

Е.В. Гребенюк¹, А.С. Могиленских², С.В. Сазонов^{1,2}

ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ИЗ ОБРАЗЦОВ ЛЮМИНАЛЬНОГО В (HER2-НЕГАТИВНОГО) ПОДТИПА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург, Российская Федерация;

² Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. Введение. Маркер клеточной пролиферации Ki-67 – необходимое условие современной морфологической диагностики рака молочной железы, его связь со степенью злокачественности и риском развития рецидива заболевания доказана. Однако динамика индекса Ki-67 в клеточной культуре из опухолей исследуемого подтипа изучена недостаточно. **Цель.** Оценить уровни экспрессии Ki-67 в клеточных культурах из образцов опухолей Люминального В (HER2-негативного) биологического подтипа. **Материалы и методы.** Опухолевые клетки были выделены из образцов рака молочной железы ферментативным способом по стандартному протоколу получения клеточной культуры. На каждом из пяти пассажей часть клеток высевали на стекла в чашки Петри для иммуноцитохимического анализа. Окрашивание проводилось в автостейнере Ventana (США) с применением антител anti-Pan Keratin (AE1/AE3/РСК26) Primary Antibody (Roche diagnostics, США) и Ki-67 (клон М1В-1, Dako, Дания). **Результаты и обсуждение.** На основании иммуногистохимических исследований парафиновых блоков образцы были отнесены к Люминальному В (Her2-негативному) подтипу. Выделены культуры и определена экспрессия Ki-67 в опухолевых клетках на всех пяти пассажах. Выявлены достоверные различия в значениях индекса пролиферации между исследуемыми пассажами. Сохранена эпителиальная природа клетками опухоли, что подтверждено данными иммуноцитохимического окрашивания на панцитокератин. Наибольшие значения пролиферативной активности определены на первом и третьем пассажах. Индекс Ki-67 в клетках культуры соответствовал его значениям в опухолевой ткани первичных образцов Люминального В (HER2-негативного) подтипа на втором, третьем и четвертом пассажах. **Заключение.** Высокий уровень пролиферативных процессов в популяции клеток, сохраняющих эпителиальный фенотип при культивировании позволяет использовать клеточные культуры как сравнительную модель для анализа экспрессии молекулярно-биологических маркеров и их соответствия данным ИГХ показателей первичной опухоли.

Ключевые слова: рак молочной железы, первичная клеточная культура, Люминальный В (HER2-негативный) подтип, иммуноцитохимия

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Гребенюк Екатерина Владимировна

ev.grebenuk9@yandex.ru

Дата поступления: 13.04.2023

Образец цитирования:

Гребенюк Е.В., Могиленских А.С., Сазонов С.В. Особенности пролиферативных процессов в клеточных культурах из образцов люминального В(HER2-негативного) подтипа рака молочной железы. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2023, Том 20,

Введение

Получение индивидуальных первичных клеточных линий рака молочной железы (РМЖ) от пациенток и определение их молекулярно-генетического подтипа является перспективным методом в целях индивидуального подбора противоопухолевых препаратов. Первичные клеточные линии проявляют существенную геномную, транскрипционную и биологическую гетерогенность, заключенную в исходной опухоли. Одним из важных критериев применения клеточной линии является корреляция ее молекулярно-генетического состава с биологическим фенотипом опухоли. Эта связь является первым шагом в развитии понимания молекулярного разнообразия биологического фенотипа [1].

Одно из направлений в доклинических исследованиях рака — создание клеточных моделей, клетки которых максимально близки молекулярно-биологическим характеристикам клеток РМЖ пациента при сохранении внутриопухолевой гетерогенности и микроокружения опухоли. Также при получении первичной клеточной культуры РМЖ необходимо учитывать, что помимо эпителиальных клеток в образцах опухоли присутствует большое количество фибробластов, которые являются стромальным компонентом и растут быстрее, чем эпителиальные клетки [2]. Эпителиальную природу клеток в культуре определяют путем иммуоцитохимического (ИЦХ) окрашивания на панцитокератин (РСК).

Понимание паттернов транскрипционной, геномной и биологической гетерогенности в субпопуляциях опухолей имеет решающее значение для успешной корректировки терапии [1].

При иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании опухоли выделяют пять суррогатных молекулярно-биологических подтипов РМЖ: Люминальный А, Люминальный В (HER2-), Люминальный В (HER2+), HER2 гиперэкспрессивный и Тройной негативный, различающихся по прогнозам и чувствительности к различным видам лекарственной терапии [3]. Принадлежность опухоли каждому подтипу определяется по сочетанию экспрессии рецепторов эстрогена, рецепторов прогестерона, Her2-neu и Ki-67 применительно к клиническим особенностям случая [4,5,6]. Вместе с тем, клинически наблюдаемая пластичность и гетерогенность обнаруживается внутри опухолевых подтипов, а не между ними [6,7].

Поскольку ответ опухоли на лечение может быть различным, все большее внимание уделяется изучению молекулярных маркеров, их прогностической значимости и влияния на химиочувствительность клеток РМЖ [8].

Маркер Ki-67 – необходимое условие современной морфологической диагностики подтипа рака молочной железы и используется как для определения степени злокачественности заболевания, так и для обоснованного назначения соответствующих режимов медикаментозного лечения [9]. Известно, что экспрессия Ki-67 закономерно изменяется в пределах всего клеточного цикла. Уровень белка считается низким в течении G1-периода, возрастает в S фазе и достигает максимума к G2-периоду, а в анафазе и телофазе митоза экспрессия Ki-67 значительно снижается, и его количество в ядре клетки становится недостаточным для выявления ИГХ методом. Таким образом, определяя белок Ki-67 иммуногистохимическим методом, можно судить о величине клеточной фракции роста в опухолевой ткани [10]. Sasaki K с соавт., 1988г. высказали предположение, что отсутствие экспрессии Ki-67 приводит к гибели клеток или к остановке митотических делений [11].

В настоящее время проводится оценка значимости индекса клеточной пролиферации Ki-67 для клинической практики в качестве предиктора эффективности неoadъювантной химиотерапии. Отмечено, что количество достигаемых полных морфологических регрессий (pCR) прямо пропорционально уровню пролиферативной активности [12]. С одной стороны, пациенты, у которых РМЖ проявляет очень высокий уровень пролиферации, могут иметь прогноз лучше, чем пациенты с более низкими значениями Ki67, так как отвечают на терапию более эффективно [13]. Другие исследования показали, что существует прямая связь между количеством клеток, экспрессирующих Ki-67, и степенью злокачественности опухоли, а также митотическим индексом. F. Renault-Llorca и соавт. 2003 г. установили, что пациенты, опухоли которых экспрессируют Ki-67 более чем в 50% клеток, имеют высокий риск развития рецидива заболевания [14].

На сегодняшний день не существует единого мнения о состоянии рецепторного аппарата клеток

и его изменения в процессе культивирования, а динамика показателя Ki-67 в клеточной культуре из опухолей данного подтипа на сегодняшний день изучена недостаточно.

Цель исследования — определить уровни экспрессии маркера Ki-67 в клеточных культурах из образцов РМЖ Люминального В (HER 2–негативного) биологического подтипа в процессе их культивирования.

Материалы и методы

Подтип образцов опухоли Люминальный В (Her2-негативный) был подтвержден иммуногистохимически в патолого-анатомическом отделении ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург (зав. отделением — проф. Сазонов С.В.). Из парафиновых блоков материала биопсии пациенток с диагнозом РМЖ были получены срезы на ротационном микротоме Microm HM340 (MICROM Labor gerate GmbH, Германия), подготовлены по стандартному гистологическому протоколу и окрашены моноклональными антителами к рецепторам эстрогена (клон 1D5, Dako, Дания), рецепторам прогестерона (клон PgR636, Dako, Дания), Ki-67 (клон MIB-1, Dako, Дания) и Her2/neu (клон 4B5, Rabbit Monoclonal primary Antibody, Ventana, США).

