

Н.О. Безденежних<sup>1</sup>  
 Н.І. Семесюк<sup>1</sup>  
 О.О. Лихова<sup>1</sup>  
 В.Є. Жильчук<sup>2</sup>  
 Ю.Й. Кудрявець<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

<sup>2</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

**Ключові слова:** рак молочної залози, епітеліально-мезенхімальний перехід, мікрооточення, кістковий мозок, кокультивування.

## МОДИФІКАЦІЯ ЕПІТЕЛІАЛЬНО-МЕЗЕНХІМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДУ В КЛІТИНАХ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ВНАСЛІДОК ЇХ КОКУЛЬТИВУВАННЯ З ФІБРОБЛАСТАМИ ТА КЛІТИНАМИ КІСТКОВОГО МОЗКУ

**Мета:** дослідити взаємодію пухлинних клітин з деякими компонентами мікрооточення для визначення можливої ролі останніх у модифікації фенотипу пухлинних клітин при розвитку дисемінованого пухлинного процесу із залученням кісткового мозку (КМ). **Об'єкт і методи:** дослідження проводили з використанням біоптатів КМ хворих на рак молочної залози (РМЗ) з різним перебігом пухлинного процесу та постійних культур клітин: використовували методи роботи з культурами клітин, імуноцитохімічний та статистичний методи аналізу. За допомогою створеної системи безконтактного кокультивування пухлинних і нормальних клітин досліджували їх фенотипічний профіль, характеризуючи рівень експресії маркерів епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП) (білки адгезії та цитоскелета і транскрипційний фактор *Slug*), стовбурових пухлинних клітин (*CD44*), а також регулятора клітинного циклу *p21*. **Результати:** виявлено значну відмінність у ростових і фенотипічних характеристиках досліджуваних клітин залежно від ЕМП-статусу пухлинних клітин і від варіанта їх кокультивування: використання клітин з КМ пацієнтів з різним характером перебігу пухлинного процесу (прогресування чи ремісія захворювання). **Висновок:** виявлено модифікуючий вплив *in vitro* мононуклеарів КМ хворих на РМЗ на пухлинні клітини залежно від перебігу захворювання. Зокрема, встановлено факт стимуляції ЕМП пухлинних клітин при дії на них факторів, які, можливо, продукуються клітинами КМ хворих в стадії прогресування захворювання.

### ВСТУП

Пухлини, як відомо, включають декілька структурних елементів: злоякісно трансформовані клітини, кровеносні судини, клітини імунної системи, фібробласти, які сполучаються зазвичай позаклітинним матриксом та формують так звану пухлинну строму [1]. На цей час існує велика кількість інформації про роль і особливості взаємодії «пухлинної стромы» з неопластичними клітинами, однак ще досить багато питань залишаються без відповіді. Існують, зокрема, дані щодо підвищення «злоякісних властивостей» клітин раку молочної залози (РМЗ), в тому числі їх інвазивності та рухомості при взаємодії зі стромальними елементами [2]. У свою чергу, пухлинні клітини (ПК) індукують зміни в фібробластах, які з ними контактують [2], перетворюючи їх у міофібробласти, які активують програму епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП) в ПК, внаслідок чого в останніх починають домінувати мезенхімальні, активація яких формує високометастатичний фенотип клітин та максимально наближує

їх до стовбурових клітин з високим рівнем лікарської резистентності. Усі ці процеси проходять із залученням розчинних (гуморальних) факторів мікрооточення (цитокінів, факторів росту та ін.), які, в свою чергу, активують інші ланки взаємодії, залучені в «злоякісний транзит», зокрема, транскрипційні фактори, EPSTI1 (epithelial-stromal interaction 1) та ін. У результаті цього епітеліальні клітини втрачають здатність формувати щільні міжклітинні контакти, знижуються їх адгезивні властивості, вони набувають здатності до інвазії та міграції. Однак коли такі клітини досягають свого «місця призначення», відбувається зворотний процес — мезенхімально-епітеліальний перехід (МЕП), при якому вони знову набувають епітеліального фенотипу з підвищеною адгезією, що дає можливість їм прикріпитися до субстрату та дати ріст вторинному метастатичному вогнищу [3]. Розвиток метастазів залишається основною причиною загибелі хворих онкологічного профілю, саме тому подальше вивчення ролі міжклітинної взаємодії у складному та надзвичайно важливому біологічному процесі трансдиференціювання

дозволить значно поглибити розуміння механізмів його контролю і реалізації, що, як наслідок, може відкрити нові мішені в антиметастатичній терапії.

