

2. К концу беременности общий белок снижается. Среднее значение по I триместру –  $71,75 \pm 5,59$ ; по II триместру –  $66,13 \pm 4,76$ ; по III триместру –  $64,39 \pm 4,84$ . При норме 65-85 г/л.;

3. У некоторых беременных (16%) была замечена тенденция к повышению содержания глюкозы в крови (max – 6,18 при норме 3.3-5.09 ммоль/л), что говорит о развитии гестационного сахарного диабета;

4. Мочевина и билирубин в пределах нормы.

**Литература:**

1. Акушерство: национальное руководство // Под ред. Э.К. Айламазяна, В.И. Кулаковой, В.Е. Радзинского, Г.М. Савельевой – М. ГЭОТАР Медиа: – 2013. – 1200 с.

2. Сидорова И. С. Материалы III Российского форума "Мать и дитя" / И.С. Сидорова, Т.А. Протопопова, А.Б. Репин // – М.: – 2001. – С. 196-197.

3. Суханова Л.П. Статистика родовспоможения в России: тенденции, проблемы, пути совершенствования // Электронный научный журнал. Социальные аспекты здоровья и населения. – 2009. – № 2.

УДК 576.535.5

**В.В. Мелехин, Н.В. Дорофеева, П.А. Ошурков, О.Г. Макеев  
КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ МАЛОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ  
АДЕНОКАРЦИНОМЫ ИЗ МЕТАСТАЗА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПОДБОРА ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ  
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ**

Кафедра медицинской биологии и генетики  
Уральский государственный медицинский университет  
Лаборатория технологий геной и клеточной терапии  
Институт медицинских клеточных технологий  
Уральский федеральный университет имени первого Президента России

Б.Н. Ельцина

Екатеринбург, Российская Федерация

**V.V. Melekhin, N.V. Dorofeeva, P.A. Oshurkov, O.G. Makeev  
CELL LINE OF POORLY DIFFERENTIATED ADENOCARCINOMA  
FROM METASTASES OF HUMAN BREAST CANCER FOR DEVELOPING  
A PERSONALIZED TUMOR THERAPY**

Department of medical biology and genetics

Ural state medical university

Institute of medical cell technologies

Ural federal university

Ekaterinburg, Russian Federation

**Контактный e-mail:** larim@mail.ru

**Аннотация.** В статье рассмотрен способ получения первичной культуры клеток из метастаза рака молочной железы человека и выделения клонов полученной линии. Проведены исследования клоногенной и пролиферативной активности полученных клонов.

**Annotation.** The article deals a process of preparing a primary culture of cells from the human metastatic breast cancer isolating line clones to investigate a clonogenic and proliferative activity.

**Ключевые слова:** раковые клетки, клеточные линии, рак молочной железы человека.

**Keywords:** cancer cell, cell lines, human breast cancer.

В рамках современной парадигмы развития медицины акцент в исследовании по разработке и подбору эффективных средств терапии онкологических заболеваний смещается в сторону подбора персонифицированных методов лечения. Создание последних реализуется в нескольких направлениях. Так, разработка противоопухолевых вакцин предусматривает внесение в клетки генетических конструкций, обеспечивающих распознавание этих клеток собственной иммунной системой пациента. Одновременно большое внимание исследователей привлекает использование локальной химиотерапии, требующей апробации средств терапии на клеточных линиях из опухолевой ткани пациентов при культивировании *in vitro*. Между тем, развитие данных направлений тормозится сложностью получения стабильной линии опухолевых клеток человека. Поэтому отработка алгоритма получения культуры трансформированных клеток составляет основную задачу начального этапа создания персонифицированных противоопухолевых препаратов.

**Цель исследования** – отработка методики получения культуры клеток метастаза рака молочной железы человека.

#### **Материалы и методы исследования**

##### *Забор ткани*

Материал для исследования получен из ткани удаленного метастаза пациентки Ч., 1952 года рождения, наблюдавшейся с диагнозом: «Метастаз рака молочной железы в тело L3 позвонка с эпидуральным компонентом, компрессией спинного мозга 2-3 степени». Комплексное лечение рака молочной железы проведено в 2013 году (мастэктомия, курс ПХТ). При госпитализации: радикулярный болевой синдром L3 слева; периферический умеренный парез L3 корешка слева; люмбалгия; состояние после ляминэктомии, ТПФ L2-L4. В условиях стационара ГБУЗ СО «Свердловский областной онкологический диспансер» было проведено плановое хирургическое лечение: тотальная корпэктомия L3, спондилорез MESH-имплантом. Гистологическое заключение операционного материала: метастаз

железисто-скirrosного рака молочной железы. Кроме того, интраоперационно несколько фрагментов опухоли были помещены в стерильный физиологический раствор и доставлены в лабораторию в течение 4 часов от момента забора ткани при температуре +4°C для проведения исследований.