Для культивирования использовались образцы, полученные в ходе хирургического вмешательства у тех же пациенток. Материал доставляли в Лабораторию клеточных культур ГАУЗ СО Института медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург (зав. лабораторией к.м.н. Фадеев Ф.А.) в стерильных условиях, в растворе Хэнкса с 5% антибиотиков-антимикотиков. После механического измельчения помещали в среду для диссоциации (ферменты коллагеназа-гиалуронидаза, DMEM-F12) и инкубировали 16 часов в термостате на шейкере (н.у., отсутствие CO₂). Далее проводили центрифугирование гомогенной смеси при 0,8 RPM (30 сек), супернатант сливали, осадок ресуспендировали с трипсином и растворяли в HF (раствор Хэнкса с 10% FBS), полученную взвесь центрифугировали при 1,4 RPM (5 мин). Супернатант сливали, оставшийся осадок растворяли в смеси диспаза-ДНКазы, центрифугировали при 1,4 RPM (5 мин). Сливали надосадочную жидкость, добавляли питательную среду Mammocult™ Human Medium (STEMCELL), помещали в культуральные флаконы. Для пересева клеточную культуру диссоциировали в трипсине, одну часть клеток высаживали на предметные стекла в чашки Петри, культивировали 1-2 дня для проведения ИЦХ исследования, вторую часть — в культуральные флаконы для получения следующих пассажей. Контроль за состоянием культуры проводили с помощью инвертированного микроскопа Eclipse TS100, Nikon (Япония).

Для ИЦХ анализа клетки культур на стеклах фиксировали в 10% нейтральном формальдегиде в течение 2-3 часов, затем промывали фосфатным буфером и высушивали. Для последующего окрашивания выполняли проводку по ксилолам и спиртам. Для определения эпителиальной природы использовали антитела anti-PanKeratin (AE1/AE3/PCK26) Primary Antibody (Roche diagnostics, США). Предварительно клетки инкубировали в 1% растворе эмбриональной бычьей сыворотки 15 минут, помещали в трипсин на 15 минут, затем, промыв фосфатным буфером, проводили демаскировку с помощью 0,01% раствора Тритон X-100 15 минут. Для оценки пролиферативной активности демаскировку проводили в цитратном буфере на водяной бане в течение 90 минут и окрашивали моноклональными антителами к рецепторам Ki-67 (клон MIB-1, Dako, Дания). Ядра докрашивали гематоксилином Майера.

Иммуногистохимические и иммуноцитохимические реакции осуществлялись в автостейнере Ventana (США). Подсчет числа положительно окрашенных клеток на биомаркеры Ki-67 и PCK от общего количества клеток осуществлялся на стеклах при увеличении ×200 оптического микроскопа Meiji Techno MT4200L (Япония) в отдельных полях зрения (оценивали не менее 600 клеток на каждое стекло). Произведен подсчет средних значений, стандартной ошибки среднего, доверительный интервал (ДИ). Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 5.1. Для сравнительного анализа качественных переменных применяли критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса на основании анализа таблиц сопряженности, критерий значимости различий р принимался равным менее 0,05.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования получены культуры пяти пассажей с сохранением эпителиального фенотипа клеток РМЖ. На каждом пассаже с помощью ИЦХ метода на части клеток выявлено ядерное окрашивание Ki-67 (рис.1). Эпителиальная природа клеток опухоли подтверждена данными ИЦХ окрашивания цитоплазматических мембран на РСК (рис.2)

