УДК 618.19-006:576.08

ВЫДЕЛЕНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ КОЛЛАГЕНАЗЫ

Филиппова С.Ю., Ситковская А.О., Сагакянц А.Б., Бондаренко Е.С., Ващенко Л.Н., Кечеджиева Э.Э., Дашкова И.Р.

ФГБУ "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: filsv@yandex.ru

В работе дана оценка влияния режима культивирования ткани опухоли молочной железы с коллагеназой из гепатопанкреаса краба на показатели клеточного выхода, жизнеспособности полученных из ткани опухоли клеток и уровень экспрессии гликопротеинов CD24 и CD44, являющихся маркерами опухолевых стволовых клеток рака молочной железы. По данным проведенного исследования, фермент показал высокую эффективность по сравнению с простой механической диссоциацией ткани. Количество выделенных клеток увеличивалось пропорционально росту концентрации коллагеназы в среде, при этом жизнеспособность клеток не менялась и составляла около 50%, что почти на порядок больше, чем при механической диссоциации ткани. Тем не менее применение исследуемой коллагеназы для выделения опухолевых стволовых клеток возможно лишь с большой осторожностью, так как культивирование в растворе коллагеназы в течение 48 часов приводит к существенному уменьшению экспрессии CD24 и CD44, что может привести к снижению полноты и чистоты выделения таргетной популяции методами иммуномагнитного или флуоресцентно активированного клеточного сортинга. По результатам исследования рекомендовано применение комбинированного подхода к диссоциации ткани опухолей молочной железы, включающего сочетание механического измельчения ткани с культивированием в растворе исследуемого фермента, сокращенным до 12 и менее часов.

Ключевые слова: коллагеназа, опухолевые стволовые клетки, рак молочной железы, CD24, CD44, иммуномагнитная сепарация, флуоресцентно активированный сортинг.

BREAST CANCER STEM CELLS ISOLATION WITH APPLICATION OF COLLAGENASE FROM CRAB HEPATOPANCREAS

Filippova S.Yu., Sitkovskaya A.O., Sagakyants A.B., Bondarenko E.S., Vashchenko L.N., Kechedzhieva E.E., Dashkova I.R.

Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, e-mail: filsv@yandex.ru

The paper assesses the influence of the incubation regimen of breast tumor tissue with collagenase from crab hepatopancreas on indicators of cell yield, cell viability, and antigenic activity of CD24 and CD44 glycoproteins, which are markers of cancer stem cells of breast cancer. According to the study, the enzyme showed high efficiency compared with simple mechanical tissue dissociation. The number of cells obtained increased in proportion to the increase in the concentration of collagenase in the medium, while the cell viability did not change and amounted to about 50%, which is almost an order of magnitude greater than with mechanical dissociation of tissue. Nevertheless, the use of the collagenase under study for the isolation of cancer stem cells is possible only with great caution, since 48 hours long incubation regime leads to a significant decrease in the antigenic activity of CD24 and CD44, which can lead to a decrease in the completeness and purity of target population selection by immunomagnetic or fluorescence activated cell sorting. The use of a combined approach to the dissociation of tissue of breast tumors, including a combination of mechanical grinding of the tissue with a 12 hours or shorter incubation time with the studied enzyme, is recommended.

Keywords: collagenase, cancer stem cells, breast cancer, CD24, CD44, immunomagnetic separation, fluorescence-activated cell sorting.

В настоящее время большим признанием пользуется концепция иерархического строения ткани опухолей. Данная концепция гласит, что лишь небольшая субпопуляция медленно пролиферирующих клеток, - так называемые опухолевые стволовые клетки (ОСК), - обладающих способностью к самовозобновлению и дифференцировке в другие типы

клеток, дает начало основной массе быстро пролиферирующих клеток опухоли и лежит в основе устойчивости опухоли к химио- и лучевой терапии [1]. Именно на исследование биологии опухолевых стволовых клеток возлагаются большие надежды в связи с поиском новых высокоэффективных средств борьбы против рака [2].

