

архив студентов. URL: <https://studfile.net/preview/6066158/> (дата обращения 06.03.2021)

УДК:616-006.699

Могиленских А.С.^{1,2}, Шамшурина Е.О.¹, Гребенюк Е.В.^{1,2}, Сазонов С.В.^{1,2}, Коньшев К.В.^{1,2}

Морфологическая характеристика клеток, полученных из образцов карциномы молочной железы разных молекулярно-биологических подтипов

Кафедра гистологии

¹ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России

²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Екатеринбург, Российская Федерация

Mogilenskikh A.S.^{1,2}, Shamshurina E.O.¹, Grebenyuk E.V.^{1,2}, Sazonov S.V.^{1,2}, Konyshev K.V.^{1,2}

Morphological characteristics of cells obtained from breast carcinoma samples of different molecular biological subtypes

¹Ural state medical University

Department of histology

²Institute for medical cell technologies,
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: annasajler@yandex.ru

Аннотация. В статье дана морфологическая характеристика клеток, полученных из образцов карциномы молочной железы человека Luminal A, HER2+ и Тройного негативного молекулярно-биологических подтипов, в ходе культивирования. Анализ показал, что в первом пассаже обнаруживаются клетки эпителиального фенотипа, что свидетельствует об эпителиальной природе опухолей и подтверждается выявлением иммуноцитохимического маркера панцитокератин. Выявление в культурах веретеновидных, фибробластоподобных и макрофагоподобных клеточных фенотипов свидетельствуют о гетерогенности культуры опухолевых клеток.

Annotation. The article presents the morphological characteristics of cells obtained from samples of human breast carcinoma Luminal A, HER2 + and Triple negative molecular biological subtypes during cultivation. The analysis showed that in the first passage cells of the epithelial phenotype are found, which indicates the epithelial nature of the tumors and is confirmed by the detection of the immunocytochemical marker pancytokeratin. The identification of fusiform,

fibroblast-like and macrophage-like cell phenotypes in cultures indicates the heterogeneity of the tumor cell culture.

Ключевые слова: карцинома молочной железы, первичная клеточная культура, Luminal A подтип, HER2+ подтип, Тройной негативный подтип

Key words: breast carcinoma, primary cell culture, Luminal A subtype, HER2 + subtype, Triple negative subtype

Введение

Стабильные клеточные линии карциномы молочной железы (КМЖ) давно используются при оценке *in vitro* подходов к лечению и диагностики опухолевых заболеваний.

Число таких линий клеток постоянно растет, но и растет число исследований, в которых ставится под сомнение релевантность результатов, представленных при работе с такими линиями. Иммуортализованные клеточные линии зачастую не только изменены на генетическом уровне, но и внешне демонстрируют морфологическое сходство, что свидетельствует об отсутствии идентификационных характеристик [1].

В последнее время использование первичных клеточных культур, полученных непосредственно от пациента, приобретает большую значимость для получения персонифицированных моделей, используемых для индивидуального подбора противоопухолевых препаратов. Первичной культурой называют культуру клеток, выделенных непосредственно из образцов опухолей и до первого посева на питательные среды [5]. Такая культура содержит не только опухолевые клетки, но и клетки микроокружения, которые, зачастую, оказывают влияние на условия роста культуры, изменение морфологии культивируемых опухолевых клеток [2,4].

В настоящее время мало данных об изменениях первичной культуры карциномы молочной железы после первого посева при переходе такой культуры в клеточную линию. Большинство исследований рецепторного аппарата, генетических изменений, морфологий клеток, проводится после многочисленных пассажей.

Цель исследования - изучение изменения морфологических характеристик клеток, полученных из образцов карциномы молочной железы человека разных молекулярно-биологических подтипов, в ходе культивирования.

Материалы и методы исследования

Для исследования использовали три образца биоптатов карциномы молочной железы размером в среднем 1,5 x 2 см, полученных в ходе операции. Образцы доставляли в лабораторию в стерильных условиях и измельчали механическим способом. Далее образцы помещались на 15-16 часов в термостат (н.у., отсутствие CO₂) в питательную среду со смесью ферментов (коллагеназы-гиалуронидазы). Далее проводили центрифугирование при 80g (30 сек), затем ресуспендировали с трипсином, разбавляли HF(раствор Хэнкса + 10% FBS),

центрифугировали при 350g 5 минут, полученный осадок обрабатывали диспазой и ДНКазой до появления тягучей субстанции, растворяли в HF, центрифугировали при тех же оборотах, после чего надосадочную жидкость сливали, осадок при необходимости пропускали через фильтр и растворяли в питательной среде Mammocult. [3]

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

Для морфологического исследования клетки окрашивали гематоксилином-эозином или по Паппенгейму. Иммуногистохимические и иммуноцитохимические реакции осуществлялись в автостейнере DАСО, Дания. Определение принадлежности выросших клеток к эпителиальным осуществлялось с помощью антитела anti-Pan Keratin, наличие белка, характерного для клеток мезенхимального происхождения определялось с помощью антитела Vimentin. Подсчет количества клеток осуществлялся в автоматическом счетчике ТС20.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты иммуногистохимического исследования показали, что образцы биоптатов карциномы молочной железы относятся к Luminal A, HER2+ и Тройному негативному биологическим подтипам со средним уровнем пролиферации (индекс пролиферации Ki-67 составил 10%, 40%, 50% соответственно)[6].

