

Рашитова Софья Денисовна

бакалавр, лаборант-исследователь

Куницына Анастасия Владимировна

научный сотрудник, ассистент

Фирсова Наталья Викторовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

Ленгесова Наталья Анатольевна

канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник

Якунин Семён Викторович

бакалавр

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-107055

ХРОМОСОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ УФ ОБЛУЧЕНИЯ

Аннотация: после ультрафиолетового облучения клеточных культур клеток кожи человека (меланоциты, фибробласты), в сравнении с контролем, нами был зафиксирован высокий уровень хромосомных аббераций. Среди числовых и структурных нарушений – делеции, инверсии, моносомии и трисомии: моносомия по 8, 12, 18, 19 хромосоме; в том числе делеция длинного плеча 4 хромосомы (*del4q*); трисомия 6 и 16 хромосомы; инверсия хромосомы 9 и 4 (*inv9p; inv4q*).

Ключевые слова: меланома, клеточные линии клеток кожи человека, цитогенетический анализ, УФ-облучение, хромосомные абберации.

Для изучения онкогенеза меланомы клеточная культура меланоцитов используется в качестве модельной системы после воздействия ультрафиолета и других экстремальных факторов с целью изучения генетической нестабильности и канцерогенного потенциала [1; 3; 8]. Использование клеточной культуры снимает как множество этических проблем, так и трудности, связанные с использованием большого количества клинического материала [25]. В частности, эксперименты с использованием меланоцитов, выращенных в культуре, особенно актуально для изучения генетики и механизмов пигментных нарушений [18; 24]. Ряд сигнальных путей, регулирующих пролиферацию, клеточное старение и апоптоз, подвержен влиянию общих генетических изменений при меланоме [10].

При оценке генетической нестабильности популяции на хромосомном уровне используют метод кариотипирования [6]. Цитогенетический метод известен уже более 100 лет и по сей день остается одним из наиболее востребованных лабораторно-клинических методов оценки генома человека [4]. Преимущества цитогенетического метода в медицине неоспоримы: во-первых, выявление кариотипически аномального клона почти всегда свидетельствует о злокачественности опухоли; во-вторых, некоторые генетические аномалии характерны для определенных заболеваний, что помогает в дифференциальной диагностике; в-третьих, результаты цитогенетического анализа опухоли помогают в прогнозе, а иногда – и в выборе тактики лечения [2].

При меланоме нестабильность генома возникает преимущественно на хромосомном уровне, более чем у 95% первичных меланом показаны увеличение или потери участков хромосом. Таким образом, хромосомный анализ может оказать помощь при классификации меланоцитарных поражений, пограничных по гистологии. Этот аспект имеет большое клиническое значение, поскольку методы, применяемые при классификации таких поражений, ограничены.

Так, в частности, благодаря использованию цитогенетического анализа меланоцитов у больных меланомой отмечено 27 видов мутаций, две из которых являются строго специфичными для меланомы [7]. В настоящее время не представ-

ляет сомнений участие определенных генетических изменений в развитии и прогрессировании меланомы: это разнообразные делеции, амплификации, сверхэкспрессия генов или молчащие гены, то есть те нарушения, многие из которых могут быть обнаружены на хромосомном уровне [16].

Меланома кожи представляет собой злокачественную опухоль, которая возникает из меланоцитов или из невусов. Каждый из подтипов меланомы имеет различные характерные мутационные генетические характеристики. Поскольку геномная нестабильность является важной отличительной чертой меланомы, которая может объяснять ее большое разнообразие фенотипических изменений, механизмы геномной нестабильности представляют значительный интерес [13].

Одним из основных пусковых механизмов, лежащих в основе роста заболеваемости меланомой, считается произошедшее за последнее время по различным причинам увеличение суммарного времени воздействия ультрафиолетовой части спектра естественного солнечного света на кожу человека, не всегда подготовленную к этому генетически. Избыточная инсоляция не только приводит к повреждению кератино- и меланоцитов, но и вызывает специфическую иммуносупрессию, связанную с нарушением функции естественных клеток-киллеров, что сопровождается повышенным риском развития меланомы.

