

На правах рукописи

НУШТАЕВА АННА АНДРЕЕВНА

**КУЛЬТУРЫ ОНКОТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК  
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЭНДОМЕТРИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ  
ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ И РАЗРАБОТКИ  
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

**Коваль Ольга Александровна**, к.б.н.

Официальные оппоненты:

**Попова Нэлли Александровна**, к.б.н., проф.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», с.н.с.

**Баклаушев Владимир Павлович**, д.м.н., проф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России», заместитель генерального директора по научной работе и медицинским технологиям

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины (ФИЦ ФТМ)»

Защита состоится «26» \_\_\_\_\_ июня 2019 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д. 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте <http://www.niboch.nsc.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
к.х.н., доцент



Коваль В.В

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы исследования.** Успехи в диагностике и лечении злокачественных опухолей молочной железы (ЗОМЖ) и эндометрия (ЗОЭ) способствовали повышению уровня выживаемости пациентов, но показатели смертности по-прежнему остаются высокими. К настоящему времени показано, что онкологические заболевания не инициируются единым общим фактором, а являются следствием суммирования и/или интерференции ряда эффектов или событий, которые по-отдельности не способны вызывать таких фатальных изменений. Многофакторность природы возникновения опухолей ведет к сложности интерпретации молекулярных паттернов, характерных для определенных злокачественных новообразований. Поэтому, для развития персонализированных терапевтических подходов необходимы комплексные решения.

На сегодняшний день не существует единой клеточной и опухолевой модели на животных, адекватно отражающей опухолевую прогрессию. Иммутизированные клеточные линии опухолей молочной железы и эндометрия являются моделью для исследования биологических процессов, связанных с этими заболеваниями, а также платформой для поиска потенциальных терапевтических маркеров и стратегий лечения (Staveren, et.al., 2009). Тем не менее, только совокупность иммутизированных линий опухолевых клеток может моделировать гетерогенность опухолей человека (Vargo–Gogola, et.al., 2007; Hynds, et.al., 2018; Ben–David, et.al., 2018). В связи с этим, обеспечение разнообразия клеточных и опухолевых моделей злокачественных новообразований остается актуальной задачей. Ресурсом для создания новых опухолевых линий является материал опухолей, из которых получают первичные культуры клеток. Такие культуры на начальных этапах культивирования отражают специфические особенности исходной опухоли, хромосомные перестройки, морфологические и молекулярные характеристики опухолевых клеток (Fang, et.al., 2009; Nakozaki, et.al., 2009). Культуры клеток из онкотрансформированной ткани пациентов позволяют расширить уже существующую панель опухолевых клеток для изучения канцерогенеза, пролиферации, метастазирования, клеточной гибели, поиска новых молекулярных маркеров, определяющих чувствительность или устойчивость опухолевых клеток к лекарственным препаратам и формируют платформу для разработки персонализированных схем терапии.

**Целью настоящей работы** являлась разработка методов получения первичных культур клеток из онкотрансформированной и нетрансформированной ткани молочной железы и эндометрия человека как моделей для изучения специфических молекулярных маркеров и фенотипических особенностей, обеспечивающих создание опухолевых и метастатических моделей на животных.

В ходе работы необходимо было решить **следующие задачи:**

1. Разработать метод получения и получить первичные культуры клеток из онкотрансформированной и нетрансформированной ткани молочной железы и эндометрия человека;

2. Оценить представленность молекулярных маркеров мезенхимально-эпителиального перехода, рецепторов эпидермального фактора роста и популяцию опухолевых стволовых клеток в полученных культурах клеток.

3. Исследовать чувствительность клеток полученных культур эндометрия и молочной железы человека к лекарственным агентам *in vitro*;

4. Исследовать туморогенность опухолевых культур клеток эндометрия и молочной железы человека *in vivo*.

**Научная новизна полученных результатов и практическая значимость.**

В ходе исследования разработан новый метод получения культур клеток из ткани злокачественных опухолей молочной железы и эндометрия человека. Получено и охарактеризовано 5 новых культур клеток эндометрия и 12 новых культур клеток молочной железы человека.

Разработан метод “импульсной гипоксии”, индуцирующий мезенхимально-эпителиальный переход в культуре клеток онкотрансформированной молочной железы *in vitro* с представленностью специфических молекулярных маркеров эпителиальных клеток.

Впервые показано, что базовый уровень мРНК IFIT3 в клетках культур молочной железы человека может отражать чувствительность клеток к иммуностимулирующим препаратам.

Получены новые модели метастазирующей и химиорезистентной опухолей молочной железы человека.

Разработанные клеточные и опухолевые модели онкопролиферативных заболеваний человека могут быть использованы исследователями, работающими в области клеточной биологии и канцерогенеза для исследования механизмов опухолевой прогрессии и скрининга новых противоопухолевых агентов.

**Положения, выносимые на защиту**

1) Разработан метод получения и получены персональные культуры клеток из онкотрансформированной и нетрансформированной ткани молочной железы и эндометрия человека с эпителиоподобным или мезенхимальноподобным фенотипами.

2) “Импульсная гипоксия” индуцирует мезенхимально-эпителиальный переход в клетках опухолевых культур молочной железы человека *in vitro*, что сопровождается экспрессией соответствующих молекулярных маркеров.

3) Базовый уровень мРНК IFIT3 в клетках культур молочной железы человека может отражать чувствительность клеток к иммуностимулирующим препаратам.

4) Полученные опухолевые модели молочной железы человека могут применяться для изучения молекулярных механизмов лекарственной устойчивости и метастазирования *in vivo*.

**Публикации и апробация результатов.** По результатам диссертации опубликовано 3 работы в рецензируемых журналах. Результаты работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: «Новейшие методы клеточных технологий в медицине» (Новосибирск, 2014), первой международной научной конференции молодых ученых: биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов, прошедшей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2014 (Научоград Кольцово, 2014), медико-биологическом форуме «Биомедицина-2016» (Новосибирск, 2016), на форуме «Биотехнология – медицина будущего» (Молекулярная медицина - завтрашний день) (Новосибирск, 2017), на международной конференции «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты», посвященной памяти советского и российского учёного Гарри Израйлевича Абелева (Горно-Алтайске, 2018), на международной конференции «Постгеном 2018» (Казань, 2018).

