

ГІСТОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ АНГІОГЕНЕЗУ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС ЗА ВПЛИВУ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ

Г.В. ОСТРОВСЬКА¹, Л.В. ГАРМАНЧУК¹, Ю.В. СТЕПАНОВ², Т.В. БУКРЕЄВА³, Н.М. ХРАНОВСЬКА⁴

¹ ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, проспект Академіка Глушкова, 2, Київ, 02000, Україна

² Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна

³ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

⁴ Національний Інститут раку, вул. Юлії Здановської, 33/43, Київ, 03022, Україна

E-mail: g_ostrovska@knu.ua, liudmyla_garmanchuk@ukr.net, lesteprom@gmail.com, tahbko@gmail.com, natalia.khranovska@unci.org.ua

В роботі досліджено і проаналізовано морфологічні особливості процесів ангіогенезу в перевивних пухлинах карциноми легень Льюїса (LLC) при їх самостійному розвитку та під впливом кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти людини (hP-MSC) за різних умов введення. В пухлинах LLC виявлено більш ранній (10 день) початок ангіогенезу, з вираженим екстрамендулярним гемопоезом і формуванням неструктурованих просудинних структур. Показано, що в цілому hP-MSC забезпечують більш структурно досконалий ангіогенез в пухлині, з формуванням на 15-й день судинних утворень, що оточені клітинною стінкою, сформованою з клітин самої пухлини. Виявлено різні морфологічні форми неангіогенезу як в пухлинах LLC, що розвиваються самостійно, так і при різних способах введення hP-MSC – при одночасній інюкуляції з пухлинними клітинами і при системному введенні (внутрішньовенному). Проте, більш активний неангіогенез в пухлинах LLC відмічено при системному внутрішньовенному введенні hP-MSC.

Ключові слова: пухлинний ангіогенез, васкуляризація, карцинома легень Льюїса (LLC), кріоконсервовані мезенхімальні стовбурові клітини плаценти (hP-MSC).

Вступ. Формування системи кровопостачання в пухлинних тканинах відіграє важливу роль у зростанні пухлини та метастазуванні. Неангіогенез в пухлинах (так як і в ембріогенезі, і в постнатальному розвитку) звичайно поділяють на васкулогенез, утворення кровоносних судин de novo, і власне ангіогенез – про-

цес утворення нових кровоносних судин з існуючих судин.

Ангіогенез відповідає за ремоделювання та розширення оточуючої пухлину кровоносної мережі і включає два різні механізми: ендотеліальне проростання (*endothelial sprouting*) та інвагінальний/розщеплюючий мікросудинний ріст (*intussusceptive growth*), у той час як васкулогенез включає диференціювання кровоносних судин in situ з клітин-попередників (Patan, 2004).

Неангіогенез в пухлинах звичайно залежить від низки факторів, що продукуються як самими пухлинними клітинами так і їхнім оточенням. Цей процес включає активацію ряду сигнальних шляхів, що призводить до секреції проангіогенних факторів, які стимулюють проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин, а також інші способи формування циркуляторного русла в пухлинних тканинах. Зокрема, одним з найважливіших у васкулогенезі та ангіогенезі вважається vascular endothelial growth factor (VEGF), широкий спектр дії якого націлений не тільки на ендотеліальні клітини, але й на низку інших типів клітин. Крім того, даний фактор представлений цілою родиною споріднених білків (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C), плацентарний фактор росту (PlGF) (Apte et al, 2019). Все це в значній мірі й пояснює його важливу і різноманітну роль як в у забезпеченні фізіологічного судинного гомеостазу, так і у патогенних ефектах (пухлинний ріст та інші патології).

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2024

Пухлинний ангиогенез становить серйозну проблему при лікуванні раку. Утворення нових кровоносних судин може сприяти поширенню пухлинних клітин і знижувати ефективність хіміотерапії та променевої терапії. Крім того, особливості пухлинного ангиогенезу можуть призвести до розвитку аномальних кровоносних судин з недосконалою організацією, що обумовлює порушення циркуляції і призводить до пошкодження тканин і запальних процесів. Тому вкрай важливо зрозуміти особливості, фактори і механізми, що лежать в основі як розвитку, так і пригнічення ангиогенезу в пухлинах. Одним з напрямків досліджень таких особливостей є вивчення ролі мезенхімальних стовбурових клітин (MSC) у модулюванні ангиогенезу в пухлинах.

MSC самі здатні до диференціації в різні види клітин, а також, залежно від мікрооточення, виділяють різні фактори, що можуть паракринно впливати на процеси диференціації і функціонування інших клітин, зокрема – на ангиогенез (Tao et al, 2016). Вони можуть посилювати ангиогенез, вивільняючи цілу низку факторів росту ангиогенної дії, такі як bFGF, VEGF, TGF- β , PDGF, angiopoietin-1, placental growth factor (PGF), IL-6, and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) З іншого боку, MSC можуть також пригнічувати ангиогенез шляхом секреції антиангиогенних факторів, таких як тромбоспондини (TSP-1, TSP-2), тканинні інгібітори металопротеїназ (TIMP1, 4) та інші (Watt et al, 2013).

На даний час все більше визнається складна неоднозначна роль MSC у патофізіології раку через їх здатність обмежувати або сприяти прогресуванню пухлини, залежно від умов впливаючи по різному на процеси проліферації/диференціації, міжклітинних взаємодій, активуючи про- або антизапальні ефекти тощо (Slama et al, 2023). В нашому попередньому дослідженні продемонстровані різні ефекти MSC плаценти на особливості росту, розвитку і метастазування перевивної пухлини карциноми Льюїса в залежності від особливостей введення клітини MSC в організм, а отже і від оточення, яке впливає на самі стовбурові клітини, змінюючи їх потенціал (Stepanov et al, 2023).

Аналіз особливостей ефектів MSC у ангиогенезі може дати нове розуміння механізмів

прогресування пухлини та сприяти розробці інноваційних методів лікування раку.

Метою проведеної експериментальної наукової роботи було дослідження впливу мезенхімальних стовбурових клітин з плаценти людини та способу їх введення на особливості гістогенезу при формуванні мікроциркуляторного русла перевивної карциноми легень Льюїса (LLC)

Карцинома легень Льюїса – пухлина, яка здатна спонтанно виникати як епідермоїдна карцинома в легенях мишей C57BL. Вона була відкрита доктором Маргарет Льюїс в Інституті Wistar у 1951 р. і стала однією з перших трансплантованих пухлин (Bertram, Janik, 1980). На даний час вона є репрезентативною моделлю для досліджень канцерогенезу в умовах як *in vivo*, так і *in vitro*.