Опухолевые стволовые клетки впервые были описаны в 90-е годы XX века при исследовании лейкемии [3]. В последующее десятилетие ОСК были выделены также и из солидных опухолей, в том числе и из ткани рака молочной железы [4; 5]. На настоящий момент накоплен обширный объем знаний об особенностях метаболизма, взаимодействия с микроокружением и внеклеточным матриксом опухоли и других характерных чертах ОСК [1]. Тем не менее существует ряд препятствий, ограничивающих экспериментальную работу с ОСК. Основными проблемами по-прежнему остаются полнота и чистота выделения из ткани опухоли пациентов фракции клеток, обладающих стволовыми свойствами. Во-первых, в процессе дезагрегации ткани необходимо в достаточной мере произвести разрушение всех микрокомпартментов опухоли, в которых могут находиться ОСК: околососудистые ниши, участки десмопластической трансформации ткани опухоли, очаги воспалительной реакции и др. Так как механическая дезагрегация может привести к неполному высвобождению клеток из областей с повышенной плотностью внеклеточного матрикса, то ферментативное разрушение ткани является более предпочтительным. К тому же применение протеаз, расщепляющих белки внеклеточного матрикса, как правило, является более мягким воздействием и позволяет получить более высокий выход жизнеспособных клеток по сравнению с механическим измельчением ткани. Однако использование протеолитических ферментов может привести к разрушению внеклеточных эпитопов мембранных белков-маркеров стволовости, что, в свою очередь, снизит эффективность очистки искомой клеточной фракции методами иммуномагнитного или флуоресцентно активированного клеточного сортинга. Сохранность поверхностных эпитопов при ферментативной дезагрегации ткани зависит от специфичности используемых протеаз, их чистоты и режима инкубации. Таким образом, при разработке эксперимента с первичными культурами ОСК следует провести предварительные исследования по подбору оптимальных условий ферментативной диссоциации ткани опухоли для достижения оптимальных показателей чистоты и полноты выделения исследуемой фракции клеток из материала пациентов при сохранении их высокой жизнеспособности. На настоящий момент наиболее охарактеризованной клеточной субпопуляцией, обладающей свойствами ОСК в раке молочной железы, является фракция клеток, несущая фенотип $CD24^{low/-}CD44^{+}$ [6; 7], именно на ней мы и остановимся в своем исследовании.

Цель исследования: усовершенствовать протокол выделения ОСК из ткани рака

молочной железы путем подбора оптимального режима культивирования ткани в растворе коллагеназы.

Материал и методы исследования. Материалом для исследования послужил образец ткани рака молочной железы, полученный во время радикальной операции по удалению опухоли. Работа была одобрена этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, протокол № 33/1 от 29.11.2018 г. Донор подписал информированное согласие. Ткань опухоли помещали в стерильный раствор Хэнкса («Биолот», Россия) в операционной непосредственно после иссечения и обрабатывали в течение 2 часов. В первый день производили измельчение ткани опухоли на фрагменты до 1 мм в диаметре при помощи стерильных хирургических лезвий, предварительно из образца удаляли участки некроза и здоровой ткани. Полученные фрагменты ткани опухоли равномерно распределяли на 4 чашки Петри диаметром 6 см и помещали в среду DMEM (Gibco, США) в следующих вариантах: без коллагеназы и с добавлением коллагеназы, полученной из гепатопанкреаса краба («Биолот», Россия, арт. 1.4.8.1), до конечной концентрации 150, 300 и 450 ед./мл.

Далее образцы культивировали 48 часов при 37 °C и 5,5% CO_2. Визуализацию и фотофиксацию образцов осуществляли через 24 и 48 часов. На вторые сутки производили выделение клеток из образцов опухоли с добавлением коллагеназы в соответствии со следующим протоколом.

1. К образцу добавляли 5 мл DMEM и производили энергичное пропускание размягченных фрагментов ткани через 10-мл наконечник (10 раз) и далее через 5-мл наконечник (10 раз).
2. Полученную суспензию, включая неразложившиеся остатки ткани опухоли, пропускали через нейлоновые фильтры с диаметром ячейки 70 мкм.
3. Трижды производили отмывку полученной клеточной суспензии в 5-кратном объеме буфера для сепарации клеток (MACS separation buffer, Miltenyi Biotech, Германия).
4. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева с 0,1% раствором трипанового синего под микроскопом инвертированным биологическим Leica DM IL LED.