Принципово важливим для розробки підходів до антиметастатичної терапії є чітке уявлення про механізми так званого хомінг-ефекту і умови створення і тривалого виживання віддалених мікрометастазів. Добре відомо, що для багатьох локалізацій пухлинного процесу характерні певні органи і тканини організму як мішені переважного метастазування. Для РМЗ такою мішенню часто є кістковий мозок (КМ) і кістки. На цей час добре відома важлива роль стромальних клітин, зокрема фібробластів, як елементів мікрооточення ПК у контролі їх фенотипу і біологічної поведінки [4], однак роль клітин КМ як компонентів пухлинного мікрооточення дуже мало вивчена. Водночас КМ є осередком значної кількості клітин різного рівня диференціювання і різної комітованості. Це не тільки кровотворні клітини, але й клітини, здатні утворювати інші тканинні структури, наприклад судини і капіляри. Усі ці клітини є активними продуцентами цитокінів і хемокінів, які безперечно впливають на долю дисемінованих ПК. Більш того, саме ці розчинні компоненти часто й зумовлюють локалізацію мікрометастазів. Тому логічним є визначення впливу клітин КМ, особливо у порівняльному аспекті з фібробластними елементами, на фенотипічну конверсію і проліферативну активність клітин РМЗ, зокрема, при їх кокультуванні.

У рутинній практиці для дослідження впливу речовин різної природи (протипухлинні препарати, цитотоксичні чинники) застосовують ізольовані культури клітин (первинні культури клітин та постійні клітинні лінії) *in vitro*. Експериментальні системи *in vitro* з використанням клітинних ліній людини являють собою важливий інструмент для оцінки рівня і механізмів токсичності протипухлинних препаратів з метою більш чіткого визначення їх можливої протипухлинної дії *in vivo*. Основним недоліком такої системи *in vitro* є відсутність численних компонентів взаємодії, що існують у цілісному організмі між різними типами клітин, які представляють кожен окремих орган. В ідеалі такі модельні клітинні системи *in vitro* мають максимально відображати умови *in vivo*, зокрема, зі збереженням як видової, так і тканинної специфічності. Принципово новим підходом для визначення міжатканинної взаємодії *in vitro* стала створена А.Р. Лі зі співавторами система інтегрованих дискретних культур нормальних клітин різного гістогенезу (IdMOC) і клітин РМЗ для дослідження одночасної комбінованої токсичної дії хіміопрепаратів на ПК-мішені та на нормальні клітини організму (печінка, нирки, легені, ендотелій судин тощо) [5]. Подібна схема з деякими модифікаціями була розроблена нами для тестування токсичності хімічних сполук, зокрема солей важких металів, *in vitro* та отримала назву мультиорганної системи токсичності (МОСТ) [6]. У цій роботі для дослідження ролі клітинної вза-

ємодії в прогресуванні захворювання було розроблено нову клітинну систему з використанням первинних та постійних клітинних ліній різного генезу (ПК молочної залози людини та щура, нормальні фібробласти людини — НФЛ та щура — НФЩ, клітини з пунктів КМ хворих на РМЗ з різним перебігом захворювання).

Мета роботи — дослідити *in vitro* взаємодію ПК з деякими компонентами мікрооточення для визначення можливої ролі останніх у модифікації фенотипу ПК при розвитку дисемінованого пухлинного процесу із залученням КМ.

