

- Gelderblom H. [et al.] // *Ann Oncol.* – 2012. – Vol. 23, № 7. – P. 131-138. – Doi: 10.1093/annonc/mds231.
3. Neuroendocrine tumor / NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. – 2014.
4. Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors / Fassnacht M., Arlt W., Bancos I. [et al.] // *Eur J Endocrinol.* – 2016. – Vol. 175 (2). – P. G1-G34. – Doi: 10.1530/eje-16-0467.
5. Prevalence of adrenal incidentaloma in a contemporary computerized tomography series / Bovio S., Cataldi A., Reimondo G. [et al.] // *J Endocrinol Invest.* – 2006. – Vol. 29 (4). – P. 298-302. – Doi: 10.1007/BF03344099.
6. Gavras, I. The incidentally discovered adrenal mass // *N Engl J Med.* – 2007. – Vol. 356 (19). – P. 2005-2006. – Doi: 10.1056/NEJMc070612.
7. Херт Г. Оперативная урогинекология: пер. с англ / под ред. Лопаткина Н. А., Аполихина О. И. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 276 с.
8. Чернышев, В. Н. «Малые» опухоли надпочечников. Спорные вопросы техники операции / Чернышев В. Н., Хамидуллин А. А., Аюпов А. М. // *Хирургия.* – 2002. – № 11. – С. 42-48.
9. Laparoscopic adrenalectomy for pheochromocytoma. A comparison to aldosteronoma and incidentaloma / Kalady M. F., McKinlay R., Olson Jr J. A. [et al.] // *Surg. Endosc.* – 2004. – № 18. – P. 621-625.
10. Effects of perioperative alphablock on haemodynamic control during laparoscopic surgery for pheochromocytoma / Tazuin-Fin P., Sesay M., Gosse P., Ballanger P. // *Br.J.Anaesth.* – 2004. – № 92 (4). – P. 512-517.
11. A survey on adrenal incidentaloma in Italy: Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology / Mantero F., Terzolo M., Arnaldi G. [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2000. – Vol. 85 (2). – P. 637-644. – Doi:10.1210/jcem.85.2.6372.
12. Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma") / Grumbach M. M., Biller B. M., Braunstein G. D. [et al.] // *Ann Intern Med.* – 2003. – Vol. 138 (5). – P. 424-429.
13. Russell, R. P. Adrenal cortical adenomas and hypertension: a clinical pathologic analysis of 690 cases with matched controls and a review of the literature / Russell R. P., Masi A. T., Richter E. D. // *Medicine (Baltimore).* – 1972. – Vol. 51 (3). – P. 211-225
14. Yeh, H. C. Sonography of the adrenal glands: normal glands and small masses // *AJR Am J Roentgenol.* – 1980. – Vol. 135. – P. 1167-1177. – Doi:10.2214/ajr.135.6.1167.
15. Incidentally discovered adrenal tumors: endocrine and scintigraphic correlates / Barzon L., Scaroni C., Sonino N. [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1998. – Vol. 83 (1). – P. 55-62. – Doi:10.1210/jcem.83.1.4501.
16. Reduced serum levels of dehydroepiandrosterone sulphate in adrenal incidentalomas: a marker of adrenocortical tumour / Flecchia D., Mazza E., Carlini M. [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 1995. – Vol. 42 (2). – P. 129-134.
17. Incidentally discovered adrenal tumors: an institutional perspective / Herrera M. F., Grant C. S., van Heerden J. A. [et al.] // *Surgery.* – 1991. – Vol. 110 (6). – P. 1014-1021.
18. Serendipitous adrenal masses: prevalence, significance, and management / Abecassis M., McLoughlin M. J., Langer B., Kudlow J. E. // *Am J Surg.* – 1985. – Vol. 149 (6). – P. 783-788.
19. Incidentally discovered adrenal masses / Kloos R. T., Gross M. D., Francis I. R. [et al.] // *Endocr Rev.* – 1995. – Vol. 16 (4). – P. 460-484. – Doi:10.1210/edrv-16-4-460.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КУЛЬТУРЕ

УДК:616-006.699

**Е.О. Шамшурина¹, М.В. Улитко^{2,3}, С.А. Титова³,
С.В. Сазонов^{1,2}, С.М. Демидов^{1,2}**

¹Уральский государственный медицинский университет,
г. Екатеринбург, Российская Федерация;

²Институт медицинских клеточных технологий,
г. Екатеринбург, Российская Федерация;

³Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,
г. Екатеринбург, Российская Федерация.

