

UDC 576

Оптимизация условий культивирования опухолевых клеток в мягком агаре для их дальнейшего иммуногистохимического анализа

А. И. Хоруженко

Государственная ключевая лаборатория молекулярной и клеточной биологии, Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

a.i.khoruzhenko@imbg.org.ua

Цель. Оптимизировать условия культивирования злокачественных клеток в мягком агаре для последующего иммуногистохимического анализа образованных трехмерных колоний клеток. **Методы.** Культивирование клеток линии MCF-7 карциномы молочной железы в мягком агаре, иммуногистохимическое и иммунофлуоресцентное выявление эпителиальных антигенов и киназы mTOR в культивированных клетках. **Результаты.** Описан методический подход к культивированию клеток в мягком агаре, позволяющий проводить морфологический, морфометрический и иммунохимический анализ исследуемых клеток. **Выводы.** Предложенный метод предоставляет дополнительную характеристику клеток, растущих в мягком агаре, что может быть полезным как для базовых исследований, так при оценке эффективности противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: мягкий агар, оценка эффективности колониеобразования, трехмерные культуры злокачественных клеток.

Введение. Эффективность колониеобразования опухолевыми клетками в мягком агаре достаточно широко используют для характеристики злокачественных клеток в условиях *in vitro* [1, 2]. Суть метода заключается в определении количества клеток, способных самостоятельно дать начало новой колонии. В некотором приближении этот тест рассматривают как возможность выявления способности клеток к субстрат-независимому росту, что может свидетельствовать о более высоком метастатическом потенциале исследуемых клеток. Для этого суспензию отдельных клеток помещают в полужидкий агар для предотвращения взаимодействия клеток между собой и контакта их с ростовой поверхностью. Таким образом, полученная колония берет начало от единственной клетки. Количество клеток, дающих начало новой колонии, характеризует канцерогенные свойства популяции [3]. Однако следует от-

метить, что вопрос происхождения метастаза из одной клетки или группы клеток остается дискуссионным, что, в свою очередь, вызывает вопросы об адекватности использования указанного метода. Однако многочисленные исследования демонстрируют очень высокий уровень корреляции между эффективностью формирования колоний злокачественными клетками в мягком агаре и результатами исследований, полученными на лабораторных животных [4]. В последнее время оценку колониеобразования в мягком агаре считают более адекватным методом исследования опухолевых клеток, чем традиционные монослойные культуры. Техника выполнения эксперимента не очень сложна и применяется достаточно широко. Обычно чашку Петри покрывают слоем 1 %-й агарозы, на который наносят суспензию клеток в 0,3 %-м растворе агарозы. Часто добавляют внешний слой 1 %-й агарозы для упрочения процедуры замены питательной среды. После определенного срока культивирования под

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 2012

световым микроскопом анализируют выросшие колонии клеток [5, 6]. В качестве показателя степени злокачественности клеток используют коэффициент эффективности колониеобразования в мягком агаре, который определяют как отношение количества образованных колоний к числу внесенных клеток, выраженное в процентах. Для подсчета количества колоний часто применяют дополнительное оборудование и программное обеспечение [7, 8]. Однако отдельный интерес представляет морфологический и иммуногистохимический анализ полученных колоний злокачественных клеток, позволяющий не только количественно, но и качественно (по содержанию исследуемых антигенов) охарактеризовать рост малигнизированных клеток в условиях трехмерных культур. В данной работе описан подход для получения гистологических срезов колоний клеток, изолированных из мягкого агара, для их иммуногистохимического анализа.

Материалы и методы. *Культура клеток.* Клетки линии MCF-7, происходящие из карциномы молочной железы, культивировали в питательной среде DMEM («Sigma», США) с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (FBS, «Hy Clone», США), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 4 мМ глутамина («РАА», США) до достижения ими 80–90 % конфлюентности монослоя. Клетки снимали раствором 0,25 %-й трипсин–0,02 %-й ЭДТА («РАА») и подсчитывали в камере Горяева. Предварительно готовили 0,6 %-й раствор агарозы (# 11400, «Serva», США) на деионизированной воде и автоклавировали его. Также предварительно готовили двукратный концентрат питательной культуральной среды для дальнейшего соединения с агарозой. При температуре до 40 °С $6 \cdot 10^3$ клеток смешивали с 1 мл двукратной питательной среды и 1 мл 0,6 %-й агарозы и вносили в 15-мл стерильную пластиковую пробирку. Через 10–15 мин наслаивали 2 мл питательной среды и культивировали в течение 10 сут, заменяя по 2 мл питательной среды каждые 4–5 сут. Фиксировали при помощи формалина (конечная концентрация 5 %) в течение 30 мин.

