



УДК 616-006.04:576.54

© 2009

Д. Л. Колесник, Л. В. Гарманчук, О. М. Пясковська, Г. І. Соляник

**Взаємодія ендотеліальних та пухлинних клітин за умов їхнього “контактного” та “безконтактного” співкультивування**

*(Представлено академіком НАН України В. Ф. Чехуном)*

*Показано, що характер взаємодії між ендотеліальними та пухлинними клітинами за умов їх “контактного” та “безконтактного” співкультивування може відображувати особливості росту та метастазування злоякісної пухлини, зокрема її ангіогенний та метастатичний потенціал.*

Взаємодія між ендотеліальними та пухлинними клітинами не тільки посилює васкуляризацію злоякісної пухлини, але й значно впливає на її ріст та метастазування. Й дійсно, пухлинні клітини за рахунок їхньої здатності секретувати велику кількість проангіогенних та антиангіогенних факторів, протеолітичних ферментів, хемоатрактантів тощо можуть істотно впливати на пухлинний ангіогенез [1–3]. З іншого боку, ендотеліальні клітини здатні посилювати проліферацію пухлинних клітин [2]. Дослідження взаємодії між ендотеліальними та пухлинними клітинами *in vitro* може сприяти з'ясуванню механізмів росту та метастазування пухлини.

У зв'язку з вищевикладеним ми ставили за мету дослідити взаємовплив ендотеліальних клітин та пухлинних клітин за умов їхнього “контактного” та “безконтактного” співкультивування. Як пухлинні клітини використовували два варіанти клітин карциноми легень Льюїс — LLC та LLC/R9, які відрізняються між собою ангіогенним та метастатичним потенціалом; як ендотеліальні клітини вибрано лінію МАЕС — ендотеліальні клітини мишачої аорти [4, 5].

Карциному легень Льюїс (LLC) було одержано з Національного банку клітинних ліній та пухлинних штамів Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Варіант карциноми Льюїс LLC/R9 одержано в результаті експериментальної прогресії LLC *in vivo* в напрямку формування лікарської резистентності до протипухлинного препарату цисплатин [6]. Пухлинні та ендотеліальні клітини підтримували в культуральному середовищі RPMI 1640 з додаванням 10% телячої ембріональної сироватки (“Sigma”), 2 мМ L-глутаміну (“Sigma”) та 40 мкг/мл гентаміцину при 37 °С у вологій атмосфері, з 5% вмістом CO<sub>2</sub>.

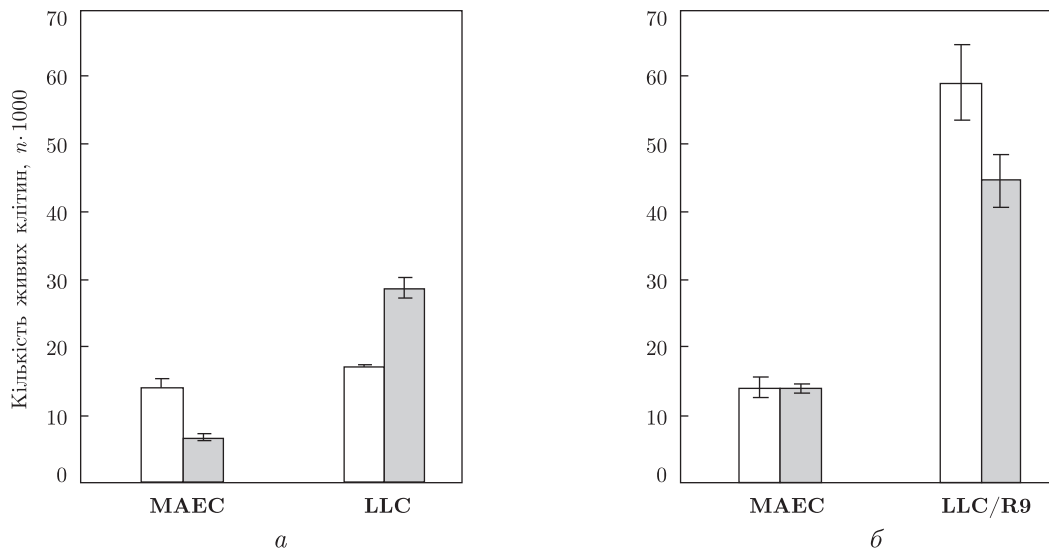


Рис. 1. Кількість клітин після 24-годинного “контактного” співкультивування МАЕС та LLC (а), МАЕС та LLC/R9 (б): світлі стовпчики — кількість ендотеліальних або пухлинних клітин через 24 год їхньої інкубації; темні стовпчики — те саме за умов їхнього співкультивування

У випадку “безконтактного” співкультивування МАЕС розміщували в дифузійні камери, а пухлинні клітини — на дно 6-лункової планшети. Підрахунок пухлинних та ендотеліальних клітин проводили через 4 год їхньої попередньої інкубації (точка “0”) та через 24 і 42 год їхнього співкультивування за допомогою прямого підрахунку в камері Горяєва.

