

УДК 61:57.085.23

КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ МЕЛАНОЦИТОВ И ИХ БИОЛОГИЯ ПРИ МЕЛАНОМЕ

Антонова Е.И., Бармина С.А., Волкова Е.С., Костина О.М.

ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова», Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии, Ульяновск, e-mail: barmina.lana@inbox.ru

В работе представлен анализ результатов исследований по изучению биологии клеточных линий эпидермальных меланоцитов человека – отростчатых пигментных клеток кожи, которые имеют неврогенное происхождение, на предмет проявления свойств онкогенности и оптимизации протоколов ведения клеточных линий меланоцитов *in vitro*, выделенных из биопсийного материала пациентов с диагнозом меланома кожи – одной из наиболее агрессивных злокачественных опухолей в онкодерматологии. Применение метода культур клеток *in vitro* и метода световой микроскопии позволило нам изучить биологию онкогенных меланоцитов, а так же оптимизировать протокол культивирования на основе данных о состоянии культур в различные временные промежутки эксперимента. В ходе эксперимента производилось изучение как цитологических характеристик каждой линии: расположение и количество клеток, образование комплексов, размеры и формы клеток, форма и размеры ядра, ядерно-цитоплазматическое соотношение, количество и форма ядрышек, наличие митозов, так и их жизнеспособность. Результаты исследований биологии опухолеродных меланоцитов и возможность их выращивания вне живого организма способны помочь в развитии методов ранней диагностики и в поиске методов лечения злокачественных новообразований меланоцитарной природы.

Ключевые слова: меланоциты, меланома кожи, клеточные культуры

CELL LINES OF MELANOCYTES AND MELANOMA BIOLOGY

Antonova E.I., Barmina S.A., Volkova E.S., Kostina O.M.

Ulyanovsk state pedagogical university named after I.N. Ulyanov, Ulyanovsk, e-mail: barmina.lana@inbox.ru

The article presents an analysis of the results of studies on the biology of cell lines of human epidermal melanocytes – pigmented skin cells of neurogenic origin, for the manifestation of the properties of oncogenicity and optimization of protocols for the management of cell lines of melanocytes *in vitro* isolated from the biopsy material of patients diagnosed with skin melanoma – one of the most aggressive malignant tumors in oncodermatology. The application of the *in vitro* cell culture method and the light microscopy method allowed us to study the biology of oncogenic melanocytes, as well as to optimize the cultivation Protocol (based on the data on the state of the cultures in different periods of the experiment). During the experiment, the study was carried out as cytological parameters of each line: the location and number of cells, the formation of complexes, the size and shape of cells, the shape and size of the nucleus, the nuclear-cytoplasmic ratio, the number and shape of nucleoli, the presence of mitoses, and their viability. The results of studies of the biology of tumor-bearing melanocytes and the possibility of their cultivation outside the living organism can help in the development of methods of early diagnosis and search for methods of treatment of malignant tumors of melanocytic nature.

Keywords: melanocytes, skin melanoma, cell cultures

Меланоциты – гетерогенная группа клеток, развивающаяся из мультипотентных клеток нейроэктодермального гребня [1].

Меланоциты кожи – отростчатые пигментные клетки неврогенного происхождения, локализующиеся в эпидермисе, и составляющие примерно 15 – 25% от общего числа клеток эпидермиса, и дерме [2].

Меланоциты имеют характерную ультраструктуру. В их цитоплазме содержится значительное количество различных органелл. Цитоплазматическая сеть выражена хорошо, количество митохондрий значительно. В клетках сильно развит пластинчатый комплекс Гольджи. В цитоплазме много везикул, рибосом и небольшое количество лизосом. Ядро имеет неровные контуры мембраны с неглубокими впячиваниями и очень плотной нуклеоплазмой [3].

