

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

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ, ПОЛУЧЕННОЙ
ИЗ ОБРАЗЦОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛЮМИНАЛЬНОГО В HER-2
ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО ПОДТИПА**

*¹Уральский государственный медицинский университет,
г. Екатеринбург, Россия*

²Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург, Россия

Описаны изменения морфологии клеток в культуре, полученной из образца рака молочной железы Люминального В HER-2 позитивного подтипа. Выявлена закономерность к увеличению полиморфизма на 4-5 пассаже и появление нового типа клеток – гигантских распластанных.

Ключевые слова: первичная клеточная культура, люминальный В HER-2 положительный подтип, морфология клеток в культуре

*Mogilenskikh A.S.^{1,2}, Chugaeva P.A.¹, Grebenyuk E.V.^{1,2}, Shamshurina E.O.¹,
Sazonov S.V.^{1,2}, Demidov S.M.^{1,2}*

**MORPHOLOGICAL EVALUATION OF CELLS IN A CULTURE DERIVED
FROM SAMPLES OF BREAST CANCER
LUMINAL B HER-2 POSITIVE SUBTYPE**

1 Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

2 Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russia

Changes in cell morphology in a culture obtained from a sample of luminal B HER-2 positive subtype breast cancer are described. A regularity to an increase in polymorphism at passages 4-5 and the appearance of a new type of cells - giant spread-eagled.

Keywords: primary cell culture, Luminal B HER-2 positive subtype, cell morphology in culture

В настоящее время создание экспериментальных моделей *in vitro* на основе первичных клеточных культур, выделенных из образца опухоли пациента, используется как для определения цитотоксичности препаратов, так и для изучения внутриклеточных механизмов пролиферации [1, 2]. Такие культуры на начальных этапах культивирования отражают специфические особенности опухоли и могут быть использованы для персонифицированного подхода к терапии.

В большинстве стран в диагностике новообразований молочной железы принят «тройной подход», включающий клинический, лучевой и морфологический методы исследования [3, 4]. К последнему относится цитологическая диагностика

биоптатом молочной железы. В настоящее время изучены цитологические картины большинства пролиферативных поражений и опухолей этой локализации[5]. Поэтому при создании клеточной культуры как модели для изучения канцерогенеза при раке молочной железы (РМЖ) необходима морфологическая характеристика клеток.

Более того, имеются данные о полиморфизме клеток при получении первичной клеточной культуры РМЖ [6-7], наличие переходных форм от мелких округлых клеток к гигантским распластанным клеткам [8-9].

Материалы и методы. Первичные клеточные культуры получали выделением из образца опухоли с Люминальным В HER-2 позитивным подтипом. После механического измельчения полученную массу помещали в среду для диссоциации (ферменты коллагеназа – гиалуронидаза, DMEM-F12) и инкубировали около 15–16 часов в отсутствии CO₂ на шейкере. Затем центрифугировали при 0,7 RPM (30 сек), супернатант сливали, а осадок ресуспендировали с трипсином, после чего растворяли в HF (раствор Хэнкса с 10 % FBS) и центрифугировали при 1,4 RPM (5 мин). Надосадочную жидкость сливали, полученный осадок растворяли в диспазе и ДНКазе, вновь центрифугировали, после чего разводили клеточный осадок в питательной среде Mammocult™ Human Medium (STEMCELL) и помещали в культуральные флаконы.

Для снятия клеточной культуры с поверхности пластика инкубировали в растворе Tryple™ (Thermo Scientific) 10 минут, затем разбавляли 1:2 в HF и центрифугировали 5 минут при 1,4 RPM. Полученный осадок разводили в питательной среде, половину помещали в культуральные флаконы, а другую половину распределяли на предметные стекла. Предметные стекла предварительно обрабатывали коллагеном и помещали в чашки Петри, культивировали 1–2 дня. Далее стекла высушивали и проводили окраску по Паппенгейму согласно стандартному протоколу. Подсчет клеток проводили при увеличении 200× на

оптическом микроскопе Meiji Techno MT4200L. В каждом случае оценивали не менее 500 клеток на случай наблюдения.

Результаты и их обсуждение. При исследовании культуры, полученной из образцов Люминального В HER-2 позитивного подтипа, на первом пассаже (p1) округлые мелкие (4-6 мкм) клетки составили 98,8% клеток и незначительный процент – 1,2% – был представлен клетками средних (10-12 мкм, рис.1, А) размеров.

