

КЛИНИЧЕСКАЯ МОРФОЛОГИЯ

УДК:616-006.81

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Белоглазова Елизавета Павловна¹, Мадиярова Оксана Владимировна², Могиленских Анна Сергеевна^{1,2}, Сазонов Сергей Владимирович^{1,2}

¹Кафедра гистологии

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Различные характеристики опухолевых клеток, их морфология могут быть связаны с агрессивностью новообразования. **Цель исследования** - оценить морфологию клеточной культуры на разных пассажах. **Материал и методы.** Клетки меланомы культивировали в среде L-MEM, 10% FBS, 0,01% гентамицина, 1% L-глутамина. Было получено семь пассажей (P). Для морфологического исследования клетки культивировали на предметных стеклах, окрашивали по методу Паппенгейма и производили подсчет. **Результаты.** Было обнаружено три основных типа клеток: веретеновидные клетки с длинными цитоплазматическими отростками, с короткими отростками и многоотростчатые клетки. Их количество менялось в зависимости от пассажа. На P1 и P2 преобладали клетки веретеновидной формы с длинными цитоплазматическими отростками, следующими по численности, являлись многоотростчатые клетки. На P3 преобладали клетки веретеновидной формы с короткими отростками и многоотростчатые. На P4 в два раза увеличилось количество многоотростчатых клеток, значительно уменьшилось количество веретеновидных клеток с короткими отростками. Многоотростчатые клетки с P4 по P7 преобладали над остальными типами клеток. **Выводы.** При культивировании меланомы с P1 - P7 наблюдалась гетерогенность клеточного состава. На первых пассажах преобладали веретеновидные клетки с длинными отростками, к последующим пассажам их число уменьшилось. Для двух других групп клеток было, напротив, характерно увеличение количества клеток к более поздним пассажам.

Ключевые слова: меланома, первичная клеточная культура, морфология.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PRIMARY CULTURE OF HUMAN SKIN MELANOMA CELLS

Beloglazova Elizaveta Pavlovna¹, Madiyarova Oksana Vladimirovna², Mogilenskikh Anna Sergeevna^{1,2}, Sazonov Sergey Vladimirovich^{1,2}.

¹Department of Histology

Ural State Medical University

²Institute of Medical Cell Technologies

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Various characteristics of tumor cells, their morphology can be associated with the aggressiveness of the neoplasm. **The aim of the study** is to evaluate the morphology of cell culture at different passages. **Material and methods.** Melanoma cells were cultured in L-MEM, 10% FBS, 0.01% gentamicin, 1% L-glutamine. Seven passages were obtained (P). For morphological examination, cells were cultured on slides, stained using the Pappenheim method, and counted. **Results.** Three main cell types were found: spindle-shaped cells with long cytoplasmic processes, cells with short processes, and multi-processed cells. Their number changed depending on the passage. At P1 and P2, spindle-shaped cells with long cytoplasmic processes predominated, followed by multi-processed cells. At P3, spindle-shaped cells with short processes and multi-processed cells predominated. At P4, the number of multi-processed cells doubled, and the number of spindle-shaped cells with short processes significantly decreased. Multi-processed cells from P4 to P7 predominated over the other cell types. **Conclusions.** When culturing melanoma from P1 to P7, heterogeneity of the cellular composition was observed. In the first passages, spindle-shaped cells with long processes predominated, and their number decreased by subsequent passages. For the other two groups of cells, on the contrary, an increase in the number of cells was characteristic by later passages.

Keywords: melanoma, cell culture, morphology.

ВВЕДЕНИЕ

Меланома является причиной наибольшего числа летальных исходов, приходящихся на группу злокачественных новообразований (ЗНО) кожи, и характеризуется высокой степенью клеточной и молекулярной гетерогенности [1]. В работе R.A. Scolyer и др. (2011)

сообщалось, что опухоль состоит из нескольких морфологических популяций, которые демонстрируют различные генотипические и фенотипические особенности, сигнальные пути, биологическое поведение и реакцию на терапию [2]. В работе А. Marconi и соавт. (2022) каждый морфологический субтип меланомы имел специфический биомолекулярный профиль, также в зависимости от морфотипа различалась агрессивность клеток [3]. Данная особенность может быть одним из возможных факторов, обуславливающих возникновение резистентности к специализированному лечению.

