

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-50-58



Хроническое ультрафиолетовое облучение индуцирует развитие устойчивой резистентности клеток меланомы к противоопухолевым препаратам

Ю.Ю. Щеголев¹, М.А. Карпучина¹, Д.В. Сорокин^{1,2}, А.М. Щербakov^{1,2}, О.Е. Андреева¹, В.Е. Разуваева¹, Т.А. Богущ¹, И.Н. Михайлова^{1,3}, Л.В. Демидов¹, М.В. Гудкова¹, М.А. Красильников^{1,2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; Россия, 603022 Нижний Новгород, проспект Гагарина, 23;

³ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; Россия, 660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

Контакты: Михаил Александрович Красильников krasilnikovm1@yandex.ru

Введение. Меланома относится к группе наиболее злокачественных новообразований, отличающихся агрессивным ростом и активным метастазированием. При этом эффективность терапии, в первую очередь таргетной терапии, во многом ограничена быстрым развитием резистентности к препаратам.

Цель исследования – изучить влияние хронического ультрафиолетового (УФ) облучения на формирование субпопуляции устойчивых к УФ клеток меланомы, а также особенности клеточного сигналинга и чувствительность УФ-резистентных клеток меланомы к действию противоопухолевых препаратов.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках меланомы A375. Клетки культивировали в стандартной среде DMEM + 10 % FBS, анализ скорости роста клеток проводили с помощью МТТ-теста; выживаемость клеток после облучения анализировали с использованием колониеобразующего теста. Транскрипционную активность рецептора эстрогенов (ER) определяли методом репортерного анализа при трансфекции в клетки плазмиды, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом. Для анализа экспрессии клеточных белков использовали метод иммуноблоттинга; сравнительный анализ экспрессии ERα и ERβ проводили с помощью иммунофлуоресцентного метода.

Результаты. Длительное УФ-облучение приводит к формированию УФ-резистентной субпопуляции клеток меланомы A375, отличающейся пониженной чувствительностью к таргетным (вемурафенибу) и гормональным (тамоксифену) препаратам на фоне повышенной экспрессии Snail – активатора эпителиально-мезенхимального перехода и при отсутствии заметных изменений в экспрессии белков PI3K (фосфоинозитид-3-киназы)/mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) сигналинга. Метформин снижает экспрессию Snail как в родительских, так и в УФ-резистентных клетках A375 и усиливает цитостатический эффект в комбинации с вемурафенибом или тамоксифеном.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о снижении чувствительности к таргетным препаратам клеток меланомы на фоне длительной экспозиции с УФ. Способность метформина потенцировать действие таргетных препаратов и ингибировать Snail позволяет рассматривать это лекарственное средство не только как противоопухолевый агент, но и как потенциальный ингибитор эпителиально-мезенхимального перехода.

Ключевые слова: клетки меланомы, ультрафиолетовое облучение, вемурафениб, тамоксифен, резистентность

Для цитирования: Щеголев Ю.Ю., Карпучина М.А., Сорокин Д.В. и др. Хроническое ультрафиолетовое облучение индуцирует развитие устойчивой резистентности клеток меланомы к противоопухолевым препаратам. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(3):50–58. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-50-58

Continuous ultraviolet irradiation induces the development of irreversible resistance of melanoma cells to anticancer drugs

Yu. Yu. Shchegolev¹, M. A. Karpukhina¹, D. V. Sorokin^{1,2}, A. M. Scherbakov^{1,2}, O. E. Andreeva¹, V. E. Razuvaeva¹, T. A. Bogush¹, I. N. Mikhailova^{1,3}, L. V. Demidov¹, M. V. Gudkova¹, M. A. Krasil'nikov^{1,2}

¹N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia;

²National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; 23 Gagarin Prospekt, Nizhny Novgorod 603022, Russia;

³Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Partizan Zheleznyak St., Krasnoyarsk, Russia

Contacts: Mikhail Alexandrovich Krasil'nikov krasilnikovm1@ya.ru

Introduction. Melanoma belongs to the group of the most malignant tumors characterized by aggressive growth and active metastasis. At the same time, the effectiveness of therapy, primarily targeted therapy, is largely limited by the rapid development of drug resistance.

Aim. To study the effect of chronic ultraviolet (UV) irradiation on the formation of a population of radiation-resistant melanoma cells; to study the features of cell signaling and the sensitivity of UV-resistant melanoma cells to the antitumor drugs.

Materials and methods. The experiments were carried out on *in vitro* cultured A375 melanoma cells. Cells were cultured in a standard DMEM + 10 % FBS medium; cell growth rate was analyzed using the MTT assay; cell survival after irradiation was analyzed using a colony-forming test. Determination of the transcriptional activity of the estrogen receptor (ER) was performed by reporter analysis upon transfection into cells of a plasmid containing the luciferase reporter gene controlled by estrogen responsive element. The immunoblotting method was used to analyze the expression of cellular proteins; comparative analysis of ER α and ER β expression was performed by immunofluorescent method.

Results. Long-term UV irradiation leads to the formation of a UV-resistant subpopulation of A375 melanoma cells, which is characterized by decreased sensitivity to targeted (vemurafenib) and hormonal (tamoxifen) drugs, increased expression of Snail, an activator of the epithelial-mesenchymal transition, and in the absence of noticeable changes in the expression of PI3K/mTOR signaling. Metformin reduces Snail expression in both parental and UV-resistant A375 cells and enhances the cytostatic effect in combination with vemurafenib or tamoxifen.

Conclusion. The data obtained demonstrate a decrease in the sensitivity of melanoma cells to targeted drugs under the long-term exposure to UV. The ability of metformin to potentiate the action of targeted drugs and inhibit Snail allows us to consider metformin not only as an antitumor agent, but also as a potential inhibitor of the epithelial-mesenchymal transition.

