

**МОДИФІКАЦІЯ В ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ
АНТИГЕННИХ ХАРАКТЕРИСТИК, АСОЦІЙОВАНИХ
З ЕПІТЕЛІАЛЬНО-МЕЗЕНХІМАЛЬНИМ ТРАНЗИТОМ,
ПІД ВПЛИВОМ ДЕЯКИХ ЦИТОКІНІВ
ТА ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ**

Н.О. Безденєжних, О.О. Лихова, Н.І. Семесюк, Ю.Й. Кудрявцев

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.С. Кавецького НАН України, Київ

***Резюме.** Імунофенотиповий профіль пухлинних клітин, як відомо, є відображенням їх певних функціональних характеристик і рівня диференціювання. На фенотип пухлинних клітин та їхні біологічні характеристики суттєво впливає пухлинне мікрооточення, зокрема елементи позаклітинного матриксу і цитокіни.*

***Метою** даної роботи було дослідження впливу компонентів мікрооточення пухлинних клітин на їхню чутливість до хіміопрепаратів та зміни імунофенотипових характеристик при дії різних факторів (інтерферону, фактору некрозу пухлин, протипухлинних препаратів).*

В роботі використані методи культури клітин та імуноцитохімії.

В результаті досліджень встановлено, що тривала експозиція пухлинних клітин з інтерфероном викликає пригнічення експресії їх мезенхімальних маркерів та активує епітеліальні маркери клітин. Виявлено, що модифікація клітин інтерфероном сприяє інгібіції дії фактору некрозу пухлин як активатора епітеліально-мезенхімального переходу пухлинних клітин. Показано суттєві зміни антигенних характеристик пухлинних клітин після впливу на них хіміопрепаратів залежно від механізму їх дії.

***Ключові слова:** пухлинні клітини, мікрооточення, епітеліально-мезенхімальний перехід, цитокіни, протипухлинні препарати.*

**МОДИФИКАЦИЯ АНТИГЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОК, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЭПИТЕЛИАЛЬНО-
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМ ТРАНЗИТОМ, ПОД ВЛИЯНИЕМ НЕКОТОРЫХ
ЦИТОКИНОВ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Н.А. Безденежных, А.А. Лихова, Н.И. Семесюк, Ю.И. Кудрявцев

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

***Резюме.** Иммунофенотипических профиль опухолевых клеток, как известно, является отражением определенных их функциональных характеристик и уровня дифференцировки. На фенотип опухолевых клеток и их биологические*

характеристики существенно влияет опухолевое микроокружение, в частности элементы внеклеточного матрикса и цитокины.

Целью данной работы было исследование влияния компонентов микроокружения опухолевых клеток на их чувствительность к химиопрепаратам, а также изменение иммунофенотипических характеристик клеток при воздействии на них различных факторов (интерферона, фактора некроза опухоли, противоопухолевых препаратов).

В работе использованы методы культуры клеток и иммуноцитохимии.

В результате исследований установлено, что длительная экспозиция опухолевых клеток с интерфероном вызывает угнетение экспрессии их мезенхимальных маркеров и активирует эпителиальные маркеры клеток. Выявлено, что модификация клеток интерфероном способствует ингибции действия фактора некроза опухоли как активатора эпителиально-мезенхимального перехода опухолевых клеток. Показано существенные изменения антигенных характеристик опухолевых клеток после воздействия на них химиопрепаратов в зависимости от механизма их действия.

Ключевые слова: опухолевые клетки, микроокружение, эпителиально-мезенхимальный переход, цитокины, противоопухолевые препараты.

MODIFICATION OF TUMOR CELLS ANTIGENIC CHARACTERISTICS ASSOCIATED WITH EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION UNDER THE IMPACT OF SOME CYTOKINES AND ANTICANCER DRUGS

N. Bezdienieznykh, O. Lykhova, N. Semesiuk, Y. Kudryavets

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,
NAS of Ukraine, Kyiv

Summary. Well known that immunophenotypic profile of tumor cells reflects of certain their functional characteristics and level of differentiation. On the phenotype of tumor cells and their biological properties significantly affect tumor microenvironment, including extracellular matrix components and cytokines.

The aim of this work was to study the influence of the components of the tumor cells microenvironment on their sensitivity to chemotherapy and changes immunophenotypic characteristics under the influence of various factors (interferon, tumor necrosis factor, anticancer drugs).

Cell culture and immunocytochemical methods were used in this study.