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Моделювання системи безконтактного кокультування клітин.** В якості матеріалу для кокультування використовували мононуклеари, які виділяли з КМ хворих на РМЗ, що перебували на лікуванні в Рівненському обласному онкологічному диспансері. Пункти КМ отримували шляхом пункції груднини через надріз шкіри для уникнення контамінації епітеліальними клітинами від хворих на РМЗ (стадії T1–4N1–2M0–1 та T1–4N0–2M0, гістологічний тип пухлини — інфільтративна протокова карцинома) до хірургічного втручання. Після проведеного лікування (радикальне хірургічне втручання та ад'ювантна хімотерапія) хворих розподілено на групи «прогресування» чи «ремісії». Підставою для поділу на групи були клінічний стан хворих, наявність ПК у КМ та високий рівень пухлиноасоційованих цитокінів у плазмі [7, 8]; при цьому було дотримано існуючих стандартів щодо повної, часткової ремісії або прогресування захворювання. У дослідженнях використовували зразки КМ від 3 хворих, у яких відзначали прогресування захворювання, та від 3 пацієнтів без ознак останнього. При цьому разом з виявленням цитокератинпозитивних клітин в КМ у хворих, в яких реєстрували прогресування процесу, відзначали високий рівень фактора некрозу пухлин (> 150 пкг/мл) в КМ і ПК, колоніестимулюючого фактора 1 (> 300 од./мл) в ПК, трансформуючого фактора росту  $\beta_1$  (> 10 нг/мл) та інтерлейкіну 6 (> 50 пкг/мл) в ПК [7, 8]. Усі хворі були проінформовані про обстеження та надали згоду на використання матеріалу в дослідницьких цілях.

Мононуклеари виділяли в градієнті щільності LSM 1077 («РАА», Австрія), двічі відмивали центрифугуванням в середовищі DMEM («РАА», Австрія) протягом 10 хв при 1000 об./хв, їх кількість обчислювали в камері Горяєва та застосовували кріоконсервацію (2,5–4 × 10<sup>6</sup> кл./ампулу).

Серед клітинних ліній використовували НФЛ і НФЩ лінії Wistar та клітини ліній РМЗ людини — T-47D, MCF-7 і щура — MRS [9, 10], що характеризуються домінуванням у популяції клітин з епітеліальним фенотипом, а також високоонкогенної сублінії MRS-T5, яка характеризується наявністю клітин тільки мезенхімального фенотипу. Усі клітинні лінії були отримані з клітинного бан-

ку ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. При проведенні експерименту клітини різного типу були фізично ізольовані одна від одної (рис. 1 а) і слугували контролем, однак дослідні лунки у варіанті кокультування були об'єднані між собою за допомогою спеціально зроблених каналів у стінці лунок так, щоб відбувалася взаємодія клітин через їх поживне середовище (рис. 1 б). Для характеристики фенотипічного профілю клітин обрано антигени, що є маркерами ЕМП (білки адгезії та цитоскелета — E-кадгерин, віментин, транскрипційний фактор Slug — ЕМП-профіль), антигени стовбурових пухлинних клітин CD44 та регулятора клітинного циклу p21<sup>waf</sup> (ендогенний інгібітор циклінзалежних кіназ).

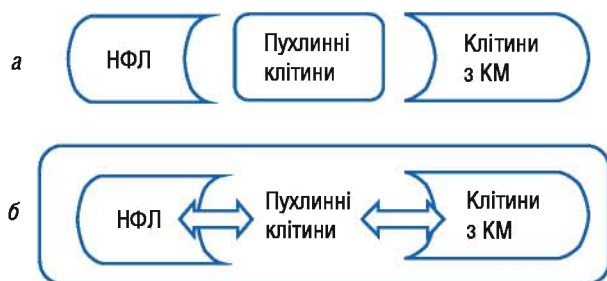


Рис. 1. Загальна схема безконтактного кокультування *in vitro*: а — контрольні лунки — ізольовані; б — лунки з безконтактним кокультуванням

**Культування клітин *in vitro*.** Клітини культивували в пластиковому посуді («ТРР», Італія) в середовищі DMEM («РАА», Австрія), яке містило 2 мМ L-глутаміну та NaHCO<sub>3</sub> з 10% сироватки ембріонів/новонароджених телят («РАА», Австрія) у зволоженій атмосфері при 37 °С у присутності 5% CO<sub>2</sub>. Кількість клітин після їх кокультування визначали шляхом фарбування кристалічним фіолетовим («Sigma», США) з наступною реєстрацією оптичної густини вмісту лунок за допомогою мультилуноквого спектрометра (Labsystems Multiskan PLUS) [11].

