

ВПЛИВ СЕКРЕТОМУ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ НА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІТИН КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС *IN VITRO*

Л.В. ГАРМАНЧУК ^{1*}, Г.В. ОСТРОВСЬКА ¹, І.А. СТУПАК ¹, Т.В. БУКРЕЄВА ², О.І. ГОРБАЧ ³, Л.І. ОСТАПЧЕНКО ¹

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

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

³ Національний Інститут раку, Київ, Україна, вул. Юлії Здановської, 33/43, Київ, 03022, Україна

E-mail: liudmyla_garmanchuk@ukr.net, g_ostrovsk@knu.ua, ivan.stupak@knu.ua, stapchenko@knu.ua, tahbko@gmail.com, horbach.alex@gmail.com

Автор для кореспонденції – Гарманчук Л.В., e-mail: liudmylagarmarchuk@knu.ua

*В роботі досліджено вплив компонентів кондиційованого середовища (К-середовища), в якому культивували мезенхімальні клітини плаценти людини (hP-MSC), на характеристики клітин карциноми легені Льюїс (LLC) в культурі. Вперше показано, що компоненти К-середовища (секретом) проявляють проонкогенний вплив на LLC-клітини, про що свідчать зростання показників виживаності клітин, стимуляція проліферації клітин LLC, та зниження рівня апоптичних клітин. Також продемонстровано вплив К-середовища на особливості адгезії LLC за моношарового росту та їх міграції з 3-D культур. При взаємодії секретому hP-MSC з культивованими клітинами LLC відмічено зростання продукції прозапальних цитокінів TGFβ та ІІ-6. В той же час рівень проангіогенного фактору VEGF залишається практично незмінним. Подібні зміни мікрооточення при взаємодії мезенхімальних і пухлинних клітин можуть лежати в основі різних проонкогенних ефектів за розвитку та метастазування карциноми легені Льюїса *in vivo*, зафіксованих в наших попередніх дослідженнях при різних способах інокуляції MSC.*

Ключові слова: клітин карциноми легені Льюїс (LLC), мезенхімальні стовбурові клітини, кріоконсервована плацента людини, кондиційоване середовище, TGFβ, ІІ-6, проонкогенні ефекти.

Вступ. Мезенхімальні стовбурові клітини (MSC) є субпопуляцією плюрипотентних стовбурових клітин зі здатністю до самовідновлення та мультипотентної диференціації (Shi, 2017). Доведена роль MSC у підсиленні пухлиноасоційованих функцій, таких як запалення, імуносупресія, ріст пухлини, ангіогенез та метастазування (Cuiffo, Karnoub, 2012, Li, 2019, Zhang, 2021). Взаємовплив MSC та клітин пухлини

опосередковується різними гуморальними факторами, що секретуються в мікрооточення, серед яких є низка прозапальних та антизапальних цитокінів та факторів росту (Goel, Mercurio, 2013; Tanaka, 2014; Liu, 2018; Patel, 2023, Schaperand Rose-John S, 2015). MSC проявляють спорідненість до пухлинних клітин, підсилюють проліферацію, рухливість, інвазію та метастазування, стимулюють ангіогенез, сприяють пухлинній десмоплазії та пригнічують протипухлинні імунні відповіді. Інвазія та метастазування є основними характеристиками та важливими маркерами злоякісних пухлин. Першим етапом цих процесів є епітеліально-мезенхімальний перехід (EMT), коли диференційовані епітеліальні клітини набувають мезенхімальних властивостей (Romano, 2020). Результати багатьох досліджень показали, що MSC беруть участь у регуляції росту пухлини та метастазуванні різними шляхами, зокрема за контактної взаємодії клітин, що прискорює прогресію пухлин. Однак інші дані демонструють зниження онкогенних ознак під дією MSC. В низці досліджень показано, що фактори, які секретують MSC в мікрооточення пухлин, підсилюють їх пухлиногенність (Suzuki K, 2011). Тож, перспективною мішенню протипухлинної терапії можуть бути компоненти секретому MSC (проангіогенні, прозапальні гуморальні фактори, тощо).

Раніше нами було виявлено різноспрямовані ефекти MSC плаценти людини (hP-MSC) на розвиток та метастазування карциноми легені людини, перещепленої мишам лінії Black C57 які залежали від способу інокуляції MSC в організм тварин (Stepanov et al, 2024). Зокрема,

були використані місцеве (безпосередньо в пухлину) та системне внутрішньовенне введення hP-MSCs, за яких параметри росту, метастазування та ангіогенезу пухлин відрізнялись як за кількісними, так і якісними характеристиками (Stepanov et al, 2024; Ostrovska et al, 2024). Метою представленого дослідження став аналіз можливих механізмів таких неоднозначних ефектів hP-MSC на пухлину, для чого було проведено дослідження впливу К-середовища цих клітин на особливості проліферації, адгезії та міграції LLC в культурі.

Матеріали і методи. *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 культивували в середовищі RPMI-1640 («Sigma», США) з додаванням 10 % FBS («Sigma», США), 1 % глютаміну та 1 % антибіотика-антимікотика («Thermo Fisher Scientific», США) при 37 °C у 100%-вій зволоженій атмосфері та 5 % CO₂.

Отримання hP-MSC. Для отримання hP-MSC використовували доношену плаценту (фізіологічні пологи після клінічно нормальної вагітності), яку обробляли згідно оригінальної методики відбору, транспортування та криозаморожування, як описано раніше (Navakasienė et al, 2023). Для отримання hP-MSC розморожування проводили на водяній бані при +38–40 °C до появи рідкої фази (0 °C), а потім поступово видаляли 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», США) з додаванням 15%-вої бичачої фетальної сироватки («Sigma», 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, Navakasienė et al, 2023).