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 173 страницах, включает 38 рисунков, 3 схемы и 15 таблиц. Список литературы содержит 326 источников.

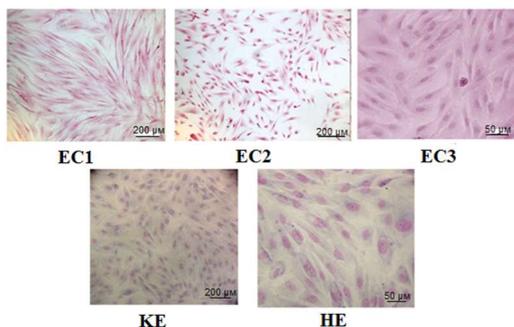
## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1.1 Получение первичных культур клеток молочной железы и эндометрия человека

Источником биологического материала для получения культур клеток были непосредственно образцы ткани опухолей и нормальной ткани, полученные при хирургической резекции и диагностическом выскабливании. Способы дезагрегации ткани для перевода в культуру влияют на эффективность получения жизнеспособных популяций клеток. Для ферментативной дезагрегации здоровой и малигнизированной ткани эндометрия использовали коллагеназу I типа, а для ткани молочной железы – коллагеназу I и IV типа. Эти ферменты относятся к семейству матриксных металлопротеиназ и отличаются по специфичности гидролиза коллагенов. К предварительно измельченным образцам ткани добавляли раствор соответствующих коллагеназ в культуральной среде IMDM, содержащей 10% FBS, 2 mM раствор L-глутамин, раствор антибиотиков/антимикотиков (далее

- полная культуральная среда) и инкубировали при температуре  $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  в атмосфере  $5.0 \pm 0.5\%$   $\text{CO}_2$  (далее - стандартные условия) в течение 15 ч. Диссоциированные таким методом клетки высевали на подложки и культивировали в стандартных условиях в полной культуральной среде, дополнительно содержащей добавку для культивирования клеток МІТО+ (BD Biosciences).

Из всех образцов ткани эндометрия удалось получить первичные культуры клеток: 3 культуры клеток из образцов опухоли - ЕС1, ЕС2 и ЕС3; культуру клеток из ткани с признаками гиперплазии - НЕ и культуру клеток из нетрансформированной ткани эндометрия – КЕ (Рис. 1). Период адгезии клеток к пластиковой подложке в среднем составлял 36 часов. Морфологию клеток полученных культур визуализировали с помощью окрашивания гематоксилином и эозином. В культурах клеток была выявлена неоднородность, появление многоугольных клеток, определяемых как эпителиальные, и удлинённых клеток, определяемых как фибробластоподобные.

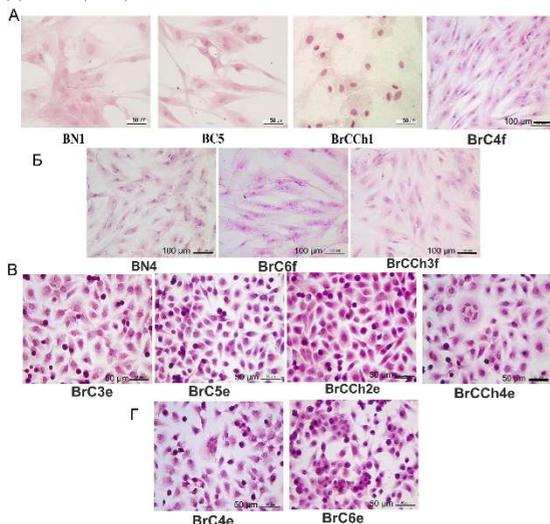


**Рис. 1.** Морфологический анализ клеток первичных культур эндометрия. Клетки культивировали на предметных стеклах и окрашивали гематоксилином и эозином. Световая микроскопия: ЕС1, ЕС2, КЕ – увеличение 63х, ЕС3, НЕ – увеличение 252х.

Из онкотрансформированной и нетрансформированной ткани молочной железы с применением коллагеназы IV были получены 3 культуры клеток – культура клеток нетрансформированной молочной железы ВN1 и опухолевые культуры ВС5 и ВrCCh1. Как и в полученных культурах клеток эндометрия, в культурах клеток молочной железы была выявлена неоднородность клеток: встречались эпителиоподобные и фибробластоподобные клетки (Рис. 2А). Использование коллагеназы I для диссоциации ткани молочной железы человека позволило получить культуру клеток нетрансформированной молочной железы ВN4 и опухолевые культуры ВrC6f и ВrCCh3f, все с фибробластоподобным фенотипом (Рис. 2Б). Период адгезии клеток составлял около 72 часов. Таким образом, использование для диссоциации ткани коллагеназы I типа или IV типа не позволило получить первичные культуры клеток с эпителиоподобным фенотипом.

### 1.1.1. Разработка оптимизированного метода получения первичных культур клеток молочной железы

Поскольку применение коллагеназ для диссоциации здоровой и онкотрансформированной ткани молочной железы человека не позволило получить первичные культуры клеток с эпителиоподобным фенотипом, на следующем этапе исследования был оптимизирован метод механической диссоциации.



**Рис. 2.** Морфология клеток полученных культур молочной железы человека. Культуры получены с использованием коллагеназы I (А), коллагеназы IV (Б), методом неферментативной дезагрегации (В) и трансформаций “импульсной гипоксией” (Г). Окрашивание гематоксилином и эозином на 4-5-м пассаже. Световая микроскопия. Для эпителиальных клеток увеличение 252х, для фибробластоподобных клеток – 126х.

