

8. *Клевцов Г. В., Мерсон Е. Д.* О возможности использования конфокального лазерного сканирующего микроскопа для исследования микрорельефа поверхности разрушения металлических материалов // *Фундаментальные исследования*. 2012. № 11(5). С. 1185–1189.
9. *Мерсон Д. Л., Мерсон Е. Д., Данилов В. А.* Уникальные возможности конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для решения задач физического материаловедения / *Перспективные материалы и технологии: матер. междуна-род. симпозиума*. В 2 ч. / Под ред. В. В. Рубаника. Ч. 2. Витебск, Беларусь: Витебский государственный технологический университет, 2017. С. 240–242.

УДК 618.19

<sup>1,2</sup>*Могиленских А. С., <sup>1,2</sup>Сазонов С. В., <sup>1,2</sup>Демидов С. М.*

## **ВЛИЯНИЕ ФЕТАЛЬНОЙ БЫЧЬЕЙ СЫВОРОТКИ НА РОСТ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

<sup>1</sup>*Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург,  
Российская Федерация*

<sup>2</sup>*Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург,  
Российская Федерация*

---

*Аннотация.* Целью работы является определение влияния фетальной бычьей сыворотки (FBS) на рост и морфологию клеток культуры рака молочной железы.

Методика работы: анализ характеристик клеток первичной культуры рака молочной железы осуществляли с помощью проточной цитометрии: определяли экспрессию к эстрогену, Ki-67, панцитокератину и виментину.

Основные результаты работы: использование FBS при культивировании клеток рака молочной железы увеличивает общее количество жизнеспособных клеток, меняет их морфологию, а также количество клеток с экспрессией эстрогена и белка клеточной пролиферации Ki-67.

*Ключевые слова:* культура клеток рака молочной железы, фетальная бычья сыворотка, рецепторный аппарат клеток.

<sup>1,2</sup>*Mogilenskikh A. S., <sup>1,2</sup>Sazonov S. V., <sup>1,2</sup>Demidov S. M.*

## **THE EFFECT OF FETAL BOVINE SERUM ON THE GROWTH AND MORPHOLOGY OF BREAST CANCER CULTURE CELLS**

<sup>1</sup>*Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation*

---

*Abstract.* The aim of the work is to determine the effect of fetal bovine serum (FBS) on the growth and morphology of breast cancer culture cells.

The methodology of the work of work analysis of the receptor apparatus of primary breast cancer cells using flow cytometry: expression to estrogen, Ki-67, pancytokeratin and vimentin.

The main results of the work showed that the use of FBS in the cultivation of breast cancer cells increases the total number of living cells, changes their morphology, as well as the number of cells with estrogen expression and cell proliferation index Ki-67.

*Keywords:* breast cancer culture, fetal bovine serum, receptor apparatus.

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на существование коллекции клеточных линий рака молочной железы (РМЖ), остается актуальным создание первичных культур, полученных непосредственно после удаления опухоли [1]. Такая культура может служить экспериментальной моделью заболевания *in vitro* для определения цитотоксического эффекта противоопухолевых препаратов или схемы лечения у каждой пациентки, поскольку содержит элементы микроокружения опухоли. При этом первичная клеточная культура более гетерогенна по составу, чем иммортализованная, а значит, более требовательна к среде культивирования [2]. Традиционно источником ростовых факторов в культуральной среде является фетальная сыворотка крови, получаемая от крупного рогатого скота (fetal bovine serum, FBS) [3]. Сыворотка крови содержит комплекс разнообразных компонентов, влияющих на рост клеток: питательные вещества, факторы роста, факторы адгезии, белки, связывающие тяжелые металлы, ингибиторы протеаз и др. [4–5].