Воздействие УФ-излучения является основным фактором окружающей среды, определяющим развитие меланомы кожи, за счет накопления нерепарированных соматических мутаций ДНК [19]. Кроме того, другие факторы риска, такие как пол, индивидуальный фототип кожи, возраст и хроническое или периодическое воздействие УФ-излучения, способствуют повышению риска развития меланомы [11]. В дополнение к этому, ультрафиолетовое излучение определяет возникновение мутаций в генах-супрессорах опухолей p53, и как следствие влечет за собой нарушение процессов регуляции апоптоза и иницирование рака кожи [27].

Хотя роль УФ в меланоме была спорной в течение многих лет, клеточные линии меланомы содержали УФ-подобные мутации в регуляторе клеточного

цикла *SKDN2*. Понимание причин наследственной меланомы привело к открытию роли нескольких ключевых генов, многие из которых также соматически мутированы при меланоме, включая *CDKN2A*, *TERT*, *MITF* и *PTEN* [29]. В настоящее время основными генетическими детерминантами риска являются мутации зародышевой линии в основных известных генах восприимчивости к высокому риску, *CDKN2A* и *CDK4*, а также варианты гена низкого риска *MC1R*, который является ключевым в процессе пигментации [17].

Известно, что на хромосоме 9p21 расположен наиболее часто инактивируемый ген-супрессор опухоли при меланоме – *CDKN2A*. Его инактивация может быть результатом возникающих мутаций, делеций или эпигенетических изменений, таких как гиперметилирование промотора [23]. Мутации зародышевой линии в гене-супрессоре *CDKN2A* являются наследственными генетическими факторами риска меланомы кожи. У носителей мутаций *CDKN2A* риск развития меланомы увеличивается более чем в 65 раз, а пенетрантность меланомы на протяжении жизни составляет от 60% до 90% [14; 22]. На сегодняшний день генетическое консультирование по меланоме кожи в основном сосредоточено на *CDKN2A* и *CDK4* генах. Использование данных секвенирования в клинической практике остается спорным из-за различия в оценках пенетрантности данных генов (28–91%) в зависимости от географического района, этнической принадлежности, УФ-облучения [9].

Ген *MC1R*, расположенный на хромосоме 16q24, связанный с G-белком, экспрессируется в меланоцитах и играет ключевую роль в пигментации кожи людей, проявляющих фенотип рыжих волос и повышенную предрасположенность к меланоме. Помимо своей роли в пигментации, *MC1R* все больше признается как способствующий репарации повреждений ДНК, вызванных УФ-излучением [21].

MC1R-зависимый ответ на УФ-излучение индуцирует множество генов, связанных с регуляцией клеточного цикла, онкогенезом [20; 26; 30]. Гиперактивация передачи сигналов по пути PI3K в первичных меланоцитах может приводить к усилению старения, при меланоме с мутациями *BRAF*^{V600E} полиморфизмы *MC1R*, могут способствовать онкогенной трансформации [12]. Важно отметить,

в недавних исследованиях было отмечено, что для носителей мутации *CDKN2A* и *MC1R* это двойной риск развития меланомы [15].

В связи с этим *целью* нашей работы является оптимизация протокола получения препаратов хромосомных пластинок клеточных линий меланоцитов для изучения генетической нестабильности генома на хромосомном уровне после УФ-облучения.

Материал и методы. Для культивирования гетерогенной клеточной линии меланоцитов и фибробластов использовали экспланты кожного локуса размерами 1,0 × 5,0 см. Для получения культуры фрагмент измельчали и помещали в стерильные чашки Петри. Далее вносили питательную среду, состоящую из RPMI-1640 (Панеко, Россия), 10% сыворотки эмбрионов телят (HyClone, США), гентамицин (Панеко, Россия) в концентрации 100 мкг/мл. Все инкубации клеточных культур следует проводить в увлажненном инкубаторе при 37°C и 10% CO₂.