В ходе исследования роста клеточных культур, полученных от образцов карцином Luminal A и Тройного негативного подтипов на 6 сутки были обнаружены островки плотно прилегающих друг к другу клеток треугольной формы. При этом, в культуре HER2+ подтипа такие островки сформировались только к 10 суткам.

Анализ жизнеспособности клеток во время пересева адгезивных культур показал, что большее количество живых клеток – 66 % (при общей клеточности $5,27 \times 10^5$) наблюдалось в культуре, полученной от образца тройного негативного подтипа. При этом меньшая выживаемость наблюдалась в образце, полученном от Luminal A – 32%, при общей клеточности $7,15 \times 10^5$.

Культуры всех трех образцов на первом пассаже исследовались на выявление иммуноцитохимических маркеров – PanCytokeratin (PCK) и Vimentin. Результаты исследования показали, что все полученные культуры имели эпителиальную природу (выявлялся ПЦК), однако, в образцах, полученных от карциномы Luminal A подтипа, определялся также виментин.

При морфологической оценке всех культур выявлялись следующие типы клеток: округлые эпителиального фенотипа мелкие, средние и крупные, веретеновидные, макрофагоподобные и фибробластоподобные (рис.1).

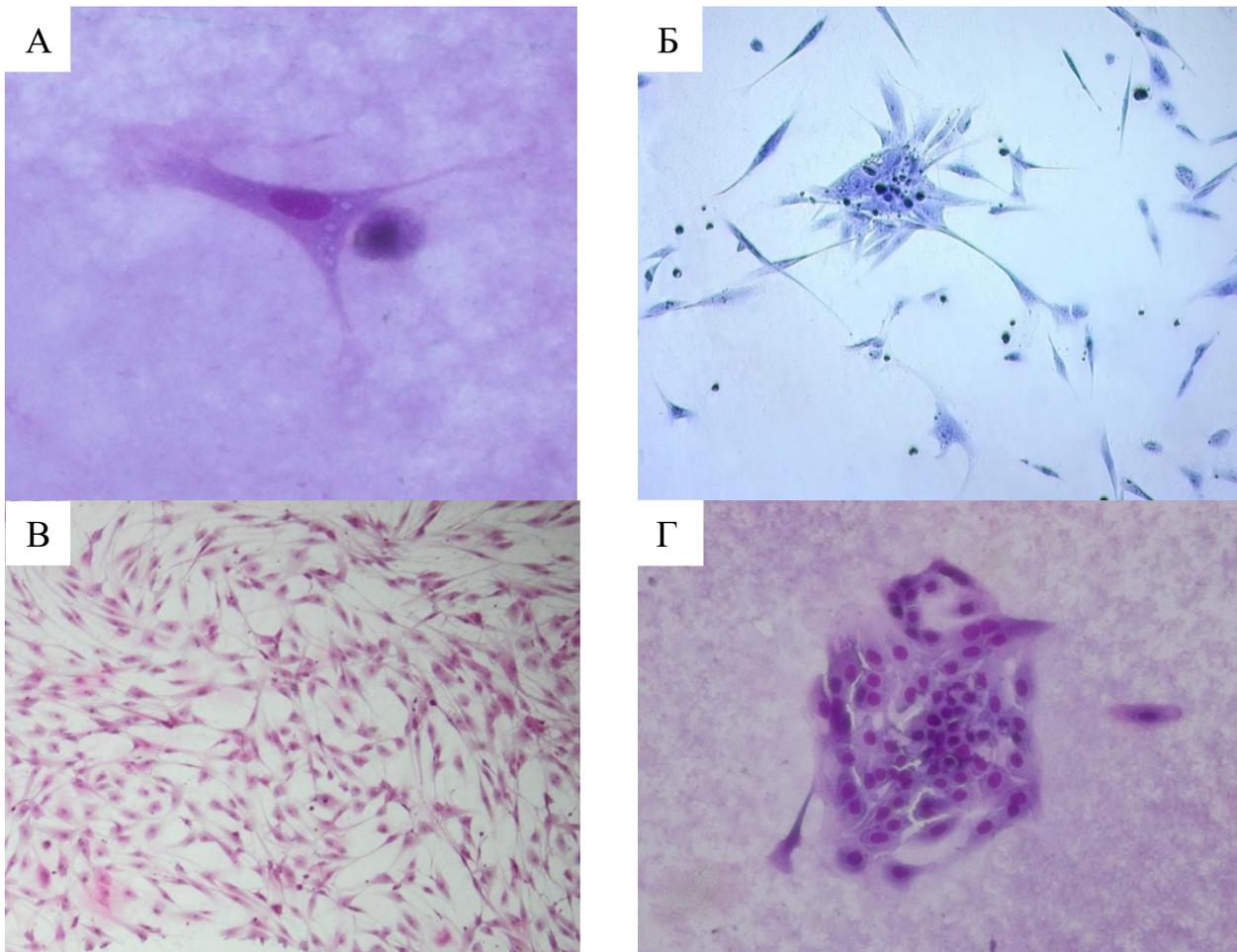


Рисунок 1. Типы клеток в культурах КМЖ (А- фибробластоподобные и макрофагоподобные клетки ув.400,Б –округлые клетки вокруг островка ув.100, В – фибробластоподобные клетки ув.100, Г- эпителиальный островок ув. 400)

Так, при оценке клеток исследуемых культур на протяжении двух пассажей, выявлено, что на первом пассаже (P1) в культуре Luminal A подтипа определялись только округлые клетки эпителиального фенотипа, причём большая часть их (60%) – мелкие, с плотным гиперхромным ядром, небольшим количеством плотной гомогенной цитоплазмы, 40% клеток более крупные, с большим количеством плотной гомогенной цитоплазмы, крупным светлым, эксцентрично расположенным ядром, в котором чётко определяются глыбки гетерохроматина. Но на втором пассаже (P2), кроме мелких округлых клеток, доля которых уменьшилась до 21%, и