

ОПЫТ СОЗДАНИЯ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ *IN VITRO*

Межевова И.В.¹, Шамова Т.В.¹, Ситковская А.О.¹, Шевченко А.Н.¹, Швырев Д.А.¹, Филатова Е.В.¹, Хомутенко И.А.¹, Хван В.К.¹, Лаптева Т.О.¹

¹-ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: grankina.anastasia@mail.ru

В настоящее время существует необходимость в получении первичных клеточных линий рака предстательной железы (РПЖ), так как имеющиеся immortalized клеточные линии не отражают в полной степени фенотип опухолей предстательной железы. В данной работе представлен опыт создания первичной культуры РПЖ из опухолевого материала после простатэктомии. Рассмотрены методы получения первичной культуры рака предстательной железы после механической диссоциации и методом без дезагрегирования опухолевого материала – культивирование эксплантатов (фрагментов опухоли размером около 1 мм³). Применение метода механической диссоциации в данном исследовании оказалось нецелесообразным, жизнеспособных клеток РПЖ после дезагрегации образцов опухоли не было обнаружено. Культивирование эксплантатов РПЖ проводилось несколько недель до достижения конфлюэнтного монослоя и первого пассажа клеток. Первичная культура РПЖ являлась гетерогенной, помимо клеток с опухолевой морфологией, из эксплантатов высыпались клетки соединительной ткани – фибробласты, образуя фидерный слой. На втором пассаже у большинства образцов наблюдалась дегенерация клеток (вакуолизация цитоплазмы, изменение морфологии) после удаления фибробластов. В итоге выход первичных культур, полученных методом эксплантатов, составил 20%. Требуется дальнейший подбор оптимальной методики диссоциации опухолевого материала для получения первичных клеточных культур РПЖ.

Ключевые слова: первичные клеточные линии рака предстательной железы, клеточные линии, механическая дезагрегация, эксплантаты, первичные культуры.

EXPERIENCE IN CREATING A PRIMARY CULTURE OF PROSTATE CANCER *IN VITRO*

Mezhevova I.V.¹, Shamova T.V.¹, Sitkovskaya A.O.¹, Shevchenko A.N.¹, Shvyrev D.A.¹, Filatova E.V.¹, Homutenko I.A.¹, Khvan V.K.¹, Lapteva T.O.¹

¹-National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, e-mail: grankina.anastasia@mail.ru

Nowadays, there is a need to obtain primary prostate cancer (PC) cell lines, since the existing immortalized cell lines do not fully reflect the phenotype of prostate tumors. This paper presents the experience of creating a primary culture of prostate cancer from tumor material after prostatectomy. Following methods for obtaining a primary culture of prostate cancer are considered: a method using mechanical dissociation and cultivating of explants (tumor fragments about 1mm³). Application of the method of mechanical dissociation turned out to be inappropriate, viable cells of prostate cancer after disaggregation of tumor samples were not found. The PCa explants were cultured for several weeks until the confluent monolayer was reached and the first cell passage was needed. The primary culture of prostate cancer was heterogeneous, in addition to cells with tumor morphology, there were fibroblasts, forming a feeder layer. At the second passage, most of the samples showed cell degeneration (vacuolization of the cytoplasm, changes in morphology) after removal of fibroblasts. As a result, the outcome of primary cultures obtained by the explant method was 20%. Further choice of the optimal technique for the dissociation of tumor material is required to obtain primary cell cultures of prostate cancer.

Keywords: primary prostate cancer cell lines, cell lines, mechanical disaggregation, explants, primary cultures.

В настоящее время рак предстательной железы (РПЖ) является часто регистрируемой онкопатологией и занимает второе место в структуре онкологических заболеваний в России среди мужского населения, уступая лишь злокачественным новообразованиям в легких. Основную группу страдающих от рака предстательной железы составляют мужчины старше 60 лет [1]. В последние два десятилетия введены программы скрининга рака предстательной

железы путем определения концентрации простат-специфического антигена, являющегося предиктором заболевания [2]. Введение скрининга привело к увеличению выявления РПЖ на ранних стадиях заболевания. Такие пациенты получают лучевую терапию или подвергаются хирургическому вмешательству. У пациентов с генерализованным РПЖ применяют андроген-депривационную терапию, включающую хирургическую или медицинскую кастрацию. Однако у большинства больных развивается РПЖ, резистентный к кастрации и к дальнейшей терапии [3]. Следовательно, существует острая необходимость в разработке новых и более эффективных вариантов терапии данного заболевания.