**Імуноцитохімічний аналіз.** При проведенні імуноцитохімічного (ІЦХ) аналізу клітини фіксували в фіксуєчому розчині (метанол + ацетон: 1:1) протягом 2 год за t -20 °С, інкубували з 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну (BSA) 20 хв. Потім наносили моноклональні антитіла в розведеннях згідно з інструкцією виробника: anti-E-cadherin (Thermo Scientific), anti-CD325 (N-Cadherin) (BioLegend), anti-Vimentin (Diagnostic BioSystems), anti-CD44 (Diagnostic BioSystems), SLUG (GeneTex), p21/waf1 (NeoMarkers) на 60 хв, після чого застосовували систему візуалізації Poly Vue (Thermo Scientific),

кон'юговану з пероксидазою, та виявляли активність ферменту із застосуванням в якості субстрату 3,3'-діамінобензидину (Thermo Scientific). Після проведення ІЦХ реакції препарати промивали водою та забарвлювали гематоксиліном Мейєра («Sigma») (15–30 с). Аналіз результатів проводили за обчисленням позитивних (+) клітин за допомогою мікроскопа AxioVert («Carl Zeiss», Німеччина) при збільшенні у 320 разів та оцінювали за допомогою класичного методу H-score:

$$S = 1 \cdot A + 2 \cdot B + 3 \cdot C,$$

де S — показник H-score, значення якого знаходяться у межах від 0 (відсутня експресія) до 300 (інтенсивна експресія у 100% клітин); A — відсоток слабо «забарвлених» клітин; B — відсоток помірно «забарвлених» клітин; C — відсоток сильно «забарвлених» клітин.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою математичної програми медико-біологічної статистики STATISTICA 6.0. Обчислення і порівняння достовірності відмінностей середніх значень проводили з використанням t-критерію Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для встановлення ЕМП-профілю ПК, що були включені в систему безконтактного кокультування, визначали експресію маркерів найбільш характерних для ЕМП-транзиту, зокрема експресію E- та N-кадгеринів, віментину та транскрипційного фактора мезенхімальних клітин Slug (табл. 1). Виявлено, що в ПК людини лінії T-47D мезенхімальний антигенний профіль більш виражений, ніж в клітинах лінії MCF-7, яка характеризується епітеліальним фенотипом. Клітини лінії MRS-T5, які відрізняються мезенхімальною морфологією, також характеризувалися і домінуванням мезенхімальних ознак порівняно з клітинами лінії MRS, яка є культурою з переважанням клітин з епітеліальним фенотипом, але й наявністю клітин з мезенхімальними ознаками (див. табл. 1).

При вивченні впливу на проліферативну активність ПК та фібробластів виявлено, що при кокультуванні кількість фібробластів практично не змінюється (відносно ізольованого контролю), тоді як кількість ПК суттєво варіює залежно від домінування в них ознак епітеліального чи мезенхімального фенотипу, тобто на число ПК суттєво впливає саме їх ЕМП-профіль (рис. 2). Визначено, що кількість ПК з домінуванням мезенхімальних характеристик (T-47D, MRS-T5) при їх безконтактному кокультуванні з фібробластами більше зростає відносно

Таблиця 1

Антигени	ЕМП маркери ПК ліній РМЗ														
	Е-кадгерин					N-кадгерин					SLUG				
	Клітини	T-47D	MCF-7	MRS		T5	T-47D	MCF-7	MRS		T5	T-47D	MCF-7	MRS	
			Е	М				Е	М				Е	М	
Оцінювання в балах за системою H-score	98 ± 11	126 ± 7	270 ± 21	22 ± 9	39 ± 4	81 ± 11	53 ± 3	72 ± 8	221 ± 28	174 ± 16	136 ± 21	54 ± 10	156 ± 26	224 ± 32	269 ± 11

контролю ( $p < 0,05$ ), ніж кількість ПК з переважанням епітеліального фенотипу (MCF-7, MRS).