округлых крупных клеток (41%) в культуре определялись 9% крупных макрофагоподобных клеток с неровными границами, крупным центральнорасположенным ядром с глыбками гетерохроматина, плотной эндоцитоплазмой и диффузной, слабоокрашенной экзоцитоплазмой и большим количеством толстых коротких выростов. На этом пассаже в культуре так же обнаружено 13% мелких плотных, с трудноразличимым ядром, веретеновидных клеток, лежащих как одиночно, так и группами по 3-5 клеток, контактирующих отростками, и 16% крупных фибробластоподобных клеток с крупным рыхлым центральнорасположенным эухроматиновым ядром с глыбками гетерохроматина и большим количеством

вакуолизированной цитоплазмы, которые так же, как и веретеновидные, лежали на стекле как одиночно, так и группами по 5 и более клеток, контактирующих отростками(рис.2).

При морфологическом исследовании клеток культуры HER2+ подтипа на первом пассаже (P1) большую часть, 90%, составляли мелкие округлые клетки, лежащие отдельно или формирующие группы по 4 и более клеток и 10 % крупных клеток овальной и полигональной формы, не проявляющих тенденцию к слиянию, с крупным рыхлым, чаще эксцентрично расположенным ядром и гомогенной цитоплазмой. На втором пассаже (P2) большую часть культуры составили так же мелкие округлые клетки (74%), однако, повысилась доля крупных округлых и овальной формы клеток (15%), среди которых определялись двухъядерные клетки и, кроме того, в культуре появилось 11% крупных фибробластоподобных клеток, лежащих одиночно, без тенденции к слиянию.

При исследовании клеток третьей культуры, принадлежащей к Тройному негативному подтипу на первом пассаже (P1) кроме мелких округлых клеток (10,4%), выявилось 50% мелких клеток веретеновидной формы, 20,7% крупных фибробластоподобных и 18,8% клеток макрофагоподобной формы. Но на втором пассаже (P2) доля мелких округлых и веретеновидных клеток уменьшилась (3,2% и 15,5% соответственно), при этом доля крупных фибробластоподобных клеток увеличилась до 62,1%, тогда как доля макрофагоподобных клеток практически не изменилась и составила 19,1%.

