

Рашитова Софья Денисовна

бакалавр, лаборант-исследователь

Савельева Виктория Алексеевна

лаборант-исследователь

Зимнуров Айдар Раилевич

лаборант-исследователь, бакалавр

Фирсова Наталья Викторовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

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-111562

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ
СОКУЛЬТУРЫ ДЕРМАЛЬНЫХ МЕЛАНОЦИТОВ И ФИБРОБЛАСТОВ
КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ УФО В АСПЕКТЕ ИЗУЧЕНИЯ
ОНКОГЕНЕЗА МЕЛАНОМЫ**

Аннотация: хромосомные аберрации (ХА) являются одним из наиболее чувствительных биомаркеров, используемых для выявления ранних биологических эффектов действия ультрафиолетового облучения (УФО) на организм человека. В этой связи сопоставление цитогенетических показателей клеточных линий фибробластов/меланоцитов, подвергшихся действию УФО, представляется весьма перспективным для понимания роли вклада генотоксического действия УФО в онкогенезе меланомы. Анализ ХА проведен на клеточных линиях фибробластов/меланоцитов. Показано увеличение частоты УФО-индуцируемых ХА таких как: моносомия по 3,4,8,10,12,13,18 хромосомам; трисомия по

8,16 хромосомам; *del(4)(q28.1-q35.2),del(9)(p21.3-p22.3),del(15)(q24.1-q26.3);dic(4)(q28.3);dfr(6)(q22.1-q27).*

Ключевые слова: меланома, клеточные линии клеток фибробластов/меланоцитов, цитогенетический анализ, УФ-облучение, хромосомные aberrации.

Одним из основных пусковых механизмов, лежащих в основе роста заболеваемости меланомой, считается произошедшее за последнее время увеличение суммарного времени воздействия ультрафиолетовой части спектра естественного солнечного света на кожу человека. Избыточная инсоляция не только приводит к повреждению кератино- и меланоцитов, но и вызывает генетические нарушения. Нестабильность генома в клеточных культурах кожи человека после УФО свидетельствует об образовании микроядер, увеличении сестринского обмена хроматидами и хромосомной нестабильности [5]. УФО-индуцируемые ХА являются одним из наиболее чувствительных биомаркеров, используемых для выявления биологических эффектов действия УФО на организм человека. В следствии чего, хромосомная нестабильность может играть важную роль на ранних стадиях онкогенеза меланомы [3].

В связи с этим целью нашей работы является анализ цитогенетических изменений в аспекте изучения ранних этапов онкогенеза меланомы на модельной системе сокультуры дермальных меланоцитов и фибробластов кожи человека после УФО.

Материалы и методы. Для получения первичной культуры использовали экспланты кожного лоскута размерами около 1,0×5,0 см, иссеченные из области груди (ареола) с информированного согласия пациента во время проведения планового хирургического вмешательства. Протокол исследования одобрен локальным комитетом по этике многопрофильной больницы «ВМ-клиник» города Ульяновска (протокол №22 от 11.02.2024). Культивирование фибробластов/меланоцитов выполнялось в условиях лаборатории клеточных технологий НИЦ ФППББ УлГПУ им. И.Н. Ульянова. Для получения первичных культур использовали ме-

тод механической дезагрегации (метод эксплантатов), описанный ранее [2]. Протокол культивирования и использованные реактивы описаны подробно ранее [1]. Для работы использованы клеточные линии четвертого, пятого и шестого пассажей.

Перед облучением производили замену ростовой среды на DPBS с последующей заменой сразу после облучения на свежую питательную среду. В качестве источника УФО использована лампа с мощностью 36 Вт, излучателем в которой служит электрическая дуга, возникающая в парах ртути низкого давления (Thermo Scientific, США), которая испускает линейчатый спектр в ультрафиолетовой области, более 80% энергии которого приходится на короткую длину волны 253,7 нм (УФ-С). Мощность излучения контролировалась аппаратом люксметр+УФ-радиометром (ТКА, Россия) и составляла 1,2 мДж/см². Эксперимент проводили в две повторности по восемь культуральных флаконов в каждой с заселением клеточных линий в количестве 2×10^5 кл/мл в чашки Петри, на дне которых размещены покровные стекла с полилизинным покрытием.