Results. We have established that prolonged exposure of tumor cells with interferon causes inhibition of mesenchymal markers and activates epithelial characteristics of cells. Also, revealed that modification of cells contributes to inhibition by interferon action of tumor necrosis factor as activator of epithelial-mesenchymal transition of tumor cells. It was shown significant changes in the antigenic characteristics of tumor cells after its exposure to chemotherapeutic drugs depending on their mechanism of action.

Key words: tumor cell microenvironment, epithelial-mesenchymal transition, interferon, tumor necrosis factor, cytokines, anticancer drugs.

Одним із факторів для прогнозування перебігу захворювання онкологічних хворих є імунотиповий профіль пухлини і, зокрема, характеристика пухлини на предмет маркерів епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП), який грає важливу роль в набутті епітеліальними клітинами мезенхімальних характеристик, асоційованих з підвищенням інвазивної та міграційної здатності клітин і формуванням метастатичного фенотипу. На фенотип пухлинних клітин та їхні біологічні характеристики суттєво впливає пухлинне мікрооточення, яке складається зі стромальних елементів, компонентів позаклітинного матриксу та розчинних факторів [1–3].

Розуміння взаємозв'язку процесу епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП) пухлинних клітин з прогресією захворювання та моніторинг його в клінічній практиці є надзвичайно актуальним питанням, оскільки відслідковування такої «пластичності» клітин в процесі розвитку злоякісного новоутворення та появи метастатичних чи вторинних пухлинних вогнищ дасть змогу виділити нові мішені для таргетного лікування та корегувати складові терапії хворих на рак. Характерною особливістю ЕМП є порушення міжклітинних контактів та підвищення клітинної рухомості, що призводить до втрати ознак, властивих епітеліальним попередникам. У результаті ЕМП з'являються клітини, близькі до мезенхімального фенотипу, які володіють високою здатністю до міграції і, відповідно, до інвазії і дисемінації, що призводить до розвитку метастатичного процесу [6, 8]. Ці клітини також більш стійкі до апоптозу, до дії хіміопрепаратів. Стандартні маркери ЕМП включають зміни експресії молекул адгезії і цитоскелету: кадгеринів, віментину, β -катеніну, цитокератинів та підвищену експресію транскрипційних факторів, таких як Snail1 (Snail), Snail2 (Slug), Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2, а також адаптерного білка Dab 2, що пригнічують продукцію E-кадгерину [5, 6]. Найочевиднішим свідченням залучення ЕМП до онкогенезу є властивість багатьох регуляторів ЕМП стимулювати утворення пухлин та/або метастазів [5, 10]. Цитокіни і фактори росту, що є важливими компонентами пухлинного мікрооточення, активно впливають на функціонування програми ЕМП, як правило, стимулюючи її. Нещодавно доведено, що пухлинні клітини продукують фактори, які запускають процес ЕМП в ендотеліальних клітинах капілярів пухлин, що сприяє метастазуванню. Також існують дані щодо взаємовпливу трансформованих клітин раку молочної залози та фібробластів [4], що призводить до підвищення «злоякісних властивостей», в тому числі інвазивності та рухомості пухлинних клітин при зв'язку їх зі стромальними елементами [5, 7, 9, 11]. Подібні зміни викликають і компоненти позаклітинного матриксу – колаген, ламінін, фібронектин та

ін. Крім того, пухлинні клітини під час розвитку пухлинного процесу зазнають впливу багатьох факторів як ендогенної, так і екзогенної природи, зокрема і протипухлинних препаратів, що є компонентами лікувальної схеми хворих на рак. При цьому, які зміни відбуваються в пухлинах на клітинному рівні, зокрема, в імунотипових характеристиках останніх є надзвичайно важливим, оскільки це є ключовим фактором у визначенні їх поведінки і, як наслідок, характеру подальшого розвитку пухлинного процесу в цілому. Саме тому метою даної роботи було дослідження антигенних характеристик пухлинних клітин після дії на них чинників різної природи: цитокінів (інтерферону (ІФН), фактору некрозу пухлин (ФНП)), протипухлинних препаратів різного класу та механізму дії (Доксорубіцин, Цисплатин, Вінорельбін) і субстрату, з яким пухлинні клітини знаходяться в прямому контакті, що є першою ланкою впливу на адгезивні властивості клітин.

Матеріали і методи досліджень. *Культивування клітин та дослідження їх чутливості до протипухлинних агентів.* Клітини А-549 (отримані з Банку Клітинних ліній з тканин людини та тварин, ІЕПОР ім.Р.С.Кавецького НАН України) культивували у повному поживному середовищі RPMI 1640 (РАА) з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (РАА) та інкубували при 37°C в зволоженій атмосфері та 5% CO₂. Для вивчення модифікуючої дії ІФН на пухлинні клітини їх довгостроково (до року) культивували *in vitro* в присутності зростаючих концентрацій цитокіну (від 100 до 10 тис. МО/мл). При цьому використовували рекомбінантний лейкоцитарний інтерферон людини І-го типу (інтерферон-альфа 2b, «Лаферобіон», БіоФарма).