Отримання К-середовища від hP-MSC здійснювали на 4-ому пасажі культивування клітин. Для цього до клітин, які формували майже 80 % моношар додавали середовище MEM («Sigma», США), яке не містило ембріональної сироватки. Відбирали 50 мл готового середовища, в якому hP-MSC росли 24 год, центрифугували його при 3000 g (для видалення клітинного дебрису) та зберігали при +4 °C.

Визначення рівня секреції проангіогенних факторів. В середовищі клітин LLC після 2-х добового культивування з К-середовищем hP-MSC та в контролі (середовище MEM) визначали рівень продукції фактору росту ендотеліальних клітин (VEGF), трансформуючого фактору росту типу бета (ТФРβ-1) та інтерлейкіну 6 (ІЛ-6) з використанням наборів для імуноферментного аналізу, згідно рекомендації виробника («OmnimAbs», США)

Дослідження впливу К-середовища hP-MSC на виживаність, адгезію та міграцію клітин LLC in vitro. Дослідження проводили на клітинах LLC після їх висаджування в 96-лункові та 12-лункові планшети («Costar», США) при досягненні 70–80 % моношару та за сфероїдного росту, індукованого 0,2%-вою карбоксиметилцелюлозою («Sigma», США). Титрування К-середовища від hP-MSC відносно LLC *in vitro* проводили в розведеннях 1:1–1:1024. Клітини LLC культивували в середовищі RPMI-1640 («Sigma», США) з додаванням 10%-вої ембріональної телячої сироватки. Після досягнення майже повного моношару додавали К-середовище hP-MSC, а до контролю – безсироваткове середовище MEM («Sigma», США), і культивували 2 доби, після чого визначали життєздатність, адгезивний та міграційний потенціал клітин.

Визначення виживаності клітин LLC in vitro. Кількісний аналіз співвідношення живих та мертвих клітин проводили після їх фарбування 0,4%-вим розчином трипанового синього («Sigma», США), приготованого на 0,1 М PBS, рН 7,2. До суспензії клітин додавали рівний об'єм 0,4%-вого розчину трипанового синього, через 5 хв підраховували клітини в 5 великих квадратах камери Горяєва. Визначали середню кількість та кількість клітин в 1 мл, враховуючи розведення клітин та об'єм інкубації. Підрахунок клітин проводили після куль-

тивування клітин LLC з повною заміною К-середовища hP-MSC, та в розведеннях 1:1; 1:4; 1:16; 1:64; 1:256. В якості контролю використовували клітини LLC, які культивували в середовищі MEM.

Визначення клітинного циклу та апоптозу LLC. Розподіл клітинного циклу та рівень апоптозу визначали за допомогою проточної цитометрії (Nicoletti, 1991, Garmanchuk et al, 2019). Аналізували клітини LLC, які культивували протягом 2 діб у К-середовищі hP-MSC та середовищі MEM (контроль). Суспензію клітин (5×10^5) осаджували центрифугуванням при 400 g впродовж 5 хв і двічі промивали фосфатно-сольовим буфером (PBS, pH 7,2). Клітини ресуспендували в 200 мкл PBS з наступним додаванням 300 мкл 0,1%-вого тритону в цитратному буфері (pH 6,8). Через 1 хв до зразків додавали 10 мкл рибонуклеази («Sigma», США) та 10 мкл пропідію йодиду («Sigma», США). Пробі інкубували впродовж 10 хв при 37 °C і 30 хв при кімнатній температурі в темряві, центрифугували при 400 g впродовж 10 хв, після чого супернатант видаляли. Осад фіксували додаванням 400 мкл 0,4%-вого розчину формаліну в PBS. Вимірювання проводили на проточному цитометрі FACS Calibur («Becton Dickinson», США) з аргонним лазером при 488 нм і 582/42 нм. Дані проточної цитометрії аналізували за допомогою програмного забезпечення Mod Fit LT 3.0 (BDIS, США). Визначення рівня апоптозу, яке базується на втраті ДНК через її міжнуклеосомну фрагментацію, проводили у гіподиплоїдній зоні.

Оцінка адгезивних характеристик культивованих клітин. Оцінку адгезивної здатності клітин проводили за умов інкубації з К-середовищем hP-MSC та в контролі і перевіряли на субстратну залежність за кількістю прикріплених клітин до поверхні 24-, або 96-лункового планшету через 2 доби інкубації. Адгезивний показник клітин LLC оцінювали після їх фарбування кристалічним фіолетовим з його наступним розчиненням в DMSO за оптичним поглинанням ($\lambda = 570$ нм), яке вимірювалось на мультилунковому спектрофотометрі Lab-systems Multiskan MS, Synergie Biotec (США), як описано (Golovynska, 2021).

Міграційний тест під впливом К-середовища від hP-MSC проводили за здатністю клітин LLC прикріплюватися та поширюватися на субстраті 3D культури. Для цього індукували 3D-сфероїди на низькоадгезивному субстраті з додаванням 0,2%-вого карбоксиметилцелюлози («Sigma», США). До клітин LLC в 3D-рості додавали К-середовище від hP-MSC, а в контролі – середовище MEM. Після 2 діб культивування, визначали площу сфероїдів та площу поширення клітин на субстраті за допомогою програми ImageJ 1.45 («NIH», США) на цифрових мікрофотографіях, зроблених з використанням камери Canon та інвертованого світлового мікроскопа Carl Zeiss Axiovert 40 (Німеччина).