Имуногистохимический анализ. Суспензию колоний клеток фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 40 мкм, после чего пятикратно отмывали забуференным физиологическим раство-

ром, рН 7, 2 (на 100 мл буфера 0,8 г NaCl, 0,02 г KCl, 0,02 г KH_2PO_4 , 0,082 г Na_2HPO_4 , 0,013 г NaN_2PO_4). Согласно стандартной гистологической технике с незначительной модификацией получали гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Модификация заключалась в сокращении времени инкубации микрообразцов во всех спиртах и ксилолах. Учитывая скорость диффузии фиксаторов, спиртов, ксилола, а также незначительный размер образцов, срок инкубации сокращен до 30 мин. Полученные гистологические срезы дважды термически обрабатывали в микроволновой печи в течение 5 мин в 10 мМ цитратном буфере для экспонирования детерминант. Эпителиальные антигены определяли с использованием мышиных моноклональных антител к цитокератинам (anti-Pan cytokeratin, Clone 11, «Sigma») в разведении 1:100. Для установления субклеточной локализации киназы mTOR применяли моноклональные антитела мыши (F11) к центральному участку молекулы, полученные в нашей лаборатории, в соотношении 1:100. Иммуногистохимический анализ проводили с использованием системы UltraVision LP Value Detection System («Thermo», США); иммунофлуоресцентный – с применением антител к мышиному IgG, конъюгированных с FITC.

Препараты анализировали с помощью микроскопа Leica DM 1000 и конфокального микроскопа «Zeiss» LSM 700 (ФРГ).

Результаты и обсуждение. Как правило, для определения способности клеток к колониеобразованию в полужидком агаре используют трехслойный метод. Слой 1 %-й агарозы помещают на дно культуральной посуды для предотвращения адгезии клеток к ростовой поверхности. Затем на него наслаивают 0,3 %-ю агарозу, содержащую суспензию клеток, и наносят еще один слой 1 %-й агарозы. Последняя позволяет сменить питательную среду, не отбирая части суспензии клеток.

Предложенный нами подход предполагает в качестве культуральной посуды использовать одно-разовые пластиковые пробирки. Поскольку поверхность таких пробирок неадгезивна, нет необходимости покрывать их слоем 1 %-й агарозы. Суспензию клеток в полужидком агаре непосредственно вносят в стерильную пробирку. Верхний слой ага-

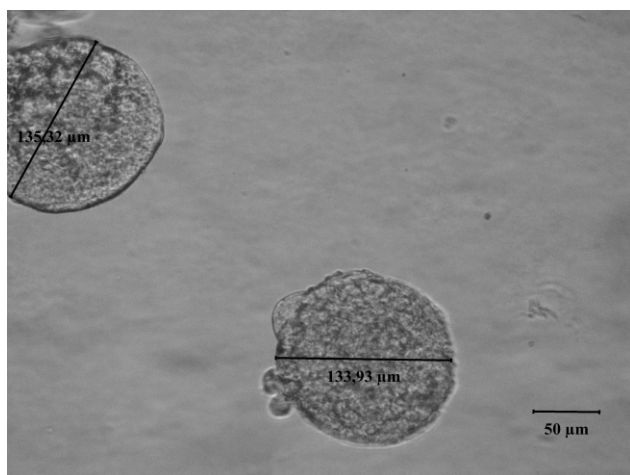


Рис. 1. Колонии клеток линии MCF-7, которые росли в мягком агаре. Определение размера колоний

розы, как и нижний, также не наслаивают, поскольку узкий столб питательной среды в пробирке позволяет сменить среду, не касаясь верхнего слоя суспензии клеток в агарозе.

При внесении в CO₂-инкубатор необходимо обеспечить возможность газообмена между инкубатором и содержимым пробирки. На сегодняшний день ряд производителей, включая TPP (США), Cstltreat (США) и др., представляют стерильные пластиковые пробирки с крышками, содержащими фильтр, обеспечивающий газообмен в условиях культивирования, но не допускающий контаминации культур. После помещения суспензии клеток в агарозе в пробирку последнюю в закрытом состоянии ставят в холодильник на 10–15 мин при температуре 4 °С для застывания агарозы. Затем в условиях ламинарного бокса в пробирки на агарозу с клетками аккуратно наслаивают питательную среду. Клетки культивируют в течение определенного срока, обычно составляющего 10–14 сут.

