

УДК 616.33-006.6-089.87]:575.191(476)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ

Р. М. СМОЛЯКОВА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет,
Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова,
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, Минск, Беларусь

Исследуется молекулярно-генетический профиль экспрессии онкогенных микроРНК mir-21, mir-181, mir-182, mir-221, mir-222 и генов супрессоров опухолевого роста mir-214, mir-200b, mir-15b при меланоме кожи и меланоцитарных невусах. Отмечено, что повышение экспрессии онкогенов микроРНК может использоваться для дифференциальной диагностики меланомы кожи. Снижение уровней генов-супрессоров микроРНК mir-214, mir-200b, mir-15b характеризует активизацию процессов пролиферации, неоангиогенеза, прогрессирование опухолевого процесса.

Ключевые слова: экологические факторы риска; меланома; меланоцитарный невус; микроРНК; профиль; экспрессия.

MOLECULAR GENETIC microRNA EXPRESSION PROFILE FOR SKIN MELANOMA

R. M. SMOLIAKOVA^a

^aBelarusian State University, International Sakharov Environmental Institute,
Dolgobrodskaya street, 23/1, 220070, Minsk, Belarus

The molecular genetic profile of the expression of oncogenic microRNA mir-21, mir-181, mir-182, mir-221, mir-222 and tumor suppressor genes mir-214, mir-200b, mir-15b in melanoma of the skin and melanocytic nevi. It is noted that an increase in the evaluation of microcancer oncogenes can be used for the differential diagnosis of skin melanoma. Reducing the levels of suppressor genes of microRNA mir-214, mir-200b, mir-15b characterizes the activation of proliferation processes, neoangiogenesis, and the progression of the tumor process.

Key words: ecological risk factors; melanoma; melanocytic nevus; microRNA; profile; expression.

Введение

Меланома кожи (МК) является новообразованием, которое развивается в результате злокачественной трансформации меланоцитов и меланобластов [1].

Образец цитирования:

Смолякова Р. М. Молекулярно-генетический профиль экспрессии микроРНК при меланоме кожи // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. 2018. № 3. С. 80–86.

For citation:

Smoliakova R. M. Molecular genetic microRNA expression profile for skin melanoma. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2018. No. 3. P. 80–86 (in Russ.).

Авторы:

Раиса Михайловна Смолякова – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой общей экологии, биологии и экологической генетики.

Authors:

Raisa M. Smoliakova, doctor of science (biology), associate professor; head of the department of general ecology, biology and environmental genetics.
smol60@mail.ru

В настоящее время во всем мире, в том числе и в Беларуси, частота возникновения данного заболевания значительно увеличилась и продолжает неуклонно возрастать. Среднегодовой темп прироста МК в мире составляет около 5 % и может считаться одним из самых высоких среди всех злокачественных опухолей, кроме рака легкого. Меланома кожи является одним из наиболее агрессивных новообразований. Опухоль локализуется преимущественно в коже, реже в слизистых оболочках и сетчатке глаза [2; 3].

В настоящее время установлены определенные факторы риска развития меланомы. В большинстве случаев факторы риска развития меланомы кожи носят экзогенный и эндогенный характер. Среди экзогенных факторов наиболее существенным является экологическое воздействия окружающей среды на кожу, в частности, солнечных лучей [4].

Ультрафиолетовое излучение может приводить к нарушениям клеток ДНК – димеризации тимина, что, вызывает клеточные мутации. При делении измененная клетка передает мутации клеткам нового поколения. Мутации в протоонкогенах и/или в генах-супрессорах приводят к неконтролируемой скорости митоза, что становится причиной роста опухоли. К эндогенным факторам относятся наследственная предрасположенность, пол, возраст, цвет кожи, наличие определенных заболеваний. Генные мутации, вызывающие меланому, могут передаваться по наследству. Если в семье один или более близких родственников страдали меланомой, риск заболевания увеличивается до 8 раз, в зависимости от количества заболевших родственников. По медицинской статистике, 10 % лиц, заболевших меланомой, имеют отягощенный семейный анамнез.