Для дослідження впливу біологічно-активних речовин різної природи (ІФН, ФНП, протипухлинних препаратів) та різних субстратів клітини висівали на 96-лункові планшети з контрольним покриттям (стандартні планшети для культур клітин – TPP), з колагеновим покриттям (Greiner) та на неадгезивні планшети, через 24 години вносили досліджувані препарати (ІФН – 10 тис. МО/мл для ІФН-модифікованої лінії А-549, ФНП (Sigma) – 500 МО/мл, протипухлинні препарати в дозах IC50: Доксорубіцин, 0,1 мкг/мл (Ебеве), Цисплатин, 2,0 мкг/мл (Ебеве); Вінорельбін, 0,1 мкг/мл (Медак) і інкубували клітини протягом 48 год за стандартних умов, після чого проводили імунцитохімічний аналіз на планшетах.

Імуноцитохімічний аналіз. Клітини фіксували в фіксуючому розчині (метанол + ацетон: 1:1) протягом 2 годин за температури -20°C, інкубували з 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну (BSA) 20 хвилин. Потім наносили моноклональні антитіла в розведеннях згідно інструкції виробника (anti-CD44 (Diagnostic BioSystems), anti-CD325 (N-Cadherin, BioLegend), anti-E-cadherin (ThermoScientific), anti-Vimentin

(DiagnosticBioSystems), SLUG (GeneTex), Twist1 (GeneTex) на 60 хвилин, після чого застосовували систему візуалізації Poly Vue (ThermoScientific), кон'юговану з пероксидазою та виявляли активність ферменту із застосуванням в якості субстрату діамінобензидин (ThermoScientific). Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивали водою та дофарбовували гематоксилін-еозином (to Mayer, Sigma) (15–30 секунд). Аналіз результатів проводили за підрахунком позитивних (+) клітин за допомогою мікроскопу AxioVert (Carl Zeiss) при збільшенні у 320 разів та оцінювали за допомогою класичного методу H-Score: $S=1xA+2xB+3xC$, де S – показник «H-Score», значення якого знаходяться у межах від 0 (білок не експресується) до 300 (сильна експресія у 100% клітин); A – % слабо «зафарбованих» клітин, B – % помірно «зафарбованих» клітин, C – % сильно «зафарбованих» клітин.

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

Результати та їх обговорення. Виявлено суттєве збільшення кількості E-кадгерин-позитивних (E-кадгерин+) клітин при тривалій модифікації їх ІФН, при цьому навіть при дії ФНП, який вважається «активатором» ЕМП, кількість E-кадгерин+ клітин не зменшувалась (табл. 1). Крім того, суттєво підвищувалась кількість позитивних клітин (особливо в вихідній сублінії \approx в 2–2,5 рази) після дії на них деяких протипухлинних препаратів, а саме доксорубіцину та цисплатину, при дії ж вінорельбіну аналогічний ефект виявлявся лише на колагеновому субстраті (табл. 2).

Інший білок системи адгезії N-кадгерин, наявність якого характерна для клітин мезенхімального фенотипу, виявлявся практично у 100% клітин вихідної лінії та клітин, культивованих з ФНП. При цьому в клітинах модифікованих ІФН% N-кадгерин – позитивних клітин був значно нижчим (таблиця 1) при будь-яких впливах досліджуваних екзогенних біологічно-активних речовин. Особливо цікавим виявився факт суттєвого зменшення (\approx в 4 рази) кількості N-кадгерин+ клітин в вихідній сублінії після дії протипухлинних хіміопрепаратів (табл. 2).

При дослідженні білка цитоскелету клітин, який також властивий мезенхімальним клітинам – Віментину, виявили зміни в кількості позитивних клітин і в контрольній, і в ІФН-модифікованій лінії при «неадгезивних умовах росту»: збільшення числа Віментин+клітин при дії екзогенного ФНП, доксорубіцину, цисплатину та вінорельбіну (табл. 1, 2).

