

actively form mammospheres and a monolayer on a non-adhesive Petri dish. Pellet 2 revealed fewer cells with a fibroblast-like phenotype compared to pellet 1.

References:

1. Alamri AM. Primary cancer cell culture: mammary-optimized vs conditional reprogramming. / AM Alamri, K Kang, S Groeneveld, et al. // *Endocr Relat Cancer*. – 2016 – № 23(7) – P.535–554

2. Imamura Y. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer./ Y Imamura, T Mukohara, Y Shimono, et al. // *Oncol Rep*. –2015– № 33(4) – P.1837–1843

3. Janik K. Efficient and simple approach to in vitro culture of primary epithelial cancer cells.[Электронный ресурс] / K Janik, M Popeda, J Peciak, et al. *BiosciRep*. – 2016. – №36 (6) // Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5146827/> (Дата обращения: 5.03.2020)

3. Shaw FL. A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. / FL Shaw, H Harrison, K Spence, et al. // *Mammary Gland Biol Neoplasia*. – 2012. – №17(2) – P.111–117

УДК616-006.699

**Могиленских А.С., Седнева-Луговец Д.А.
СРАВНЕНИЕ РОСТА ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КАРЦИНОМЫ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ДЛЯ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии
Уральский государственный медицинский университет
ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Екатеринбург, Российская Федерация

**Mogilensky A.S., Sedneva-Lugovets D.A.
COMPARISON OF THE GROWTH OF THE PRIMARY CULTURE OF
BREAST CARCINOMA IN VARIOUS CONDITIONS FOR CULTIVATION**

Ural state medical University
Department of histology, cytology and embriology
Institute for medical cell technologies,
Yekaterinburg, Russian Federation

annasajler@yandex.ru

Аннотация. В статье представлены данные по культивированию карциномы молочной железы в специфической среде на разных подложках и произведено сравнение роста клеточных культур, полученных от двух осадков.

Annotation. The article presents data on the cultivation of breast carcinoma in a specific medium on different substrates and compares the growth of cell cultures obtained from two sediments.

Ключевые слова: первичная клеточная культура, карцинома молочной железы.

Key words: primary cell culture, breast carcinoma.

Введение

Первичные культуры раковых клеток представляют собой благоприятную платформу для исследований *in vitro* в области онкологии, поскольку они отражают состояние опухоли более точно, чем стабильные клеточные линии. Было предпринято множество попыток преодолеть проблемы с первичными культурами карциномы молочной железы, что привело к разработке различных стратегий, в которых используются специальные обогащенные среды [2], питающий слой [3] или питающий слой и среда, дополненная ингибитором Rho-киназы (ROCK) [4].

Для поддержки роста эпителиальных клеток в культуре зачастую используется создание подложки, на которой эти клетки смогут поддерживать стабильный рост популяции. Например, фидерный слой – фибробласты (или другие клетки), которые выделяют необходимые факторы роста для эпителиальной культуры. Однако, используемые в качестве такого слоя клетки также могут трансформироваться и подвергаться трансформации, а его подготовка занимает длительное время. Другой вариант подложки - использование покрытия коллагеном, а также специфическими коммерческими покрытиями [3].

До сих пор не существует единого протокола по клеточному культивированию карциномы молочной железы. Нет единого мнения об использовании того или иного покрытия флакона, предлагаются разные варианты выделения клеток из биоптата.

Цель исследования – охарактеризовать соотношение различных морфологических форм клеток первичной культуры карциномы молочной железы при использовании разных различных методик культивирования.

Материалы и методы исследования

Биоптат карциномы молочной железы, размером 2,5х 1,5 см, полученный в ходе операции от пациентки 44 лет, транспортировали в лабораторию в стерильных условиях. Работа производилась на базе ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий».

