

**Фирсова Наталья Викторовна**

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

**Савельева Виктория Алексеевна**

лаборант-исследователь

**Ачилов Атабег Батырович**

магистрант, младший научный сотрудник

**Антонова Елена Ивановна**

д-р биол. наук, профессор, директор

**Ленгесова Наталья Анатольевна**

канд. биол. наук, доцент, заведующая кафедрой,

старший научный сотрудник

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-111738

## **ИММУНОФЕНОТИП КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ КОЖИ**

### **ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ УФО**

**Аннотация:** в статье приводятся данные иммунофенотипа клеток кожи человека 5-го пассажа с использованием поверхностных маркеров дифференцировки клеток при однократном воздействии УФО. Отмечено УФО-индуцируемое снижение доли низкодифференцированных фибробластов (иммунофенотип  $CD117^-/CD90^+$ ), зрелых дифференцированных меланоцитов (иммунофенотип  $CD117^+/CD90^-$ ) и увеличение популяции малодифференцированных клеток (иммунофенотип  $CD117^+/CD90^+$ ).

**Ключевые слова:** культура клеток кожи, иммунофенотип, поверхностные маркеры дифференцировки, УФО.

Иммунофенотипирование клеток кожи методом проточной цитофлуориметрии для анализа маркеров клеточной поверхности с определением цитотипа клеточных дифферонов является признанным во всем мире «золотым стандартом» в области определения поверхностных маркёров и, соответственно, принадлежности клеток к той или иной субпопуляции. Метод, основанный на реакции антител с антигенами и применяется для определения специфических типов клеток *in vivo* и *in vitro*. Иммунофенотипирование с использованием метода проточной цитометрии имеет преимущества перед другими методами за счет большей точности, скорости, возможности одновременной регистрации нескольких антигенов на одной клетке.

Учитывая, что популяция меланоцитов кожи человека гетерогенна, поэтому идентификация и дифференциальная характеристика различных популяций меланоцитов важна с позиции анализа клеточного гомеостаза популяции меланоцитарного дифферона. Для определения уровня дифференцировки клеток меланоцитарного и фибробластического дифферона используется комбинация маркеров CD90 и CD117 (c-Kit) [3]. Так, в частности, с позиции функциональной характеристики клеток для определения малодифференцированной популяции клеток нервного гребня используется маркер CD90. Безамелотические клетки CD117<sup>-</sup>/CD90<sup>+</sup>, которые относят к меланобластам, демонстрируют высокий уровень пролиферативной активности и представляют собой «резервуар клеток-предшественников» не только меланоцитов кожи, а также могут дифференцироваться в другие клеточные линии [2]. Michalak-Micka с соавторами по степени экспрессии гена c-Kit (CD117), кодирующего трансмембранный тирозинкиназный рецептор, который участвует в сигнальных путях МАР и АКТ, идентифицировали зрелую популяцию меланоцитов [7]. CD117 рассматривался как один из ключевых маркеров пигментированных, зрелых дифференцированных меланоцитов эпидермиса человека. Данная группа меланоцитов представляет собой популяцию клеток с характерным дендритным фенотипом и большим количеством меланина в цитоплазме.

В тоже время в более ранних работах показано, что CD117 играет критическую роль в миграции, пролиферации и выживаемости меланобластов [8]. Меланоциты CD117<sup>+</sup>/CD90<sup>-</sup> характеризуются самым большим количеством меланина; CD117<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup> клетки – со средним уровнем содержания меланина; клетки CD117<sup>-</sup>/CD90<sup>+</sup> практически не продуцировали меланин.

