

*Шамишурина Е.О.<sup>1\*</sup>, Улитко М.В.<sup>2,3</sup>,  
Могиленских А.С.<sup>2</sup>, Сазонов С.В.<sup>1,2</sup>,  
Демидов С.М.<sup>1,2</sup>, Титова С.А.<sup>3</sup>*

## **ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДВУХ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Российская Федерация;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург, Российская Федерация

\* elshamshurina@gmail.com

**Резюме.** Установлено проявление полиморфизма и гетерогенности культивируемых клеток карциномы молочной железы, проявляющихся в изменении морфологических показателей клеток и выявлении популяций адгезивных и неадгезивных клеток в культуре.

**Ключевые слова:** карцинома молочной железы, культивирование клеток, полиморфизм, гетерогенность

### **Введение**

В настоящее время культуры опухолевых клеток являются одним из основных инструментов для оценки потенциальной эффективности противоопухолевых лекарственных препаратов и разработки персонализированных подходов к лечению онкологических заболеваний, в частности, рака молочной железы, которые основаны на получении персонализированной культуры опухолевых клеток, что является одной из важных задач для ряда исследователей [4, 6, 8].

Наиболее часто для изучения свойств опухолевых клеток, цитотоксического эффекта противоопухолевых препаратов и других исследований используют иммортализованные линии карцином молочной железы [1, 2, 6], тогда как существует острая необходимость в создании персонифицированных экспериментальных моделей, которые могут быть использованы для различных методов исследования и, в том числе, для индивидуального подбора терапевтических методик.

Учитывая морфологическую гетерогенность рака молочной железы, влияющей на ряд биологических процессов в клетках, на чувствительность опухоли к химиотерапии [1], при длительном культивировании клеток карциномы молочной железы наблюдается появление различных клеточных популяций, которые характеризуются изменением морфологических показателей [3, 7], изменением изначальных характеристик опухоли [5]. При обработке методик получения персонифицированных культур клеток необходимо учитывать условия культивирования, состав культуральной среды, которые во многом определяют рост, изменение морфологических свойств, жизнеспособность культивируемых клеток [2, 3].

### **Цель работы**

Оценка полиморфизма и гетерогенности клеточных популяций образца карциномы молочной железы при обработке методики культивирования с целью создания персонифицированной экспериментальной модели.

### **Материалы и методы**

Для проведения исследования использовался операционный материал карциномы молочной железы, который транспортировали в лабораторию в стерильной среде (PBS и 1% раствора антибиотиков-антимикотиков).

Опухолевую ткань промывали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) на чашке Петри и измельчали с помощью хирургического скальпеля. Фрагменты образца вновь промывали PBS, и инкубировали 50-мл пробирке, содержащей сме-

шанный раствор ферментов 16 часов при 37 °С, в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации образец фильтровали с использованием сита для клеток 100 мкм, затем центрифугировали при 1600 об/мин в течение 10 минут. Супернатант отбрасывали и осадок промывали в фосфатно-солевом буферном растворе и вновь центрифугировали при 1600 об/мин в течение 5 минут. Затем осадок ресуспендировали в полной питательной среде, содержащей среду DMEM, 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% антибиотика-антимикотика, 1% амфотерицина В, 0,1% гентамицина. Суспензию клеток помещали в посевной флакон с питательной средой Игла DMEM с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% антибиотика-антимикотика, 1% амфотерицина В, 0,1% гентамицина и инкубировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе до образования монослоя.

Смену культуральной среды осуществляли каждые 3 дня.

Пересев клеточных линий проводили при достижении культурой 80–90% конфлюента один раз в 6–7 дней, вызывая дезинтеграцию монослоя 8-минутной экспозицией в растворе трипсина и версена в соотношении 1:1.

Контроль за состоянием культуры проводили с помощью инвертированного микроскопа Eclipse TS100, Nikon при увеличении ×200 и ×400 раз.

Для оценки морфологических параметров клетки окрашивались по Романовскому.