Установлено влияние инсулина на полиморфизм культивируемых клеток карциномы молочной железы, проявляющихся в изменении морфологических показателей клеток в культуре на протяжении нескольких пассажей.

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

INFLUENCE OF INSULIN ON MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BREAST CARCINOMA CELLS IN CULTURE

**E.O. Shamshurina¹, M.V. Ulitko^{2,3}, S.A. Titova³,
S.V. Sazonov^{1,2}, S.M. Demidov^{1,2}**

¹Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

²Institute of Medical Cellular Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

³Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russian Federation

The effect of insulin on the polymorphism of cultured breast carcinoma cells, which manifests itself in changes in the morphological parameters of cells in culture over several passages, has been established.

Keywords: breast carcinoma, cell culture, insulin.

Введение

На сегодняшний день для ряда исследователей одной из важных задач является получение персонифицированной культуры клеток карциномы молочной железы [1, 7].

Учитывая морфологическую гетерогенность рака молочной железы, влияющей на ряд биологических процессов в клетках, на чувствительность опухоли к химиотерапии [6], при длительном культивировании клеток карциномы молочной железы наблюдается появление различных клеточных популяций, которые характеризуются изменением морфологических показателей [2, 5], изменением изначальных характеристик опухоли [3]. При отработке методик получения персонифицированных культур клеток необходимо учитывать условия культивирования [7], состав культуральной среды, которые во многом определяют рост, изменение морфологических свойств, жизнеспособность культивируемых клеток [4].

Цель работы

Оценка влияния состава культуральной среды на морфологические показатели культивируемых клеток карциномы молочной железы с целью создания персонифицированной экспериментальной модели.

Материалы и методы

Для проведения исследования использовался операционный материал карциномы молочной железы, который транспортировали в лабораторию в стерильной среде (PBS и 1%-ый раствор антибиотиков-антимикотиков).

Все операции, связанные с обработкой материала, проводились в стерильных условиях в ламинарном боксе БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 LORICA.

Опухолевую ткань промывали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, Gibco, 1740576) на чашке Петри и измельчали с помощью хирургического скальпеля. Фрагменты образца вновь промывали PBS, помещали в 50-мл пробирку (TPP, 91050), содержащую смешанный раствор ферментов, и инкубировали 16 часов в CO₂ инкубаторе Sanyo (Panasonic) MCO-18AC при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂, 95% влажности. После инкубации образец фильтровали с использованием сита для клеток 100 мкм (Corning, 431752), затем центрифугировали при 1600 об./мин. в течение 10 минут. Супернатант отбрасывали и осадок промывали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) и центрифугировали при 1600 об./мин. в течение 5 минут. Затем осадок ресуспендировали с полной питательной средой. Суспензию клеток инкубировали в CO₂ инкубаторе при температуре 37°C с использованием питательной среды Игла DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия) и 1% антибиотика-антимикотика, 1% амфотерицина В, 0,1% гентамицина до образования монослоя.

Далее к части культуры клеток добавляли инсулин в дозе 0,005 мг/мл и продолжали культивирование с проведением оценки морфологиче-

ского состояния клеток в культурах с инсулином и без добавления препарата на протяжении трех пассажей.

Смену культуральной среды осуществляли каждые 4-5 дней.

Пересев клеточных линий проводили при достижении культурой 80-90% конфлюента один раз в 3-4 дня, вызывая дезинтеграцию монослоя 8-минутной экспозицией в растворе трипсина и версена в соотношении 1:1.

Контроль за состоянием культуры проводили с помощью инвертированного микроскопа Eclipse TS100, Nikon при увеличении в 200 и 400 раз.

Для оценки морфологических параметров клетки окрашивались по Романовскому-Гимзе и по Май-Грюнвальду (рис. 1).

Линейные размеры ядер и самих клеток вычислялись с помощью окулярного микрометра МОВ-1-15х и светового микроскопа Micros MC50 (Австрия) при увеличении х400 по формуле:

$$t = \frac{II - I}{\beta},$$

где t — линейные размеры объекта;

$II - I$ — разность отсчетов;

β — линейное увеличение объектива.

На основании этих данных высчитывалась площадь ядер и клеток. Также определялось ядерно-цитоплазматическое соотношение по формуле:

$$ЯЦО = \frac{S_{я}}{S_{ц}}$$

где ЯЦО — ядерно-цитоплазматическое отношение;

$S_{я}$ — площадь ядра;

$S_{ц}$ — площадь цитоплазмы.

