

3. Анатомия Грея для студентов : Учебник для студентов мед. вузов / Ричард Л. Дрейк, А. Уэйн Фогль, Адам У. М. Митчелл. – Москва : ООО «Медицинское информационное агентство», 2020. – 120 с.
4. Гончаров, Н.И. Руководство по препарированию / Н.И.Гончаров, Л.С. Сперанский. – Волгоград: ВМА, 1994. – 217 с.
5. Кованова, В.В. Оперативная хирургия и топографическая анатомия / В.В. Кованова. – Москва: Медицина, 1995. – 49 с.
6. Сапин, М.Р. Нормальная и топографическая анатомия человека: учебник в 3 томах. Т. 1 / М.Р. Сапин, Д. Б. Никитюк. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2010. – 640 с.
7. Netter, Frank H. Atlas of Human Anatomy / Frank H. Netter. – 6th ed. – Philadelphia: Elsevier, 2014. – 531 p. : il.

Сведения об авторах

А. В. Лунегова* – студент

Н. В. Ялунин – кандидат медицинских наук, доцент

Information about the authors

A.V. Lunegova* – student

N. V. Yalunin - Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor

***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

lunegovaanna72@gmail.com

УДК 616-006.699

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ЭСТРОГЕНА И ИНДЕКСА ПРОЛИФЕРАЦИИ KI-67 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦА ЛЮМИНАЛЬНОГО В HER-2 НЕГАТИВНОГО ПОДТИПА

Анна Сергеевна Могиленских^{1,2}, Екатерина Владимировна Гребенюк^{1,2}, Полина Александровна Чугаева¹

¹ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ

²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Актуальность изучения разнообразных взаимосвязей биологических свойств РМЖ обусловила проведение настоящего исследования. **Цель исследования** — определение уровней экспрессии рецепторов эстрогена и индекса клеточной пролиферации Ki67 в культуре клеток, полученной из образца люминального В HER-2 негативного подтипа на протяжении пяти пассажей. **Материал и методы.** Образец опухолевой ткани был получен в ходе операции у пациентки с диагнозом рак молочной железы справа, 40 л., стадия T1N0M. Из части материала были изготовлены парафиновые блоки для иммуногистохимического анализа (ИГХ). Получена клеточная культура. Произведен анализ эстрогена и Ki67 на протяжении пяти пассажей. **Результаты.** Уровень экспрессии эстрогена в клеточной культуре, полученной

от люминального В подтипа, сохранялся на протяжении первых четырех пассажей. На пятом пассаже экспрессия данного маркера отсутствует. Индекс клеточной пролиферации Ki-67 на P1, P3, P4 высокий (>14%) и составил 27%, 18%, 40% соответственно. На P2 и P5 клетки, экспрессирующие данный маркер, отсутствуют. **Выводы.** В клеточной культуре РМЖ полученной из образца люминального В подтипа уровень экспрессии эстрогена выше, чем в хирургическом образце и сохраняется до четвертого пассажа. Уровень пролиферативной активности, определенный с помощью индекса Ki-67, варьирует на протяжении культивирования. На пятом пассаже отсутствует экспрессия эстрогена и не выявляется маркер клеточной пролиферации Ki-67.

Ключевые слова: рак молочной железы, первичная культура, уровень пролиферативной активности Ki-67, рецепторы эстрогена

EVALUATION OF CHANGES IN ESTROGEN EXPRESSION LEVEL AND KI-67 PROLIFERATION INDEX DURING BREAST CANCER CELL CULTURE, DERIVED FROM A SAMPLE OF LUMINAL TO HER-2 SUBTYPE NEGATIVE