С помощью окулярного микрометра МОВ-1-15х и светового микроскопа Micros MC50 (Австрия) вычислялись линейные размеры ядер и самих клеток при увеличении ×400 по формуле:

$$t = (II - I) / \beta$$

где  $t$  – линейные размеры объекта;  $II - I$  – разность отсчётов;  $\beta$  – линейное увеличение объектива.

На основании этих данных высчитывалось площадь ядер и клеток. Также определялось ядерно-цитоплазматическое соотношение по формуле:

$$\text{ЯЦО} = (S_{\text{я}}) / (S_{\text{ц}})$$

где ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение;  $S_{\text{я}}$  – площадь ядра;  $S_{\text{ц}}$  – площадь цитоплазмы.

Микрофотографии препаратов были сделаны на микроскопе Leica DM5000 B на увеличении  $\times 400$ .

Статистическую обработку результатов проводили, используя программы MS Excel и STATISTICA 6, для оценки значимости различий использовали критерий Манна – Уитни.

### Результаты и обсуждение

В ходе культивирования клеток карциномы молочной железы на протяжении трёх пассажей наблюдалась гетерогенность популяций клеток карциномы молочной железы, в частности, в культуре идентифицировались два типа клеток - адгезивные и неадгезивные.

Результаты исследования показали, что при определении относительной площади клеток наблюдается достоверное увеличение этого показателя в обеих популяциях клеток карциномы молочной железы - адгезивных и неадгезивных на протяжении трёх пассажей.

Так, данный показатель на первом пассаже (P0) в популяции неадгезивных клеток составил  $0,0096 \pm 0,0003 \text{ мм}^2$ ; в популяции адгезивных —  $0,0091 \pm 0,0001 \text{ мм}^2$ . На протяжении двух последующих пассажей показатель площади клеток достоверно увеличивался в обеих популяциях и составил на втором пассаже (P1)  $0,0105 \pm 0,0003 \text{ мм}^2$  у неадгезивных и  $0,0101 \pm 0,0003 \text{ мм}^2$  у адгезивных соответственно и, к третьему пассажиру (P2), повысился до  $0,0107 \pm 0,0007 \text{ мм}^2$  в популяции неадгезивных и  $0,0105 \pm 0,00009 \text{ мм}^2$  в популяции адгезивных клеток (Рисунок 1).

В ходе эксперимента отмечают и изменения показателя относительной площади ядер популяций адгезивных и неадгезивных клеток.

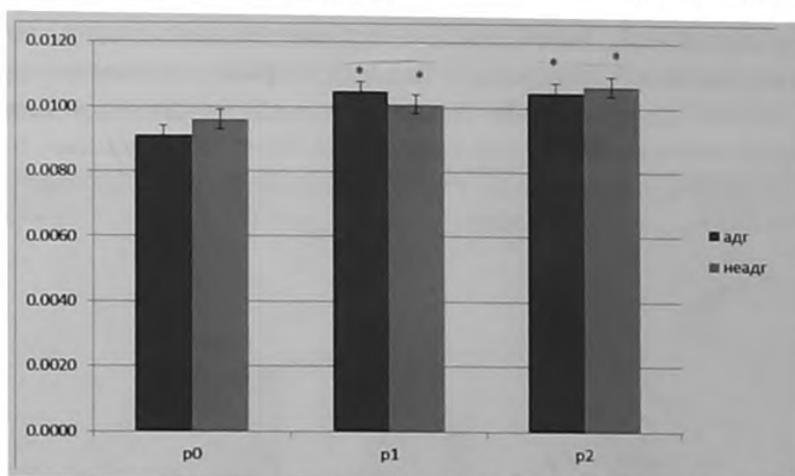


Рисунок 1. Различие популяций адгезивных и неадгезивных клеток карциномы молочной железы по показателю площади клеток между разными пассажами.