Статистическую обработку результатов проводили, используя программы MS Excel и STATISTICA 6, для оценки значимости различий использовали критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

При исследовании морфологических параметров опухолевых клеток в процессе культивирования были выявлены статистически значимые изменения показателей площади клеток, площади ядер и ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) в зависимости от условий культивирования.

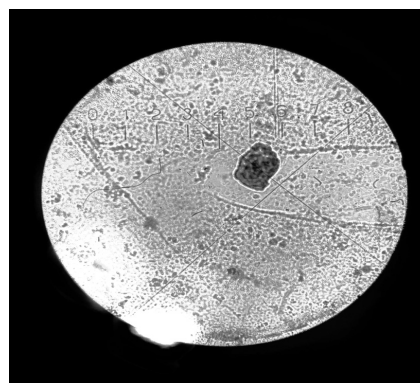


Рис. 1. Измерение линейных размеров клеток с помощью окулярного микрометра МОВ-1-15х и светового микроскопа Micros MC50 (Австрия). Увел. X 400. Окраска по Романовскому-Гимзе

При оценке показателей площади клеток и площади ядер в культурах клеток карциномы молочной железы, инкубированных с инсулином и без добавления препарата, были выявлены статистически значимые различия между культурами клеток.

Так, показатель площади ядер в культуре без добавления инсулина на первом пассаже (P0) составил $0,0033 \pm 0,0002$, на втором пассаже (P1) этот показатель достиг значения $0,0044 \pm 0,0002$ и к третьему пассажиру (P2) достиг $0,0049 \pm 0,0004$ ($p \leq 0,05$).

Оценка этого показателя в культуре с добавлением инсулина показала, что уже на P0 значение составило $0,0036 \pm 0,0007$, в клетках P1 показатель достиг значения $0,0048 \pm 0,0003$ и на третьем пассаже составил $0,0059 \pm 0,0002$ ($p \leq 0,05$) (рис. 2).

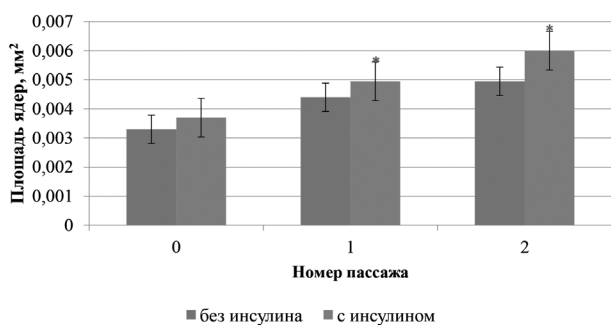


Рис. 2. Различие между группами культуры клеток рака молочной железы с инсулином и без инсулина по площади ядер (* — различие групп с инсулином и без инсулина достоверно ($p < 0,05$), на доверительных интервалах отложена величина ошибки среднего)

При оценке показателя площади клеток также были выявлены достоверные изменения. Так, значение этого показателя в клетках, культивируемых без добавления инсулина, на первом пассаже (P0) составило $0,0096 \pm 0,0003$, но на последующих двух пассажах (P1 и P2) значительно не изменилось и достигло значений $0,0103 \pm 0,0002$ и $0,0104 \pm 0,0003$ соответственно. Тогда как в культуре клеток с добавлением инсулина показатель площади клеток достоверно увеличивался на протяжении всех трех пассажей и составил $0,0089 \pm 0,0017$ на первом пассаже (P0), $0,0100 \pm 0,0003$ — на втором (P1), на третьем пассаже (P2) достиг значения $0,0107 \pm 0,0002$ ($p \leq 0,05$) (рис. 3).

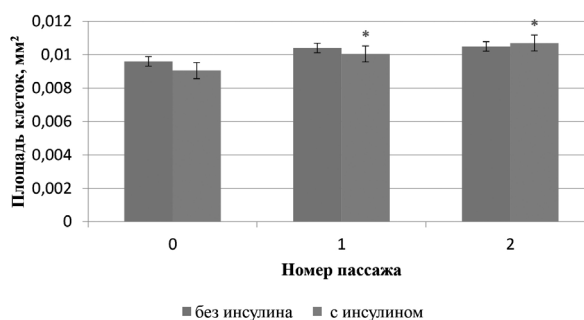


Рис. 3. Различие между группами культуры клеток рака молочной железы с инсулином и без инсулина по площади клеток (* — различие групп с инсулином и без инсулина достоверно ($p < 0,05$), на доверительных интервалах отложена величина ошибки среднего)

Результаты эксперимента показали, что на протяжении всего процесса культивирования наблюдалось увеличение значения ядерно-цитоплазматического соотношения клеток, инкубированных с добавлением инсулина, по сравнению с культурой без инсулина.