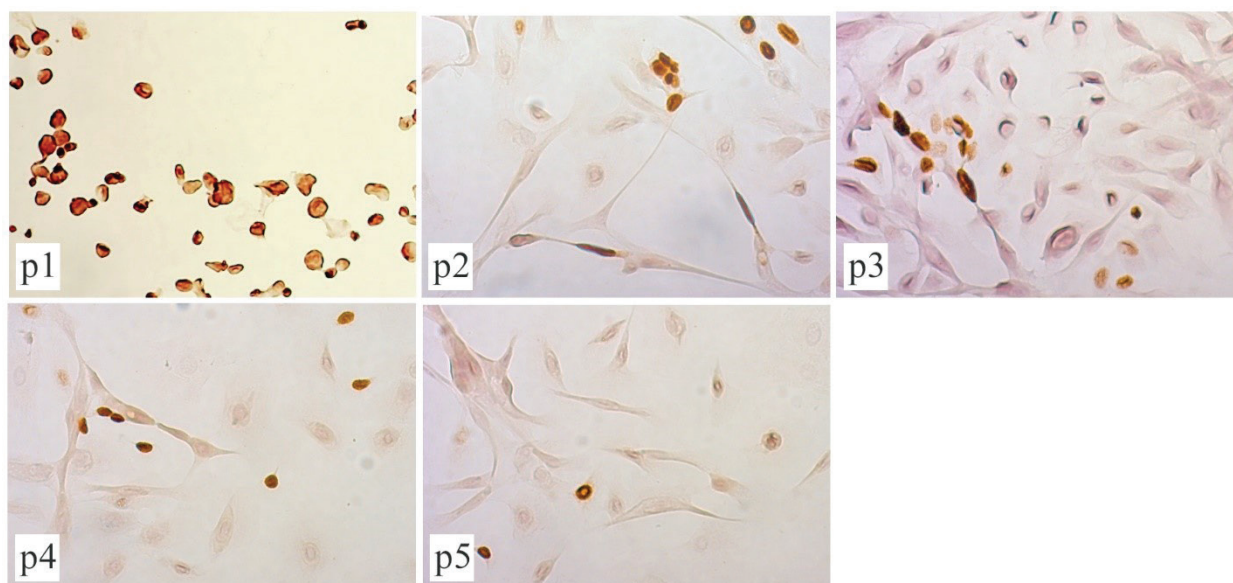


Рис. 1. Культуры клеток РМЖ, иммуноцитохимическое окрашивание, экспрессия маркера Ki-67 в ядрах клеток на пяти пассажах, световая микроскопия, ув. $\times 200$.

Fig. 1. BC cell cultures, immunocytochemical staining, marker Ki-67 expression in cell nuclei at passages 1-5, light microscopy, $\times 200$.

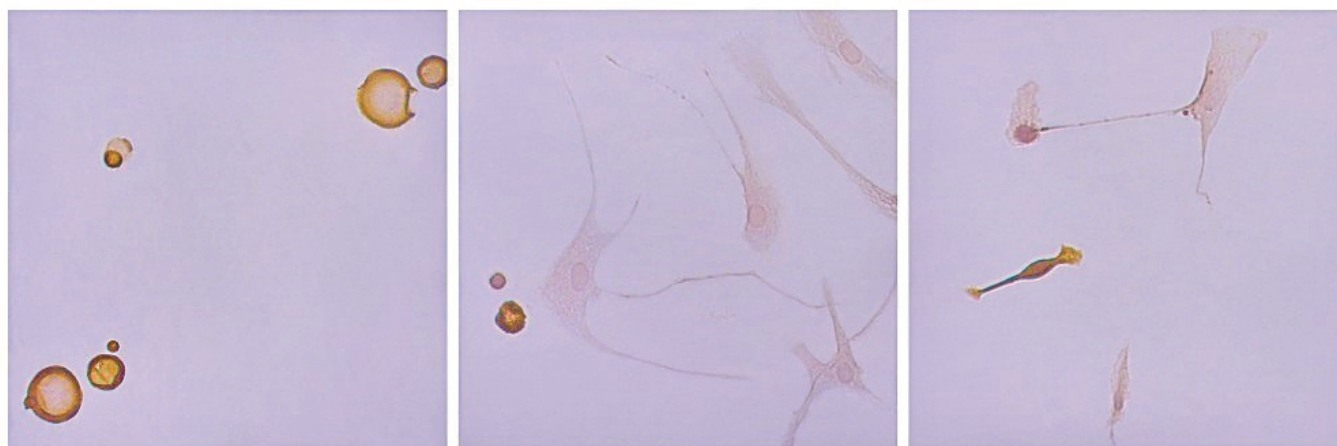


Рис. 2. Клетки культуры РМЖ, ИЦХ окрашивание, определение пancyтoкepaтина в цитоплазматических мембранах клеток различных форм, световая микроскопия, ув. $\times 200$.

Fig. 2. BC culture cells, ICH staining, pancytokeratin detection in cytoplasmic membranes of different cell types, light microscopy, $\times 200$.

Наибольшее количество клеток с эпителиальным фенотипом выявлено на первом пассаже и составляет 70,7%. Значение показателя уменьшается к четвертому пассажу. Между вторым и третьим пассажами значимых различий нет (Табл. 1).

Уменьшение количества клеток, экспрессирующих РСК на четвертом пассаже, свидетельствует об изменении молекулярно-генетической природы культуры и может являться ограничением для проведения дальнейших пассажей [15].

