

*А.С. Могиленских^{1,2}, Е.О. Шамигурина¹,
Е.В. Гребенюк^{1,2}, С.В. Сазонов^{1,2}, С.М. Демидов^{1,2}*

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ РАЗНЫХ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ПОДТИПОВ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург, Российская Федерация;
²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Российская Федерация

Введение

Основной причиной устойчивости к лекарственной терапии является гетерогенность клеток карциномы молочной железы (КМЖ). Кариотипическое разнообразие, аллельный дисбаланс различной природы приводят к появлению в опухоли субпопуляций клеток с различной чувствительностью к используемым для химиотерапии препаратам, что ведет к развитию лекарственной резистентности опухоли и, как следствие, ухудшению отклика на лечение [1].

Наиболее точной моделью для исследования данного процесса *in vitro* являются первичные клеточные культуры, которые получают непосредственно из тканей опухоли пациента [2]. В последнее время первичные культуры используются в исследованиях по определению влияния различных химических препаратов на опухолевые клетки, что свидетельствует о необходимости изучения таких культур и разработки методики их получения для дальнейшего внедрения результатов исследований в практической медицине. При успешном получении культуры опухолевые клетки можно подвергать субкультивированию для

пролонгированного их изучения. Однако, получение первичной культуры, несмотря на появление новых бессывроточных сред, разработку различных протоколов, сопряжено с определёнными трудностями. Так, удовлетворение в полной мере потребности всех культивируемых клеток в питательных веществах для поддержания их гетерогенности продолжает оставаться одной из сложных задач [3-4].

В нашем исследовании мы получили три первичных культуры клеток от пациенток с разным молекулярно-биологическим подтипом: люминальный А, люминальный В HER2 негативный и HER2 — позитивный, и сравнили морфологическую характеристику культур клеток на нулевом пассаже и при первом субкультивировании [5]. Большой интерес для нас представляло исследование сохранения клетками в культуре эпителиальной природы [6].

Материалы и методы

Материал для исследования был получен в ходе хирургического вмешательства у пациенток с диагнозом карцинома молочной железы. Из части материала были изготовлены парафиновые блоки для иммуногистохимической оценки опухоли по стандартной методике [5]. Иммуногистохимическая реакции осуществлялись в автостейнере DAKO, Дания. Определение экспрессии HER-2/neu на клетках опухоли осуществлялось с помощью моноклональных антител к Her2/neu (clone 4B5, Rabbit Monoclonal primary Antibody, Ventana, США), экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона на ядрах клеток опухоли — с помощью моноклональных антител к рецепторам эстрогенов (клон 1D5, Dako, Дания), рецепторам прогестерона (клон PgR636, Dako, Дания). Для опеределения индекса клеточной пролиферации использовались антитела Ki-67 (Clone SP6, Spring Bioscience, США). Ядра клеток докрашивали гематоксилином. Экспрессию рецепторов эстрогена и прогестерона определяли по шкале Allred от 0 до 8 баллов, учитывающей количество окрашенных ядер опухолевых клеток и интенсивность их окраски. Уровень пролиферации клеток опухоли по экспрессии

Ki-67 рассчитывали по процентному отношению числа окрашенных ядер опухолевых клеток ко всем клеткам (%).

Другую часть материала, доставляли в лабораторию клеточных культур в стерильных условиях в растворе Хэнкса с 5% гентамицина. Образцы измельчали, далее гомогенную массу помещали в среду для диссоциации (ферменты коллагеназа — гиалуронидаза, DMEM-F12) и инкубировали 16 часов в отсутствии CO₂ на шейкере. Полученную взвесь центрифугировали при 0,7 RPM (30 сек), супернатант сливали, а осадок ресуспендировали с трипсином и, далее, растворяли в HF (раствор Хэнкса с 10% FBS) и центрифугировали при 1,4 RPM (5 мин). Супернатант сливали, полученный осадок растворяли в диспазе и ДНКазе, вновь центрифугировали, после чего клеточный осадок разводили в питательной среде Mammocult™ Human Medium (STEMCELL) и помещали в культуральные флаконы. Для пересева клеточную культуру диссоциировали в трипсине, часть осадка распределяли на покрытые коллагеном предметные стекла, помещали их в чашки Петри и культивировали 1-2 дня для дальнейшего проведения иммуноцитохимического (ИЦХ) исследования. Для ИЦХ исследования стекла высушивали, фиксировали в 10% нейтральном формальдегиде в течение 3 часов, затем промывали фосфатным буфером, выполняли проводку по ксилолам и спиртам. При определении принадлежности клеток к эпителиоцитам с использованием антитела anti-Pan Keratin (AE1/AE3/РСК26) Primary Antibody (Roche diagnostics, USA) проводили демаскировку с помощью 0,01% раствора Тритон X-100 (10 минут), трипсином (10 минут), для блокирования неспецифического связывания антител клетки инкубировали в 1% растворе эмбриональной бычьей сыворотки. При иммуноцитохимическом исследовании оценка уровня экспрессии панцитокератина оценивалась в нескольких полях зрения. Вычислялось процентное соотношение клеток с экспрессией к общему количеству клеток.