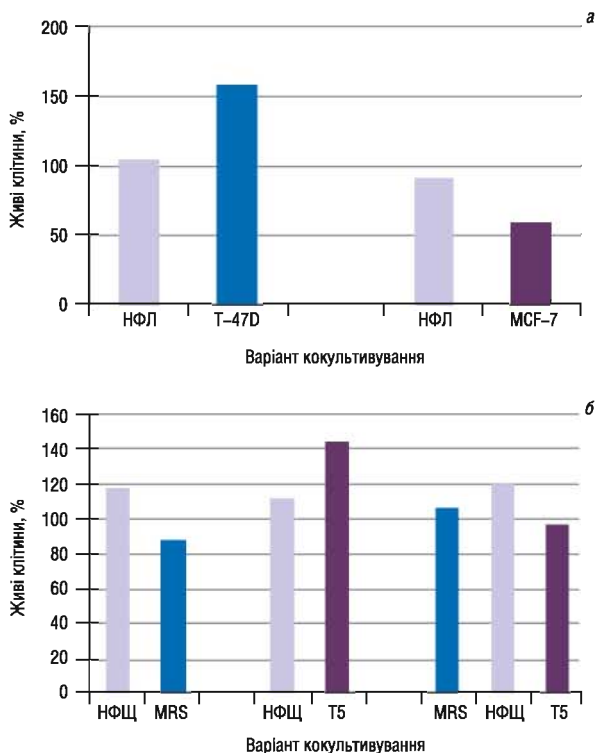


Рис. 2. Кількість життєздатних нормальних фібробластів та ПК людини (а) та щура (б) з різними фенотипічними характеристиками при їх сумісному безконтактному кокультуванні

Таким чином, виявлено суттєвий взаємовплив ПК та нормальних фібробластів, результати якого значно залежали від фенотипічного профілю ПК. Цікавими виявилися дані щодо сумісного кокультування фібробластів з ПК щура з мезенхімальними або епітеліальними характеристиками (варіант кокультування MRS + НФЦ + MRS-T5) (див. табл. 1). У цьому випадку відбувалася значна інгібіція клітин мезенхімального фенотипу лінії (MRS-T5) у присутності епітеліальних клітин MRS. Тобто, клітини більш диференційованого епітеліального фенотипу можуть пригнічувати ростовий потенціал клітин мезенхімального фенотипу. Це свідчить про можливість контролю клітинної проліферації на клонально-популяційному рівні із залученням у даний процес певних клітинних факторів, які формують фенотипічний профіль клітин.

Наступним етапом роботи було дослідження впливу додаткового фактора в новій інтегрованій системі *in vitro*, а саме — клітин, отриманих з пунктатів КМ хворих на РМЗ, оскільки КМ вважається депо для ПК клітин та є безпосереднім учасником мінімальної залишкової хвороби [12–14].

Виявлено суттєві зміни фенотипічних характеристик як пухлинних, так і нормальних клітин у системі безконтактного кокультування із додаванням клітин КМ, одержаних у хворих з різним перебігом процесу (табл. 2). При дослідженні білка — регуля-

тора клітинного циклу p21 суттєві зміни кількості позитивних клітин відзначали лише в нормальних фібробластах при їх кокультуванні з ПК. Водночас в останніх рівень експресії і субклітинна локалізація білка p21 не змінювалися при різних варіантах впливу. Локалізацію p21 в клітинах важливо було враховувати, оскільки в ядрі та цитоплазмі цей білок виконує протилежні функції. Зокрема, при локалізації в ядрі p21 є регулятором клітинного циклу шляхом інактивації транскрипційних факторів E2F1, с-Мус, STAT3 [15], а також інгібітором реплікації за рахунок пригнічення субодиниці ДНК-полімерази δ-білка PCNA. При локалізації в цитоплазмі p21 пригнічує утворення стрес-фібрину та фокальних контактів, внаслідок чого сприяє міграції клітин. Крім того, p21 виконує в цитоплазмі антиапоптозичні функції шляхом пригнічення активності проапоптозичних кіназ ASK-1, JNK, p38 та інгібіції прокаспази-3.