Одной из основных проблем в исследованиях РПЖ является отсутствие подходящих моделей *in vitro* и *in vivo*. В исследованиях *in vitro* важно использовать модели клеточных культур, отражающие типичные характеристики опухолевых клеток предстательной железы, такие как чувствительность к андрогенам и достаточная экспрессия андрогенового рецептора, которые часто теряются при культивировании иммортализованных клеточных линий [4].

Исторически культуры клеток предстательной железы человека *in vitro* были ограничены в доступности и объеме по сравнению с культурами других органов. В работах *in vitro* наиболее часто используемыми моделями РПЖ являются три иммортализованные клеточные линии: PC-3, DU145 и LNCaP [5]. В настоящее время доступны и другие клеточные линии РПЖ, однако было показано, что большинство из них являются производными трех вышеупомянутых линий [6]. Существующие клеточные культуры не охватывают весь спектр фенотипов РПЖ и, в частности, не являются репрезентативными для первичных аденокарцином предстательной железы [7]. Кроме того, большое внимание уделяют опухолевому микроокружению, оказывающему влияние на развитие метастазов, рост, выживание и инвазию клеток опухоли [8], что еще раз подчеркивает необходимость создания первичных клеточных линий РПЖ, имитирующих типичные характеристики роста РПЖ, позволяющих изучать взаимодействия между эпителием и стромой *in vitro* [9].

Создание первичных клеточных линий часто осложняется отсутствием жизнеспособных клеток после резекции материала. От выбора методики диссоциации опухолевого материала будет зависеть получение достаточного количества жизнеспособных клеток для введения их в первичную культуру. Для получения первичных клеточных культур исследователи применяют различные методы дезагрегации и диссоциации опухолевых тканей. Наиболее простым и распространенным является метод механической дезагрегации опухолевой ткани, в котором опухолевые фрагменты измельчают при помощи ножей для гомогенизации тканей или любых других острых инструментов. Помимо этого, применяют метод эксплантатов, не требующий дезагрегации опухолевого материала [10]. В настоящее время в нашей

лаборатории ведутся поиск и подбор оптимального метода получения первичных культур злокачественных клеток предстательной железы.

Цель исследования: создание первичной культуры рака предстательной железы при помощи метода механической дезагрегации опухолевого материала BD-medimachine (Becton Dickinson, США) и метода эксплантатов.

Материалы и методы исследования. Образцы опухолевого материала были получены от 10 больных с II–IV стадией рака предстательной железы с гистологической верификацией – аденокарцинома предстательной железы. Оценка опухоли по индексу Глисона: 9 (n=1), 8 (n=2), 7 (n=2), 6 (n=5) (таблица).

Характеристика образцов опухоли предстательной железы

№ п/п	Гистологическая верификация	Возраст	Степень дифференцировки	TNM	Стадия	Индекс Глисона
1	Низкодифференцированная ацинарная аденокарцинома	60	G3	T3aN0M0	III	8
2	Умеренно дифференцированная ацинарная аденокарцинома	65	G2	T2N0M0	II	7
3	Умеренно дифференцированная ацинарная аденокарцинома	73	G2	T2N0M0	II	7
4	Высокодифференцированная мелкоацинарная аденокарцинома	59	G1	T2aN0M0	II	6
5	Высокодифференцированная ацинарная аденокарцинома	56	G1	T2N0M0	II	6
6	Низкодифференцированная ацинарная с криброзными структурами аденокарцинома	65	G3	T3bN1M0	IV	9
7	Высокодифференцированная ацинарная аденокарцинома	67	G1	T2N0M0	II	6
8	Низкодифференцированная ацинарная аденокарцинома	63	G3	T3aN0M0	III	8
9	Умеренно дифференцированная ацинарная аденокарцинома	71	G2	T2N0M0	II	6
10	Высокодифференцирован	64	G1	T2N0M0	II	6

	ная ацинарная аденокарцинома					
--	---------------------------------	--	--	--	--	--

Больные не проходили противоопухолевого лечения и перенесли простатэктомия в урологическом отделении ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России в 2020 г. Гистологическая верификация проводилась в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ. Пациенты подписывали информированное согласие на сбор биологического материала. Работа была одобрена локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (протокол № 6/1 от 10 февраля 2020 г.).