У випадку “контактного” співкультивування один з типів клітин забарвлювали за допомогою вітального барвника (ефір 5(6)- карбофлуоресцеїн діацетат *N*-сукцинімідилу (CFSE)) згідно зі стандартною процедурою [7]. Кількість пухлинних та ендотеліальних клітин через 24 год їхнього співкультивування оцінювали, виходячи з відсотку CFSE-забарвлених клітин, який вимірювали за допомогою проточної цитофлуориметрії, а також загальної кількості клітин, підрахованих за допомогою камери Горяєва. Усі експерименти виконано у двох повторях. В усіх випадках пухлинні клітини відбирали з експоненційної фази росту, тоді як ендотеліальні клітини (МАЕС) — з експоненційної та стаціонарної фаз їхнього росту.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили з використанням описативних методів, *t*-критерію Стьюдента та методів нелінійної регресії.

У результаті проведеного дослідження встановлено, що проліферація ендотеліальних та пухлинних клітин за умов їхнього співкультивування залежить від фази росту ендотеліальних клітин, а також типу їхньої взаємодії (“контактне” або “безконтактне”). Так, “контактне” співкультивування клітин МАЕС (з експоненційної фази) та клітин LLC протягом 24 год призводить до значного пригнічення проліферації ендотеліальних клітин та стимуляції проліферації пухлинних: кількість ендотеліальних клітин знижується на 53,3% ( $p < 0,01$ ), кількість пухлинних клітин підвищується на 68,7% ( $p < 0,01$ ) порівняно з відповідним контролем (рис. 1). Натомість, “безконтактне” співкультивування цих клітин протягом такого ж терміну інкубації спричинює пригнічення проліферації пухлинних клітин (їхня кількість знижується майже на 24%,  $p < 0,05$ ) та практично не впливає на проліферацію ендотеліальних клітин (кількість ендотеліоцитів істотно не змінюється) (рис. 2, рис. 3). Вказані ефекти виявляються і при подовженні терміну інкубації до 42 год.

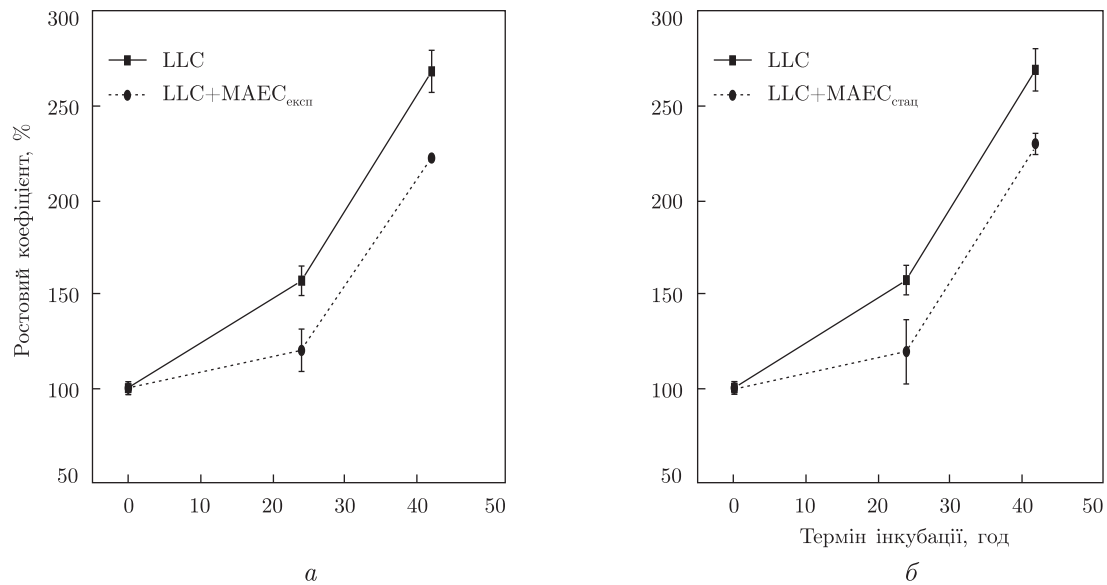


Рис. 2. Кінетика росту клітин LLC за умов їхнього “безконтактного” співкультивування з ендотеліальними клітинами з експоненційної (а) та стаціонарної (б) фази росту