Отростки меланоцитов содержат множество меланосом, рибосом и контактируют с несколькими кератиноцитами при помощи десмосом. Каждый меланоцит секретирует гранулы меланина в связанные с ним кератиноциты. Это партнерство «меланоцит – кератиноцит» называют меланиновой эпидермальной единицей. Один меланоцит контактирует с 36 (40) кератиноцитами [4, 5]. Последствия нарушения работы меланоцитов объединяют в 3 группы: гиперпигментация, гипопигментация и смешанные гипер- / гипопигментационные расстройства. Одним из наиболее распространенных и сложных заболеваний является одна из наиболее агрессивных злокачественных опухолей – меланома кожи, составляющая не более 4,0% всех новообразований кожи, которая, согласно статистике, является при-

чиной примерно 80% случаев летальных исходов в онкодерматологии [1], что связано с недостаточной изученностью проблемы диагностики и лечения этого заболевания. Заболеваемость меланомой кожи в период с 2000 по 2010 г. увеличилась с 3,18 до 3,95 случая на 100 тыс. населения. Среднегодовой темп прироста составил 1,99%, а общий прирост заболеваемости 21,81%.

Меланома кожи относится к наиболее агрессивно протекающим злокачественным новообразованиям, характеризующимся быстрым развитием метастазирования и резистентностью к стандартной цитостатической терапии, поэтому 5 летняя выживаемость больных с метастатическим процессом находится в пределах 10–15%.

Целью нашего исследования является изучение клеточных линий меланоцитов и их биологии при меланоме, а также оптимизация протоколов культивирования меланоцитов для возможности дальнейшего углубленного изучения вопроса.

Эксперимент был поставлен на меланоцитах, выделенных из злокачественных новообразований кожи больных меланомой. Каждой клеточной линии был присвоен индивидуальный код. После забора материал сразу помещали в транспортную среду на сутки при комнатной температуре. В лаборатории Клеточных технологий НИЦ ФППБ УлГПУ биоптаты механически измельчались на фрагменты размером около 5x5 мм, и инкубировались в 0,25% растворе трипсина 18 часов при температуре 37°C, в CO₂ – инкубаторе («Binder», Германия) с содержанием CO₂=5%. Далее проводили отделение слоя эпидермы от дермы, фрагменты эпидермы и опухоли помещали в 0,05% раствор ЭДТА на 5 минут для дезагрегации клеток. Суспензию центрифугировали при 1500 об/мин 5 минут. После этого сбрасывали супернатант и к полученной взвеси клеток приливали 5 мл готовой полной среды. Для культивирования было выбрано 2 основные среды – RPMI-1640 и Melanocytes Growth Medium с содержанием ЭТС 5% и 20%. Полученную смесь помещали в культуральные флаконы объемом 25 см³ и культивировали в CO₂-инкубаторе. Культивирование осуществляли на протяжении 8 пассажей, каждый из которых высевали на 15 флаконов. Подсчёт клеток вели с использованием счетчика клеток («Bio – Rad TC10», Сингапур), красителем трипановый синий. Через 48 часов после инокуляции осуществляли замену среды. В дальнейшем среду меняли при необходимости (около одного раза в неделю), исходя из визуальных характеристик, таких как: – цвет среды – светло –

розовая с желтизной, что говорит об изменении pH.

После формирования монослоя (спустя 2 – 4 недели), наличие которого просматривали на инвертированном микроскопе Axio Vert. A1 («Carl Zeiss», Германия), клетки снимали с поверхности флакона 0,25% раствором трипсина – Версена (1:1) и проводили пересадку, предварительно обработав флакон PBS.