«Золотым стандартом» лечения пациентов с МК является удаление опухоли. Лечение пациентов с МК остается трудно решаемой проблемой, что обусловлено высокой частотой развития рецидивов, непредсказуемостью клинического течения заболевания и отсутствием эффективной системной терапии.

Меланома кожи распространяется лимфогенным и гематогенным путем и обладает выраженной склонностью к диссеминации. По данным научной литературы, поражение регионарных лимфатических узлов при прогрессировании заболевания после удаления первичной опухоли составляет от 70 до 90 %, что является одним из самых прогностически неблагоприятных факторов: общая 5-летняя выживаемость пациентов, лечение которых начато на этой стадии, составляет в среднем 15–40 %.

Проблема профилактической терапии при МК – сложный и нерешенный вопрос в современной онкологии. Препаратом выбора цитостатической терапии диссеминированной МК является дакарбазин. Другая важнейшая составляющая лечения пациентов с МК – иммунотерапия. На протяжении последних 20 лет во всем мире идет активное изучение применения интерферонов в схемах лечения пациентов с МК с высоким риском метастазирования.

В настоящее время доказана статистически достоверная высокая прямая корреляция между периодом времени после иссечения первичной опухоли до появления регионарных метастазов и результатами 5-летней выживаемости с момента их удаления, что может служить серьезным поводом для поиска новых схем и комбинаций препаратов и методов локального воздействия на опухоль.

Повышение эффективности противоопухолевой терапии непосредственно связано с успехами в сфере молекулярной и клеточной биологии и генетики, а также смежных областях, что позволяет разрабатывать новые способы лечения онкологических заболеваний на рациональной основе. «Молекулярный портрет» опухоли, то есть совокупность характерных для нее молекулярных изменений, позволяет проводить диагностику онкологических заболеваний, оценивать ее чувствительность к проводимой терапии и прогнозировать течение процесса.

В настоящее время накоплено множество данных, позволяющих рассматривать микроРНК в качестве биомаркеров опухолевых клеток: уровень экспрессии микроРНК является специфическим для различных линий раковых клеток; выявление их экспрессии в биологических жидкостях, включая кровь, может быть диагностировано с использованием молекулярно-генетических технологий [5; 6].

В настоящее время имеются отдельные данные об изменениях в уровнях экспрессии микроРНК при меланоме. В отдельных исследованиях показано, что экспрессия микроРНК-137 ассоциирована с экспрессией фактора MITF, основного регулятора меланогенеза [7].

Регуляторный фактор MITF связан с функционированием микроРНК-182 [Segura et al., 2009]. Избыточная экспрессия микроРНК-182 отражает агрессивный и инвазивный потенциал клеток меланомы посредством регуляции как фактора MITF, так и FOXO3. Предполагается, что микроРНК-182 усиливает инвазивную способность клеток меланомы *in vitro* и увеличивает их метастатический потенциал *in vivo* в экспериментальной модели легочных метастазов. Кроме того выявлено, что в тканях человека, экспрессия микроРНК-182 увеличивается с прогрессированием от первичной к метастатической форме меланомы и коррелирует с экспрессией факторов FOXO3 и MITF. Предполагается, что оба этих транскрипционных фактора являются мишенями для действия микроРНК-182. Стимулирующее действие гиперэкспрессируемой микроРНК-182 на процесс метастазирования меланомы блокируется сопутствующей

гиперэкспрессией факторов MITF и FOXO3, делая их ключевыми регуляторами эффектов, вызванных экспрессией микроРНК-182. Предполагается, что накопленные данные могут оказаться применимыми к процессам метастазирования в других злокачественных новообразованиях, а подавление экспрессии микроРНК может стать одной из наиболее объективных критериев эффективности лечения.

Проведенные единичные эксперименты дают возможность предполагать участие микроРНК-214 в миграции, инвазии и проникновении в кровоток *in vitro*. *In vivo* микроРНК-214 не влияла на рост первичных опухолей, но увеличивала метастатический потенциал клеток в экспериментальном подходе с метастазированием в легкие.