#### *Получение первичной культуры*

В условиях ламинарного потока ткань обрабатывали 70% этанолом в течение 30 сек. и промывали фосфатным буфером. После механического измельчения, фрагменты размером до 4мм<sup>3</sup> распределяли по культуральным флаконам, содержащим культуральную среду DMEM (Sigma Aldrich), фетальную бычью сыворотку (9:1, Sigma Aldrich) и антибиотики в стандартной концентрации (пенициллин 100U/мл, стрептомицин 100мкг/мл).

Культивирование проводили при 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе Sanyo. Дезагрегацию фрагментов производили на 3 сутки с использованием раствора неочищенной коллагеназы в концентрации 200 ед./мл. Клетки отмывали от фермента трехкратным переосаждением в фосфатном буфере (150g, 5 минут). Взвесь клеток переносили в новые культуральные флаконы, которые помещали в инкубатор для культивирования при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% влажности с ежедневным макро- и микроскопическим контролем с использованием инвертированного микроскопа Olympus CX41 при x40, x200. Смену среды осуществляли каждые 3 суток на 60% от общего объема [1]. Одиночно расположенные клетки, адгезированные на поверхности культурального флакона, были отмечены уже через 24 часа после отмывания от фермента.

Первое субкультивирование проводилось при достижении культурой 80% конfluence на 6 сутки после ферментативной дезагрегации по стандартной методике [3]. 2/3 от общего количества клеток в виде суспензии переносили на новую культуральную поверхность.

#### *Выделение клонов*

Для выделения клонов использовали клеточную культуру, находящуюся на третьем пассаже. Клетки высевали в посевной концентрации 20 клеток на 1 см<sup>2</sup> площади и культивировали в стандартных условиях в течение 2 недель – до визуализации видимых невооруженным глазом колоний. Каждую колонию изолировали металлическим кольцом, внутри которого с помощью стандартной методики трипсинизации клетки снимали и пересевали. Манипуляции повторяли до получения трех пролиферативно активных клонов.

Клоны, после наращивания необходимого клеточного объема, характеризовали по эффективности посева и клонирования. Для этого клетки каждого клеточного клона высаживали в низкой посевной концентрации (20 клеток на 1 см<sup>2</sup>). Контроль прикрепившихся клеток производили через 6 часов после пассажа, контроль клоногенной активности – через две недели, промежуточный микроскопический контроль – раз в три дня. Расчет производился по формулам:

$$N_2 / N_1 \times 100 = PE \quad \text{и} \quad N_3 / N_1 \times 100 = SE,$$

где:  $N_1$  – количество посеянных клеток,  $N_2$  – количество сформированных колоний,  $N_3$  – количество прикрепившихся клеток, PE – эффективность культивирования, SE – эффективность посева.

#### *Морфологическая оценка*

Для морфологического исследования клонов клетки высевали на чашки Петри (Sarstedt), в 4-х повторностях для каждого клона. После достижения культурой log-фазы и 70% конфлюентности клетки закрепляли 80% этанолом и окрашивали по методу Романовского.

#### *Построение кривой роста*

Для построения кривой роста [2] клетки выделенного клона были посажены на 10 культуральных флаконов (Orange), с посевной концентрацией  $5 \times 10^3$  клеток на  $\text{см}^2$ . Для проведения подсчета клеток каждый день из эксперимента выводился один культуральный флакон, с которого клетки снимались с помощью 0,25% раствора трипсина. Подсчет клеток производился на камере Фукса-Розенталя в 10-кратной повторности. На основании полученных данных была построена и проанализирована кривая роста.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью программы Excel. При построении кривой роста использовали критерий Манна-Уитни.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

##### *Клоногенная активность*

При получении культуры клеток из ткани метастаза молочной железы были выделены три клеточных клонов. Для получения характеристики жизнеспособности и пролиферативной активности полученных линий, была проведена оценка эффективности культивирования и посева (табл.).

Таблица

Сравнение жизнеспособности трансформированных клеточных линий, полученных из разных клонов одной культуры, по показателям эффективности культивирования и посева

Клон	Количество чашек	Посевная концентрация, (клеток/ $\text{см}^2$ )	Среднее количество колоний в чашке	Эффективность культивирования, %	Эффективность посева, %
1	10	20	1,0	0,52	85
2	10	20	1,1	0,57	88
3	10	20	1,4	0,73	93

Как следует из таблицы, полученные клеточные линии проявляли умеренную клоногенную активность: при посевной концентрации равной 20 клеток на  $1 \text{ см}^2$ , среднее количество колоний у разных клонов составляло от 1 до 1,4 на одну чашку. В то же время, полученная культура клеток продемонстрировала высокую эффективность посева: от 85 до 93%.

##### *Морфологический анализ*

При анализе первичной культуры выявлена слабая морфологическая гетерогенность клеток. Культура представлена мономорфными крупными клетками веретеновидной, отростчатой и треугольной формы с крупным ядром и несколькими ядрышками. Клеточные контакты выражены слабо.