Матеріали і методи. *Тварини.* Дослідження на тваринах проводили на мишах-самках C57Bl/6 віком 10 тижнів, вагою 1–21 г. Усі експерименти на тваринах проводилися на базі ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, Україна) відповідно до «Посібника з догляду та використання лабораторних тварин» Національного інституту здоров'я (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011) та у відповідності до положень вітчизняних і міжнародних біоетичних документів: IV «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, ETS 123, 1986), законодавчих документів України з проведення експериментів на тваринах: «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», ухвалені Першим національним конгресом з біоетики (20.09.2001). Мишей утримували в спільних клітках у стандартних контрольованих умовах із 12-годинним циклом світло/темрява і забезпечували стандартною їжею для гризунів і водою.

Клітини LLC. Штам LLC був люб'язно наданий Національним банком клітинних ліній і штамів пухлин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України. Клітини LLC зберігалися в середовищі DMEM з додаван-

ням 10 % FBS, 1 % глутаміну та 1 % антибіотика-антимікотика («Thermo Fisher Scientific», США) при 37 °C у 95%-вій зволоженій атмосфері з 5 % CO₂.

Отримання мезенхімальних стромальних клітин із кріоконсервованої плаценти людини (hP-MSC). Для отримання hP-MSC використовували доношену плаценту (фізіологічні пологи після клінічно нормальної вагітності), яку отримували від донорів віком до 36 років на 39–41 тижні вагітності в Київському міському пологовому будинку № 3, згідно письмової інформованої згоди. Амніон видаляли, ножицями відсікали фрагмент хоріальної пластинки і ворсинки хоріона вагою 8 г (товщина 3–7 мм). Далі тканина плаценти була кріоконсервована у розчині Хенкса («Sigma», Сент-Луїс, Міссурі, США), що містив 5 % ДМСО («Sigma», Сент-Луїс, Міссурі, США). Зразки заморожували в кріогенних флаконах в морозильній камері з контрольованою швидкістю охолодження й кристалоутворення (IceCube, Австралія). Коли температура досягала –140 °C, процес охолодження в морозильній камері припиняли, а зразки переносили на тривале зберігання в рідкий азот (–196 °C). Розморозування проводили на водяній бані при +38–40 °C до появи рідкої фази у зразку (0 °C), а потім поступово відмивали від ДМСО шляхом повільного додавання до тканини розчину Хенкса. Розморожену тканину подрібнювали, а для отримання росту клітин з експлантів фрагменти переносили в культуральні флакони з готовим ростовим середовищем, на основі MEM альфа модифікації («Sigma-Adrich», США) з додаванням 15%-вої бичачої фетальної сироватки («Sigma-Adrich», США). hP-MSC культивували при 37 °C і 5 % CO₂ впродовж чотирьох пасажів. Середовище змінювали кожні 3 дні. Клітини характеризували за здатністю до диференціювання в остеогенному, адипогенному та хондрогенному напрямках та експресією поверхневих маркерів відповідно до мінімальних критеріїв ISCT (Dominici, 2006).

Інокуляція клітин LLC та hP-MSC. Для дослідження впливу hP-MSC на особливості ангиогенезу тварини були розділені на 3 експериментальні групи ($n = 10$ у кожній). Мишам 1-ї групи (контрольна група, LLC) внут-

рішньом'язово (в/м) (в м'яз правого стегна) вводили 5×10^5 клітин LLC у 100 мкл фізіологічного розчину (Натрію хлорид, 9 мг/мл, Юрія-фарм ТОВ (Україна)). Мишам 2-ї групи (група LLC+hP-MSC) одночасно вводили в/м 5×10^5 клітин LLC і 5×10^5 hP-MSC у 100 мкл фізіологічного розчину в м'яз правого стегна. Миші 3-ї групи (група LLC+hP-MSC (i.v.)) отримували в/м інокуляцію 5×10^5 клітин LLC у 100 мкл фізіологічного розчину в м'яз правого стегна, потім 5×10^5 hP-MSC вводили внутрішньовенно у хвостову вену на 7-й день розвитку LLC.

Гістологічний аналіз зразків. Морфологічний аналіз проводили на 10, 15 та 23 добу розвитку пухлини LLC. Отримані зміни росту пухлини та гістологічних особливостей ангиогенезу у експериментальних мишей з LLC+hP-MSC та LLC+hP-MSC (i.v.) порівнювали з результатами контрольної групи (тварини з перевивною LLC). Після вимірювання об'єму та ваги пухлини зразки фіксували у нейтральному формаліні та ущільнювали в парафіні згідно зі стандартним методом, гістологічні зрізи товщиною 5 мкм фарбували гематоксиліном та еозином (H&E, Alfarus, Ukraine). Зрізи аналізували за допомогою мікроскопа Olympus BX-41, оснащеного камерою Olympus C-5050 Zoom (Olympus Europe GmbH, Японія) і програмним забезпеченням Olympus DP 80 FT 3.2 («Olympus Imaging Corp.», Японія). Кількісний морфометричний аналіз щільності та розподілу судин оцінювали на цифрових зображеннях зрізів за допомогою програмного забезпечення ImageJ («NIH», США). Розраховували співвідношення площі просвіту судинної структури на 1000 мкм² пухлинної тканини у видимих полях зору.

Статистичний аналіз. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програм Statistica 6.0 («StatSoft», США) та OriginLab («OriginLab Corporation», США). Нормальність розподілу даних визначали за критерієм Колмогорова-Смирнова. Для оцінки достовірності виявлених змін використовували параметричний (t-критерій Стьюдента для двох виборок) та непараметричний (U-критерій Манна-Уїтні для незалежних груп) методи варіаційної статистики, різниця була

достовірною при $p < 0,05$. Отримані результати були представлені як $M \pm SD$ (середнє значення \pm стандартне відхилення).

Результати та їх обговорення. Клітини лінії LLC при інокуляції в м'язову тканину стегна миші впродовж 1–3 діб інфільтрують м'язові волокна, поступово формуючи пухлинний вузол. На 10 добу формується пухлина діаметром до 5 мм, клітини якої вже мають ознаки анаплазії (виражений поліморфізм, анізоцитоз, гіперхромність ядер і висока базофільність клітин в цілому, підвищені показники ядерно-цитоплазматичного співвідношення 0,6–0,7) і мітотичного індексу (по 5–7 мітотичних фігур в полі зору при збільшенні $\times 400$), а також – аномальні мітози і пікнотичні ядра (рис. 1, а).

