

УДК:616-006.699

ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИИ И РЕЦЕПТОРНОГО АППАРАТА КЛЕТОК КУЛЬТУР ИЗ ЛЮМИНАЛЬНОГО А ПОДТИПА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Могиленских Анна Сергеевна^{1,2}, Дерюгин Михаил Игоревич^{1,2}, Мадиярова Оксана Владимировна², Медведев Артем Андреевич^{1,2}

¹Кафедра гистологии

ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России

²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. В качестве модели *in vitro* для изучения РМЖ используются клеточные линии, как иммортализованные, так и первичные, полученные непосредственно из образца опухоли пациенток. Первичные клеточные культуры рака молочной железы (РМЖ) демонстрируют гетерогенность морфологического состава. Изучение особенностей строения клеток и их рецепторного аппарата необходимо для поиска дополнительных параметров, позволяющих более точно определять прогноз РМЖ. **Цель исследования** - определение морфологических характеристик и рецепторного аппарата клеток рака молочной железы при культивировании.

Материал и методы. Образцы опухолевой ткани были получены в ходе операции у пациенток с диагнозом РМЖ. Получено две культуры – ЛюмА1 и ЛюмА2. Из части материала были изготовлены парафиновые блоки для иммуногистохимического анализа (ИГХ). Определение экспрессии HER-2/neu на клетках опухоли осуществлялось с помощью моноклональных антител к Her2/neu, рецепторов эстрогена и прогестерона на ядрах клеток опухоли — с помощью моноклональных антител к рецепторам эстрогенов, рецепторам прогестерона. Для определения индекса клеточной пролиферации использовались антитела Ki-67. Оценку уровня флуоресценции окрашенных клеток осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра Navios 10. Для оценки маркеров цитоскелета использовали антитела к виментину и панцитокератину. Уровень экспрессии рецепторов оценивался с помощью антител к эстрогену, определялся индекс клеточной пролиферации Ki-67. Наличие некротических и апоптотических клеток определялось с помощью набора. **Результаты.** При изучении природы клеток в культуре ЛюмА-1 был выявлен высокий уровень коэкспрессии мезенхимального маркера виментина (VI) и эпителиального маркера цитокератина (PCK) – 89,55±2,55 на p1 и p2. В культуре ЛюмА-2 на p1 уровень коэкспрессии был низкий и составил 6%, преобладали клетки, экспрессирующие VI (34,7%). На p2 уровень коэкспрессии увеличился до 60%, появились клетки, экспрессирующие только PCK – 13%. При оценке специфических для РМЖ рецепторов в двух культурах на первом и втором пассаже обнаружена высокая экспрессия ER и индекса клеточной пролиферации Ki-67. При этом все клетки, обладающие эпителиальной природой, экспрессировали Ki-67. **Выводы.** Были получены две клеточные культуры с высоким уровнем экспрессии эстрогена, характерным для люминального А подтипа РМЖ. Остальные показатели: отсутствие апоптоза, высокий уровень индекса клеточной пролиферации Ki-67 и наличие экспрессии маркера виментина, ассоциированы с увеличением злокачественности полученных клеток по сравнению с изначальными образцами.

Ключевые слова: люминальный А подтип, эстроген, Ki-67, клеточная культура

Abstract. Cell lines, both immortalized and primary, obtained directly from the patient's tumor sample, are used as an *in vitro* model for the study of breast cancer. Primary breast cancer cell cultures demonstrate heterogeneity of morphological composition. The study of the structural features of cells and their receptor apparatus is necessary to search for additional morphological parameters that make it possible to more accurately determine the prognosis of breast cancer. The aim of the study was to determine the characteristics of breast carcinoma cells during cultivation over two passages.