Исследование морфологии полученных клонов выявило морфологические различия клеточных линий. Для клонов 1 и 2 характерно преобладание функционально активных клеток с овальным, хорошо контурированным ядром, выраженными клеточными контактами и наличием не более 3 ядрышек. Клетки имели преимущественно веретеновидную и отростчатую форму. В цитограмме культуры клона 3 отмечено нарастание полиморфизма клеток с увеличением конфлюентности, что характерно для культур, полученных из опухолевых тканей. Культура представлена клетками с одним или двумя ядрами и наличием не менее двух ядрышек. Контуры клеток и клеточные контакты выражены отчетливо. После достижения культурой более 70% конфлюентности отмечалось появление многочисленных скоплений мелких округлых клеток с меньшей оптической плотностью цитоплазмы. Данные колонии были окружены более крупными клетками с одним или двумя крупными отростками. Между такими колониями располагались крупные и мелкие клетки веретеновидной, треугольной и отростчатой форм с одним или двумя ядрами, содержащих не менее трех ядрышек.

#### *Кривая роста*

В процессе исследований были получены данные, на основании которых произведено построение кривых роста культур, полученных из различных клонов (рис.).

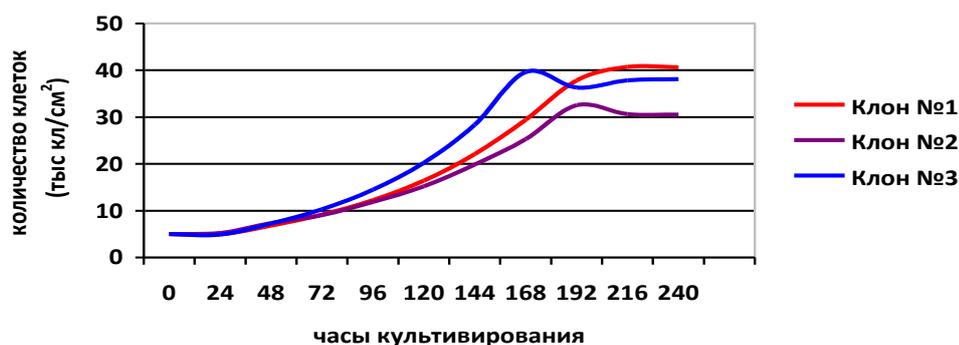


Рис. Кривая роста культур клеток, полученных из ткани метастаза рака молочной железы

Анализ кривой роста позволил определить продолжительность фаз роста клеток и сравнить эти показатели у полученных линий. Как следует из графика, выход на lag-фазу для всех линий наблюдался к 24 часам. При этом уже на примере log-фазы, прослеживаются заметные различия: для линий 1 и 2 клонов она составила 168 часов, а у линии 3 клона log-фаза продолжалась менее 144 часов. Фаза Плато, в которой количество клеток стабилизировалось, достигалась к 8 и 7 сутки соответственно. Минимальный показатель среднего периода удвоения был продемонстрирован культурой 3 клона и составил 33,8

часов. Для культур 1 и 2 клонов период удвоения - от 35,9 до 37 часов. Также различалось максимальное количество клеток. Так, зарегистрированное в культуре из 1 клона к 9 суткам, оно составило 40,72 тыс. клеток на см<sup>2</sup>. Сопоставимый результат по этому показателю был получен для клеток 3 клона: 39,64 тыс.кл./см<sup>2</sup> на 7 сутки эксперимента. Однако максимальное количество клеток культуры 2 клона оказалось существенно ниже: 32,54 тыс.кл./см<sup>2</sup> на 8 сутки.

Представленные различия свидетельствуют о гетерогенности клеточного состава опухоли, что подтверждает известные представления о различной клоногенной и пролиферативной активности клонов, выделенных из одного образца опухоли. Важным представляется то, что различные клеточные линии одной опухоли могут различаться иммуногенностью, генерируемой в процессе создания противоопухолевой вакцины. Учет этих данных также позволит более эффективно определять индивидуальную чувствительность пациента к планируемой противоопухолевой терапии.

**Выводы:**

1. Клоногенная и пролиферативная активность, а также морфология клеточных линий, выделенных из разных клонов одной опухоли различаются, что позволяет предположить различную индуцируемую иммуногенность;

2. Разработанный алгоритм может быть использован для получения клеточных культур из опухолевых тканей для создания противоопухолевой вакцины, исследований добавочной экспрессии генов на трансформированные клетки, повышения эффективности персонифицированной терапии для пациентов онкологического профиля.

**Литература:**

1. Миронова Л.Л. Опыт создания банка авторских линий перевиваемых клеток и их применение в вирусологической практике / Л.Л. Миронова, В.Д. Попова, О.И. Конюшко, Ю.Х. Хапчаев, Д.В. Зыбин, А.С. Акопян // Биотехнология. – 2000. – №6. – С.41-47.

2. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство // пер. с 5-го англ. Изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2011. – 691 с.

3. Langdon S.P. Cancer cell culture. Method and protocols / Methods in Molecular Medicine, vol. 88: Humana Press Inc., Totowa, NJ

УДК 612.29, 615.835.56

**Т.В. Миногина, А.А. Курносенко, Е.И. Зерчанинова**  
**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ**  
**ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА УЧАЩИХСЯ ПОДРОСТКОВОГО**  
**ВОЗРАСТА**

Кафедра нормальной физиологии  
Уральский государственный медицинский университет