Статистичний аналіз отриманих результатів дослідження проводили з використанням програмного забезпечення Statistica 6.0 та Microsoft Excel. Проводилась оцінка нормальності розподілу кількісних експериментальних даних і для оцінки достовірності виявлених змін застосовували t-критерій Стьюдента, достовірність значень приймалася при $p < 0,05$. Морфометричні показники підраховували за допомогою програм AxioVision та ImageJ. Отримані результати представлені у вигляді $M \pm m$ (середнє значення \pm стандартна похибка середнього).

Результати та їх обговорення. Раніше було проаналізовано транскриптом hP-MSC, згідно якого виявлено підвищення рівня експресії цитокінів *IL34*, *IL6*, *CXCL8*, *EDN1*, *IL17D*, *CSF2*, *IL32*, *IL11* та *IFNA1* і зниження рівня експресії генів, пов'язаних з ангиогенезом *ANGPTL1*, *ANGPTL2*, *PDGFB* і *PDGFD* у hP-MSC (Navakauskienė et al, 2023). Однак, отримані в попередніх дослідженнях (Stepanov et al, 2023, Ostrovska et al, 2024) дані щодо підсилення росту, метастазування та ангиогенезу за введення hP-MSC, як локально в пухлину LLC, яка розвивалась в стегновому м'язі мишей C57 Black, так і за їх системного внутрішньовенного введення, вказують на імовірність участі у цих процесах не лише клітин hP-MSC, а і секретованих цими клітинами гуморальних факторів. Тому, було перевірено рівень секреції TGF β , VEGF та IL-6, які можуть стимулювати онкогенні властивості клітин лінії LLC.

Було виявлено незначне збільшення цитокінів TGF β та IL-6 (табл. 1), тоді як рівень VEGF не відрізнявся від контролю.

Незважаючи на пухлино-супресорні ефекти, TGF β є одним із найпотужніших регуляторів взаємодії пухлинних клітин з позаклітинним матриксом, оскільки модулює такі процеси, як клітинна інвазія, імунна регуляція та мікрооточення пухлинних клітин (Massagué, 2008; Liu, 2018); інтерлейкін-6 (IL-6) є плеїотропним цитокіном, який бере участь у регуляції гематологічної та імунної відповідей (Bielins'ka, 2014). IL-6 секретується, головним чином, стромальними клітинами, але мало відомо про його точну роль у гомеостазі MSC людини і роль, яку він може відігравати в опосередкованій ними імунорегуляції (Dorronsoro A, 2020). Отримані нами результати свідчать, що інкубація клітин LLC із К-середовищем hP-MSC призводила до значущого збільшення секреції TGF β (до 20 %, $p < 0,05$), IL-6 на 24 % ($p < 0,05$), на відміну від VEGF – рівень якого не відрізнявся від контролю.

Визначення виживаності клітин LLC *in vitro*. В нашому дослідженні було виявлено стимулюючий вплив К-середовища hP-MSC на проліферативну активність та виживаність пухлинних клітин, порівняно з контролем (табл. 2).

При культивуванні LLC клітин з К-середовищем hP-MSC концентрованим та в розведеннях 1:1–1:16 концентрація пухлинних клітин зростала в 1,4–1,5 рази ($p < 0,05$), при цьому вміст мертвих клітин за повної заміни К-середовища hP-MSC та в розведенні 1:1 та 1:4 знижувався в 2,2–4 рази порівняно з контролем (табл. 2).

Отримані дані підтверджують результати, проведені *in vivo* щодо стимулюючої дії hP-MSC на ріст первинної пухлини карциноми легені Льюїс, за їх інокуляції безпосередньо в пухлину, та і при внутрішньовенному системному введенні (Stepanov et al, 2024)

Вплив К-середовища hP-MSC на прогресію клітинного циклу LLC за моношарового росту. Стимулююча дія на проліферацію клітин LLC була виявлена нами при аналізі клітинного циклу. Вміст клітин LLC в S-фазі клітинного циклу під дією hP-MSC і, відповідно, їх проліферативна здатність збільшувалися (рис. 1, табл. 3).

Згідно отриманих даних, виявлено зростання вмісту клітин в S-фазі клітинного циклу, так під впливом К-середовища hP-MSC частка клітин в S-фазі зростає на 17 % порівняно з контролем ($p < 0,05$), тоді як в G0/G1 вміст клітин зменшується на 24 %. (табл. 3)

Таблиця 1. Рівень продукції TGF β , VEGF IL-6 клітинами LLC за умов їх культивування в контрольному та збагаченому К-середовищі hP-MSCs

Фактор росту \ Умови інкубації	LLC (контроль)	LLC + К-середовище від hP-MSC
TGF β (pg/ml)	180 \pm 8	216 \pm 10 *
VEGF (pg/ml)	90 \pm 6	99 \pm 9
IL-6 (pg/ml)	120 \pm 7 (100 %)	149 \pm 10 *

Примітка. * – значуща різниця порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Таблиця 2. Кількість життєздатних LLC та вміст мертвих клітин LLC за культивування протягом 2 діб з К-середовищем hP-MSC в різних розведеннях

Розведення К-середовища hP-MSC	Нерозведене К-середовище	1:1	1:4	1:16	1:64	1:256	Контроль
Концентрація клітин LLC	12,5 \times 10 ³ \pm 0,4 \times 10 ^{3*}	11,8 \times 10 ³ \pm 1,1 \times 10 ^{3*}	12,9 \times 10 ³ \pm 1,7 \times 10 ^{3*}	13,2 \times 10 ³ \pm 2,2 \times 10 ³	9,3 \times 10 ³ \pm 1,7 \times 10 ³	7,9 \times 10 ³ \pm 0,9 \times 10 ³	8,7 \times 10 ³ \pm 0,9 \times 10 ³
Вміст мертвих клітин (%)	9,5 %*	8,1 %*	5,4 %*	14,4 %*	15,7 %	18,9 %	23 %

Примітка. * – значуща різниця порівняно з контролем ($p < 0,05$).

