

Мелехин В.В.^{1,2}, Ошурков П.А.^{1,2,3}, Коротков А.В.^{1,2}, Макеев О.Г.^{1,2}, Дорофеева Н.В.^{1,2}, Шершевер А.С.^{1,3}, Герасимов М.В.³, Дубских А.О.^{1,3}, Филимонова П.А.^{1,3}, Горных К.А.^{1,3}

Разработка метода получения культуры клеток алодифференцированной аденокарциномы из метастаза рака молочной железы человека в I3 позвонок как модели для проведения лабораторных исследований с целью оптимизации лечебного алгоритма для ведения указанной категории пациентов

1 ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, 2 ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, 3 ГБУЗ СО «Свердловский областной онкологический диспансер» Россия, г. Екатеринбург,

Melekhin V. V., Oshurkov P. A., Korotkov A. V., M.D. Makeev O. G., Dorofeyeva N. V., M.D. Shershever A.S., Gerasimov M. V., Dubskikh A.O., Filimonova P. A., Gornyh K.A

Development of the method of receiving culture of cells of adenokartsinoma from the metastasis of the breast cancer. Development of model for carrying out laboratory researches for optimization of medical algorithm for maintaining patients

Резюме

В работе представлен алгоритм получения культуры клеток метастаза рака молочной железы для использования ее в качестве модели для проведения клинически-безопасных лабораторных исследований, направленных на оптимизацию лечебного алгоритма для ведения пациентов с метастатическим поражением позвоночного столба. Полученные результаты свидетельствуют, что клоногенная и пролиферативная активность, а также морфология клеточных линий, выделенных из разных клонов одной опухоли отличается, что позволяет предположить различную индуцируемую иммуногенность. Разработанный алгоритм может быть использован для получения клеточных культур из опухолевых тканей для создания противоопухолевой вакцины, исследований добавочной экспрессии генов на трансформированные клетки, повышения эффективности персонифицированной терапии для пациентов онкологического профиля.

Ключевые слова. Рак, аденокарцинома, метастазы

Summary

In work the algorithm of receiving culture of cages of a metastasis of a breast cancer for its use as model for carrying out the clinical and safe laboratory researches directed on optimization of medical algorithm for maintaining patients with metastatic damage of a spine column is presented. The received results testify that klonogeny and proliferative activity, and also morphology of the cellular lines allocated from different clones of one tumor differs that allows to assume various induced immunogenicity. The developed algorithm can be used for receiving cellular cultures from tumoral fabrics for creation of an antineoplastic vaccine, researches of an additional expression of genes on the transformed cages, increase of efficiency of the personified therapy for patients of an oncologi profile.

Key words. Cell carcinoma, adenocarcinoma, metastasis

Введение

В последние годы акцент в отношении поиска эффективных средств терапии онкологических заболеваний

смещается в область разработки качественно нового поколения препаратов – персонифицированных противоопухолевых вакцин. Создание последних предусматривает

внесение в опухолевые клетки генетических конструкций, обеспечивающих распознавание этих клеток собственной иммунной системой пациента. Между тем, развитие данного направления тормозится сложностью получения стабильной линии опухолевых клеток человека, предусматривающей возможность манипулирования с их геномом. Поэтому отработка алгоритма получения культуры трансформированных клеток составляет основную и подчас трудновыполнимую задачу начального этапа создания лечебной вакцины.

Цель исследования – отработка алгоритма получения культуры клеток метастаза рака молочной железы человека для использования в последующем в качестве модели для проведения клинически-безопасных лабораторных исследований с целью оптимизации лечебного алгоритма для ведения пациентов с метастатическим поражением позвоночного столба.

Материалы и методы

Забор ткани

Материал для исследования был получен от пациентки Ч., 1952 года рождения получавшей лечение в условиях онкологического стационара по поводу диагноза: «Метастаз рака молочной железы в тело L3 позвонка с эпидуральным компонентом, компрессией спинного мозга 2-3 степени.». Комплексное лечение рака молочной железы проведено в 2013 году (мастэктомия, курс ПХТ). При госпитализации: радикулярный болевой синдром L3 слева; периферический умеренный парез L3 корешка слева; люмбалгия; состояние после ламинэктомии, ТПФ L2-L4.

Пациентка госпитализирована планово из амбулаторно-поликлинического звена с жалобами на боли в поясничном отделе позвоночника, иррадиирующие в левую нижнюю конечность, умеренную слабость. В левой конечности. В анамнезе – комплексное лечение по поводу рака молочной железы (2013 г., мастэктомия, курсы ПХТ). С 2015 г. диагностирован одиночный метастатический очаг в теле L3 позвонка. Диагноз подтвержден КТ, МРТ, гистологическими исследованиями. Учитывая наличие единичного очага поражения, прогрессирующий неврологический дефицит, принято решение о проведении радикального оперативного вмешательства – двухэтапной спондилэктомии L3 позвонка. В 2015 году выполнен задний этап оперативного вмешательства – ламинэктомия L3, декомпрессия спинного мозга, частичное удаление опухоли L3 позвонка, транспедикулярная фиксация L2-L4. Настоящая госпитализация спустя месяц для проведения второго этапа оперативного вмешательства.