Для большинства опухолей прогрессирование в сторону злокачественности сопровождается потерей эпителиальной дифференцировки и сдвигом в сторону мезенхимального фенотипа. Суще-

ствуется также множество наблюдений, показывающих, что опухолевые клетки с мезенхимальным фенотипом могут восстанавливать характеристики эпителиальных клеток [16]. Полученные результаты доказывают важность контроля за сохранением эпителиального фенотипа в культуре.

Значения индекса пролиферации Ki-67 на всех пассажах приведены в табл. 2. При анализе динамики уровней маркера Ki-67 первичной культуры рака молочной железы обнаружены статистически значимые различия между всеми пассажами.

Таблица 1

Средний уровень РСК и доверительные интервалы (ДИ) в процессе культивирования образцов РМЖ Люминального В (HER2-негативного) подтипа

Table 1

Average PCK level and confidence intervals (CI) during culturing of Luminal B (HER2-negative) subtype BC samples

Пассаж	Доверительный интервал (%)	Среднее значение (М) (%)	Стандартная ошибка среднего (m) (%0)	p (χ^2); п. Йейтса
P1	64,1-77,3	70,7	3,3	P1:P2* p <0,001; p <0,001
P2	28,2-36,2	32,2	2	P2:P3 p =0,155; p =0,206
P3	18,7-26,9	22,8	2,1	P3:P4* p =0,002; p =0,003
P4	3,9-10,3	7,1	1,6	P4:P5* p <0,001; p =0,002
P5	17,3-32,3	24,8	3,7	P1:P5* p <0,001; p <0,001

* — статистически значимые различия между пассажами.

Таблица 2

Средний уровень Ki-67 и доверительные интервалы (ДИ) в процессе культивирования образцов РМЖ Люминального В (HER2-негативного) подтипа.

Table 2

Average KI-67 level and confidence intervals (CI) during culturing of Luminal B (HER2-negative) subtype BC samples.

Пассаж	Доверительный интервал (%)	Среднее значение (М) (%)	Стандартная ошибка среднего (m) (%)	p (χ^2); п. Йейтса
P1	44,4-58,2	51,3	3,5	P1:P2* p <0,001; p <0,001
P2	16,6-22,4	19,5	1,5	P2:P3* p <0,001; p <0,001
P3	36,5-48,9	42,7	3,1	P3:P4* p =0,001; p =0,001
P4	21,2-33,2	27,2	3,0	P4:P5* p =0,018; p =0,027
P5	2,7-18,5	7,9	5,1	P1:P5* p <0,001; p <0,001

* — статистически достоверные различия Ki-67 между пассажами.

Проведенные исследования позволили установить некоторые закономерности состояния пролиферативных процессов в клеточных культурах РМЖ, полученных из образцов Люминального В (HER2-негативного) подтипа.

Количество клеток, экспрессирующих в ядрах Ki-67, достоверно увеличивается при опухолевой трансформации по сравнению с уровнем пролиферации в обычном люминальном эпителии молочной железы. Для нормальной ткани молочной железы характерен низкий уровень Ki-67 (<3,0%), уровень же пролиферации в ткани РМЖ в первую очередь связан с особенностями рецепторного аппарата клеток, который может меняться в процессе культивирования [17].

Самый высокий процент окрашенных на Ki-67 клеток был получен на первом пассаже, где более половины клеток находились в активных фазах клеточного деления. Также высокий показатель маркера Ki-67 был отмечен на третьем пассаже. Уровень клеточной пролиферации на втором и четвертом пассажах достигали средних значений при отсутствии значимых различий между этими пассажами.

Cidado J. с соавт., 2016 г. обнаружили, что чем дольше клетка находится в состоянии покоя, тем ниже будет уровень Ki-67 при повторном входе в клеточный цикл [18]. Самый низкий уровень экспрессии Ki-67 в клетках наблюдался на пятом пассаже, что свидетельствует о снижении популяции пролиферирующих клеток в культуре. Высокий уровень пролиферативных процессов, установленный на первом и третьем пассажах демонстрирует эффективность культуральной модели для исследования данного показателя.

