

Научная статья

УДК 616-006.699

Определение эпителиальной природы клеток и уровня пролиферативной активности Ki-67 в первичной культуре карциномы молочной железы

Артём Андреевич Медведев^{1✉}, Анна Сергеевна Могиленских²,
Ирина Артёмовна Гронь³, Елена Олеговна Шамшурина⁴,
Екатерина Владимировна Гребенюк⁵, Сергей Владимирович Сазонов⁶

^{1–6} Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

^{2–6} Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

✉ irina.gron243@gmail.com

Аннотация. *Введение.* Несмотря на то, что иммуногистохимический метод получил наибольшее распространение в клинической практике, его использование при исследовании культур клеток невозможно, поэтому в качестве альтернативного метода используется экспрессия молекулярных маркеров на клеточном уровне — иммуноцитохимический метод. *Цель исследования* — изучить возможность первичной клеточной культуры сохранять пролиферативную способность и эпителиальную природу клеток на протяжении нескольких пассажей. *Материал и методы.* В работе описан случай получения первичной клеточной культуры карциномы молочной железы. Проведено исследование индекса клеточной пролиферации Ki-67 и определение эпителиальной природы клеток. *Результаты.* При определении индекса клеточной пролиферации Ki-67 была отмечена тенденция к увеличению данного индекса на втором пассаже. Максимально низкий уровень был отмечен на первом пассаже и составлял 8,9% окрашенных клеток. Для определения возможности использования полученной культуры после процедуры криоконсервации было выполнено повторное исследование на оба белка на третьем пассаже. Полученные данные имеют статистически значимые различия по критерию Манна — Уитни и составляют для Ki-67 27,3% и 47,2%, для экспрессии цитокератина — 75% и 81% соответственно. *Обсуждение.* При получении клеточной культуры уровень индекса клеточной пролиферации Ki-67 соответствовал уровню изначального образца на первом пассаже. При дальнейших пересевах клетки культуры демонстрировали высокий индекс, что свидетельствует о высоком уровне пролиферативных процессов и может быть связан с особенностями рецепторного аппарата клеток. Уровень цитокератина свидетельствует об эпителиальной природе опухоли, что необходимо учитывать при разного рода молекулярных исследованиях эпителиальных кле-

ток in vitro. **Выводы.** Первичная культура карциномы молочной железы в ходе культивирования сохраняет преимущественно эпителиальную природу на протяжении трех пассажей и после криоконсервации. Индекс клеточной пролиферации Ki-67 меняется при пересевах культуры.

Ключевые слова: первичная клеточная культура, Ki-67, цитокератин, карцинома молочной железы

Для цитирования: Определение эпителиальной природы клеток и уровня пролиферативной активности Ki-67 в первичной культуре карциномы молочной железы / А. М. Медведев, А. С. Могиленских, И. А. Гронь [и др.] // Вестник УГМУ. 2022. № 3–4. С. 15–22.

Original article

Determination of the Epithelial Nature of Cells and the Level of Proliferative Activity of Ki-67 in the Primary Culture of Breast Carcinoma

Artyom A. Medvedev^{1✉}, Anna S. Mogilenskikh², Irina A. Gron³,
Elena O. Shamshurina⁴, Ekaterina V. Grebenyuk⁵, Sergey V. Sazonov⁶