Примечание – \* – различие с нулевым пассажем достоверно ( $p < 0,05$ ), на доверительных интервалах отложена величина ошибки среднего

В частности, на первом пассаже данный показатель составил  $0,0036 \pm 0,00073$  мм<sup>2</sup> и  $0,0033 \pm 0,00020$  мм<sup>2</sup> у неадгезивных и адгезивных клеток соответственно. С увеличением времени культивирования наблюдается достоверное увеличение показателя относительной площади ядер в клетках обеих популяций: так, на втором пассаже данный показатель составил  $0,0051 \pm 0,00039$  мм<sup>2</sup> у неадгезивных клеток и  $0,0044 \pm 0,00022$  мм<sup>2</sup> у адгезивных и на третьем пассаже —  $0,0061 \pm 0,00026$  мм<sup>2</sup> в популяции неадгезивных клеток, у адгезивных клеток –  $0,0050 \pm 0,00037$  мм<sup>2</sup>.

По мере увеличения продолжительности культивирования клеток карциномы молочной железы так же наблюдается достоверное увеличение показателя ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) как в популяции адгезивных, так и неадгезивных клеток.

Так, на первом пассаже (P0) данный показатель составил в популяции адгезивных клеток  $0,40 \pm 0,0072$ , в популяции не-

адгезивных –  $0,35 \pm 0,0068$ . При исследовании клеток последующих пассажей показатель ЯЦО адгезивных клеток составил  $0,42 \pm 0,0076$  и  $0,49 \pm 0,0090$  в популяции неадгезивных клеток на втором пассаже (P1) и, на третьем пассаже (P2), данный показатель составил  $0,48 \pm 0,0089$  в популяции адгезивных клеток и  $0,56 \pm 0,0068$  у неадгезивных соответственно (Рисунок 2).

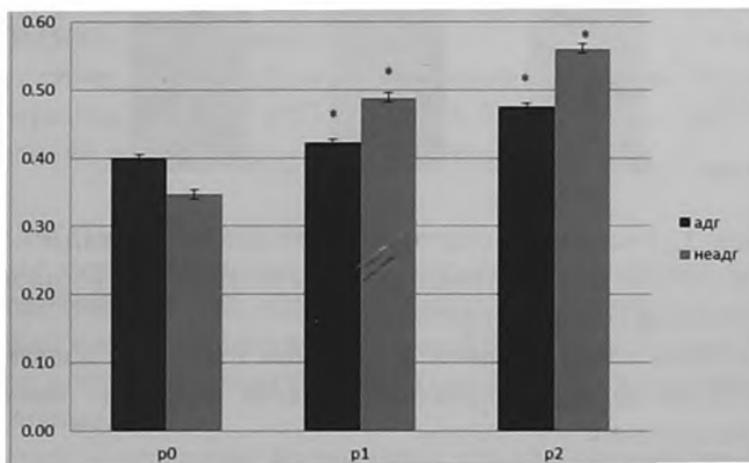


Рисунок 2. Различие показателя ЯЦО популяций адгезивных и неадгезивных клеток карциномы молочной железы между разными пассажами.

Примечание – \* – различие с нулевым пассажем достоверно ( $p < 0,05$ ), на доверительных интервалах отложена величина ошибки среднего.

При морфологическом исследовании культивируемых клеток отмечено проявление полиморфизма как в популяции адгезивных клеток, так и в популяции неадгезивных при увеличении времени культивирования, что проявляется в изменении формы и размеров клеток в культуре. Так, на каждом последующем пассаже увеличивалась доля более крупных, неправильной формы клеток (Рисунок 3).

Полученные данные свидетельствуют о гетерогенности популяции клеток рака молочной железы, так как идентифицируется как минимум два типа клеток: адгезивные и неадгезивные.

Отмечается и полиморфизм культивируемых клеток, который сопровождается изменением размеров и формы клеток с увеличением времени культивирования и числа пассажей.