Цитогенетический анализ. Препараты метафазных хромосом были получены из клеточных линий 4, 5 и 6-го пассажей. После добавления в полученную суспензию клеток раствора колцемида (0,5 мкг/мл) проводили инкубацию в термостатической камере Shaking Incubator (LabTech, Корея) в условиях 37°C, 100 об/мин. С целью гипотонии использовали 0,075М КСl при 37°C и осуществляли несколько промывок фиксирующим раствором Карнуа (смесь метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1). Полученную суспензию клеток раскапывали на предварительно охлажденные предметные стекла. Дифференциальное окрашивание хромосом проводили методом GTG (G-бэндинг) после предварительной обработки хромосомных препаратов 0,25% Трипсин-ЭДТА (ПанЭко, США) с последующей окраской по Романовскому- Гимзе согласно традиционной методике [4]. При анализе дифференциально окрашенных хромосом было просмотрено не менее 20 метафазных пластинок, с помощью микроскопа «Axio Lab.A1» (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения Ikaros Karyotyping System (Metasystems, Германия).

Сформированы 6 групп клеточных линий фибробластов/меланоцитов: *Cul4P/5P/6P* – клеточные линии четвертого/пятого/шестого пассажа без облучения (контроль), *Cul4PUV/5PUV/6PUV* – клеточные линии четвертого/пятого/шестого пассажа с УФО.

Результаты и их обсуждение. Нами отмечено, что УФО вызывает индуцируемую нестабильность генома на хромосомном уровне. В группе *Cul4PUV* и *Cul6PUV* процент встречаемости хромосомных aberrаций схож и составляет 80%. Тогда как в группе *Cul5PUV* во всех 5 просмотренных метафазных пластинках обнаружены хромосомные нарушения. В контрольных группах хромосомных аномалий не выявлено (рис. 1А).

Разброс геномных мутаций в трех пассажах представлен на рисунке 1Б. Следует отметить, что коэффициент варируемости показателей в группах *Cul4PUV* и *Cul6PUV* составляет 1,97 и 1,85, соответственно, а в группе *Cul5PUV* он соответствует максимально равномерному распространению и равен 4,29.

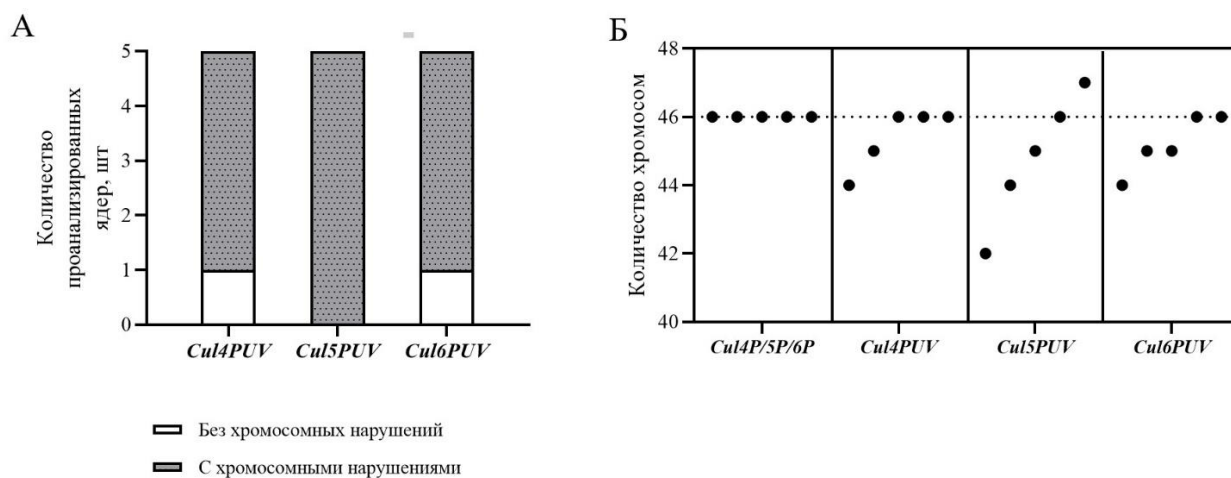


Рис. 1. Встречаемость хромосомных aberrаций среди проанализированных ядер (А) и разброс геномных мутаций (Б) в *Cul4PUV*, *Cul5PUV*, *Cul6PUV*

Выявлены хромосомные aberrации в трех пассажах (группах) с экспозицией УФО в 30 сек – *Cul4PUV*, *Cul5PUV*, *Cul6PUV*. Обнаружено: моносомия по 3,4,8,10,12,13,18 хромосомам; трисомия по 8,16 хромосомам; делеция нижних плеч 4 хромосомы ($\text{del}(4)(\text{q}28.1\text{-q}35.2)$), верхних плеч 9 хромосомы ($\text{del}(9)(\text{p}21.3\text{-p}22.3)$) и нижнего плеча 15 хромосомы ($\text{del}(15)(\text{q}24.1\text{-q}26.3)$); дицентрическая 4

хромосома (dic(4)(q28.3)); разрыв в области 6 хромосомы в виде парного фрагмента (dfr(6)(q22.1-q27)). Встречаемость нарушений в экспериментальных группах представлена на рисунке 2.