Таблиця 1

**Білки системи адгезії та цитоскелету клітин А-549
за умов тривалої модифікації їх ІФН та дії екзогенного ФНП**

Антигени (оцінка за системою Н-score в балах)	Клітини					
	А-549			ІФН – модифіковані А-549		
	Тип покриття					
	Конт- роль	Колаген	Неадгезивне покриття	Контроль	Колаген	Неадгезивне покриття
Е - кадгерин	75±11	64±5	52±10	124±19	240±23	112±4
N - кадгерин	272±32	281±21	232±11	62±5	156±15	59±17
Віментин	214±21	242±11	164±9	91±13	196±16	75±12
	+ екзогенний ФНП					
Е - кадгерин	52±9	79±11	68±4	182±13	232±4	160±18
N - кадгерин	286±35	290±10	250±17	92±2	105±7	60±3
Віментин	264±21	300±0	238±22	154±19	240±22	180±19

Таблиця 2

**Білки системи адгезії та цитоскелету клітин А-549
за умов тривалої модифікації їх ІФН та дії протипухлинних
хіміопрепаратів різних класів**

Антигени (оцінка за системою Н-score в балах)	Клітини					
	А-549			ІФН – модифіковані А-549		
	Тип покриття					
	Контроль	Колаген	Неадгезивне покриття	Контроль	Колаген	Неадгезивне покриття
	Препарати					
	Доксорубіцин					
Е- кадгерин	132±14	121±9	58±12	196±32	300±0	79±9
N- кадгерин	54±4	136±32	49±8	32±2	182±14	41±4
Віментин	201±12	231±2	87±18	121±26	232±20	184±11
	Цисплатин					
Е- кадгерин	162±8	168±34	62±12	101±10	227±23	136±8
N- кадгерин	272±25	236±11	39±3	95±11	121±21	94±16
Віментин	245±32	232±28	245±31	151±22	228±13	255±32
	Вінорельбін					
Е- кадгерин	58±4	171±9	96±19	142±21	258±19	92±32
N- кадгерин	101±13	242±19	54±7	71±11	193±22	132±16
Віментин	215±23	274±16	251±32	172±18	209±11	136±29

Також було виявлено суттєве збільшення кількості SLUG-позитивних клітин при дії на пухлинні клітини всіх досліджуваних протипухлинних препаратів, при цьому спостерігалось посилення ефекту при додатковому впливі колагенового субстрату (таблиця 3, 4). Цікавим виявився факт, що даний транскрипційний фактор, який також є маркером мезенхімальних клітин, виявлявся в суттєво меншій кількості клітин за умов їх модифікації ІФН, особливо при використанні неадгезивного субстрату. Навіть при дії на ІФН-модифіковані клітини ФНП кількість SLUG-позитивних клітин збільшувалась тільки за умов колагенового субстрату, при штучному зниженні адгезії клітин кількість SLUG +-клітин не змінювалась при дії ФНП та несуттєво (відносно вихідної лінії А-549) збільшувалась при дії протипухлинних хіміопрепаратів (таблиця 3, 4). Що стосується іншого транскрипційного фактору Twist, який також відіграє важливу роль при ЕМП клітин, було встановлено, що Twist-позитивні клітини з ядерною локалізацією АГ (де даний транскрипційний фактор є активним) виявляються тільки в вихідних клітинах А-549 після дії на них екзогенних чинників: ФНП, доксорубіцину, цисплатину та вінорельбіну (таблиця 3, 4). При цьому в ІФН-модифікованій лінії клітин А-549 в жодному варіанті не визначалось Twist+-клітин з ядерною локалізацією, кількість клітин з цитоплазматичною локалізацією Twist була суттєво меншою в порівнянні з вихідними А-549 при будь-яких варіантах впливу (різні субстрати, екзогенні речовини).

Таблиця 3

**Транскрипційні фактори клітин А-549
за умов модифікації їх ІФН та дії екзогенного ФНП**

Антигени (оцінка за системою H-score в балах)	Клітини					
	А-549			ІФН – модифіковані А-549		
	Тип покриття					
	Контроль	Колаген	Неадгезивне покриття	Контроль	Колаген	Неадгезивне покриття
Twist (ЦП/Я)*	105±16 / 0	95±4 / 0	210±32 / 0	75±6 / 0	110±9 / 0	85±4 / 0
SLUG (ЦП/Я)	95±19 / 210±23	145±29 / 285±12	276±10 / 256±24	44±9 / 82±12	184±13 / 162±26	24±5 / 42±9
	+ екзогенний ФНП					
Twist (ЦП/Я)	125±11 / 0	240±42 / 22±8	140±10 / 0	110±13 / 0	90±7 / 0	44±2 / 0
SLUG (ЦП/Я)	95±9 / 182±19	224±32 / 285±11	244±6 / 262±32	38±2 / 114±15	190±9 / 224±21	52±2 / 74±11

* ЦП / Я – цитоплазма/ядро (локалізація антигену в відповідному компартменті)