В качестве источника ультрафиолетового излучения использована лампа с мощностью 36 Вт (Thermo Scientific, США). Излучателем в этом источнике служит электрическая дуга, возникающая в парах ртути низкого давления. Она испускает линейчатый спектр в ультрафиолетовой области, более 80% энергии которого приходится на длину волны 253,7 нм, данная длина волны по глубине воздействия соответствует влиянию на эпидермис кожи *in vivo*. УФ-облучение проводили в течение 30 сек, мощность, в пересчете на площадь облучаемой поверхности, составила 20 Дж/см². Цитогенетический анализ проводили перед посевом клеток и на 8-й день культивирования (через 1 сутки после облучения).

Цитогенетический анализ. Препараты метафазных хромосом были получены из клеточных линий 3-го пассажа, на котором отмечался высокий индекс пролиферации. Клетки инкубировали с колцемидом с конечной концентрацией 0,15 мкг/мл (Carbison scientific, Германия) в течение 80 минут при 37°C. Далее обрабатывали гипотоническим раствором 0,075м KCL и инкубировали на водяной бане при температуре +37°C. Материал фиксировали раствором 40 мл этанола 100% и 10 мл ледяной уксусной кислоты. Далее на подготовленные стекла, раскапывали суспензию фиксированных клеток. GTG-окрашивание проводилось

с использованием 0,25% Трипсин-ЭДТА (ПанкЭко, Россия) с последующим окрашиванием по Романовскому-Гимзе (Biovitrum, Россия). При анализе хромосом было просмотрено не менее 20 метафазных пластинок. Хромосомы анализировались с помощью микроскопа «Axio Lab.A1» (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения Ikaros Karyotyping System (Metasystems, Германия).

Результаты и обсуждение. Для успешного цитогенетического анализа хромосомных препаратов необходимо достаточное число метафазных пластинок с хорошей морфологией. Облучение 30 секунд позволило нам получить малое количество (менее 0,1% от всех клеток) метафазных пластинок тем не менее с приемлемой морфологией для анализа.

После УФ-облучения клеточных культур клеток кожи человека (меланоциты, фибробласты), в сравнении с контролем, нами был зафиксирован высокий уровень хромосомных aberrаций. Среди числовых и структурных нарушений – делеции, инверсии, моносомии и трисомии: моносомия по 8, 12, 18, 19 хромосоме; в том числе, делеция длинного плеча 4 хромосомы (del4q); трисомия 6 и 16 хромосомы; инверсия хромосомы 9 и 4 (inv9p; inv4q) (рис. 1).

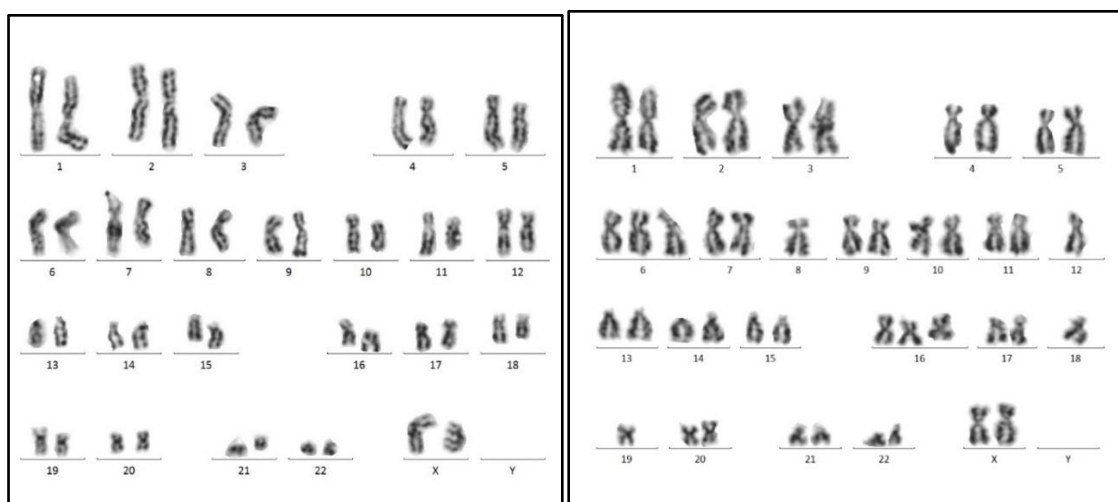


Рис. 1. Кариограмма клеток до и после УФ-облучения.