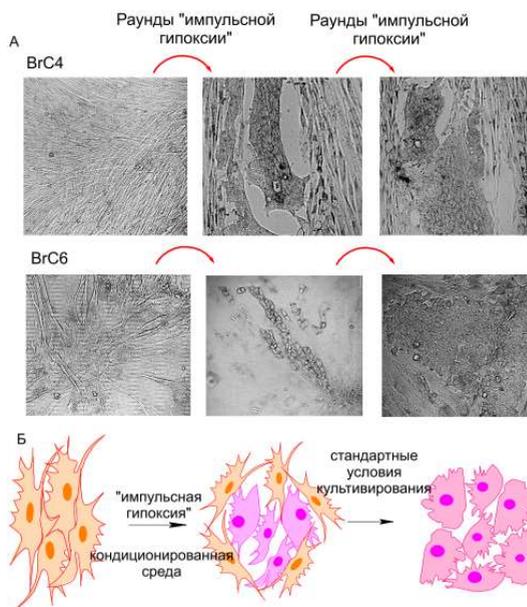
Для сохранения популяционного многообразия клеток опухоли в лунках объединяли клетки, спонтанно диссоциировавшие от образца биоптата в транспортировочные растворы и в промывочные растворы при механической дезагрегации фрагментов ткани до размеров 1-2 мм<sup>3</sup>, и помещали в полную культуральную среду для культивирования в стандартных условиях. Фрагменты ткани и клетки, не прикрепившиеся к подложке, через 2-3 дня переносили в новые культуральные планшеты, а далее при культивировании полученные популяции клеток объединяли. Таким образом были получены эпителиоподобные культуры онкотрансформированной ткани молочной железы человека BrC3e, BrC5e, BrCCh2e и BrCCh4e (Рис. 2В), и фибробластоподобная культура BrCCh3f1.

Можно заключить, что разработанный неферментативный метод получения первичных культур клеток молочной железы человека позволяет получать жизнеспособные культуры с эпителиальным фенотипом.

### 1.1.2 Метод «импульсной гипоксии»

Поскольку в задачи исследования входила разработка протокола для стабильного рутинного получения первичных культур опухолевых клеток с

эпителиальным фенотипом, условия культивирования полученных фибробластоподобных клеток были модифицированы, для того, чтобы вызвать смещение фенотипа в эпителиоподобный. Известно, что состояние гипоксии является сильным трансформирующим фактором, стимулирующим эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) (Yang, et al., 2019). Мы обнаружили, что четыре раунда смены концентрации кислорода от нормы до гипоксии при культивировании фибробластоподобных клеток BrC4f, BrC6f и BrCCh3f приводили к смещению фенотипа в сторону округлых эпителиоподобных клеток для культур BrC4 и BrC6, но не для культуры BrCCh3 (Рис. 3А). Пассирование клеток BrC4f, BrC6f и BrCCh3f в присутствии кондиционированной среды при стандартной концентрации O<sub>2</sub> не индуцировало трансформацию фибробластоподобных клеток в эпителиоподобные. Такие условия культивирования клеток со сменой концентрации O<sub>2</sub> от нормальной до гипоксии были названы «импульсной гипоксией». Продолжительность каждого раунда гипоксии составляла от 24 до 48 часов, промежутки между раундами гипоксии составляли 48-72 ч. На Рис.3Б изображена схема наблюдаемой трансформации фенотипа клеток при «импульсной гипоксии», морфологически соответствующая мезенхимально-эпителиальному переходу. Соответственно, опухоли BrC4 и BrC6 были представлены парами культур клеток: эпителиоподобными (символ «е») и фибробластоподобными клетками (символ «ф»).

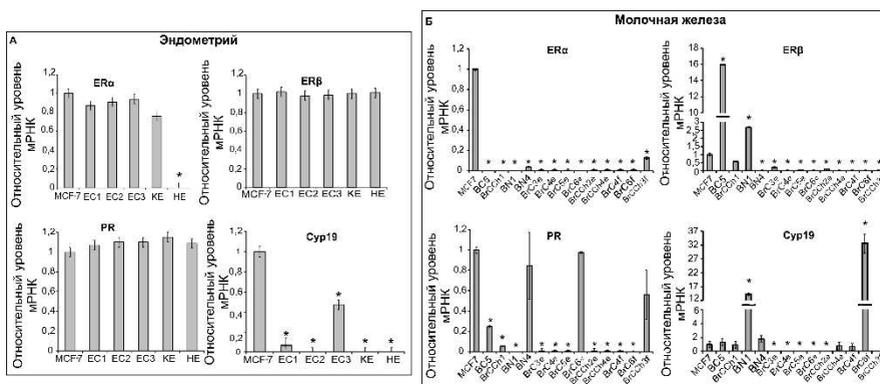


**Рис. 3.** Образование колоний эпителиоподобных клеток в первичных культурах BrC4 и BrC6. (А) Фазово-контрастная микроскопия. (Б) Схематическое изображение наблюдаемой трансформации.

## 1.2 Молекулярный профиль культур клеток из нормальной и онкотрансформированной ткани эндометрия и молочной железы человека

### 1.2.1. Рецепторы стероидных гормонов

Регуляция роста и развития гормон-зависимых тканей, таких как эндометрий и молочная железа, происходит вследствие взаимодействия гормона и клеточного рецептора. Для определения молекулярного профиля полученных культур клеток эндометрия и молочной железы анализ экспрессии генов ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR и Cyp19 проводили методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени на 2-3м пассажах. В качестве референсной РНК, относительно которой проводилось нормирование продуктов амплификации исследуемой мРНК, была использована мРНК глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH). В качестве эталонной экспрессии указанных генов за единицу был принят уровень экспрессии этих генов в клетках гормонозависимой аденокарциномы молочной железы MCF-7.



**Рис. 4.** Относительный уровень экспрессии мРНК ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR и Cyp19 в первичных культурах клеток эндометрия (А) и молочной железы (Б) человека. Уровень транскриптов анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами и нормализовали к мРНК GAPDH. ER- рецептор эстрогена, PR- рецептор прогестерона, Cyp19- ароматаза. Данные представлены как среднее значение 3х независимых экспериментов $\pm$ SD. Относительный уровень мРНК в культурах клеток эндометрия и клетках MCF-7 достоверно отличался при  $p < 0.05$  (\*).

На Рис. 4А можно видеть, что клетки всех первичных культур эндометрия экспрессируют ER $\alpha$  за исключением клеток культуры гиперплазии эндометрия HE, и все без исключения экспрессируют мРНК ER $\beta$  и PR. Уровень Cyp19 в клетках полученных культур эндометрия по сравнению с клетками культуры MCF-7 был достоверно ниже для культур эндометрия EC1 и EC3, а в культурах EC2, HE и KE уровень мРНК Cyp19 был ниже точки чувствительности метода. Таким образом, все полученные культуры клеток

эндометрия относятся к гормон-зависимому типу. Сравнивая полученные результаты с данными клинического иммуногистохимического анализа опухолей пациентов можно заключить, что культуры клеток эндометрия сохраняют статус рецепторов стероидных гормонов исходных опухолей.