Цель исследования – оценить морфологию первичной клеточной культуры злокачественной меланомы кожи человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Первичную клеточную культуру получали из метастаза меланомы кожи левой заушной области. Опухолевую ткань механически измельчали и помещали в среду для диссоциации, содержащую ферменты коллагеназу и гиалуронидазу, а также питательную среду L-MEM. Куски опухоли инкубировали в среде 12 часов на шейкере в термостате без присутствия CO₂. После взвесь центрифугировали при режиме 1,4 RPM - 3 минуты. Осадок ресуспендировали трипсином в течение 5 минут, растворяли в растворе Хэнкса с 10% FBS (HF) и центрифугировали при тех же оборотах 5 минут. Супернатант сливали и полученный осадок ресуспендировали в ДНКазе и диспазе. После снова центрифугировали и разводили клеточный осадок в питательной среде L-MEM, 10% FBS, 0,01% гентамицине, 1% L-глутамине и помещали в культуральный флакон. Контроль за ростом культуры осуществлялся с помощью биологического инвертированного микроскопа для лабораторных исследований Eclips TS100 (Nikon, Япония).

По достижении монослоя на 5-6 сутки клетки инкубировали в растворе трипсина 8 минут, затем разбавляли 1:2 в HF и центрифугировали 5 минут при 1,4 RPM. Надосадочную жидкость сливали и ресуспендировали в питательной среде. Клеточную суспензию высаживали обратно в культуральный флакон - первый пассаж. Всего было получено семь пассажей. Остальную часть клеток высевали на два предметных стекла в чашках Петри и культивировали 2 дня для проведения морфологического исследования клеток. После стекла высушивали и окрашивали по методу Паппенгейма. Клетки были подсчитаны при увеличении x200 на световом микроскопе Axio Lab.A1 FL (Carl Zeiss, Германия). Было проанализировано не менее 500 клеток на каждое стекло. Произведен подсчет каждого типа клеток к общему количеству клеток на стеклах.

Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 5.1. Для сравнительного анализа качественных переменных был применен критерий Хи-квадрат, основанный на анализе таблиц сопряженности, при этом уровень значимости различий считался $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделенная культура меланомы на протяжении семи пассажей (P) характеризуется морфологической гетерогенностью, которая проявляется в наличии клеток разнообразных форм. Были обнаружены веретеновидные клетки с длинными и короткими цитоплазматическими отростками, многоотростчатые клетки полигональной формы, единичные округлые и гигантские клетки (Рис. 1). Цитоплазма клеток была окрашена в базофильные тона. Ядра имели овальную и вытянутую форму с грубозернистой структурой хроматина и одним или несколькими ядрышками. В поле зрения наблюдали единичные клетки с ядрами и гигантские многоядерные клетки. Встречались митозы.