На момент поступления сохранялся люмбалгический, корешковый синдром L3 слева, умеренный периферический парез L3 слева. Пациентка обследована, подготовлена к оперативному вмешательству. На 5 сутки выполнено оперативное лечение – забрюшинный левосторонний доступ, тотальная корпэктомия L3, спондилез MESH-имплантом.

Протокол оперативного лечения: Положение пациента на правом боку. После рентгеновской разметки

выполнен забрюшинный боковой доступ к зоне L3. Подвздошно-поясничная мышца разведена, скелетирована боковая поверхность тела L3 позвонка и смежных дисков. Выполнена дискотомия, зона интереса ограничена спицами. Обращает на себя внимание плохое качество костной ткани. Тело позвонка полностью замещено опухолью волокнистой структуры с клеточными очагами, малососудистой, серого цвета. Выполнено удаление тела кускованием. При удалении резецирована контрлатеральная замыкательная пластинка позвонка, зона обеих ножек. Опухоль грубо сдавливает ТМО, инфильтрируя заднюю продольную связку. Последняя коагулирована, рассечена, резецирована. После резекции визуализированы оба корешка L3, достигнута адекватная декомпрессия ТМО и корешков на целевом уровне. Контроль гемостаза. В сформированный дефект имплантирован MESH, заполненный костным цементом. Опороспособность переднего столба восстановлена. В забрюшинной пространство помещен дренаж, поперечная фасция ушита, восстановлена анатомическая целостность мышц. Швы на клетчатку в 2 слоя, косметический шов на кожу биодеградируемой нитью. Асептическая повязка.

Часть операционного материала отправлена на гистологическое исследование. Несколько фрагментов опухоли помещено в 0,9% стерильный раствор NaCl, транспортированы в течение 4 часов от момента забора ткани в термоконтейнере при температуре +4 С0 в лабораторию для проведения лабораторного этапа исследования.

Послеоперационный период протекал спокойно. Рана зажила первичным натяжением, шов биодеградирующей нитью. В отделении проводилась симптоматическая терапия, в т.ч. гормональная для уменьшения отека и достижения уменьшения степени выраженности неврологического дефицита. Отмечалась положительная динамика в виде регресса люмбалгии, корешкового болевого синдрома слева, частичного регресса слабости в левой нижней конечности. На контрольных рентгенограммах поясничного отдела позвоночника в двух проекциях – положение имплантов адекватное.

Гистологическое заключение: метастаз железисто-скirroзного рака.

Пациентка в удовлетворительном состоянии и с положительной динамикой выписана под наблюдение онколога, невролога по месту жительства. По согласованию с радиологами запланирован курс дистанционной послеоперационной лучевой терапии на зону оперативного вмешательства – L2-L4 позвонки, 40–45 Гр. Контрольная явка через 3 месяца.

Получение первичной культуры

В условиях ламинарного потока ткань обрабатывали 70% этанолом в течение 30 сек. и промывали фосфатным буфером. После механического измельчения, фрагменты размером до 4мм3 распределяли по культуральным флаконам, содержащих культуральную среду DMEM (Sigma Aldrich), фетальную бычью сыворотку (9:1, Sigma Aldrich) и антибиотики в стандартной концентрации (пенициллин 100U/мл, стрептомицин 100мкг/мл).

Культивирование проводили при 5% CO₂ в инкубаторе Sanyo. Дезагрегацию фрагментов производили на 3 сутки с использованием раствора неочищенной коллагеназы в концентрации 200 ед./мл. Клетки отмывали от фермента трехкратным пересаживанием в фосфатном буфере (150g, 5 минут). Взвесь клеток переносили в новые культуральные флаконы, которые помещали в инкубатор для культивирования при 37°C, 5% CO₂, 95% влажности.

Макро- и микроскопический контроль производили ежедневно на инвертированном микроскопе Olympus CX41 при x40, x200, x200. Смену среды во флаконах проводили через 3 суток на 60% от общего объема. Одиночно расположенные клетки, адгезированные на поверхности культурального флакона, появились уже через 24 часа после отмывания от фермента.

Первое субкультивирование было проведено при достижении 80% конfluenceности к 6 суткам после ферментативной дезагрегации. Для удаления остатков культуральной среды клетки отмывали фосфатным буфером. С культуральной поверхности клетки снимали 0,25% раствором трипсина (Sigma Aldrich) из расчета 0,1 мл на 1 см² площади флакона. Культуры инкубировали при комнатной температуре до полного открепления клеток от поверхности флакона. Трипсин нейтрализовали кондиционной средой (0,1 мл на 1 см² площади) с 20% свежей бычьей фетальной сывороткой. 2/3 от общего количества клеток в виде суспензии переносили на новую культуральную поверхность.

