

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК МЕЛАНОМНОЙ ЛИНИИ MEL CHER ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В РОСТОВОЙ СРЕДЕ С НИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТЕЛЯЧЬЕЙ СЫВОРОТКИ

Л.Ф. Морозова, Н.М. Сураева, О.С. Бурова, А.Е. Бармашов, М.А. Барышникова

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Наталья Михайловна Сураева nsuraeva@yandex.ru

Введение. Клеточная линия меланомы человека mel Cher обладает ярко выраженным полиморфизмом клеток и по степени дифференцировки оценивается как низкодифференцированная меланома.

Цель исследования — получение и характеристика субклона клеток линии mel Cher 5C.

Материалы и методы. Для получения субклона клеток линии mel Cher 5C был использован метод колониеобразования в среде с пониженной до 5 % концентрацией эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Затем проведена селекция веретеновидных клеток, их длительное культивирование и оценка морфологических и иммунологических характеристик.

Результаты. При культивировании клеток меланомной линии mel Cher в ростовой среде с пониженной до 5 % концентрацией ЭТС развивались клетки mel Cher 5C, которые морфологически отличались от клеток исходной линии mel Cher. Они имели веретеновидную форму и обладали способностью формировать в процессе роста колонии сферического типа на поверхности монослоя. Клетки субклона росли более интенсивно в сравнении с клетками исходной линии, имели отличия по иммунологическому фенотипу и не экспрессировали HLA-DR-антигены.

Выводы. Клетки субклона обладали веретеновидной формой, в процессе роста формировали мономорфные колонии сферического типа, не экспрессировали антигены главного комплекса гистосовместимости II.

Ключевые слова: эмбриональная телячья сыворотка, опухолевая стволовая клетка, клетки линии меланомы, субклон

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-90-94

CHANGES IN THE MORPHOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MEL CHER MELANOMA CELLS IN RESPONSE TO LOW CONCENTRATION OF EMBRYO CALF SERUM

L. F. Morozova, N. M. Suraeva, O. S. Burova, A. E. Barmashov, M. A. Baryshnikova

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Human melanoma cell line mel Cher have a different cell forms and is appraised for grade of differentiation as low-differentiation melanoma.

Objective. The purpose of this study was development and characterization of subclone mel Cher 5C.

Materials and methods. For received subclone mel Cher 5C was applied method of colony formation in conditions with low concentration of embryo calf serum (5 %). Then was carry out selection spindle-like cells, their long cultivation and estimate morphological and immunological characteristics.

Results. Subclone mel Cher 5C cells differed for morphology from primary line mel Cher. This cells had spindle-like form and had capacity to form spherical type colony on the surface of monolayer during their growth. Subclone cells has more intensive growth compare with cells of primary line. Subclone cells had differences by immunological phenotype and didn't expressed antigene HLA-DR.

Conclusions. Subclone cells had a fusiform shape, in the growth process of the formed spheroid colonies monomorphic type, did not Express antigens of histocompatibility complex II.

Key words: embryo calf serum, cancer stem cells, melanoma cell line, subclone

Введение

Способность опухоли адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды, обусловленная гетерогенностью составляющих ее клеток, гарантирует ей не только самоподдержание, но и способность к инвазии и метастазированию. Какие клетки в популяции ответственны за эти процессы, и похожи ли механизмы запуска этих процессов в различных опухолевых тканях? Ответы на эти вопросы до сих пор являются главным предметом научных исследований в онкологии [1, 2]. В настоящее время в качестве претендента на роль инициатора механизмов опухолевой прогрессии, несмотря на отсутствие достоверного знания источников их происхождения, выдвинуты опухолевые стволовые клетки (СК).