Keywords: melanoma cells, ultraviolet irradiation, vemurafenib, tamoxifen, resistance

For citation: Shchegolev Yu.Yu., Karpukhina M.A., Sorokin D.V. et al. Continuous ultraviolet irradiation induces the development of irreversible resistance of melanoma cells to anticancer drugs. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3):50–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-50-58

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день меланома рассматривается как одно из наиболее агрессивных злокачественных новообразований кожи, отличающихся высоким риском развития рецидивирования и метастазирования. Меланома характеризуется выраженной генетической нестабильностью и высоким уровнем мутаций, среди которых наиболее распространенной является мутация в гене *BRAF*, расположенная на 600-м кодоне 15-го экзона (*BRAF*^{V600E}). В настоящее время в клиническую практику активно внедряются новые таргетные препараты, тропные к мутантному эпитопу *BRAF*, однако эффективность таргетной терапии во многом ограничена возникновением резистентности к препаратам — врожденной или приобретенной в процессе терапии.

Одним из основных внешних факторов, способствующих злокачественной трансформации меланоцитов кожи и развитию меланомы, является ультрафиолетовое (УФ) облучение, длительное воздействие которого вызывает целый каскад мутаций в ДНК меланоцитов, приводящих в итоге к трансформации клеток. Собственно, роль УФ-облучения в инициации злокачественного роста довольно хорошо изучена, идентифицированы мутации, вызванные облучением, получившие общее название УФ-сигнатуры, в том числе драйверные мутации таких генов, как *P53*, *PTEN*, *p14ARF*, *p16INK4a*, *ARID2*, *PPP6C*, *SNX31*, некоторые

варианты *BRAF* и ряд других [1]. Менее исследован вопрос о влиянии УФ-облучения на клетки, прошедшие злокачественную трансформацию. Установлено, что оно вызывает каскад апоптотических реакций в клетках меланомы, сопровождающийся остановкой клеточного деления и гибелью клеток; идентифицированы отдельные белки, участвующие в развитии УФ-индуцированного апоптоза [2]. Вместе с тем практически не изучен вопрос о воздействии хронического УФ-облучения на клетки меланомы, в том числе возможность и механизм формирования клонов клеток меланом, устойчивых к данному облучению. Продemonстрировано участие p53-сигналинга в реализации УФ-индуцированного апоптоза [3], выявлены отдельные белки, в частности MEK-ERK-STAT3-сигналинга, ассоциированные с резистентностью клеток меланом к УФ-облучению [4], однако особенности формирования УФ-резистентных клонов и взаимосвязь УФ-резистентности и чувствительности клеток меланом к противоопухолевым препаратам, в первую очередь таргетным, остаются малоисследованными.

В настоящей работе в условиях хронического УФ-облучения культивируемых *in vitro* клеток меланомы A375 была получена сублиния клеток, отличающаяся частичной резистентностью к УФ-облучению. Резистентные к УФ клетки характеризовались пониженной чувствительностью к таргетным (вемурафенибу)

и гормональным (тамоксифену) препаратам на фоне повышенной экспрессии Snail — активатора эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Метформин усиливал цитостатический эффект препаратов и снижал экспрессию Snail, что свидетельствует об активности этого лекарственного средства не только как противоопухолевого агента, но и как потенциального ингибитора ЭМП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках меланомы A375. В работе использовались методы, представленные ниже.

Культивирование клеток. Клетки меланомы A375 культивировали в стандартной среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10 % эмбриональной сыворотки телят (FBS HyClone, США) и гентамицин (50 ед./мл) («ПанЭко», Россия), при 37 °C и 5 % CO₂. Культивирование клеток выполняли в инкубаторе NU-5840E (NuAire, США). При анализе скорости роста количество клеток определяли с использованием МТТ-теста, основанного на восстановлении живыми клетками реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2)-2,5-дифенилтетразол бромид) в кристаллы формазана (нерастворимые в культуральных средах).

Репортерный анализ. Для определения транскрипционной активности рецептора эстрогенов (ER) проводили трансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом, любезно предоставленной George Reid и Frank Gannon [5]. Для контроля за эффективностью и потенциальной токсичностью процедуры трансфекции применялась котрансфекция клеток плазмидой, содержащей ген β-галактозидазы. Активность люциферазы измерялась по стандартному протоколу (Promega, США) на люминометре Tecan Infinite M200 Pro (США). Расчет активности люциферазы проводили в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности галактозидазы в исследованных образцах).

Иммуноблоттинг. Клетки на стадии формирования 80 % монослоя дважды промывали на чашках (60 мм; Corning, США) 2 мл фосфатного буфера. Для получения тотального клеточного экстракта к образцам добавляли по 130 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-HCl pH 7,4; 1 % Igepal CA-630, 150 мМ NaCl, 1 мМ тетраацетата этилендиамина, 1 мМ дитиотреитола, 1 мкг/мл аprotинина, леупептина и пепстатина, 1 мМ фторида натрия и ортованадата натрия (Merck, США). Образцы клеточных экстрактов центрифугировали (10 000 g, 10 мин, 4 °C, центрифуга Eppendorf 5417R) и проводили стандартный электрофорез и иммуноблоттинг, как описано ранее [6]. В цитозольных экстрактах исследовали содержание расщепленной формы PARP, phospho-p53, p53, Snail, мишень рапамицина млекопитающих (mTOR), phospho-mTOR, phospho-S6K, S6K, phospho-Akt, Akt, Slug, ERα (Cell Signaling

Technology, США). Для контроля эффективности иммуноблоттинга использовали антитела к α-тубулину (Cell Signaling Technology, США).

Анализ экспрессии рецепторов эстрогенов α и β иммунофлуоресцентным методом. В работе использовались первичные моноклональные антитела к ERα и ERβ и вторичные антикроличьи антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем DyLight650 (Abcam, ab98510). Клетки A375 инкубировали с первичными антителами 14–16 ч при +37 °C в темноте, со вторичными — 1,5 ч при +4 °C в темноте. Интенсивность флуоресценции клеток оценивали на проточном цитометре Beckman Coulter Navios. Специфическая флуоресценция клеток рассчитывалась в программе FlowJo 10.0.8 с помощью критерия Колмогорова—Смирнова.