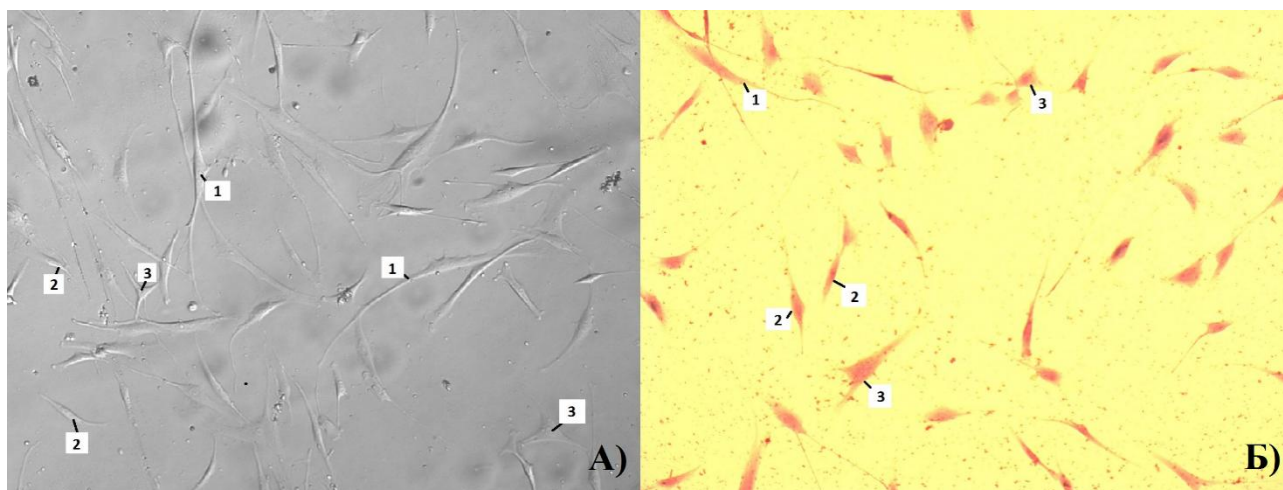


Рис. 1. Первичная культура клеток меланомы кожи человека, 1 пассаж, $\times 200$: А – растущая культура меланомы; Б – фиксированная и окрашенная культура меланомы по методу Паппенгейма. 1 – веретеновидные клетки с длинными цитоплазматическими отростками, 2 – веретеновидные клетки с короткими цитоплазматическими отростками, 3 – многоотростчатые клетки.

На 1 и 2 пассажах (Рис. 2) преобладали клетки веретеновидной формы с длинными цитоплазматическими отростками (P1 – 60%, $n=300/500$; P2 – 49,6%, $n=248/500$), после – многоотростчатые клетки (P1 – 24,2%, $n=121/500$; P2 – 23,5%, $n=117/500$) и веретеновидные клетки с короткими цитоплазматическими отростками (P1 – 10%, $n=50/500$; P2 – 20,6%, $n=103/500$). Округлые и гигантские клетки не учитывали, поскольку их количество составляло 2% и менее от общего количества клеток. На 3 пассаже (P3) картина изменилась – преобладали клетки веретеновидной формы с короткими цитоплазматическими отростками (54,5%, $n=272/500$), многоотростчатые (21%, $n=105/500$) и веретеновидные клетки с длинными отростками (19,9%, $n=99/500$). На P4 увеличилось в два раза количество многоотростчатых клеток (40,2%, $n=201/500$), значительно уменьшилось количество веретеновидных клеток с короткими цитоплазматическими отростками (24,1%, $n=120/500$; P3:P4<0,05), а веретеновидные клетки с длинными цитоплазматическими отростками остались на том же уровне (21,7%, $n=108/500$). Морфология и количество клеток P5 значимо не отличалась от P4 пассажа. Многоотростчатые клетки с P4 по P7 преобладали над остальными типами клеток, их количество значимо не изменилось и составило в среднем 43% ($n=215/500$) (P4:P5, P5:P6, P6:P7>0,05). Содержание веретеновидных клеток с короткими цитоплазматическими отростками (В. Короткие) к P6 увеличилось до 36,5% ($n=182/500$), но к P7 уменьшилось до 30,2% ($n=151/500$). Обратный результат наблюдали с веретеновидными клетками с длинными цитоплазматическими отростками (В. Длинные): их, напротив, стало меньше к P7 – 12,2% ($n=61/500$).

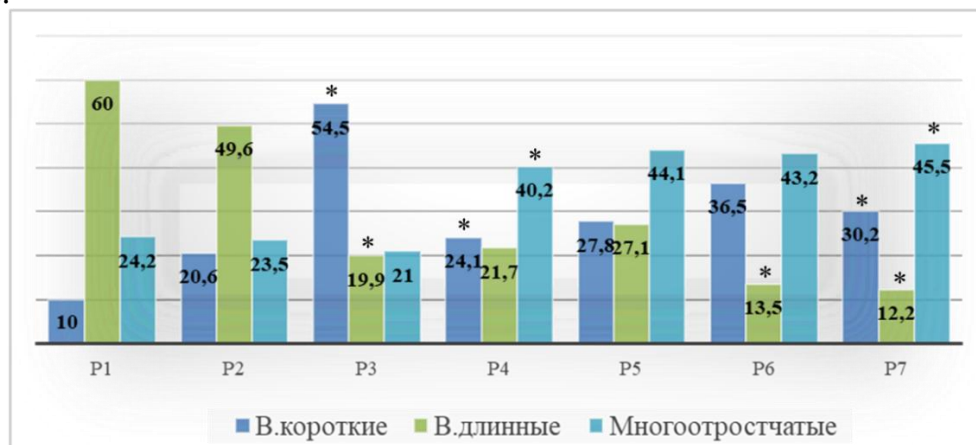


Рис. 2. Изменение морфологии первичной культуры клеток меланомы с 1-7 пассаж, %.

