

23. Mehi S.J., Maltare A., Abraham C. R., King, G. D. MicroRNA-339 and microRNA-556 regulate Klotho expression in vitro // *Age*. – 2014. – Т. 36. – №. 1. – С. 141-149. doi.org/10.1007/s11357-013-9555-6

24. He X.J., Ma Y.Y., Yu S., Jiang X.T., Lu Y.D., Tao L. Up-regulated miR-199a-5p in gastric cancer functions as an oncogene and targets klotho // *BMC cancer*. – 2014. – Т. 14. – №. 1. – С. 218. doi.org/10.1186/1471-2407-14-218

25. Pan J.Y., Sun C.C., Li S.J., Huang J., Li D. J. Role of miR-10b in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells by targeting Klotho // *Cancer Cell & Microenvironment*. – 2015. – Т. 2. – №. 4. dx.doi.org/10.14800/ccm.936.

26. Lu L., Katsaros D., Wiley A., Rigault de la Longrais I.A., Puopolo M., Yu H. Klotho expression in epithelial ovarian cancer and its association with insulin-like growth factors and disease progression // *Cancer investigation*. – 2008. – Т. 26. – №. 2. – С. 185-192. doi.org/10.1080/07357900701638343

**Сазонов С.В., Бриллиант А.А.,
Бриллиант Ю.М. Фадеев Ф.А., Демидов С.М.**

ОПЫТ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛЮМИНАЛЬНОГО ПОДТИПА

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных
технологий»,
ФГБОУ ВО «Уральский государственный
медицинский университет»,
г. Екатеринбург, Россия

Рак молочной железы гетерогенное заболевание, этиология и принципы развития которого до сих пор не установлены. Несмотря на существование таргетных препаратов для терапии групп иммуногистохимических подтипов карцином молочной железы, эффективность лечения может быть выше при более глубоком изучении каждого случая.

На сегодняшний день для изучения свойств опухолей используются методы основанные на определении клеточных рецепторов в фиксированном операционном материале. Однако такое исследование затрудняет выявление генетических особенностей данного случая, а также исключает возможность тестирования эффективности назначаемого препарата. Нужна экспериментальная модель конкретного случая: первичная клеточная культура, клеточная линия, возможно экспериментальное животное. Каждая модель может быть использована для различных исследований: для генетического анализа, Днк метилирования, подбора существующих терапевтических методик. Такие модели снимают ряд этических проблем, такими моделями легко манипулировать, зная их молекулярную характеристику. Такие модели могут быть использованы для изучения сигнальных путей и «критических» генов вовлеченных в канцерогенез.

Это дает важную комплексную информацию о полигенетической структуре конкретного случая, а также раскрывает биологические механизмы проходящие в нем. Характеристика опухолевых клеточных линий имеет важное значение при разработке новых проотивоопухолевых препаратов, а также корректировки имеющихся схем терапии для случая входящего в определенный иммуногистохимический подтип. Клеточные культуры опухолей легко использовать после разморозки. Всегда можно увеличить количество материала для исследования, кроме того такой материал практически лишен свойств гетерогенности первичной опухоли.

Однако существуют и недостатки культивирования опухолевых клеточных линий. Клеточные линии склонны к генотипическому и фенотипическому дрейфу во время их постоянного культивирования. Такая особенность преобладает у наиболее часто используемых клеточных линий, особенно тех, которые были сохранены в банках клеток в течение многих лет. Субпопуляции могут возникать и вызывать фенотипические изменения во времени в результате отбора наиболее быстро растущих клонов в популяции [1, 5-8] Кроме того при культивировании всегда существует опасность кросс-контаминации и получения ложных клеточных линий, поэтому важнейшим этапом при культивировании клеточных линий является проверка и идентификация.

Для сортировки полученных клеточных линий используется иммуногистохимическая классификация, как и для карцином молочной железы. Чаще всего выделяют 4 иммуногистохимических подтипа: Люминальной А, Люминальный Б, HER-2 позитивный, Тройной негативный подтипы [3]. Это необходимо для выявления важных молекулярных особенностей, которые присущи тому или иному иммуногистохимическому подтипу.