Material and methods. Tumor tissue samples were obtained during surgery in patients diagnosed with breast cancer. Paraffin blocks for immunohistochemical analysis (IHC) were made from a part of the material. The expression of HER-

2/neu on tumor cells was determined using monoclonal antibodies to Her2/neu, estrogen receptors and progesterone receptors. The expression of estrogen receptors and progesterone receptors on tumor cells was determined using monoclonal antibodies to estrogen receptors and progesterone receptors. The cell proliferation index was determined using Ki-67 antibodies. The fluorescence intensity of stained cells was evaluated using a Navios 10 flow cytometer. For the evaluation of cytoskeleton markers, antibodies to vimentin and pan-cytokeratin were used. The expression of receptors was evaluated using antibodies to estrogen, the cell proliferation index Ki-67 was determined. The presence of necrotic and apoptotic cells was determined using a kit.

Results. In the study of the nature of cells in culture LumA-1, a high level of co-expression of mesenchymal marker vimentin (VI) and epithelial marker cytokeratin (PCK) – 89.55±2.55 on p1 and p2. In LumA-2 culture on p1, the level of co-expression was low and amounted to 6%, cells expressing VI (34.7%) predominated. On p2, the level of co-expression increased to 60%, cells expressing only PCK – 13%. When evaluating specific markers for breast cancer receptors in two cultures on the first and second passages, a high expression of ER and cell proliferation index Ki-67 was detected. At the same time, all cells with an epithelial nature expressed Ki-67. All cells with an epithelial nature expressed Ki-67.

Conclusions. Two cell cultures with a high level of estrogen expression, characteristic of luminal A subtype breast cancer, were obtained. Other indicators: absence of apoptosis, high level of cell proliferation index Ki-67 and presence of vimentin expression, are associated with an increase in the malignancy of the obtained cells compared to the original samples.

Keywords: luminal A subtype, estrogen, Ki-67, cell culture

CHARACTERISTICS OF THE MORPHOLOGY AND RECEPTOR APPARATUS OF THE CULTURE LUMINAL A SUBTYPE OF BREAST CANCER

Mogilenskikh Anna Sergeevna^{1,2}, Deryugin Mikhail Igorevich^{1,2}, Madiyarova Oksana Vladimirovna², Medvedev Artem Andreevich^{1,2}

¹Department of Histology

Ural State Medical University

²Institute of Medical Cell Technologies

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Cell lines, both immortalized and primary, obtained directly from the patient's tumor sample, are used as an *in vitro* model for the study of breast cancer. Primary breast cancer cell cultures demonstrate heterogeneity of morphological composition. The study of the structural features of cells and their receptor apparatus is necessary to search for additional morphological parameters that make it possible to more accurately determine the prognosis of breast cancer. The aim of the study was to determine the characteristics of breast carcinoma cells during cultivation over two passages.

Material and methods. Tumor tissue samples were obtained during surgery in patients diagnosed with breast cancer. Paraffin blocks for immunohistochemical analysis (IHC) were made from a part of the material. The expression of HER-

2/neu on tumor cells was determined using monoclonal antibodies to Her2/neu, estrogen and progesterone receptors on tumor cell nuclei — using monoclonal antibodies to estrogen receptors, progesterone receptors. Ki-67 antibodies were used to determine the index of cell proliferation. The fluorescence level of the stained cells was assessed using a Navios 10 flow cytometer. Antibodies to vimentin and pancytokeratin were used to evaluate cytoskeleton markers. The level of receptor expression was assessed using antibodies to estrogen, and the cell proliferation index Ki-67 was determined. **Results.** When studying the nature of cells in the LumA-1 culture, a high level of coexpression of the mesenchymal marker vimentin (VI) and the epithelial marker cytokeratin (PCK) was revealed – 89.55 ± 2.55 on p1 and p2. In the culture of LumA-2 on p1, the level of coexpression was low and amounted to 6%, cells expressing VI prevailed (34.7%). On p2, the level of coexpression increased to 60%, and cells expressing only RSK – 13% appeared. When evaluating breast cancer-specific receptors in two cultures, high expression of ER and the Ki-67 cell proliferation index was found in the first and second passages. At the same time, all cells with an epithelial nature expressed Ki-67. **Conclusion.** Two cell cultures with a high level of estrogen expression characteristic of the luminal A subtype of breast cancer were obtained. The remaining indicators: the absence of apoptosis, a high level of the Ki-67 cell proliferation index and the presence of vimentin marker expression are associated with an increase in the malignancy of the obtained cells compared with the original samples.

