Information about the authors
A.A. Medvedev – Department Assistant
S.V. Sazonov – Doctor of Sciences (Medicine), Professor
M.I. Deryugin – Department Assistant
***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**
medvedevarteym.m@yandex.ru

УДК 618.19-006

К ВОПРОСУ ОБ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ КЛЕТОК И ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНА В ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Могиленских Анна Сергеевна[1,2], Дерюгин Михаил Игоревич[1,2], Мадиярова Оксана Владимировна[2], Сазонов Сергей Владимирович[1,2]
[1] Кафедра гистологии
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России
[2] ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Екатеринбург, Россия

Аннотация
Введение. В качестве модели для изучения процессов внутриопухолевой гетерогенности и лекарственной резистентности могут являться первичные клеточные культуры, полученные из образцов рака молочной железы (РМЖ) Люминального А подтипа. **Цель исследования –** изучить изменение количества эпителиальных клеток и клеток с экспрессией рецепторов эстрогена при пересеве культур, полученных из образцов РМЖ, с нулевого до пятого пассажа. **Материал и методы.** В ходе исследования получены первичные клеточные культуры из образцов Люминального А подтипа. Подтип определен с помощью ИГХ-метода. Количество клеток с экспрессией цитокератина и эстрогена исследовано методом проточной цитометрии. **Результаты.** В состав выборки вошло 8 культур, у которых на нулевом пассаже выявлено небольшое количество клеток с экспрессией панцитокератина - 10-20%. Наибольшая медиана по количеству клеток с экспрессией панцитокератина и эстрогена обнаружена на p2 и составила 1165/5000 [777;1892] и 1062/5000 [490; 1888] соответственно. **Выводы.** В первичных клеточных культурах рака молочной железы, полученных от Люминального А подтипа, количество клеток эпителиальной природы и экспрессирующих рецепторы эстрогена значимо увеличивается на втором пассаже, по сравнению с предыдущими. Клетки, экспрессирующие эстроген в клеточной культуре, являются эпителиальными.
Ключевые слова: РМЖ, ИГХ-метод, рецепторы эстрогена.

ON THE ISSUE OF DETERMINING THE EPITHELIAL NATURE OF CELLS AND THE EXPRESSION OF ESTROGEN RECEPTORS IN PRIMARY BREAST CANCER CELL CULTURES

Mogilenskikh Anna Sergeevna[1,2], Deryugin Mikhail Igorevich[1,2], Madiyarova Oksana Vladimirovna[2], Sazonov Sergey Vladimirovich[1,2]
[1]Department of Histology
Ural State Medical University
[2]Institute of Medical Cell Technologies
Yekaterinburg, Russia

Abstract
Introduction. Primary cell cultures obtained from breast cancer (BC) samples of the Luminal A subtype used as a model for studying the processes of intra-tumor heterogeneity and drug resistance. **The aim of the study** is to research the change in the number of epithelial cells and cells with estrogen receptor expression during culture transfer from breast cancer samples from the p0-p5 passage. **Material and methods.** In the course of the study, primary cell cultures obtained from samples of the Luminal A subtype. The subtype is determined using the IHC method. The number of cells expressing cytokeratin and estrogen studied by flow cytometry. **Results.** The sample included eight cultures, in which a small number of cells with pancytokeratin expression - 10-20% - detected at the zero passage. The highest median in terms of the number of cells with pancytokeratin and estrogen expression was found on p2 and amounted to 1165/5000 [777; 1892] and 1062/5000 [490; 1888], respectively. **Conclusions**. In cell cultures primary breast cancer obtained from the Luminal A subtype, the number of epithelial cells expressing estrogen receptors increases significantly in the second passage, compared with the previous ones. The cells expressing estrogen in cell culture are epithelial.
Keywords: breast cancer, IHC method, estrogen receptors.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно исследованиям, более 70% опухолей являются позитивными по наличию рецепторов эстрогена (РЭ), а самым распространённым подтипом является Люминальный А, характеризующийся высоким уровнем экспрессии рецепторов эстрогена (РЭ), низким уровнем индекса клеточной пролиферации Ki-67, и отсутствием экспрессии онкобелка Her2 [1].