Живлення пухлинної тканини на цьому етапі розвитку здійснюється за рахунок одиничних судин, існуючих в прилеглих тканинах, навкруги яких формується первинний пухлинний вузол. Нові судинні утворення у периферичній частині пухлини в цей період практично не рееструються. Проте, новоутворені просудинні структури виникають ближче до центральної частини пухлини – ділянка, де відзначається утворення нових «судин», становить приблизно 50 % площі зрізу пухлинного вузла. Локалізація процесів васкуляризації в центральній частині пухлинного вузла пояснюється тим, що тканинна гіпоксія є відомим тригерним фактором цього процесу (Rajendran, Krohn, 2005). На цій стадії ангиогенезу в таких структурах не відзначається наявність ендотеліальних клітин та інших компонентів, характерних для гістологічної структури стінки судин (рис. 1, а), що свідчить про те, що формування нових судин відбувається не за рахунок проростання вже існуючої в навколишніх тканинах судинної мережі, а, в основному, шляхом індукції утворення нових судинно-подібних структур (васкуляризація) за допомогою різних молекулярних та клітинних механізмів. При цьому такі структури є надзвичайно невпорядкованими, мають вигляд каналів, стінки яких утворені недиференційованими клітинами самої пухлини. Через це спостерігається виражена дифузія еритроцитів в прилеглі ділянки (рис. 1, а).

При введенні hP-MSC одночасно з клітинами LLC – як разом, безпосередньо у м'язову

тканину (модель LLC+hP-MSC), так і через ін'єкцію hP-MSC в хвостову вену (модель LLC+hP-MSC i.v.) загальна гістологічна морфологія пухлини, що формується, подібна самостійній пухлині LLC – зокрема, відмічається виражений клітинний і ядерний поліморфізм.

Однак, при сумісному введенні клітин LLC+hP-MSC на 10 день розвитку характерною відмінністю є значно нижчий рівень (на 90 %, $p < 0,05$) утворення судинних структур, зокрема – за їх кількістю і загальною площею просвітів на зрізах пухлин – в більшості полів зору при мікроскопічному аналізі відсутні просудинні структури (рис. 1, б, д). Окремі дрібні судинні утворення з поодинокими еритроцитами становлять менше 1 % загальної видимої площі. Кровопостачання вузла відбувається, очевидно, в основному за рахунок передіснуючих і проростаючих судин оточуючих тканин, які виявляються в поодиноких кількостях по периферії пухлини LLC+hP-MSC, проте є добре вираженими (рис. 1, з).

В той же час в моделі введення hP-MSC через центральний кровоток (LLC+hP-MSC i/v) на 10 день розвитку рееструється проміжний стан васкулогенезу – в пухлинах починають формуватися нові еритроцитвмісні структури, проте їх кількість та площа їх просвітів значно менше (на 57 %, $p < 0,05$) у порівнянні з індивідуальним розвитком пухлини LLC (рис. 1, в, д).

Максимально виражені процеси пухлинного росту (в тому числі, збільшення клітинного поліморфізму в усіх моделях (рис. 2, а, б, в) та васкуляризації в центральній частині пухлин були відмічені на 15 день після інокуляції клітин в тканини і продовжуються до 23–25 дня. Проте, на цьому етапі (15-й день) поступово з'являються і вогнища некрозу, наростання яких до 25 дня розвитку пухлини веде до її розпаду. В індивідуальних пухлинах LLC, поблизу ділянок з некротичними змінами, спостерігаються значні вогнища з екстравазальною еритроцитарною масою, як результат недосконалої структури «судин» (рис. 2, з) – саме такі неоформлені еритроцитвмісні утворення займають більшу частину площі пухлини LLC. В обох моделях пухлин, які взаємодіють з hP-MSC, це явище виражено значно менше, особливо – hP-MSC в групі 2 (рис. 2, д, е).

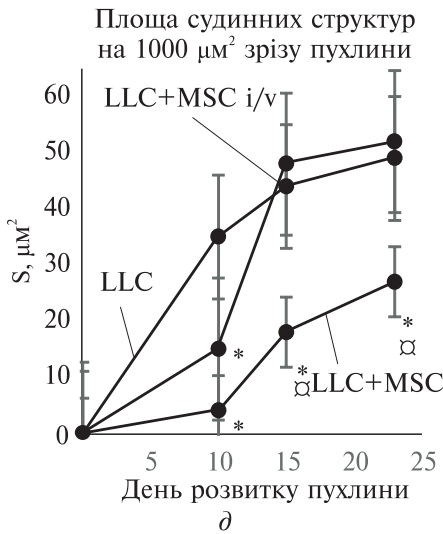
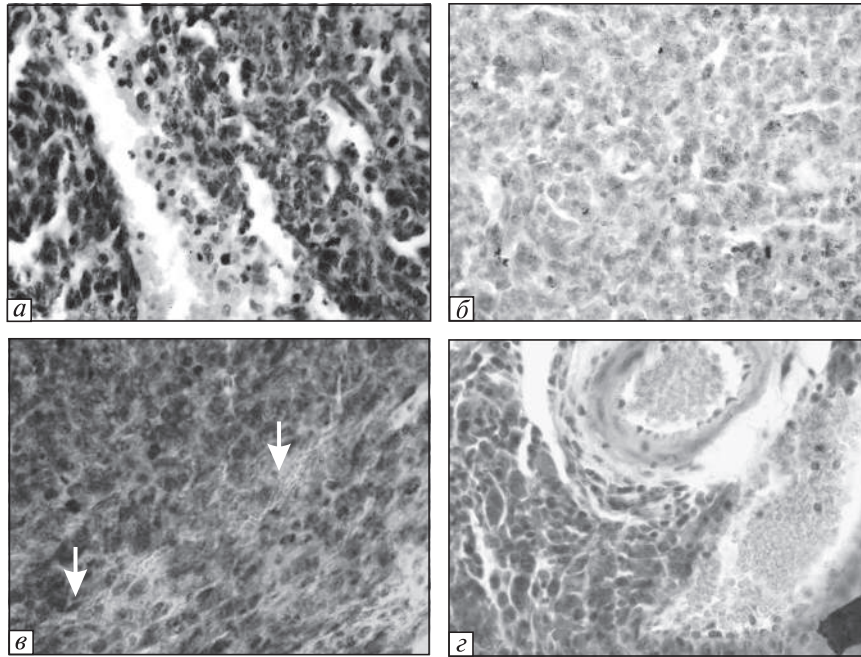