Есть данные о том, что первоначальный иммуногистохимический подтип опухоли в ходе становления клеточной линии претерпевает существенные генетические и эпигенетические трансформации, что в конечном итоге может приводит даже к смене подтипа [2]. В своей работе мы постарались выявить из-

менения рецепторного аппарата клеток карциномы молочной железы, на протяжении 5 пассажей.

Целью исследования была оценка изменения рецепторного аппарата клеток карцином молочной железы при создании клеточной культуры Люминального В подтипа.

Методы исследования

Материал карциномы молочной железы был диссоциирован, опухолевые клетки были выделены и культивированы на протяжении 5 пассажей. Полученные культуры исследовались гистологическим, иммуногистохимическим, морфометрическими и статистическими методами.

Гистологический метод

Предварительно приготовлены парафиновые блоки (Калантарли С.С., Мацко Д.Е., 2012). Для этого материал прошел фиксацию в 10% растворе нейтрального формалина в течение 1-2 суток, осуществлена его проводка по спиртам, после чего материал был залит в парафиновые блоки. Изготовление серийных срезов толщиной 4 мкм осуществляли на ротационном микротоме Microm HM340 (MICROM Labor gerate GmbH) с системой переноса срезов. После депарафинизации производили гистологическую окраску с помощью гематоксилина Майера и эозина.

Культивирование эпителиальных клеток опухоли

Диссоциация тканей:

1) Измельченный фрагмент ткани, помещали в раствор коллагеназы/гиалуронидазы (разводится в полной среде Epi-Cult-C или в смеси DMEM/F-12).

2) Ткань в растворе коллагеназы помещали на шейкер и инкубировали при 37°C около 16 часов, до растворения крупных фрагментов ткани.

3) Диссоциированную ткань помещали в 50-миллилитровую пробирку, центрифугировали 30 секунд при 80 g.

4) Удаляли плавающий на поверхности слой жира. Получен осадок А.

5) Супернатант переносили в другую 50-миллилитровую пробирку, центрифугировали 3 минуты при 200 g. Полученный осадок В содержал эпителиальные, стромальные клетки и эритроциты.

6) Центрифугировали супернатант в новой пробирке в течение 5 минут при 350 g. Полученный осадок содержал фибробласты молочной железы.

Дальнейшее выделение клеток:

1) Добавляли к осадку А 1-5 мл теплого трипсина с ЭДТА (0,25%), ресуспендировали клетки пипеткой, затем, в течение 1-3 минут 1-миллилитровым дозатором. Смесь должна стать тягучей из-за лизиса мертвых клеток и высвобождения ДНК. Можно использовать и осадок В, но полученная из него культура будет более гетерогенной, с примесью эпителиальных клеток.

2) Добавляли 10 мл холодного раствора Хенкса с 2% FBS (далее эта смесь будет называться HF), центрифугировали 5 минут при 350 g.

3) Удалили как можно больше супернатанта. Клетки могут выглядеть как «тягучая субстанция», плавающая в HF.

4) Добавляли 2 мл теплой диспазы и 200 мкл ДНКазы I (концентрация 1 мг/мл). Перемешивали 1-миллилитровым дозатором в течение 1 минуты. Если образец оставался тягучим, добавляли еще 100 мкл ДНКазы.

5) Добавляли 10 мл холодного HF, фильтровали через 40-мкм фильтр в новую 50-миллилитровую пробирку. Центрифугировали 5 минут при 350 g, удаляли супернатант.

I. Получение культуры маммосфер:

1) Разводили клеточный осадок в полной среде Mammocult, переносили в неадгезивный планшет. Посевная доза — не более 4×10^3 клеток/см².

2) Инкубировали 7 дней при 37°C и 5% CO₂.

3) Подсчитывали количество маммосфер с диаметром более 60 мкм.

Пересев культуры маммосфер:

1) Собирали культуральную жидкость с маммосферами в 50-миллилитровую пробирку. Центрифугировали 5 минут при 350 g, удаляли супернатант.