Anna S. Mogilenskikh^{1,2}, Ekaterina V. Grebenyuk^{1,2}, Polina A. Chugaeva¹

¹Ural state medical university

²Institute of Medical Cellular Technologies

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. The relevance of studying the various relationships of the biological properties of breast cancer led to the present study. **The purpose of the study** was to determine the expression levels of estrogen receptors and the Ki67 cell proliferation index in a cell culture obtained from a sample of the luminal B HER-2 negative subtype over five passages. **Material and methods.** A tumor tissue sample was obtained during surgery in a patient diagnosed with breast cancer on the right, 40 years old, stage T1N0M. Part of the material was used to prepare paraffin blocks for immunohistochemical analysis (IHC). Received cell culture. Estrogen and Ki67 were analyzed for five passages. **Results.** The expression level of estrogen in cell culture derived from the luminal B subtype was maintained throughout the first four passages. At the fifth passage, the expression of this marker is absent. The Ki-67 cell proliferation index on P1, P3, P4 is high (>14%) and amounted to 27%, 18%, 40%, respectively. There are no cells expressing this marker on P2 and P5. **Conclusions.** In the cell culture of breast cancer obtained from a sample of the luminal B subtype, the level of estrogen expression is higher than in the surgical sample and persists until the fourth passage. The level of proliferative activity, as determined by the Ki-67 index, varies throughout cultivation. At the fifth passage, estrogen expression is absent and the cell proliferation marker Ki-67 is not detected.

Keywords: breast cancer, primary culture, Ki-67 proliferative activity level, estrogen receptors

ВВЕДЕНИЕ

Исследования *in vitro* рака молочной железы (РМЖ) сыграли значительную роль в улучшении методов лечения, понимании клеточных и молекулярных механизмов, приводящих к распространению опухолевых клеток, определении путей возникновения лекарственной резистентности. Одной из таких моделей является первичная клеточная культура. Опухоль и ее микроокружение способно вызывать взаимные изменения в фенотипе и функциях, поддерживающих непрерывный процесс канцерогенеза [1,2].

На процесс развития рака молочной железы влияет изменение рецепторного аппарата клеток. Имеются данные, что клетки с высоким уровнем экспрессии рецепторов эстрогена участвуют в формировании метастазов и приводят к эпителиально-мезенхимальному переходу клетки [3].

В настоящее время используется ряд клеточных маркеров для определения терапии случаев РМЖ положительных или отрицательных по рецепторам эстрогена и прогестерона. Одним из таких маркеров является ядерный белок Ki-67, отражающий величину клеточной фракции роста в опухолевой ткани. Имеются данные о связи экспрессии Ki-67 с особенностями рецепторного аппарата клеток. Так, в опухолевой ткани гормон-рецептор-негативных раков молочной железы более высокий уровень пролиферативных процессов по сравнению с гормон-рецептор-позитивными подтипами рака [4, 5].

Актуальность изучения разнообразных взаимосвязей биологических свойств РМЖ обусловила проведение настоящего исследования.

Цель исследования — определение уровней экспрессии рецепторов эстрогена и индекса клеточной пролиферации Ki67 в культуре клеток, полученной из образца люминального В HER-2 негативного подтипа на протяжении пяти пассажей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Образец опухолевой ткани был получен в ходе операции у пациентки с диагнозом рак молочной железы справа, 40 л., стадия T1N0M. Материал из Городского маммологического центра ГКБ № 40, г. Екатеринбург, зав. – проф. Демидов С.М. Наличие клинического диагноза и добровольное согласие пациентки послужили критерием включения образца в исследование. Работа одобрена локальным этическим комитетом УГМУ протокол № 1 от 24.01.20.

Из части материала были изготовлены парафиновые блоки для иммуногистохимического анализа (ИГХ). Исследования выполнялись в патологоанатомическом отделении ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г.Екатеринбург, зав. отделением – проф. Сазонов С.В.

ИГХ реакции осуществлялись в автостейнере ДАКО, Дания. Определение экспрессии HER-2/neu на клетках опухоли осуществлялось с помощью моноклональных антител к Her2/neu (clone 4B5, Rabbit Monoclonal primary Antibody, Ventana, США), рецепторов эстрогена и прогестерона на ядрах клеток опухоли — с помощью моноклональных антител к рецепторам эстрогенов (клон 1D5, ДАКО, Дания), рецепторам прогестерона (клон PgR636, ДАКО, Дания). Для определения индекса клеточной пролиферации использовались антитела Ki-67 (Clone SP6, Spring Bioscience, США). Ядра