^{1–6} Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia

^{2–6} Institute of Medical Cellular Technologies, Ekaterinburg, Russia

✉ irina.gron243@gmail.com

Abstract. Introduction. Despite the fact that the immunohistochemical method is the most widely used in clinical practice, its use in the study of cell cultures is impossible, therefore, expression of molecular markers at the cellular level, the immunocytochemical method, is used as an alternative method. *The aim of the study* was to study the possibility of primary cell culture to maintain the proliferative ability and epithelial nature of cells over several passages. *Material and methods.* The paper describes a case of obtaining a primary cell culture of breast carcinoma. A study of the Ki-67 cell proliferation index and determination of the epithelial nature of the cells was carried out. *Results.* When determining the index of cell proliferation Ki-67, there was a tendency to increase this index at the second passage. The lowest level was noted at the first passage and amounted to 8.9% of stained cells. To determine the possibility of using the obtained culture after the cryopreservation procedure, a second study was performed for both proteins at the third passage. The data obtained do have statistically significant differences according to the Mann–Whitney test and are 27.3% and 47.2% for Ki-67, 75% and 81% for cytokeratin expression, respectively. *Discussion.* The level of the Ki-67 cell proliferation index corresponded to the level of the initial sample at the first passage, when the cell culture was received. The cells showed a high index during further replanting. This indicates a high level of proliferative processes. This may be due to

the peculiarities of the receptor apparatus of cells. The cytokeratin level indicates the epithelial nature of the tumor. This should be taken into account in various kinds of molecular studies of epithelial cells in vitro. *Conclusion.* The primary culture of breast carcinoma during cultivation retains a predominantly epithelial nature for three passages and after cryopreservation. The cell proliferation index Ki-67 changes during culture subcultures.

Keywords: primary cell culture, Ki-67, cytokeratin, breast carcinoma

For citation: Medvedev AA, Mogilenskikh AS, Gron IA, Shamshurina EO, Grebenyuk EV, Sazonov SV. Determination of the epithelial nature of cells and the level of proliferative activity of Ki-67 in the primary culture of breast carcinoma. *Bulletin of USMU.* 2022; (3–4):15–22. Russian.

Введение. Иммуногистохимический (ИГХ) метод, получивший наибольшее распространение в клинической практике, стал золотым стандартом в определении рецепторов эстрогена, прогестерона и онкопротеина HER2/neu в клетках карциномы молочной железы (КМЖ). Метод позволяет определить число положительно реагирующих клеток, оценить степень интенсивности реакции и дать точную рецепторную характеристику опухоли [1–3]. При исследовании культур клеток использование данного метода невозможно, поэтому в качестве альтернативного метода используется экспрессия молекулярных маркеров на клеточном уровне — иммуноцитохимический метод (ИЦХ). Однако не всегда протоколы по демаскировке и последующему окрашиванию сопоставимы для клеток и ткани.

В данном исследовании на цитологическом материале, полученном от клеток КМЖ определенного подтипа, определялось два параметра: уровень экспрессии цитокератина и индекс пролиферации опухоли с помощью ядерного белка Ki-67. Имеются данные о том, что уровень цитокератина меняется при эпителиально-мезенхимальном переходе, что играет важную роль в изучении процессов метастазирования [4–9]. Ядерный белок Ki-67 присутствует во всех активно пролиферирующих клетках, что позволяет использовать его как маркер при постановке онкологического диагноза. Резкое снижение уровня Ki-67 происходит на поздних стадиях митоза во время анафазы и телофазы [9].

Цель исследования — изучить возможность первичной клеточной культуры сохранять пролиферативную способность и эпителиальную природу клеток на протяжении нескольких пассажей

Материалы и методы. Материал был получен в ходе хирургического вмешательства у пациентки с диагнозом «карцинома молочной железы». Работа одобрена локальным этическим комитетом (ЛЭК) Уральского государственного медицинского университета (УГМУ) (протокол № 1 от 24.01.2020). Наличие клинического диагноза, отсутствие терапии перед операцией и добровольное согласие пациентки послужили критерием включения образ-