В. клетки с короткими отростками: P2:P3*, P3:P4*, P1:P7*.

В. клетки с длинными отростками: P2:P3*, P5:P6*, P1:P7*.

Многоотростчатые клетки: P3:P4*, P1:P7*, где * – значимые отличия при $p \leq 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Первичная культура меланомы кожи человека была представлена несколькими основными типами клеток. Схожие вариации морфологии клеток описывались и в других работах. Так, А.А. Вартанян и др. (2019) при культивировании меланомы, полученной от пациентов с положительным статусом BRAF-мутации и резистентности к вемурафенибу, отмечали наличие клеток веретеноподобной формы, характерной для меланомы [4]. М. Novak и соавт. (2015) сообщали об узкой веретенообразной форме клеток в тех линиях, которые были трансфицированы пустым вектором [5]. Изменения морфологии клеток на разных пассажах могут являться отражением ключевых молекулярных механизмов, лежащих в основе развития и прогрессирования опухоли [6]. Кроме того, согласно информации Е. Malle и др. (1989), морфология клеток меланомы зависела также от локализации опухоли, и от того, является ли очаг первичным или метастатическим. Первичная клеточная культура, полученная из метастаза меланомы, характеризовалась клетками фибробластоподобной и полигональной формы, что сопоставимо с нашими данными [7].

ВЫВОДЫ

Таким образом, при получении первичной культуры меланомы наблюдается гетерогенность клеточного состава с 1 – 7 пассаж. На первых пассажах преобладали веретеновидные клетки с длинными отростками, к последующим пассажам их число уменьшилось. Для многоотростчатых клеток и для веретеновидных клеток с короткими цитоплазматическими отростками, напротив, было характерно увеличение количества к более поздним пассажам. Многоотростчатые клетки стали самой многочисленной морфологической группой с P4 по P7.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Петкау, В.В. Отдаленные результаты лечения пациентов с IV стадией злокачественной меланомы в Свердловской области / В.В. Петкау, Е.П. Белоглазова, А.В. Соколова // Уральский медицинский журнал. – 2024. – Т. 23 (4). – С. 116–126.
2. Scolyer, R.A. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care / R.A. Scolyer, G.V. Long, J.F. Thompson // Molecular Oncology. – 2011. – Vol. 5 (2). – P. 124-136.
3. In Vivo Melanoma Cell Morphology Reflects Molecular Signature and Tumor Aggressiveness / A Marconi, M Quadri, F Farnetani [et al.] // J Invest Dermatol. – 2022. – Vol. 142(8). – P. 2205-2216.e6.
4. Резистентные к вемурафенибу клетки меланомы приобретают свойства мезенхимальных стволовых клеток / А.А. Вартанян, О.С. Бурова, Х.С. Вишнякова [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2019. – Т. 6, № 4. – С. 47-57.
5. Metastasis suppressor NME1 regulates melanoma cell morphology, self-adhesion and motility via induction of fibronectin expression. / M. Novak, M.K. Leonard, X.H. Yang, [et al.] // Exp Dermatol. – 2015. – Vol. 24(6). – P. 455-61.
6. Цитологическая оценка одной культуры клеток карциномы молочной железы Luminal A подтипа / Е. О. Шамшурина, А. С. Могиленских, Е. В. Гребенюк [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2021. – Т. 20, № 5. – С. 75-81.
7. Influence of morphology and malignancy of three new human melanoma cell lines on the cyclooxygenase pathway / E Malle, M Rotheneder, M Vetterlein, GM Kostner // Prostaglandins. – 1989. – Vol. 37(3). – P. 389-98.

Сведения об авторах

Е.П. Белоглазова* – студент

О.В. Мадиярова – младший научный сотрудник

А.С. Могиленских – научный сотрудник, ассистент кафедры

С.В. Сазонов – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, Заслуженный работник высшей школы РФ

Information about the authors

E.P. Beloglazova* – Student

O.V. Madiyarova – Researcher

A.C. Mogilenskikh – Researcher, Department Assistant

S.V. Sazonov - Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Head of the Department of Histology, Honored Worker of Higher Education of the Russian Federation

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

lenl68288@gmail.com