клеток докрашивали гематоксилином. Другую часть материала доставляли в лабораторию клеточных культур в стерильных условиях. Полученные образцы измельчали и оставляли на ночь для ферментативной диссоциации на качающейся платформе при н.у.. Полученную взвесь центрифугировали при 1,4 RPM (5 мин), при 0,7 RPM 30 сек). Полученный осадок ресуспендировали сначала с трипсином (Gibco™, США), затем с диспазой-днказой (STEMCELL, Канада). Между ферментативной обработкой смесь центрифугировали при 1,4 RPM (5 мин). Затем клеточный осадок растворяли в питательной среде Mammoscult™ Human Medium (STEMCELL, Канада) и помещали в культуральные флаконы. Для пересева клеточную культуру диссоциировали в трипсине (Gibco™, США), часть осадка распределяли на предметные стекла, покрытые коллагеном 1:46 (STEMCELL, Канада) и помещенные в чашки Петри, культивировали 1-2 дня для проведения иммуноцитохимического исследования (ИЦХ). Далее стекла высушивали, фиксировали в 10% нейтральном формальдегиде в течение 2-3 часов, затем проводили демаскировку в водяной бане. Для определения ядерного индекса пролиферации и определения рецепторов эстрогена использовались те же антитела, что и при ИЦХ. Подсчет производился по процентному отношению числа окрашенных к общему количеству клеток культуры при увеличении оптического микроскопа x200 Meiji Techno MT4200L (Япония) в нескольких случайно выбранных полях зрения. В каждом случае оценивали не менее 500 клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При иммуногистохимическом исследовании материала обнаружена экспрессия рецепторов эстрогена — 3 балла, к прогестерону — 7 баллов по шкале Allred, индекс клеточной пролиферации Ki67 составил 30%. Экспрессия к HER-2/neu 0. Данный случай рака молочной железы относится к люминальному В подтипу, HER-2- негативному.

При иммуноцитохимическом исследовании с первого по пятый пассаж были обнаружены клетки, экспрессирующие эстроген и Ki-67 (Рис. 1).

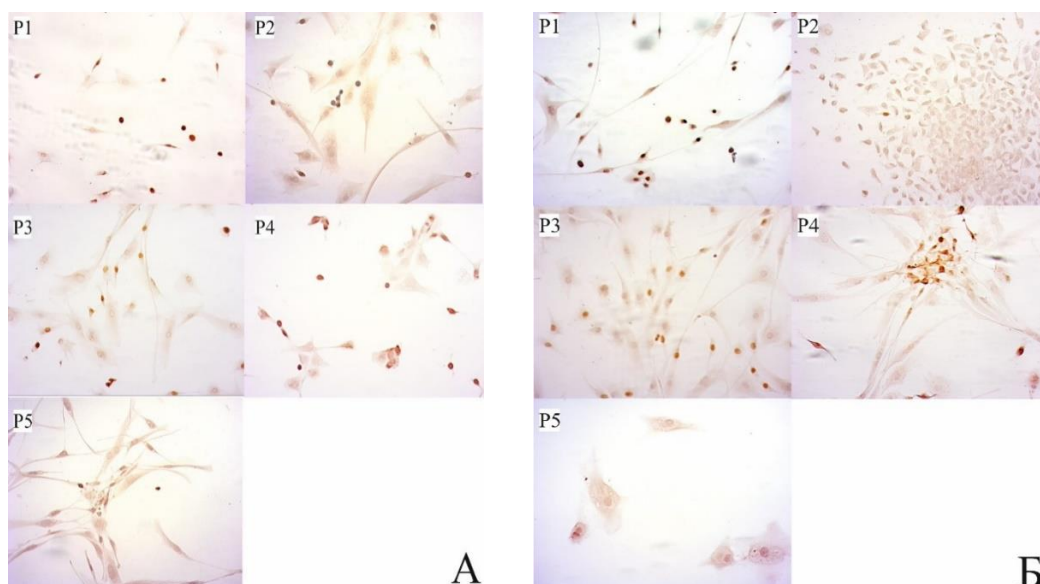


Рис. 1 Иммуноцитохимическое исследование, А – экспрессия к рецептору эстрогена с P1-P5, Б – экспрессия Ki-67 с P1-P5, световая микроскопия, ув. 200х.

Уровень экспрессии эстрогена в клеточной культуре, полученной от люминального В подтипа, сохранялся на протяжении первых четырех пассажей. На пятом пассаже экспрессия данного маркера отсутствует.

Индекс клеточной пролиферации Ki-67 на P1, P3, P4 высокий (>14%) и составил 27%,18%,40% соответственно. На P2 и P5 клетки, экспрессирующие данный маркер, отсутствуют (Рис. 2).