Ультрафиолетовое облучение и отбор устойчивых к ультрафиолетовому облучению клеток. Облучение проводили с помощью УФ-лампы Vilber Lourmat (Франция) мощностью 6 Вт модели VL-6. LC. На клетки A375 воздействовали УФ-излучением диапазона C с длиной волны 254 нм и интенсивностью 50 Дж/м². Для отбора УФ-резистентных клеток клетки A375 подвергали воздействию УФ 1 раз в неделю в течение 12 нед с последующим поддержанием роста клеток в течение не менее 40 дней после последнего раунда облучения.

Колониеобразующий тест. Клетки A375 рассеивали на культуральные чашки диаметром 60 мм (Corning, США) в среде DMEM, содержащей 10 % FBS. На следующий день культуральную среду удаляли, клетки облучали УФ (длина волны 254 нм) и рассеивали на 6-луночный культуральный планшет (Corning, США) в стандартной культуральной среде с образованием 50–2000 колоний на лунку. Колонии фиксировали и окрашивали 20 % метанолом и 0,2 % кристаллическим фиолетовым после 10-дневного периода инкубации в инкубаторе с 5 % CO₂, 37 °C. Любую колонию, состоящую из более чем 50 клеток, оценивали как выживший клон.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние однократного ультрафиолетового облучения на клетки меланомы A375. Основной целью работы явилось исследование возможных изменений чувствительности клеток меланомы к противоопухолевым препаратам под действием УФ-облучения. Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках меланомы A375, несущих мутацию BRAF^{V600E} и чувствительных к ингибитору BRAF вемурафенибу.

Клетки A375 облучали под лампой 6W Vilber Lourmat (Франция) VL-6. LC, интенсивность 25–50 Дж/м², как было описано выше. Однократное УФ-облучение

клеток меланомы A375 в диапазоне 254 нм приводит к выраженной гибели клеток (рис. 1, а), сопровождающейся повышением уровня апоптотических маркеров: накоплением фосфорилированной формы p53, расщеплением PARP и повышением экспрессии маркера ЭМП Snail (рис. 1, б).

Разработка модели хронического ультрафиолетового облучения культивируемых *in vitro* клеток меланомы A375. Для моделирования хронического облучения проведены 12 раундов облучения клеток в диапазоне УФ 254 нм с интенсивностью 50 Дж/м² с частотой 1 раз в неделю, последующие эксперименты с выжившими клетками (сублиния A375/UVR) выполняли в стандартной среде в течение 2 мес после последнего раунда облучения. Сравнительный анализ чувствительности

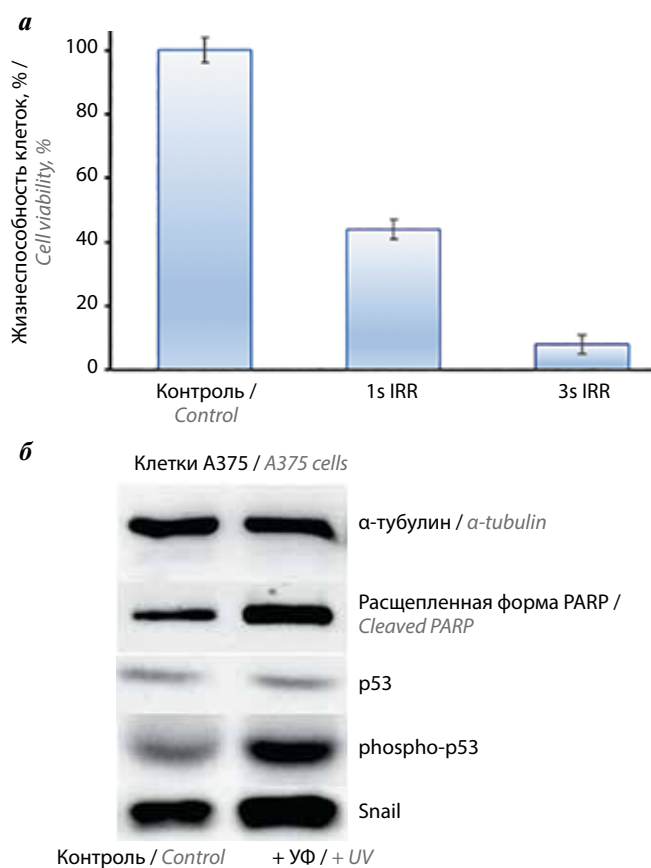


Рис. 1. Влияние ультрафиолетового (УФ) облучения на клетки меланомы линии A375: а — клетки A375 облучали УФ 1 и 3 с, 1s IRR и 3s IRR, как описано в тексте, через 48 ч с помощью МТТ-теста определяли количество выживших клеток. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение двух независимых экспериментов; б — иммуноблоттинг образцов клеток A375 через 24 ч после УФ-облучения проводили, как описано в тексте. Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов. Антитела к α-тубулину использовали для контроля загрузки образцов в гель

Fig. 1. Influence of ultraviolet (UV) irradiation on A375 melanoma cells: а — A375 cells were irradiated with UV 1–3 s, 1s IRR and 3s IRR, respectively, as described in the text of the article, and after 48 h the amount of viable cells was assessed by the MTT-test. Data represent the mean value \pm standard deviation of two independent experiments; б — A375 cells exposed to UV irradiation, and after 24 h were subjected to immunoblotting. Protein loading was controlled by membrane hybridization with α-tubulin Abs. The blot represents the results of one of the three similar experiments