ца в исследование. Из части материала была получена первичная клеточная культура. Выделение клеток производилось ферментативным способом. Для этого измельченный образец помещали в смесь коллагеназы — гиалуронидазы и инкубировали около 15—16 ч в отсутствии CO_2 на шейкере. После чего выделяли осадок, содержащий предположительно эпителиальную фракцию клеток (центрифугировали при 0,7 RPM 30 с). Полученный осадок ресуспендировали сначала с трипсином, затем с диспазой — ДНКазой. Между ферментативной обработкой смесь центрифугировали при 1,4 RPM (5 мин). Затем клеточный осадок растворяли в питательной среде Mammocult™ Human Medium (STEMCELL) и помещали в культуральные флаконы. Для пересева клеточную культуру диссоциировали в трипсине, часть осадка распределяли на предметные стекла, покрытые коллагеном и помещенные в чашки Петри, культивировали 1—2 дня для проведения ИЦХ-исследования. Фиксация образцов осуществлялась в 10 % нейтральном формальдегиде. Для подготовки к ИЦХ выполняли проводку по ксилолам и спиртам. При определении принадлежности клеток к эпителиоцитам с использованием антитела anti-Pan Keratin (AE1/AE3/РСК26) Primary Antibody (Roche diagnostics, США) демаскировка проводилась в растворе Тритон X-100 (10 мин) и трипсина (10 мин). Для определения индекса Ki-67 демаскировку проводили в цитратном буфере на водяной бане в течение 90 мин. На каждом пассаже полученную культуру подвергали процедуре криоконсервации по стандартным протоколам. Для заморозки использовали среду «Криомед» (Россия). Контроль за ростом культуры проводился с помощью микроскопа Eclipse TS100, Nikon, определение подтипа осуществлялось с помощью микроскопа Meiji Techno MT4200L.

Из другой части материала были изготовлены парафиновые блоки для иммуногистохимической оценки опухоли. Иммуногистохимические реакции осуществлялись в автостейнере DАСО (Дания). Для определения экспрессии к рецепторам срезы окрашивали моноклональными антителами к рецепторам эстрогенов (клон 1D5, Dako, Дания), рецепторам прогестерона (клон PgR636, Dako, Дания), Ki-67 (клон MIB-1, Dako, Дания), а также моноклональными антителами к HER2/neu (clone 4B5, Rabbit Monoclonal primary Antibody, Ventana, США). Ядра клеток докрашивали гематоксилином. Для статистической обработки использовался непараметрический U-критерий Манна — Уитни, подсчет производился в программе MS Excel. При проверке гипотезы критический уровень значимости $p = 0,05$.

Результаты. По итогам иммуногистохимического исследования образца КМЖ выявлена экспрессия рецепторов Эстрогена (ER) — 20 баллов, Прогестерона (PR) — 70 баллов, Ki-67—10 %, амплификация гена HER2 — отсутствует. Согласно классификации иммуногистохимических подтипов КМЖ данный образец относится к люминальному А подтипу. Определяли по шкале Allred от 0 до 8 баллов, учитывающей одновременно количество окрашенных

ядер опухолевых клеток и интенсивность их окраски, уровень пролиферации клеток опухоли по экспрессии Ki-67 рассчитывали по процентному отношению числа окрашенных ядер опухолевых клеток ко всем клеткам (%) [9].

Полученную из образца культуру КМЖ анализировали в течение трех пассажей. При определении индекса клеточной пролиферации Ki-67 была отмечена тенденция к увеличению данного индекса на втором пассаже. Максимально низкий уровень был отмечен на первом пассаже и составлял 8,9 % окрашенных клеток (рис.).

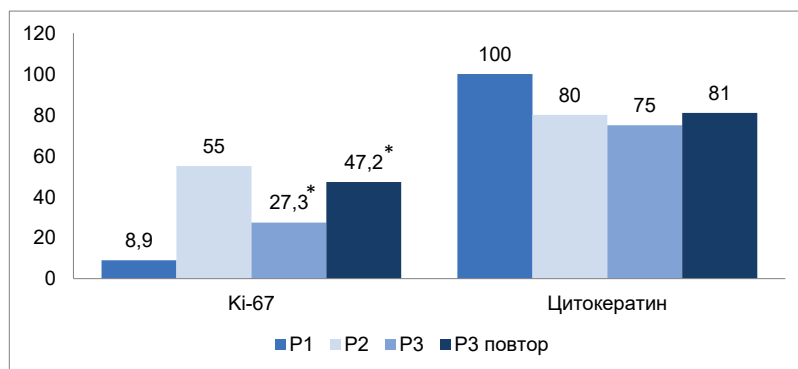


Рис. Соотношение окрашенных клеток экспрессирующих белок Ki-67 и цитокератин, % (* — $p < 0,05$, критерий Манна — Уитни)

На всех пассажах большинство клеток демонстрируют эпителиальный фенотип. На третьем пассаже процент данных клеток снижается до 75 % при первом исследовании.