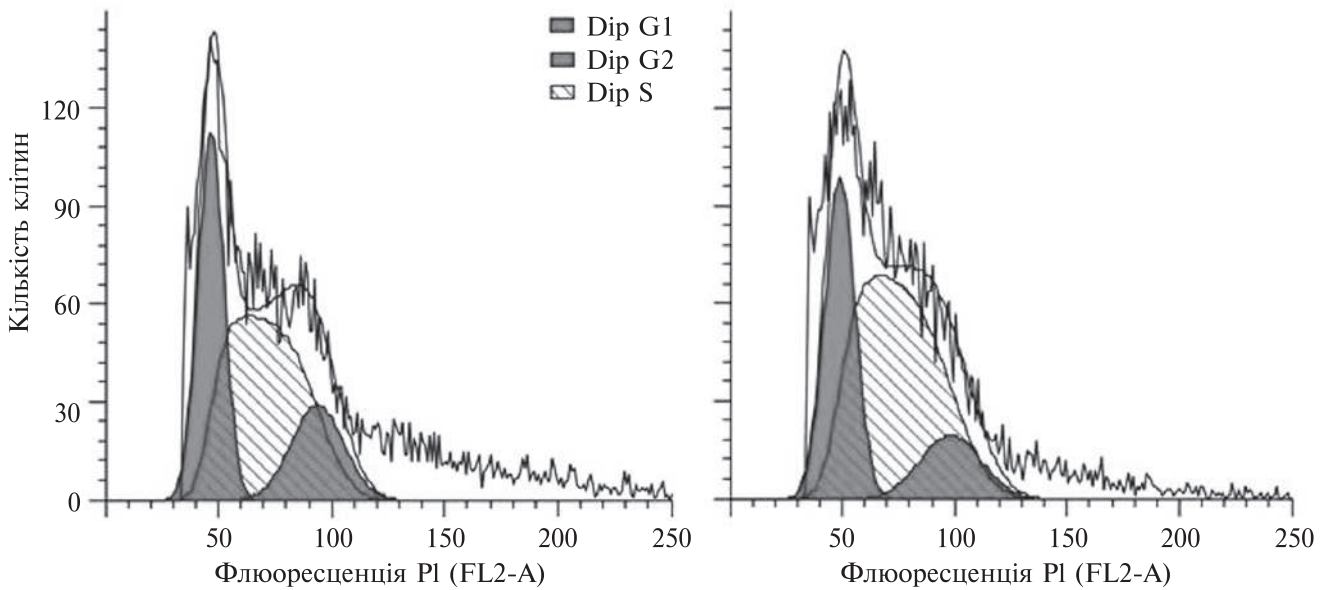


Рис. 1. Гістограми цитофлюориметричного аналізу клітинного циклу LLC при моношаровому рості за впливу К-середовища від hP-MSC

Вміст клітин в G2/M фазі в контролі і за дії К-середовища від hP-MSC достовірно не відрізнявся. Про/антиапоптичної дії К-середовища hP-MSC на клітини LLC в моношаровому рості не виявлено: рівень апоптозу в обох випадках становив біля 15 %. Виявлений стимулюючий ефект секретому hP-MSC на проліферативну активність пухлинних клітин *in vitro* може сприяти як росту і виживанню пухлини в цілому, так і активації утворених ними проангіогенних структур *in vivo* (Stepanov et al, 2023, Ostrovska et al, 2024).

Оцінка адгезивних характеристик культивованих клітин. За культивування клітин LLC з К-середовищем hP-MSC збільшився показник сумарного адгезивного потенціалу.

Таблиця 3. Розподіл клітин LLC за фазами циклу в контролі та за умов культивування з додаванням К-середовища hP-MSC

Фаза циклу	G1/G0 (%)	G2/M (%)	S (%)
Контроль LLC	30,39 ± 1,40	17,21 ± 0,61	52,41 ± 0,79
LLC + К-середовище hP-MSC	23,15 ± 4,50 *	15,09 ± 2,55	61,76 ± 1,96 *

Примітка. * – значуща різниця порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Клітини в контрольному середовищі зберігали округлу форму з мінімумом відростків, не було ознак їх розпластання та прикріплення до субстрату. В той же час розведення К-середовища hP-MSC у співвідношенні 1:1–1:16 індукувало збільшення кількості прикріплених до субстрату клітин (в середньому в 1,5 рази, порівняно з контролем (рис. 2)).