Рис. 1. Гістологічна організація кровопостачання в моделях пухлини LLC на 10 день після інюкуляції. *a* – низькодиференційовані проангіогенні утворення в пухлині LLC; *b* – відсутність судинних структур в більшій частині пухлинного вузла LLC+hP-MSC; *v* – початок розвитку просудинних структур (стрілки) в пухлині LLC при системному введенні hP-MSC (i/v); *z* – судини з типовою гістологічною структурою (артеріола і вена) на периферії

пухлини; H&E, $\times 400$; δ – графік залежності площі просвітів новоутворених судинних структур в центральній частині пухлин від дня розвитку в різних моделях взаємодії LLC з hP-MSC. * – $p < 0,05$ у порівнянні з групою 1 (індивідуальний розвиток LLC); α – $p < 0,05$ у порівнянні з групою 3 (розвиток LLC при системному введенні hP-MSC (i/v))

Відмічене нами явище еритроцитарної гіперплазії, слід віднести до так званого екстрамедулярного гемопоєзу – процесу кровотворення за межами кісткового мозку, з утворенням мієлоїдних та еритроїдних клітин попередників і потім – диференційованих клітин крові. У звичайних умовах цей про-

цес може зрідка відбуватися в печінці та селезінці при деяких дисфункціях кісткового мозку – анеміях, мієлопроліферативних новоутвореннях і т.п. (Zhou et al, 2014). У той же час екстрамедулярний гемопоєз може іноді зустрічатися в деяких солідних пухлинах – карциномах легень та молочної залози, нирок

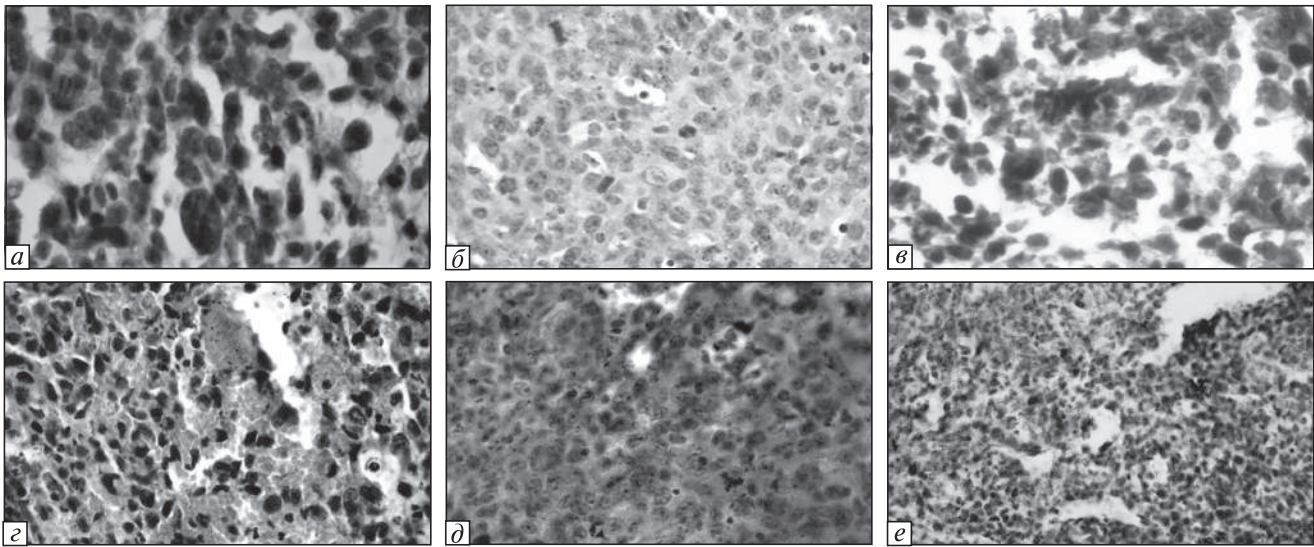


Рис. 2. Особливості гістологічної організації пухлин LLC на 15-й день розвитку. Збільшення ознак анаплазії та клітинного поліморфізму в пухлинах: *a* – модель LLC, *б* – LLC+hP-MSC; *в* – LLC+hP-MSC i/v. Васкуляризація в центральних ділянках, 15-й день розвитку: *г* – пухлина LLC – множинні неструктуровані просудинні утворення та екстравазальні скупчення еритроцитів, *д* – LLC+hP-MSC – дрібні новоутворені судини з формуванням стінки из пухлинних клітин, *е* – LLC+hP-MSC i/v – проміжний стан. Забарвлення Н&Е. $\times 40$

та ін. (Bao et al, 2018; Cho, Mandavilli, 2020). В таких випадках він є не тільки способом підтримки власного ангиогенезу пухлини, але й виконує важливу роль у порушенні протипухлинного імунітету та зниженні ефективності імунотерапії за рахунок міелоїдних та еритроїдних клітин попередників, які утворюються в результаті пухлинно-індукованого екстрамедулярного гемопоезу (Chen et al, 2023).

З 15 дня в ангиогенезі пухлин відмічається початок утворення ендотеліоподібних структур: часткове оточення просудини сплосненими клітинами. Переріз судин в такому випадку також найчастіше має сплюснену або виражену веретеноподібну форму (рис. 3). Проте, в моделі індивідуального росту LLC (група 1) вони зустрічаються дуже рідко і також є недостатньо функціональними в плані забезпечення ролі судинної стінки, внаслідок чого відбувається екстравазація еритроцитів у прилягаючі ділянки (рис. 3, *a*).

При обох шляхах взаємодії LLC з hP-MSC – як при одночасному введенні (група 2), так і при i/v введенні стовбурових клітин (група 3), – такі судинні структури складають основну масу всіх зареєстрованих «судин», а їх стінка є

більш чітко і щільно сформованою (рис. 3, *б*, *в*), ніж у самостійно ростучій пухлині LLC. Завдяки цьому в цих моделях значно знижена екстравазація еритроцитів, а кровопостачання центральної частини пухлини є більш досконалим, ніж в LLC, що розвивається самостійно. При цьому (за візуальною мікроскопічною оцінкою) трубка судини утворена переважно самими пухлинними клітинами (рис. 3, *б*, *в*, *г*), які надалі стають більш плоскими, що може свідчити про їх диференціацію в ендотеліальному напрямку.