В наших предыдущих исследованиях на клетках меланомы человека была предпринята попытка найти связь между приспособительными свойствами отдельных клеток и наличием у них маркеров, ответственных за фенотип СК. Клетки субклонов mel 1br 5C и mel 1br получены нами из исходной линии клеток эпителиоподобного вида после воздействия определенных факторов среды, а именно уменьшения концентрации ЭТС в культуре с 10 до 5 % и обработки куриным эмбриональным экстрактом (КЭЭ) [3, 4]. В этих экспериментах из одиночных клеток выросли колонии. Далее были отобраны колонии, состоящие из клеток веретеновидной формы (мезенхимальный тип), при этом в отличие от исходной линии клетки субклона mel 1br 5C показали иммунологический фенотип опухолевых СК, а клетки субклона mel 1br наряду с указанными признаками — фенотип эмбриональных СК по антигену Oct-4A. Важно отметить, что после воздействия КЭЭ выжили только клетки веретеновидной формы, т. е. в исходной популяции mel 1br в неблагоприятных условиях культивирования клетки веретеновидной формы имели селективное преимущество. Нас заинтересовал вопрос, произойдет ли аналогичная селекция популяции веретеновидных клеток в линии меланомы от другого пациента при уменьшении концентрации ЭТС в культуральной среде. Для проверки этого предположения нами была выбрана линия меланомы mel Cher, клетки которой отличались от клеток mel 1br ярко выраженным полиморфизмом и по морфологическим критериям оценивались как низкодифференцированные.

Цель исследования — получение и характеристика субклона клеток линии mel Cher 5C.

Материалы и методы

В работе использована стабильно перевиваемая клеточная линия меланомы человека mel Cher [5], полученная из опухолевого образца метастатического лимфатического узла пациентки с диагнозом «дис-

семинарированная меланома кожи», оперированной в НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клетки из посевного банка мы культивировали в ростовой среде RPMI-1640 с 10 % ЭТС с добавлением 2 mM L-глутамина и 0,04 мг/мл гентамицина при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Для образования колоний клетки предварительно культивировали в среде RPMI-1640 с 5 % ЭТС в течение 3 пассажей, а затем рассеивали на чашки Петри в дубликатах диаметром 60 мм в количестве 200–400 клеток на чашку и оставляли в инкубаторе на 14 сут. Каждую из сформировавшихся колоний, состоящих из клеток веретеновидной формы, снимали раствором Версена, переносили на другие чашки и продолжали культивировать в тех же условиях на протяжении более 30 пассажей. Смену среды на свежую проводили 1 раз в 3 сут. 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. Тестировали экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости I (HLA-ABC, Beckman Coulter, США) и II классов (HLA-DR, Beckman Coulter, США), меланоцитов (CD63, MACS, Miltenyi Biotec, Германия), клеточной адгезии (CD54, Beckman Coulter, США), гемопоэтической СК (CD34, MACS, Miltenyi Biotec, Германия), нелинейного антигена (CD24, BD, Pharmingen, США), опухолевой СК (CD133/2, CD117, MACS Miltenyi Biotec, Германия; CD44, BD Pharmingen, США), инициации апоптоза (CD95, Dako, Дания). Реакцию учитывали на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

Результаты и обсуждение

Клетки линии mel Cher, растущие в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % ЭТС, образовывали адгезионный монослой. Линия mel Cher отличалась ярко выраженным полиморфизмом клеток различных размеров, вытянутой, удлинённой веретенообразной с тонкими отростками, округлой овальной и неправильной формы. Цитоплазма клеток была относительно обильной, негомогенной и содержала большое количество мелкозернистого пигмента — меланина. Ядра опухолевых клеток полиморфные, нормо- и гиперхромные с 1–3 ядрышками, строение хроматина мелкозернистое или мелкоглыбчатое, часто наблюдались почкование и фрагментация ядер. Встречались гигантские одноядерные и двухъядерные, а также многоядерные клетки. Нередко выявлялись митозы (рис. 1). При культивировании в среде RPMI-1640 с добавлением 5 % ЭТС в чашках диаметром 60 мм наблюдалась незначительная гибель клеток. Выросшие в этих

чашках колонии состояли из клеток 3 типов, различающихся своей морфологией. Первый тип был представлен веретеновидными клетками, 2-й — эпителиоподобными, а 3-й тип включал примерно в равной степени эпителиоподобные и веретеновидные клетки.