При ИГХ анализе парафиновых блоков первичных опухолевых образцов Люминального В (Her2-негативного) подтипа было определено среднее значение маркера Ki-67 в опухолевой ткани (Mo), которое составило $26,7 \pm 3,3$ с доверительной вероятностью 95% в диапазоне ДИ $33,2 \pm 20,1$. При сравнении индекса клеточной пролиферации в культуре клеток РМЖ с этим значением (Таблица 3) на втором, третьем и четвертом пассажах достоверных различий между изученными показателями не обнаружено.

Таблица 3

Сравнение значений индекса пролиферации в пассажах культур клеток со средним значением Ki-67 в образцах первичной опухоли

Table 3

Comparison of proliferation index values in cell culture passages with mean Ki-67 level in primary tumor samples

	Mo:P1*	Mo: P	Mo: P3	Mo: P4	Mo:P5*
$p(\chi^2)$; п. Йейтса	$p < 0,01$; $p < 0,01$	$p = 0,244$; $p = 0,318$	$p = 0,018$; $p = 0,027$	$p = 1,000$; $p = 0,874$	$p < 0,001$; $p < 0,001$

* — статистически достоверные различия KI-67 между пассажами.

Выводы

Первичные клеточные культуры Люминального В (HER2-негативного) подтипа РМЖ показали высокий уровень пролиферативных процессов на первом и третьем пассажах в популяции клеток, сохраняющих эпителиальный фенотип при культивировании.

Значение индекса Ki-67 достоверно не отличалось от уровня пролиферативной активности в образцах первичной опухоли Люминального В (HER2-негативного) подтипа РМЖ на втором, третьем и четвертом пассажах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Neve R.M.; A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes; Cancer Cell; 2006; 10 (6): 515-527.
2. Freshney R.I.; Induction of differentiation in neoplastic cells; Anticancer Res; 1985; 5(1): 111-130.
3. Сазонов С.В.; Обеспечение качества молекулярно-биологических исследования при диагностике рака молочной железы: Екатеринбург: БУМАН; 2018.
4. Perou Ch.M., Sorlie T., Eisen M.B. Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A. et al.; Molecular portraits of human breast tumours; Nature; 2000; 406 (6797):747-52.
5. Prat A., Perou Ch.M.; Deconstructing the molecular portraits of breast cancer; Mol. Oncol; 2011; 5 (1): 5-23.
6. Rivenbark A.G., O'Connor S.M., Coleman W.B.; Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine; Am. J. Pathol.; 2013; 183 (4):1113-24.
7. Marusyk A., Almendro V., Polyak K.; Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?; Nat. Rev. Cancer; 2012; 12 (5): 323-34.
8. Брагина О.Д., Слонимская Е.М., Завьялова М.В., Телегина Н.С., Перельмутер В.М., Тарабановская Н.А. и др.; Предсказательное значение ряда молекулярных параметров у больных базально-

подобным трипл-негативным раком молочной железы; Сибирский онкологический журнал; 2014; (3): 5-10.

9. Assersohn L., Salter J., Powles T.J., A'hern R., Makris A., Gregory R. K. et al.; Studies of the potential utility of Ki67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer; Breast Cancer Res Treat; 2003; 82 (2): 113–123.

10. Сазонов С.В. ИГХ диагностика рака молочной железы: Saarbrücken: LAP LAMBERT Acad. Publ.; 2013.

11. Sasaki K., Matsumura K., Tsuji T., Shinozaki F., Takahashi M.; Relationship between labeling indices of Ki-67 and BrdUrd in human malignant tumors; Cancer; 1988; 62 (5):989-93.

12. Fasching P.A., Heusinger K., Haeberle L., Niklos M., Hein A., Bayer Ch.M., et al.; Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment; BMC Cancer; 2011; 11: 486-96.

13. Yerushalmi R., Woods R., Ravdin P.M., Hayes M.M., Gelmon K.A.; Ki 67 in breast cancer: prognostic and predictive potential; Lancet Oncol; 2010; 11:174–183.

14. Penault-Llorca F., Cayre A., Mishellany F.B. , Amat S., Feillel V., Bouedec G. Le, et al.; Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome; Int. J. Oncol; 2003; 22 (6): 1319-25.

15. Шамшурина Е.О., Могиленских А.С., Гребенюк Е.В. с соавт.; Сравнение фенотипов клеток адгезивной и неадгезивной культур карциномы молочной железы; Уральский медицинский журнал; 2022;2(6): 89-94.