Было показано, что взаимодействие фактора стволовых клеток (SCF) с рецептором CD117 важно для выживания, пролиферации, дифференцировки и миграции меланоцитов по дорсолатеральному пути [4, 6, 9]. Однако до сих пор мало известно о влиянии передачи сигналов CD117 на меланоциты в постнатальной коже человека. Транскриптомный анализ показал, что ключевые гены, кодирующие меланосомальные белки, такие как HMB45, PMEL17, TYR и TYRP1, экспрессируются на значительно более высоких уровнях в меланоцитах CD117<sup>+</sup>/CD90<sup>-</sup>, чем в клетках CD117<sup>-</sup>/CD90<sup>+</sup>. Кроме того, показано, что гены, кодирующие белки, которые участвуют в транспорте меланосомных ионов, такие как *SLC45A2* и *SLC24A5*, активны в популяции меланоцитов, экспрессирующих CD117. Эти данные подтверждают способность клеток CD117<sup>+</sup>/CD90<sup>-</sup> продуцировать меланин и в конечном итоге передавать его адъюнктивным кератиноцитам. Более того, уровни экспрессии генов *EDNRB* и *MC1R*, которые играют большую роль для развития и дифференцировки меланоцитов и их правильного меланогенеза также повышаются в CD117<sup>+</sup>/CD90<sup>-</sup> меланоцитах.

Показано, что клетки с иммунофенотипом CD117<sup>-</sup>/CD90<sup>+</sup>, которые обладают высокой пролиферативной активностью *in vitro*, экспрессируют белки MITF, SOX10 и TYRP2. Интересно, что клетки первичной культуры с иммунофенотипом CD117<sup>-</sup>/CD90<sup>+</sup> демонстрируют значительно повышенную экспрессию гена *MITF-M* по сравнению с другими подгруппами меланоцитов. Экспрессия гена мРНК *MITF* в меланоцитах регулируется различными факторами транскрипции, включая PAX3, SOX10, CREB и LEF. Петля положительной обратной связи MITF на собственном промоторе приводит к увеличению продукции мРНК *MITF*. Следовательно, в клетках CD117<sup>-</sup>/CD90<sup>+</sup> отсутствует экспрессия нижесто-

ящих мишней MITF, таких как TYR и TRP-1. Из-за отсутствия этих необходимых ферментов/белков клетки CD117<sup>-</sup>/CD90<sup>+</sup> не способны синтезировать меланин [5].

Ультрафиолетовое облучение (УФО) как экзогенный фактор оказывает широкий дозозависимый спектр воздействия и вызывает системные изменения организма на клеточном, тканевом и органном уровне [10]. Хроническое воздействие УФ излучения вызывает фотостарение, иммуносупрессию, генетические мутации, а также способствует развитию меланомы кожи. В онкогенезе меланомы, которая в большей части локализуется на участках кожи с хронической инсоляцией, отмечается широкий спектр мутаций в генах с последующим нарушением меланогенеза. В клетках меланомы нестабильность генома на хромосомном уровне, более чем у 95% представлена дупликациями или делециями участков хромосом [1]. Коротковолновое УФО (УФ-С) оказывает наиболее выраженное мутагенное действие, так как этот спектр лучей совпадает со спектром поглощения нуклеиновых кислот [10]. В связи с тем что УФО оказывает прямое мутагенное воздействие на ДНК, отмечается развитие меланомы как через малигнизацию существующих невусов, так и через трансформацию меланоцитов кожи *de novo* с последующим метастазированием.

В связи с этим целью данной работы является анализ иммунофенотипа клеток кожи человека 5-го пассажа с использованием поверхностных маркеров дифференцировки клеток при однократном воздействии УФО.

*Материалы и методы.* Для получения первичной культуры клеток использованы экспланты кожного биоптата, иссеченные из области груди (область ареола) после проведения пластической хирургии в Многопрофильной больнице «ВМ-клиник» города Ульяновска. Все манипуляции с фрагментами кожи и клеточным материалом проводились в асептических условиях ламинарного бокса MSC Advantage (Thermo Scientific, США) и боксированном помещении класса чистоты B. В качестве полных питательных сред использована RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с содержанием 15% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС)

(ПанЭко, Россия). Формирование монослоя контролировали визуально на инвертированном микроскопе «Axio Vert. A1» (Zeiss, Германия).