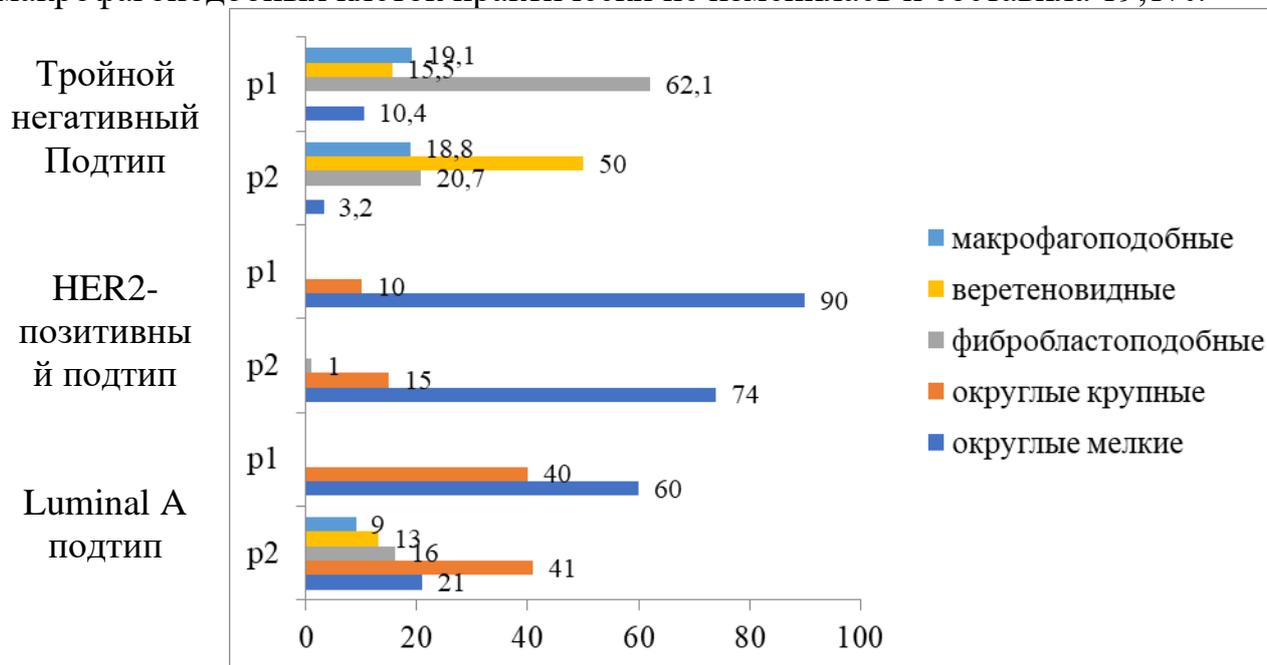


Рисунок 2. Сравнение морфологии клеток культуры КМЖ, полученных от трех молекулярно-биологических подтипов (%)

Выводы

1. Анализ морфологических характеристик клеток культур карцином молочной железы разных биологических подтипов показал, что на первом пассаже (P1) обнаруживаются клетки эпителиального фенотипа, что

свидетельствует об эпителиальной природе опухолей и подтверждается выявлением иммуноцитохимического маркера панцитокератин.

2. Выявление в культурах веретеновидных, фибробластоподобных и макрофагоподобных клеточных фенотипов свидетельствуют о гетерогенности культуры опухолевых клеток.

3. Наибольшая гетерогенность была отмечена в культурах, полученных от Luminal A и тройного негативного подтипа.

4. Во втором пассаже (P2) уменьшается количество мелких эпителиальноподобных округлых клеток за счет клеток других популяций или увеличении размеров последних.

Список литературы:

1. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение (обзор)/ Т.С Геращенко, Е.В. Денисов, Н.В Литвяков., М.В. Завьялова и др.// Биохимия. – 2013. – Т. 78. № 11. – С.1531-49.
2. Межевова И.В., Ситковская А.О., Кит О.И. Первичные культуры опухолевых клеток: современные методы получения и поддержания *in vitro*. /
3. И.В. Межевова, А.О.Ситковская, О.И.Кит// Южно-российский онкологический журнал. – 2020. – т.1. №3.– С. 36-49
4. Могиленских А.С., Нуркиев А.Р, Шамшурина Е.О. Анализ морфологических показателей клеток карциномы молочной железы в культуре. / А.С Могиленских., А.Р Нуркиев, Е.О Шамшурина //Материалы 93 Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Мечниковские чтения 2020». – Санкт-Петербург, 2020. – С. 230-231
5. Сазонов С.В. Обеспечение качества молекулярно-биологических исследований при диагностике инвазивного рака молочной железы./ С.В. Сазонов – Екатеринбург: Юника, 2018. – С.154.
6. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. Перевод с 5-го английского издания./ Р. Я. Фрешни – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – С. 706.
7. Шамшурина Е.О., Проявления гетерогенности и полиморфизма клеток карциномы молочной железы при культивировании/ А.С. Могиленских, М.В.Улитко, С.В. Сазонов, С.М.Демидов, С.А Титова.// Вестник уральской академической науки. – 2020. –Том 17.№3

УДК 61:57 086

Подлесный Н.А., Новикова Е.А., Костромина О.В.

Изучение экспрессии Estrogen Receptor на опухолевых клетках у пациенток разного возраста с раком молочной железы

Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии
Уральский государственный медицинский университет