2) Разводили осадок в 0,5-1 мл теплого трипсина с ЭДТА (0,25%), ресуспендировали 1-миллилитровым дозатором.

3) Добавляли 5 мл холодного HF, центрифугировали 5 минут при 350 g, удаляли супернатант.

4) Осадок разводили в среде, сеяли клетки.

II. Культура эпителиоцитов:

Клетки должны высаживаться на культуральный пластик, покрытый тонким слоем коллагена*.

1) Разводили клеточный осадок в полной среде Epi-Cult-B с добавлением 5% FBS. Посевная доза $1-5 \times 10^4$ клеток/см².

2) Инкубировали 24 часа при 37°C и 5% CO₂, затем меняли среду на бессывороточную.

Иммуногистохимический метод

Иммуногистохимическая реакция осуществлялась в автостейнере “Ventana”, USA. Для проведения иммуногистохимических исследований использовались положительно заряженные адгезивные стекла, Superfrost Plus (Thermo scientific, Германия). Для определения экспрессии ALDH1 использовались антитела Rabbit Monoclonal Anti-Human ALDH1A1 (EP168) (Epitomics, USA). Определение экспрессии HER-2/neu на клетках опухоли осуществлялось с помощью моноклональных антител Ventana

*

1. Коллаген разводится в 45 раз в стерильном фосфатном буфере
2. Полученным раствором покрывали культуральный пластик, инкубировали 1 час при 37°C и 5% CO₂
3. Раствор коллагена удалялся, пластик однократно промывался стерильным PBS или культуральной средой

anti-Her/2neu 4B5 Rabbit Monoclonal primary Antibody (Ventana, USA), рецепторов эстрогена и прогестерона на ядрах клеток опухоли — с помощью моноклональных антител Confirm anti-Estrogen Receptor (SP1), Monoclonal Rb Anti-Progesterone Receptor (SP2) (Spring, USA) Для определения ядерного индекса пролиферации опухоли использовались антитела Rb Anti-KI-67 (SP6) (Spring, USA). Все пассажи тестировались на принадлежность выросших клеток к эпителиальным с помощью антитела anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) Primary Antibody (Roche diagnostics, USA).

Флуоресцентная гибридизация

Метод использовался для определения амплификации гена HER-2 в клетках карциномы молочной железы. Подсчет копий гена производился в 20 опухолевых клетках. Использовался набор HER2 IQFISH pharmDx™ (ДАКО, Дания). [4]

Уровень пролиферативной активности оценивали по ядерному индексу пролиферации клеток опухоли — KI-67. По процентному отношению числа окрашенных ядер клеток карциномы к неокрашенным судили о пролиферативной активности исследуемой опухоли. В каждом случае оценивали не менее 600 опухолевых клеток (Jalava, Kuorio, 2006). Уровень экспрессии Estrogen receptor и Progesterone receptor определяли по шкале от 0 до 8 (Allred D.C. et al, 1998). Оценка уровней мембранной экспрессии HER-2/neu в опухолевых клетках производилась по шкале от 0 до 3+ (Vilous M. et al, 2003). Оценка реакции осуществляли на роботизированном микроскопе “Zeiss ImagerM” (Германия).

Мы получили материал от пациентки с карциномой молочной железы G3 T2N1M0. По итогам иммуногистохимического исследования материала была выявлена экспрессия рецепторов Эстрогена — 5 баллов, Прогестерона — 4. Экспрессия рецепторов тирозинкиназы HER-2/neu 2+. После проведения флуоресцентной гибридизации выяснилось, что амплификация гена HER2 отсутствует. Данный случай карциномы относится к люминальному В подтипу (рис. 1).