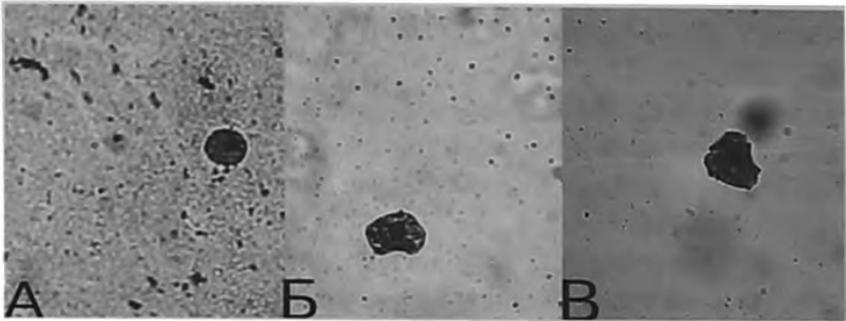


Рисунок 3. Полиморфизм клеток рака молочной железы, ув. x400: А – первый пассаж (P0) Б – второй пассаж (P1) В – третий пассаж (P2)

### Выводы

Таким образом, для исследуемой культуры клеток карциномы молочной железы характерна гетерогенность, проявляющаяся в появлении в культуре двух популяций клеток – адгезивных и неадгезивных. Кроме того, в обеих популяциях наблюдается полиморфизм клеток, который сопровождается увеличением доли более крупных клеток неправильной формы в культуре с увеличением времени культивирования и числа пассажей.

В обеих популяциях культивируемых клеток опухоли отмечается высокая пролиферативная активность клеток, которая подтверждается достоверными изменениями показателей пролиферативной активности клеток – размеров ядер, ЯЦО.

Следовательно, гетерогенность и тенденция к увеличению размеров клеток в культуре карциномы молочной железы должны учитываться при дальнейшем культивировании с целью создания персонафицированных экспериментальных моделей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геращенко Т.С., Завьялова М.В. и др. Внутриопухолевого морфологическая гетерогенность рака молочной железы, как фактор, отражающий метастатический потенциал и чувствительность опухоли к химиотерапии/ ACTA NATURE, 2017. - Том 9, -№1 (32). С. 60-72
2. Галимова Э.С. Двухмерные и трёхмерные модели культуры клеток опухолей in vitro: преимущества и недостатки/ Галимова Э.С., Галагудза М.М. // Бюллетень сибирской медицины, 2018. -17(3).-С. 188-196.
3. Могиленских А.С. Оптимизация условий культивирования первичной культуры карциномы молочной железы человека/ Могиленских А.С., Сазонов С.В., Демидов С.М.//Материалы VI Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2020». С-Петербург, 2020.
4. Сазонов С.В. Бриллиант А.А., Бриллиант Ю.М., Фадеев Ф.А. , Демидов С.М. Опыт культивирования клеток карциномы молочной железы люминального подтипа//Материалы VII межрегиональной научно-практической конференции « Клеточные технологии – практическому здравоохранению». Екатеринбург. 6 декабря 2018 г. С. 115 - 128
5. Сазонов С.В. Изменение рецепторов клеток карциномы молочной железы люминального В подтипа при культивировании / Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Фадеев Ф.А., Улитко М.В. и др. //Морфология, 2019. –Т.155. -№2. –С.248.
6. Скворцова В.В. Выращивание культур опухолей в 3D-формате для исследования их ответа на лекарственное воздействие./Скворцова В.В., Полуконова Н.В., Бучарская А.Б.// Bulluten of Medical Internet Conferences (ISSN 2224-6150).- 2014. -Volume 4. – Issue 1.
7. Шамшурина Е.О. Морфологический анализ культуры клеток рака молочной железы /Шамшурина Е.О., Могиленских А.С., Сазонов С.В.//Успехи молекулярной онкологии.-2019. –Т.6. -№4. – С.88-89.
8. Шамшурина Е.О. Опыт культивирования клеток карциномы

молочной железы трой-но-го негативного подтипа. / Шамшурин Е. О., Могиленских А. С., Сазонов С. В., Улитко М. В., Демидов С. М., Титова С. А // Клеточные технологии – практическому здравоохранению: сборник статей VIII межрегиональной научно-практической конференции. – Екатеринбург, 2019. – С. 212-214.