МикроРНК-221 и микроРНК-222 регулируют экспрессию гена p27 и гена c-KIT, которые подавляются в метастатических клетках меланомы. Ген c-KIT регулируется с помощью AP-2α транскрипционного фактора. Более того, обработка с помощью антагонистов микроРНК против микроРНК-221/222 ингибировала пролиферацию и инвазивность меланомы *in vitro* и рост меланомы *in vivo* [Felicetti et al., 2008]. Ozsolak, et al. (2008) установил, что микроРНК-221/222 специфически регулируются с помощью фактора MITF и характерны для прогрессирования меланомы [8].

Гиперэкспрессия микроРНК-21 может функционировать как онкоген. Chuan He Yang с соавторами продемонстрировали влияние интерферона на микроРНК-21 через STAT3-зависимый путь. МикроРНК-21 играет важную роль в супрессии ИФН-индуцированного апоптоза. В ходе исследования предполагалось, что индуцируемый интерфероном апоптоз не возникает в клеточной линии DU145 с повышенным уровнем экспрессии микроРНК-21 и проявляет себя в линии клеток РС3, где экспрессия этой микроРНК блокирована. Одним из основных ограничений для применения интерферона в качестве эффективного метода лечения пациентов со злокачественными новообразованиями является его неспособность эффективно индуцировать апоптоз в опухолевых клетках. Предполагается, что регуляция микроРНК-21 в различных видах карцином может быть причиной развития резистентности этих новообразований к ИФН-индуцированному апоптозу. Таким образом, изучение экспрессии микроРНК-21 может явиться одним из факторов повышения эффективности интерферона отдельно или в сочетании с другими химиотерапевтическими препаратами [9].

Отдельными исследованиями выявлено, что экспрессия микроРНК имеет большое значение для выбора химиотерапевтических стратегий, направленных на преодоление устойчивости раковых клеток. Установлено, что микроРНК-21 способствует росту опухоли, препятствуя апоптозу, и является ключевым фактором устойчивости к химиотерапии темозоломидом [10; 11].

Химиотерапия может вызывать эпителиально-мезенхимальный переход в опухолевых клетках, что является важным шагом в процессе метастазирования рака, приводит к распространению процесса и неэффективности лечения. Клиническое снижение микроРНК-200b, микроРНК-15b связано с химиотерапевтической устойчивостью и плохим прогнозом для пациентов с диссеминированной меланомой кожи. Данные, используемые в мировой практике, свидетельствуют, что снижение экспрессии микроРНК-200b и микроРНК-15b может быть вызвано химиотерапией и служить в качестве молекулярного маркера для отмены цитостатической терапии [12].

Ограниченное число данных по изучаемой теме, предположительный характер механизмов развития лекарственной устойчивости и отсутствие доказательных критериев прогноза на уровне нарушений генов и контролирующих их микроРНК обусловили актуальность и перспективность изучения данной проблемы при диссеминированной меланоме кожи для персонализации тактики лечения и определения прогноза течения заболевания у данных пациентов.

Материалы и методы исследования

Изучение молекулярно-генетического профиля экспрессии микроРНК при меланоме кожи и его влияние на прогноз проведено на основе изучения данных первичной медицинской документации (истории болезни и амбулаторные карты) 32 пациентов, получавших специальное лечение в РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова.

Из общего числа пациентов имели I стадию 40,6 %, II стадию – 59,4 %, меланоцитарные невусы диагностированы у 10.

Средний возраст пациентов с меланомой кожи составил 59±13,09 лет, мужчин – 13, женщин – 19. В исследуемой группе пациентов выявлена меланома кожи в области туловища в 28 % случаев, нижних конечностей – 44 %, верхних конечностей – 19 %, головы и шеи – 9 %.

Поверхностно-распространяющаяся меланома кожи диагностирована у 44 % пациентов, узловая форма – в 44 % случаев, лентиго меланома – в 12 %.

В анализируемой группе пациентов отмечалась пигментная меланома кожи у 68 %, слабопигментная меланома – у 20 %, беспигментная – у 12 %.

Для определения молекулярного профиля экспрессии исследуемых микроРНК mir-15b, mir-21, mir-181, mir-182, mir-200b, mir-214, mir-221, mir-222 в качестве материала использовалась ткань меланомы кожи и доброкачественных меланоцитарных невусов, заключенных в парафиновые блоки.