Наибольшую эффективность при лечении таких опухолей показала эндокринная терапия, однако, существенной проблемой была и остается лекарственная устойчивость. Для изучения биологических детерминант гетерогенности экспрессии рецепторов эстрогена, лежащих в основе резистентности, необходима разработка экспериментальных моделей [2].

Существует множество вариантов моделей, как «в пробирке», так и вне организма. Создание моделей in vitro обладает рядом преимуществ: простота воспроизведения, контроль над условиями эксперимента, быстрота проведения. Одним из видов такой моделей являются первичные клеточные культуры, полученные из клеток пациенток с диагнозом РМЖ. Однако при получении культур из образцов Люминального А подтипа зачастую возникают проблемы, связанные с релевантностью данной модели, потому что в ходе культивирования не удается сохранить клетки с экспрессией рецепторов эстрогена [3].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Образцы ткани были получены в ходе операций у пациенток, проходящих лечение в городском онкомаммологическом центре на базе муниципального автономного учреждения здравоохранения г. Екатеринбурга «Городская клиническая больница № 40» (гл. врач – Прудков А.И., руководитель центра – Демидов С.М.). Критерии включения образца в исследование: наличие клинического диагноза, отсутствие терапии, наличие добровольного информированного согласия от пациентки. Работа одобрена локальным этическим комитетом УГМУ протокол №1 от 24.01.2020г. Исследование проводилось на базе Лаборатории клеточных культур и патологоанатомического отделения ГАУЗ СО ИМКТ.

Часть операционного материала в растворе Хэнкса с 0,1% гентамицина (Биолот, Россия) доставлялась в лабораторию для получения клеточных культур. Другую часть образцов подготавливали для проведения иммуногистохимического исследования (ИГХ).

Для получения клеточных культур каждый образец измельчали механическим способом, полученную массу на ночь помещали в раствор питательной среды DMEM-F12 (ПанЭко, Россия) со смесью ферментов коллагеназы и гиалуронидазы (STEMCELL, Канада) при нормальных условиях. Затем суспензию центрифугировали при 0,7 RPM (30 сек), клеточный осадок ресуспендировали с трипсином 0,25% (ПанЭко, Россия), центрифугировали при 1,4 RPM в течение 5 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в диспазе и ДНКазе (STEMCELL, Канада), центрифугировали при тех же оборотах. Осадок растворяли в 5 мл питательной среды Mammocult ™ Human Medium (STEMCELL, Канада) и помещали в культуральные флаконы.

Для определения подтипа методом ИГХ подготовленные по стандартной методике стекла окрашивали моноклональными антителами к рецепторам эстрогена (клон 1D5, Dako, Дания), рецепторам прогестерона (клон PgR636, Dako, Дания), Ki-67 (клон MIB-1, Dako, Дания) и Her2/neu (клон 4B5, Ventana, США). Исследования выполнялись на автостейнере Dako (Дания). Уровень экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона определялся по шкале Allred от 0 до 8 баллов. Оценка уровня экспрессии Ki-67 производилась при подсчете не менее 500 опухолевых клеток, определялось соотношение окрашенных ядер ко всем клеткам. Оценка уровней мембранной экспрессии HER-2/neu в опухолевых клетках производилась в соответствии с общими принципами по шкале от 0 до 3+.

Количество клеток с экспрессией панцитокератина и эстрогена определялась с помощью программного обеспечения проточного цитометра Navios (Beckman Coulter, США). После каждого пассажа (p0-p5) клетки были окрашены антителами к эстрогену (клон SP1, Abcam, Канада), меченные Alexa Fluor® 647 и к панцитокератину (клон 11, Biolegend, США), меченные Alexa Fluor® 647. Оценивалось соотношение окрашенных клеток к общему количеству (не менее 5000 событий), с помощью программы, встроенной в обеспечение

цитометра. Для описания количественных данных использовали непараметрические методы статистики, определяли медиану (Me), межквартильный размах (IQR), минимальное и максимальное значения (min и max). Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программы Origin Pro 2024 (OriginLab Corporation, США).

Цель исследования – изучить изменение количества эпителиальных клеток и клеток с экспрессией рецепторов эстрогена при пересеве культур, полученных из образцов Люминального А подтипа РМЖ, с нулевого до пятого пассажа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из образцов Люминального А подтипа РМЖ было получено 27 первичных клеточных культур. В состав выборки вошло 8 культур, у которых на нулевом пассаже было выявлено небольшое количество клеток с экспрессией панцитокератина - 10-20%.