При анализе экспрессии мРНК генов ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR и Cyp19 в культурах клеток молочной железы было обнаружено, что только фибробластоподобные клетки BrCC3f и BN4 имели фенотип ER $\alpha^+$ /PR $^+$ , а BC5 и BrCC1 фенотип ER $\beta^{\text{high}}$ /PR $^+$ , таким образом, большинство полученных культур клеток молочной железы можно охарактеризовать как гормон-независимые (Рис. 4Б). Уровень мРНК Cyp19 в клетках BC5, BrCC1, BrCC4e, BrC4f и BN4 был сравним с уровнем в клетках MCF-7, в то время как клетки BN1 и BrC6f экспрессировали мРНК Cyp19 на высоком уровне. Сравнивая полученные результаты с данными клинического иммуногистохимического анализа опухолей пациентов, можно заключить, что клетки опухолей молочной железы человека преимущественно теряют рецепторы стероидных гормонов при переводе в культуру.

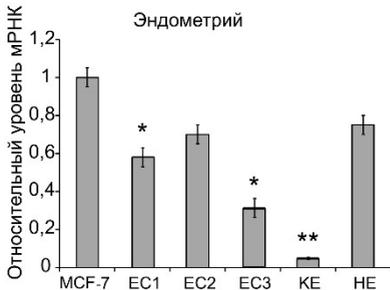
### ***1.2.2 Анализ рецепторов семейства эпидермального фактора роста (ErbB)***

Гиперэкспрессия тирозинкиназ HER2 и HER3 в злокачественных опухолях молочной железы (ЗМЖ) и эндометрия (ЗОЭ) ассоциирована со снижением общей выживаемости пациентов. Представленность рецепторов HER2 и HER3 в культурах клеток эндометрия и молочной железы анализировали методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител. Рецептор-положительными считали культуры, в которых доля HER2 $^+$  клеток составляла более 10%, в соответствии с рекомендациями ASCO (Американское Общество Клинической Онкологии); аналогично предельное значение в 10% было использовано для определения HER3-положительных культур.

При исследовании полученных культур эндометрия было выявлено высокое содержание HER2-положительных клеток в культуре EC3, при этом, процент дважды-положительных (HER2 $^+$ /HER3 $^+$ ) клеток также был высокий – около 35% (Рис. 5А). Таким образом, можно предположить, что клетки культуры EC3 будут чувствительны к ингибиторам рецептора HER2.

При анализе содержания HER2-положительных и HER3-положительных клеток в полученных культурах молочной железы условно можно провести разделение культур на три группы, первая из которых состоит из клеток с высоким уровнем HER2 $^+$  и HER3 $^+$ , вторая группа состоит из клеток с фенотипом HER2 $^+$ /HER3 $^{\text{low}}$ , а третья группа представлена клетками HER2 $^-$ /HER3 $^-$ . Группу с фенотипом HER2 $^{\text{high}}$ /HER3 $^{\text{high}}$  представляли клетки с фибробластоподобной морфологией - BrC4f и BrC6f (Рис. 5 Б). Клетки культур BrC4e, BrC5e и BrC6e были HER3-негативными с умеренной экспрессией



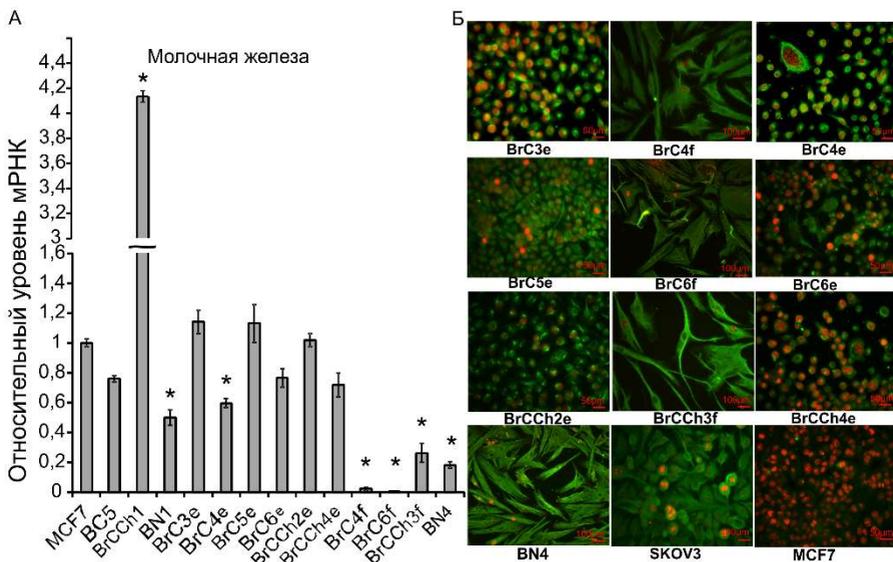


**Рис. 6.** Относительный уровень мРНК Ki-67 в клетках культур эндометрия. Уровень транскриптов анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами и нормализовали к мРНК GAPDH. Данные представлены как среднее значение 3х независимых экспериментов  $\pm$  SD. Относительный уровень мРНК в клетках культур эндометрия и клетках MCF-7 достоверно отличался при  $p < 0.05$  (\*) и  $p < 0.01$  (\*\*).

### ***1.2.4 Взаимосвязь уровня виментина с фенотипом клеток культур молочной железы***

Поскольку для виментина показано участие в процессах эпителиально-мезенхимального перехода, опухолевого роста и метастазирования, этот белок включен в перечень потенциальных мишеней для таргетной терапии (Vuoriluoto, et.al., 2011). Уровень виментина в клетках полученных культур молочной железы анализировали методом вестерн блота и иммуноцитохимически. Анализ показал высокий уровень виментина в фибробластоподобных клетках культур молочной железы, что хорошо согласуется с литературными данными о том, что в опухолевых мезенхимальных клетках виментин замещает цитокератины и становится основным белком цитоскелета. Таким образом, по уровню виментина клетки с фибробластоподобным фенотипом - BrCCh3f, BrC4f и BrC6f можно отнести к мезенхимальным клеткам.

