

UDC 576

Модель *in vitro* для изучения взаимодействия стромальных клеток и клеток опухолевого происхождения

Е. А. Шкарина, О. В. Чередник, И. А. Тихонкова, А. И. Хоруженко

Государственная ключевая лаборатория молекулярной и клеточной биологии
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина 03680

a.i.khoruzhenko@imbg.org.ua

Цель. Разработать модель для изучения взаимодействия опухолевых и стромальных клеток в условиях трехмерной культуры. **Методы.** Культивирование клеток линии HeLa и дермальных фибробластов человека в монослойной и трехмерной культуре, иммунофлуоресцентный и иммуногистохимический анализ. **Результаты.** Предложен подход, базирующийся на исследовании непосредственных взаимодействий клеток многоклеточных сфероидов опухолевых клеток и сфероидов фибробластов. Последующий иммунофлуоресцентный анализ дает возможность определить происхождение клеток в зоне их контакта. **Выводы.** Описанная модель будет полезна как для изучения базовых механизмов канцерогенеза, так и при поиске мишеней для противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: взаимодействие стромальных и опухолевых клеток, трехмерные культуры злокачественных клеток, многоклеточные сфероиды.

Введение. В условиях организма рост и развитие раковой опухоли происходят в контексте системы сложных гомо- и гетеротипических межклеточных взаимодействий, оказывающих существенное влияние на выживание и пролиферацию клеток опухоли, а также на процессы инвазии, ангиогенеза и метастазирования [1]. Фибробласты являются основным клеточным компонентом стромы раковой опухоли. Они секретируют компоненты межклеточного матрикса, такие как фибриллярные коллагены, фибронектин и тенасцин С, а также продуцируют значительное количество ауто- и паракринных факторов роста [2, 3]. В некоторых случаях фибробласты также активно участвуют в преобразовании межклеточного матрикса за счет секреции матриксных металлопротеиназ MMP2, MMP3 и MMP9 [1].

Известно, что раковые клетки способны влиять на свойства окружающей соединительнотканной стромы и изменять ее характеристики, создавая, та-

ким образом благоприятное микроокружение для дальнейшей прогрессии опухоли. В процессе развития раковой опухоли происходит активация стромальных фибробластов, подобная той, что наблюдается при заживлении ран и фиброзе тканей [3]. Процесс активации фибробластов включает в себя изменение ряда морфофункциональных характеристик, а также экспрессию некоторых специфических биохимических маркеров, таких как гладкомышечный актин и фибробласт-специфический белок (FSP), а также фибробласт-активирующий белок (FAP) и др. Активированные фибробласты стимулируют дальнейшую прогрессию опухоли, секретируя большое количество факторов роста, гормонов и цитокинов, среди которых PDGF- α /в, TGF β 1, bFGF, IL-6, LPA и эйкозаноиды, а также через установление непосредственных межклеточных контактов и ремоделирование окружающего матрикса [1, 4]. Опухоль-ассоциированные фибробласты не только симулируют пролиферативную активность опухолевых клеток, но также участвуют в инициа-

ции их эпителиально-мезенхимальных переходов. Кроме того, они способны инициировать появление раковых стволовых клеток в составе популяции опухолевых клеток [4] и играют важную роль в образовании органоспецифических ниш, благоприятных для оседания циркулирующих раковых клеток и образования метастазов [5].

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что стромальные элементы могут существенно влиять на чувствительность злокачественных клеток к противоопухолевым препаратам, а также участвовать в формировании хеморезистентности опухоли. Одновременно существуют убедительные доказательства того, что в ряде случаев нормальное клеточное микроокружение способно в значительной мере препятствовать развитию раковой опухоли, снижая ее пролиферативную активность и уменьшая риск инвазии [6]. В связи с этим модели, предусматривающие наличие стромальных элементов, могут оказаться удобным инструментом для изучения молекулярных основ взаимного влияния стромальных и трансформированных клеток и их роли в инициации и ингибировании процессов онкогенеза, а также дать необходимую информацию для разработки новых подходов к профилактике и терапии раковых заболеваний [2, 4, 6].

Для изучения межклеточных взаимодействий *in vitro* используют ряд методик, начиная с непрямых методов, основанных на выявлении действия кондиционированной среды, полученной от фибробластов и других типов клеток, на различные аспекты поведения раковых клеток в культуре, и заканчивая различными техниками совместного культивирования клеток двух и более типов. При этом используют как двух-, так и трехмерные системы, состоящие из клеток двух и более типов, а также смешанные и промежуточные варианты [7, 8].