Keywords: luminal A subtype, estrogen, Ki-67, cell culture

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) характеризуется высокой молекулярной и морфологической гетерогенности, которая определяет эффективность применения лекарственной терапии и дальнейшего прогноза [1].

Современная молекулярная классификация рака молочной железы основана на экспрессии опухолевыми клетками рецепторов к эстрогену (ER), прогестерону (PR) и человеческому эпидермальному фактору роста 2 типа (HER2). Согласно данной классификации выделяют следующие подтипы рака молочной железы: Люминальный А, Люминальный В (HER2-), Люминальный В (HER2+), HER2 гиперэкспрессивный и Тройной негативный [1-3].

Люминальный А тип считается наиболее часто встречающимся среди рака молочной железы и характеризуется позитивным рецепторным статусом, отсутствием экспрессии HER2-neu и низким уровнем значения индекса клеточной пролиферации Ki-67 [3].

При этом, Люминальный А подтип рака молочной железы не является с морфологической точки зрения мономорфным и включает в себя спектр нозологических форм, такие как инвазивный протоковый рак молочной железы, инвазивный дольковый и редкие формы опухоли [4].

В качестве модели *in vitro* для изучения РМЖ используются клеточные линии, как иммортализованные, так и первичные, полученные непосредственно из образца опухоли пациенток [5].

При изучении морфологии иммортализованных клеточных линий были описаны мезенхимальные и эпителиоподобные фенотипы. В более чем трети исследований, посвященных изучению разработки и тестирования терапевтических препаратов, используются линия MCF7, относящаяся к люминальному А подтипу (ER+, PR+/-, HER2-). Описано, что клетки MCF7 демонстрируют плотные межклеточные контакты и образуют островки [6]. Первичные клеточные культуры РМЖ демонстрируют гетерогенность морфологического состава [7].

Данных о связи морфологического строения клеток в культуре и их рецепторного аппарата недостаточно, в то время как визуальный контроль играет важную роль при получении клеточных культур.

Цель исследования — определение морфологических характеристик и рецепторного аппарата клеток рака молочной железы при культивировании.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Образцы опухолевой ткани были доставлены из Городского маммологического центра ГКБ №40, г. Екатеринбург, зав. – проф. Демидов С.М. Наличие клинического диагноза РМЖ и добровольное согласие пациентки послужили критерием включения образца в исследование. Работа одобрена локальным этическим комитетом УГМУ протокол №1 от 24.01.20.

После механической дезагрегации образец растворяли в смеси ферментов коллагеназы-гиалуронидазы с питательной средой (DMEM:F12) в течение ночи в термостате при н.у. Полученную взвесь центрифугировали при 0,7 RPM 30 сек. Супернатант сливали, осадок подвергали химической дезагрегации: с трипсином (ПанЭко,Россия), с диспазой, с днказой (STEMCELL, Канада). После обработки ферментами клетки растворяли в большем объеме HF и центрифугировали при 1,4 RPM 5. Для поддержания роста культуры использовалась питательная среда Mammocult™ Human Medium (STEMCELL, Канада) с добавлением гентамицина.

Из части материала были изготовлены парафиновые блоки для иммуногистохимического анализа (ИГХ). Исследования выполнялись в патологоанатомическом отделении ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г.Екатеринбург, зав. отделением – проф. Сазонов С.В.

ИГХ 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), 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.