В моделі одночасного введення LLC та hP-MSC (група 2) такі судинні структури в центральній частині пухлин з 15 дня розвитку складають більшість новоутворених судин. При системному внутрішньовенному введенні hP-MSC їх кількість є меншою, проте перевищує кількість подібних судин у моделі LLC (рис. 3, *д*). За структурною організацією таких судин модель системного введення hP-MSC також займає проміжну позицію між індивідуальним ростом LLC і одночасною інокуляцією LLC+hP-MSC – в ній наявні просудини як з сформованою стінкою з клітин (рис. 3, *в*), так і не в повній мірі організовані, в результаті чого від-

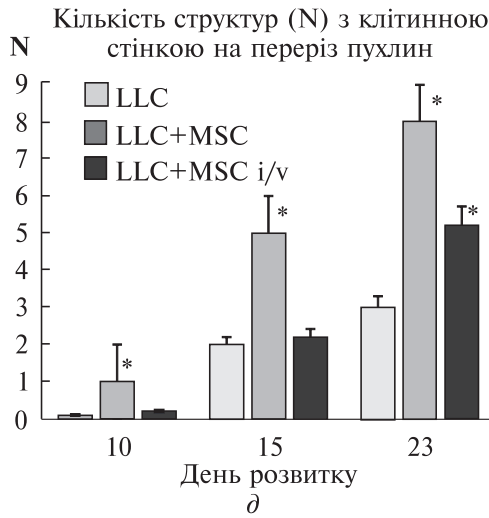
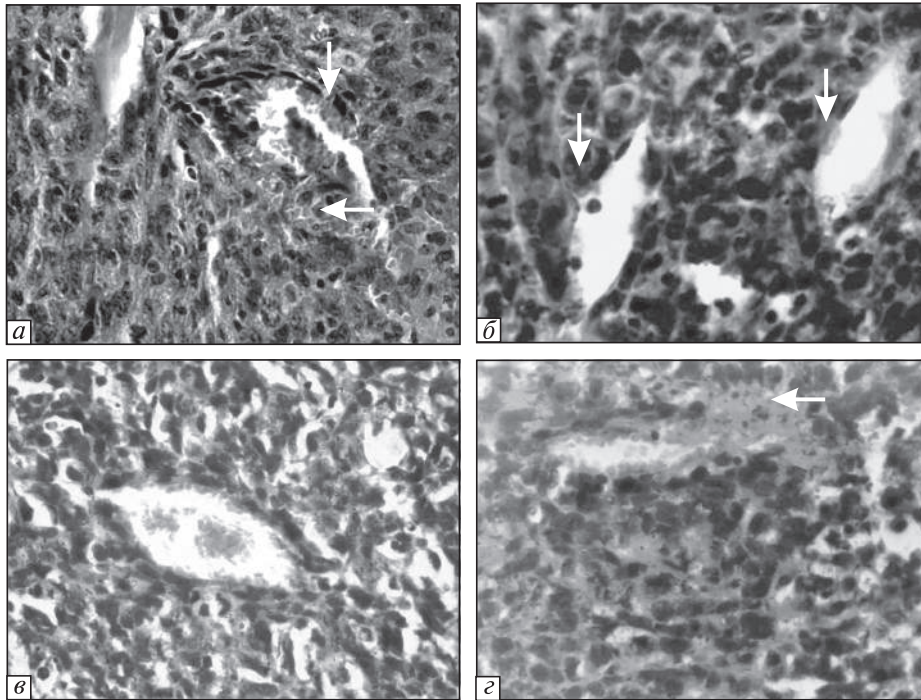


Рис. 3. Диференціація ендотеліо-подібних клітин в просудинних структурах, модель LLC, 15 день, $\times 400$ «Просудина» з початковим формуванням стінки з ендотеліо-подібних клітин (біла стрілка), часткова екстравазація еритроцитів (рожева стрілка). *a* – модель LLC, *б* – LLC+hP-MSC; *в*, *г* – LLC+hP-MSC i/v.; гістограма частоти утворення просудинних утворень з первинною судинною стінкою. * – $p < 0,05$ у порівнянні з групою 1 (індивідуальний розвиток LLC)

мічається вихід еритроцитів в пухлинну тканину (рис. 3, *г*).

З цього моменту розвитку пухлин LLC (15-й день) спостерігаються подальші, більш виражені процеси ангіогенезу і васкуляризації, з різними механізмами формування пухлинного кровоносного русла, але з певними відмінностями в різних досліджених моделях.

Так, в інюльованій пухлині LLC, що розвивається самостійно, ми спостерігаємо переважання процесів так званої васкулогенної мімікрії, при яких в пухлинній тканині для руху крові утворюються каналоподібні структури, стінки яких сформовані з пухлинних клітин (Folberg, Maniotis, 2004). Такий же механізм чітко простежується і при взаємодії клітин

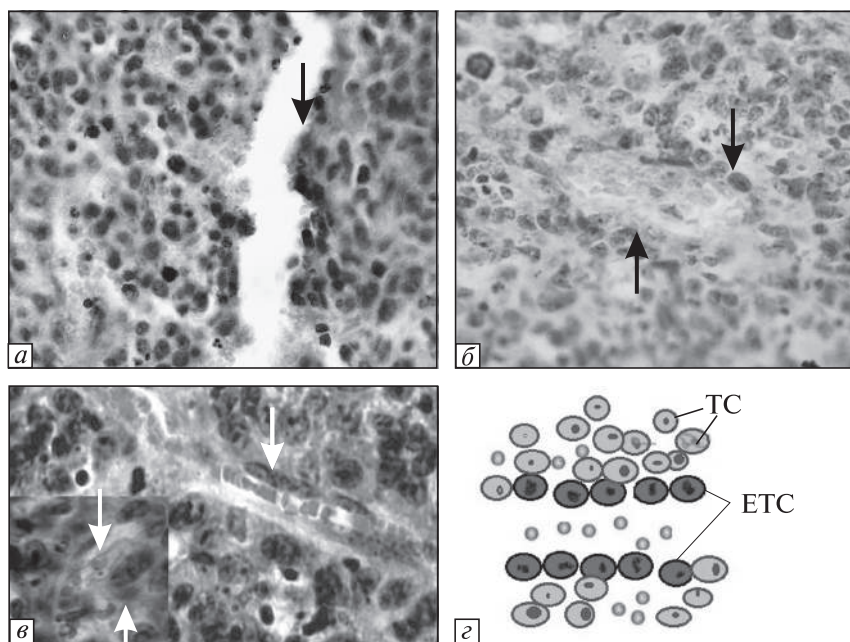


Рис. 4. Морфологічний прояв васкулогенної мімікрії в моделях розвитку перевивної пухлини LLC. Концентрації пухлинних клітин навкруги судинних структур (стрілки) для формування судинної стінки в центральній частині пухлин LLC, 15–23 дні розвитку: *а* – низькорганізовані каналні структури в LLC (група 1); судини, оточені пухлинними клітинами: *б* – LLC+hP-MSC (група 2); *в* – LLC+hP-MSC i.v. (група 3). Н&Е, ×400; *г* – схема формування судини за механізмом васкулогенної мімікрії. TC – пухлинні клітини; ETC – ендотеліоподібні пухлинні клітини