Мы обратили внимание на тот факт, что клетки 1-го типа по своей форме были похожи на веретеновидные клетки ранее полученных нами субклонов *mel 1br* и *mel 1br 5C* [2, 3], поэтому для дальнейшего изучения под микроскопом были отобраны только

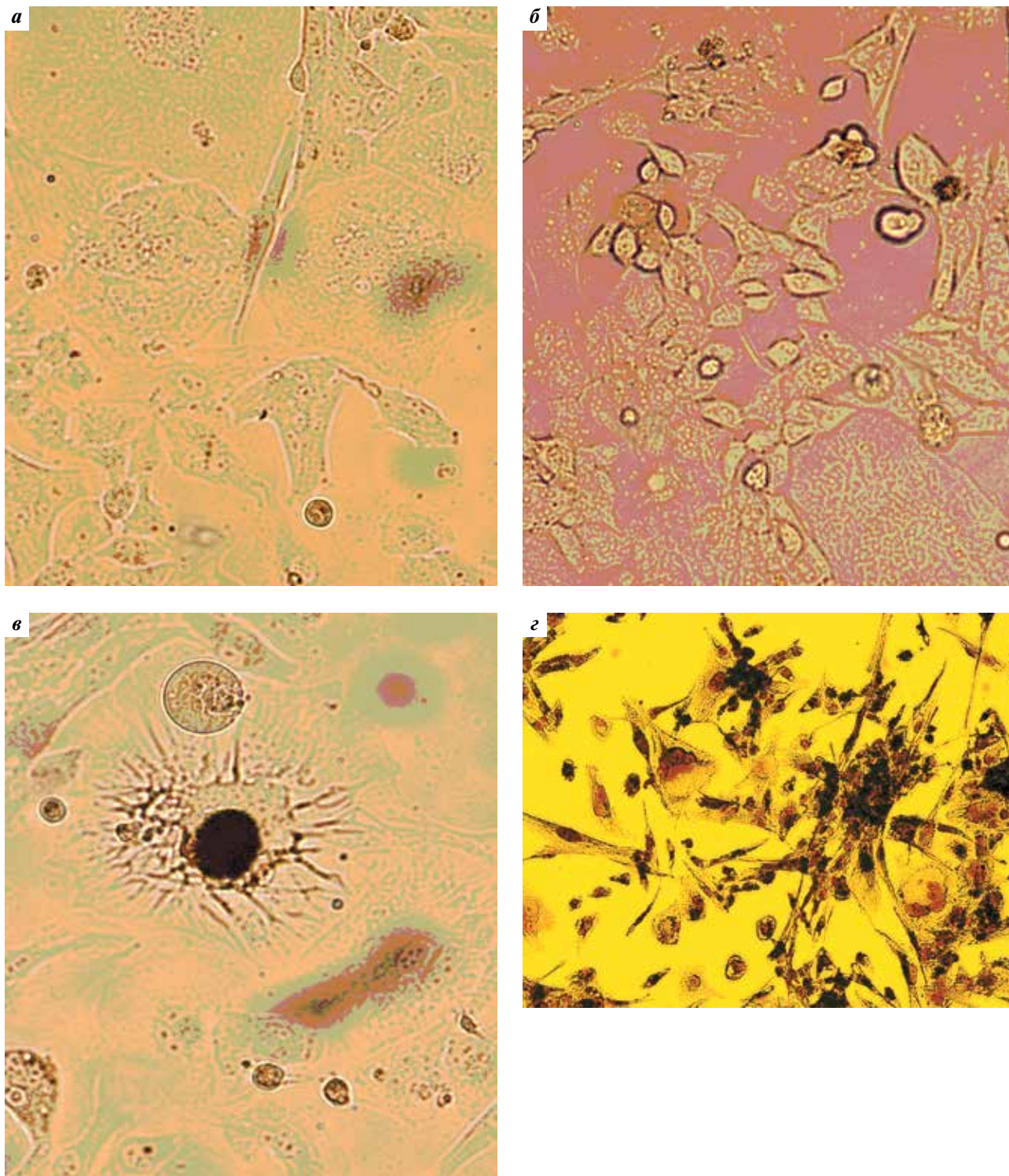


Рис. 1. Культура клеток линии меланомы человека *mel Cher*. $\times 100$: а, б, в — растущая культура *mel Cher*; г — фиксированная и окрашенная культура *mel Cher*

колонии 1-го типа. В течение 30 пассажей клетки не изменили свою морфологию. Полученная субпопуляция клеток была обозначена нами как субклон *mel Cher 5C*. Эти клетки существенно отличались от родительской популяции: они были веретеновидными, с крупным ядром и длинными отростками цитоплазмы, росли плотным монослоем и обладали способностью формировать на его поверхности выпуклые образования в виде сфероидов, сохраняли мономорфность на протяжении длительного пассирования и росли более интенсивно (рис. 2). Период их удвоения при одинаковой плотности посева превышал таковой исходной популяции в 2–3 раза. Таким образом, клетки субклона *mel Cher 5C* обладали характерными для эмбриональных СК свойствами — маленьким размером, большим ядром, высоким потенциалом пролиферации и способностью образовывать сфероиды. По морфологии клетки субклона *mel Cher 5C* практически не отличались от клеток субклона *mel Ibr 5C*.