Получение клеточных линий и проточная цитофлуорометрия выполнялась в Лаборатории клеточных культур ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий - зав. к.б.н. Фадеев Ф.А.. Оценку уровня флуоресценции окрашенных клеток осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра Navios 10 (Beckman Coulter, США). Для оценки маркеров цитоскелета использовали антитела к виментину и панцитокератину. Уровень экспрессии рецепторов оценивался с помощью антител к эстрогену, определялся индекс клеточной пролиферации Ki-67. Все антитела производства Abcam, Канада. Фиксация клеток осуществлялась с помощью 4% формальдегида – 5 минут, подготовка холодным метанолом – 5 минут, 0,5% Тритон X-100 (Applichem, Германия) – 15 минут. Для исследования на апоптоз и некроз использовался коммерческий набор Lumiprobe, Россия. Оценка производилась для 10.000 событий.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При ИГХ исследовании материала первого случая (ЛюмА-1) обнаружена экспрессия рецепторов ER — 20 %, к PR — 70%, индекс клеточной пролиферации Ki67 — 10%. Во втором случае (ЛюмА-2) ER — 70 %, к PR — 90%, Ki67 составил 5%. Экспрессия к HER-2/neu 0, данные образцы РМЖ относятся к люминальному А подтипу.

При морфологической оценке на первом пассаже (p1) в обоих случаях отмечаются клетки разной формы: мелкие округлые, веретеновидные, фибробластоподобные. Клетки контактируют друг с другом при помощи отростков. На втором пассаже (p2) наблюдается тенденция к уменьшению гетерогенности, в первой культуре клетки округлые средних размеров и веретеновидные, вторая культура представлена преимущественно округлыми клетками (Рис. 1).

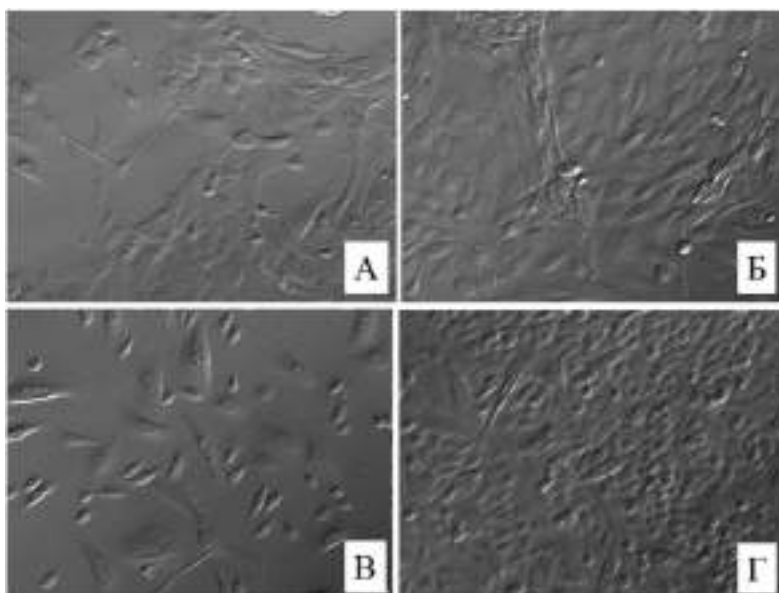


Рис. 1. Морфология клеток культур РМЖ, А- р1 ЛюмА-1, Б – р2 люмА-1, В – р1 люмА-2, Г – р2 ЛюмА-2, световая микроскопия, увеличение 200

При исследовании клеток методом проточной цитофлуориметрии было обнаружено формирование двух популяций клеток на каждом пассаже – с большими и меньшими размерами согласно корреляции с прямым светорассеянием. Боковое светорассеяние связано с формой ядра, количеством и типом гранул. Соответственно, группа клеток с меньшими размерами имеет большую гетерогенность.