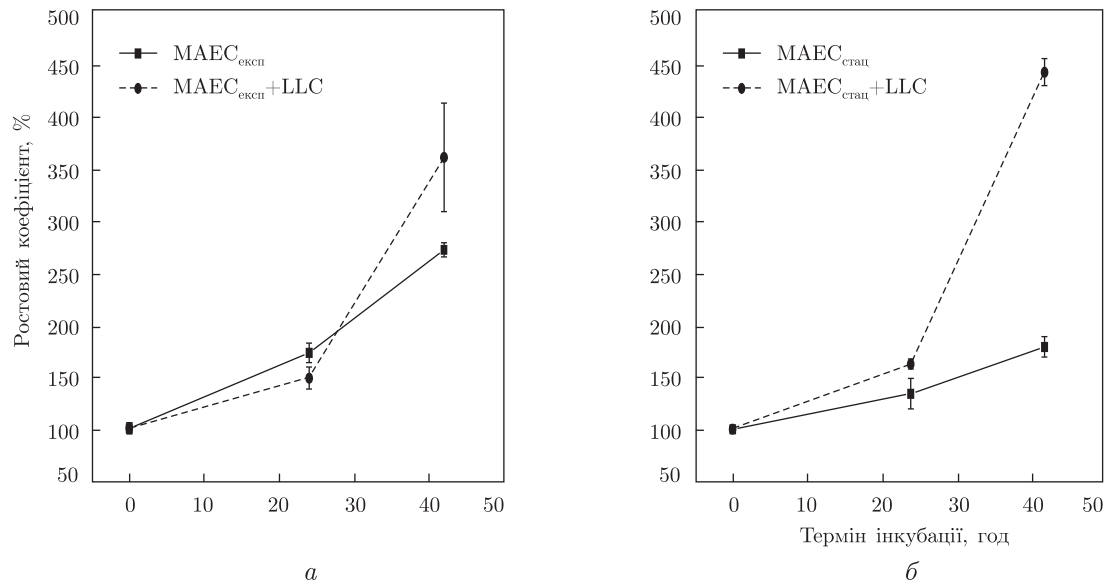


Рис. 3. Кінетика росту ендотеліальних клітин з експоненційної (а) та стаціонарної (б) фази росту за умов їхнього “безконтактного” співкультивування з клітинами LLC

“Контактне” співкультивування MAEC (в експоненційній фазі) з клітинами LLC/R9, на відміну від такого з клітинами LLC, значно не впливає на проліферацію ендотеліальних клітин і в той же час пригнічує проліферацію клітин LLC/R9: кількість ендотеліоцитів через 24 год сумісної інкубації практично не змінюється, тоді як кількість клітин LLC/R9 знижується на 24,3% ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 1) порівняно з показниками у відповідному контролі.

Такі різнонаправлені впливи ендотеліальних клітин на ріст двох варіантів клітин карциноми Льюїс за умов їх “контактного” співкультивування можуть бути пов’язані з різним

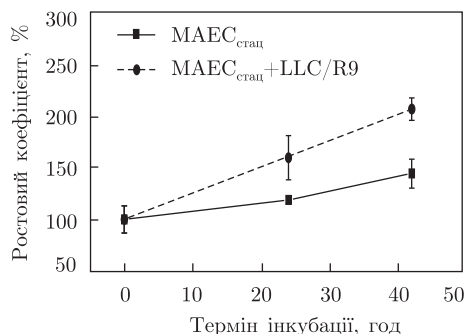


Рис. 4. Кінетика росту ендотеліальних клітин зі стаціонарної фази росту за умов їхнього “безконтактного” співкультивування з клітинами LLC/R9

рівнем їхньої туморогенності. Зокрема, відомо, що рівень метастатичного ураження легенів у мишей з LLC/R9 є втричі нижчим, ніж у мишей з LLC [8].

За результатами дослідження швидкості росту ендотеліальних та пухлинних клітин за умов їхнього “безконтактного” співкультивування встановлено однонаправлений вплив обох варіантів пухлинних клітин на ріст ендотеліоцитів. Зокрема, як клітини LLC, так і клітини LLC/R9 спричинюють значну стимуляцію росту ендотеліальних клітин (зі стаціонарної фази). При чому стимуляція росту ендотеліоцитів у випадку клітин LLC є значно вираженішою порівняно з такою клітинами LLC/R9 (у першому випадку швидкість росту ендотеліоцитів збільшується у 2,5 рази ( $p < 0,05$ ), у другому — лише в 2 рази ( $p < 0,05$ )) (рис. 4, табл. 1). Проте рівень продукції VEGF, ключового індуктора пухлинного ангіогенезу, клітинами LLC/R9 у 1,5 рази перевищує ( $p < 0,05$ ) рівень продукції цього фактору клітинами LLC [6, 9].