Для определения возможности использования полученной культуры после процедуры криоконсервации было выполнено повторное исследование на оба белка на третьем пассаже. Для Ki-67 полученные значения имеют значимые различия и составляют 27,3 % и 47,2 % ($p < 0,05$, критерий Манна — Уитни), для уровня экспрессии цитокератина различий не обнаружено, уровень составил 75 % и 81 % ($p > 0,05$, критерий Манна — Уитни).

Обсуждение. При использовании первичной культуры как модели для персонализированной терапии рака необходимо учитывать молекулярно-генетические изменения, происходящие в клетках во время получения культуры, криоконсервации и других процессов, необходимых для поддержания и сохранения клеток [10].

Белок Ki-67 свидетельствует о высоком уровне пролиферативных процессов и связан с особенностями рецепторного аппарата клеток. Так, гормон-рецептор-негативные подтипы опухоли демонстрируют более высокие уровни пролиферативной активности, чем гормон-рецептор-позитивные подтипы [6].

Для исследования был взят образец ткани опухоли люминального А подтипа с низким уровнем Ki-67—10 %. В ходе работы была выявлена тенденция к увеличению уровня Ki-67 на втором и третьем пассажах (55 % и 47,2 %) по сравнению с уровнем данного белка в гистологическом образце ткани и первым пассажем. На данный момент нет работ, посвященных первичным культурам, полученным от образца с низкой пролиферативной активностью.

В исследованиях первичных культур, полученных из образцов люминального В подтипа, также наблюдается повышение уровня Ki-67 при пересевах, по сравнению с образцом ткани. Так, С. В. Сазонов с соавторами (2018) продемонстрировали увеличение уровня Ki-67 на первом пассаже до 30 %, на втором и третьем до 40 % и на четвертом до 52 %, по сравнению с начальным уровнем в опухолевой ткани — 30 % [11]. Увеличение количества клеток с экспрессией Ki-67 свидетельствует о том, что большая часть клеток в культуре находится в активных фазах клеточного цикла [11]. Однако опухоли люминального А подтипа характеризуются низким уровнем Ki-67, поэтому повышение уровня этого белка может быть ограничением к использованию культуры как модели для исследования внутриопухолевых процессов *in vitro*.

При получении первичной клеточной культуры КМЖ также необходимо учитывать, что в образцах опухоли помимо эпителиальных клеток присутствует большое количество фибробластов, которые при культивировании быстрее приспособляются к условиям *in vitro*. Количество клеток, экспрессирующих цитокератин, на всех пассажах оставалось высоким, что свидетельствует о сохранении эпителиальной природы культуры [10—11], в то время как многие авторы указывают на увеличение количества клеток, экспрессирующих мезенхимальный белок виментин [6—7].

Еще одним ограничением в применении клеточной линии, полученной от первичной культуры, может быть изменение молекулярно-биологических характеристик после криоконсервации. Наши результаты показывают значимые изменения в уровне Ki-67 после разморозки и повторного культивирования на третьем пассаже (27,3 % и 47,2 %).

Выводы. Первичная культура карциномы молочной железы в ходе культивирования сохраняет преимущественно эпителиальную природу на протяжении трех пассажей и после криоконсервации. Индекс клеточной пролиферации Ki-67 меняется при пересевах культуры.

Список источников

1. Савостикова М. В., Коротких И. Ю., Лактионов К. П. Иммуноцитохимическое определение важнейших факторов прогноза у больных раком молочной железы // Онкология. Журнал им. П. А. Герцена. 2014. Т. 3, № 1. С. 33–36.