Преимуществами трехмерного культивирования являются сохранение поляриности и морфологии клеток, а также характера генной экспрессии и активации внутриклеточных сигнальных каскадов, характерных для исходной ткани. Показано, что клетки в 2Д и 3Д культурах значительно отличаются по ряду морфологических и биохимических параметров, включая экспрессию рецепторов к факторам роста и ряду других паракринных регулято-

ров, а также по уровню протеолитической активности, способности к миграции и чувствительности к некоторым терапевтическим агентам [8].

При работе с органотипическими трехмерными культурами применяют ряд техник, наиболее распространенной среди которых является образование многоклеточных сфероидов из одного или более типов клеток.

Для получения трехмерных агрегатов суспензию клеток наносят на неадгезивный субстрат, в качестве которого чаще всего используют Матригель, агарозу или их аналоги, что способствует инициации межклеточных контактов и образованию многоклеточных агрегатов [7]. В последние годы в связи с ростом популярности 3Д культивирования разработано большое количество способов получения таких агрегатов, начиная от традиционных, таких как метод висячей капли, метод вращающихся флаконов и «сэндвич»-метод, и заканчивая созданием различных биоинженерных систем и микрореакторов для быстрого получения большого количества сфероидов [8, 9].

Изучение взаимодействия раковых и стромальных клеток в трехмерных условиях может дать более полное представление о гетеротипических межклеточных взаимодействиях в составе раковой опухоли и роли компонентов стромы в регуляции различных стадий онкогенеза [9, 10]. Для получения гетеротипических агрегатов чаще всего применяют следующие методы: формирование сфероидов смешанного типа, культивирование сфероидов одного типа клеток с монослоем клеток другого типа, добавление суспензии клеток к уже сформированным сфероидам другого типа клеток [10, 11].

Предложенный нами метод состоит во взаимодействии уже сформированных сфероидов из фибробластов человека и клеток линии HeLa.

Материалы и методы. *Культура клеток.* Клетки линии HeLa, происходящие из карциномы шейки матки, культивировали в питательной среде DMEM («Sigma», США) с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (FBS, «Hy Clone», США), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 4 мМ глутамина («РАА», США) до достижения ими 80–90 % конfluenceности монослоя. Клетки снимали раствором 0,25 %-й трипсин–0,02

%-й ЭДТА («РАА») и подсчитывали в камере Горяева. Предварительно готовили 1 %-й раствор агарозы (# 11400, «Serva», США) на деионизированной воде, после чего его автоклавировали. 1 мл горячей агарозы наслаивали на лунки 24-луночного планшета. После остывания промывали питательной средой с сывороткой. $5 \cdot 10^3$ клеток вносили в лунки и культивировали в течение 5 сут, наблюдали формирование многоклеточных агрегатов. Первичная культура дермальных фибробластов человека любезно предоставлена К. А. Нижерадзе (Институт коллоидной химии и химии воды им. А. В. Думанского НАН Украины).

Фибробласты культивировали в среде F-12 с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 4 мМ глутамина. Как указано выше для клеток HeLa, фибробласты снимали с ростовой поверхности смесью 0,25 %-й трипсин–0,02 %-й ЭДТА и переносили по $5 \cdot 10^3$ клеток в лунки, покрытые агарозой для формирования многоклеточных агрегатов. Через 5 сут агрегаты, сформированные клетками HeLa и фибробластами, помещали в одну лунку и наблюдали их слияние. Агрегаты фиксировали формалином, парафиновые срезы получали по стандартной гистологической методике.

Иммуногистохимический и иммунофлуоресцентный анализ. Полученные гистологические срезы подвергали термической обработке в микроволновой печи (700 Вт) дважды в течение 5 мин в 10 мМ цитратном буфере, рН 6, для экспонирования детерминант [12]. Аутофлуоресценцию препаратов подавляли при помощи буфера, содержащего 10 мМ сульфат меди, 50 мМ ацетат аммония, рН 5, в течение 20 мин при комнатной температуре. Эпителиальные антигены определяли, используя мышинные моноклональные антитела к цитокератинам (anti-Pan cytokeratin, Clone 11, «Sigma») в разведении 1:100, фибробласты – с применением антител к виментину («Dako», Дания) в разведении 1:100. Для визуализации антигенов использовали вторичные антитела, меченные FITC («Jacksonimmunoresearch», США), для иммунопероксидазной реакции – систему Ultra Vision LPValue Large Volume Detection («Thermo Scientific», США). Препараты анализировали с применением микроскопа Leica DM 1000 (Германия).