По результатам ИГХ в ткани первичной опухоли медиана по уровню экспрессии РЭ составила 7, межквартильный размах составил 0. По уровню экспрессии прогестерона 6, межквартильный размах 2,5. В двух образцах уровень экспрессии +1, в одном +2, в остальных – 0. Медиана индекса клеточной пролиферации – 5, межквартильный размах – 5.

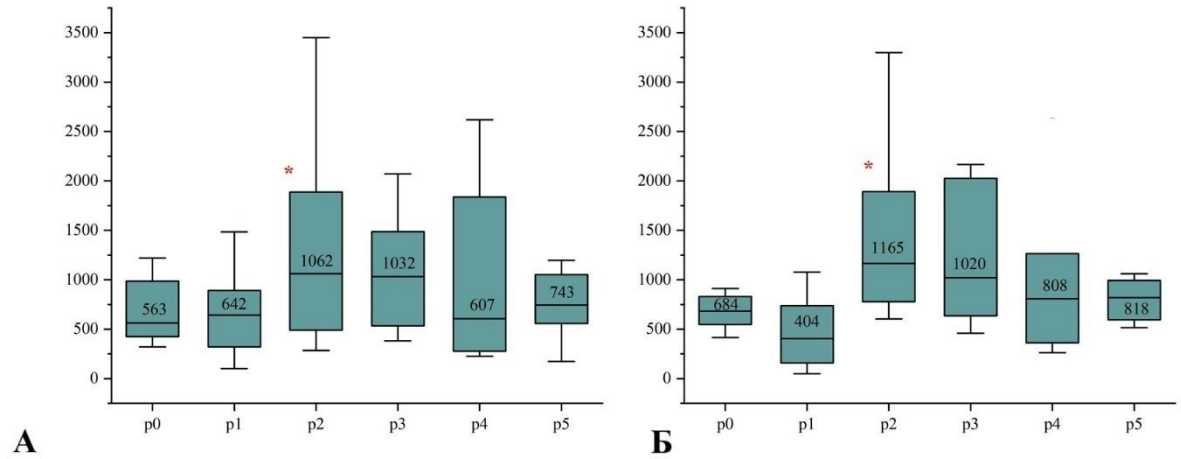

Рис. 1. Диаграмма «Ящик с усами» показывает распределение данных экспрессии рецепторов эстрогена (А) и панцитокератина (Б) в клетках культур, полученных от Люминального А подтипа рака молочной железы с p0 - p5. Начало и окончание «усов» – минимальное и максимальное значение показателя, медиана – средняя линия внутри ящика, верхняя грань ящика – Q3, нижняя грань ящика – Q1, * обозначает значимые различия, p≤0,05.

На ящичковых диаграммах по количеству клеток, экспрессирующих цитокератин и эстроген с нулевого по пятый пассаж наименьший разброс значений отмечается на p0, p1 и p5 (Рис. 1).

При оценке количества клеток с экспрессией панцитокератина на втором пассаже отмечается значимое увеличение количества клеток по сравнению с предыдущими пассажами (p≤0,05). Медиана увеличивается в два раза. Как на втором, так и на третьем пассаже наблюдается тенденция к увеличению вариабельности значений. Медиана расположена ближе к первому квартилю, значит большая часть данных имеет значение, близкое к медиане – на p2 1165/5000[777;1892] и на p3 1020/5000[636;2027]. На p2 максимальное количество клеток с экспрессией панцитокератина в одной из культур составило 3298/5000. На p3 в этой же культуре количество клеток эпителиальной природы составило 2166/5000. На последующих пассажах – p4, p5 происходит незначительное уменьшение количества клеток с экспрессией панцитокератина во всех культурах, медиана составляет 808/5000[361;1264] и 818/5000[595;993].