На втором пассаже (p2) отмечалась морфологическая гетерогенность: полигональные клетки (преимущественно треугольной формы средних размеров) – 56,8%, веретеновидные (с двумя отростками на полюсах клетки) – 21,2% и фибробластоподобные (многоотростчатые) клетки – 4,4%. Как и на p1, присутствовали округлые средние клетки в количестве 14%, однако было отмечено значительное снижение количества мелких клеток до 3,6%. Таким образом, наибольшую популяцию клеток p2 составили полигональные клетки.

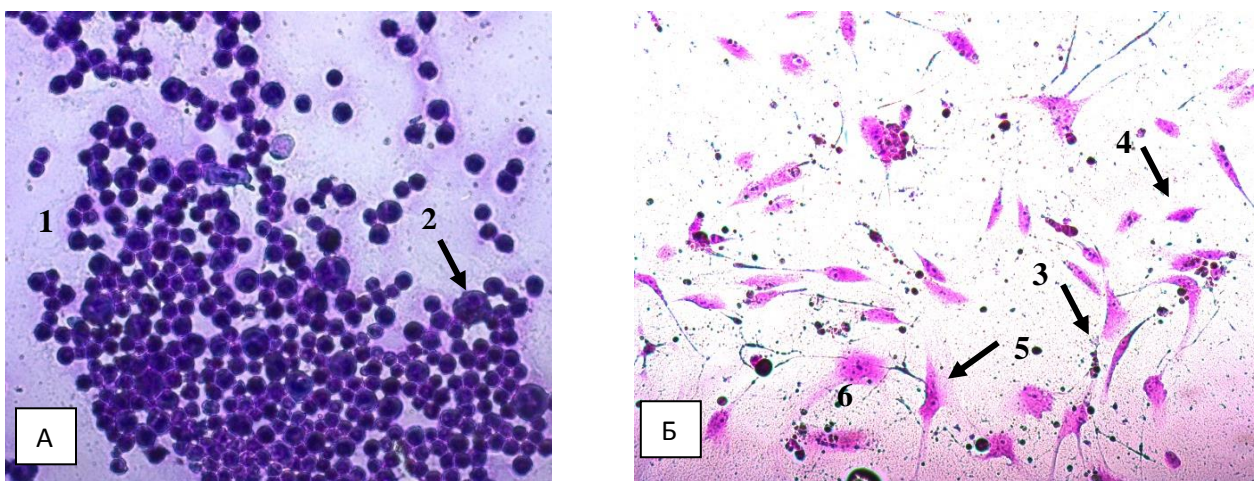


Рис.1 Морфология клеток первичной культуры; А – p1, Б – p4; 1- округлые мелкие клетки, 2 – округлые клетки средних размеров; 3- веретеновидные клетки; 4- полигональные клетки; 5 – фибробластоподобные клетки; 6 – гигантские клетки; световая микроскопия, ув. 100х.

На третьем пассаже (p3) морфология клеток не отличалась от второго пассажа, обнаружены в небольшом количестве округлые мелкие (5,2%), округлые

средние (1,4%), фибробластоподобные (0,8%) клетки. Основную массу клеток составили клетки полигональной (37,8%) и веретеновидной формы (54,8%).

При изучении клеточного состава четвертого пассажа (p4) были выделены следующие группы клеток: округлые мелкие – 15,2%, округлые средних размеров – 11%, полигональные клетки – 26%, фибробластоподобные клетки – 13,4%, веретеновидные клетки – 20,6%. Появилось незначительное количество гигантских клеток – 2% (рис.2, Б).

На пятом пассаже (p5) сохраняются клетки с разными морфологическими характеристиками: округлые мелкие 2,4%, округлые средних размеров 8,6 %, фибробластоподобные клетки 7,8%, веретеновидные клетки 20,6%. Больше половины (58,2%) популяции составляют полигональные клетки, что соотносится с результатами, полученными на втором пассаже (рис.1).