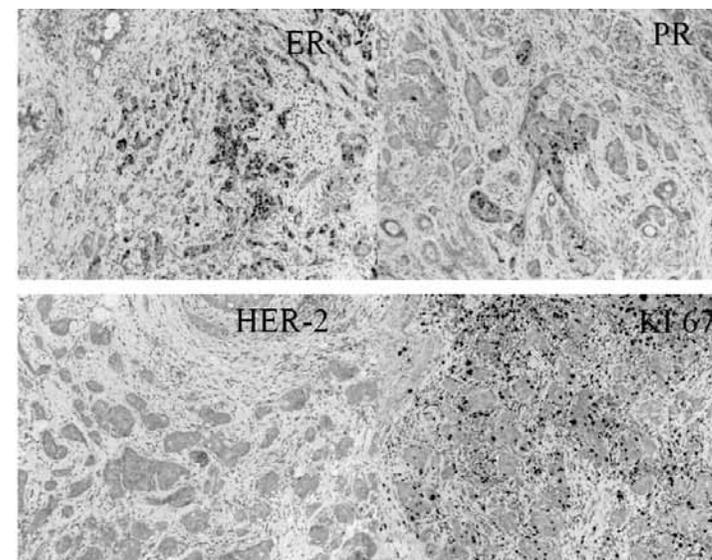


Рисунок 1. Первичный материал.

При исследовании культуры клеток после первого пассажа мы получили фенотип не соответствующий первичной опухоли. Клетки не экспрессировали рецепторы Estrogen и Progesterone. Экспрессия HER-2 рецепторов низкая (1+). Индекс пролиферативной активности 40%. Эти данные говорят о том, что клетки принадлежат к тройному негативному иммуногистохимическому подтипу (рис. 2).

Такой же результат получен при исследовании клеток после 2 пассажа. Клетки можно отнести к тройному негативному иммуногистохимическому подтипу (рис. 3)