Для выделения мРНК из парафиновых блоков готовили серийные срезы толщиной 3–5 микрон, заливали ксилолом и инкубировали при температуре 50 °С в течение 30 мин, затем центрифугировали в миницентрифуге, после чего удаляли ксилол и дважды промывали в 96 % этаноле. В дальнейшем осуществляли выделение РНК с использованием наборов реагентов производства Qiagen (Германия) согласно инструкции производителя. Выделенную мРНК переводили в кДНК.

Аmplification проводили в амплификаторе BioRad (США). Для амплификации в режиме реального времени фрагментов кДНК генов микроРНК использовали набор «miScript SYBR Green PCR Kit» (Qiagen, Германия). При этом отбирали необходимое количество микропробирок объемом 0,2 мл (на одну пробу – две пробирки). Готовили реакционную смесь на хладоэлементе из расчета на одну реакцию (табл. 1).

Таблица 1

Компоненты реакционной смеси для ПЦР

Table 1

Components of the reaction mixture for PCL

Компонент	Объем / реакция	Конечная концентрация
1	2	3
2× буфер для ПЦР-буфер (на основе интеркалирующего красителя SybrGreen)	10 мкл	1x
Универсальный праймер (200 нМ)	0,4 мкл	1x
Диагностические праймеры (200 нМ)	по 0,4 мкл	1x
Деионизированная вода	варьирует	-
кДНК	≤5 мкл	1-3 нг/реакция
Общий объем	20 мкл	-

Общий объем реакционной смеси на 10 % должен превышать необходимый.

Последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров для амплификации в режиме реального времени фрагментов кДНК генов микроРНК представлены в табл. 2.

Таблица 2

Праймеры для амплификации

Table 2

Primers for amplification

МикроРНК	Нуклеотидная последовательность праймера
микроРНК-21	5'–UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA–3'
микроРНК-214	5'–AGCUACAUCUGGCUACUGGGU–3'
микроРНК-181c	5'–AACAUUCAACCUGUCGGUGAGU–3'
микроРНК-182	5'–UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU–3'
микроРНК-221	5'–AGCUACAUCUGUCUGCGGGUUUC–3'
микроРНК-222	5'–AGCUACAUCUGGCUACUGGGU–3'
микроРНК-200b	5'–UAAUACUGCCUGGUAUAUGAUGA–3'
микроРНК-15b	5'–UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA–3'

В реакционную смесь вносили кДНК в концентрации 1–3 нг на реакцию. При более высоких исходных значениях разбавляли кДНК до указанной концентрации с целью повышения эффективности протекания ПЦР и снижения вероятности образования неспецифического ПЦР-продукта. В микропробирки вносили реакционную смесь и кДНК, перемешивали пипетированием и помещали в амплификатор.

В качестве референсного гена использовали RNU6.

Для проведения ПЦР-реакции использовали следующие условия:

1. 50 °C – 2 мин

2. 95 °C – 2 мин

3. 95 °C – 15 сек

4. 57 °C – 1 мин 40 циклов

5. Кривая плавления: 55–95 °C. Температура плавления микроРНК-специфического ПЦР продукта – 74–77 °C.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 7. Сравнение двух независимых групп осуществляли непараметрическим методом при помощи U-критерия Манна–Уитни. Различия между сравниваемыми показателями считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Количественные признаки оценивались при помощи критерия Краскела–Уоллиса. Различия между сравниваемыми показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Корреляционный анализ выполнен по Спирмену с использованием непараметрического анализа корреляционных взаимосвязей. Коэффициент корреляции считали значимым при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Определение молекулярно-генетического профиля у пациентов с меланомой кожи и меланоцитарными невусами осуществлялось по уровням экспрессии онкогенов микроРНК mir-21, mir-181, mir-182, mir-221, mir-222 и генов супрессоров опухолевого роста mir-214, mir-200b, mir-15b.