Контроль за ростом культуры проводился с помощью микроскопа Eclipse TS100, Nikon, определение подтипа осуществлялось с помощью микроскопа Meiji Techno MT4200L.

Результаты их обсуждение

Результаты иммуногистохимического исследования материала показали, что в первом образце выявлена амплификация гена HER2 3+ (более 10% клеток демонстрируют равномерное сильное окрашивание мембран), не было выявлено экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона, индекс клеточной пролиферации Ki-67 составил 20%. Согласно молекулярно-генетической классификации [5], данный подтип относится к HER2-позитивному.

Во втором случае была выявлена экспрессия рецепторов эстрогена — 8 баллов, прогестерона — 8 баллов, индекс клеточной пролиферации Ki-67 составил 20%. Экспрессия HER-2/neu отсутствует. Данный образец относится к люминальному В, HER-2-негативному подтипу.

Третий образец, на основании результатов иммуногистохимического исследования, был отнесен к Люминальному А подтипу (ER — 20 баллов, PR — 70 баллов, Ki-67 — 10%, амплификация гена HER2 — отсутствует).

При культивировании клеток, полученных от данных образцов, производилась оценка роста культуры на первых сутках с последующим контролем на 5-е, 7-е и 10-е сутки.

На первых сутках в культурах, полученных из образцов HER2-позитивного (K-HER2) и люминального А (K-lumA) подтипов наблюдалось формирование большого количества сфероидных образований (маммосфер). В культуре, полученной из образца люминального В подтипа (K-lumB), имелись одиночные прикрепленные клетки треугольной формы, а сфероидных образований не наблюдалось. На 10-е сутки во флаконах с культурами K-HER2 и K-lumA обнаружались островки монослоя, состоящие из плотно расположенных друг к другу клеток, мигрирующих из крупных сфероидных образований с плотным центром. В культуре первого образца также наблюдались одиночные клетки треугольной формы. В флаконах с культурой K-lumB островков монослоя не наблюдалось, клетки расположены отдельными группами с незначительным количеством межклеточного пространства между ними.

После субкультивирования на первом пассаже формирование маммосфер наблюдалось только в К-HER2. Также в данном подтипе формирование монослоя происходило медленно, к 10 суткам.

В К-lumB и К-lumA на первом пассаже монослоем выглядел одинаково и быстро формировался, на 5е сутки (рис. 1).

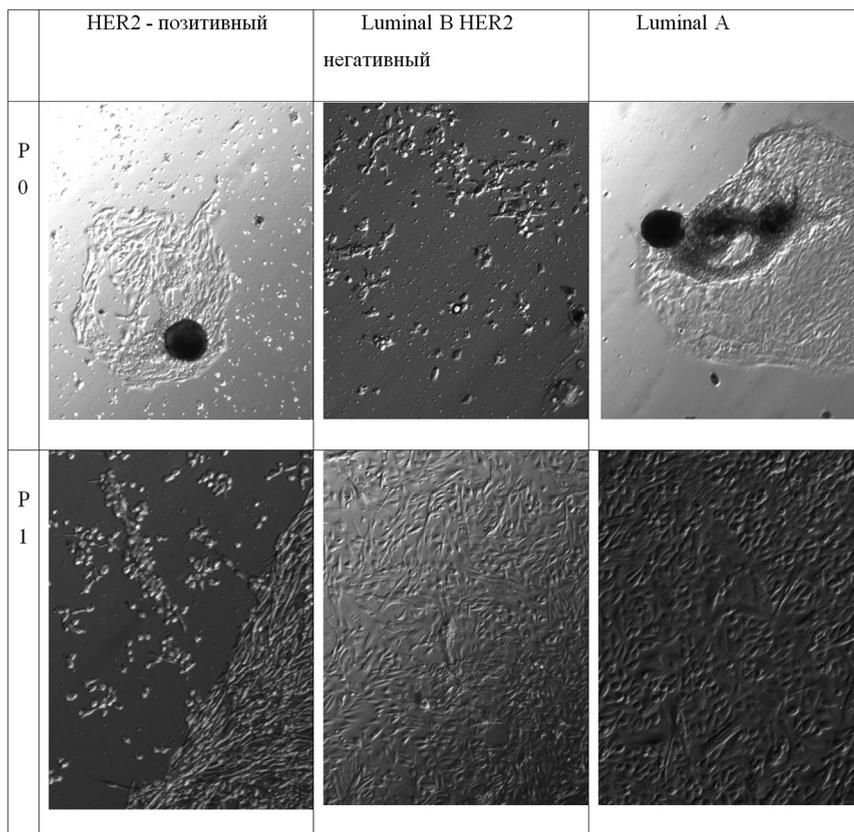


Рисунок 1. Культуры клеток карциномы молочной железы, полученной от разных подтипов, р0 — увеличение $\times 50$, р1 — увеличение $\times 100$, Световая микроскопия

Для определения гетерогенности культур на первом пассаже была проведена оценка морфологического состава клеток.