16. Christiansen J.J., Rajasekaran A.K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis; Cancer Res.; 2006; 66: 8319–8326.

17. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Бриллиант Ю.М.; Связь состояния пролиферативных процессов и особенностей рецепторного аппарата опухолевых клеток карциномы молочной железы; Гены и клетки; 2017; 12 (4): 76-81.

18. Cidado J., Wong H.Y., Rosen D.M., Cimino-Mathews A., Garay J.P., Fessler A.G. et al.; Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation; Oncotarget; 2016; 7 (5): 6281-93.

Авторы

Гребенюк Екатерина Владимировна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Уральский государственный медицинский университет

Аспирант 3-го года обучения, специальность 3.3.3. - Патологическая физиология

ev.grebenyuk9@yandex.ru

Екатеринбург, Российская Федерация

Могиленских Анна Сергеевна

ГАУЗ СО «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий»

Научный сотрудник

annasajler@yandex.ru

Екатеринбург, Российская Федерация

Сазонов Сергей Владимирович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Уральский государственный медицинский университет

Доктор медицинских наук, профессор

Заведующий кафедрой гистологии

ГАУЗ СО «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий»

Заместитель главного врача по науке

prof-ssazonov@yandex.ru

Екатеринбург, Российская Федерация

E.V. Grebenyuk², A.S. Mogilenskikh¹, S.V. Sazonov^{1,2}

FEATURES OF PROLIFERATIVE PROCESSES IN CELL CULTURES FROM SAMPLES OF LUMINAL B (HER2- NEGATIVE) SUBTYPE BREAST CARCINOMA

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russian Federation;

² State Autonomous Institution of Healthcare of the Sverdlovsk Region «Center for Specialized Types of Medical Care» Institute of Medical Cellular Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Introduction. The Ki-67 cell proliferation marker is an indispensable point of the present morphological diagnosis of breast carcinoma, its association with the degree of malignancy and the recurrence risk for the disease has been substantiated. However dynamics of the Ki-67 index in cell culture from tumors of this subtype has not been studied enough. **The aim of the study.** To evaluate Ki-67 expression levels in cell cultures from samples of luminal B (HER2-negative) biological subtype tumors. **Materials and methods.** Tumor cells were extracted from BC samples by enzymatic method according to the standard protocol for obtaining a cell culture. A portion of cells from each passage was seeded on glasses in Petri dishes for immunocytochemical (ICC) analysis. ICC staining of the cells was conducted in autostainer Ventana (USA) using anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) Primary Antibody (Roche diagnostics, the USA) and Ki-67 (clone of MIB-1, Dako, Denmark) antibodies. **Results and discussion.** Based on immunohistochemical (IHC) analysis of paraffin blocks the samples were determined as luminal B (Her2-negative) subtype. Cultures were obtained and the Ki-67 biomarker was determined at five passages. Significant differences in the values of the proliferation index between the examined passages were found. The epithelial phenotype of the tumor cells was saved as confirmed by the pancytokeratin staining data. Changes of proliferative activity showed the highest values of the biomarker at the first and third passages. The proliferation Ki-67 index value in the culture cells corresponded to the Ki-67 level in the tumor tissue of the luminal B (Her2-negative) subtype primary samples at the second, third and fourth passages. **Conclusion.** The high level of proliferative processes in the cell population maintaining the epithelial phenotype during cultivation allows the use of cell cultures as a comparative model for analyzing the expression of molecular biological markers and their compliance with primary cancer samples IHC data within a certain subtype.

Keywords: breast carcinoma, primary cell culture, Luminal B (HER2-negative) subtype, Immunocytochemistry

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Ekaterina V. Grebenyuk

ev.grebenyuk9@yandex.ru

Received 13.04.2023

For citation:

Grebenyuk E.V., Mogilenskikh A.S., Sazonov S.V. Features of proliferative processes in Cell cultures from samples of luminal B (HER2-negative) subtype breast carcinoma. [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2023, Vol. 20, no. 1-2, pp. 53–62. DOI: 10.22138/2500-0918-2023-20-1-53-62 (In Russ)

