

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ, ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК МЕЛАНОМНОЙ ЛИНИИ (*MEL IBr*) ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В РОСТОВОЙ СРЕДЕ С НИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТЕЛЯЧЬЕЙ СЫВОРОТКИ

Л.Ф. Морозова¹, Н.М. Сураева¹, О.С. Бурова¹, Е.С. Воронина², М.А. Барышникова¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Сураева Наталья Михайловна nsuraeva@yandex.ru

Цель исследования — изучение изменения фенотипических и генетических характеристик клеток меланомы *Mel Ibr* при культивировании в ростовой среде со сниженной концентрацией эмбриональной телячьей сыворотки до 5 %.

Материалы и методы. Клетки линии *Mel Ibr* для селекции колоний веретеновидных клеток предварительно культивировали в среде RPMI-1640 с 5 % эмбриональной телячьей сыворотки в течение 3 пассажей, а затем рассевали на чашки в дубликатах диаметром 60 мм в количестве 200–400 клеток на чашку Петри и оставляли в инкубаторе на 14 дней до образования колоний. Каждую из сформировавшихся колоний, состоящих из клеток веретеновидной формы, продолжали культивировать в тех же условиях на протяжении более 30 пассажей. Для исследования морфологии растущих клеток их окрашивали по методу Лейшмана. Экспрессию антигенов на клетках определяли в реакции непрямой иммунофлуоресценции.

Результаты. При культивировании клеток меланомной линии человека *Mel Ibr* в ростовой среде со сниженным содержанием эмбриональной телячьей сыворотки до 5 % получен субклон, клетки которого сравнивали по морфологическим, иммунологическим и цитогенетическим характеристикам с клетками родительской линии. Клетки субклона отличались веретеновидной формой, значительно меньшим размером, большим ядром, занимающим практически весь объем цитоплазмы, и образованием в процессе роста колоний сфероидного типа, а также резким уменьшением HLA-DR⁺ клеток, уменьшением процентного содержания CD-54⁺ клеток, увеличением CD-63⁺ клеток и появлением CD-133⁺ клеток. Кариотип клеток субклона значительно отличался от кариотипа родительской популяции.

Выводы. В результате проведенных исследований выявлено, что клетки полученного субклона обладают признаками стволовых клеток и могут быть использованы в качестве модели для изучения опухолевой прогрессии.

Ключевые слова: сыворотка, клеточная линия меланомы, опухолевая стволовая клетка, субклон

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-19-23

CHANGES IN THE MORPHOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF *MEL IBr* MELANOMA CELLS IN RESPONSE TO LOW CONCENTRATION OF EMBRYO CALF SERUM

L.F. Morozova¹, N.M. Suraeva¹, O.S. Burova¹, E.S. Voronina², M.A. Baryshnikova¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;

24 Kashirskoye shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Research Center for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow, 115478, Russia

Objective: the purpose of the study is research of the changes in phenotypic and genetic characteristics of melanoma cells *Mel Ibr* cultured in growth medium with low concentration (5 %) of embryo calf serum.

Materials and methods. Cell line *Mel Ibr* was pre-cultured in RPMI-1640 medium with 5 % FBS for 3 passages, and then 200–400 cells were replaced on the Petri dish with a diameter of 60 mm and left in the incubator for 14 days to form colonies. Colonies of spindle form cells were cultivated in the same conditions for more than 30 passages. Cells were stained according to the method of Leishman to investigate the morphology. The expression of antigens was determined in the reaction of indirect immunofluorescence.

Results. Exposure of *Mel Ibr* human melanoma cells to low concentration of embryo calf serum resulted in the appearance of a subclone with morphological, immunological and cytogenetical characteristics differed to those of parental cells. The subclone cells distinguished

with spindle form, more small size, large nucleus which broadcasted on whole cytoplasm, formation spheroid and sharply reduced percentage of HLA-DR (+) and CD54 (+) cells, a significantly elevated percentage of CD63 (+) cells, and appearance of CD133 (+). The subclone karyotype differed to those of parental cells.

Conclusoin. The subclone cells were characterized by the same features as stem tumor cells and could be use as tumor progression model.