Для определения цитологических характеристик полученные клетки окрашивали гематоксилином Карацци и водно-спиртовым раствором эозина. При увеличении: x40; x100 определяли: размеры и количество клеток, образование комплексов, размеры и формы клеток и ядра, ядерно-цитоплазматическое отношение, количество и форму ядрышек, наличие митозов. Размеры ядер и клеток измеряли с помощью программного обеспечения ZEN («Carl Zeiss», Германия). Форма клеток показывает уровень их дифференцировки и развития. Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) – отношение между площадями цитоплазмы и ядра живой клетки является важной морфологической характеристикой, которая оценивает уровень метаболизма, выявить проявление компенсаторных реакций. Изменение размеров ядер и ядерно-цитоплазматического отношения могут служить индикатором воспалительных процессов, а также проявлениями некоторых форм онкологических заболеваний. Если ЯЦО равно или больше 1, это значит, что в клетке большое ядро и мало цитоплазмы, что указывает на низкий уровень метаболизма этих клеток. Такие клетки функционально неактивны, однако они обладают способностью делиться, в норме. Наоборот, клетки, у которых ЯЦО меньше 1, имеют большой объем цитоплазмы и, следовательно, большое количество органелл. Они высокодифференцированы и способны активно функционировать.

В первой экспериментальной модели – культивирование меланоцитов на среде RPMI-1640, было сформировано 2 подгруппы:

1) с содержанием ЭТС – 5% (клеточные линии Mel I, Mel II);

2) с содержанием ЭТС – 20% (клеточные линии Mel III, Mel IV).

Для среды RPMI-1640 с содержанием ЭТС 5% количество клеток x10⁵/мл = 3,95±1,01, из них процент живых клеток составил – 40,07% в пятом пассаже.

В соответствии с измеряемыми параметрами для каждой клеточной линии была составлена характеристика.

Проведенный анализ позволил выявить, что для линии онкомеланоцитов

Mel I свойственны следующие характеристики: клетки варьируют по размеру от 306,7 мкм² до 1250,6 мкм² и лежат разрозненно. Формы клеток данной линии различны от полигональной до звездчатой и трёхгранной. Встречаются атипичные клетки с крупными ядрами (до 230,2 мкм²), округлой формы. ЯЦО составляет 0,17. Количество ядрышек чаще от 2 до 4. При визуальном исследовании препарата, в поле зрения был выявлен один митотически делящийся меланоцит.

В линии онкомеланоцитов Mel II клетки варьируют по размеру от 170,4 мкм² до 2441,4 мкм². Клетки расположены разрозненно и имеют полигональную, звездчатую, трёхгранную и веретеновидную формы. Встречаются и гигантские клетки с крупными ядрами (до 571,8 мкм²), округлой формы. ЯЦО составляет 0,26. Количество ядрышек колеблется от 2 до 4. В поле зрения было выявлено 2 митотически делящихся меланоцита.

Для среды RPMI-1640 с содержанием ЭТС 20% количество клеток $\times 10^5/\text{мл} = 5,97 \pm 1,5$, из них процент живых клеток составил – 72,33% (пятый пассаж).

Линии онкомеланоцитов Mel III свойственны следующие характеристики: клетки варьируют по размеру от 289,7 мкм² до 590,9 мкм². Фиксировалось как разрозненное расположение клеток, так и плотные скопления. Размер ядра варьирует от 35,7 мкм² до 166,5 мкм², округлой, либо вытянутой формы. ЯЦО составляет 0,25. Количество ядрышек чаще от 2 до 3. В поле зрения выявляется митотически делящийся меланоцит.

Клеточная линия опухолевидных меланоцитов Mel IV имела размер клеток от 134,4 мкм² до 747,4 мкм². Меланоциты группировались в плотные скопления, но местами были заметны и единичные, разрозненно лежащие клетки. Форма меланоцитов полигональная, трёхгранная, веретеновидная. Размер ядра варьирует от 25,4 мкм² до 91,4 мкм², округлой, либо вытянутой формы. ЯЦО составляет 0,18. Количество ядрышек чаще от 1 до 5. Во второй экспериментальной модели – культивирование меланоцитов на среде Melanocytes Growth Medium, было сформировано 2 подгруппы:

1) с содержанием ЭТС – 5% (клеточные линии Mel V, Mel VI);

2) с содержанием ЭТС – 20% (клеточные линии Mel VII).