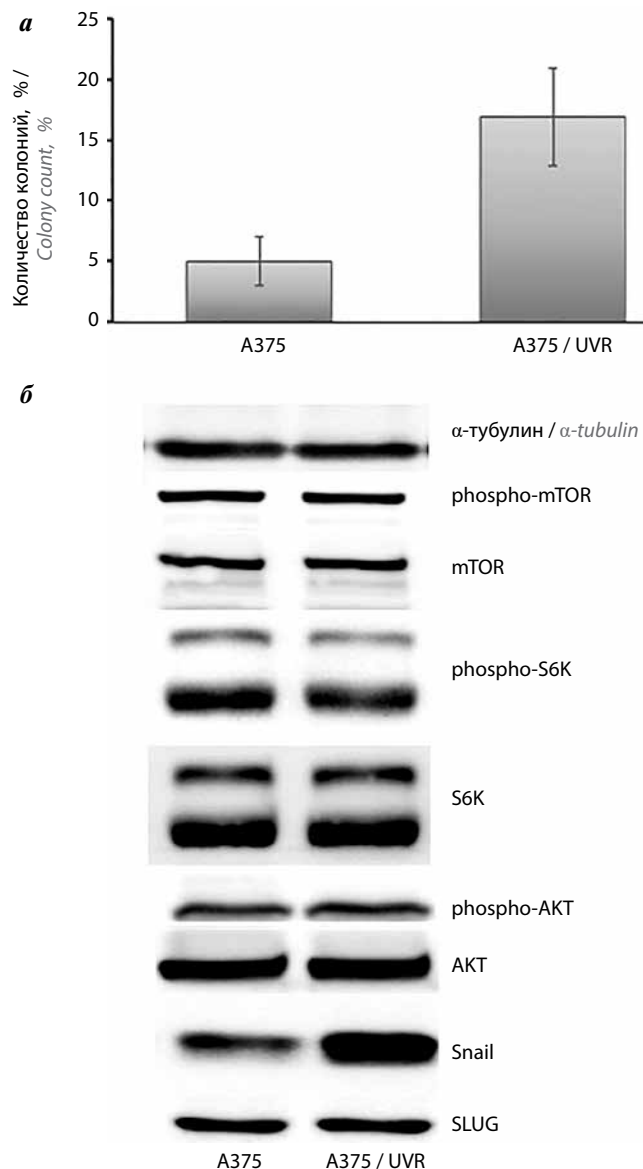


Рис. 2. Сравнительный анализ клеток A375 и резистентной к ультрафиолетовому (УФ) излучению сублинии A375/UVR: а — колониеобразующий тест. Клетки облучали УФ и рассеивали на 6-луночный планшет с образованием 50–2000 колоний на лунку. Окраску колоний проводили через 10–14 сут, как описано в тексте; б — иммуноблоттинг образцов клеток A375 и A375/UVR. Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов

Fig. 2. Comparative analysis of A375 and resistant to ultraviolet (UV) irradiation A375/UVR cells: а — colony-forming test. The cells were exposed to UV and seeded on 6-well plates for growing 50–2000 colonies per well. The colonies were stained after 10–14 days as described in the text of the article; б — immunoblotting of A375 and A375 cells. The blot represents the results of one of the three similar experiments

клеток к УФ-облучению с использованием теста на колониеобразование показал существенное увеличение эффективности этого процесса в клетках A375/UVR по сравнению с родительскими клетками, что свидетельствует о развитии частичной резистентности к облучению в клетках A375/UVR (рис. 2, а). Исследование основных белков ростового сигналинга в клетках A375 и A375/UVR не выявило существенных различий

в экспрессии белков, за исключением Snail, ключевого активатора ЭМП, экспрессия которого оказалась существенно выше в резистентных клетках (рис. 2, б).

Чувствительность клеток меланомы A375 к вемурафенибу; комбинированный эффект вемурафениба и метформина. Сравнительный анализ чувствительности родительских и УФ-резистентных клеток меланомы A375 к ингибитору BRAF вемурафенибу показал снижение чувствительности УФ-резистентных клеток A375/UVR к антипролиферативному действию вемурафениба (рис. 3, а). Как отмечалось выше, резистентные клетки A375/UVR сохраняют практически неизменным уровень экспрессии белков Akt- и mTOR-сигналинга (см. рис. 2, б), что свидетельствует о потенциальной возможности усиления цитостатического эффекта при комбинированном воздействии на клетки вемурафениба и ингибиторов mTOR. В дальнейших экспериментах в качестве последнего использовался метформин — антидиабетический препарат с минимальными побочными эффектами, обладающий ши-

роким спектром действия, в том числе являющийся непрямым ингибитором mTOR-сигналинга. Мы показали, что комбинация вемурафениба с сублетальными дозами метформина усиливает цитостатический эффект на родительские и УФ-резистентные клетки меланомы (рис. 3, б). Анализ влияния этого препарата на основные белки клеточного сигналинга выявил выраженное снижение экспрессии Snail в присутствии метформина, в том числе в УФ-резистентных клетках (рис. 4), что позволяет рассматривать его в качестве одного из соединений, не только обладающих антипролиферативной активностью, но и препятствующих активизации ЭМП.

Эстрогеновый сигналинг в клетках меланомы A375; чувствительность клеток меланомы к антипролиферативному действию антиэстрогена тамоксифена. Использование тамоксифена в качестве дополнительной линии терапии меланом активно обсуждается в литературе, однако результаты как экспериментальных, так и клинических исследований носят довольно противоречивый характер [7, 8].

Проведенный в наших экспериментах анализ содержания ER в клетках меланомы A375 методом