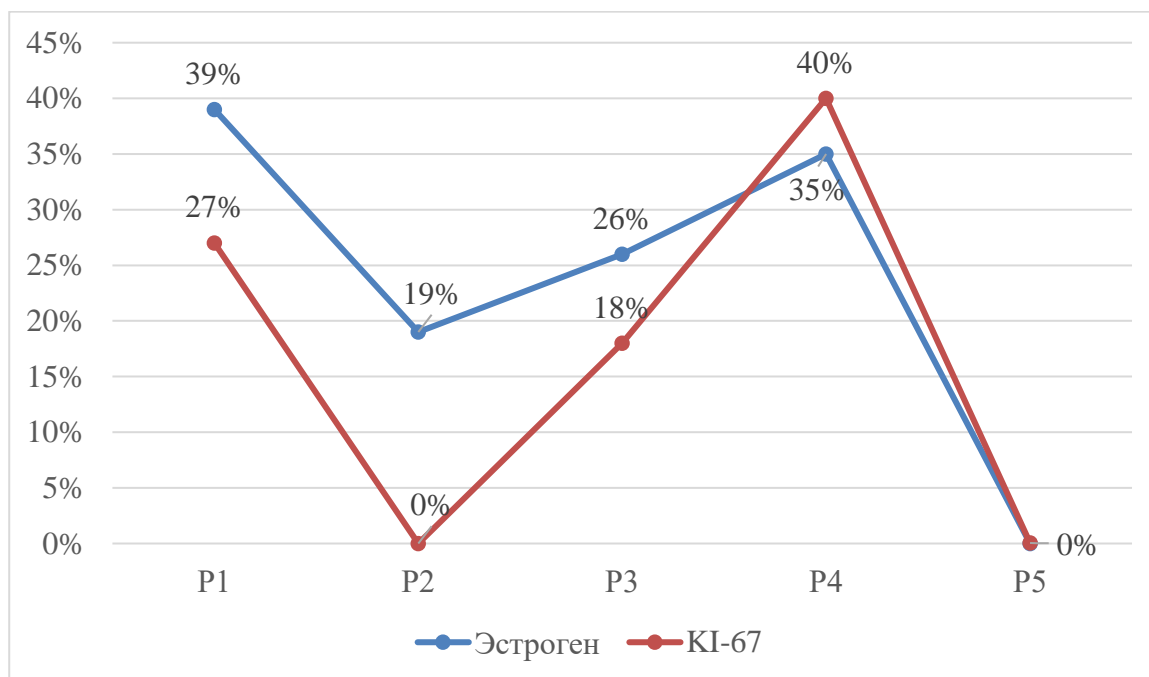


Рис. 2 Изменение рецепторного аппарата клеток в культуре, полученной от люминального В подтипа с первого по пятый пассаж

ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании первичной клеточной культуры РМЖ, полученной из образца люминального В подтипа был обнаружен высокий уровень экспрессии эстрогена, по сравнению с хирургическим образцом. Уровень пролиферативной активности, определенный с помощью индекса Ki-67, варьирует от 19% до 40%, в то время как при ИГХ анализе образца составил 30%. В некоторых исследованиях, посвященных получению первичных клеточных культур РМЖ, также отмечается тенденция к увеличению данного маркера в сравнении с гистологическим образцом [6]. На P2 и P5 не были выявлены клетки с экспрессией Ki-67, что свидетельствует об остановке активного клеточного деления.

В процессе культивирования экспрессия рецепторов эстрогена в клеточной культуре сохраняют высокие значения на P1, P3 и P4. С одной стороны, это противоречит данным о том, что уровень индекса клеточной пролиферации обратно коррелирует с экспрессией гормональных рецепторов. С

другой стороны, может свидетельствовать об эпителиально-мезенхимальном переходе [3].

На пятом пассаже происходит трансформация культуры, которая приводит к потере как рецепторов эстрогена, так и полному отсутствию уровня пролиферативных процессов. В то время как при получении других клеточных культур на пятом пассаже сохранялась экспрессия эстрогена при снижении уровня Ki-67 [7].

ВЫВОДЫ

1. В клеточной культуре РМЖ полученной из образца люминального В подтипа уровень экспрессии эстрогена выше, чем в хирургическом образце и сохраняется до четвертого пассажа.

2. Уровень пролиферативной активности, определенный с помощью индекса Ki-67, варьирует на протяжении культивирования.