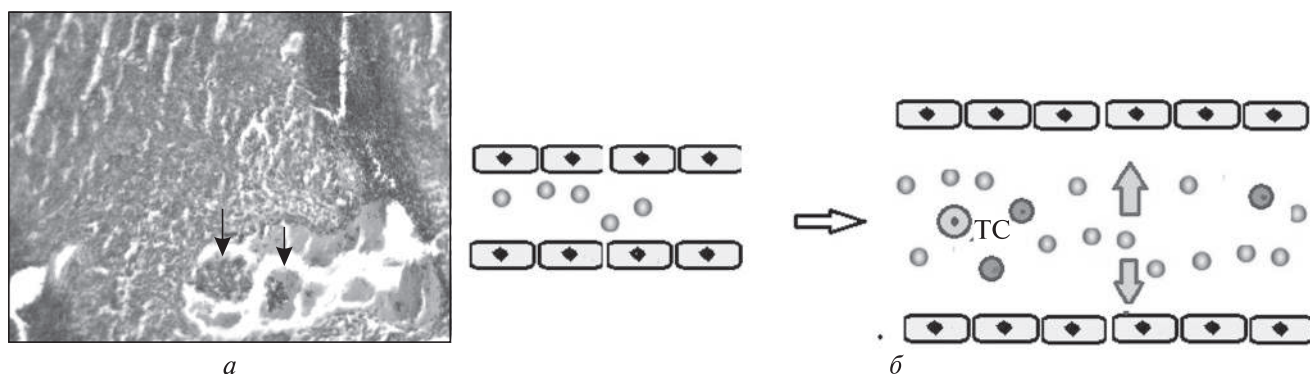


Рис. 5. Збільшення циркуляторного русла в пухлині за рахунок розширення периферійних судин. *а* – розширена вена на периферії пухлини LLC+hP-MSC i.v. (23 день розвитку), з метастазуючими скупченнями пухлинних клітин в просвіті (стрілка), Н&Е, ×400; *б* – схема ангіогенезу за рахунок розширення судин на периферії пухлини. TC – пухлинні клітини

LLC з hP-MSC. Проте, якщо у випадку самостійного розвитку LLC ці каналоподібні структури є вкрай недовершеними, то під впливом hP-MSC ми спостерігаємо вже морфологічні ознаки диференціації пухлинних клітин в ендотеліоподібні клітини, які дозволяють судинам, що формуються, ефективно утримувати клітини крові і спрямовувати їх рух (рис. 4). При цьому найбільша кількість таких оформлених судинних структур спостерігається в моделі одночасної інокуляції клітин LLC з hP-MSC (рис. 3, д).

На периферії пухлин всіх досліджених моделей розвитку ми спостерігали декілька спо-

собів пухлинного ангіогенезу за рахунок розростання і збільшення існуючих диференційованих судин. При цьому ми знову відмічали більш активний процес росту судин в присутності hP-MSC.

Одним з найпростіших механізмів ангіогенезу, очевидно, можна вважати збільшення діаметру судин, що оточують пухлину. В індивідуально ростучих пухлинах цей процес розпочинається раніше – вже на 10-й день, але надалі (впродовж 15–23 днів) він стає більш активним саме в пухлинах, що піддаються дії hP-MSC і, особливо, при їх системному (внутрішньовенному введенні) (рис. 1, д) – перифе-

Рис. 6. Проростаючий ангиогенез. *a* – судина венозного типу (V) і численні дрібні судини (стрілки), що проростають від існуючих судин на периферії пухлини. LLC+hP-MSC (15 день розвитку); H&E, ×400. *б* – схема проростаючого ангиогенезу (пояснення в тексті)

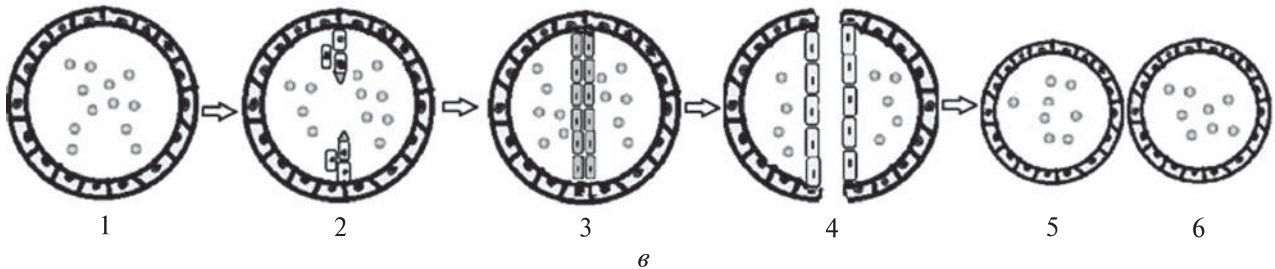
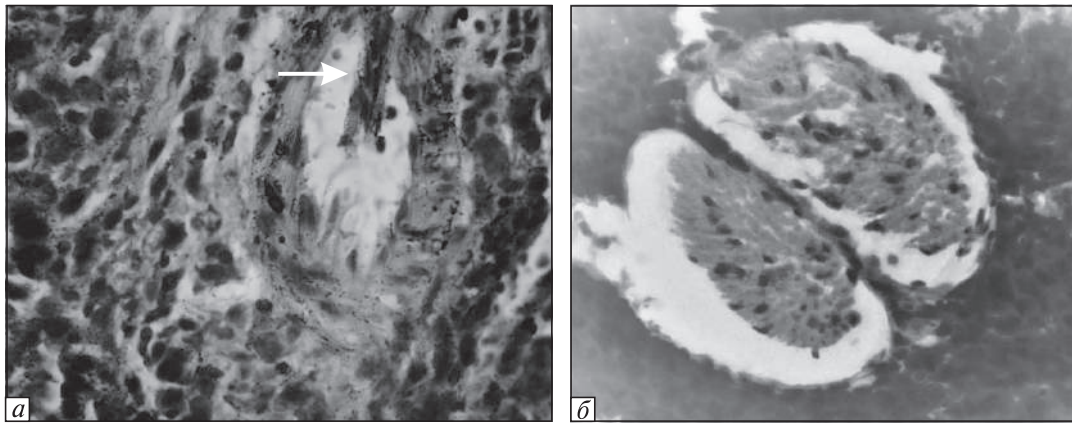
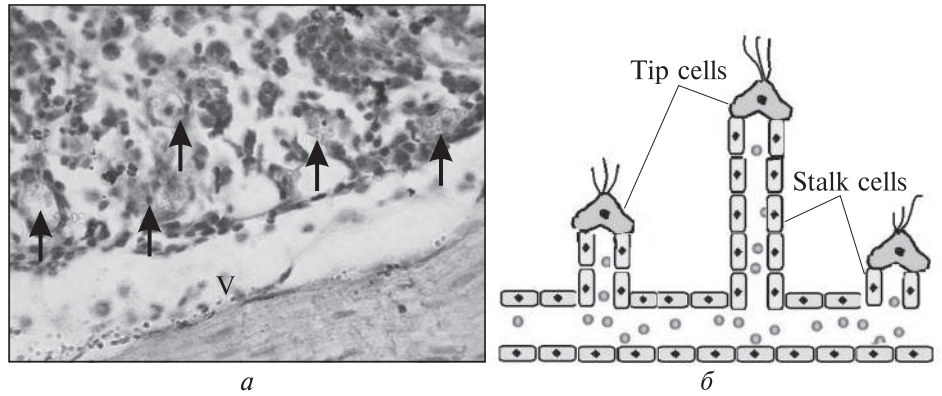