Key words: serum, melanoma cell line, tumor stem cell, subclone

Введение

Злокачественная опухоль представляет собой гетерогенную популяцию клеток на различных стадиях дифференцировки. Принято считать, что такая гетерогенность обусловлена генетическими и эпигенетическими отклонениями от нормы в популяциях опухолевых клеток [1]. Исследования по идентификации и изучению характеристик этих клеток позволили выдвинуть гипотезу существования стволовых опухолевых клеток, дающих начало опухолевому росту. Комплекс многообразных нарушений, происходящих в клетке в процессе опухолевой прогрессии, требует создания адекватной модели для исследования стадий онкогенеза. В настоящее время проводится анализ фенотипических и генетических свойств стволовых опухолевых клеток с использованием различных методов. Широко применяется скрининг поверхностных маркеров на разных этапах прогрессии с последующей оценкой эффективности пролиферации опухолевых клеток после имплантации животным. Изучается воздействие цитокинов и других биологически активных препаратов в культурах *in vitro* и экспериментах *in vivo* на опухолевый рост и прогрессию. Используются трансгенные нокаутные животные. Разрабатываются различные клеточные модели и другие технологии. И несмотря на весь этот спектр приемов, по-прежнему остается открытым вопрос об адекватности той или иной модели.

Нами также была предпринята попытка создать модель опухолевой стволовой клетки на основе культуры меланомных клеток человека после снижения концентрации телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС) в культуре до 5 % и с дальнейшей обработкой куриным эмбриональным экстрактом (КЭЭ) [2, 3]. В этих экспериментах показано, что после обработки экстрактом единичные выжившие клетки отличались от эпителиоподобных родительских своей веретеновидной формой, более интенсивным ростом и обладали сходством со стволовыми эмбриональными и опухолевыми клетками по морфологическим, ростовым и иммунологическим параметрам.

В процессе проведения указанных экспериментов мы обратили внимание на то, что снижение концентрации ТЭС при культивировании родительской линии также способствует образованию колоний веретеновидных клеток. С целью изучения данного феномена мы провели исследование фенотипических и генети-

ческих характеристик родительских меланомных клеток при культивировании в норме и в ростовой среде со сниженной концентрацией ТЭС в ростовой среде до 5 %.

Материалы и методы

В работе использовалась стабильно перевиваемая клеточная линия меланомы человека *Mel Ibr* (патент на изобретение Российской Федерации № 2287576 от 20.11.06 г.), полученная из опухолевого образца метастатического узла пациентки с диагнозом «диссеминированная меланома кожи» [2]. Клетки из посевного банка культивировали с 10 % ТЭС с добавлением 2 ммоль L-глутамина, 0,04 мг/мл гентамицина при температуре 37 °C в атмосфере 5 %-ного CO₂.

Клетки линии *Mel Ibr* для селекции колоний веретеновидных клеток предварительно культивировали в среде RPMI-1640 с 5 % ТЭС в течение 3 пассажей, а затем рассеивали на чашки в дубликатах диаметром 60 мм в количестве 200–400 клеток на чашку и оставляли в инкубаторе на 14 дней до образования колоний. Каждую из сформировавшихся колоний, состоящих из клеток веретеновидной формы, снимали раствором Версена, переносили в другие чашки и продолжали культивировать в тех же условиях на протяжении более 30 пассажей. Смену среды на свежую проводили 1 раз в 3 дня.

Для исследования морфологии растущих клеток их окрашивали по методу Лейшмана. Окрашенные клетки оценивали под световым микроскопом при увеличении ×100.

Экспрессию антигенов на клетках определяли в реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител серии ICO [4] и Serotec. Тестировали экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости I (HLA-ABC) и II (HLA-DR), меланоцитов (CD63), клеточной адгезии (CD54), стволовых опухолевых клеток (CD44, CD117, CD133), стволовой гемопоэтической клетки (CD34), рецептора эндотелиальных клеток (CD105), нелинейного антигена (CD-24), антигена эмбриональных стволовых клеток (Oct-4A, RnDSystem). Реакцию учитывали на проточном цитофлуориметре.

Для кариологического исследования цитогенетические препараты готовили по стандартной методике [5]. Для каждой культуры анализировали не менее 15 метафаз. Анализ препаратов проводили согласно

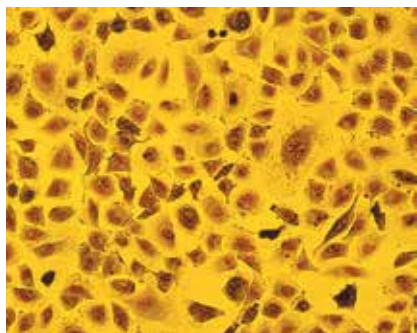


Рис. 1. Фиксированная и окрашенная по методу Лейшмана культура *Mel Ibr*, $\times 100$

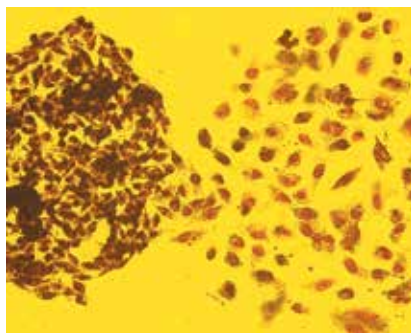


Рис. 2. Фиксированные и окрашенные по методу Лейшмана колонии 1-го типа веретеновидных (слева) и 2-го типа эпителиоподобных клеток линии *Mel Ibr*, $\times 100$