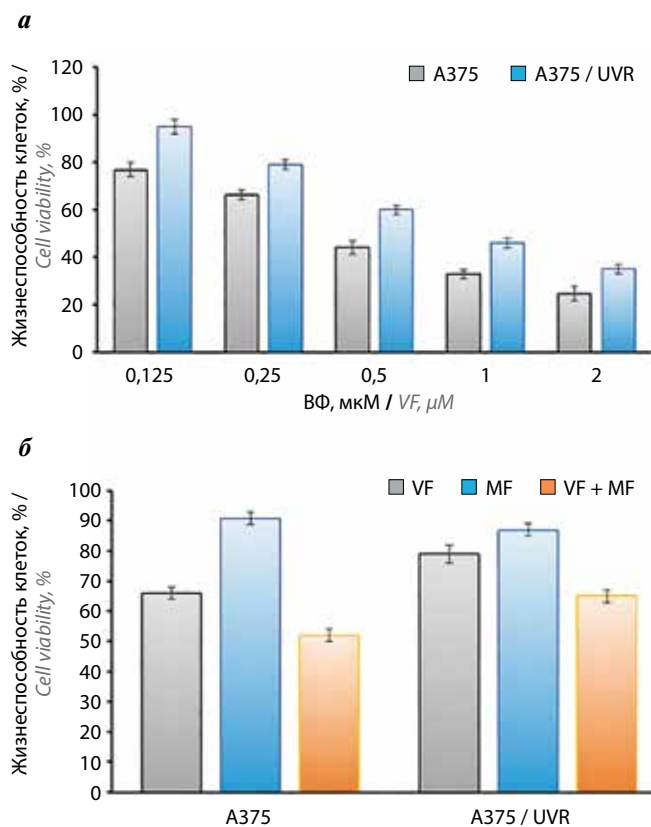


Рис. 3. Влияние вемурафениба (VF) в концентрации 0,125–2 мкМ (а) и вемурафениба в концентрации 0,25 мкМ в комбинации с 2 мМ метформина (MF) (б) на рост клеток A375 и A375/UVR. Клетки культивировали с указанными препаратами в течение 72 ч, количество выживших клеток определяли с помощью MTT-теста. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов

Fig. 3. Influence of 0,125–2 μ M vemurafenib (VF) (a) and 0,25 μ M vemurafenib in combination with 2 mM metformin (MF) (b) on the growth of A375 and A375/UVR cells. The cells were cultured with indicated drugs within 72 h, and the amount of viable cells was assessed by the MTT-test. Data represent the mean value \pm standard deviation of three independent experiments

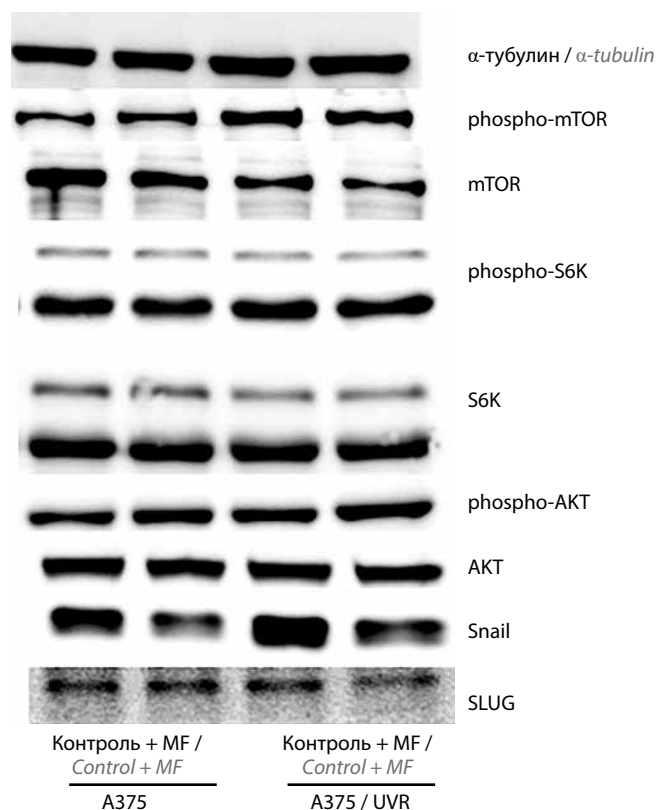


Рис. 4. Влияние метформина (MF) на экспрессию белков в клетках A375 и A375/UVR. Клетки культивировали в присутствии 2 мМ метформина 24 ч и проводили иммуноблоттинг образцов, как описано в тексте. Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов

Fig. 4. Metformin (MF) influence on the protein expression in A375 and A375/UVR cells. The cells were treated with 2 mM metformin for 24 h, and the cells were subjected to immunoblotting as described in the text of the article. The blot represents the results of one of the three similar experiments

проточной цитометрии показал присутствие в клетках α - и β -форм этого рецептора, при этом содержание $ER\beta$ практически в 3 раза превышает содержание $ER\alpha$ (см. таблицу). Определение транскрипционной активности $ER\alpha$ с использованием репортерной плазмиды, содержащей ген люциферазы под контролем эстроген-респонсивного элемента, не выявило изменений его активности под действием эстрогенов или антиэстрогенов, что свидетельствует о низкой транскрипционной активности $ER\alpha$ в клетках меланомы A375 (рис. 5).

Сравнительный анализ экспрессии и активности $ER\alpha$ в родительских и УФ-резистентных клетках меланомы не показал существенных различий в уровне $ER\alpha$; однократное УФ-облучение клеток приводило к снижению содержания $ER\alpha$, при этом транскрипционная активность менялась незначительно (рис. 6). Несмотря на низкую активность $ER\alpha$, был выявлен выраженный цитостатический эффект антиэстрогена тамоксифена на клетки меланомы A375; при этом, как и в случае с вемурафенибом, мы обнаружили снижение чувствительности к тамоксифену в УФ-резистентных клетках A375/UVR (рис. 7, а). Комбинация тамоксифена с метформинном усиливает цитостатический эффект, в большей степени — в родительских клетках A375 (рис. 7, б).

В целом полученные результаты свидетельствуют о формировании УФ-резистентной популяции клеток меланомы в условиях длительного УФ-облучения, для которой характерна пониженная чувствительность к таргетным и гормональным препаратам на фоне повышенной экспрессии активатора ЭМП Snail. Метформин в комбинации с вемурафенибом или тамоксифеном усиливает цитостатический эффект и снижает экспрессию Snail, что свидетельствует о потенциальной перспективности использования метформина при проведении противоопухолевой терапии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мутации в гене *BRAF* встречаются в 40–85 % случаев меланомы, повышенная частота мутации отмечается в метастазах и рецидивирующих меланомах [9, 10]. Чаще всего мутация локализуется в 600-м кодоне