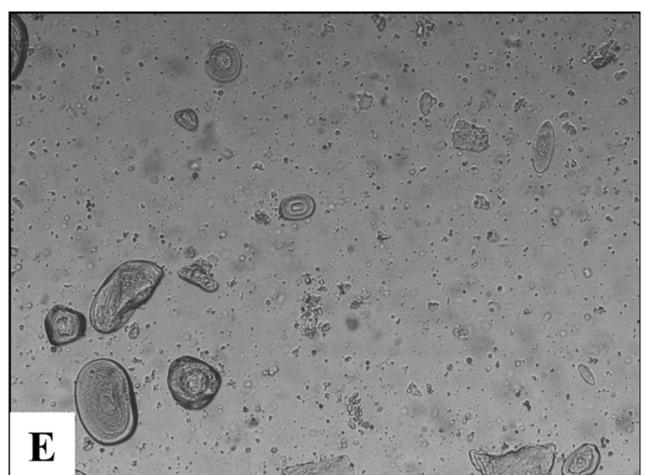
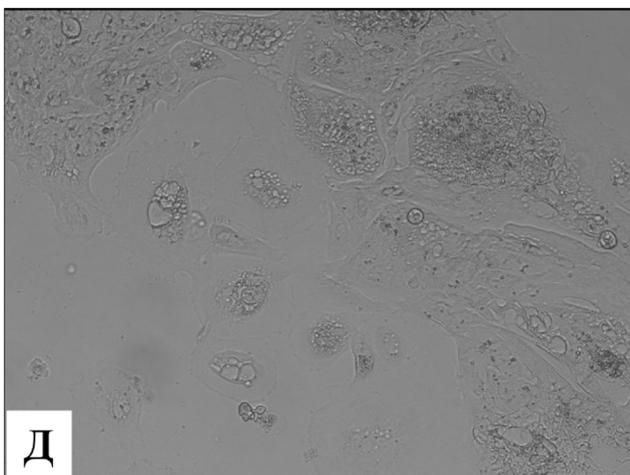
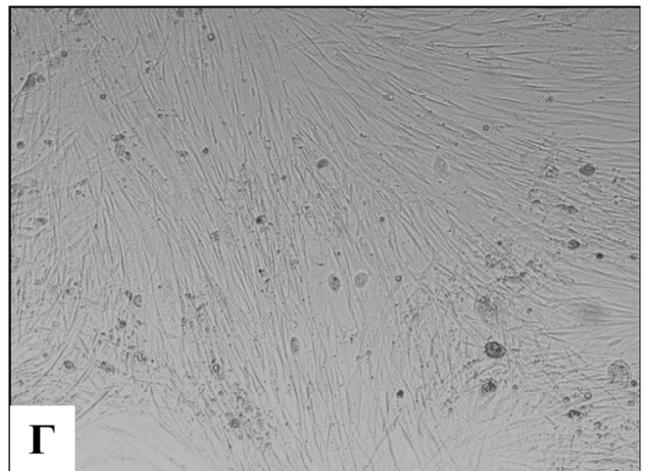
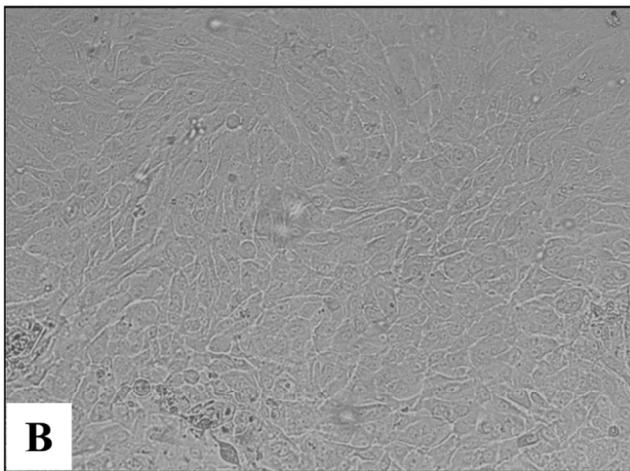
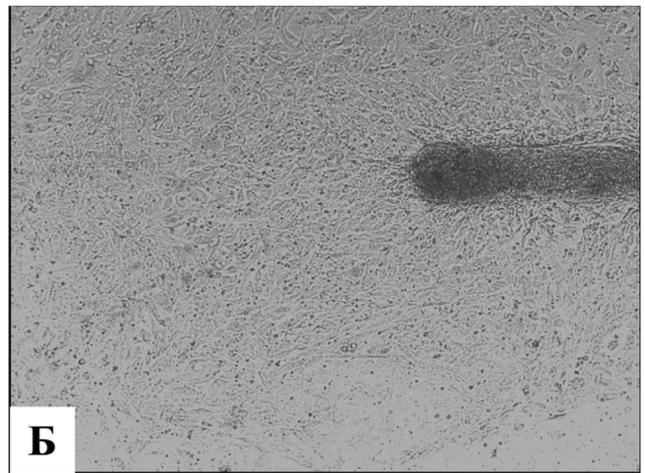
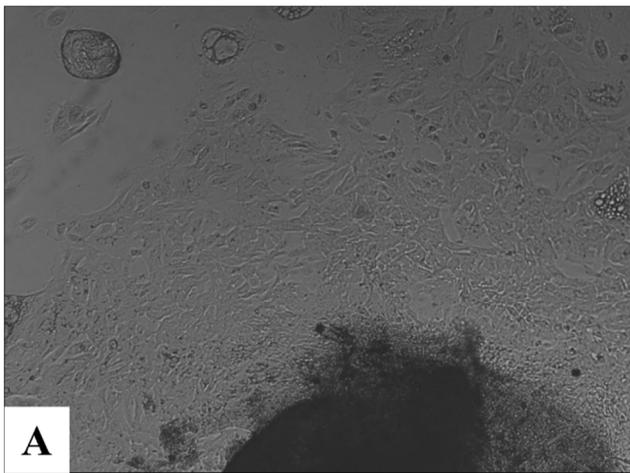
Резецированный опухолевый материал ткани предстательной железы без некроза в размере 1 см² помещали в холодный (+4...+8°C) раствор Хенкса (HBSS, Gibco, США) с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина («Биолот», Россия). Образцы доставляли в лабораторию клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России в течение 10 мин. Полученные фрагменты опухоли дважды промывали фосфатным буфером Дальбекко без ионов кальция и магния («Биолот», Россия), содержащим 1% раствора антибиотиков пенициллин-стрептомицина («Биолот», Россия). Опухолевый материал переносили в питательную среду DMEM (Gibco, США) в стерильную чашку Петри с диаметром 35 мм (Eppendorf, Германия). Образцы разделяли стерильными скальпелями на две равные части. Одну из частей образца подвергали дезагрегированию по следующему протоколу: вносили опухолевый материал в ножи Medicon с диаметром пор 50 мкм (Becton Dickinson, США) для BD-medimachine (Becton Dickinson, США), добавляли 1 мл питательной среды DMEM (Gibco, США). Гомогенизировали образец в течение 1 мин в BD-medimachine (Becton Dickinson, США). Полученную клеточную суспензию пропускали через стерильный нейлоновый фильтр с диаметром пор 70 мкм (Becton Dickinson, США). Подсчет клеток и определение их жизнеспособности проводили в камере Горяева с трипановым синим 0,4% («Биолот», Россия).