При иммунофлуоресцентной визуализации виментина в клетках полученных культур ЗОМЖ было обнаружено, что внутриклеточное распределение виментина различно для эпителиоподобных и фибробластоподобных культур клеток (Рис. 7). В культурах клеток с фибробластоподобным фенотипом - BrC5, BrC4f, BrC3f, BrCCh1, BrCCh3f, BN1, BN4 виментин распределен равномерно по всему цитоплазматическому пространству, обозначая цитоскелет. В культурах, представленных эпителиоподобными клетками (BrC3e, BrC4e, BrC5e, BrC6e, BrCCh2e, BrCCh4e), виментин локализован в около ядерной области и не визуализируется в отростках клеток. Можно заключить, что высокое содержание виментина подтверждает мезенхимальный фенотип полученных фибробластоподобных культур (Рис. 7). Дополнительное иммуоокрашивание белка Ki-67 в клетках исследуемых культур подтверждает вывод о том, что уровень Ki-67 выше в клетках эпителиоподобных культур по сравнению с клетками фибробластоподобной морфологии.



**Рис. 7. Анализ уровня Ki-67 и виментина в клетках культур молочной железы человека. (А)** Относительный уровень мРНК Ki-67. Относительный уровень мРНК в клетках полученных культур и клетках MCF-7 достоверно отличался при  $p < 0.05$  (\*). **(Б)** Иммунофлуоресцентная визуализация Ki-67 и виментина в клетках культур молочной железы. В качестве положительного контроля виментина - клетки аденокарциномы яичника человека SKOV3, негативный контроль виментина - клетки MCF-7. Красный сигнал - Ki-67, зеленый – виментин.

### 1.2.5 Молекулярные маркеры мезенхимально-эпителиального перехода в культурах онкотрансформированных клеток молочной железы

При эпителиально-мезенхимальном переходе разрушаются адгезионные контакты, щелевые контакты и филаменты базальной мембраны, обеспечивая клетками подвижность, подавляется экспрессия E-кадгерина, формирующего адгезионные контакты, вместо которого экспрессируется N-кадгерин, (Kang and Massagué, 2004); происходят перестройки в цитоскелете: вместо цитокератинов экспрессируются виментин и фибронектин (Micalizzi, et.al., 2010). Гиперэкспрессия молекулы адгезии эпителиальных клеток EPCAM часто наблюдается при инвазивных ЗОМЖ, а молекула адгезии меланомы Mel-CAM характерна для мезенхимальных клеток ЗОМЖ (Jang, et.al., 2015). Поэтому, для оценки маркеров эпителиально-мезенхимального перехода в клетках полученных культур молочной железы анализировали уровень Mel-CAM, EPCAM, N-кадгерина и E-кадгерина методом проточной цитофлуориметрии (Таблица 1). В результате анализа было обнаружено, что представленность указанных маркеров в клетках культур ЗОМЖ строго коррелирует с морфологией клеток: фибробластоподобные клетки

демонстрируют высокое содержание Mel-CAM-положительных и N-кадгерин-положительных клеток в сочетании с низким содержанием EpCAM- и E-кадгерин-положительных клеток. Эпителиальные клетки демонстрируют «обратный» фенотип – с низким содержанием Mel-CAM и N-кадгерина и высоким содержанием EpCAM и E-кадгерина. Содержание N-кадгерина, E-кадгерина, Mel-CAM и EpCAM в родительских культурах BrC4f и BrC6f и в трансформированных культурах BrC4e и BrC6e подтверждало трансформацию клеточного фенотипа в результате мезенхимально-эпителиального перехода (MET).

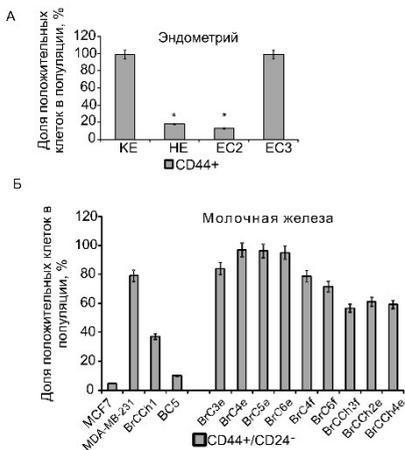
**Таблица 1.** Содержание клеток с маркерами ЭМТ и MET в полученных персональных культурах ЗОМЖ

Доля положительных клеток, %				
Персональная культура клеток	Mel-CAM (CD146)	EpCAM (CD326)	E-кад (CD324)	N-кад (CD325)
BrC3e	34.9	98.2	97.0	10.2
BrC4e	33.4	99.0	76.6	н/г
BrC5e	23.9	99.0	73.0	н/г
BrC6e	42.6	99.0	78.4	н/г
BrC4f	96.0	9.7	1.2	85
BrC6f	91.0	20.9	5.6	74
BrCCh3f	93.6	н/г	н/г	66
BrCCh2e	65.7	60.4	58.1	20.0
BrCCh4e	71.5	97	89	8.8

E-кад - E-кадгерин; N-кад - N-кадгерин; н/г - негативные

### ***1.2.6 Содержание стволовых опухолевых клеток в культурах эндометрия и молочной железы***

Маркеры CD44 и CD24 рассматривают как маркеры опухолевых стволовых клеток (ОСК) эндометрия и молочной железы человека. Для гиперплазии эндометрия и ЗОЭ показано, что снижение уровня CD44 в клетках взаимосвязано с развитием и прогрессированием опухолей эндометрия. В случае ЗОМЖ, клетки с фенотипом CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low/-</sup> являются функциональными стволовыми клетками (Tsang, et.al., 2014). Сравнение представленности маркеров CD44 в полученных культурах клеток эндометрия выявил низкое содержание CD44-положительных клеток в культуре гиперплазии эндометрия HE и в культуре опухолевых клеток EC2 по сравнению с нетрансформированными клетками культуры KE и опухолевыми клетками EC3 (Рис. 8А). Экспрессия CD24 не была выявлена ни в одной из полученных культур клеток эндометрия.



**Рис. 8.** Представленность маркеров опухолевых клеток CD44 и CD24 в культурах ЗОЭ и ЗОМЖ. (А) Доля CD44<sup>+</sup> клеток в культурах клеток эндометрия. (\*) Статистически значимое различие ( $p < 0.05$ ) с нетрансформированными клетками KE. (Б) Доля CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> клеток в культурах опухоли молочной железы. Анализ выполнен методом проточной цитометрии. Представлены данные средних значений  $\pm$ SD по результатам трех независимых измерений.