Фрагменты образца измельчали с помощью хирургических ножниц и помещали в среду для диссоциации (4 мг/мл коллагеназы, 1 мг/мл гиалуронидазы, 0,1% трипсина, DMEM:F-12), затем инкубировали около 20 часов при 37°C и отсутствии CO₂. Далее образец центрифугировали при 0, 7 RPM и получали осадок 1(ос.), предположительно, обогащенный эпителиальными клетками. Надосадочную жидкость центрифугировали 3

минуты при 200g (осадок А), затем снова переносили надосадочную жидкость и центрифугировали 5 минут при 350g (осадок В). Полученные осадки А и В смешивали, ресуспендировали с трипсином и с раствором Хэнкса с 2% FBS(HF), центрифугировали 5 минут при тех же оборотах – осадок 2. Затем ресуспендировали с диспазой и ДНКазой, смешивали с HF и центрифугировали при 350g . Полученный осадок разводили с полной средой Mammocult и 5%FBS и клетки высаживали в 48- луночные планшеты адгезивные (адг.пл.) и не адгезивные (н/адг. пл.). На второй день не прикрепившиеся клетки центрифугировали, осадок разбавляли в бессывороточной среде. Для каждого из осадков лунки одного из планшетов предварительно покрывали коллагеном. После 7 дней клетки фиксировали и окрашивали флуоресцентным красителем DAPI, подсчет клеток производился в программе ImageG. Статистическая обработка производилась в программе MSExcel использованием непараметрической статистики (критерий Манна-Уитни).

Результаты исследования и их обсуждение

Контроль роста клеток проводили на 1, 3, 7 день (см. табл.1). На первый день наибольшее количество клеток наблюдалось в первом осадке, как на коллагене, так и на адгезивном покрытии(4 из 6 лунок в каждом случае). На неадгезивном покрытии прикрепленных клеток не обнаружено. Во втором осадке визуально определялось незначительное количество прикрепленных клеток на коллагене, среди которых преимущественно определялись мелкие и округлые клетки(2 из 6 лунок).

К 7 суткам в первом осадке определялись островки монослоя эпителиоподобного фенотипа, когда как во втором осадке прикрепленных клеток было по-прежнему мало.

Таблица 1

Контроль роста клеток, полученных из разных осадков

Покрытие и осадок	1 день	3 день	7 день
1 ос. коллаген	+	+	островки монослоя
1 ос. адг.пл	+	+	островки монослоя
1 ос. н/адг. пл.	-	единичные	единичные
2 ос. коллаген	+	+	+
2 ос. адг.пл	-	единичные	единичные
2 ос. н/адг. пл.	-	единичные	единичные

Суммарное количество клеток в первом осадке после окрашивания значительно больше, чем во втором (гр.1). Наибольшее количество клеток наблюдается в 1 осадке на адгезивном планшете и вдвое меньше клеток обнаруживается на коллагене. Различия между адгезивным планшетом и не адгезивным существенны (критерий Манна-Уитни).

Во втором осадке, наоборот, наибольшее количество клеток в лунках, покрытых коллагеном. Различия между покрытием коллагеном и другими покрытиями существенны.