Проведенный сравнительный анализ показал, что экспрессии микроРНК mir-21 (рис. 1) у пациентов с меланомой кожи варьировала в пределах от 19,5 до 32,8 отн. ед. ($26,5 \pm 0,13$ отн. ед.) по отношению к значениям показателя у пациентов с меланоцитарными невусами $29,8 \pm 0,15$ отн. ед. (уровень экспрессии от 27,5 до 32,2 отн. ед.) ($p_{\text{(Манна–Уитни)}} < 0,05$).

Развитие меланомы кожи сопряжено с повышением экспрессии mir-181 до $32,3 \pm 0,16$ отн. ед. по отношению к значению параметра при невусах $29,9 \pm 0,12$ отн. ед. ($p_{\text{(Манна–Уитни)}} < 0,21$).

Оценка уровня экспрессии mir-182 имеет одно из первостепенных значений в клинической практике и отражает способность опухоли к инвазии и прогрессированию процесса. Результаты проведенного исследования показали, что уровень экспрессии mir-182 у пациентов, страдающих меланомой кожи, составил $36,8 \pm 0,18$ отн. ед. по сравнению с таковым $34,6 \pm 0,11$ отн. ед. при невусах ($p_{\text{(Манна–Уитни)}} < 0,05$).

Представляется возможным предположить, что повышение уровней экспрессии онкогенов mir-221, mir-222 может служить предиктивным фактором трансформации меланоцитарных невусов в меланому с активацией процессов пролиферации и инвазии.

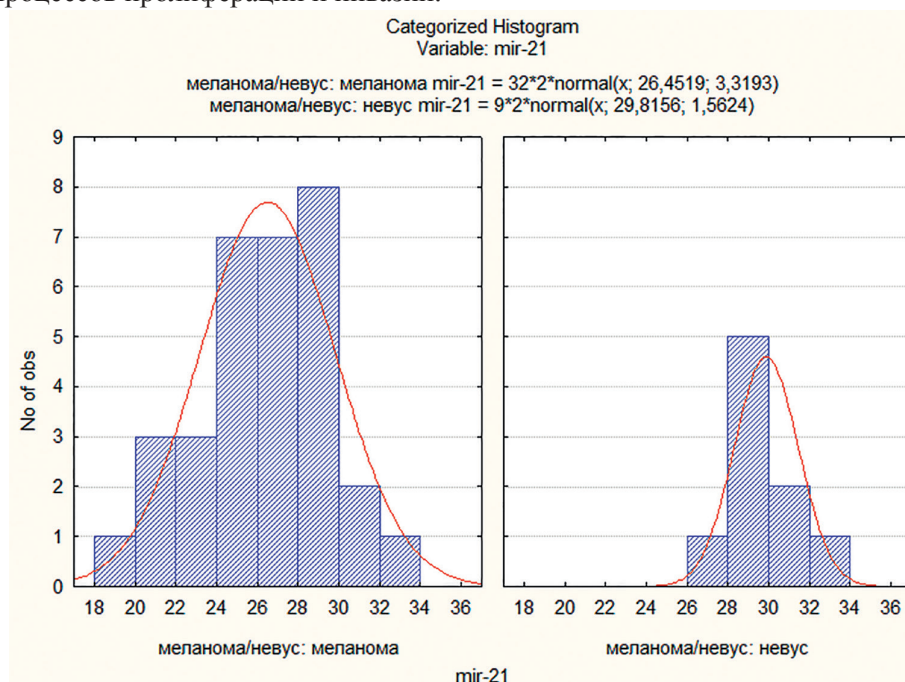


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии mir-21 при меланоме и невусах

Fig. 1. The relative level of expression of mir-21 in melanoma and nevi

Оценка уровней экспрессии онкогенных *mir-221*, *mir-222* у пациентов с меланоцитарными невусами показала повышение их значений до $31,9 \pm 0,21$ и $31,85 \pm 0,21$ отн. ед. соответственно по отношению к уровням таковых при меланоме – ($30,5 \pm 0,15$ и $30,4 \pm 0,17$ отн. ед. соответственно $p_{\text{(Манна-Уитни)}} < 0,15$).