З одного боку, вважається, що збільшення міцності адгезії відповідає зниженню метастатичного потенціалу пухлинних клітин (Veri et al, 2020). Проте, з представлених на рис. 2, б мікрофото видно, що морфологічні особливості клітин LLC під впливом К-середовища hP-MSC відрізнялись не просто більш вираженим розпластанням і пасивним прикріпленням, а й активною перебудовою цитоскелету і фокальних контактів, що відображено у збільшенні кількості відростків, зміні форми клітин на трапецієвидну та полігональну. Подібні перебудови, що свідчать про ріст динаміки фокально-адгезивних процесів, дозволяють передбачити, що клітини LLC, оброблені К-середовищем hP-MSC, здатні мати більш виражену рухливість і, відповідно, інвазивний потенціал, що є одним із проявів онкогенності пухлинних клітин. Клітинна адгезія є важливою особливістю в міжклітинній комунікації та регуляції, а також має фунда-

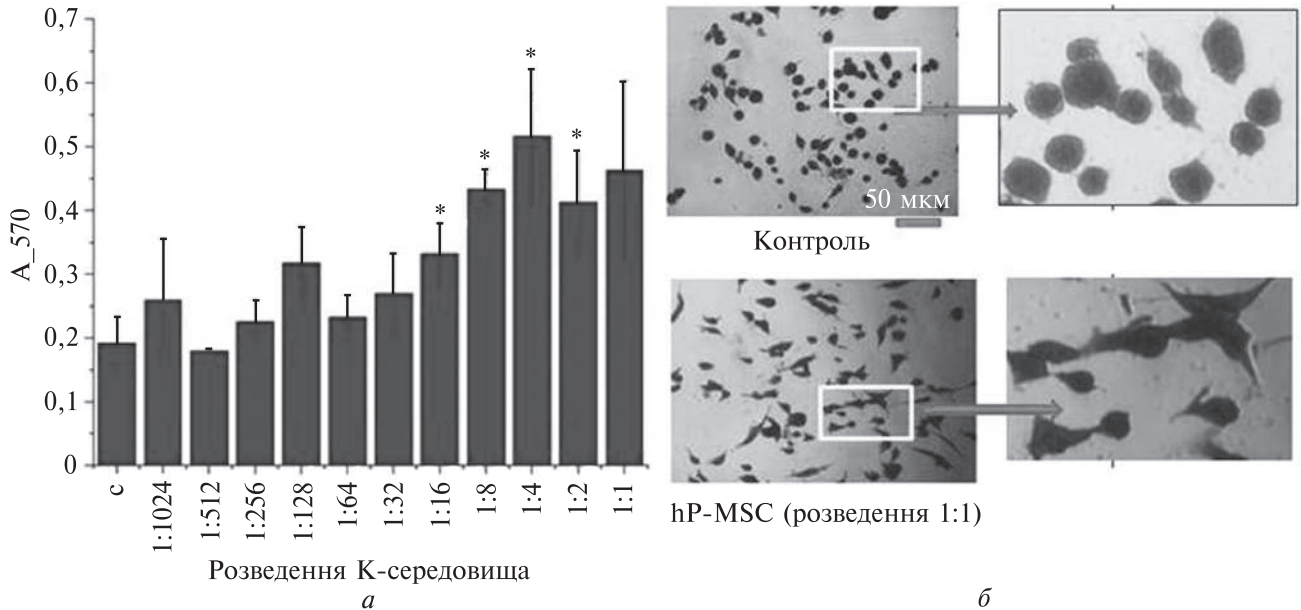


Рис. 2. Адгезивні показники клітин LLC під впливом різних розведень К-середовища клітин hP-MSC; *а* – колориметричний аналіз, *б* – морфологічний аналіз (репрезентивне фото). * – значуща різниця порівняно з контролем ($p < 0,05$)

ментальне значення для розвитку та підтримки тканин. Механічна взаємодія між клітиною та її позаклітинним матриксом (ECM) може впливати та контролювати поведінку та функцію клітини (Khalili and Ahmad, 2015). Також адгезія є критичним компонентом злоякісної трансформації, прогресування раку та розвитку хіміорезистентності. Молекули адгезії дозволяють пухлинним клітинам проникати в тканини, що оточують первинну пухлину, і екстравазувати під час метастазування. Крім того, молекули адгезії служать якорями, які розташовують пухлинні клітини в безпосередній близькості до імунних і стромальних клітин (Razi, 2023)

Міграційний тест. Використання тканинно-інженерних 3D-моделей останнім часом широко використовується для досліджень раку. 3D-моделі за своєю суттю більш біомімітичні порівняно з двовимірними клітинними моношарами, оскільки відображають тканино-специфічне поширення пухлини з наявними шарами проліферуючих мігруючих клітин, а також зон гіпоксії та некрозу (Pare, 2021). З використанням 3D моделі було показано збільшення проліферативного, міграційного потенціалу LLC під впливом К-середовища hP-MSC (рис. 3).

Так, показано збільшення кількості та розмірів сфероїдів LLC (майже вдвічі) в 3D-культурі, а також міграція клітин із сфероїдів, їх поширення по субстрату та проліферацію за впливу К-середовища hP-MSC, тоді як в контролі – майже не мігрували із сфероїдів та не поширювались по субстрату.

Аналіз клітинного циклу 3D-культури LLC показав зростання вмісту клітин в S-фазі на 12 % за дії секретому hP-MSC, порівняно з контролем (рис. 4, табл. 4).

Також для клітин контрольної групи за 3D умов відмічено збільшення апоптичного індексу (17 проти 9 % за впливу К-середовища hP-MSCs) (рис. 4) та кількості мертвих клітин (24 проти 5 % відповідно).