Образец сравнения, который культивировали в отсутствие коллагеназы, измельчали в Medimachine (BD, США), и далее, начиная с п. 2, протокол выделения клеток не отличался от такового для образцов с коллагеназой.

Оценку влияния процесса ферментативной дезагрегации ткани на сохранность иммунофенотипа ОСК рака молочной железы ($CD24^{low/-}CD44^{+}$) производили на проточном цитометре BD FacsCanto II (BD, США) с антителами PE Mouse Anti-Human CD24 (клон ML5; BD, США) и FITC Mouse Anti-Human CD44 (клон G44-26; BD, США).

Результаты исследования и их обсуждение. По мере увеличения срока культивирования отмечалось постепенное размягчение образцов ткани опухоли молочной

железы, находившихся в среде с добавлением коллагеназы, при этом увеличивалось количество переходящих в среду клеток, росла вязкость раствора и уменьшалась его прозрачность. На фотографиях образцов видно, что увеличение концентрации коллагеназы ведет к резкому росту количества перешедших в раствор клеток (рис. 1).

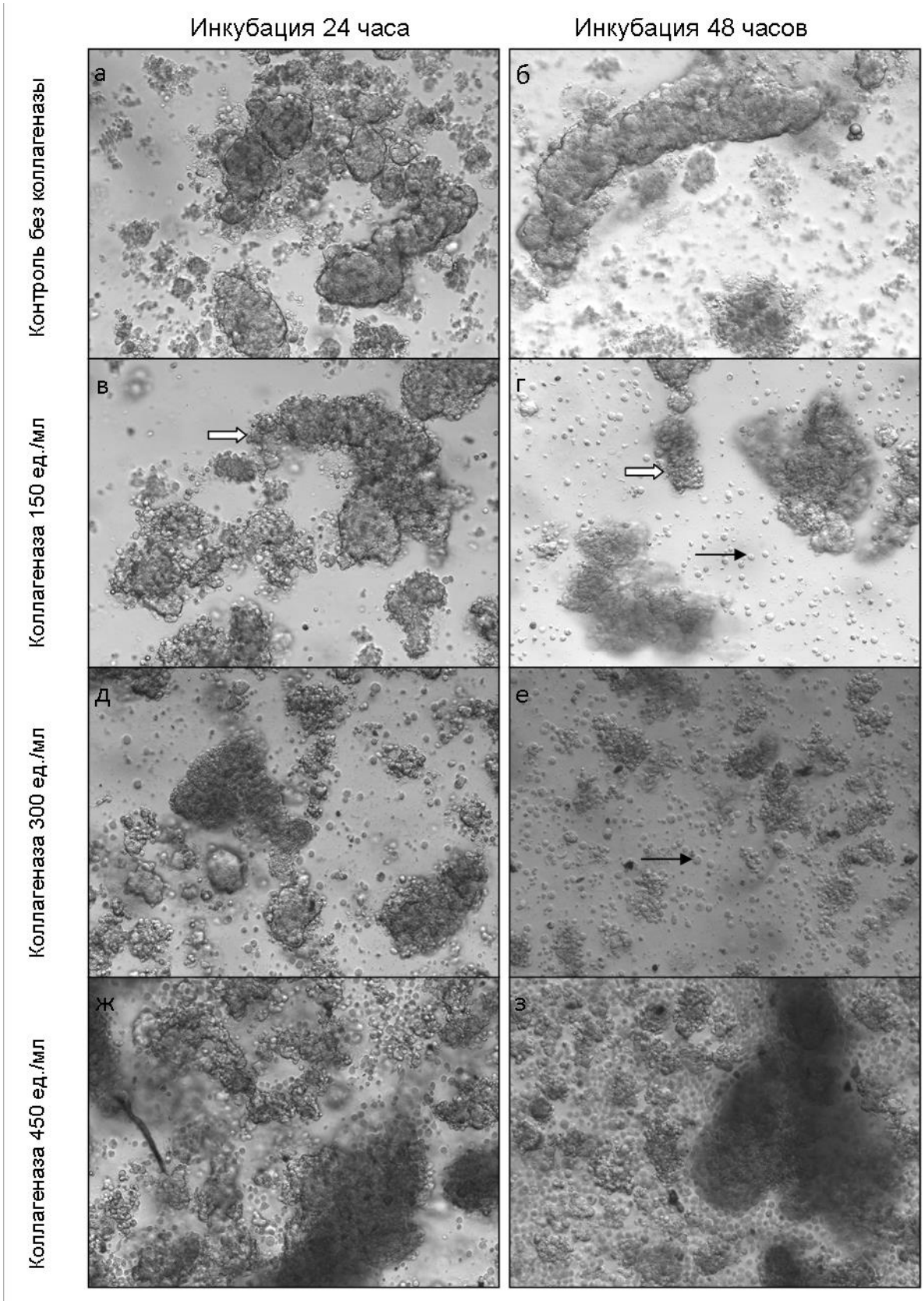

Рис. 1. Вид фрагментов ткани опухоли молочной железы в контроле и после инкубации с

раствором коллагеназы в среде DMEM в трех концентрациях: а – контроль без коллагеназы, культивирование 24 часа; б – контроль без коллагеназы, культивирование 48 часов; в – концентрация коллагеназы 150 ед./мл, культивирование 24 часа; г - концентрация коллагеназы 150 ед./мл, культивирование 48 часов; д – концентрация коллагеназы 300 ед./мл, инкубация 24 часа; е - концентрация коллагеназы 300 ед./мл, культивирование 48 часов; ж – концентрация коллагеназы 450 ед./мл, культивирование 24 часа; з - концентрация коллагеназы 450 ед./мл, культивирование 48 часов. Чёрными стрелками обозначены единичные клетки, белыми стрелками обозначены фрагменты ткани. Увеличение х100