2. Кайгородова Е. В. Циркулирующие опухолевые клетки: клиническое значение при раке молочной железы (обзор литературы) // Вестник РАМН. 2017. Т. 72, № 6. С. 450–457.

3. Волченко Н. Н., Савостикова М. В. Иммуноцитохимическое исследование при раке молочной железы // Маммология. 2006. № 4. С. 18–21.

4. Бриллиант Ю. М., Бриллиант А. А., Сазонов С. В. Эпителиальные кадгерины и ассоциированные с ними молекулы при инвазивном дольковом раке молочной железы // Архив патологии. 2017. Т. 79, № 1. С. 12–18.

5. Expression of WNT, Hedgehog and NOTCH signaling pathways in HER-2 overexpressed and triple negative subtypes of breast cancer with high and low content of cancer stem cells/S. Demidov, S. Sazonov, A. Brilliant, Y. Brilliant//Annals of Oncology. 2020. Vol. 31, Iss. 2. P. S30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.03.176>.

5. Экспрессия виментина в культурах клеток эпителиальных опухолей человека / Т. А. Богуши, С. А. Калужный, М. Р. Четыркина [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. 2018. Т. 5, № 2. С. 24–30.

6. Экспрессия белков промежуточных филаментов клеток при получении маммосфер / А. С. Могиленских, Е. В. Гребенюк, Е. О. Шамшурина [и др.] // VII Петербургский международный онкологический форум «Белые Ночи 2021»: тез. форума: материалы VII Петербург. международ. онколог. форума, Санкт-Петербург, 21–27 июня 2021 г. Санкт-Петербург: Вопросы онкологии, 2021. С. 90.

7. Inhibition of proliferation of small intestinal and bronchopulmonary neuroendocrine cell lines by using peptide analogs targeting receptors / M. Kidd, A. V. Schally, R. Pfragner [et al.] // Cancer. 2008. Vol. 112, Iss. 6. P. 1404–1410.

8. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis / D. C. Allred, J. M. Harvey, M. Berardo [et al.] // Mod Pathol. 1998. Vol. 11, Iss. 2. P. 155–168.

9. 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, № 4. С. 76–81.

10. Первый опыт культивирования клеток рака молочной железы / С. В. Сазонов, А. А. Бриллиант, Ф. А. Фадеев // Вестник Урал. мед. академ. науки. 2018. Т. 15, № 6. С. 860–867.

Сведения об авторах

Артём Андреевич Медведев — ассистент кафедры гистологии, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия). E-mail: medvedevarteym.m@yandex.ru.

Анна Сергеевна Могиленских — аспирант кафедры гистологии, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия). E-mail: annasajler@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7145-0733>.

Ирина Артёмовна Гронь — студент, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия). E-mail: irina.gron243@gmail.com.

Елена Олеговна Шамшурина — кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия). E-mail: elshamshurina@gmail.com.

Екатерина Владимировна Гребенюк — аспирант кафедры гистологии, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия). E-mail: id-1111@mail.ru.

Сергей Владимирович Сазонов — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия). E-mail: prof-ssazonov@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7064-0079>.

Information about the authors

Artyom A. Medvedev — Assistant of Department of Histology, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia). E-mail: medvedevarteym.m@yandex.ru.

Anna S. Mogilenskikh — Postgraduate Student of Department of Histology, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia). E-mail: annasajler@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7145-0733>.

Irina A. Gron — Student, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia). E-mail: irina.gron243@gmail.com.

Elena O. Shamshurina — Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor of Department of Histology, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia).

Ekaterina V. Grebenyuk — Postgraduate Student of Department of Histology, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia). E-mail: elshamshurina@gmail.com.

Sergey V. Sazonov — Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Head of Department of Histology, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia). E-mail: prof-ssazonov@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7064-0079>.