- Mattia G., Puglisi R., Ascione B., Malorni W., Carè A., Matarrese P. 2018. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death Dis.* V. 9. P. 112.
- Matheson T.D., Kaufman P.D. 2017. The p150N domain of chromatin assembly factor-1 regulates Ki-67 accumulation on the mitotic perichromosomal layer. *Mol. Biol. Cell.* V. 28. P. 21.
- McConnell A.M., Zon L.I. 2021. Dissecting melanocytes to predict melanoma. *Nat. Cell Biol.* V. 23. P. 930.
- Mhaidat N.M., Zhang X.D., Jiang C.C., Hersey P. 2007. Docetaxel-induced apoptosis of human melanoma is mediated by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and inhibited by the mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Clin. Cancer Res.* V. 13. P. 1308.
- Olszewska-Słonina D.M., Styczyński J., Drewa T.A., Olszewski K.J., Czajkowski R. 2005. B16 and cloudman S91 mouse melanoma cells susceptibility to apoptosis after dacarbazine treatment. *Acta Pol. Pharm.* V. 62. P. 473.
- Oliferenko S., Kaverina I., Small J.V., Huber L.A. 2000. Brief report hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth. *J. Cell Biol.* V. 148. P. 1159.
- Ossowski L., Aguirre-Ghiso J.A. 2010. Dormancy of metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* V. 23. P. 41.
- Pawlowska E., Szczepanska J., Szatkowska M., Blasiak J. 2018. An interplay between senescence, apoptosis and autophagy in glioblastoma multiforme-role in pathogenesis and therapeutic perspective. *Int. J. Mol. Sci.* V. 19. P. 889.
- Reyes-Reyes E.M., Jin Z., Vaisberg A.J., Hammond G.B., Bates P.J. 2013. Physangulidine A, a withanolide from *Physalis angulata*, perturbs the cell cycle and induces cell death by apoptosis in prostate cancer cells. *J. Nat. Prod.* V. 1. P. 2.
- Ruksha T.G. 2019. MicroRNAs' control of cancer cell dormancy. *Cell Div.* V. 14. P. 11.
- Risson E., Nobre A.R., Maguer-Satta V., Aguirre-Ghiso J.A. 2020. The current paradigm and challenges ahead for the dormancy of disseminated tumor cells. *Nat. Cancer.* V. 7. P. 672.
- Ralhan R., Kaur J. 2007. Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Path.* V. 17. P. 1061.
- Shah M.A., Schwartz G.K. 2001. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* V. 7. P. 2168.
- Sheppard K.E., McArthur G.A. 2013. The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma. *Clin Cancer Res.* V. 19. P. 5320.
- Sun X., Kaufman P.D. 2018. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* V. 127. P. 175.
- Tyumentseva A., Averchuk A., Palkina N., Zinchenko I., Moshev A., Savchenko A., Ruksha T. 2021. Transcriptomic profiling revealed plexin A2 downregulation with migration and invasion alteration in dacarbazine-treated primary melanoma cells. *Front. Oncol.* V. 11. P. 732501.
- Xu W., McArthur G. 2016. Cell cycle regulation and melanoma. *Curr. Oncol. Rep.* V. 18. P. 34.
- Wang H., Feng W., Lu Y., Li H., Xiang W., Chen Z., He M., Zhao L., Sun X., Lei B., Qi S., Liu Y. 2016. Expression of dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1 (DHC2) associated with glioblastoma cell resistance to temozolomide. *Sci. Rep.* V. 6. P. 28948.

Cell Cycle Phase Distribution in B16 Melanoma Cells under Dacarbazine Treatment

E. Z. Lapkina^a, A. R. Esimbekova^a, V. D. Beleniuk^b, A. A. Savchenko^b, and T. G. Ruksha^{a, *}

^a*Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, 660022 Russia*

^b*Research Institute for Medical Problems in the North, Krasnoyarsk, 660022 Russia*

*e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Reversible transition to the resting phase (G₀) of the cell cycle is implicated in the development of cancer cells drug resistance. The effect of dacarbazine on B16 melanoma cells was used to study the distribution of phases of the cell cycle of melanoma cells. The ability of cells to enter into a G₀ phase of cell cycle was determined by immunocytochemistry and flow cytometry based on the negative staining of Ki-67 protein. The pool of G₀-positive cells was increased with subsequent decrease in the proportion of cells in the G₁ and G₂ phases in the cell cycle in dacarbazine-treated B16 melanoma cells.

Keywords: melanoma, B16, dacarbazine, cell cycle, G₀ phase, Ki-67, cell dormancy, cell senescence