Тем не менее полного разложения волокон коллагена на вторые сутки все же не произошло, и большая часть материала не поддалась дезагрегации даже при высоких концентрациях коллагеназы.

Подсчет клеток в камере Горяева показал, что общее количество выделенных клеток увеличивается с ростом концентрации коллагеназы почти экспоненциально. При этом по данным теста с трипановым синим жизнеспособность клеток с ростом концентрации коллагеназы существенно не меняется и составляет в среднем примерно 50%, что на порядок выше по сравнению с механической диссоциацией (4%) (табл.).

Результаты подсчета клеток в камере Горяева с применением 0,1% раствора трипанового синего через 48 часов культивирования с коллагеназой и без нее

Концентрация фермента	Количество живых клеток, $x10^6$	Общее количество клеток, $x10^6$	Доля живых клеток, %
Без коллагеназы (механическая диссоциация)	0.34	8.51	4
Коллагеназа 150 ед./мл	1.83	3.2	57
Коллагеназа 300 ед./мл	2.83	6.06	47
Коллагеназа 450 ед./мл	5.95	11.35	53

Увеличение количества выделяемых живых клеток тем не менее сопровождалось существенным уменьшением экспрессии маркеров ОСК рака молочной железы - трансмембранных гликопротеинов CD44 и CD24. По данным проточной цитометрии, спустя 48 часов после культивирования образцов ткани в растворе коллагеназы количество клеток, экспрессирующих CD44, уменьшается пропорционально концентрации фермента и в сравнении с контролем составляет от 3- до 10-кратного уменьшения в образцах с

концентрацией коллагеназы 150 и 450 ед./мл соответственно (рис. 2а).