Рис. 7. Розщеплювальний ангиогенез в пухлинах (15 день розвитку). *a* – формування ендотеліальної перетинки в периферійній судині індивідуально ростучої пухлини LLC (група 1) (стрілка); *б* – завершене утворення перетинки з розщепленням на 2 судини в пухлині з одночасним введенням клітин hP-MSC (LLC+hP-MSC, група 2); H&E, ×400. *в* – схема розщеплюваного ангиогенезу: 1 – вихідна судина; 2–3 утворення перетинки (внутрішньопросвітної «стовпа») з прогеніторних ендотеліальних клітин в просвіті судини; 4 – поздовжнє розщеплення судини; 5 – утворення двох нових капілярів

ричні судини в цьому випадку мають більший діаметр просвіту, а кількість розширених судин також є більшою. В таких судинах часто відмічаються як поодинокі пухлинні клітини, так і пухлинні емболи, що є шляхом реалізації метастатичного потенціалу даної пухлини (рис. 5).

Крім збільшення діаметру існуючих судин зростання кровотоку в пухлинах досягається і за рахунок збільшення їх кількості. І в цьому

випадку ми спостерігали 2 способи ангиогенезу на периферії пухлин.

Перший – це проростання ендотелію судин, яке може стимулюватися впливом гіпоксії, травми або ангиогенних факторів росту, індукованих онкогенними сигналами (Dudley, 2023). Основним серед ангиогенних факторів вважається VEGF, який має залежну від концентрації активність, що стимулює рухливість/

проліферацію ендотелію (Wiszniak, Schwarz 2021). Першими в ендотелії активуються окремі клітини, що стають верхівковими (tip cells) при проростанні, за ними утворюються клітини стебла (stalk cells), які спочатку формують незрілі та негерметичні судинні проростки, що пізніше стабілізуються новим позаклітинним матриксом (ECM) та перицитами (Dudley, Griffioen, 2023). Більш активний проростаючий ангиогенез спостерігався в пухлинах, клітини яких інокулювалися одночасно з hP-MSC і розвивалися під їх безпосереднім впливом (рис. 6).

Інший спосіб розширення судинної сітки, який ми спостерігали на периферії пухлин – інвагінальний, або розщеплювальний ангиогенез (*Intussusceptive or splitting angiogenesis*) (Mentzer, Konerding, 2014). Він опосередковується утворенням внутрішньопросвітнього стовпа з ендотеліальних клітин на протилежних стінках капіляра або розростанням перетинки з групи прогеніторних клітин в середині просвіту (рис. 7). Судина поступово розділяється вздовж (розщеплюється) на два капіляри, утворюючи таким чином дві судини, і, відповідно, розширюючи судинне русло (рис. 7, в).

Висновки. Підводячи підсумки морфологічного аналізу неоангіогенезу в пухлинах LLC і впливу на нього мезенхімальних стовбурових клітин плацент, можемо зробити такі узагальнення. Присутність клітин hP-MSC не має суттєвого впливу на морфологічні ознаки розвитку неоплазії. Пухлинні клітини в усіх досліджених моделях зберігають високий рівень злоякісності (анаплазії). Васкуляризація, за рахунок формування власних судинних структур, відбувається переважно у центральній частині пухлин. Межі судин формуються клітинами самої пухлини. У моделі LLC контрольної групи формування власних, слабо організованих і низькофункціональних судинних структур, відбувається раніше (на 10 день) і значно більш виражене в кількісному відношенні (їх загальна площа приблизно в 5–8 разів, залежно від ділянки пухлини, більша, порівняно з пухлинами в присутності hP-MSC – у них неоангіогенез стає вираженим на 15 день. У LLC пухлинах значно виражений процес екстрамедулярного гемопоезу – формування клітин крові за межами кісткового

мозку. Проте, судини, новоутворені до 15 дня, в пухлинах LLC у присутності hP-MSC мають більш досконалу і організовану структуру, в них практично відсутні явища екстравазації еритроцитів (виходу в навколишні тканини) порівняно з LLC-пухлиною. Стінка таких судин утворена пухлинними клітинами, які морфологічно диференціюються до ендотеліоподібних клітин. Така подібність до ендотеліоцитів більш виражена при дії системно введених hP-MSC у порівнянні з впливом одночасно інокульованих стовбурових клітин і зростає до останніх стадій розвитку пухлин. На кінцевих стадіях розвитку (15–23-й день) пухлини в присутності hP-MSC (за обох способів введення) краще забезпечені диференційованими (тканинними) судинами, що проростають від оточуючих тканин. Обидва види судинних структур (диференційовані периферичні і власні пухлинні) використовуються для васкулярної міграції пухлинних клітин. Очевидно, що такі відмінності в часі і морфологічних особливостях формування судинного русла різних моделей росту інокульованих пухлин LLC, в першу чергу, залежать від секреторних властивостей мезенхімальних стовбурових клітин. Раніше було проаналізовано транскриптом hP-MSC, отриманих з кріоконсервованої тканини плаценти, дані розміщені у депозиторії NIH під номером PRJNA921741 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/921741>). Анотація метаболічних шляхів серед збагачених категорій в базі даних KEGG показала в кріоконсервованих hP-MSC активацію сигнальних шляхів, асоційованих із запаленням. Підвищений рівень експресії в hP-MSC мали цитокіни *IL34*, *IL6*, *CXCL8*, *EDN1*, *IL17D*, *CSF2*, *IL32*, *IL11* та *IFNA1* і нижчий рівень експресії демонстрували *IL12B* та *IL18*. Для генів хемокінів було продемонстровано досить гетерогенні рівні експресії. В hP-MSC були активовані такі хемокіни, як *CXCL12*, *CXCL6*, *CCL2* і *CXCL1*. Також в профілі експресії факторів росту в hP-MSC були активовані прозапальні фактори росту, такі як *THBS1*, *EFNA5*, і *EREG*. У той же час, протизапальний фактор *HGF* мав нижчий рівень експресії в кріоклітинах, на відміну від *TGFB2* і *MFAP2*, які були надекспресовані. Виявлена знижена експресія пов'язаних з ангиогенезом генів *ANGPTL1*,