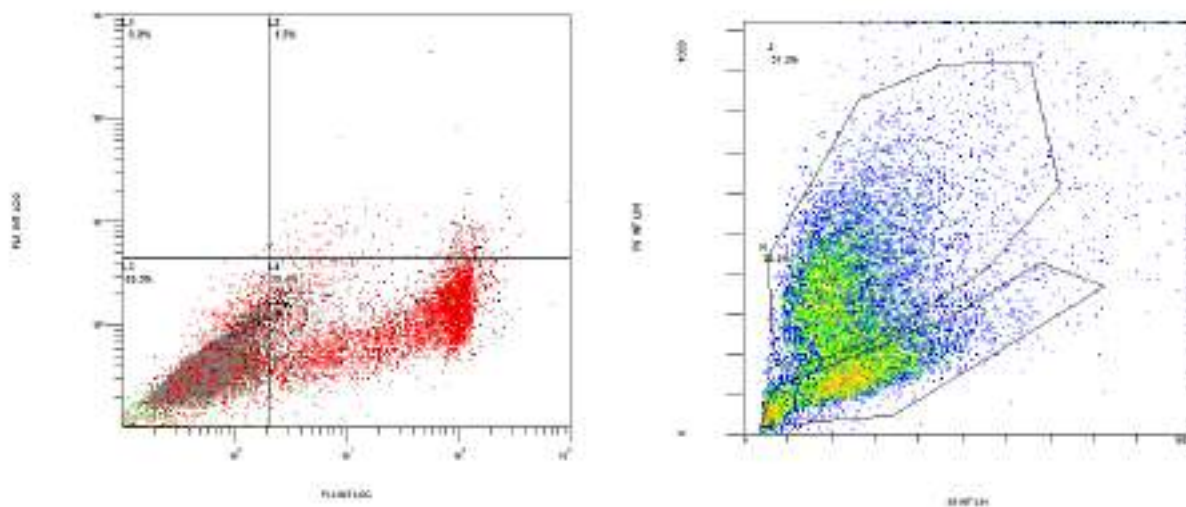


Рис. 2. Проточная цитофлуориметрия, пример. Первый график слева – по оси X окрашивание пропидий йодид (некрот), по оси Y – аннексин (апоптоз). Второй график справа – по оси X боковое светорассеяние, по оси Y – прямое светорассеяние.

При окраске аннексином и пропидием йодидом для оценки клеточной гибели в двух культурах обнаружено более 50% живых клеток. Количество некротических клеток в культуре ЛюмА-1 составляло $4,5 \pm 0,3$ на р1 и р2. В культуре ЛюмА-2 значительно больше – $26,05 \pm 2,55$. Клеток, находящихся в состоянии апоптоза, обнаружено не было как при окрашивании, так и при оценке морфометрических характеристик.

При изучении природы клеток в культуре ЛюмА-1 был выявлен высокий уровень коэкспрессии мезенхимального маркера виментина (VI) и эпителиального маркера цитокератина (РСК) – $89,55 \pm 2,55$ на р1 и р2. В культуре ЛюмА-2 на р1 уровень коэкспрессии

был низкий и составил 6%, преобладали клетки, экспрессирующие VI (34,7%). На p2 уровень коэкспрессии увеличился до 60%, появились клетки, экспрессирующие только PCK – 13%.

При оценке специфических для РМЖ рецепторов в двух культурах на первом и втором пассаже обнаружена высокая экспрессия ER и индекса клеточной пролиферации Ki-67. При этом все клетки, обладающие эпителиальной природой, экспрессировали Ki-67.