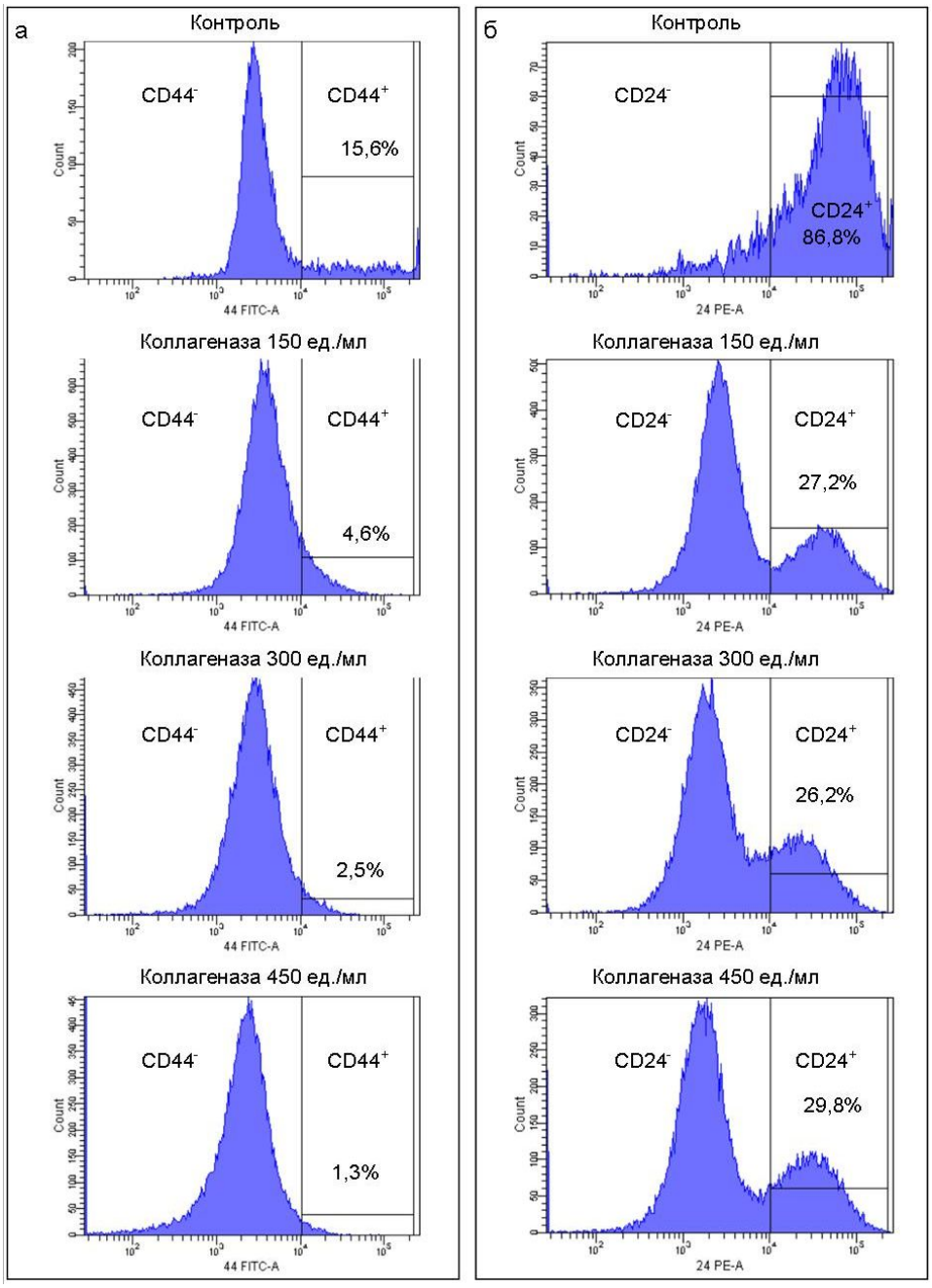

Рис. 2. Доля клеток опухоли, экспрессирующих поверхностные белки-маркеры ОСК после инкубации в течение 48 часов в растворах коллагеназы в сравнении с контролем. Данные приведены для клеточной субпопуляции отрицательной по CD45 (общий лейкоцитарный антиген): а – данные проточной цитометрии для CD44; б – данные проточной цитометрии для CD24

Полученные данные говорят о том, что длительное культивирование с исследуемой коллагеназой оказывает негативное влияние на полноту выделения из ткани рака молочной железы клеток, обладающих фенотипом $CD44^+$. Учитывая, что уровень экспрессии этого