Анализ популяции ОСК в культурах молочной железы, показал, что наибольшая доля клеток с фенотипом CD44<sup>+</sup>CD24<sup>low/-</sup> была в культурах, полученных методом «импульсной гипоксии» – BrC4e и BrC6e, а также в культуре с эпителиоподобным фенотипом - BrC5e. Данные о содержании клеток с фенотипом ОСК в полученных культурах хорошо согласуются с данными уровня Ki-67 в этих клетках, подтверждая высокую пролиферативную активность клеток с фенотипом ОСК.

### 1.3 Чувствительность клеток культур эндометрия и молочной железы человека к противоопухолевым агентам

Для оценки чувствительности культур клеток эндометрия были выбраны препараты доксорубин, цисплатин и рекомбинантный аналог лактапина RL2. Ранее действие RL2 в отношении опухолевых культур клеток эндометрия исследовано не было.

**Таблица 2.** Индекс цитотоксичности (IC<sub>50</sub>) препаратов доксорубин, цисплатин и RL2, определенный для культур клеток эндометрия человека

Культура клеток	IC <sub>50</sub>		
	Доксорубин, $\mu$ М	Цисплатин, мкг/мл	RL2, мг/мл
EC1	0.21 $\pm$ 0.1	7.5 $\pm$ 2.3	0.38 $\pm$ 0.1
EC2	0.16 $\pm$ 0.1	1.97 $\pm$ 0.8	0.32 $\pm$ 0.1
EC3	0.29 $\pm$ 0.1	1.54 $\pm$ 0.6	0.34 $\pm$ 0.1
HE	2 $\pm$ 0.2	43.2 $\pm$ 4.6	0.57 $\pm$ 0.1
KE	> 50	69 $\pm$ 2.8	0.64 $\pm$ 0.1

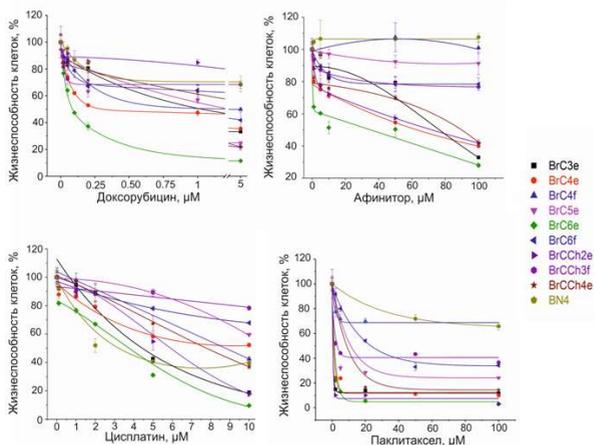
Значения IC<sub>50</sub> представлены как среднее значение  $\pm$  SD.

Анализ цитотоксического действия препаратов методом МТТ показал, что клетки культуры нетрансформированного эндометрия KE обладали низкой

чувствительностью к исследуемым препаратам (Таблица 2). Все культуры клеток, полученные из опухолевой ткани, имели близкие значения IC50 для аналога лактапина RL2.

### 1.3.1. Чувствительность клеток культур молочной железы человека к химиопрепаратам

Препараты доксорубицин, цисплатин, афинитор, метатрексат, паклитаксел и хлорокин были использованы для выявления резистентных и чувствительных культур молочной железы. Анализ кривых зависимости цитотоксической активности от концентрации препаратов (Рис.9) и рассчитанные значения IC50 позволили условно разделить культуры на чувствительные и устойчивые. Наибольшую чувствительность к исследуемым препаратам проявляли клетки BrC6e, полученные методом «импульсной гипоксии». В то же время, их родительская культура BrC6f обладала широким спектром устойчивости (цисплатин, афинитор и метатрексат). Наряду с BrC6f, суммарно наиболее устойчивыми к химиопрепаратам были клетки культуры BrC4f (метатрексат, паклитаксел, афинитор), BrCCh3f (метатрексат, паклитаксел, афинитор, цисплатин) и BN4 (доксорубицин, афинитор, паклитаксел, метатрексат, хлорокин). Культура BrCCh2e была относительно устойчива к доксорубину. Наблюдаемая тенденция устойчивости указывает на то, что именно фибробластоподобные клетки с мезенхимальными маркерами проявляют устойчивость к действию широкого спектра химиопрепаратов.

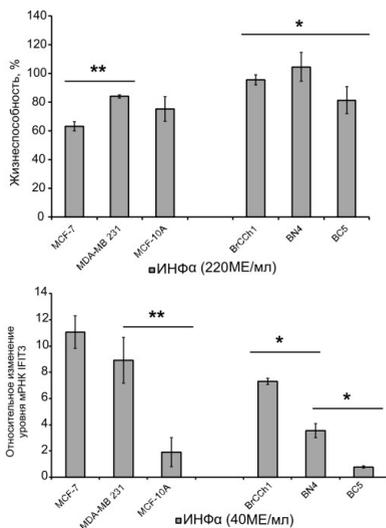


**Рис. 9.** Зависимость жизнеспособности клеток культур молочной железы от концентрации цитотоксических препаратов. Анализ проводили методом МТТ через 48 ч после добавления препарата.

### 1.3.2 Чувствительность культур клеток молочной железы к интерферону альфа

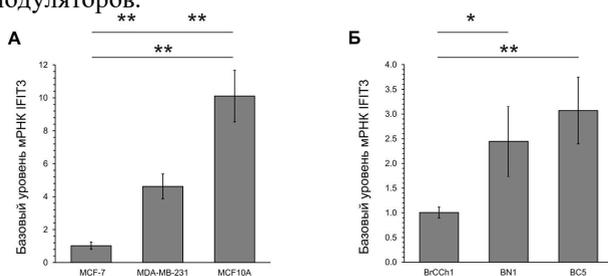
За последние десятилетия иммунотерапия стала частью комплексного подхода к лечению злокачественных новообразований. Для выявления чувствительности полученных и иммортализованных культур клеток молочной железы к иммуномодуляторам использовали препарат рекомбинантного интерферона альфа человека (ИФНа). Было установлено, что ИФНа индуцировал снижение жизнеспособности клеток в диапазон от ~ 5 до 70% при концентрации 220 МЕ/мл (Рис. 10А). Наиболее чувствительными к действию ИФНа были клетки иммортализованной культуры MCF-7 и чувствительность уменьшалась в ряду MCF-7>MCF10A>MDA-MB-231>BC5>BrCCh1>BN1.