Результаты и обсуждение. Вопрос о взаимоотношениях опухоли и стромы является очень сложным. На примере карциномы молочной железы показано, что на начальных этапах формирования опухоли строма скорее препятствует ее росту и распространению, однако на более поздних этапах она может содействовать развитию опухоли [5]. Проблеме взаимовлияния опухолевых и стромальных клеток посвящено множество исследований и соответственно создано много моделей для изучения подобных взаимодействий. В представленной работе предложен модифицированный подход к моделированию взаимодействия строма–опухоль. Классические модели предполагают использование суспензии клеток, помещенных в неадгезивные условия. В нашей работе представлен метод, базирующийся на взаимодействии уже сформированных многоклеточных агрегатов фибробластов (как стромальных элементов) и опухолевых клеток. Такой подход дает возможность морфологическими и иммуногистохимическими методами изучать непосредственно взаимодействующие опухолевые клетки и фибробласты.

Первичную культуру дермальных фибробластов проанализировали иммуноцитохимическим методом с использованием антител к поверхности фибробластов человека и не обнаружили клеток, давших негативную реакцию (данные не приведены). Указанные фибробласты послужили источником получения многоклеточных агрегатов (сфероидов).

Клетки линии HeLa сформировали сфероиды уже на второй день культивирования на агаризованной поверхности. При сокультивировании сфероидов фибробластов и клеток HeLa слияние агрегатов наблюдали уже на следующие сутки (рис. 1, см. вклейку). Во многих случаях количество агрегатов HeLa было больше, чем фибробластов. При взаимодействии агрегатов, сформированных клетками HeLa и агрегата из фибробластов, эпителиальные клетки окаймляли фибробласты, что соответствует механизмам гистогенеза в целом (рис. 2, 3, см. вклейку). После окончания срока культивирования полученные комбинированные трехмерные культуры клеток фиксировали формалином и, согласно гистологической технике, готовили парафиновые срезы. Методом иммунофлуоресцентного анализа опреде-

Figure to article by K. A. Shkarina et al.

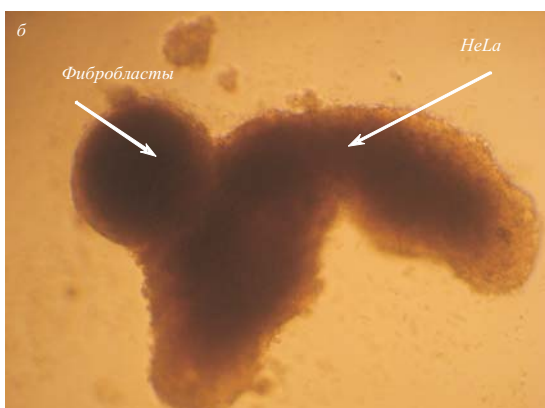
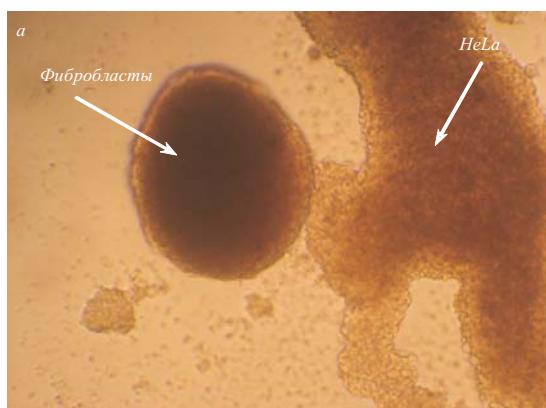


Рис. 1. Сокультивирование сфероидов, полученных из дермальных фибробластов и клеток HeLa: а – 1 сутки культивирования (окуляр 10х; объектив 20х); б – 4 суток культивирования. Окуляр 10х; объектив 10х