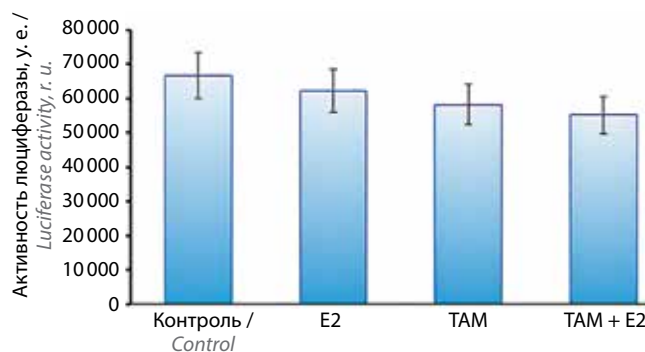


Рис. 5. Эстрогеновый сигналинг в клетках A375. Репортерный анализ транскрипционной активности $ER\alpha$. Клетки A375 трансфицировали плазмидой, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом, и плазмидой, содержащей ген β -галактозидазы, и культивировали в присутствии 10^{-8} М 17β -эстрадиола (E2) и 5×10^{-6} М тамоксифена (TAM). Через 24 ч определяли активность люциферазы и β -галактозидазы, как описано в тексте. Расчет активности люциферазы проводили в у. е. (отношение общей активности люциферазы к активности β -галактозидазы в исследованных образцах). Представлены средние значения \pm стандартные отклонения трех независимых экспериментов.

Fig. 5. Estrogen signaling in A375 cells. Reporter analysis of $ER\alpha$ transcriptional activity. A375 cells were transfected with the plasmid containing the luciferase reporter gene under the estrogen-responsive elements, and β -galactosidase plasmid, and cells were cultured in the presence of 10^{-8} M 17β -estradiol (E2) and 5×10^{-6} M tamoxifen (TAM). After 24 h the luciferase and β -galactosidase activities were determined as described in the text of the article. The relative luciferase activity was calculated in arbitrary units as the ratio of the luciferase to the galactosidase activity. Data represent mean value \pm standard deviation of three independent experiments

гена *BRAF*, в результате которой происходит замена валина на глутаминовую кислоту (V600E) [11]. Идентификация мутаций, приводящих к усиленной активации *BRAF*, способствовала разработке селективных ингибиторов, включая вемурафениб (PLX4032) и дабрафениб (GSK2118436), которые ингибируют передачу ростового сигнала в MAP-киназном каскаде.

Вемурафениб (N-(3-((5-(4-Хлорфенил)-1Н-пирроло[2,3-б]пиридин-3-ил) карбонил)-2,4-дифторфенил)пропан-1-сульфонамид) является сильным ингибитором мутантной киназы *BRAF* [12] и проявляет высокую противоопухолевую активность в клетках меланомы с мутацией *BRAF*^{V600E} [9, 13]. Ответ клеток меланомы на этот препарат может варьировать в зависимости от уровня экспрессии гена *BRAF* или количества

Содержание рецепторов эстрогенов $ER\alpha$ и $ER\beta$, определенное с помощью иммунофлуоресцентного метода

Level of estrogen receptors $ER\alpha$ and $ER\beta$ determined by immunofluorescence assay

Показатель Parameter	Уровень экспрессии (доля специфически флуоресцирующих клеток относительно контроля), % Expression level (is the proportion of specifically fluorescent cells relative to the control), %	Интенсивность экспрессии (отношение среднего геометрического интенсивности флуоресценции в опытном образце к контролю), у. е. Expression intensity (is the ratio of the geometric mean fluorescence intensity in the test sample to the control), r. u.	Индекс экспрессии (интегральный показатель, равный произведению интенсивности и уровня экспрессии, деленному на 100), у. е. Expression index (an integral indicator equal to the product of intensity and expression level divided by 100), r. u.
$ER\alpha$	59	2,2	1,3
$ER\beta$	86	6,3	5,4

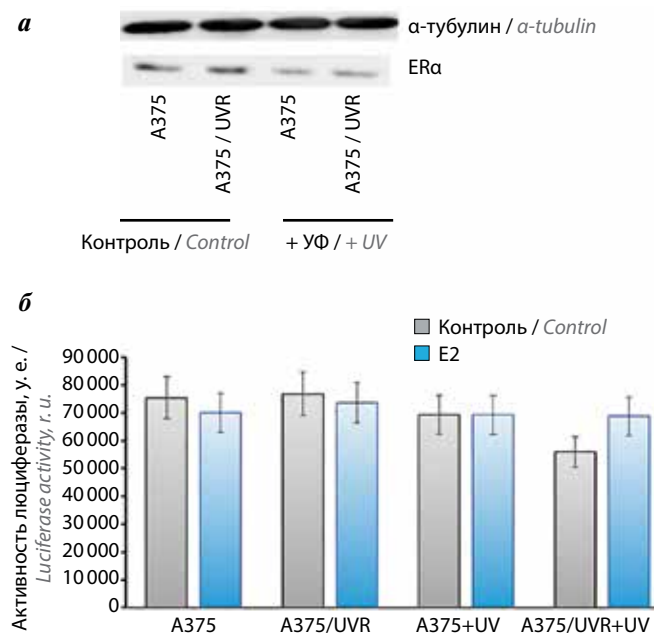


Рис. 6. Влияние ультрафиолетового (УФ) облучения на экспрессию и транскрипционную активность эстрогенового рецептора ERα в клетках A375 и A375/UVR. Клетки облучали УФ, через 24 ч содержание ERα в образцах клеток определяли методом иммуноблоттинга (а); активность ERα анализировали методом репортерного анализа (б). Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов. E2 – 17β-эстрадиол

Fig. 6. The influence of ultraviolet irradiation (UV) on the expression of estrogen receptor α (ERα) and its transcriptional activity in A375 and A375/UVR cells. The cells were exposed to UV, and after 24 h the ERα expression was determined by immunoblotting (a); ERα activity was measured by reporter gene analysis (b). Data represent mean value ± standard deviation of three independent experiments. E2 – 17β estradiol

матричной РНК (мРНК) BRAF. Несмотря на высокие показатели ответа на терапию в начале применения вемурафениба, у пациентов с метастатической меланомой во многих случаях наблюдается довольно стремительное прогрессирование заболевания на фоне продолжения терапии, что указывает на развитие приобретенной резистентности к нему в клетках меланомы. Как правило, приобретенная резистентность к данному препарату связана с реактивацией незаблокированных сигнальных путей, в частности путей рецепторной тирозинкиназы PDGFR [14], киназы CRAF (RAF1) и ряда других [15, 16]. Продemonстрирована важная роль эпигенетических факторов в формировании резистентности к вемурафенибу, в том числе метилирования ДНК [17], изменения спектра отдельных микроРНК, регулирующих ростовой сигналинг в клетках меланом [18].