По данным литературы, малигнизированные новообразования имеют, как правило, околотрехплоидный или даже тетраплоидный набор хромосом с множественными численными и структурными повреждениями. Наиболее часто во-

влекаются хромосомы 1, 6, 7, 9, 10 и 11. Делеция длинного плеча 4-ой хромосомы, отмеченная нами, согласуется с литературными данными по аналогичным исследованиям культур меланоцитов кожи [2].

Установленная нами трисомия по 6-й хромосоме (6+) коррелирует с подобными случаями обнаружения численной абберации у пациентов с гистологическим заключением меланомы и эпидермальный невус. Трисомия по 6-й хромосоме ранее не рассматривалась как изолированная находка при эпидермальных невусах, а также отмечена корреляция трисомии по хромосомам 6 и 8 с увеличением риска развития меланомы. Цитогенетические исследования других авторов на культурах меланомы показали, что структурные изменения хромосомы 6 играют роль в процессах метастазирования [28]. Были также проведены эксперименты по созданию гибридных клеток меланомы, когда в клетки вводили одну нормальную копию хромосомы 6. Такие клетки при инъекции «nude» мышам не вызывали развитие опухоли, в то время как вновь утраченная хромосома 6 приводила к восстановлению злокачественного потенциала этих клеток.

Обнаруженная нами инверсия короткого плеча хромосомы 9 (inv9p) может являться причиной инактивации гена *CDKN2A*, расположенного в локусе 9p21. Потеря гетерозиготности в этом локусе обнаружена не только в тканях меланомы, но и в диспластических и даже в доброкачественных невусах. Это означает, что потерю гетерозиготности в этом локусе можно выявить даже в предполагаемых предраковых очагах, то есть до появления гистологических признаков опухоли. Кроме того, мутации этого гена характерны для семейной меланомы [2].

Следует отметить, что хромосома 9 достаточно часто вовлекается в перестройки при меланоме. При этом различные структурные перестройки встречаются гораздо чаще, чем отсутствие или появление добавочной хромосомы. Имеется мнение, что делеция 9p наиболее часто появляется именно в клетках этих опухолей. В коротком плече хромосомы 9 выявляются многочисленные микроделеции и точечные мутации. Конституционные мутации *CDKN2A* гена, расположенного в 9p, связаны с высоким риском развития меланомы. Возможно, что

несколько генов-супрессоров опухоли, которые могут быть вовлечены в образование меланобластомы, расположены в этом участке хромосомы [5]. Многие исследователи отмечают высокий процент уменьшения копийности хромосом 9 и 10. С большой частотой оба эти нарушения встречаются как при первичной, так и при метастатической меланоме. Причем потеря в области 9p чаще наблюдается в поверхностно распространяющихся меланомах, а утрата хромосомы 10 – в узловой. Кроме того, потеря гетерозиготности 8 или более микросателлитных маркеров, расположенных на 9p, является надежным прогностическим фактором в плане появления метастазов в ближайшие 4,4–6,3 года от начала заболевания.

Трисомия по 16 хромосоме обнаруженная нами при исследовании клеточных линий после УФ-облучения, может повлиять на экспрессию гена *MC1R*, расположенного в хромосоме 16q24, но данное предположение требует гистохимического подтверждения увеличения экспрессии меланина.

Таким образом, цитогенетический анализ культивируемых клеток меланом демонстрирует значительное число хромосомных изменений, позволяющих при определенных условиях прогнозировать их метастатический потенциал. Определение генетических локусов, ответственных за развитие злокачественных опухолей, таких как меланома кожи, с дальнейшим определением стратегии лечения.