Таким чином, компоненти К-середовища, в якому культивували hP-MSC, в цілому, проявляють проонкогенний вплив на клітини LLC в культурі, про що свідчать показники виживаності клітин: так за дії К-середовища hP-MSC в розведеннях 1:1–1:16 знижено відсоток мертвих клітин в 1,8–2,5 рази порівняно з контролем ($p < 0,05$) та відмічено стимуляцію проліферації клітин LLC, зокрема, збільшення концентрації клітин в 1,3–1,4 рази ($p < 0,05$), та вмісту клітин в S-фазі клітинного циклу в 1.2 рази, порівняно з контро-

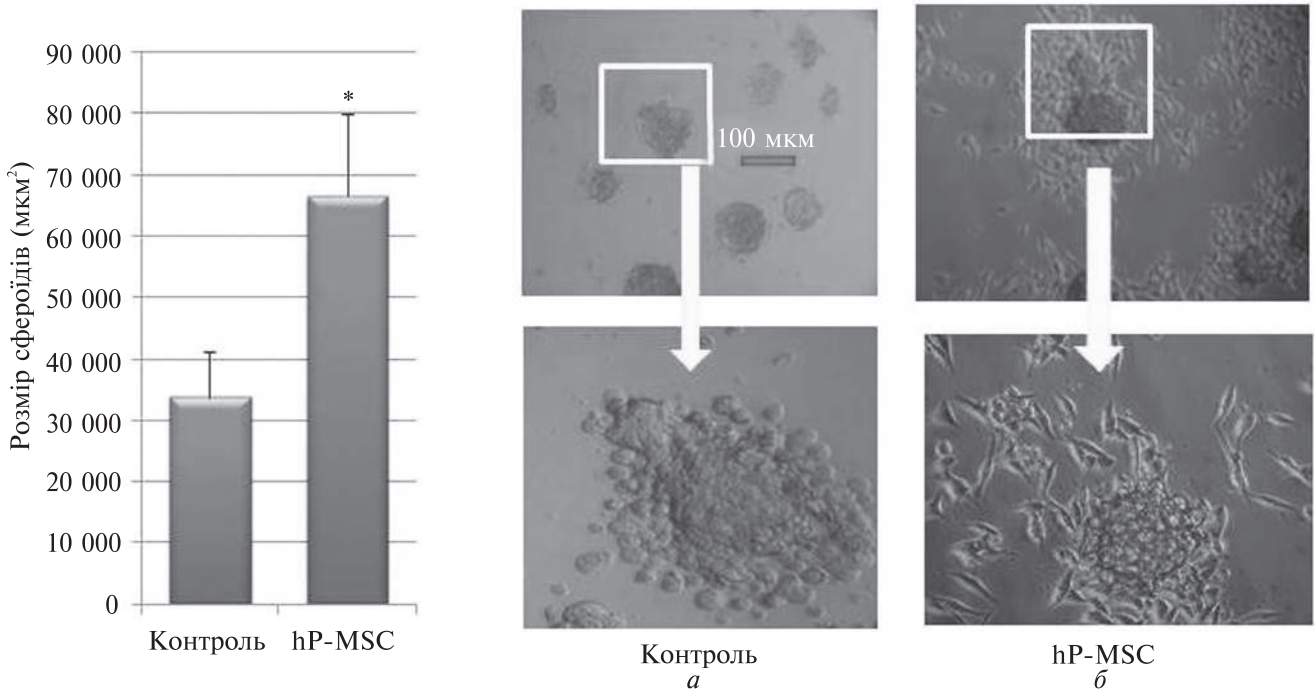


Рис. 3. Розміри сфероїдів клітин LLC під впливом К-середовища hP-MSCs. а – контроль, б – концентроване К-середовище (1:1)

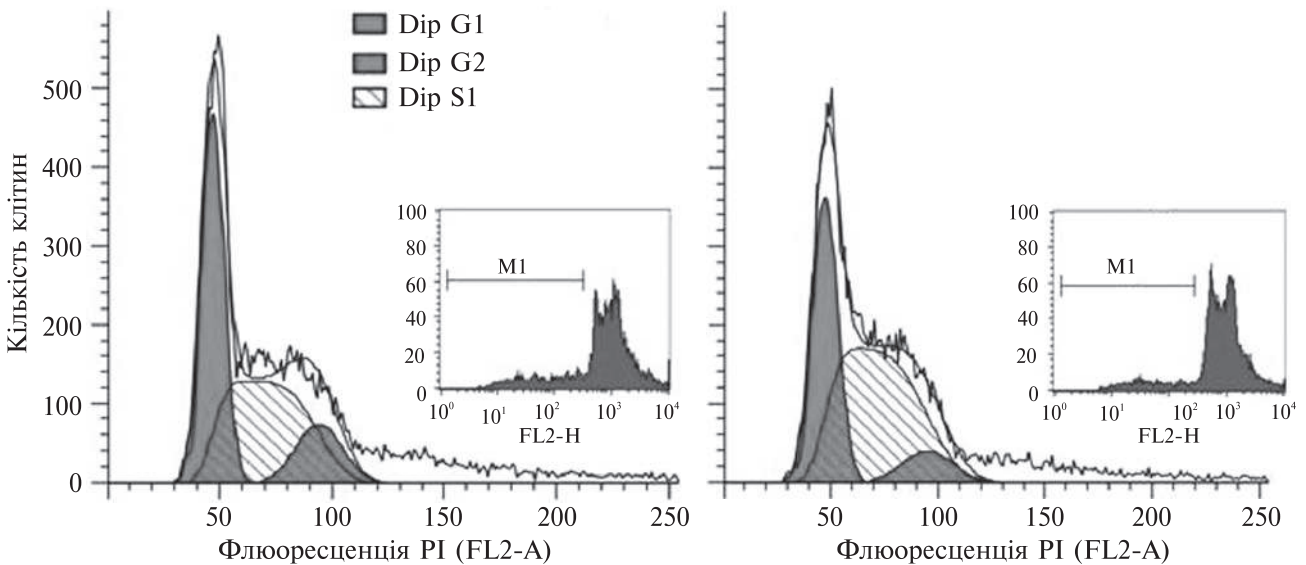


Рис. 4. Гістограми цитофлюориметричного аналізу клітинного циклу та рівня апоптозу клітин LLC в 3-D культурах за впливу К-середовища від hP-MSC та в контролі