Выделение клонов

Для выделения клонов использовали клеточную культуру, находящуюся на третьем пассаже. Клетки высевали в посевной концентрации 20 клеток на 1 см² площади и культивировали в стандартных условиях в течение 2 недель – до визуализации видимых невооруженным глазом колоний.

Каждую колонию изолировали металлическим кольцом, внутри которого с помощью стандартной методики трипсинизации клетки снимали и пересевали. Манипуляции повторяли до получения трех пролиферативно активных клонов трансформированной клеточной линии.

Клоны, после наращивания необходимого клеточного объема, характеризовали по эффективности посева и клонирования. Для этого клетки каждого клеточного клона высаживали в низкой посевной концентрации (20 клеток на см²). Контроль прикрепившихся клеток производили через 6 часов после пассажа, контроль клоногенной активности – через две недели, промежуточный микроскопический контроль – раз в три дня. Расчет производился по формулам:

$$N2 / N1 \times 100 = PE \quad \text{и} \quad N3 / N1 \times 100 = SE,$$

где: N1 – количество посеянных клеток, N2 – количество сформированных колоний, N3 – количество прикрепившихся клеток, PE – эффективность культивирования, SE – эффективность посева.

Морфологическая оценка

Для морфологического исследования клонов клетки высевали на чашки Петри (Sarstedt), в 4-х повторностях для каждого клона. После достижения культурой

log-фазы и 70% конfluenceности клетки закрепляли 80% этанолом и окрашивали по методу Романовского.

Построение кривой роста

Для построения кривой роста [2] клетки выделенного клона были посажены на 10 культуральных флаконов (Orange), с посевной концентрацией 5 x 10³ клеток на см². Смена среды производилась на 60% от общего количества раз в три дня. Для проведения подсчета клеток каждый день из эксперимента выводился один культуральный флакон, с которого клетки снимались с помощью 0,25% раствора трипсина. Подсчет клеток производился на камере Фукса-Розенталя в 10-кратной повторности. На основании полученных данных была построена и проанализирована кривая роста.

Результаты и обсуждение

Клоногенная активность

При получении культуры клеток из ткани метастаза молочной железы были выделены три клеточных клона. Для получения характеристики жизнеспособности и пролиферативной активности полученных линий, была проведена оценка эффективности культивирования и посева. Результаты представлены в табл. №1.

Как следует из таблицы, полученные клеточные линии проявляли умеренную клоногенную активность: при посевной концентрации равной 20 клеток на 1 см², среднее количество колоний у разных клонов составляло от 1 до 1,4 на одну чашку. В то же время, культура клеток продемонстрировала высокую эффективность посева: от 85 до 93%.

Морфологический анализ

При анализе первичной культуры выявлена слабая морфологическая гетерогенность клеток. Культура представлена монотипными крупными клетками веретеновидной, оторстчатой и треугольной формы с крупным ядром и несколькими ядрышками. Клеточные контакты выражены слабо (Рис. 1).

Исследование морфологии полученных клонов выявило морфологические различия клеточных линий.

Для клонов 1 и 2 было характерно преобладание функционально активных клеток с овальным, хорошо контурированным ядром, выраженными клеточными контактами и наличием не более 3 ядрышек. Клетки имели преимущественно веретеновидную и оторстчатую форму и многочисленные крупные отростки (Рис. 2).

В цитограмме культуры клона 3 отмечено нарастание полиморфизма клеток с увеличением конfluenceности, что характерно для культур, полученных из опухолевых тканей. Культура представлена полиморфными клетками с одним или двумя ядрами и наличием не менее двух ядрышек. Контуров клеток и клеточные контакты выражены отчетливо. После достижения культурой более 70% конfluenceности отмечалось появление многочисленных скоплений мелких округлых клеток с меньшей оптической плотностью цитоплазмы. Данные колонии были окружены более крупными клетками с одним или двумя крупными отростками. Между такими колониями располагались крупные и мелкие клетки веретеновидной,

Табл.1. Сравнение жизнеспособности трансформированных клеточных линий, полученных из разных клонов одной культуры, по показателям эффективности культивирования и посева.

Клон	Количество чашек	Посевная концентрация (клеток/см ²)	Среднее количество колоний в чашке	Эффективность культивирования, %	Эффективность посева, %
1	10	20	1,0	0,52	85
2	10	20	1,1	0,57	88
3	10	20	1,4	0,73	93



Рисунок 1. Первичная культура клеток, полученных из метастаза рака молочной железы человека. Ув. 200.