Так, показатель ЯЦО клеток, культивируемых без добавления инсулина, на первом пассаже (P0) составил $0,35 \pm 0,021$, на втором пассаже (P1) этот показатель составил $0,42 \pm 0,020$, на третьем (P2) — $0,47 \pm 0,032$ ($p \leq 0,05$).

При морфологической оценке клеток, культивируемых с добавлением инсулина, показатель ЯЦО значительно превышал таковой в культуре без добавления инсулина и в клетках P0 составил $0,40 \pm 0,022$ с дальнейшим увеличением на P1 до $0,48 \pm 0,028$ и к P2 увеличился до $0,55 \pm 0,023$ ($p \leq 0,05$) (рис. 4).

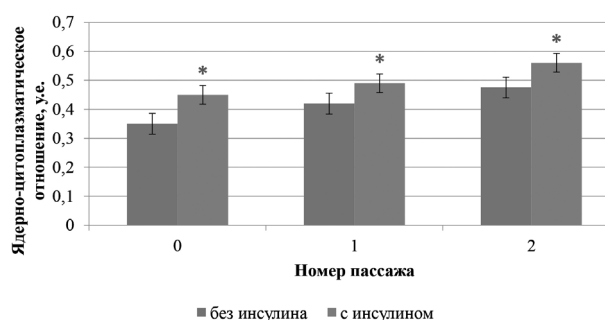


Рис. 4. Различие ЯЦО между группами культуры клеток рака молочной железы с инсулином и без инсулина (* — различие групп с инсулином и без инсулина достоверно ($p < 0,05$), на доверительных интервалах отложена величина ошибки среднего)

Выводы

Опыт культивирования клеток рака молочной железы с добавлением в культуру инсулина выявил статистически значимые различия площадей ядер и клеток данных групп и тенденцию к увеличению ядерно-цитоплазматического отношения этих клеток, по сравнению с морфологическими показателями клеток, культивируемых без добавления препарата, что свидетельствует о чувствительности данного типа клеток к инсулину. Таким образом, инсулин, не являющийся специфическим агентом для какого-либо типа культивируемых клеток, повышая накопление глюкозы и аминокислот клетками в культуре, влияет на процессы пролиферации и дифференцировки клеток, необходимых для поддержания роста культуры. Следовательно, изменение состава культуральной среды должно учитываться при дальнейшем культивировании клеток карциномы молочной железы с целью создания персонифицированных экспериментальных моделей.

Литература

1. 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. Шамшурина, Е. О. Морфологический анализ культуры клеток рака молочной железы / Шамшурина Е. О., Могиленских А. С., Сазонов С. В. // Успехи молекулярной онкологии. – 2019. –Т.6, №4. – С.88-89.
3. Опыт культивирования клеток карциномы молочной железы тройного негативного подтипа / Шамшурина Е. О., Могиленских А. С., Сазонов С. В. [и др.] // Клеточные технологии – практическому здравоохранению: сборник статей VIII межрегиональной научно-практической конференции. – Екатеринбург, 2019. – С. 212-214.
4. Могиленских? А. С. Сравнение роста первичной культуры карциномы молочной железы в различных условиях для культивирования. / Могиленских А. С., Седнева-Луговец Д. А. // VМеждународная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» : Сборник статей. – Екатеринбург, 2020. – С.128-132.
5. Нуркиев, А. Р. Сравнительная морфологическая оценка культивируемых клеток двух случаев карцином молочной железы / Нуркиев А. Р., Шамшурина Е. О. // V Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» : Сборник статей. – Екатеринбург, 2020. – С.132-137.
6. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы, как фактор, отражающий метастатический потенциал и чувствительность опухоли к химиотерапии./ Герашенко Т.С. , Завьялова М.В. [и др.] // ACTA NATURE. – 2017. – Том 9, № 1 (32). – С. 60-72.
7. Могиленских, А. С. Оптимизация условий культивирования первичной культуры карциномы молочной железы человека / Могиленских А. С., Сазонов С. В., Демидов С. М. // Материалы VI Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2020». – С-Петербург, 2020.

Сведения об авторах

Е.О. Шамшурина — канд. мед. наук, доц. кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УГМУ.

Адрес для переписки: elshamshurina@gmail.