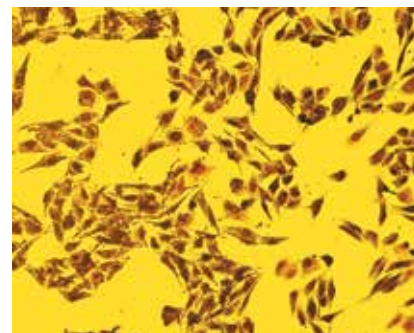


Рис. 3. Фиксированная и окрашенная по методу Лейшмана культура субклона *Mel Ibr*, 5 $\times 100$

Международной цитогенетической номенклатуре хромосом человека (ISCN, 2005). Препараты анализировали под световым микроскопом при увеличении $\times 1000$.

Результаты и обсуждение

Клетки линии *Mel Ibr*, растущие в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % ТЭС, образовывали адгезионный монослой. Он был представлен преимущественно клетками эпителиоподобного вида с признаками низкой дифференцировки. Клетки в основной массе были неправильной округлой (эпителиоподобной) формы с полиморфными ядрами и обильно вакуолизированной, без четких контуров цитоплазмы. Среди них встречались отдельные клетки (0,5–1 %) вытянутой формы (рис. 1). При культивировании в среде RPMI-1640 с добавлением 5 % ТЭС в чашках диаметром 60 мм наблюдали незначительную гибель клеток. Выросшие в этих чашках колонии состояли из 3 типов клеток, различающихся своей морфологией. Первый тип был представлен веретеновидными клетками, второй — эпителиоподобными, а третий — клетками обоих типов (эпителиоподобными и веретеновидными) примерно в равной степени (рис. 2).

Мы обратили внимание на тот факт, что морфологически клетки 1-го типа были очень похожи на веретеновидные клетки ранее полученного нами субклона после воздействия КЭЭ на клетки меланомной линии человека *Mel Ibr* [2]. Поэтому для дальнейшего изучения и получения субклона под микроскопом были отобраны колонии 1-го типа. После 30 пассажей клетки оставались мономорфными и сохраняли свой иммунологический фенотип. Полученная субпопуляция клеток была обозначена нами как субклон *Mel Ibr 5C* (рис. 3). Действительно, клетки *Mel Ibr 5C* субклона так же, как и ранее полученный субклон с выявленными характеристиками стволовых опухолевых клеток [2], отличались от родительских значительно меньшим размером, большим ядром, занимающим практически весь объем цитоплазмы, длинными

вытянутыми отростками, более интенсивным ростом. Эти клетки росли плотным монослоем и обладали способностью формировать на поверхности монослоя выпуклые образования в виде сфероидов.

С целью дальнейшей характеристики полученного субклона *Mel Ibr 5C* было проведено исследование его иммунологического фенотипа и маркеров стволовых опухолевых клеток. Как видно из табл. 1, указанный фенотип субклона действительно отличался от исходных клеток *Mel Ibr*. В клетках субклона *Mel Ibr 5C* уменьшился процент HLA-DR⁺ клеток, CD95 и CD54⁺, на их поверхности появились антигены стволовых клеток CD133 (24,9 %), но не эмбриональный антиген

Таблица 1. Иммунологический фенотип клеток линии *Mel Ibr* и ее субклона *Mel Ibr 5C*

Маркеры	Количество положительных клеток по маркеру от общего числа клеток, %	
	Исходная линия <i>Mel Ibr</i> , 48-й пассаж	Субклон <i>Mel Ibr 5C</i> , 30-й пассаж
HLA-ABC	97,6 \pm 2,0	99,6 \pm 0,4
HLA-DR	87,9 \pm 2,0	10,2 \pm 2,0
CD24	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
CD34	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
CD44	99,2 \pm 0,5	99,9 \pm 0,5
CD133	1,6 \pm 1,0	24,9 \pm 1,0
CD117	0,2 \pm 0,1	1,0 \pm 0,5
CD105	95,4 \pm 2,0	92,4 \pm 10,0
CD63	20,0 \pm 3,0	92,4 \pm 10,0
CD54	93,1 \pm 5,0	24,9 \pm 1,0
CD 95	70,0 \pm 5,0	10,0 \pm 2,0
CD117	0,2 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
Oct-4A	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1

Таблица 2. Кариотип клеток исходной линии *Mel Ibr* и субклона *Mel Ibr 5C*

Клетки	Кариотип
<i>Mel Ibr</i> – линия	71 87 <4n->,XX,add(X)(q28),del(1)(q12),+7,+7,+7,i(21)(q10), inc.
<i>Mel Ibr C</i> – субклон	92 100<4n+>,XXX,-X,del(6)(p21),?der(6)del(6)(12)dup(6)(q?q?),der(9)t(1;9)(q12;p21), inc.