лем ($p < 0,05$). Під впливом К-середовища hP-MSC відмічено модифікацію проонкогенних показників клітин LLC, таких як адгезія до субстрату та міграція з 3-D культур. В секретомі К-середовища hP-MSC після його додавання до клітин LLC відмічено зростання

продукції прозапальних цитокінів TGF β та ІІ-6, які відіграють важливу функцію в модифікації пухлинного мікрооточення (Yang, 2010; Alison, 2024). Збільшення динаміки фокально-адгезивних процесів і міграційної активності є свідченням епітеліально-мезенхімального пере-

Таблиця 4. Розподіл клітин LLC в умовах 3-D росту за фазами циклу та рівень апоптичних клітин в контролі та за культивування в К-середовищі hP-MSC

Фаза циклу/рівень апоптозу	% апоптичних клітин	G1/G0 (%)	G2/M (%)	S(%)
Контроль LLC	17 ± 1,2	42,91 ± 0,72	13,96 ± 0,361	43,13 ± 0,32
LLC+ К-середовище hP-MSC	9 ± 0,71*	37,01 ± 1,02 *	8,35 ± 061	54,63 ± 1,32 *

Примітка. *— значуща різниця порівняно з контролем (p < 0,05).

ходу, яке демонструє проонкогенний потенціал пухлинних клітин (Pawelek, 2008).

Отримані результати проонкогенного впливу К-середовища hP-MSC на культивовані клітини LLC *in vitro* підтверджують зроблені нами в попередніх дослідженнях висновки, щодо зростання пухлини, підсилення метастатичного та ангіогенного потенціалу в моделях карциноми LLC *in vivo* в присутності hP-MSC.

Згідно даних літератури (Uder, 2018) різні типи MSC залежно від умов мікрооточення можуть проявляти як антионкогенні так і проонкогенні впливи на пухлинні клітини. В наших дослідженнях вперше показано, що за умов співкультивування пухлинних клітин LLC з кондиційованим середовищем MSC плаценти людини продемонстровано переважання саме проонкогенних властивостей за низкою показників.

Дотримання етичних стандартів. Усі дослідження проводилися відповідно до принципів біомедичної етики, викладених у Гельсінкській декларації 1964 року та пізніших поправках до неї. Комісія з біоетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України розглянула матеріали наукової публікації: «Вплив секретому мезенхімальних стовбурових клітин плаценти на функціональні властивості клітин карциноми легені Льюїс *in vitro*», на засіданні Комісії з біоетики № 36 від 13.02.2024. Кожен учасник дослідження надав добровільну письмову інформовану згоду після отримання пояснень щодо потенційних ризиків і переваг, а також характеру майбутнього дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Робота виконана в рамках НДР, що фінансується НАН України шифр 2.2.4.12

«Зміни транскрипційного профілю та фенотипу клітин під впливом терапевтичних агентів при онкогенній трансформації чи запаленні» № ДР 0123U100932 та спільного проекту ВЦП КНУ імені Тараса Шевченка та НАН України «Цитокініни лікарських базидієвих грибів: онкостатична та імуномодельююча дія в культурах пухлинних клітин № ДР0122U002461».

INFLUENCE OF THE SECRETOME OF PLACENTA MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF LEWIS LUNG CARCINOMA CELLS IN VITRO

L.V. Garmanchuk, G.V. Ostrovska, I.A. Stupak, T.V. Bukreieva, O.I. Gorbach, L.I. Ostapchenko

Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine» of Taras Shevchenko National University of Kyiv
Akademika Glushkova avenue, 2, Kyiv, 02000, Ukraine
National Academy of Sciences of Ukraine Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine,
St. Akademika Zabolotny, 150, Kyiv, 03680, Ukraine
National Cancer Institute, Ukraine,
St. 33/43 Yulia Zdanovska Street, Kyiv, 03022, Ukraine

E-mail: liudmyla_garmanchuk@ukr.net, g_ostrovska@knu.ua, ivan.stupak@knu.ua, stapchenko@knu.ua, tahbko@gmail.com, horbach.alex@gmail.com