Имеются данные о том, что FBS положительно влияет на рост иммортализованных клеточных линий рака молочной железы, однако оказывает цитотоксическое действие на первичные культуры [6]. При получении первичных клеточных культур необходимо сохранение рецепторного аппарата клеток, поскольку при определении тактики лечения РМЖ руководствуются определяемым при иммуногистохимическом исследовании суррогатным молекулярно-биологическим подтипом, определяемым по сочетанию экспрессии рецепторов к эстрогену (ER), прогестерону (PR), HER-2 и Ki-67 [7].

Целью данного исследования является оценка влияния FBS на рост и морфологию клеток культуры РМЖ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения клеточной культуры часть материала из хирургического образца измельчали с помощью ножниц, помещали в смесь ферментов коллагеназа-гиалуронидаза (STEMCELL, Канада) и раствор DMEM: F12 (Панэко, Россия) на ночь в термостат (37 °С) на качающуюся платформу. После растворения полученную смесь центрифугировали при 0,8 RPM (30 секунд), надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспендировали с трипсином (Панэко, Россия), после чего разбавляли в соотношении 1:2 раствором HF (Хэнкс с 10% FBS, Панэко, Россия). Далее смесь центрифугировали при 1,4 RPM (5 минут). Полученный осадок ресуспендировали с ферментами диспазой и ДНКазой (STEMCELL, Канада), разбавляли HF и центрифугировали при тех же оборотах. Полученный осадок растворяли в питательной среде Mammocult™ Human Medium (STEMCELL, Канада) с добавлением раствора гепарина и гидрокортизона, помещали в культуральные флаконы, предварительно обработанные раствором коллагена (STEMCELL, Канада). Пересев культуры осуществлялся на 7-е сутки, после достижения клеточного монослоя. Поверхность культурального флакона обраба-

тывали ферментом триспином в течение 10 минут, затем разбавляли раствором HF и центрифугировали при 1,4 RPM (5 минут).

Оценку уровня флуоресценции окрашенных клеток осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра Navios 10 (Beckman Coulter, США). В работе были использованы моноклональные кроличьи и мышинные антитела: к рецепторам эстрогенов (клон SP1, Alexa Fluor® 647, Abcam, США), к белку пролиферативной активности Ki-67 (клон SP6, Alexa Fluor® 488 Abcam, США), к панцитокератину (клон C-11, Alexa Fluor® 488, Abcam, США), к виментину (EPR3776 Alexa Fluor® 405, Abcam, США). Фиксация клеток осуществлялась с помощью 4%-ного формальдегида — 5 минут, предподготовка холодным метанолом — 5 минут, 0,5% Тритон X-100 (Applichem, Германия) — 15 минут.

Подсчет клеток осуществлялся в счетчике TC20 (Bio-Rad, США) после окрашивания метиленовым синим. Оценка действия препарата производилась на 5-е сутки эксперимента. Анализ полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения проточного цитофлуориметра.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При визуальном контроле на 5-е сутки эксперимента в среде без сыворотки наблюдаются островки монослоя, одиночные вытянутые клетки и маммосферы. В среде с добавлением 10% FBS клетки образовали монослой (рис. 1).