Особый интерес представляет вопрос о возможных изменениях чувствительности меланомы к вемурафенибу под действием различных повреждающих и генотоксических факторов, в том числе под действием УФ-облучения. Роль УФ-облучения в злокачественной трансформации меланоцитов и прогрессировании меланомы достаточно хорошо изучена, продемонстрирована ведущая роль мутаций ДНК, индуцированных

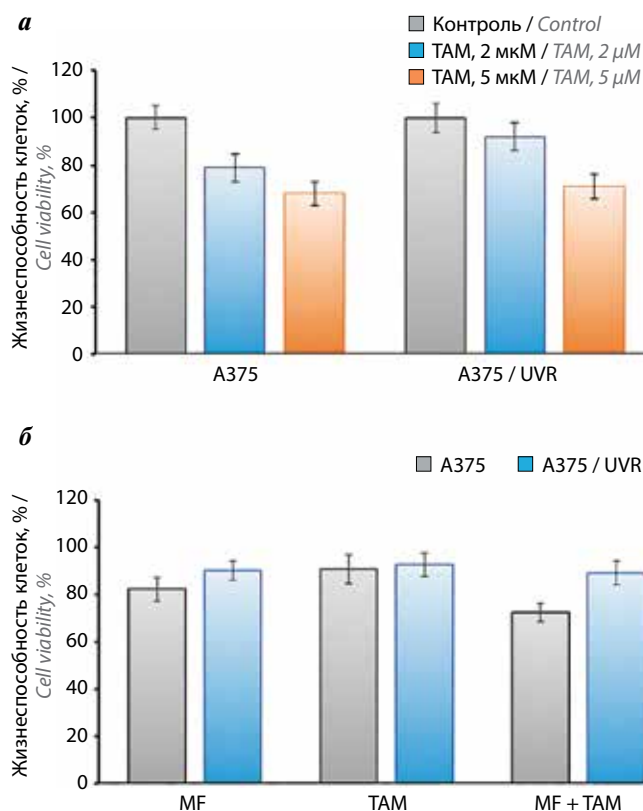


Рис. 7. Влияние тамоксифена (TAM) в концентрации 2–5 мкМ (а) и тамоксифена в концентрации 5 мкМ в комбинации с 2 мМ метформина (MF) (б) на рост клеток A375 и A375/UVR. Клетки культивировали с указанными препаратами в течение 72 ч, количество выживших клеток определяли с помощью МТТ-теста. Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов

облучением, в трансформации клеток, в том числе мутаций *P53*, *PTEN*, *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *BRAF* и ряда других [1]. Действие УФ-облучения на трансформированные клетки меланомы сопровождается активизацией апоптотического каскада и частичной гибелью клеток [3]. Лишь в единичных работах исследовались особенности метаболизма клеток меланомы, обладающих повышенной устойчивостью к УФ-облучению. Так, в клетках, резистентных к нему, выявлены существенная реаранжировка сигнальных путей и активизация ростового/антиапоптотического сигналинга [4], продемонстрировано развитие УФ-резистентности при инактивации p53 сигнального пути [3].

В какой степени изменения клеточного сигналинга, ассоциированные с развитием УФ-резистентности, могут влиять на чувствительность клеток меланом к противоопухолевым препаратам? В настоящей работе мы исследовали чувствительность клеток меланомы A375 и УФ-резистентной сублинии A375/UVR, полученной в результате хронического облучения клеток УФ, к ингибитору BRAF вемурафенибу [13] и ингибитору

эстрогенового сигналинга тамоксифену, возможное использование которого в терапии меланом активно обсуждается в литературе [7, 8]. Было показано, что развитие резистентности клеток меланомы к УФ-облучению сопровождается снижением чувствительности клеток к обоим препаратам; дополнительное воздействие на клетки метформина, относящегося к группе активаторов AMPK и не прямых ингибиторов mTOR, приводит к усилению их цитостатического эффекта. Сравнительный анализ белков клеточного сигналинга выявил конститутивную активацию Snail — основного активатора ЭМП, в УФ-резистентных клетках; при этом метформин приводил к существенному подавлению