REFERENCES

1. Neve R.M.; A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes; *Cancer Cell*; 2006; 10 (6): 515-527.
2. Freshney R.I.; Induction of differentiation in neoplastic cells; *Anticancer Res*; 1985; 5(1): 111-130.
3. Sazonov S.V.; Ensuring the quality of molecular biological studies in the diagnosis of breast cancer: Yekaterinburg: VUMAN; 2018.
4. Perou Ch.M., Sorlie T., Eisen M.B. Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A. et al.; Molecular portraits of human breast tumours; *Nature*; 2000; 406 (6797):747–52.
5. Prat A., Perou Ch.M.; Deconstructing the molecular portraits of breast cancer; *Mol. Oncol*; 2011; 5 (1): 5–23.
6. Rivenbark A.G., O'Connor S.M., Coleman W.B.; Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine; *Am. J. Pathol.*; 2013; 183 (4):1113–24.
7. Marusyk A., Almendro V., Polyak K.; Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?; *Nat. Rev. Cancer*; 2012; 12 (5): 323–34.
8. Bragina O.D., Slonimskaya E.M., Zavyalova M.V., Telegina N.S., Perelmuter V.M., Tarabanovskaya N.A., et al; Predictive value of molecular parameters in patients with triple-negative breast cancer; *Siberian Cancer Journal*; 2014; (3): 5-10.
9. Assersohn L., Salter J., Powles T.J., A'hern R., Makris A., Gregory R. K. et al.; Studies of the potential utility of Ki67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer; *Breast Cancer Res Treat*; 2003; 82 (2): 113–123.
10. S.V. Sazonov; IHC breast cancer diagnosis: Saarbrücken: LAP LAMBERT Acad. Publ.; 2013.
11. Sasaki K., Matsumura K., Tsuji T., Shinozaki F., Takahashi M.; Relationship between labeling indices of Ki-67 and BrdUrd in human malignant tumors; *Cancer*; 1988; 62 (5):989-93.
12. Fasching P.A., Heusinger K., Haeberle L., Niklos M., Hein A., Bayer Ch.M., et al.; Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment; *BMC Cancer*; 2011; 11: 486-96.
13. Yerushalmi R., Woods R., Ravdin P.M., Hayes M.M., Gelmon K.A.; Ki 67 in breast cancer: prognostic and predictive potential; *Lancet Oncol*; 2010; 11:174–183.
14. Penault-Llorca F., Cayre A., Mishellany F.B. , Amat S., Feillel V., Bouedec G. Le, et al.; Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome; *Int. J. Oncol*; 2003; 22 (6): 1319-25.
15. Shamshurina E.O., Mogilensky A.S., Grebenyuk E.V. et al.; Comparison of adherent and non-adherent breast carcinoma cell phenotypes; *Ural Medical Journal*; 2022;2(6): 89-94.
16. Christiansen J.J., Rajasekaran A.K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis; *Cancer Res.*; 2006; 66: 8319–8326.
17. Sazonov S.V., Brilliant A.A., Brilliant Yu.M.; Proliferative processes and features of tumor cell receptor apparatus of the breast carcinoma; *Genes & Cells*; 2017; 12 (4): 76-81.
18. Cidado J., Wong H.Y., Rosen D.M., Cimino-Mathews A., Garay J.P., Fessler A.G. et al.; Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation; *Oncotarget*; 2016; 7 (5): 6281-93.

Authors

Ekaterina V. Grebenyuk

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation

Postgraduate student of the 3rd year of study, specialty Pathological Physiology

State Autonomous Institution of Healthcare of the Sverdlovsk Region «Center for Specialized Types of Medical Care» Institute of Medical Cellular Technologies»

Researcher

ev.grebenyuk9@yandex.ru

Yekaterinburg, Russian Federation

Anna S. Mogilenskikh

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ural State Medical University of

the Ministry of Health of the Russian Federation

Researcher

State Autonomous Institution of Healthcare of the Sverdlovsk Region «Center for Specialized Types of Medical Care» Institute of Medical Cellular Technologies»

Researcher

annasajler@yandex.ru

Yekaterinburg, Russian Federation

Sergey V. Sazonov

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation

Head of the Department of Histology, Doctor of Medical Sciences, Professor

State Autonomous Institution of Healthcare of the Sverdlovsk Region «Center for Specialized Types of Medical Care» Institute of Medical Cellular Technologies»

Deputy Chief Physician for Science

prof-ssazonov@yandex.ru

Yekaterinburg, Russian Federation