Прогностическими факторами повышенной биологической агрессивности опухолевого процесса является снижение уровней экспрессии генов супрессоров опухолевого роста *mir-214*, *mir-200b*, *mir-15b*. Полученные в ходе выполнения исследования данные (рис. 2) выявили у пациентов с меланомой кожи снижение уровня экспрессии антионкогена *mir-214* до $30,9 \pm 0,12$ отн. ед. по сравнению со значением показателя $33,4 \pm 0,16$ отн. ед. у пациентов с невусами ($p_{\text{(Манна-Уитни)}} < 0,05$).

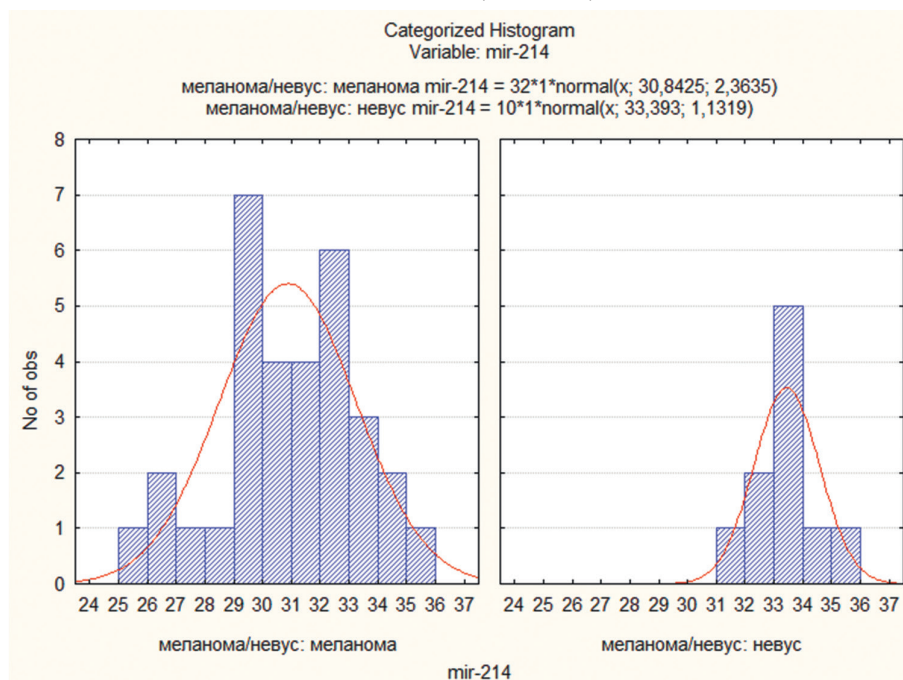


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии *mir-214* при меланоме и невусах

Fig. 2. The relative level of expression of *mir-214* in melanoma and nevi

Понижение функциональной активности антионкогенов способствует усилению процессов пролиферации, неоваскуляризации, снижению чувствительности опухолевых клеток к цитостатической системной терапии. У пациентов, страдающих меланомой кожи, диагностировано понижение уровней экспрессии микроРНК *mir-200b* ($30,7 \pm 0,21$ отн. ед.) и *mir-15b* ($31,0 \pm 0,19$ отн. ед.), по сравнению с таковыми у пациентов с меланоцитарными невусами ($31,7 \pm 0,12$ и $32,4 \pm 0,14$ отн. ед. соответственно) ($p_{\text{(Манна-Уитни)}} < 0,07$).

Заключение

Таким образом, молекулярно-генетический профиль меланомы кожи характеризуется экспрессией онкогенных микроРНК *mir-21*, *mir-181*, *mir-182*, *mir-221*, *mir-222* и генов супрессоров опухолевого роста *mir-214*, *mir-200b*, *mir-15b*.

Установлен повышенный уровень экспрессии онкогена микроРНК 182 у пациентов, страдающих меланомой кожи ($36,8 \pm 0,18$ отн. ед.), по сравнению со значением параметра ($34,6 \pm 0,11$ отн. ед.) при меланоцитарных невусах, что имеет высокую предсказательную значимость в дифференциальной диагностике и оценке степени биологической агрессивности опухоли ($p_{\text{(Манна-Уитни)}} < 0,05$).