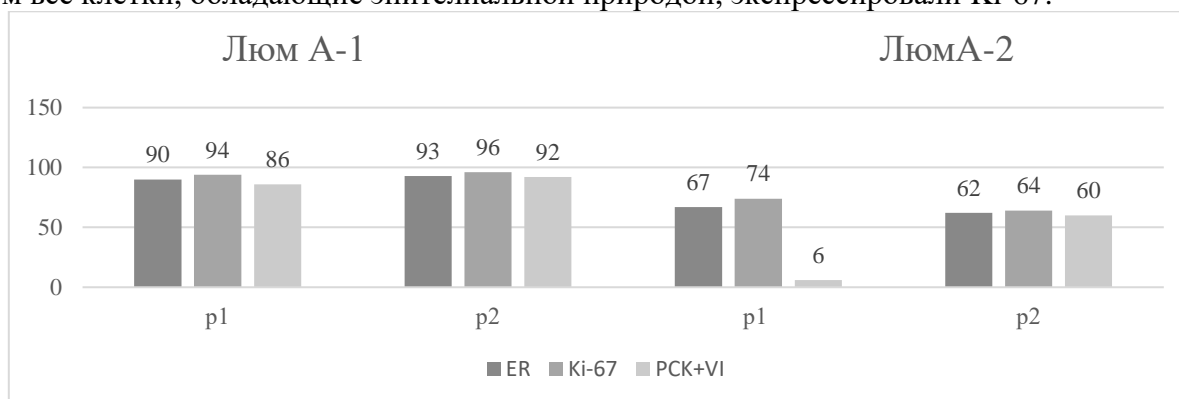


Рис. 3 Распределение экспрессии основных маркеров в двух культурах РМЖ, полученных от люминальных А подтипов, %

ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки, полученные из образцов Люминального А подтипа в культуре, демонстрировали сходную морфологию и жизнеспособность.

Апоптоз – регулируемый процесс запрограммированной клеточной гибели. Неспособность поврежденных клеток подвергнуться апоптозу способствует прогрессированию рака. Апоптоз морфологически определяется уменьшением размеров клеток, разрывом мембран, конденсацией хроматина и образованием апоптотических телец, что отражается на графике бокового и прямого светорассеяния при проточной цитофлуориметрии [8]. Как на графике, так и при окраске аннексином, апоптотических клеток обнаружено не было.

По размерам и экспрессии маркеров цитокератина и виментина клетки гетерогенны. В культуре ЛюмА-1 на протяжении двух пассажей сохранялась коэкспрессия двух маркеров. Имеются данные о том, что потеря цитокератина и усиление экспрессии виментина являются показателями биологически агрессивной рака молочной железы [9]. Высокий уровень индекса Ki-67 также свидетельствует об увеличении злокачественности [10].

На протяжении двух пассажей клетки сохраняли высокий уровень экспрессии эстрогена, характерный для люминального А подтипа РМЖ.

ВЫВОДЫ

Были получены две клеточные культуры с высоким уровнем экспрессии эстрогена, характерным для люминального А подтипа РМЖ. Остальные показатели: отсутствие апоптоза, высокий уровень индекса клеточной пролиферации Ki-67 и наличие экспрессии маркера виментина, ассоциированы с увеличением злокачественности полученных клеток по сравнению с изначальными образцами.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Молекулярно-генетические маркеры рака молочной железы / Гришина К.А., Музаффарова Т.А., Хайленко В.А., Карпунин А.В. // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2016. – 12(3). – с. 36-42.
2. Ранний рак молочной железы: прогностическое значение биологических подтипов (анализ кумулятивной базы данных ФГБУ «НИИ ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. ПЕТРОВА» Минздрава России) / Семиглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Семиглазов В.В. и др. // Злокачественные опухоли. – 2012. – 2(2). – 12-18
3. Сазонов С.В. Обеспечение качества молекулярно-биологических исследований при диагностике рака молочной железы. Екатеринбург: ВУМАН, 2018. 152 с.
4. Особенности морфологического строения люминального А типа рака молочной железы. / Завьялова М.В., Телегина Н.С., Вторушин С.В. и др. // Сибирский онкологический журнал. 2013. – Том 1. – с. 38-41
5. Ингибирование Тамоксифеном роста клеток и запуск механизма старения в культуре, полученной от люминального В HER2-негативного подтипа рака молочной железы. / Могиленских А.С., Фадеев Ф.А., Сазонов С.В., Демидов С.М. // Успехи молекулярной онкологии. – 2023. – Том 10. № 4. – С 125.
6. Molecular and cellular characterization of two patient-derived ductal carcinoma in situ (DCIS) cell lines, ETCC-006 and ETCC-010. / Samson J, Derlipanska M, Zaheed O, Dean K. // BMC Cancer. 2021 Jul 8;21(1):790. doi: 10.1186/s12885-021-08511-2.