Иммунофенотип клеток кожи человека определяли по экспрессии меток CD117<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>/CD90<sup>-</sup> и CD117<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup> с определением доли малодифференцированных клеток по отношению к зрелой популяции. Данный анализ проводили на мультилазерной диагностической системе проточной цитофлуориметрии CyFlowSpace (Partec, Германия), сопряженной с программным обеспечением FlowMax того же производителя. Использованы моноклональные антитела к проточной цитофлуориметрии CD90 и cKit (CD117) (Beckman Coulter, США).

*Результаты и их обсуждение.* Клеточная линия клеток кожи человека 5-го пассажа представляет собой сокультуру фибробластов и меланоцитов, с характерным морфотипом для каждого цитотипа. В зависимости от уровня зрелости отмечается полиморфность клеточных популяций. Так, фибробласти и малодифференцированные меланоциты представляют собой вытянутые веретеновидные клетки небольшого размера (рис. 1 «1»). Клетки с более высоким уровнем дифференцировки большего размера с несколькими отростками (рис. 1 «2»), а зрелые дифференцированные меланоциты – плащевидной формы с несколькими отростками и крупным ядром (рис. 1 «3»).

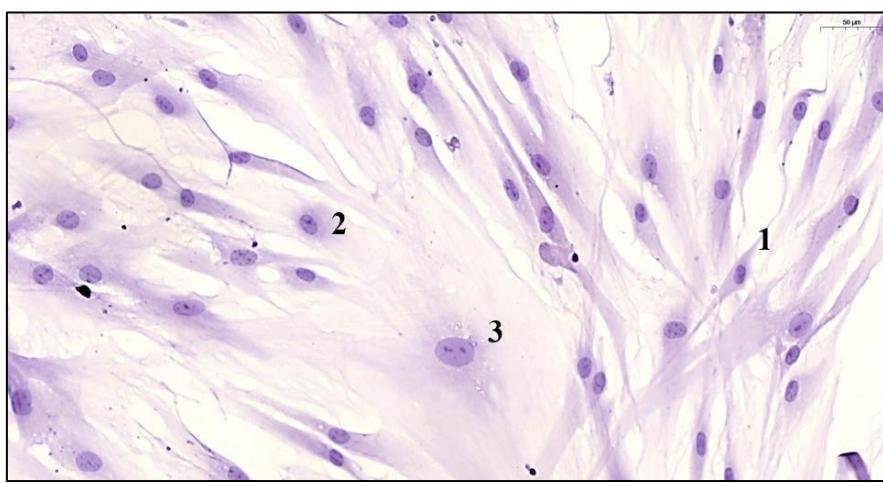


Рис. 1. Клеточная линия (группа *Cul5P*). Окраска гематоксилином и эозином

В результате исследования иммунофенотипа клеточной линии 5 пассажа выявлено, что в группе *Cul5PUV* количество клеток с иммунофенотипом CD117<sup>-</sup>

$/CD90^+$  составляет 18% от общей популяции, что на 25% меньше показателя контрольной группы *Cul5P*. В случае с количеством клеток с иммунофенотипом  $CD117^+/CD90^+$  отмечается обратная тенденция – в группе *Cul5PUV* данная популяция клеток составляет 70%, что на 26% больше в сравнении с контрольной группой (52%). Количество клеток с иммунофенотипом  $CD117^+/CD90^-$  в группе *Cul5PUV* (5%) почти в 2 раза меньше, чем в контрольной группе (11%) (рис. 2).

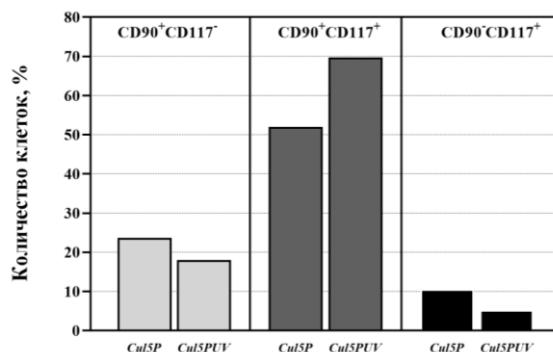


Рис. 2. Иммунофенотип поверхностных маркеров дифференцировки клеточной линии клеток кожи человека

Проведенное нами двойного окрашивания с применением маркера ранней дифференцировки клеток кожи CD117 позволяет исключить отнесение клеток с фенотипом  $CD90^+$  к популяции клеток  $CD117^+/CD90^+$ , которые характеризуются более высоким уровнем дифференцировки [2].