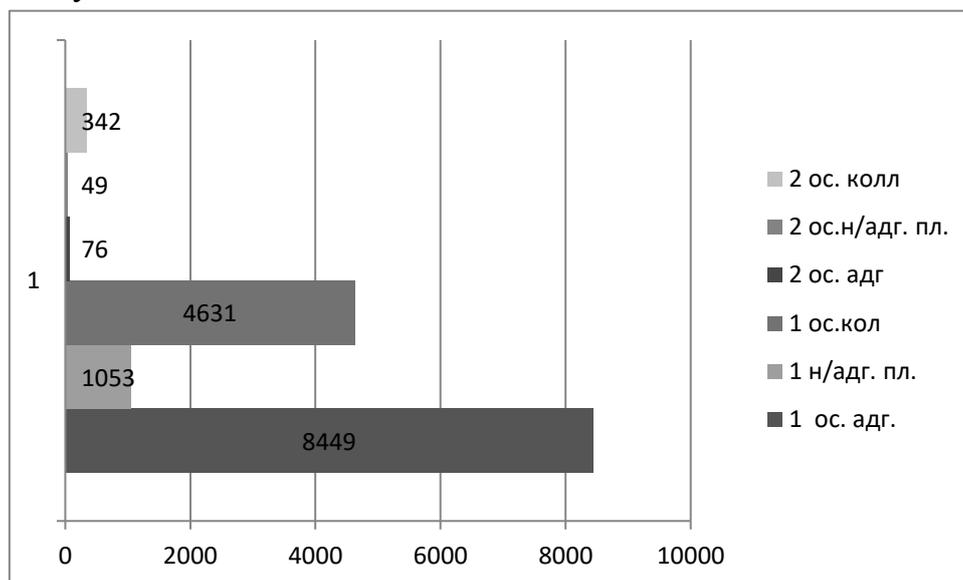


Рис. 1. Суммарное количество клеток в лунках на разной подложке

Помимо эксперимента, клетки первого и второго осадков были посажены также на флаконы, покрытые коллагеном. К 8 суткам во флаконе с первым осадком сформировались островки монослоя клеток, имеющих эпителиоподобный фенотип. Во флаконе со вторым осадком формирование монослоя произошло к 10 суткам, однако, клетки имели фибробластоподобный фенотип и наблюдалось значительно меньше островков с эпителиоподобными клетками. В дальнейшем наблюдалось открепление клеток от подложки (на 14 сутки).

Выводы:

1. Наибольшее количество прикрепленных клеток наблюдалось в 1 осадке на адгезивном планшете и на покрытии коллагеном.
2. Клетки второго осадка лучше адгезировались к лункам, предварительно покрытым коллагеном.

Список литературы:

1. Сазонов С.В. Опыт культивирования клеток карциномы молочной железы люминального подтипа / Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Бриллиант Ю.М., Демидов С.М. // Сборник научных работ «Клеточные технологии - практическому здравоохранению». – 2018 – С.115-128
2. Drost J. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue./ J. Drost, W.R.Karthaus, D.Gao, E. Driehuis et al/ Nat. Protoc. – 2016 – vol. 11– P. 347-358
3. Janik K. Efficient and simple approach to in vitro culture of primary epithelial cancer cells.[Электронный ресурс] / К Janik, М Popeda, J Peciak, et al. BiosciRep. – 2016. – №36 (6) // Режим доступа:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5146827/> (Дата обращения: 5.03.2020)

4. Liu, Xuefeng et al. ROCK Inhibitor and Feeder Cells Induce the Conditional Reprogramming of Epithelial Cells /The American Journal of Pathology//. – 2012. – V. 180(2) – P. 599 – 607

УДК 616-006.699

**Нуркиев А.Р., Шамшурина Е.О.
СРАВНИТЕЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ДВУХ СЛУЧАЕВ КАРЦИНОМ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии
Уральский государственный медицинский университет
Екатеринбург, Российская федерация

**Nurkiev A.R., Shamshurina E.O.
COMPARATIVE MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF CULTURED
CELLS IN TWO CASES OF BREAST CARCINOMAS**

Department of histology, cytology and embryology
Ural state medical University
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: nurkievalex@mail.ru

Аннотация. В статье рассмотрены закономерности изменения морфологических характеристик клеток двух образцов карцином молочных желёз на протяжении нескольких пассажей культивирования.

Annotation. The article considers the regularities of changes in the morphological characteristics of cells of two samples of breast carcinomas during several stages of cultivation.

Ключевые слова: карцинома молочной железы, культивирование, морфология клеток.

Key words: carcinoma of the breast, cultivation, morphology of cells.

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее частое злокачественное заболевание у женщин, характеризующееся значительной внутриопухолевой морфологической гетерогенностью, которая влияет как на изменение преобладающей формы клеток в каждом пассаже [3,5,6], так и ряд биологических процессов, таких, как пролиферация, миграция, гибель опухолевых клеток, а так же на чувствительность опухоли к химиотерапии [2,4].