Список литературы

1. Антонова Е.И. Клеточные линии меланоцитов и их биология при меланоме / Е.И. Антонова, С.А. Бармина, Е.С. Волкова [и др.] // Научное обозрение. – 2019. – №5. – С. 15–18.
2. Барышников А.Ю. Клеточные линии меланомы человека / А.Ю. Барышников, О.С. Бурова, Е.С. Воронина [и др.]; под общ. ред. И.Н. Михайловой, М.М. Давыдова. – СПб.: Научное издание, 2017. – 174 с. EDN ZQJXHT
3. Верле О.В. Влияние синхронизации клеточной культуры Vero на результаты цитотоксических тестов при изучении новых лекарственных препаратов / О.В. Верле, Е.В. Зыкова, О.В. Островский, В.Е. Веровский // Вестник ВолГМУ. – 2020. – №1 (73). – С. 34–37. DOI 10.19163/1994-9480-2020-1(73)-34-37. EDN TGGXUI

4. Дмитренко Д.В. Цитогенетика: клинический случай диагностики новой неклассифицируемой хромосомной мутации / Д.В. Дмитренко, Е.А. Шаповалова, Н.А. Шнайдер // Вестник Клинической больницы. – 2010. – №51 (11). – С. 51–57.

5. Колюбаева С.Н. Гетерогенность хромосомных аномалий в культивируемых клетках меланомы кожи человека / С.Н. Колюбаева, А.Б. Данилова, И.А. Балдуева [и др.] // Вопросы онкологии. – 2014. – №5 (60). – С. 596–601. EDN SXTEQJ

6. Мельникова Е.В. Современные подходы к проведению оценки качества препаратов для клеточной терапии / Е.В. Мельникова, О.В. Меркулова, О.А. Рачинская [и др.] // Биофармацевтический журнал. – 2016. – №8 (4). – С. 35–46. EDN USWJSF

7. Нероев В.В. Факторы риска экстрабульбарного роста после локального лечения увеальной меланомы / В.В. Нероев, С.В. Саакян, А.Г. Амирян [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2011. – №2 (128). – С. 68–70.

8. Сабурин И.Н. 3D культура меланоцитов как тест-система и клеточная модель для изучения патологии меланогенеза / И.Н. Сабурин, Е.В. Джуссоева, А.А. Горкун [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – Т. 62. №4. – С. 265–268. DOI 10.25557/0031-2991.2018.04.265-268. EDN VOHDHW

9. Aspinwall L.G. Unaffected family members report improvements in daily routine sun protection 2 years following melanoma genetic testing / L.G. Aspinwall, J.M. Taber, W. Kohlmann // Genetics Medical. – 2014. – №16. – P. 846–853.

10. Bennett D.C. Genetics of melanoma progression: the rise and fall of cell senescence / D.C. Bennett // Pigment Cell Melanoma Res. – 2016. – №29 (2). – P. 122–140. DOI 10.1111/pcmr.12422. EDN WVDLLV

11. Bobos M. Histopathological classification and prognostic factors of melanoma: update 2021 / M. Bobos // Dermatol. Venerol. – 2021. – №156. – P. 300–321.

12. Cao J. MC1R is a potent regulator of PTEN after UV exposure in melanocytes / J. Cao, L. Wan, E. Hacker, et al. // *Molecular cell*. – 2013. – vol. 51 (4). – P. 409–422.

13. Cherepakhin O.S. Genomic and transcriptomic underpinnings of melanoma genesis, progression, and metastasis / O.S. Cherepakhin, Z.B. Argenyi, A.S. Moshiri // *Cancers (Basel)*. – 2021. – 14 (1) 123. 123. doi: 10.3390/cancers14010123. EDN WDCEWA

14. Demenais F. Association of MC1R variants and host phenotypes with melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenoMEL study / F. Demenais, H. Mohammadi, V. Chaudru [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2010. – 102 (20). P. 1568–1583. DOI 10.1093/jnci/djq363. EDN NYUCVT

15. Fargnoli M. MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: a meta-analysis / M. Fargnoli, S. Gandini, K. Peris, et al. // *Eur.J.Cancer*. – 2010. – №46. – P.1413–1420.