Далее трехмерные культуры клеток фиксируют добавлением глутарового альдегида до конечной концентрации 2,5 % или формалина – до концентрации 5 %. Фиксацию проводят в течение от 30 мин до 2 ч. Объем жидкости, наслоенной на мягкий агар, контролируют таким образом, чтобы он соответствовал объему агара с колониями клеток. Таким образом, в конечном итоге концентрация агарозы достигает 0,15 %. После фиксации суспензию колоний ставят на водяную баню (60–75 °С) и инкубируют в течение 30 мин, после чего очень плавно перемешивают с помощью ротации для полного перемешивания. Суспензию колоний клеток (20–100 мкл) носи-

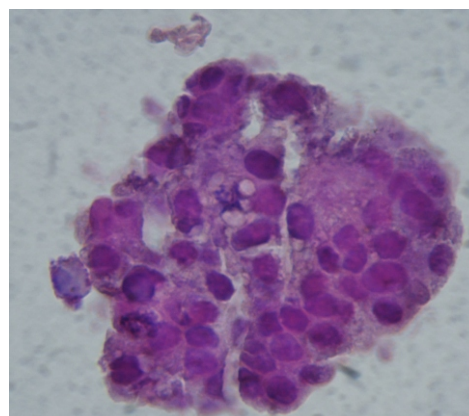


Рис. 2. Колонии клеток линии MCF-7, растущих в мягком агаре. Окраска гематоксилином-эозином. Ок.10, об. 40

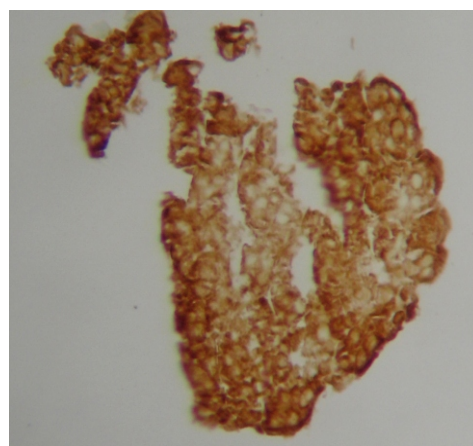


Рис. 3. Иммуногистохимическое определение эпителиальных антигенов (цитокератинов) в трехмерных культурах клеток линии MCF-7. Ок.10, об. 20

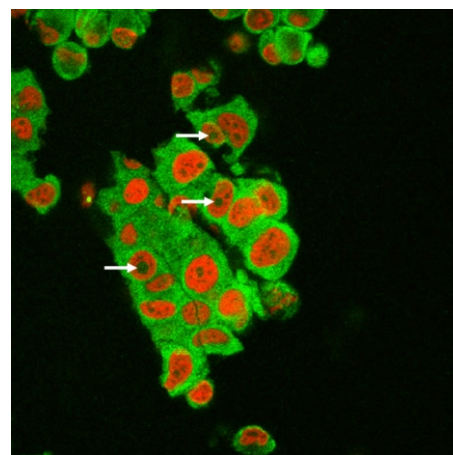


Рис. 4. Иммунофлуоресцентный анализ субклеточной локализации киназы mTOR в клетках линии MCF-7, культивированных в мягком агаре. Стрелки указывают на ядрышки. Ок.10, об. 40

вают с помощью ротации для полного перемешивания. Суспензию колоний клеток (20–100 мкл) носи-

ком с большим отверстием наносят на предметное стекло и накрывают покровным стеклом размером 18 × 18 мм. Под микроскопом определяют их размер (рис. 1). При указанных условиях все колонии клеток расположены в одной плоскости. Применение данного подхода позволяет получить гистологические срезы из колоний клеток, образованных в мягком агаре. Для этого колонии собирают на нейлоновый фильтр с диаметром пор 40 мкм, чтобы избавиться от агарозы. После отмывания остатков агарозы культуры клеток дегидратируют, обрабатывая спиртами возрастающей концентрации, и по указанной в разделе «Материалы и методы» методике получают гистологические срезы.

Так, на рис. 2 представлен срез колонии клеток MCF-7, растущих в мягком агаре. Возможность применения иммуногистохимической техники для анализа таких срезов была доказана в результате определения эпителиальных антигенов, а именно – цитокератинов. Данные представлены на рис. 3. Более того, в указанных культурах установлена субклеточная локализация киназы mTOR и впервые выявлена ее ядрышковая локализация наряду с цитоплазматической, что в дальнейшем было подтверждено на гистологических срезах злокачественных опухолей молочной железы и на монослойных культурах клеток линии MCF-7 (рис. 4).