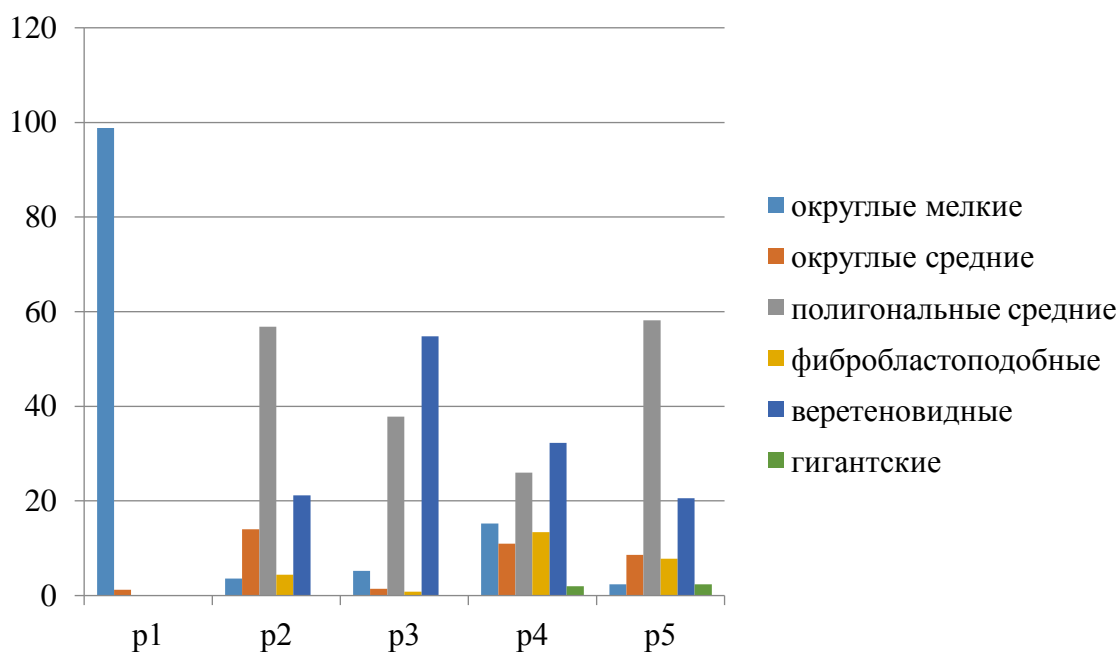


Рис.2. Изменение морфологии культуры клеток рака молочной железы с 1-5 пассажами.

Вывод. Таким образом, при получении клеточных культур из образцов Люминального В HER-2 положительного подтипа рака молочной железы

наблюдается полиморфизм клеток, который увеличивается к четвертому пассажу.

На первом пассаже клетки однотипные, имеют округлую форму.

Литература

1. Галимова Э. С., Галагудза М. М. Двухмерные и трехмерные модели культур клеток опухолей in vitro. Преимущества и недостатки // Бюллетень сибирской медицины. – 2018. 17 (3). С.188-196.
2. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes / Neve RM [et al.] // Cancer Cell. 2006. 10 (6). С. 515-27
3. Морфологические и молекулярно-генетические проявления опухолевой инвазии при раке молочной железы / Н.В. Крахмаль, М.В. Завьялова, О.Е. Савельева и др.; под ред. В.М. Перельмутера, М.В. Завьяловой. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2017. – 128 с.
4. Шабалова И.П., Джангирова Т.В., Волченко Н.Н., Пугачев К.К. Цитологический атлас: Диагностика заболеваний молочной железы. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2005. – 119 с.
5. Papeix G., Zardawi I.M., Douglas C.D. et al. The accuracy of the «triple test» in the diagnosis of papillary lesions of the breast // Acta Cytol. – 2012. – Vol.56. – P. 41-46.
6. Нуштаева А. А. Культуры онкотрансформированных клеток молочной железы и эндометрия для изучения опухолевой прогрессии и разработки терапевтических подходов: дис. ... канд. биол. наук : 03.01.03: – Новосибирск, 2019. – 171
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. – <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2021-20-5-75-81>.
8. Могиленских А.С., Сазонов С.В. Создание клеточных линий карциномы молочной железы // Гены и клетки. 2021. №1. Т.16 С.15-23
9. Могиленских А.С. Морфологическая гетерогенность культуры клеток карциномы молочной железы // Морфология. – 2020. –Т.157, № 2-3, С.144