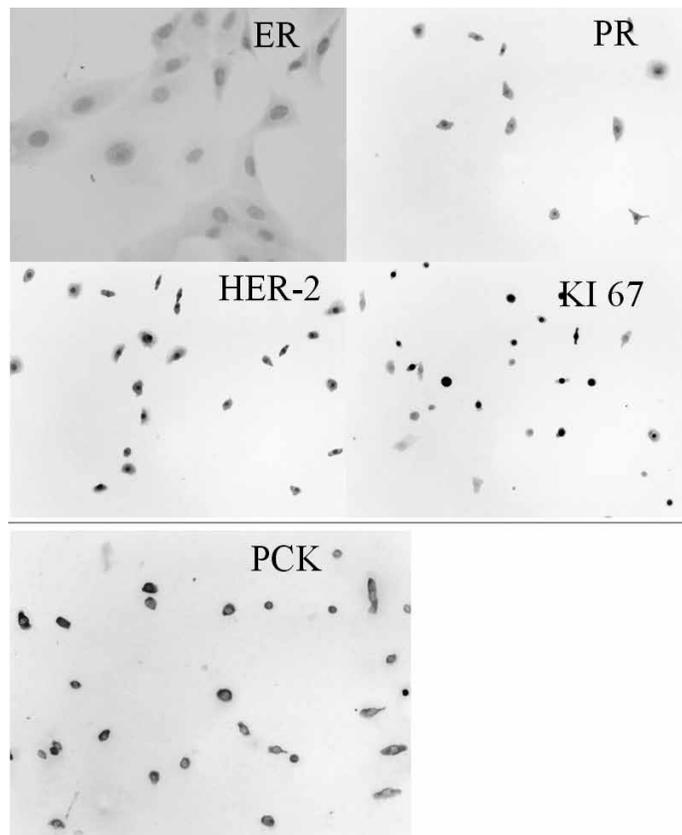


Рисунок 2. 1 пассаж

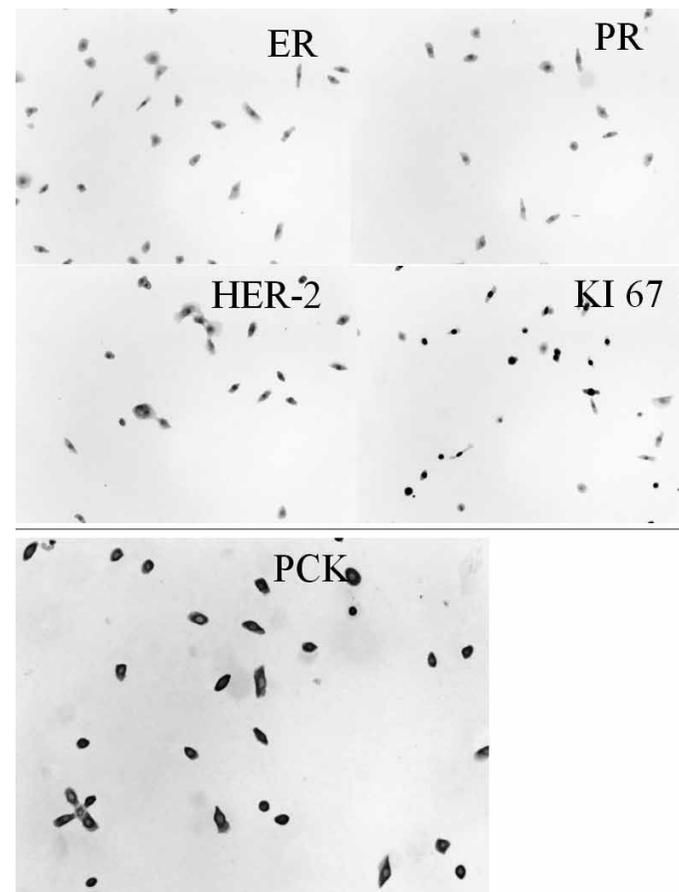


Рисунок 3. 2 пассаж

При типировании клеток 3-го пассажа мы обнаружили высокую экспрессию рецепторов стероидных гормонов Estrogen (6+), Progesterone (5+). Не изменено низкой осталась экспрессия HER-2 (1+). Клетки имеют высокую пролиферативную активность — 52%. Такой вариант опухоли можно отнести к люминальному В подтипу (рис. 4).

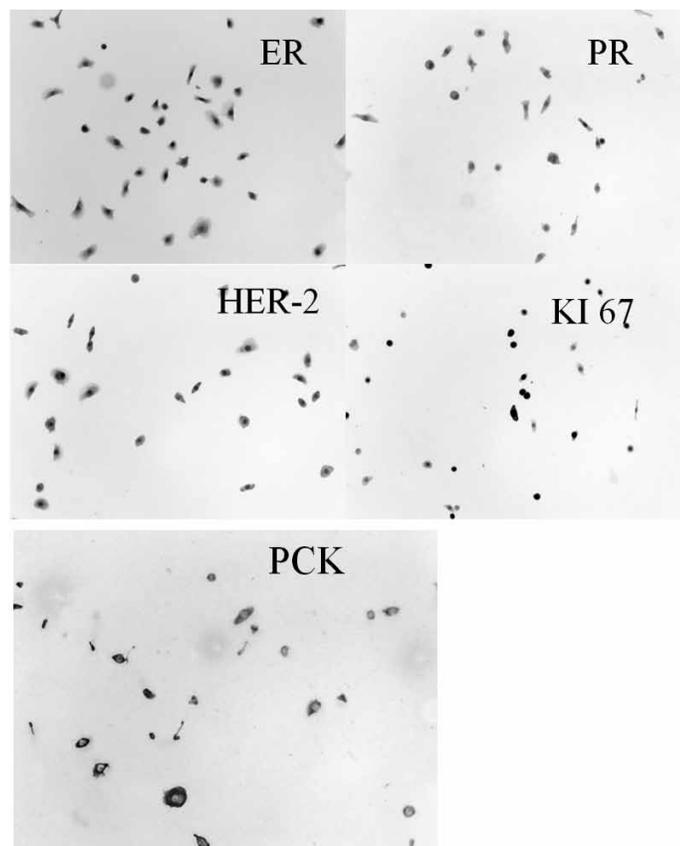


Рисунок 4. 3 пассаж

После проведения 4-го пассажа и иммуногистохимической оценки опухоли получили вновь тройной негативный подтип (негативный по экспрессии Estrogen, Progesterone, Her-2 и высоким индексом пролиферативной активности — 45%). Однако, часть опухолевых клеток образовали объёмные структуры — глобулы, экспрессия рецепторов тирозинкиназы (Her-2) в которых выше чем в отдельных клетках. Рис. 5.