Вторую часть образца использовали для создания эксплантатов по следующему протоколу: опухолевую ткань нарезали стерильным скальпелем на мелкие фрагменты размером около 1 мм³. Измельченные фрагменты отбирали стерильной серологической пипеткой в центрифужную пробирку объемом 50 мл (Biofil, Китай), дважды аккуратно промывали фосфатным буфером Дальбекко без ионов кальция и магния («Биолот», Россия). Несколько фрагментов опухолевого образца вносили в 1 мл питательной среды с высоким содержанием фетальной бычьей сыворотки (20%) (Hyclone, США), 10 нг/мл фактор роста фибробластов FGF (Россия), 5 мкг/мл инсулина («Белмедпрепараты», Россия) и 50 мкг/мл гентамицина («Биолот», Россия) во флаконы с площадью культуральной поверхности 25 см² (Thermo Fisher Scientific NUNCtm EasYFlasktm, Дания). Флаконы с эксплантатами помещали в

СО₂-инкубатор и культивировали сутки в малом объеме питательной среды при 37 °С, 5% СО₂. Далее объем питательной среды увеличивали до 5 мл, внося во флакон ежедневно по 1 мл полной питательной среды, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, США), 1% пенициллина-стрептомицина («Биолот», Россия), 10 нг/мл фактор роста фибробластов FGF (Science Store, Россия), 5 мкг/мл инсулина («Белмедпрепараты», Россия), 50 мкг/мл гентамицина («Биолот», Россия). Замену питательной среды проводили 1 раз в 7 дней. Через 14 дней культивирования убирали эксплантаты. После образования монослоя замену питательной среды проводили регулярно.

Результаты исследования и их обсуждение. Эксплантаты всех образцов были культивированы в малом объеме среды с большим содержанием сыворотки, что предположительно поддерживало опухолевые клетки факторами роста и питательными веществами и стимулировало их миграцию из фрагмента опухоли. В результате увеличенного содержания сыворотки и малого объема питательной среды происходила более эффективная адгезия эксплантатов, однако подобные условия приводили к усиленному росту фибробластов.

На 2-е сутки после внесения фрагментов опухолевых образцов на поверхности культуральных флаконов наблюдали прикрепление эксплантатов. Миграцию клеток из эксплантатов наблюдали на 7–10-е сутки культивирования. Выход опухолевых клеток из эксплантатов РПЖ происходил радиально по всему периметру опухолевой ткани (рис. а, б). В зависимости от скорости роста на нулевом пассаже (до первого пересева клеток) клетки культивировали в инкубаторе до 4 недель. Первичные культуры РПЖ после удаления эксплантатов были субкультивированы в течение двух пассажей, без отличительных признаков неспецифической дегенерации. Появление распластанных клеток, плотно расположенных друг к другу, является характерной морфологической особенностью первичных культур *in vitro*. В ряде образцов первичных культур РПЖ наблюдали клетки эпителиоподобные, беспорядочно ориентированные и активно распластанные. На некоторых участках просматривалась параллельная ориентация клеток. Первичные клеточные линии культивировали до достижения конфлюэнтного монослоя (рис. в).



Создание первичных клеточных линий РПЖ. а, б – радиальная миграция клеток из опухолевого эксплантата, увеличение $\times 50$; в – монослой клеток первичной клеточной линии опухоли, увеличение $\times 100$; г – контаминация фибробластами, увеличение $\times 50$; д – вакуолизация цитоплазмы опухолевых клеток, увеличение $\times 50$; е – амилоидные тельца, увеличение $\times 100$

Первичные культуры РПЖ являются гетерогенными и содержат несколько типов клеток. При культивировании образцов из эксплантатов «высыпались» не только опухолевые

клетки, но и фибробласты. Клетки фибробластов при культивировании, достигая стадии конфлюэнтности, образовывали параллельные лучи, перекрывающие друг друга. В большинстве образцов на поверхности фибробластов, образующих фидерный слой, визуализировали клетки эпителиоподобной морфологии, предположительно опухолевые, в которых отсутствовала пролиферация (рис. д). Так, в восьми образцах на втором пассаже после механического удаления слоя фибробластов (скрепером) наблюдали снижение пролиферативной активности клеток и изменение клеточной морфологии. Визуально отмечали прекращение митотической активности, отсутствие изменений рН питательной среды. Появление вакуолизации и грануляции в клетках опухоли, а также снижение клеточной плотности на поверхности культурального флакона свидетельствовали о начинающейся дегенерации первичных линий РПЖ (рис. г).