С целью дальнейшей характеристики полученного субклона *mel Cher 5C* было проведено исследование его иммунологического фенотипа. Клетки субклона отличались от исходных клеток *mel Cher* по экспрессии HLA-DR антигена, тогда как экспрессия остальных антигенов не изменилась (табл. 1). Так, в клетках субклона *mel Cher 5C* почти не осталось HLA-DR-положительных клеток (26-й и 28-й пассажи), но не изменилось число клеток, экспрессирующих антиген HLA-ABC. Возможно, утрата антигенов гистосовместимости II класса у клеток субклона *mel Cher 5C* свидетельствует о дальнейшей прогрессии злокачественных потенций опухоли.

Таблица 1. Иммунологический фенотип клеток линии меланомы человека *mel Cher* и клеток ее субклона *mel Cher 5C*

Антиген	Количество антиген-положительных клеток, %	
	RPMI 1640 + 10 % ЭТС <i>mel Cher</i> , 28-й пассаж	RPMI 1640 + 5 % ЭТС <i>mel Cher 5C</i> , 26-й пассаж
HLA-ABC	97,3 ± 0,5	98,9 ± 0,2
HLA-DR	58,6 ± 0,7	1,0 ± 0,2
CD 54	51,3 ± 0,5	37,9 ± 1,0
CD 24	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,3
CD 44	93,3 ± 0,2	96,4 ± 0,2
CD 133/2	1,9 ± 0,5	2,6 ± 0,2
CD 117	1,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
CD 34	1,5 ± 0,3	1,8 ± 0,1
CD 63	63,9 ± 2,0	99,5 ± 2,0
CD 95	60,3 ± 2,5	55,5 ± 0,2