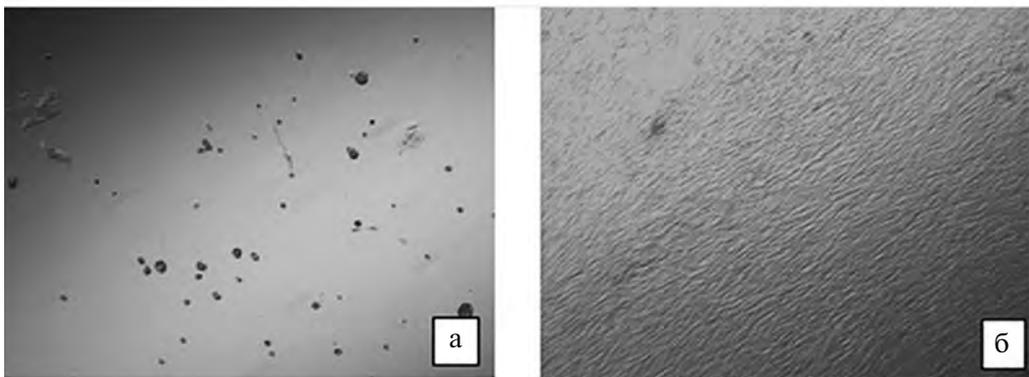
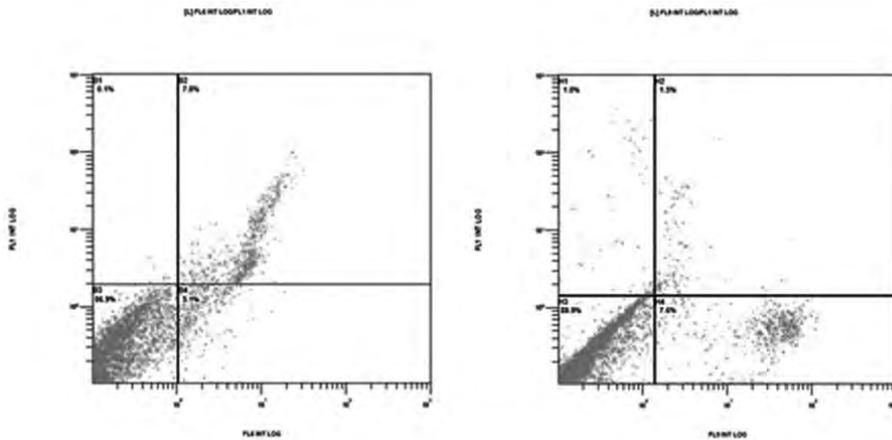


Рис. 1. Культура клеток рака молочной железы, без окраски, ув. 50:  
а — бессывороточная среда, б — в среде с добавлением сыворотки

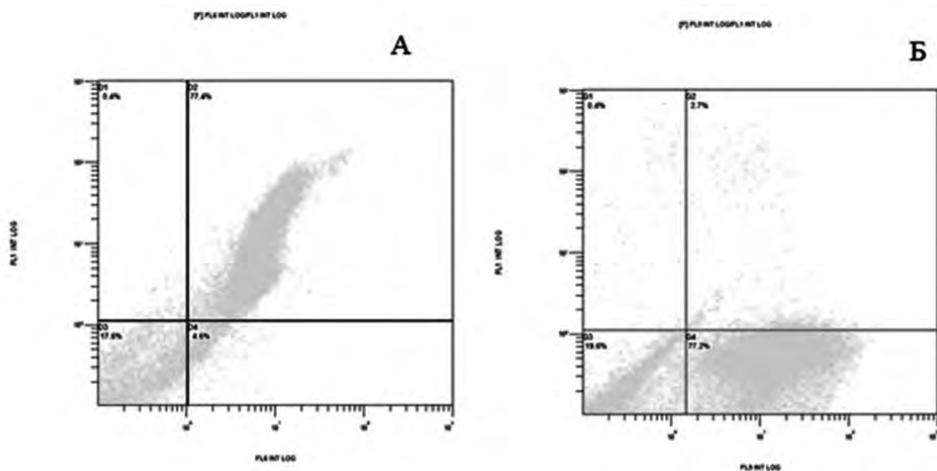
При подсчете общее количество клеток в контрольной группе составило  $2,61 \times 10^5 \pm 0,3$ , из которых  $54 \pm 7\%$  — жизнеспособные. В группе, где была добавлена сыворотка, общее количество клеток значительно больше —  $5,0 \times 10^5 \pm 0,5$ , из которых жизнеспособных —  $77,0 \pm 3,0\%$ .