ANGPTL2, *PDGFB* і *PDGFD* у-hP-MSC може негативно впливати на індукцію розвитку кровоносних судин (Navakauskienė et al, 2023). В той же час, гетерогенна популяція hP-MSC містила клітини периваскулярного походження, які експресували ERG – транскрипційний фактор, характерний для ендотеліальних клітин (Shablii et al, 2019). Отже, логічно припустити, що різна активність ангиогенезу і переважання його різних способів залежно від наявності і умов введення hP-MSC залежатиме від профіля генної експресії hP-MSC і часу впливу мікрооточення пухлинних клітин за різних умов розвитку.

Дотримання етичних стандартів. Дослідження виконані в межах теми «Цито- і гістологічні ефекти метаболічних та проліферативних порушень та способи їх корекції» 2020–2023 рр., № ДР 0120U103507).

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

CYTOLOGICAL MANIFESTATIONS OF THE INFLUENCE OF CRYOPRESERVED PLACENTA MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE FEATURE OF NEOANGIOGENESIS IN LLC TUMORS

G.V. Ostrovska, L.V. Garmanchuk, Yu.V. Stepanov, T.V. Bukreieva, N.M. Khranovska

Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine» of Taras Shevchenko National University of Kyiv

RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine

Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine
National Cancer Institute, Ukraine

E-mail: g_ostrovska@knu.ua, liudmyla_garmanchuk@ukr.net, lestehprom@gmail.com, tahbko@gmail.com, natalia.khranovska@unci.org.ua

Morphological features of angiogenesis processes in Lewis lung carcinoma (LLC) regrowth tumors were investigated and analyzed during their independent development and under the influence of cryopreserved mesenchymal stem cells of the human placenta (hP-

MSC) under different administration conditions. In LLC tumors, an earlier (day 10) onset of angiogenesis was revealed, with pronounced extramedullary hematopoiesis and the formation of unstructured provascular structures. It was shown that, in general, hP-MSC provide a more structurally perfect angiogenesis in the tumor, with the formation on the 15th day of vascular formations surrounded by a cell wall formed from the cells of the tumor itself. Different morphological forms of neoangiogenesis were detected both in LLC tumors that develop independently, and with different methods of hP-MSC administration – with simultaneous inoculation with tumor cells and with systemic (intravenous) administration. However, more active neoangiogenesis in LLC tumors was noted with systemic intravenous administration of hP-MSC.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Apte RS, Chen DS, Ferrara N (2019) VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 176(6):124–1264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>
- Bao Y, Liu Z, Guo M, Li B et al (2018) Extramedullary hematopoiesis secondary to malignant solid tumors: a case report and literature review. *Cancer Manag Res* 10:1461–1470. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S161746>
- Bertram JS, Janik P (1980) Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer letter* 11(1):63–73. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(80\)90130-5](https://doi.org/10.1016/0304-3835(80)90130-5)
- Chen Z, Cheng X, Yang L et al (2023) Mechanism and effects of extramedullary hematopoiesis on anti-tumor immunity. *Cancer Biol Med* 20(7):477–482. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2023.0203>
- Cho WC, Mandavilli S (2020). Intratumoral extramedullary hematopoiesis in solitary fibrous tumor of the breast. *Breast J* 26(4):755–758. <https://doi.org/10.1111/tbj.1358>
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dudley AC, Griffioen AW (2023). Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis* 26(3):313–347. <https://doi.org/10.1007/s10456-023-09876-7>
- Folberg R, Maniotis AJ (2004) Vasculogenic mimicry. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 112(7–8):508–525. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0810.x>
- Mentzer SJ, Konerding M (2014) Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular

- networks. *Angiogenesis* 17(3):499–509. <https://doi.org/10.1007/s10456-014-9428-3>
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>. <https://doi.org/10.17226/12910>
- Navakauskienė R, Žukauskaitė D, Borutinskaitė VV et al (2023) Effects of human placenta cryopreservation on molecular characteristics of placental mesenchymal stromal cells. *Front Bioengineer Biotechnol* 11:1140781. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1140781>
- Patan S (2004) Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 117:3–32. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8871-3_1
- Rajendran JG, Krohn KA (2005) Imaging hypoxia and angiogenesis in tumors. *Radiol Clin North America* 43(1):169–187. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2004.08.00>
- Shablii V, Kuchma M, Svitina H et al (2019) High Proliferative Placenta-Derived Multipotent Cells Express Cytokeratin 7 at Low Level. *BioMed Res Inter* 2098749. <https://doi.org/10.1155/2019/2098749>
- Slama Y, Ah-Pine F, Khettab M et al (2023) The Dual Role of Mesenchymal Stem Cells in Cancer Pathophysiology: Pro-Tumorigenic Effects versus Therapeutic Potential *Int J Mol Sci* 24:13511. <https://doi.org/10.3390/ijms241713511>
- Stepanov YV, Golovynska I, Ostrovska G et al (2023) Human mesenchymal stem cells increase LLC metastasis and stimulate or decelerate tumor development depending on injection method and cell amount. *Cytometry. Part A :J Inter Soc Analyt Cytol* 10.1002/cyto.a.24814. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24814>
- Tao H, Han Z, Han ZC, Li Z (2016) Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem Cells Int* 2016:1314709. <https://doi.org/10.1155/2016/1314709>
- Watt SM, Gullo F, van der Garde M et al (2013) The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *British Med Bull* 108(1):25–53. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldt031>
- Wiszniak S, Schwarz Q (2021) Exploring the Intracrine Functions of VEGF-A. *Biomolecules* 11(1):128. <https://doi.org/10.3390/biom11010128>
- Zhou B, Yan S, Zheng S (2014). Intrathoracic extramedullary hematopoiesis mimicking intrathoracic tumors: A case report. *Oncol Letters* 7:1984–1986. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2051>

Надійшла в редакцію 01.02.2024
Після доопрацювання 15.02.2024
Прийнята до друку 18.05.2024