16. Gerami P. A highly specific and discriminatory FISH assay for distinguishing between benign and malignant melanocytic neoplasms / P. Gerami, G. Li, B. Blondin [et al.] // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2012. – Vol. 36 (6). – P. 808–817. DOI 10.1097/PAS.0b013e31824b1efd. EDN PGMKTH

17. Ghiorzo P. MC1R variation and melanoma risk in relation to host/clinical and environmental factors in CDKN2A positive and negative melanoma patients / P. Ghiorzo, L. Bonelli, L. Pastorino // *Experimental dermatology*. – 2012. – №21 (9). – P. 718–720.

18. Godwin L.S. Isolation, culture, and transfection of melanocytes / L.S. Godwin, J.T. Castle, J.S. Kohli [et al.] // *Curr. Protoc. Cell Biol.* – 2014. – 63:1.8. – P. 1–20.

19. Guhan S. Melanoma genomics: a modern review of practical clinical applications / S. Guhan, N. Klebanov, H. Cao // *Dermatol.* – 2021. – 185. P. 272–281.

20. Guida S. Sporadic melanoma in Southeastern Italy: the effect of melanocortin 1 receptor polymorphism (MC1R) analysis on low-risk individuals and a report on

three new variants of Arch / S. Guida, N. Bartolomeo, P.T. Zana [et al.] // *Dermatol. Res.* – 2015. – 307. – P. 495–503. DOI 10.1007/s00403-015-1552-4. EDN UTZHZN

21. Guida S. MC1R functions, expression, and implications for targeted therapy / S. Guida, G. Guida, C.R. Goding // *J. Invest. Dermatol.* – 2022. – №142 (2). – P. 293–302.

22. Helgadottir H. High risk of tobacco-related cancer in families with melanoma positive for CDKN2A mutation / H. Helgadottir, V. Höiom, G. Jönsson // *J. Med. Genet.* – 2014. – 51 (8). – P. 545–552.

23. Kreuger I. Therapeutic strategies for targeting CDKN2A loss in melanoma / I. Kreuger, R.C. Sliker, T. van Groningen, R. van Doorn // *J. Invest. Dermatol.* – 2023. – №143 (1). – P. 18–25.

24. Le L. Melanosome biogenesis in the pigmentation of mammalian skin / L. Le, J. Sires-Campos, G. Raposo [et al.] // *Integr. Comp. Biol.* – 2021. – №61 (4). – P. 1517–1545. DOI 10.1093/icb/icab078. EDN VABRYJ

25. Ly D.V. Lipid producing ciliochoroidal melanoma with expression of HMGCoA reductase / D.V. Ly, D. Wang, R. Conway [et al.] // *Ocul. Oncol. Path.* – 2020. – №6 (6). P. 416–421.

26. Manganelli M. Behind the Scenes: Using MC1R to reduce risk and prevent skin cancer genes / M. Manganelli, S. Hyde, A. Ferrite [et al.] // *Genes (Basel)*. – 2021. – №12. – P. 1093.

27. Narayanan D.L. Ultraviolet radiation and skin cancer / D.L. Narayanan, R.N. Saladi, J.L. Fox // *Int. J. Dermatol.* – 2010. – 9. – P. 978–986.

28. North J.P. Assessment of copy number status of chromosome 6 and 11 by FISH provides independent prognostic information in primary melanoma / J.P. North, J.T. Vetto, R. Murali [et al.] // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2011. – Vol. 35 (8). – P. 1146–1150.

29. Reddy B. Somatic leading mutations in melanoma / B. Reddy, D.M. Miller, H. Cao // *Cancer*. – 2017. – №123 (S11). – P. 2104–2117.

30. Yin K. MC1R and NR4A receptors in cellular stress and DNA repair: implications for UVR protection / K. Yin, R.A. Sturm, A.G. Smith // *Experim. Dermatol.* – 2014. – Vol. 23 (7). – P. 449–452.