Полученные в нашей работе результаты иммунофенотипирования популяции меланоцитов  $CD117^+/CD90^+$  и  $CD117^+/CD90^-$  демонстрируют высокий процент содержания данной популяции клеток в культуре клеток 5-го пассажа (около 63%) после УФО до 75%. Поскольку самая многочисленная популяция клеток исследуемой клеточной линии с иммунофенотипом  $CD117^+/CD90^+$  можно сделать вывод, что основными клетками исследуемой сокультуры являются клетки меланоцитарного дифферона, а именно меланоциты со средней степенью дифференцировки, тогда как доля высокодифференцированных зрелых клеток с иммунофенотипом  $CD117^+/CD90^-$  составляет лишь 11% в контроле и 5% после УФО.

Таким образом, полученные данные отражают УФО-индуцируемое снижение доли малодифференцированных фибробластов и зрелых дифференцированных меланоцитов. Кроме этого, выявленное преобладание популяции малодифференцированных клеток (52%) на 5-ом пассаже отражает высокий биологический потенциал данной клеточной линии и дает основание рассматривать 5-й пассаж в качестве оптимального для дальнейших исследований.

*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).*

### **References**

1. Carrier A., Desjobert C., Ponger L. [et al.] DNA methylome combined with chromosome cluster-oriented analysis provides an early signature for cutaneous melanoma aggressiveness. *eLife*. 2022. 20 (11). 78587.
2. Cui Y.-Z., Xiao-Yong Man X. Biology of melanocytes in mammals. Morphogenesis and Patterning. *Front. Cell Dev. Biol.* 2023 Sec. Vol. 11. 2023.
3. Duan Y., Luo X., Zhao S. [et al.] c-KIT and CD90 are useful markers for predicting prognosis in patients with melanoma. *Oncol Let.* 2019. 17 (3). P. 2598–2606.
4. Grichnik J.M., Burch J.A., Burchette J., Shea C.R. The SCF/KIT pathway plays a critical role in the control of normal human melanocyte homeostasis. *Journal of Investigative Dermatology*. Vol. 111 (2). 1998. P. 233–238.
5. Jack Longley B., Carter E.L. SCF-KIT pathway in human epidermal melanocyte homeostasis. *Journal of Investigative Dermatology*. Vol. 113 (1). 1999. P. 139.
6. Megan Lyle, Georgina V. Long Diagnosis and treatment of KIT-mutant metastatic melanoma. *Case Reports. J Clin Oncol.* 2013 Sep 10; 31 (26) : 3176–81.
7. Michalak-Micka K., Buchler V.L., Zapiorkowska-Blumer N. [et al.] Characterization of a melanocyte progenitor population in human interfollicular epidermis. *Cell reports*. 2022. 38 (9). 110419. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110419>. EDN: KKWWUZ

8. Nishikawa S., Kusakabe M., Yoshinaga K. [et al.]. In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *EMBO J.* 1991; 10: 2111–2118.
9. Radu A., Bejenaru C., Tolea I. [et al.]. Immunohistochemical study of CD117 in various cutaneous melanocytic lesions. *Exp Ther Med.* 2021; 21 (1): 78.
10. Welch D., Muro M.A., Buonanno M., Brenner D.J. Wavelength-dependent DNA photodamage in a 3-D human skin model over the far-UVC and germicidal UVC wavelength ranges from 215 to 255 nm. *Photochem and Photobiol.* 2022; 98 (5):1167–1171. <https://doi.org/10.1111/php.13602>. EDN: ZQVNKM