Выводы. Предложенный подход к оценке колоний, образованных злокачественными клетками в мягком агаре под действием определенных факторов, позволит достаточно быстро и эффективно провести анализ исследуемых клеток и существенно упростит процедуру их культивирования. Дальнейший иммуногистохимический анализ клеток, растущих в трехмерных условиях, предоставит дополнительную информацию относительно наличия определенных антигенов в исследуемых клетках.

По мнению автора, этот метод будет полезен для базовых исследований малигнанных свойств клеток в условиях *in vitro*, а также для анализа противоопухолевых препаратов на клетках различного происхождения.

Работа выполнена при частичной поддержке Государственного Фонда Фундаментальных исследований Украины, грант № Ф46/457-2011.

A. I. Khoruzhenko

Optimization of tumor cell culture conditions in soft agar for subsequent immunohistochemical analysis

State Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology
Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Aim. The aim of this work is to optimize conditions of malignant cells cultivation in soft agar for subsequent immunohistochemical analysis of formed three-dimensional colonies. **Methods.** Cultivation of breast carcinoma cell line MCF-7 in soft agar, immunohistochemical and immunofluorescence detection of epithelial antigen and mTOR kinase in cultured cells. **Results.** We describe a methodical approach to the cultivation of cells in soft agar, which allows to carry out morphological, morphometric and immunochemical analysis of the studied cells. **Conclusions.** The proposed method provides an additional characterization of cells growing in soft agar, which will be useful in basic research and in evaluation of the effectiveness of anticancer drugs.

Keywords: soft agar, evaluation of colony formation, three-dimensional culture of malignant cells.

REFERENCES

1. Chen X., Overcash R., Green T., Hoffman D., Asch A. S., Ruiz-Echevarria M. J. The tumor suppressor activity of the transmembrane protein with epidermal growth factor and two follistatin motifs 2 (TMEFF2) correlates with its ability to modulate sarcosine levels // J. Biol. Chem.—2011.—6, N 286.—P. 16091–16100.
2. Hagan C. R., Regan T. M., Dressing G. E., Lange C. A. cdk2-dependent phosphorylation of progesterone receptors (PR) on Ser81 regulates PR-B isoform-specific target gene expression in breast cancer cells // Mol. Cell. Biol.—2011.—31, N 12.—P. 2439–2452.
3. Khoruzhenko A. I. 2D- and 3D-cell culture // Biopolym. and Cell.—2011.—27, N 1.—P. 17–24.
4. Kwak Y. T., Radaideh S. M., Ding L., Li R., Frenkel E., Story M. D., Girard L., Minna J., Verma U. N. Cells lacking IKK show nuclear cyclin D1 overexpression and a neoplastic phenotype: role of IKK as a tumor suppressor // Mol. Cancer Res.—2011.—9, N 3.—P. 341–349.
5. Goparaju C. M., Blasberg J. D., Volinia S., Palatini J., Ivanov S., Donington J. S., Croce C., Carbone M., Yang H., Pass H. I. Oncogene mediated NFK downregulation in malignant pleural mesothelioma // Oncogene.—2011.—30, N 24.—P. 2767–2777.
6. Hama-Kourbali Y., Bermek O., Bernard-Pierrot I., Karaky R., Martel-Renoir D., Frechault S., Courty J., Delbe J. The synthetic peptide P111-136 derived from the C-terminal domain of heparin affinity regulatory peptide inhibits tumour growth of prostate cancer PC-3 cells // BMC Cancer.—2011.—11.—P. 212.
7. Maurya D. K., Ayuzawa R., Doi C., Troyer D., Tamura M. Topoisomerase I inhibitor SN-38 effectively attenuates growth of human non-small cell lung cancer cell lines *in vitro* and *in vivo* // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.—2011.—30, N 1.—P. 1–10.
8. Feldmann G., Mishra A., Bisht S., Karikari C., Garrido-Laguna I., Rasheed Z., Ottenhof N. A., Dadon T., Alvarez H., Fendrich V., Rajeshkumar N. V., Matsui W., Brossart P., Hidalgo M., Bannerji R., Maitra A., Nelkin B. D. Cyclin-dependent kinase inhibitor Dinaciclib (SCH727965) inhibits pancreatic cancer growth and progression in murine xenograft models // Cancer Biol. Ther.—2011.—12, N 7.—P. 598–609.

Received 22.04.12