экспрессии Snail в родительских и УФ-резистентных клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом полученные результаты свидетельствуют о формировании в условиях длительного УФ-облучения клонa УФ-резистентных клеток, характеризующихся пониженной чувствительностью к вемурафенибу и тамоксифену, а также активацией белков, ассоциированных с ЭМП. Метформин усиливает цитостатический эффект в комбинации с обоими препаратами, что позволяет рассматривать его в качестве потенциального противоопухолевого препарата в терапии меланом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hodis E., Watson I.R., Kryukov G.V. et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012;150(2):251–63. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.024
2. Ouhit A., Gupta I., Gaur R.L. et al. Deregulation of cell growth and apoptosis in UV-induced melanomagenesis. *Front Biosci (Elite ed.)* 2020;12(2):223–36. DOI: 10.2741/e868
3. Awais R., Spiller D.G., White M.R. et al. p63 is required beside p53 for PERP-mediated apoptosis in uveal melanoma. *Br J Cancer* 2016;115(8):983–92. DOI: 10.1038/bjc.2016.269
4. Fukumoto T., Iwasaki T., Okada T. et al. High expression of Mcl-1L via the MEK-ERK-phospho-STAT3 (Ser727) pathway protects melanocytes and melanoma from UVB-induced apoptosis. *Genes Cells* 2016;21(2):185–99. DOI: 10.1111/gtc.12330
5. Reid G., Hübner M.R., Métivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003;11(3):695–707. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00090-x
6. Shchegolev Y., Sorokin D., Scherbakov A. et al. Upregulation of Akt/Raptor signaling is associated with rapamycin resistance of breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2020;330:109243. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109243
7. Kanter-Lewensohn L., Girnita L., Girnita A. et al. Tamoxifen-induced cell death in malignant melanoma cells: possible involvement of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2000;165(1–2):131–7. DOI: 10.1016/s0303-7207(00)00253-7
8. Lens M.B., Reiman T., Husain A.F. Use of tamoxifen in the treatment of malignant melanoma. *Cancer* 2003;98(7):1355–61. DOI: 10.1002/cncr.11644
9. Forschner A., Niessner H., Bauer J. et al. Successful treatment with vemurafenib in BRAF V600K-positive cerebral melanoma metastasis. *JAMA Dermatol* 2013;149(5):642–4. DOI: 10.1001/jamadermatol.2013.372
10. Spathis A., Katoulis A.C., Damaskou V. et al. BRAF mutation status in primary, recurrent, and metastatic malignant melanoma and its relation to histopathological parameters. *Dermatol Pract Concept* 2019;9(1):54–62. DOI: 10.5826/dpc.0901a13
11. Flaherty K.T., McArthur G. BRAF, a target in melanoma: implications for solid tumor drug development. *Cancer* 2010;116(21):4902–13. DOI: 10.1002/cncr.25261
12. Wellbrock C., Arozarena I. The complexity of the ERK/MAP-KINASE pathway and the treatment of melanoma skin cancer. *Front Cell Dev Biol* 2016;4:33. DOI: 10.3389/fcell.2016.00033
13. Chapman P.B., Hauschild A., Robert C. et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Eng J Med* 2011;364(26):2507–16. DOI: 10.1056/NEJMoa1103782
14. Sullivan R.J., Flaherty K.T. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *Eur J Cancer* 2013;49(6):1297–304. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.11.019
15. Chan X.Y., Singh A., Osman N. et al. Role played by signalling pathways in overcoming BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Int J Mol Sci* 2017;18(7):1527. DOI: 10.3390/ijms18071527
16. Nelson B.E., Roszik J., Janku F. et al. BRAF v600E-mutant cancers treated with vemurafenib alone or in combination with everolimus, sorafenib, or crizotinib or with paclitaxel and carboplatin (VEM-PLUS) study. *NPJ Precis Oncol* 2023;7(1):9. DOI: 10.1038/s41698-022-00341-0
17. Zakharia Y., Monga V., Swami U. et al. Targeting epigenetics for treatment of BRAF mutated metastatic melanoma with decitabine in combination with vemurafenib: a phase Ib study. *Oncotarget* 2017;8(51):89182–93. DOI: 10.18632/oncotarget.21269
18. Vergani E., Di Guardo L., Dugo M. et al. Overcoming melanoma resistance to vemurafenib by targeting CCL2-induced miR-34a, miR-100 and miR-125b. *Oncotarget* 2016;7(4):4428–41. DOI: 10.18632/oncotarget.6599

Благодарность. Авторы выражают особую благодарность за предоставление плазмид для экспериментов.

Acknowledgment. Authors express special thanks to George Reid and Frank Gannon and for the providing plasmids for experiments.

Вклад авторов

Ю.Ю. Щеголев: проведение исследований на клеточных культурах, МТТ-анализа и колониеобразующего теста;

М.А. Карпухина: проведение исследований на клеточных культурах и МТТ-анализа;

Д.В. Сорокин: иммуноблоттинг;

А.М. Щербаков: статистическая обработка данных, анализ полученных данных, подготовка иллюстративного материала;

О.Е. Андреева: репортерный анализ;

В.Е. Разуваева: отбор клеток с устойчивостью к облучению, проведение колониеобразующего теста;

Т.А. Богущ: анализ экспрессии ER α и ER β иммунофлуоресцентным методом, редактирование;

И.Н. Михайлова, Л.В. Демидов: обзор литературы по теме статьи, редактирование;

М.В. Гудкова: руководство проектом, написание текста статьи;

М.А. Красильников: идея и организация исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

Yu.Yu. Shchegolev: conducting research on cell cultures, MTT assay and colony-forming test;

M.A. Karpukhina: conducting research on cell cultures and MTT assay;

D.V. Sorokin: immunoblotting;

A.M. Shcherbakov: statistical data processing, analysis of the obtained data, preparation of illustrative material;

O.E. Andreeva: reporter gene assays;

V.E. Razuvaeva: selection of UV-resistant cells, colony-forming test;

T.A. Bogush: analysis of ER α and ER β expression using immunofluorescence method, editing;

I.N. Mikhailova, L.V. Demidov: literature review on the topic of the article, editing;

M.V. Gudkova: project management, article writing;

M.A. Krasil'nikov: idea and organization of the research, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Ю.Ю. Щеголев / Yu.Yu. Shchegolev: <https://orcid.org/0000-0002-1490-6781>

М.А. Карпухина / M.A. Karpukhina: <https://orcid.org/0000-0002-3202-2293>

О.Е. Андреева / O.E. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-6015-6619>

Д.В. Сорокин / D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>

А.М. Щербаков / A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>

Т.А. Богущ / T.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>

М.В. Гудкова / M.V. Gudkova: <https://orcid.org/0000-0003-2694-5232>

И.Н. Михайлова / I.N. Mikhaylova: <https://orcid.org/0000-0002-7659-6045>

Л.В. Демидов / L.V. Demidov: <https://orcid.org/0000-0002-8562-6082>

М.А. Красильников / M.A. Krasil'nikov: <https://orcid.org/0000-0002-5902-7633>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00368).

Funding. This research was funded by the Russian Scientific Foundation (grant No. 22-25-00368).

Статья поступила: 01.06.2023. **Принята к публикации:** 04.07.2023.

Article submitted: 01.06.2023. **Accepted for publication:** 04.07.2023.