3. На пятом пассаже отсутствует экспрессия эстрогена и не выявляется маркер клеточной пролиферации Ki-67.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Межевова, И. В. Первичные культуры опухолевых клеток: современные методы получения и поддержания *in vitro*. / И. В. Межевова, А. О. Ситковская, О. И. Кит //Южно-Российский онкологический журнал / South Russian Journal of Cancer. – 2020. – Т. 1, No 3. – С. 36-49.

2. Могиленских, А.С., Сазонов, С.В. Создание клеточных линий карциномы молочной железы / А. С. Могиленских, С. В. Сазонов //Гены и клетки. – 2021. - Т. 16, No 1. - С. 15-23.

3. Конышев, К.В., Сазонов, С.В. Изменение экспрессии иммуногистохимических маркеров в регионарных метастазах рака молочной железы / К. В. Конышев, С. В. Сазонов //Архив патологии. – 2020. – Т.82, No 4. – С. 19–26.

4. Должиков, А. А., Котляров, А. А., Мухина, Т. С. Изучение экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, Her2/неу, маркера пролиферации Ki67 и их взаимосвязей в раке молочной железы //Человек и его здоровье. – 2007. – Т. 1, No 4. – С. 37-44.

5. Сазонов, С. В., Бриллиант, А. А., Бриллиант, Ю. М. Связь состояния пролиферативных процессов и особенностей рецепторного аппарата опухолевых клеток карциномы молочной железы //Гены и клетки. – 2017. – Т. 12, No 4. – С. 76-81.

6. Minafra, L. et al. Unmasking epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer primary culture: a study report //ВМС research notes. – 2012. – Т. 5. – С. 1-10.

7. Сазонов С. В. и др. Первый опыт культивирования клеток рака молочной железы //Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2018. – Т. 15, No 6. – С. 860-867.

Сведения об авторах

Могиленских А.С.* – ассистент кафедры, научный сотрудник

Гребенюк Е.В. – аспирант, научный сотрудник

Чугаева П.А. – студент

Information about the authors

Mogilenskikh A.S.* – Department assistant, researcher
Grebenyuk E.V. – Postgraduate student, researcher
Chugaeva P.A. – student

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
annasajler@yandex.ru

УДК 616.8-089; 616-006.48

ЗНАЧЕНИЕ ЛИМФОЦИТАРНОЙ ИНФИЛЬТРАЦИИ В РАЗВИТИИ РЕЦИДИВОВ ШВАННОМ

Джамия Адильхановна Мурзаева^{1,2}, Мария Александровна Киселева², Артем Андреевич Долгушин¹, Альберт Акрамович Суфианов³, Андрей Юрьевич Орлов¹, Юлия Михайловна Забродская¹

¹Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова

Санкт-Петербург, Россия

²ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

³ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ

Тюмень, Россия

Аннотация

Введение. Шванномы – доброкачественные опухоли оболочек периферических нервов, которые способны к непредсказуемому клиническому поведению: от многолетней стабильности до местных рецидивов и даже малигнизации в злокачественные опухоли оболочек периферических нервов. В настоящий момент крайне актуальны исследования факторов риска неблагоприятного клинического курса опухолей, в связи с чем активно исследуется опухолевое иммунное микроокружение новообразований, так с помощью иммуногистохимических методов исследования можно оценить степень лимфоцитарной инфильтрации и ее роль в развитии рецидивов шванном. **Цель исследования** – оценить влияние лимфоцитарной инфильтрации на развитие рецидивов шванном. **Материал и методы.** В рамках исследования был проведен ретроспективный когортный анализ. Оценивался уровень иммуногистохимической экспрессии CD3 в послеоперационном материале пациентов с диагнозом «шваннома, grade 1». Критерии включения: пациенты 18 лет и старше; проведенное хирургическое лечение; наличие рецидивов; наличие гистологического архива; наличие информированного добровольного согласия. Критерии исключения: отсутствие катмнеза, гистологического архива, ИДС. Для анализа полученных данных использовались методы описательной статистики. **Результаты.** При оценке экспрессии CD3+ в послеоперационном материале исследуемых в зависимости от наличия рецидивов опухоли были получены следующие данные: у нерезидивных пациентов медиана показателя составила 10,0% (Q1-Q3: 5,0-17,5%), у пациентов с рецидивами – 5,5% (Q1-Q3: 2,0-7,0%). **Выводы.** В нерезидивных опухолях наблюдается более высокая