Таблиця 2

Експресія p21, CD44, віментину та Е-кадгерину в клітинах лінії РМЗ людини Т-47D без додаткового впливу (контроль) та в системі безконтактного кокультування *in vitro* з НФЛ та клітинами КМ

Варіант кокультування клітин	Білкові маркери <sup>1</sup>				
	p21		CD44	Віментин	Е-кадгерин
	Цитоплазматична локалізація	Ядерна локалізація			
Т-47D ізолювані (без впливу)	263 ± 24	187 ± 19	97 ± 11	0	98 ± 11
Т-47D варіант кокультування + НФЛ + КМ з групи «Прогресія»	274 ± 32	194 ± 12	122 ± 14	50 ± 6*	56 ± 3**
Т-47D варіант кокультування + НФЛ + КМ з групи «Ремісія»	255 ± 15	176 ± 10	58 ± 5**	0	104 ± 12

\* $p < 0,005$ ; \*\*  $p < 0,05$ ; <sup>1</sup>оцінка за методом H-Score, бали.

Цікаві дані одержано при дослідженні експресії CD44 — молекули адгезії, яка відіграє важливу роль у взаємозв'язку «пухлина-оточення» і залучена в процеси міграції та інвазії ПК. Крім того, CD44 використовують як маркер прогресування та метастазування при багатьох онкологічних захворюваннях, зокрема РМЗ; клітини з фенотипом CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> розглядають як стовбурові ПК. Нами виявлено збільшення на 26% кількості CD44-позитивних (CD44<sup>+</sup>) Т-47D клітин при їх кокультуванні з клітинами КМ хворих з групи «Прогресія» порівняно з контролем клітин в ізолюваних лунках. При використанні клітин КМ хворих з групи «Ремісія» як додаткового фактора впливу реєстрували протилежний результат — достовірне зменшення кількості CD44<sup>+</sup>-клітин ( $p < 0,005$ ) відносно ізолюваного контролю і достовірне зменшення кількості CD44<sup>+</sup>-клітин від-

Фенотипічні характеристики НФЛ безконтактного кокульттивування з ПК і клітинами КМ хворих на РМЗ

Клітини	Досліджувані маркери*				Віментин
	p21		SLUG		
	Цитоплазматична локалізація	Ядерна локалізація	Цитоплазматична локалізація	Ядерна локалізація	
НФЛ ізольовані (без впливу)	53 ± 7	0	186 ± 16	0	292 ± 8
НФЛ варіант кокульттивування + Т-47D + КМ з групи «Прогресія»	148 ± 22**	0	82 ± 12****	42 ± 4*****	300 ± 0
НФЛ варіант кокульттивування + Т-47D + КМ з групи «Ремісія»	0***	0	72 ± 10****	22 ± 1*****	300 ± 0

\*оцінка за методом H-Score, бали; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,02$ ; \*\*\*\*\*  $p < 0,002$ .

Таким чином, отримані факти підтверджують та певною мірою пояснюють відомі дані щодо активації фібробластів та їх конверсії в міофібробласти при кокульттивуванні з ПК [2], після чого «активовані» фібробласти починають стимулювати вже самі ПК. Стромальні елементи, складовими яких є і фібробласти, можуть бути індукторами транскрипційних факторів ПК, що в подальшому сприяє домінуванню в клітинах мезенхімальних ознак. Такі модуляції внутрішньоклітинних процесів відбуваються шляхом секреції клітинами низки факторів (цитокіни, фактори росту та ін.); одним з таких факторів, зокрема, може бути EPST1 (epithelial-stromal interaction 1). EPST1 був ідентифікований як interferon response gene саме при кокульттивуванні клітин РМЗ зі стромальними фібробластами [16, 17], а при імуногістохімічному аналізі пухлинного післяопераційного матеріалу хворих на РМЗ виявляли його підвищену експресію саме в пухлинному матеріалі (на відміну від контрольних тканин молочної залози); «найвищу інтенсивність експресії» EPST1 відзначали саме в ділянках пухлини, які тісно контактували зі строною [17].

## ВИСНОВКИ

1. За допомогою створеної системи безконтактного кокульттивування клітин різного генезу виявлено суттєву різницю в кількості ПК після їх взаємодії з фібробластами залежно від ЕМП-статусу ПК.
2. Виявлено різний модифікуючий вплив мононуклеарів КМ хворих на РМЗ на ПК залежно від перебігу захворювання (група «Ремісія» чи «Прогресія»).
3. Встановлено факт стимуляції ЕМП ПК РМЗ при дії на них розчинних факторів, які, можливо, продукуються клітинами КМ хворих на РМЗ в стадії прогресування захворювання.