Недавно было продемонстрировано, что уровень экспрессии мРНК интерферон-индуцируемого белка с тетраатрикопептидными повторами 3 (IFIT3) может быть маркером ответа на терапию ИФНа пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (Yang, et.al., 2017). Принимая во внимание, что интерферон- $\alpha$  имеет плейотропную биологическую активность, не связанную напрямую с пролиферацией или апоптозом, проводили исследование активации врожденного иммунитета в клетках культур молочной железы. Для этого клетки инкубировали с ИФНа и оценивали уровень мРНК IFIT3 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Рис. 10Б). Степень изменения уровня мРНК IFIT3, вызванная ИФНа, уменьшалась в следующем порядке MCF-7>MDA-MB 231>MCF10A.



**Рис. 10.** Влияние ИФНа на жизнеспособность (А) и уровень экспрессии IFIT3 (Б) в клетках молочной железы человека. Для анализа жизнеспособности клетки обрабатывали ИФНа (220 МЕ/мл). Для анализа изменения уровня экспрессии мРНК IFIT3 в линиях клеток молочной железы человека под действием ИФНа (40 МЕ/мл) количественные значения ОТ-ПЦР были нормализованы на уровень мРНК генов GAPDH, HPRT и RNU6. Результаты представлены относительно образцов необработанных клеток. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение в двух независимых экспериментах. Разница между группами была статистически значимой при  $p < 0.05$  (\*) и при  $p < 0.01$  (\*\*).

Сравнение уровня мРНК IFIT3 в клетках персональных культур молочной железы BC5, BrCCh1 и BN1 после обработки ИНФа показало, что наибольшая активация IFIT3 была в клетках BrCCh1 (Рис. 10 Б), в то время как эти клетки характеризовались самым низким базовым уровнем мРНК IFIT3 (Рис. 11Б). То есть, в клетках с наименьшим базовым уровнем мРНК IFIT3 изменения мРНК IFIT3 при обработке ИНФа были наибольшими как для иммортализованных культур клеток молочной железы (Рис. 11А), так и для полученных персональных культур клеток. Можно заключить, что относительный базовый уровень мРНК IFIT3 позволяет прогнозировать чувствительность опухолевых клеток молочной железы к воздействию иммуномодуляторов.



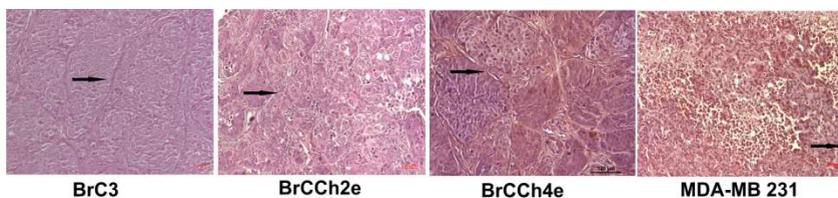
**Рис. 11.** Базовый уровень мРНК IFIT3 в клетках культур молочной железы человека. Количественные значения ОТ-ПЦР были нормализованы на мРНК генов GAPDH, HPRT и RNU6. (А) В иммортализованных культурах за единицу принята экспрессия IFIT3 в клетках MCF-7. (Б) В персональных культурах за единицу принята экспрессия IFIT3 в клетках BrCCh1. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение в двух независимых экспериментах. Разница между группами была статистически значимой при  $p < 0.05$  (\*) и при  $p < 0.01$  (\*\*).

#### 1.4 Туморогенность культур опухолевых клеток молочной железы и эндометрия

Для оценки туморогенности персональных культур опухолевых клеток молочной железы и эндометрия *in vivo* клетки опухолевых культур перевивали мышам линии SCID. В результате трансплантации ни одна из полученных опухолевых культур клеток эндометрия не давала опухолевого роста. Возможно, дополнительная стимуляция животных препаратами эстрогенов могла бы способствовать росту опухолевых узлов, так как все опухолевые культуры эндометрия были, как показано выше, гормон-зависимыми культурами.

В случае опухолевых клеток молочной железы только три культуры клеток вызвали рост опухоли на месте подкожного введения клеток - BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e. Культуры BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e имеют эпителиоподобный фенотип и содержат молекулярные маркеры эпителиальных клеток. При исследовании гистологических срезов

полученных опухолей видно структуры, подобные структурам в молочной железе (Рис. 12): хорошо выделяются дольки с прослойками соединительной ткани. Однако, в отличие от нормальной молочной железы, у опухолей, сформированных персональными культурами клеток, наблюдается тканевой атипизм, который частично проявляется в исчезновении протоков, присутствующих в нормальной молочной железе. Кроме того, наблюдается клеточный атипизм, который проявляется ядерным полиморфизмом, большим количеством митозов, изменением ядерно-цитоплазматического соотношения в пользу ядра. Таким образом, при подкожной трансплантации опухолевых клеток BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e формируются солидные опухоли, проявляющие внешние признаки онкотрансформированной молочной железы, что позволяет рассматривать клетки BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e опухолевыми моделями молочной железы человека.



**Рис. 12.** Гистологический анализ препаратов опухолей BrC3e, BrCCh2e, BrCCh4e и MDA-MB 231. Стрелкой обозначена соединительно-тканная капсула.

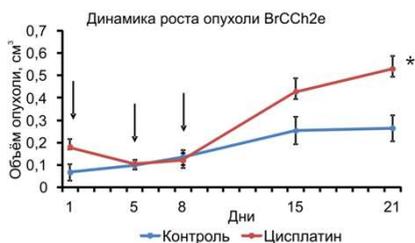
По окончании эксперимента животных-опухоленосителей подвергали патологоанатомическому осмотру для выявления метастазов. Было обнаружено, что опухоль BrCCh4e метастазировала в лимфатический узел средостения.