Для среды Melanocytes Growth Medium с содержанием ЭТС 5% количество клеток $\times 10^5/\text{мл} = 5,74 \pm 0,9$, из них процент живых клеток составил – 53,20% (пятый пассаж).

Для линии онкомеланоцитов Mel V свойственны следующие характеристики: клетки варьируют по размеру от 122,8 мкм² до 712,8 мкм², лежат разрозненно. Форма клеток: полигональная, звездчатая, трёхгранная, веретеновидная, округлая. Размеры ядер клеток варьируют от 41,0 мкм² до 251,0 мкм². По форме ядра округлые. Количество ядрышек чаще 1 – 4, редко встречается 5. В поле зрения было выявлено четыре митотически делящихся меланоцита.

Линии Mel VI характерны следующие измерения: клетки варьируют по размеру от 199,3 мкм² до 2321,4 мкм² и местами группируются в неплотные скопления. Форма различна от полигональной, звездчатой, трёхгранной, округлой. Ядра клеток размерами от 31,0 мкм² до 609,1 мкм², округлой формы. ЯЦО = 0,31, количество ядрышек чаще 1 – 4. В поле зрения было выявлено 4 митотически делящихся меланоцита.

Для среды Melanocytes Growth Medium с содержанием ЭТС 20% количество клеток $\times 10^5/\text{мл} = 6,51 \pm 1,2$, из них процент живых клеток составил – 94,00% (пятый пассаж). Онкомеланоцитам Mel VII свойственны следующие характеристики: клетки варьируют по размеру от 149,2 мкм² до 1076,0 мкм², расположены они разрозненно, но местами могут группироваться в неплотные скопления. Были выявлены клетки полигональной, звездчатой, трёхгранной формы. Ядра клеток размерами от 50,4 мкм² до 235,8 мкм², округлой формы. ЯЦО = 0,21. Количество ядрышек чаще 1 – 4, в крупных клетках может быть больше.

В ходе эксперимента по изучению биологии меланоцитов мы пришли к выводу о том, что оптимальной средой для культивирования клеточных линий меланоцитов является среда Melanocytes Growth Medium с содержанием ЭТС 20%, так как именно среди клеток линии, культивируемых на этой среде, наблюдалась наибольшая численность живых меланоцитов (94%).

Наиболее благоприятным для культивирования оказался пятый пассаж.

Также была выявлена ведущая морфологическая форма онкомеланоцитов – полигональная (Mel I, Mel II, Mel VI, Mel VII), трёхгранная (Mel III, Mel IV), веретеновидная форма (Mel V), преобладающее количество отростков у звездчатых меланоцитов – 5–6. Наибольшее ядерно-цитоплазматическое отношение = 0,31 у линии Mel VI, культивируемой на среде Melanocytes Growth Medium с содержанием ЭТС 5%, что указывает на пониженный уровень метаболизма и вероятную онкогенность клеток.

Список литературы

1. Хейнштейн В.А. Патоморфологическая характеристика спектра веретенчатых меланом: дис. ... канд. мед. наук. – СПб., 2015. – 147 с.
2. Попова М.Ю., Танурова К.С. Уvealная меланома: особенности диагностики и лечения (литературный обзор) // Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. – 2016. – Т. 1; № 4 (15). – С. 62–64.
3. Кичигина Т.Н., Грушин В.Н., Беликова И.С., Мяделец О.Д. Меланоциты: строение, функции, методы выявления, роль в кожной патологии // Вестник ВГМУ. – 2007. – Т. 6; № 4. – 1–16 с.
4. Малюк Е.А., Целуйко С.С., Красавина Н.П. Морфофункциональная характеристика эпидермиса в норме и при действии экстремальных факторов // Дальневосточный медицинский журнал. – 2016. – № 1. – С. 113–117.
5. Кузнецов С.Л., Горячкина В.Л., Цомартова Д.А., Заборова В.А., Луцевич О.А. Современные представления о структуре и функциях эпидермиса // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2013. – № 2. – С. 26–32.