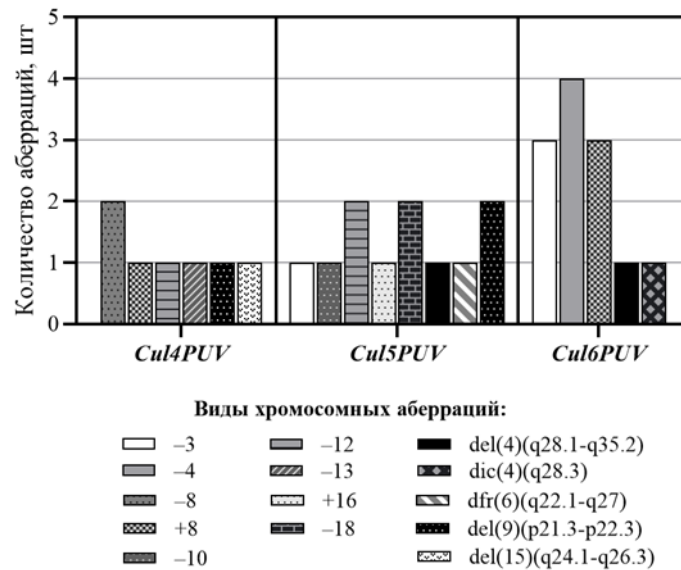


Рис. 2. Виды хромосомных aberrаций по группам – *Cul4PUV*, *Cul5PUV*, *Cul6PUV*

Нами отмечено, что по мере культивирования происходит сохранение и увеличение частоты встречаемости некоторых мутаций. Так, в частности, встречаемость трисомии по 8 хромосоме и моносомии по 3 увеличивается в 3 раза от 4 к 6 пассажу и от 5 к 6 пассажу, соответственно. Кроме этого с 4 по 5 пассаж в 2 раза увеличилась частота встречаемости моносомии по 12 хромосоме и делеции по 9 хромосоме в области p21.3-p22.3. Моносомия по 4 хромосоме с высокой частотой встречаемости обнаруживается только на 6 пассаже.

При сравнительном анализе частоты встречаемости хромосомных и геномных мутаций (табл.1) в 3 экспериментальных группах нами отмечено, что по мере увеличения пассирования клеточных культур увеличивается частота геномных мутаций с 5 в группе *Cul4PUV* до 10 в группе *Cul6PUV*. В частности, встречаемость моносомии увеличивается с 4 в группе *Cul4PUV* до 7 в группе *Cul6PUV*. Встречаемость хромосомных мутаций практически не коррелировала с группой пассажа. Следует отметить, что на 5 пассаже нами обнаружено наибольшее количество ХА.

Таким образом, цитогенетический анализ модельной системы сокультуры дермальных меланоцитов и фибробластов кожи человека после УФО продемонстрировал выраженную нестабильность генома на хромосомном уровне.

Таблица 1

Частота встречаемости хромосомных и геномных типов мутаций в 3 группах

Показатель	Группы		
	<i>Cul4PUV</i> n = 5	<i>Cul5PUV</i> n = 5	<i>Cul6PUV</i> n = 5
Хромосомный тип мутаций:			
- делеция;	2	3 ¹	1
- парные фрагменты;	0	1	0
- дицентрические хромосомы	0	0	1
- всего aberrаций хромосомного типа	2	4 ¹	2
Геномный тип мутаций:			
- моносомия;	4 ¹	6 ² 3	7 ⁴
- трисомия;	1	1	3
- всего aberrаций геномного типа	5 ¹	7 ² 3	10 ⁴

Примечание: ¹ – одна из пяти метафазных пластинок имеет два типа мутаций, ² – одна из пяти метафазных пластинок имеет два типа мутаций, ³ – одна из пяти метафазных пластинок имеет три типа мутаций, ⁴ – три из пяти метафазных пластинок имеет два типа мутаций