Во всех исследуемых культурах были выявлены несколько

типов клеток

Первый тип — мелкие округлые клетки (4-6 мкм), с чёткими границами. Плотное, гиперхромное ядро занимающее практически всю цитоплазму, которая окружает ядро очень узким ободком. Цитоплазма тёмная, гомогенная. Клетки на стекле лежат как отдельно, так и группами плотноконтактирующих клеток (4-7 и более клеток) с малым количеством межклеточного пространства. Однако, среди данной группы клеток в K-lumA имелись веретенovidные клетки.

Второй тип — средние клетки (10-12 мкм), отличающиеся по своей морфологии в культурах разных образцов опухоли. Так, в культуре K-HER2 образца они имели полигональную форму, в культуре K-lumB и K-lumA образцов — овальную форму. В культуре K-lumA образца также наблюдались отростчатые клетки.

Третий тип — крупные клетки (16-18 мкм), представлены во всех культурах в меньшем количестве, чем клетки других популяций. Это клетки овальной формы с большим количеством вакуолизированной цитоплазмы. Ядро округлое, с плотным хроматином, расположено эксцентрично.

Четвёртый тип — гигантские клетки (20-30 мкм) встречаются только в культурах K-lumB и K-lumA образцов. Границы этих клеток не ровные, с широкими короткими выпячиваниями цитоплазмы. Ядро эксцентрично расположено, хроматин сгруппирован крупными глыбками, ядрышко не определяется. Эндочитоплазма плотная, тёмноокрашена, содержит гранулы различного размера, эктоцитоплазма светлая, содержит мелкодисперсные вакуоли. В культуре K-lumA образца, среди гигантских клеток наблюдались как клетки с четкими контурами, так и с широкими размытыми контурами.

Результаты иммуноцитохимического исследования клеток первого пассажа показали степень экспрессии панцитокератина в культуре K-lumB образца — 97%, в культуре K-lumA образца — 47%, в культуре K — HER2 образца — 100%.

Заключение

Результаты данного исследования показали, что культуры, полученные от люминального А и люминального В подтипов, наиболее сопоставимы как по срокам формирования монослоя, так и по морфологии клеточных популяций.

Согласно результатам иммуноцитохимического анализа, самый высокий процент клеток эпителиальной природы обнаружен в культуре, полученной от HER2-позитивного образца. В то время как в остальных культурах этот показатель снижается за счет наличия гигантских клеток, теряющих эпителиальный фенотип. Самый низкий процент эпителиальных клеток наблюдается в культуре K-lumA образца, что подтверждается наибольшим полиморфизмом в ней клеточных популяций.

Таким образом, оценка роста культур и морфологическое исследование клеточных популяций в культурах разных иммуногистохимических подтипах опухолей показали, что клеточные культуры, полученные от разных образцов, проявляют гетерогенность и полиморфизм популяций культивируемых клеток, при этом в процессе субкультивирования теряется способность клеток сохранять эпителиальный фенотип, что необходимо учитывать при отработке методики создания персонифицированных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герашенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В., и др. Внутриопухолева гетерогенность: природа и биологическое значение (обзор). Биохимия 2013; 78: 1531-1549.
2. Галимова Э.С., Галагудза М.М. Двухмерные и трёхмерные модели культур клеток опухолей *in vitro*. Преимущества и недостатки // Бюллетень сибирской медицины. 2018. 17 (3). С.188-196.
3. Могиленских А.С., Шамшурина Е.О. Морфологическая оценка клеток карциномы молочной железы тройного негативного подтипа в культуре // Гены и Клетки. 2020, Т. 15, № S3. С. 104.
4. Могиленских А.С, Сазонов С.В., Демидов С.М. Оценка влияния различных условий культивирования на рост первичной клеточной культуры карциномы молочной железы //Совре-

менная медицина новые подходы и актуальные исследования: сборник материалов международной научно-практической конференции, посвящённой 30-летию юбилею Медицинского института ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет» / под ред. М.Р. Нахаева. Изд-во ГЧГУ, 2020, С.508-514.

5. Сазонов С.В. Обеспечение качества молекулярно-биологических исследований при диагностике инвазивного рака молочной железы: монография. Екатеринбург: ВУМАН, 2018. 152с.

6. Minafra L., Norata R., Bravatà V., Viola M., Lupo C., Gelfi C., Messa C.. Unmasking epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer primary culture: a study report. BMC Res Notes. 2012; 5: 343.