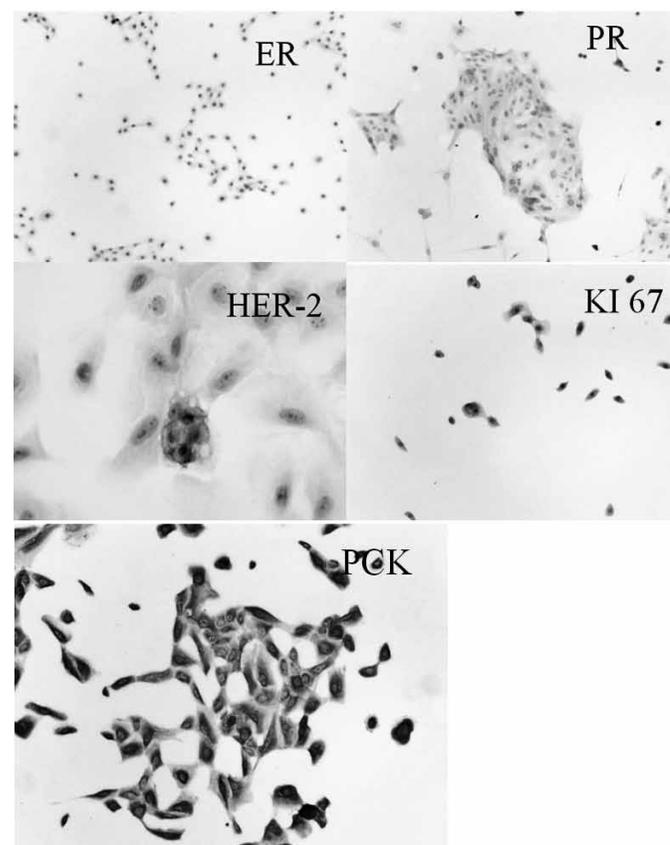


Рисунок 5. 4 пассаж

После 5-го пассажа мы получили культуру клеток, схожую рецепторным аппаратом с первичной опухолью. Клетки имеют высокую экспрессию Estrogen и Progesterone рецепторов (6+). Невысокая экспрессия HER-2 (1+). Однако пролиферируют они медленно. Индекс KI-67 всего 3%. Это дает нам право относить полученную культуру к Люминальному А подтипу (рис. 6).