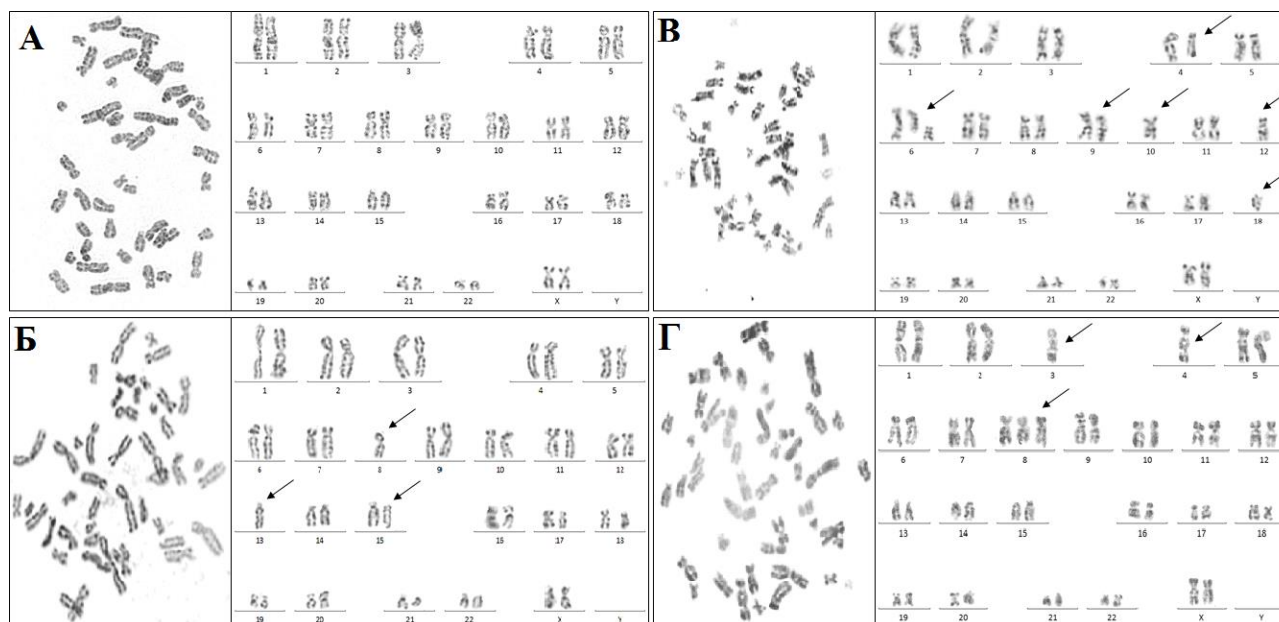


Рис. 3. А-контрольная группа *Cul4P*; Б-группа *Cul4PUV* через 24 часа после УФО; В-группа *Cul5PUV* через 24 часа после УФО; Г-группа *Cul6PUV* через 24 часа после УФО

Стрелками указаны ХА.

Исследования выполнены за счет субсидий из федерального бюджета Министерства просвещения РФ на финансовое обеспечение выполнения государственного задания №073-00037-2302 от 31.07.2023 г (регистрационный номер 1023012300024-4-1.6.4).

Список литературы

1. Антонова Е.И. Повышение эффективности культивирования сокультуры дермальных фибробластов/меланоцитов за счет внесения кластера витаминных добавок (в аспекте разработки эквивалента кожи) / Е.И. Антонова, Н.В. Фирсова, Н.А. Ленгесова [и др.] // Тенденции развития науки и образования. 2024. – №105–9. – С. 91–97. DOI 10.18411/trnio-01-2024-446. EDN ХКХПВ

2. Киямова М.Р. Оптимизация протоколов выделения и культивирования клеток различных топографических участков кожи человека / М.Р. Киямова, Е.И. Антонова, Н.В. Фирсова [и др.] // Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии: сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Ульяновск, 20 мая 2022 года) / гл. ред. Е.И. Антонова. – Чебоксары: Среда, 2022. – С. 107–116. – DOI 10.31483/r-102248. – EDN AQNOJW.

3. Carrier A. DNA methylation combined with chromosome cluster-oriented analysis provides an early signature for cutaneous melanoma aggressiveness. / A. Carrier, C. Desjobert, L. Ponger [et al.] // Elife. – 2022. – 20 (11).78587. DOI: 10.7554/eLife.78587. EDN SFNDRC

4. Ozkinay C. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes / C. Ozkinay, F. Mitelman // Hereditas. 1979. 90:1 – 4.

5. Timar J. Molecular pathology of skin melanoma: epidemiology, differential diagnostics, prognosis and therapy prediction / J. Timar // International journal of molecular sciences. 2022. 23 (10).5384. DOI: 10.3390/ijms23105384. EDN BDXIRS