Таким образом, можно заключить, что полученная культура клеток BrCCh4e, формирующая опухоль без дополнительных стимуляторов и обладающая способностью метастазировать в лимфатические узлы средостения, может быть полезной моделью для изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе метастазирования опухолей молочной железы в лимфатические узлы.

### 1.12 Чувствительность опухоли BrCCh2e к цисплатину *in vivo*

Две из опухолевых культур клеток – BrCCh2e и BrCCh4e были получены из опухолевых образцов пациентов, прошедших 4 курса химиотерапии доксорубицином с циклофосфаном, что может вызывать развитие резистентности к химиопрепаратам *in vivo*. Для анализа чувствительности опухолевой модели BrCCh2e к цисплатину клетки культуры BrCCh2e были трансплантированы подкожно ( $4 \times 10^6$  клеток на мышшь) мышам линии SCID. Через 3 недели после трансплантации, животные контрольной группы получали инъекции физиологического раствора внутривенно, а

животные экспериментальной группы получали внутривенно цисплатин (3.5 мг/кг). Данные по изменению размеров опухолей в группах представлены на Рис. 13.



**Рис. 13.** Чувствительность опухоли BrCCh2e к цисплатину *in vivo*. Динамика роста опухолей. Стрелками отмечены дни введения препарата. Статистический анализ отличия опухолей между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, при  $p < 0.05$  различия считали достоверными (\*).

Видно, что после 3-й инъекции цисплатина не происходит торможения роста опухоли у животных, а напротив, наблюдается рост опухолевого узла. Можно видеть, что средний вес опухоли в контрольной группе был достоверно меньше среднего веса опухоли в группе животных, получавших цисплатин ( $p < 0.05$ , U-критерий Манна-Уитни) в финальной точке эксперимента. Полученные данные указывают на то, что в клетках опухоли BrCCh2e, демонстрирующих резистентность к доксорубину *in vitro*, *in vivo* развивается резистентность к цисплатину.

Таким образом, опухолевая модель BrCCh2e является моделью опухоли молочной железы человека, резистентной к цисплатину.

### 3.6 Кариотип и ультраструктура клеток опухолевых культур молочной железы человека

При анализе метафазных пластинок клеток опухолевых культур наиболее заметным изменением были множественные хромосомные перестройки. Обнаружено, что анализируемые клеточные линии имеют женский псевдотриплоидный набор хромосом.

Сравнивая особенности ультраструктуры опухолевых клеток, можно заключить, что морфологически клетки BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e имеют фенотип малодифференцированных опухолевых клеток.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан метод получения первичных культур клеток из онкотрансформированной и нетрансформированной ткани молочной железы и эндометрия человека. Получено 5 культур клеток эндометрия и 12 культур клеток молочной железы человека. Показано, что неферментативный метод дезагрегации ткани является наиболее продуктивным для получения жизнеспособных культур с эпителиальным фенотипом. Разработан метод “импульсной гипоксии” для индукции мезенхимально-эпителиального перехода в опухолевых культурах клеток молочной железы человека *in vitro*.

2. Показано, что клетки полученных опухолевых культур с эпителиоподобным фенотипом содержат маркеры эпителиальных клеток E-кадгерин и EpCAM, а клетки культур с фибробластоподобным фенотипом маркеры мезенхимальных клеток – N-кадгерин, Mel-CAM, виментин, а также рецепторы эпидермальных факторов роста HER2, HER3 и EGFR.

- Показано, что полученные опухолевые культуры клеток эндометрия и молочной железы содержат значительную долю опухолевых стволовых клеток с соответствующими фенотипами - фенотипом CD44-/CD24- для культур эндометрия и CD44+/CD24- для культур молочной железы.

3. Сравнение чувствительности клеток опухолевых культур эндометрия и молочной железы к противоопухолевым агентам показало, что

- Культуры клеток с мезенхимальным фенотипом устойчивы к цисплатину, доксорубину, афинитору, паклитакселу, метатрексату и хлорокину.

- Показано, что при обработке культур клеток молочной железы препаратом ИФН $\alpha$  изменение относительного уровня мРНК IFIT3 обратно пропорционально базовому уровню этой мРНК в клетках, и базовый уровень мРНК IFIT3 может отражать чувствительность клеток к иммуностимулирующим препаратам.

4. Показано, что среди полученных культур клеток злокачественных опухолей эндометрия и молочной железы человека культуры BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e туморогенны при трансплантации мышам линии SCID.

- Гистологический анализ полученных опухолей показал, что опухолевые клетки формируют структуры, гомологичные структурам в молочной железе человека с признаками тканевого и клеточного атипизма.

- Получена модель метастазирующей злокачественной опухоли молочной железы человека. При подкожной трансплантации мышам клеток BrCCh4e опухоль метастазирует в лимфоузлы средостения. Клетки BrCCh4e имеют фенотип малодифференцированных опухолевых клеток с псевдотриплоидным набором хромосом и множественными абберациями.

- Опухоль BrCCh2e является моделью ЗОМЖ, устойчивой к цисплатину.

**Основные результаты диссертации опубликованы в работах:**

1. Nushtaeva A., Karpushina A., Ermakov M., Gulyaeva L., Gerasimov A., Sidorov S, Gayner T., Yunusova A., Tkachenko A., Richter V., Koval O. Establishment of primary human breast cancer cell lines using “pulsed hypoxia” method and development of metastatic tumor model in immunodeficient mice. // Cancer Cell Int. – 2019. – V. 19. – P. 46 (1-19). – doi:10.1186/s12935-019-0766-5.
2. Nushtaeva A., Stepanov G., Semenov D., Zhuravlev E., Balahonova E, Gerasimov A., Sidorov S., Savelyev E., Kuligina E., Richter V., Koval O. Characterization of primary normal and malignant breast cancer cell and their response to chemotherapy and immunostimulatory agents. // BMC Cancer. – 2018. –V. 18. –N. 1. –P. 728 (1-11). – doi: 10.1186/s12885-018-4635-84.
3. Koval O., Sakaeva G., Fomin A., Nushtaeva A., Semenov D., Kuligina E., Gulyaeva L., Gerasimov A., Richter V. Sensitivity of endometrial cancer cells from primary human tumour samples to new potential anticancer peptide lactaptin. // J Cancer Res Ther. – 2015. – V. 2. – P. 345-351. – doi: 10.4103/0973-1482.157301.