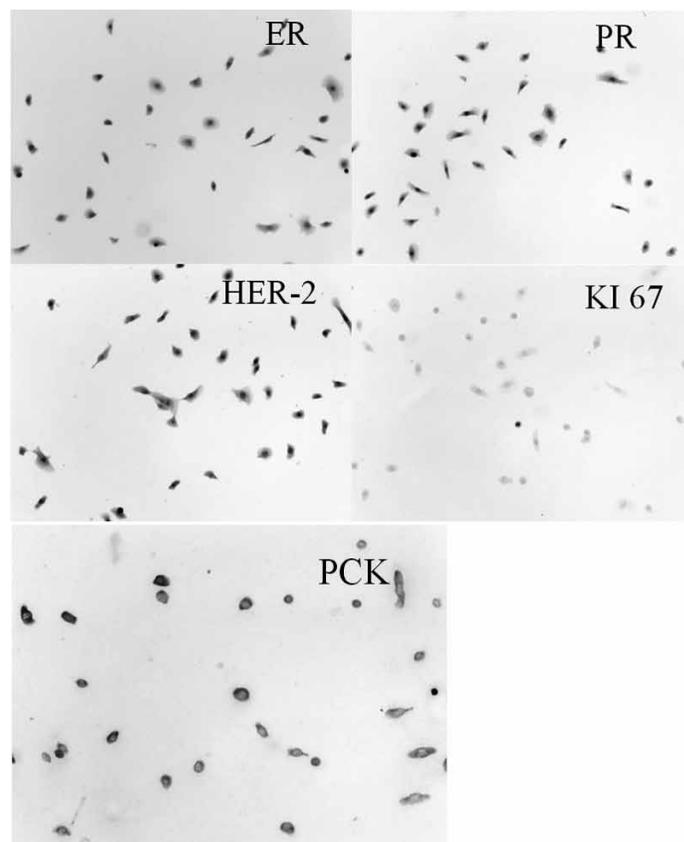


Рисунок 6. 5 пассаж

Итак, при культивировании данного случая мы получили 5 пассажей. Морфологически полученные клетки сходны с клетками рака молочной железы, имеют высокое отношение объёма ядра к цитоплазме. Форма полученных одиночных клеток напоминает фибробласты и не отличалась на этапах культивирования. Для подтверждения эпителиальной природы культивируемых клеток, каждый пассаж тестировался на экспрессию цитокератинов. В пяти пассажах экспрессия цитокератинов обнаружена у большинства культивируемых клеток. На 4-м пассаже культура клеток наиболее плотная, клетки имеют округлую форму, ядра отличаются по размерам и форме, количество ци-

топлазмы варьирует. Местами образовался монослой, морфология клеток похожа на клетки ткани рака молочной железы.

В ходе работы мы получили культуры клеток, которые отличаются рецепторным аппаратом, следовательно относятся к разным иммуногистохимическим подтипам (Таб. 1).

Таблица 1.

Изменение иммуногистохимического подтипа опухоли по пассажам

	ER	PR	HER2	KI-67	ИГХ подтип
Первичный материал	5	4	2+	30%	Люминальный В
1Пассаж	0	0	1+	40%	Тройной негативный
2 Пассаж	0	0	0	50%	Тройной негативный
3 Пассаж	6	5	1+	52%	Люминальный В
4 Пассаж	2	2	1+ глобулы (2+)	45%	Тройной негативный
5 Пассаж	6	6	1+	3%	Люминальный А

Только в результате 3-го пассажа мы получили иммуногистохимический подтип, соответствующий первичной опухоли. Первый, второй и третий пассажи дали нам культуру тройного негативного рака молочной железы, отличающуюся от первичной опухоли высокой пролиферацией и отсутствием рецепторов.

В результате выполненного исследования выявлено, что рецепторный аппарат культивируемых клеток рака молочной железы (в данном случае Люминального В иммуногистохимического подтипа) меняется при каждом пассаже.

Работа выполнена в рамках государственного задания УГМУ № 056-00151-18-00.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cope LM, Fackler MJ, Lopez-Bujanda Z, Wolff AC, Visvanathan K, Gray JW. et al. Do breast cancer cell lines provide a relevant model of the patient tumor methylome?. PloS one. 2014;9:e105545
2. Bahia H, Ashman JN, Cawkwell L, Lind M, Monson JR, Drew PJ, Greenman J
Karyotypic variation between independently cultured strains of the cell line MCF-7 identified by multicolour fluorescence in situ hybridization.
Int J Oncol. 2002 Mar; 20(3):489-94.
3. Hollestelle A, Nagel JH, Smid M, Lam S, Elstrodt F, Wasielewski M. et al. Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. Breast cancer research and treatment. 2010;121:53-64
4. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, et al. Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. Cancer. 2001;92:2965-74.
5. Засадкевич Ю.М., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Роль кадгеринов в норме и при развитии рака молочной железы. Архив патологии. 2015; 77(3): 57-64.
6. Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Изменение рецепторного статуса в группах пролиферативной активности карцином молочной железы. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2013; 43(1): 61-63.
7. Засадкевич Ю.М., Сазонов С.В. Роль молекула клеточной адгезии E-кадгерина в онтогенезе человека в норме и патологии// Морфология. 2014. Т. 146. № 5. С. 78-82.
8. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Дорофеев А.В. Некоторые закономерности экспрессии Estrogen, Progesterone Receptor и Ki-67 на опухолевых клетках карциномы молочной железы// Уральский медицинский журнал. 2010. № 12. С. 68.