The work investigated the influence of the components of the conditioned medium (K-medium) in which mesenchymal cells of the human placenta (hP-MSC) were cultured, on the characteristics of Lewis lung carcinoma (LLC) cells in culture. For the first time, it was shown that the components of the K-environment (secretome) exert a pro-oncogenic effect on LLC cells, as evidenced by an increase in cell survival rates, stimulation of LLC cell proliferation, and a decrease in the level of apoptotic cells. The effect of K-medium on

the adhesion characteristics of LLCs during monolayer growth and their migration from 3-D cultures was also demonstrated. When hP-MSC secretome interacts with cultured LLC cells, an increase in the production of pro-inflammatory cytokines TGF β and IL-6 was noted. At the same time, the level of the proangiogenic factor VEGF remains practically unchanged. Similar changes in the microenvironment during the interaction of mesenchymal and tumor cells may underlie various pro-oncogenic effects during the development and metastasis of Lewis lung carcinoma in vivo, recorded in our previous studies with different methods of MSC inoculation.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Alison A, Charles S, Bellows F (2024) Modification of the inflammatory profile of mesenchymal stem cells using different culture conditions. *Future Medicine*. <https://doi.org/10.2217/rme-2023-0162>
- Beri P, Popravko A, Yeoman B et al (2020) Cell Adhesiveness Serves as a Biophysical Marker for Metastatic Potential. *Cancer Res* 80(4):901–911. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1794>
- Bielins'ka IV, Lynchak OV, Rybal'chenko TV, Hurniak OM (2014) Hematological effects of the protein kinase inhibitor maleimide derivative in dimethylhydrazin E-induced colorectal carcinogenesis of rats. *Fiziol Zh* 60(4):40–49. <https://doi.org/10.15407/fz60.04.040>
- Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA et al (2008) Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF κ B-but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 294(3):675–682. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00437.2007>
- Cuiffo BG, Karnoub AE (2012) Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Adh Migr* 6(3):220–230. <https://doi.org/10.4161/cam.20875>
- 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>
- Dorronsoro A, Lang V, Ferrin I et al (2020) Intracellular role of IL-6 in mesenchymal stromal cell immunosuppression and proliferation. *Sci Rep* 10:21853. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78864-4>
- Garmanchuk LV, Borovaya MN, Nehelia AO, Inomistova M, Khranovska NM, Tolstanova GM, Blume YaB, Yemets AI (2019) CdS quantum dots obtained by “green” synthesis: comparative analysis of toxicity and effects on the proliferative and adhesive activity of human cells. *Cytol Genet* 53(2):132–142. <https://doi.org/10.3103/S0095452719020026>
- Goel HL, Mercurio AM (2013) VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* 13(12):871–882. <https://doi.org/10.1038/nrc3627>
- Golovynska I, Stepanov YV, Golovynskiy S et al (2022) Macrophages Modulated by Red/NIR Light: Phagocytosis, Cytokines, Mitochondrial Activity, Ca²⁺ Influx, Membrane Depolarization and Viability. *Photochem Photobiol* 98(2):484–497. <https://doi.org/10.1111/php.13526>
- Khalili AA, Ahmad MRA (2015) Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int J Mol Sci* 16:18149–18184. <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>
- Li P, Gong Z, Shultz LD, Ren G (2019) Mesenchymal stem cells: from regeneration to cancer. *Pharmacol Ther* 200:42–54. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.04.005>
- Liu S, Chen S, Zeng J (2018) TGF- β signaling: A complex role in tumorigenesis (Review). *Mol Med ep* 17:699–704. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7970>
- Massagué J (2008) TGF β in Cancer. *Cell* 134(2):215–230. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>
- Navakauskienė R, Zukauskaitė 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>
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC et al (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immun Method* 139(2):271–279. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90198-o](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90198-o)
- Ostrowska G, Stepanov YV, Garmanchuk L et al (2024) Cytological manifestations of the influence of cryopreserved placenta mesenchymal stem cells on the feature of neoangiogenesis in LLC tumors *Cyt Genet* 58(3):29–40
- Pape J, Emberton M, Cheema U (2021) 3D Cancer Models: The Need for a Complex Stroma, Compartmentalization and Stiffness. *Front Bioeng Biotechnol* 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.660502>
- Patel SA, Nilsson MB, Le X et al (2023) Molecular Mechanisms and Future Implications of VEGF/VEGFR in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 29:30–39 <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-1366>
- Pawelek JM (2008) Cancer-cell fusion with migratory bone-marrow-derived cells as an explanation for metastasis: new therapeutic paradigms. *Future Oncol* 4:449–452
- Razi S, Haghparast A, Khameneh SC et al (2023) The role of tumor microenvironment on cancer stem

- cell fate in solid tumors. *Cell Comm Signal* 21:143. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01129-w>
- Romano S, Tufano M, D'Arrigo P et al (2020) Cell stemness, epithelial-to-mesenchymal transition, and immunoevasion: Intertwined aspects in cancer metastasis. *Semin Cancer Biol* 60:181–190. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.015>
- Schaper F, Rose-John S (2015) Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev* 26:475–487. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.004>
- Shi Y, Du L, Lin L, Wang Y (2017) Tumour-associated mesenchymal stem/stromal cells: emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 16:35–52. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.193>
- Smith AA, Bellows CF (2024) Modification of the inflammatory profile of mesenchymal stem cells using different culture conditions. *Fut Med*. <https://doi.org/10.2217/rme-2023-0162>
- 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. *J Quantit Cell Sci*. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24814>
- Suzuki K, Sun R, Origuchi M et al (2011) Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Mol Med* 17:579–587. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00157>
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Uder Ch, Brückner S, Winkler S et al (2018) Mamalian MSC from Selected Species: Features and Applications. *Cytometry Part A*. 93A:32–49.
- Zhang L, Zhang D, Yang L et al (2021) Roles of cell fusion between mesenchymal stromal/stem cells and malignant cells in tumor growth and metastasis. *FEBS J* 288:1447–1456. <https://doi.org/10.1111/febs.15483>
- Yang L, Pang Y, Moses HL (2010) TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 31:220–227

Надійшла в редакцію 13.03.2024
Після доопрацювання 10.04.2024
Прийнята до друку 18.07.2024