Рисунок 2. Культура клеток, полученных из метастаза рака молочной железы человека. Клон 2. Ув. 100

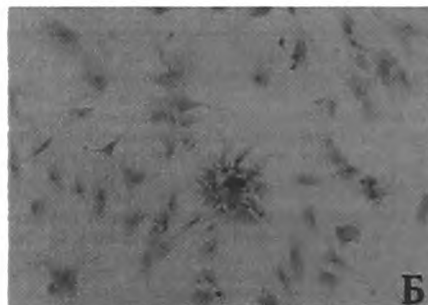
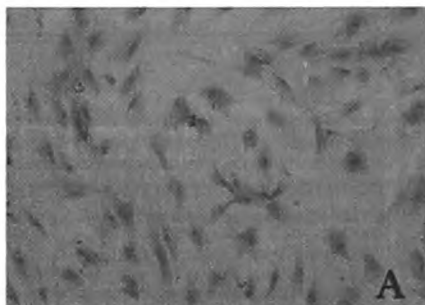


Рисунок 3. Культура клеток, полученных из метастаза рака молочной железы человека. Клон 3. А – через 3 дня, после достижения 50 % конфлюентности; Б – через 5 дней, после достижении 70% конфлюентности. Ув.

100



Рисунок 4. Кривая роста культур клеток, полученных из ткани метастаза рака молочной железы.

треугольной и отростчатой форм с одним или двумя ядрами, содержащих не менее трех ядрышек (Рис. 3).

Кривая роста

В процессе исследований были получены данные, на основании которых произведено построение кривых роста культур, полученных из различных клонов (Рис. 4).

Анализ кривой роста позволил определить продолжительность фаз роста клеток и сравнить эти показатели у полученных линий. Как следует из графика, выход на lag-фазу для всех линий наблюдался к 24 часам. При этом уже на примере log-фазы, прослеживаются заметные различия: для линий 1 и 2 клонов она составила 168 часов, а

у линии 3 клона log-фаза продолжалась менее 144 часов. Фаза Плато, в которой количество клеток стабилизировалось, достигалась к 8 и 7 сутки соответственно. Минимальный показатель среднего периода удвоения был продемонстрирован культурой 3 клона и составил 33,8 часов. Для культур 1 и 2 клонов период удвоения - от 35,9 до 37 часов. Также различалось максимальное количество клеток. Так, зарегистрированное в культуре из 1 клона к 9 суткам, оно составило 40,72 тыс. клеток на см². Сопоставимый результат по этому показателю был получен для клеток 3 клона: 39,64 тыс.кл./см² на 7 сутки эксперимента. Однако максимальное количество клеток культуры 2 клона оказалось существенно ниже: 32,54 тыс.кл./см² на 8 сутки.

Представленные различия свидетельствуют о гетерогенности клеточного состава опухоли, что подтверждает известные представления о различной клоногенной и пролиферативной активности клонов, выделенных из одного образца опухоли. Важным представляется то, что различные клеточные линии одной опухоли могут различаться иммуногенностью, генерируемой в процессе создания противоопухолевой вакцины. Учет этих данных также позволит более эффективно определять индивидуальную чувствительность пациента к планируемой противоопухолевой терапии.

Выводы

1. Клоногенная и пролиферативная активность, а также морфология клеточных линий, выделенных из разных клонов одной опухоли отличается, что позволяет предположить различную индуцируемую иммуногенность.

2. Разработанный алгоритм может быть использован для получения клеточных культур из опухолевых тканей для создания противоопухолевой вакцины, исследований добавочной экспрессии генов на трансформированные клетки, повышения эффективности персонализированной терапии для пациентов онкологического профиля. ■

Мелехин В.В. – сотрудник ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, *Коротков А.В.* – сотрудник ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, *Дорофеева Н.В.* – сотрудник ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, *Ошурков П.А.* – врач-нейрохирург МАУ ГКБ №40, *Дубских А. О.* – врач-нейрохирург СООД, *Горных К.А.* – врач-нейрохирург СООД, *Герасимов М.В.* – к.м.н., врач-нейрохирург СООД, *Филимонова П.А.* – врач-невролог СООД, *Тарханов А.А.* врач-рентгенолог СООД, *Шершвер А.С.*, д.м.н., проф. врач-нейрохирург СООД, *Макеев О.Г.* д.м.н., проф., зав. кафедрой медицинской биологии и генетики УГМУ, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку Дубских Алексей Олегович. lens.leo@me.com

Литература:

1. *Миронова Л.Л., Попова В.Д., Конюшко О.И., Ханчаев Ю.Х., Зыбин Д.В., Аюбян А.С. Опыт создания банка авторских линий перевиваемых клеток и их применение в вирусологической практике// Биотехнология, 2000. №6. С.41-47.*
2. *Фреини Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство // пер. с 5-го изд. Изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 691с.*