Дані результати отримано за фінансової підтримки гранту Президента України для обдарованої молоді.

носно варіанта з кокультивуванням клітин КМ від хворих з групи «Прогресія» ( $p < 0,005$ ) (див. табл. 2).

При вивченні експресії в клітинах Т-47D ще одного білка, який характеризує міжклітинну адгезію та адгезію клітин до субстрату та властивий клітинам «епітеліального фенотипу», — Е-кадгерину — виявлено суттєве зменшення кількості позитивних клітин Т-47D у варіанті їх кокультивування з клітинами КМ хворих з групи «Прогресія» порівняно з контролем; кокультивування з клітинами КМ хворих з групи «Ремісія» не змінило кількості Е-кадгерин+ клітин РМЗ (див. табл. 2).

При дослідженні експресії білка цитоскелета віментину, характерного для клітин мезенхімальної природи, встановлено, що клітини Т-47D не експресують цей білок. Однак при кокультивуванні їх з КМ хворих з групи «Прогресія» з'являються клітини з його експресією, на відміну від повної відсутності віментин+ клітин в ізольованому контролі та у варіанті кокультивування з клітинами КМ хворих з групи «Ремісія».

Такі зміни фенотипічного профілю ПК Т-47D внаслідок кокультивування їх з компонентами мікрооточення (у цьому дослідженні з нормальними фібробластами та клітинами КМ хворих з різним перебігом пухлинного процесу) свідчать про суттєвий вплив клітин КМ та факторів, які вони продукують, на клітини РМЗ людини. При цьому залежно від стану пухлинного процесу хворого — прогресування захворювання або ремісія — результат впливу клітин КМ на ПК суттєво відрізняється. У варіанті з кокультивуванням з клітинами КМ хворих з групи «Ремісія» фенотипічний профіль ПК практично не відрізняється від контрольних клітин, тоді як у варіанті з використанням клітин КМ хворих з групи «Прогресія» відзначається запуск в ПК програми ЕМП, що асоціюється із набуттям більш агресивних ознак клітинами та можливим підвищенням їх метастатичного потенціалу.