Що ж до впливу ендотеліальних клітин на швидкість росту пухлинних, то ендотеліоцити не впливають на швидкість росту клітин LLC, але пришвидшують ріст клітин LLC/R9 на 22% ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 1). Раніше було показано, що клітини LLC/R9 за швидкістю росту в умовах *in vitro* істотно не відрізняються від клітин LLC, тоді як в умовах росту *in vivo* значно випереджають останні [8]. Враховуючи одержані нами дані, можна припустити,

Таблиця 1. Параметри росту ендотеліальних та пухлинних клітин за умов їхнього “безконтактного” співкультивування

Клітинна лінія	Співкультивування з клітинами	Швидкість росту клітинної лінії, доба <sup>-1</sup>
LLC	—	0,023 ± 0,002
	MAEC <sub>експ</sub>	0,018 ± 0,004*
	MAEC <sub>стац</sub>	0,02 ± 0,005
LLC/R9	—	0,0075 ± 0,0013
	MAEC <sub>стац</sub>	0,012 ± 0,002*
MAEC <sub>експ</sub>	—	0,024 ± 0,001
	LLC	0,029 ± 0,005*
MAEC <sub>стац</sub>	—	0,014 ± 0,002
	LLC	0,035 ± 0,005*
MAEC <sub>стац</sub>	—	0,009 ± 0,003
	LLC/R9	0,018 ± 0,003*

\*Показник статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) відрізняється від такого у відповідному контролі.

що висока швидкість росту LLC/R9 *in vivo* обумовлена в тому числі здатністю ендотеліальних клітин стимулювати ріст клітин LLC/R9.

Таким чином, одержані нами результати вказують на те, що характер взаємодії між ендотеліальними та пухлинними клітинами може відображувати особливості росту та метастазування злоякісної пухлини, зокрема її ангиогенний та метастатичний потенціал.

1. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2000. – **11**. – P. 617–624.
2. Zhong L., Roybal J., Chaerkady R. et al. Identification of secreted proteins that mediate cell-cell interactions in an *in vitro* model of the lung cancer microenvironment // *Cancer Res.* – 2008. – **68**. – P. 7237–7245.
3. Markowska A., Uraśńska E., Domagala W. *In vitro* assessment of adhesion molecules expression by human endothelial cells cocultured with c-erbB2-positive and c-erbB2-negative breast carcinoma cell lines // *Pol. J. Pathol.* – 2008. – **59**. – P. 49–54.
4. Gumcovski F., Kaminska G., Kaminski M. et al. Heterogeneity of mouse vascular endothelium // *Blood Vessels.* – 1987. – **24**. – P. 11–23.
5. Garmanchouk L. V., Pyaskovskaya O. N., Yanish Yu. et al. Influence of aconitine-containing herbal extract BC1 on proliferative and electrokinetic characteristics of endothelial cells // *Exp. Oncol.* – 2005. – **27**. – P. 262–266.
6. Solyanik G. I., Pyaskovskaya O. N., Garmanchouk L. V. Cisplatin-resistant Lewis lung carcinoma cells possess increased level of VEGF secretion // *Ibid.* – 2003. – **25**. – P. 260–265.
7. Wang X.-Q., Duan X.-M., Liu L.-H. et al. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling // *Acta Biochim. et Biophys. Sinica.* – 2005. – **37**. – P. 379–385.
8. Solyanik G. I., Fedorchuk A. G., Pyaskovskaya O. N. et al. Anticancer activity of aconitine-containing herbal extract BC1 // *Exp. Oncol.* – 2004. – **26**. – P. 307–311.
9. Pyaskovskaya O. N., Dasyukevich O. I., Kolesnik D. L., Garmanchouk L. V., Todor I. N., Solyanik G. I. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance // *Ibid.* – 2007. – **29**. – P. 197–202.

*Інститут експериментальної патології,  
онкології та радіобіології  
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ*

*Надійшло до редакції 20.02.2009*

**D. L. Kolesnik, L. V. Garmanchouk, O. M. Pyaskovskaya, G. I. Solyanik**

### **Interactions between endothelial and tumor cells under their “contact” and “contactless” co-cultivation**

*The interactions between endothelial and tumor cells under their “contact” and “contactless” co-cultivation are studied. It is shown that the differences in metastatic ability and angiogenic potential of cancer cells are related to the nature of their interplay with endothelial cells.*