Ost-4A, повысился процент CD63⁺ клеток и не изменилось число клеток, экспрессирующих антигены HLA-ABC и CD24, CD34, CD44, CD117 и CD105. Похожие отличия по сравнению с родительской линией, за исключением Ost-4A маркера, наблюдались и у ранее полученного субклона [2].

Цитогенетическое исследование показало, что клетки субклона *Mel Ibr 5C* отличаются по кариотипу от популяции клеток исходной линии *Mel Ibr*. Данные представлены в табл. 2.

При анализе 15 метафаз клеток линии *Mel Ibr* выявлено, что число хромосом колеблется от 71 до 87. Модальное число хромосом соответствует гипертетраплоидному набору (4n). Популяция клеток культуры характеризуется увеличенным количеством хромосом 7, их число в клетках колеблется от 4 до 7. Кариотип не соответствует стандартному набору не только по числу хромосом, но и по их структуре. Во всех клетках обнаружен дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на длинном плече X-хромосомы. Наблюдаются две различные делетированные хромосомы 1, в одном случае имеет место делеция практически всего плеча (p21-pter), а в другом – (q12-qter). Присутствует изохромосома, образованная двумя длинными плечами хромосомы 21.

Определение кариотипа клеток субклона *Mel Ibr 5C* строилось на анализе 25 метафаз. Установлено, что число хромосом колеблется от 92 до 100. Модальное число хромосом соответствует гипертетраплоидному набору (4n+). Обнаружены структурные перестройки: дериватная хромосома 9, образованная транслокацией хромосом 1 и 9; делеция короткого плеча хромосомы 6 (p21-pter), а также, возможно, дериватная хромосома 6, образовавшаяся в результате терминальной делеции короткого плеча (p21-pter) и дубликацией части длинного плеча хромосомы 6. Имели место и другие перестройки, которые возможно было идентифицировать с помощью молекулярно-цитогенетических методов.

В исходной культуре *Mel Ibr* наблюдается одно из характерных для меланомы нарушений: увеличе-

ние числа хромосом 7. На коротком плече хромосомы 7 в районе 7p12.3-p12.1 расположен ген рецептора эпидермального фактора роста, который может вызывать или усиливать злокачественную трансформацию клеток при меланоме. Кроме того, экспрессия этого гена повышена в метастазах.

В клетках субклона *Mel Ibr 5C* общее количество хромосом больше (гипертетраплоидный набор), однако относительное количество хромосом 7 нормальное. В этой культуре наблюдается другое характерное хромосомное нарушение: перестройка, затрагивающая локус p21 хромосомы 9, в котором расположен ген-супрессор опухоли CDKN2A (p16), играющий важную роль при многих злокачественных новообразованиях (он кодирует белок, участвующий в регуляции клеточного цикла и клеточного старения).

Таким образом, выявленные хромосомные нарушения в популяции клеточной линии *Mel Ibr* и клетках субклона *Mel Ibr 5C* полностью различны.

Выводы

На основании полученных данных можно предположить, что в исходной популяции линии *Mel Ibr* присутствует небольшое число клеток с веретеновидной морфологией, утративших антигены гистосовместимости II класса (HLA-DR) и имеющих антиген стволовых клеток-CD133 (но не Ost-4A). В условиях роста клеток *Mel Ibr* в среде со сниженной концентрацией ТЭС до 5 % и в результате отбора колоний из клеток веретеновидной формы и дальнейшего их культивирования на протяжении длительного времени произошла селекция форм с признаками стволовых клеток. Потомки этих клеток имеют пролиферативное преимущество по сравнению с клетками родительской линии и могут, возможно, представлять собой метастазирующий клон. Дальнейшее изучение полученного субклона *Mel Ibr 5C* как модели меланомных клеток с характеристиками стволовых клеток позволит определить их роль в опухолевой прогрессии.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В. и др. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение. *Биохимия* 2013;78(11):1531–49.
2. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Самойлов А.В. и др. Изменение морфологических и иммунологических характеристик клеток меланомной линии (MEL 1BR) в результате воздействия куриного эмбрионального экстракта. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2015;159(4):521–4.
3. Сураева Н.М., Самойлов А.В. Получение фармацевтических белков с помощью трансгенной птицы. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2009;20(4):19–25.
4. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека. *Гематология и трансфузиология* 1990;8:4–7.
5. Short protocols in human genetics: a compendium of methods from current protocols in human genetics. N.C. Dracopoli et al. (eds.). New York: Wiley, 2004.