При оценке рецепторного аппарата в контрольной группе обнаружено 7,8% клеток с коэкспрессией как маркера клеточной пролиферации Ki-67, так и рецептора эстрогена. Клеток с экспрессией только эстрогена — 5,1%. При оценке эпителиальной и мезенхимальной природы клеток 1% клеток экспрессируют панцитокератин, 7,6% — виментин, в 1,5% случаев наблюдается коэкспрессия (рис. 2).



*Рис. 2.* Проточная цитометрия культуры клеток в бессывороточной среде. Гистограмма а — квадранты: V1 — экспрессия к Ki-67, V2 — коэкспрессия Ki-67 и ER, V3 — негативные клетки, V4 — экспрессия к ER. Гистограмма б — квадранты: H1 — экспрессия к панцитокератину, H2 — коэкспрессия, H3 — негативные клетки, H4 — экспрессия к виментину

При оценке рецепторного аппарата в группе с использованием 10%-ной сыворотки обнаружено 77,4% клеток с коэкспрессией как маркера клеточной пролиферации Ki-67, так и рецептора эстрогена. Клеток с экспрессией только эстрогена — 4,6%. При оценке природы клеток: 0,4% клеток экспрессируют панцитокератин, 77,2% — виментин, 2,6% — коэкспрессия панкератина и виментина (*рис. 3*).



*Рис. 3.* Проточная цитометрия культуры клеток при использовании 10%-ной сыворотки FBS. Гистограмма а — квадранты: D1 — экспрессия к Ki-67, D2 — коэкспрессия Ki-67 и ER, D3 — негативные клетки, D4 — экспрессия к ER. Гистограмма б — квадранты: D1 — экспрессия к панцитокератину, D2 — коэкспрессия, D3 — негативные клетки, D4 — экспрессия к виментину

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование FBS при культивировании клеток рака молочной железы увеличивает общее количество жизнеспособных клеток, клеток с экспрессией эстрогена и экспрессией белка клеточной пролиферации Ki-67.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Межевова И. В., Ситковская А. О., Кит О. И.* Первичные культуры опухолевых клеток: современные методы получения и поддержания in vitro // Южно-Российский онкологический журнал. 2020. № 1(3). С. 36–49.
2. Могиленских А. С., Сазонов С. В. Создание клеточных линий карциномы молочной железы // Гены и клетки. 2021. Т. 16. № 1. С. 15–23.
3. *Froud S. J.* The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Dev Biol Stand.* 1999; 99:157–166.
4. Бессывороточная питательная среда для культивирования клеток vero / Г. П. Трошкова и др. // Фундаментальные исследования. 2005. № 5. С. 94–94.
5. *Зорин В. Л., Копнин П. Б., Зорина А. И., Еремин И. И.* и др. Оптимизация условий получения и ведения культур фибробластов кожи и десны человека // Гены и клетки. — 2014. — Т. 9. — № 2. — С. 53–60.
6. *De Launoit Y., Gasperin P., Pauwels O., et al.* Influence of fetal bovine serum and hormones on primary vs. long-term cultures of human breast cancers. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1991; 27(3):234–238.
7. *Сазонов С. В.* Обеспечение качества молекулярно-биологических исследований при диагностике инвазивного рака молочной железы. Екатеринбург: ВУМАН, 2018. 152 с.

УДК 57.084: 576.53: 615.032

*Мурзина Е. В., Пак Н. В., Аксенова Н. В., Веселова О. М., Жирнова Н. А.*

### ПОЛУЧЕНИЕ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА И ОЦЕНКА ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ

*Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Санкт-Петербург,  
Российская Федерация*

---

*Аннотация.* Целью работы явилось исследование возможности использования биомедицинского клеточного продукта, полученного из жировой ткани, для лечения острого радиационного поражения.

Материалы и методы. Исследование проведено на белых беспородных мышак-самцах с костномозговой формой острой лучевой болезни в результате острого общего рентгеновского облучения. Из жировой ткани лабораторных грызунов получали фракцию стромальных клеток; для введения животным ис-