После механической дезагрегации нативного материала в BD-medium во всех 10 образцах отсутствовали жизнеспособные клетки. Мы предполагаем, что это связано с сильным механическим воздействием на клетки либо с самой плотностью исходной ткани. В данных образцах наблюдали только плотные слоистые структуры неправильной овальной формы, напоминающие амилоидные тельца (рис. е).

Большинство полученных первичных культур РПЖ дегенерировало в течение нескольких недель после проведения второго пассажа. В настоящее время продолжается культивирование двух первичных линий РПЖ из десяти, в которых наблюдается активный митоз.

Заключение. В ходе нашего исследования удалось установить, что применение метода эксплантатов является более эффективным для получения первичных культур РПЖ. Выбор метода эксплантатов для введения опухолевых образцов в первичную культуру позволяет получить гетерогенную первичную культуру с присутствием клеток соединительной ткани – фибробластов, выступающих в роли фидерного слоя. Удаление фидерного слоя фибробластов может привести к дегенерации клеточных линий.

Применение метода механической дезагрегации опухолевого материала РПЖ оказалось нецелесообразным для получения первичной культуры, так как была потеряна вся популяция жизнеспособных клеток. Механическая дезагрегация опухолевого материала в нашем исследовании показала свою неэффективность. Вероятно, следует выбирать другие способы более щадящего механического воздействия (фильтрацию образцов через фильтры со стальными порами, ресуспендирование через серологическую пипетку) на опухолевые образцы РПЖ либо применять более мягкие ферментативные способы диссоциации опухолевого материала.

Таким образом, наше исследование показало, что для создания первичных клеточных

линий РПЖ возможно применение простого метода эксплантатов, однако процент выхода первичных клеточных линий из опухолевого образца размером 1 см² при данном способе составляет 20%.

Список литературы

1. Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 250 с.
2. Zhang S.J., Sun Z.Y., Zhonghua N. K. X. Correlation of prostate-specific antigen with the progression and metastasis of human prostate cancer. Review. Chinese. 2018. vol. 24 no. 5 P. 457-461.
3. Merseburger A.S., Bellmunt J., Jenkins C., Parker C., Fitzpatrick J.M. Perspectives on treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Oncologist*. 2013. vol. 18 P. 558–567. DOI: 10.1634/theoncologist.2012-0478.
4. Culig Z., Santer F.R. Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Review*. 2014. vol. 33 no. 2–3. P. 413–427. DOI: 10.1007/s10555-013-9474-0.
5. Timofeeva O.A., Palechor-Ceron N., Li G. Et al. Conditionally reprogrammed normal and primary tumor prostate epithelial cells: a novel patient-derived cell model for studies of human prostate cancer. *Oncotarget*. 2017. vol. 8 no.14. P. 22741-22758. DOI: 10.18632/oncotarget.13937.
6. Namekawa T., Ikeda K., Horie-Inoue K., Inoue S. Application of prostate cancer models for preclinical study: advantages and limitations of cell lines, patient-derived xenografts, and three-dimensional culture of patient-derived cells. *Cells*. 2019. vol. 8 no. 74. DOI:10.3390/cells8010074.
7. Peehl D. M. Primary cell cultures as models of prostate cancer development in Endocrine-Related Cancer. Society for Endocrinology. 2005. vol.12. no.1 P. 19–47. DOI: 10.1677/erc.1.00795.
8. Ellem S.J., De-Juan-Pardo E.M., Risbridger G.P. In vitro modeling of the prostate cancer microenvironment. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014. vol.79–80 P. 214–221. DOI: 10.1016/j.addr.2014.04.008.
9. Cohen M.B., Rokhlin O.W. Mechanisms of prostate cancer cell survival after inhibition of AR expression. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009. vol. 106 no. 3 P.363–371. DOI: 10.1002/jcb.22022.
10. 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. DOI: 10.37748/2687-0533-2020-1-3-4.