Транскрипційні фактори клітин А-549 за умов модифікації їх ІФН та дії протипухлинних препаратів різного механізму дії

Антигени (оцінка за системою H-score в балах)	Клітини					
	А-549 (вихідні)			ІФН – модифіковані А-549		
	Тип покриття					
	Контроль	Колаген	Неадгезивне покриття	Контроль	Колаген	Неадгезивне покриття
	Препарати					
	Доксорубіцин					
Twist (ЦП /Я)*	201±32 / 34±6	276±20 / 62±15	248±42 / 0	102±9 / 0	211±19 / 0	39±3 / 0
SLUG (ЦП /Я)	141±11 / 276±22	282±24 / 290±11	256±11 / 294±0	60±5 / 180±5	101±22 / 234±18	106±29 / 174±10
Цисплатин						
Twist (ЦП /Я)	244±42 / 0	265±32 / 58±0	121±16 / 0	172±10 / 0	142±9 / 0	121±21 / 0
SLUG (ЦП /Я)	290±10 / 282±18	300±0 / 296±0	270±25 / 280±10	62±5 / 234±12	142±21 / 260±10	37±8 / 132±11
Вінорельбін						
Twist (ЦП /Я)	268±22 / 0	221±18 / 90±22	196±26 / 0	105±8 / 0	122±21 / 0	105±16 / 0
SLUG (ЦП /Я)	90±10 / 201±27	280±0 / 286±10	74±11 / 96±4	124±11 / 138±7	210±20 / 242±11	141±13 / 180±32

* ЦП / Я – цитоплазма / ядро (локалізація антигену в відповідному компартменті)

Висновки

1. Встановлено, що тривала модифікація клітин раку легені лінії А-549 інтерфероном викликає пригнічення мезенхімальних маркерів клітин та активує їхні епітеліальні характеристики.

2. Виявлено, що довгострокова інкубація клітин з інтерфероном створює перешкоду на шляху дії фактору некрозу пухлин як активатора ЕМП пухлинних клітин.

3. Встановлено, що короткотермінова дія на клітини лінії А-549 та її ІФН-модифікованої сублінії Доксорубіцину сприяє селекції клітин з домінуванням епітеліальних характеристик, тоді як Цисплатин діє як активатор мезенхімального фенотипу пухлинних клітин незалежно від використаного субстрату – при цьому Вінорельбін найбільше впливав на білок цитоскелету – віментин та транскрипційний фактор SLUG – збільшуючи кількість позитивних клітин як у вихідних клітинах А-549, так і після їх модифікації ІФН.

Подяка. Результати даної роботи були отримані за підтримки Гранту Президента України для обдарованої молоді (договір № 54/43 від 6.08.2014 р.) та НДР за договором №2.2.5.388 від 13.02.2014 р. за підтримки НАН України.

Література

1. Impact of stromal cell components of tumor microenvironment on epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells / N. Bezdenezhnykh [et al.] // *Exp Oncol.* – 2014. – V.36 (2). – P. 72–78.
2. Castaco Z. The tumor macroenvironment and systemic regulation of breast cancer progression / Z. Castaco, K. Tracy, SS. McAllister // *Int J Dev Biol.* – 2011. – V. 55. – P. 889–97.
3. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death / M. Castells [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2012. – V. 13. – P. 9545–71.
4. Danh Tran-Thanh. The role of stromal factors in breast tumorigenicity / Danh Tran-Thanh, Susan J.Done // *The American Journal of Pathology.* – 2010. – V. 176 (3). – P. 1072–1074.
5. Kalluri R. The basics of epithelial-mesenchymal transition / R. Kalluri, R.A.Weinberg // *J. Clin. Invest.* – 2009. – V. 119. – P. 1420–1428.
6. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition / S. Lamouille [et al.] // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* – 2014. – V. 15. – P. 178–196.
7. Schiavoni G. The tumor microenvironment: a pitch for multiple players / G.Schiavoni, L.Gabriele, F.Mattei // *Front Oncol.* – 2013. – V. 3. – P. 90.
8. Singh A. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer / A. Singh, J. Settleman // *Oncogene.* – 2010. – V. 29. – P. 4741–4751.
9. Strell C. Fibroblasts – a key host cell type in tumor initiation, progression and metastasis / C. Strell, H. Rundovist, A.Ostman // *Upsala J Med Sci.* – 2012. – V. 117. – P. 187–195.
10. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease / J.P. Thiery [et al.] // *Cell.* – 2009. – V. 139 (5). – P. 871–890.
11. Witz IP. The tumor microenvironment: the making of a paradigm cancer microenvironment // *Cancer Microenviron.* – 2009. – V. 2. – P. 9–17.