При характеристиці фенотипічного профілю НФЛ після їх кокультивування з ПК Т-47D та клітинами з КМ хворих з різними варіантами перебігу пухлинного процесу досліджено експресію віментину, p21 та Slug. При цьому змін експресії віментину не виявляли при жодному з варіантів кокультивування, тоді як при дослідженні експресії транскрипційного фактора мезенхімальних клітин Slug виявляли зміни як кількості Slug+ клітин, так і локалізації цього білка в клітинах. Зокрема, відзначали релокалізацію Slug в ядро НФЛ при їх кокультивуванні з ПК та клітинами КМ хворих, що підтверджує відомі факти активації фібробластів при дії ПК з набуттям ними ознак міофібробластів. Також виявлено цікавий факт наявності білка p21 тільки в цитоплазмі нормальних фібробластів (табл. 3), при цьому кількість p21+ клітин при кокультивуванні з клітинами КМ хворих з групи «Прогресія» значно зросла порівняно з контролем ( $p < 0,005$ ).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. de Neergaard M, Kim J, Villadsen R, *et al.* Epithelial-stromal interaction 1 (EPST11) substitutes for peritumoral fibroblasts in the tumor microenvironment. *Am J Pathol* 2010; **176** (3): 1229–40.
2. Tran-Thanh D, Done SJ. The role of stromal factors in breast tumorigenicity. *Am J Pathol* 2010; **176** (3): 1072–74.
3. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; **119** (6): 1420–28.
4. Strell C, Rundqvist H, Ostman A. Fibroblasts — a key host cell type in tumor initiation, progression and metastasis. *Upsala J Med Sci* 2012; **117**: 187–195.
5. Li AP, Bode C, Sakai Y. A novel *in vitro* system, the integrated discrete multiple organ cell culture (IdMOC) system, for the evaluation of human drug toxicity: comparative cytotoxicity of tamoxifen towards normal human cells from five major organs and MCF-7 adenocarcinoma breast cancer cells. *Chem-Biol Interact* 2004; **150** (1): 129–36.
6. Трахтенберг ІМ, Кудрявцев ЮЙ, Марченко МЛ та ін. Удосконалена модель мультиорганної системи токсичності ксенобіотиків на основі кокультування клітин людини *in vitro*. *Суч прбл токсикол* 2011; (1–2): 60–4.
7. Семесюк НІ, Жильчук АВ, Безденежних НО та ін. Фактор некрозу пухлин в периферичній крові та кістковому мозку хворих на рак молочної залози як маркер прогресії пухлинного процесу. *Онкологія* 2012; **14** (4): 293–7.
8. Семесюк НІ, Жильчук АВ, Безденежних НО та ін. Прогностичне значення рівня колоніестимулюючого фактора 1 в периферичній крові та кістковому мозку хворих на рак молочної залози. *36. Гематол перелив крові* 2012; (36): 232–7.
9. Кудрявцев ЮЙ, Безденежних НА, Трегубова НА *и др.* Новая модель экспериментальной онкологии: клеточная линия МКС из спонтанного рака молочной железы крысы, склонная к модуляции трансформированного фенотипа. В: XI з'їзд онкологів України. Судак, 2006, 29 с.
10. Кудрявцев ЮЙ, Безденежних НО, Ковальова ОА та ін. Клітинна лінія МКС з аденокарциноми молочної залози шура як модель для дослідження механізмів епітеліально-мезенхімального переходу пухлинних клітин. *Клин онкол* 2011, Спец вып II: С. 218.
11. Vega-Avila E, Pugsley KM. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc* 2011; **54**: 10–4.
12. Krishnamurthy S, Cristofanilli M, Singh B, *et al.* Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer. *Cancer* 2010; **116** (14): 3330–7.
13. Bischoff J, Rosenberg R, Dahm M, *et al.* Minimal residual disease in bone marrow and peripheral blood of patients with metastatic breast cancer. *Recent Results Cancer Res* 2003; **162**: 135–40.
14. Diel IJ, Cote RJ. Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2000; **26** (1): 53–65.
15. Романов ВС. Регулятор клеточного цикла p21Waf1: роль в онкоген-индуцированной трансформации и клеточном старении [Автореф дис... канд биол наук]. Санкт-Петербург: Институт цитологии РАН, 2011. 26 с.
16. Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Villadsen R, *et al.* Identification of EPST11, a novel gene induced by epithelial-stromal interaction in human breast cancer. *Genom* 2002; **79** (5): 703–10.

17. Honeth G, Bedahl PO, Ringner M, *et al.* The CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res* 2008; **10** (3): R53.

### MODIFICATION OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN BREAST CANCER CELLS BY MEANS OF THEIR COCULTIVATION WITH FIBROBLASTS AND BONE MARROW CELLS

N.O. Bezdenezhnykh, N.I. Semesiuk, O.O. Lykhova, V.E. Zhylchuk, Yu.I. Kudryavets

**Summary.** *Objective:* the goal of our study was to investigate the interaction between tumor cells and some components of their microenvironment for identification leading factors in tumor progression. **Object and methods:** we used primary (biopsies of bone marrow breast cancer patients with different stages of disease) and cell culture lines (human breast cancer cell line, rat breast cancer cell line, human normal fibroblasts) with immunocytochemical analysis and statistical methods. The proliferative potential and immunophenotypical features of tumor and normal cells were revealed in our new co-cultivation system *in vitro*, which include investigation to markers of epithelial — mesenchymal transition and tumor stem cells (adhesion protein and cytoskeleton — E-cadherin, Vimentin, CD44), protein of cell cycle p21 and transcription factor Slug. **Results:** it was revealed the great differences in growth and phenotypic features of these cells which depended on EMT status of tumor cells and version of co-cultivation (using the bone marrow cells of breast cancer patients with progression or remission stage of disease). **Conclusion:** modifying effects of bone marrow mononuclears of breast cancer patients in tumor cells, depending on the disease were found *in vitro*. In particular, the fact that epithelial-mesenchymal transition stimulation of tumor cells exposed to factors that may be produced by bone marrow cells of patients in stage of disease progression was determined.

**Key words:** breast cancer, epithelial-mesenchymal transition, microenvironment, bone marrow, co-cultivation.

#### Адреса для листування:

Безденежних Н.О.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України  
E-mail: beznalia@mail.ru

Одержано: 01.07.2013