При оценке количества клеток с экспрессией эстрогена, также, как и при оценке панцитокератина, на втором пассаже отмечается значимое увеличение клеток по сравнению с предыдущими пассажами (p≤0,05). Наблюдается больший разброс значений, чем при оценке количества эпителиальных клеток, в то время как показатели распределены симметрично по отношению к медиане, которая составляет 1062/5000[490; 1888]. На p3 происходит уменьшение разброса значений, сохраняется симметричное распределение показателей,

медиана 1032 [533; 1486]. На p4 происходит смещение к первому квартилю, в сторону уменьшения количества клеток, экспрессирующих эстроген, увеличивается вариабельность значений. На p5 возвращается симметричность, уменьшается разброс.

ОБСУЖДЕНИЕ

В работах многих исследователей установлена прогностическая ценность исследования панцитокератина при раке молочной железы [4]. Однако при анализе эпителиальной природы клеточных культур зачастую используется только определенный вид цитокератина, в то время как люминальные клетки могут экспрессировать несколько видов (7,8,18,19 и др.) [5]. В нашем исследовании определены изменения количества клеток с экспрессией панцитокератина с p0-p5, установлено, что в процессе культивирования количество клеток с экспрессией изменяется на втором пассаже. Имеются данные, что при получении адгезивной первичной клеточной культуры РМЖ от Люминального В подтипа изменения в экспрессии маркеров также происходят на p2 [6]. В другой работе, при культивировании клеток ретинального пигментного эпителия на третьем пассаже было обнаружено появление маркеров мезенхимального перехода [7].

В данном исследовании не обнаружено значимых различий между количеством клеток с экспрессией панцитокератина и с экспрессией эстрогена на протяжении культивирования, это позволяет сделать вывод о том, что клетки, экспрессирующие эстроген в клеточной культуре, являются эпителиальными.

ВЫВОДЫ

В первичных клеточных культурах рака молочной железы, полученных от Люминального А подтипа, количество клеток эпителиальной природы и экспрессирующих рецепторы эстрогена значимо увеличивается на втором пассаже, по сравнению с предыдущими. Клетки с экспрессией рецепторов эстрогена и панцитокератина составляют одну популяцию.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Сазонов, С. В. Обеспечение качества молекулярно-биологических исследований при диагностике рака молочной железы / С.В. Сазонов. – Екатеринбург: ВУМАН, 2018. – 152 с.
2. Хисамов, А.А. Механизмы развития и пути преодоления эндокринной резистентности при раке молочной железы /А.А. Хисамов, О.О. Мануйлова, М.Ю. Бяхов // Злокачественные опухоли. – 2015. – Т. 4. – С. 52-61.
3. Могиленских, А.С. Создание клеточных линий карциномы молочной железы / А.С. Могиленских, С.В. Сазонов // Гены и Клетки. – 2021. – Т. 16, № 1. – С. 15-23.
4. Analysis of Spatial Distribution and Prognostic Value of Different Pan Cytokeratin Immunostaining Intensities in Breast Tumor Tissue Sections/ V. Vranes, T. Vujasinović, N. Rajković [et al.] // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21, №12.
5. Горелик, М.З. Новые аспекты патогенеза и классификации базальноподобного рака молочной железы / М.З. Горелик, Ю.Ю. Андреева, Л.Э. Завалишина // Архив патологии. – 2013. –Т. 75, №4. – С.48-53.
6. Сравнение фенотипов клеток адгезивной и неадгезивной культур карциномы молочной железы / Е.О. Шамшурина, А.С. Могиленских, Е.В. Гребенюк [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2022. – Т.2, №6. - С.89-94.
7. Переход клеток в мезенхимальный фенотип на примере прогрессирования идиопатического эпиретинального фиброза / А.В. Миридонова, С.А. Борзенок, И.М. Горшкови др. [и др.] // Современные технологии в офтальмологии. – 2018. – № 4. - С. 200-203.

Сведения об авторах

А.С. Могиленских – научный сотрудник, ассистент кафедры
М.И. Дерюгин - ассистент кафедры, лаборант-исследователь
О.В. Мадиярова – младший научный сотрудник
С.В. Сазонов – д.м.н., заведующий кафедрой гистологии, профессор

Information about the authors

A.S. Mogilenskikh* – Researcher, Department Assistant
M.I. Deryugin – Department Assistant, Laboratory Researcher
O.V. Madiyarova – Researcher
S.V. Sazonov - Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Head of the Department of Histology
***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**
annasajler@yandex.ru