Нарушение функциональной активности генов супрессов микроРНК сопряжено с активацией процессов пролиферации, неоваскуляризации, инвазивного потенциала, что характеризуется уменьшением уровней экспрессии микроРНК *mir-214*, *mir-200b*, *mir-15b* у пациентов с меланомой кожи, по сравнению экспрессией генов-супрессоров при доброкачественных невусах ($p_{\text{(Манна-Уитни)}} < 0,05$).

Библиографические ссылки

1. Жигулина А. Г., Ключарева С. В., Новицкая Т. А. Меланома кожи в практике врача-дерматолога // Клиническая дерматология и венерология. 2013. № 3. С. 113–117.
2. Киселев Ф. Л. МикроРНК и рак // Молекул. биология. 2014. Т. 48, № 2. С. 232–242.

3. Манихас Г. М., Мартынюк В. В. Пигментные невусы и меланома // Саркома костей, мягких тканей и опухоли кожи. 2012. № 1. С. 36–41.
4. Bertolotto C., Lesueur F. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options // *Scientifica*. 2013. Vol. 6, № 3. P. 203.
5. Anand S., Cheres D. A. Emerging role of micro-RNAs in regulation of angiogenesis // *Genes Cancer*. 2011. Vol. 2, № 12. P. 1134–1138.
6. Bartel D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions // *Cell*. 2009. Vol. 136. P. 215–233.
7. Howell M. P., Li X., Riker A. I., et al. MicroRNA in Melanoma // *Ochsner J*. 2010. Vol. 10, № 2. P. 83–92.
8. Inada T., Fukushima S. Murai M., et al. Hair shaft miRNA-221 levels as a new tumor marker of malignant melanoma // *J. Dermatol*. 2015. Vol. 42, № 2. P. 198–201.
9. Chan S. H., Wu C. H. MiR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association // *Anticancer Res*. 2008. Vol. 28. P. 907–911.
10. 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. Vol. 129, № 7. P. 1740–1751.
11. Shen J., Lei Q. Q., Chen X., et al. Diagnostic performance of microphthalmia transcription factor for melanoma: a systematic review and meta-analysis // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2014. Vol. 18, № 6. P. 798–805.
12. Trotter S. C., Sroa N., Winkelmann R. R. A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines // *J. of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 2013. Vol. 6, № 9. P. 18–26.

References

1. Zhigulina A. G., Klyucharyova S. V., Novitskaya T. A. [Melanoma of the skin in the practice of a dermatologist]. *Clinical dermatology and veneorology*. 2013. No. 3. P. 113–117 (in Russ.).
2. Kiselev F. L. [MicroRNA and cancer]. *Molecular biology*. 2014. Vol. 48, No. 2. P. 232–242 (in Russ.).
3. Machinas G. M., Martinyuk V. V. [Pigmentary nervses and skin melanoma]. *Sarcoma bones, soft tissue and skin tumors*. 2012. No. 1. P. 36–41 (in Russ.).
4. Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica*. 2013. Vol. 6, No. 3. P. 203.
5. Anand S., Cheres D. A. Emerging role of micro-RNAs in regulation of angiogenesis. *Genes Cancer*. 2011. Vol. 2, No. 12. P. 1134–1138.
6. Bartel D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009. Vol. 136. P. 215–233.
7. Howell M. P., Li X., Riker A. I., et al. MicroRNA in Melanoma. *Ochsner J*. 2010. Vol. 10, No. 2. P. 83–92.
8. Inada T., Fukushima S. Murai M., et al. Hair shaft miRNA-221 levels as a new tumor marker of malignant melanoma. *J. Dermatol*. 2015. Vol. 42, No. 2. P. 198–201.
9. Chan S. H., Wu C. H. MiR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association. *Anticancer Res*. 2008. Vol. 28. P. 907–911.
10. 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. Vol. 129, No. 7. P. 1740–1751.
11. Shen J., Lei Q. Q., Chen X., et al. Diagnostic performance of microphthalmia transcription factor for melanoma: a systematic review and meta-analysis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2014. Vol. 18, No. 6. P. 798–805.
12. Trotter S. C., Sroa N., Winkelmann R. R. A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines. *J. of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 2013. Vol. 6, No. 9. P. 18–26.

Статья поступила в редколлегию 28.06.2018
Received by editorial board 28.06.2018