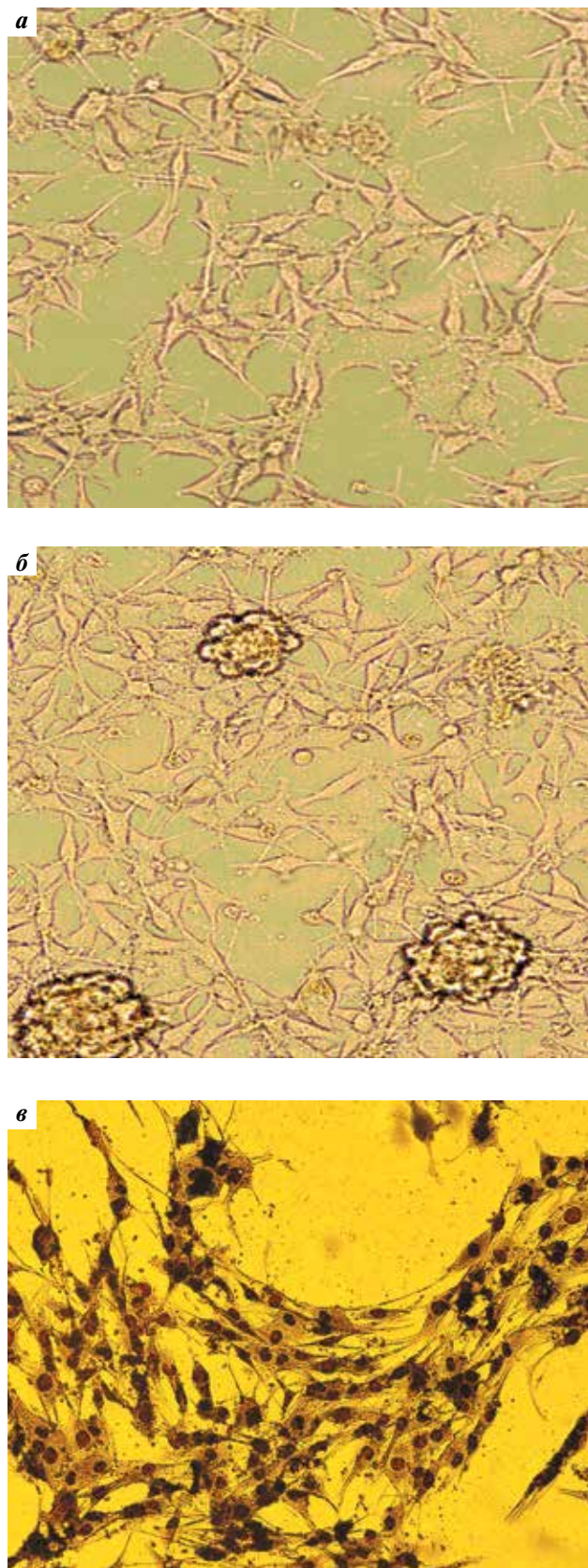


Рис. 2. Культура субклона клеток линии меланомы человека, *mel Cher 5C*, ×100: а, б — растущая культура *mel Cher 5C*; в — фиксированная и окрашенная культура *mel Cher 5C*

Аналогичные данные по этому антигену за исключением маркера CD133 были зафиксированы и у ранее полученных субклонов mel Ibr и mel Ibr 5C [2, 3]. Экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса не обнаружена и при культивировании клеток субклона в течение 6 пассажей в ростовой среде с повышенной до 10 % концентрацией ЭТС (табл. 2). Однако в отличие от ранее полученных субклонов mel Ibr и mel Ibr 5C [2, 3], на поверхности клеток субклона mel Cher 5C не экспрессировались антигены СК CD133. Полагаем, что эти антигены могут появиться при обработке клеток линии mel Cher КЭЭ по аналогии с результатами экспериментов с субклонами mel Ibr и mel Ibr 5C, где подобная обработка приводила к увеличению количества CD133-положительных клеток.

Заключение

На основании полученных данных можно предположить, что в исходной популяции линии mel Cher присутствует небольшое количество клеток с веретеновидной морфологией, не содержащих антигены гистосовместимости II класса (HLA-DR). В результате роста клеток mel Cher в среде со сниженной до 5 % концентрацией ЭТС, отбора колоний клеток веретеновидной формы и их дальнейшего длитель-

Таблица 2. Иммунологический фенотип клеток субклона линии меланомы человека mel Cher 5C при возврате клона в ростовую среду, содержащую 10 % ЭТС

Антиген	Количество антиген-положительных клеток в среднем, %	
	RPMI 1640 + 5 % ЭТС mel Cher 5C, 26 пассажей	RPMI 1640 + 10 % ЭТС mel Cher 5C, 6 пассажей
HLA-ABC	98.9 ± 0,2	98,3 ± 0,4
HLA-DR	0.4 ± 0,5	0,0 ± 0,4
CD-34	1.8 ± 0,2	0,1 ± 0,1
CD-24	0.3 ± 0,2	0,0 ± 0,1
CD-63	99.5 ± 2,1	52,0 ± 2,0
CD-54	37.9 ± 0,4	0,1 ± 0,1

ного культивирования произошла селекция форм с признаками СК. Потомки этих клеток были схожи с опухолевыми СК по своим морфологическим и пролиферативным характеристикам. Дальнейшее изучение полученного субклона mel Cher 5C как модели меланомных клеток с характеристиками СК позволит определить их роль в опухолевой прогрессии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

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. Iwasaki H., Suda T. Cancer stem cells and their niche. Cancer Sci 2009;100(7):1166–1172. DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01177.x. PMID: 19432904.
3. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Самойлов А.В. и др. Изменение

- морфологических и иммунологических характеристик клеток меланомной линии mel Ibr в результате воздействия куриного эмбрионального экстракта. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2015;159(4):521–4.
4. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Бурова О.С. и др. Изменение морфологических, иммунологических и генетических характеристик клеток меланомной линии mel Ibr

- при культивировании в ростовой среде с низкой концентрацией эмбриональной телячьей сыворотки. Российский биотерапевтический журнал 2016;2:19–23.
5. Патент № 2364624 РФ Клеточная линия меланомы человека mel Cher, используемая для получения противоопухолевых вакцин. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. и др.; опубл. 20.08.2009. Бюллетень № 23.