7. 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.
- 8.. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии / Головкин А. С., Зурочка А. В., Хайдуков С. В., Кудрявцев И.В // Медицинская иммунология. - 2012. - №6.
9. Cytokeratin and vimentin expression in breast cancer. /Vora H.H., Patel N.A., Rajvik K.N.et al//. Int J Biol Markers. – 2009. – 24(1):38-46. doi: 10.1177/172460080902400106
10. Прогностическая и предиктивная значимость маркера Ki67 при раке молочной железы. /Тележникова И.М., Сетдикова Г.Р., Еремеева Е.Р. и [др]//. Злокачественные опухоли. – 2022. – 12(3s1). – 27-38.

Сведения об авторах

А.С. Могиленских* – научный сотрудник ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», ассистент кафедры гистологии

М.И. Дерюгин - лаборант-исследователь ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», ассистент кафедры гистологии

О.В. Мадиярова – научный сотрудник ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

А.А. Медведев - лаборант-исследователь ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», ассистент кафедры гистологии, ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет

Information about the authors

A.S. Mogilenskikh* - researcher of the State Autonomous Institution of Medical Cell Technologies, assistant professor of the department of Histology

M.I. Deryugin - laboratory researcher of the State Autonomous Institution of Medical Cell Technologies, assistant professor of the department of Histology

O.V. Madiyarova - researcher of the State Autonomous Institution of Medical Cell Technologies

A.A. Medvedev - research laboratory assistant at the Institute of Medical Cell Technologies, assistant professor of the department of Histology

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

annasajler@yandex.ru

УДК: 617.5-089.844

ОБЗОР ЭТАПОВ ЖИРОВОЙ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ

Насырова Алина Азатовна¹, Петровских Арина Андреевна¹, Богданова Анна Михайловна^{1,2}

¹Кафедра анатомии, топографической анатомии и оперативной хирургии

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

²ГБУЗ СО «Центральная городская больница № 7»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Липосакция - удаление избыточных и неравномерных жировых отложений путем вакуумного отсасывания подкожного жира в области живота, бедер и др. В последующем с помощью отобранного материала можно провести инъекцию собственных жировых клеток в требуемые места для коррекции контуров тела (липофилинг). Отсутствие иммуногенности, низкая стоимость и легкая доступность делают этот метод предпочтительным для решения многих реконструктивных и эстетических проблем. **Цель исследования** – провести литературный обзор всех этапов липофилинга и описание модернизаций этой процедуры, сравнить имеющиеся техники очистки жировой ткани. **Материал и методы.** На основе электронных научных ресурсов был проведен литературный обзор основных этапов жировой аутоотрансплантации. Были описаны используемые оперативные доступы, преимущества и недостатки методов сбора аутологичного жира и его обработки, техника введения. **Результаты.** Донорский участок влияет на жизнеспособность аутоотрансплантата, доступ к нему осуществляется из нескольких мест для получения положительного косметического эффекта. Для сбора жира преимущественно применяют вакуумную и шприцевую липосакцию, аутоотрансплантат обязательно подвергается очистке во избежание некроза и воспаления. Инъекция проводится малой по диаметру канюлей, трансплантат распределяется послойно. **Выводы.** В качестве донорской области предпочтительно использование ткани SAT. Использование шприцевой вакуумной аспирации сохраняет целостность адипоцитов. Для сбора жира используются большие по диаметру канюли. Промывка и фильтрация эффективны для больших объемов жира. Равномерное распределение жирового трансплантата в месте реципиента на разную глубину является ключом к успешной инъекции.

Ключевые слова: липосакция, липофилинг, липоаспират, аутоотрансплантация жировой ткани, канюли.

OVERVIEW OF FAT AUTOTRANSPLANTATION STEPS

Nasyrova Alina Azatovna¹, Petrovskikh Arina Andreevna¹, Bogdanova Anna Mikhailovna^{1,2}

¹Department of Anatomy, Operative Surgery and Topographic Anatomy

Ural State Medical University