маркера в ткани опухоли изначально довольно низкий, таргетная популяция клеток может быть полностью потеряна при слишком жестких режимах ферментативной диссоциации. Кроме того, в исследуемых образцах наблюдается угнетение экспрессии CD24 по сравнению с контролем, что неизбежно приведет к снижению чистоты выделения субпопуляции с фенотипом $CD24^{low/-}CD44^{+}$. На гистограмме видно, что после культивирования с коллагеназой единый пик в области положительной экспрессии данного маркера разбивается на два и появляется выраженный пик, соответствующий отрицательной по данному маркеру популяции клеток (рис. 2б). Таким образом, длительная обработка ткани исследуемой коллагеназой может привести к контаминации выделенной отрицательной по CD24 фракции клетками, в действительности несущими фенотип $CD24^{+}$.

Заключение. По результатам проведенного исследования можно сделать ряд выводов. Во-первых, культивирование ткани в растворе коллагеназы из гепатопанкреаса краба («Биолот», Россия) является более эффективным методом получения жизнеспособных клеток из ткани рака молочной железы по сравнению с простой механической диссоциацией и может быть применено для решения широкого круга исследовательских задач, где требуется получение большого количества клеток из послеоперационного материала. Во-вторых, так как жизнеспособность получаемых клеток остается постоянной при различных режимах обработки коллагеназой в диапазоне концентрации от 150 до 450 ед./мл и при культивировании от 24 до 48 часов, то итоговый протокол может быть модифицирован в широких пределах для получения наилучшего результата с учетом плотности ткани опухоли и возможности для обработки материала в лаборатории. В-третьих, как оказалось, применение исследуемой коллагеназы при длительной инкубации приводит к изменению иммунофенотипа ОСК рака молочной железы, что может отразиться на чистоте и полноте выделения субпопуляции $CD24^{low/-}CD44^{+}$ методами иммуномагнитного или флуоресцентно активированного клеточного сортинга, и, как следствие, результаты последующих экспериментов с выделенными клетками опухоли могут быть скомпрометированы. Также мы предполагаем, что подобный тип ферментативной обработки с использованными нами реагентами и концентрациями, скорее всего, будет провоцировать слущивание и других поверхностных антигенов независимо от типа ткани. В качестве решения проблемы повышения клеточного выхода при сохранении поверхностных маркеров ОСК мы предлагаем применять укороченное культивирование ткани (до 12 часов) в растворе исследуемой коллагеназы в сочетании с низкоинтенсивной механической обработкой.

Список литературы

1. Colak S., Medema J.P. Cancer stem cells--important players in tumor therapy resistance. FEBS J. 2014. V.281. no. 21. P. 4779-4791. DOI: 10.1111/febs.13023.
2. Златник Е.Ю., Кит О.И., Новикова И.А., Ульянова Е.П., Сагакянц А.Б., Теплякова М.А., Егоров Г.Ю., Чупанов Г.М., Черникова Е.Н. Возможная роль стволовых опухолевых клеток в процессах метастазирования колоректального рака // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 6. URL: http://science-education.ru/ru/article/view?id=28217 (дата обращения: 10.11.2019).
3. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M.A., Dick J.E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature. 1994. V.367. no. 6464. P. 645-648.
4. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2003. V.100. no. 7. p. 3983-3988.
5. De Angelis M.L., Francescangeli F., Zeuner A. Breast Cancer Stem Cells as Drivers of Tumor Chemoresistance, Dormancy and Relapse: New Challenges and Therapeutic Opportunities. Cancers (Basel). 2019. V.11. no. 10. pii: E1569.
6. DA Cruz Paula A., Lopes C. Implications of Different Cancer Stem Cell Phenotypes in Breast Cancer. Anticancer Res. 2017. V.37 no. 5. P. 2173-2183.
7. Camerlingo R., Ferraro G.A., De Francesco F., Romano M., Nicoletti G., Di Bonito M., Rinaldo M., D'Andrea F., Pirozzi G. The role of CD44+/CD24-/low biomarker for screening, diagnosis and monitoring of breast cancer. Oncol. Rep. 2014. V.31. no. 3. P. 1127-1132.