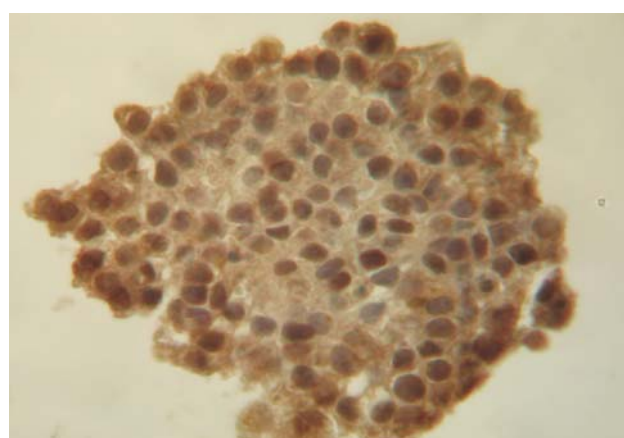
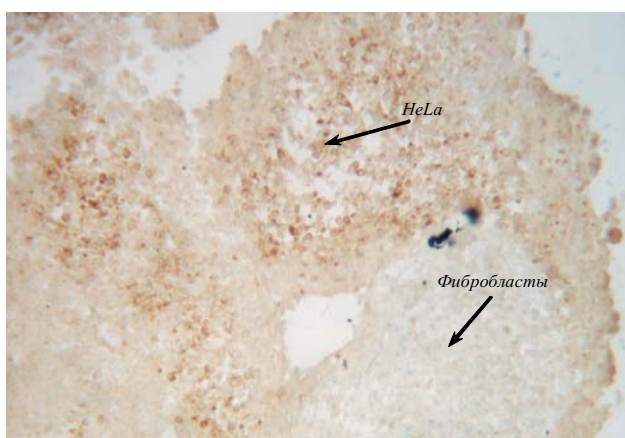


Рис. 2. Агрегат – результат слияния сфероидов из фибробластов и нескольких сфероидов из клеток HeLa. Иммунопероксидазная реакция (коричневое окрашивание) выявила эпителиальные, положительные на цитокератины клетки, расположенные вокруг сфероидов из фибробластов. Окуляр 10х; объектив 10х

Рис. 3. Иммуногистохимическое выявление эпителиальных антигенов (цитокератинов, промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток) в клетках линии HeLa, сформировавшихся сфероид. Ядра клеток докрашены гематоксилином. Окуляр 10х; объектив 40х

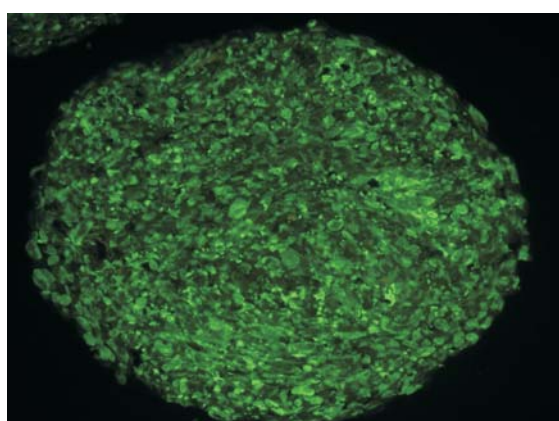


Рис. 4. Иммунофлуоресцентное выявление виментина (белка промежуточных филаментов фибробластов) в клетках сфероидов, образованного фибробластами. Цитоплазма клеток окрашена в зелёный цвет. Окуляр 10х; объектив 40х

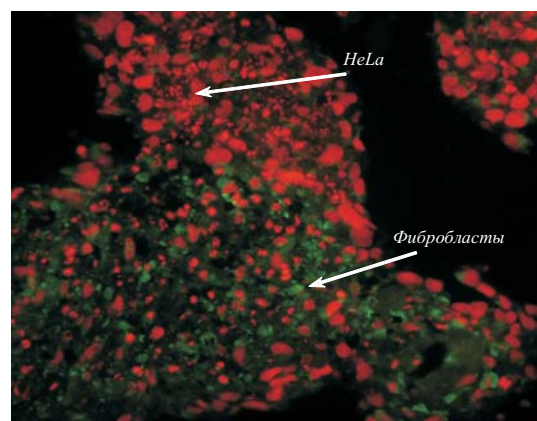


Рис. 5. Иммунофлуоресцентное выявление фибробластов по содержанию виментина (зелёный) в агрегатах при совместном культивировании HeLa и фибробластов. Ядра клеток докрасивали PI (красный). Окуляр 10х; объектив 40х

ляли фибробласты и эпителиальные клетки в образовавшихся агрегатах. Ядра клеток докрашивали иодидом пропидиума. Наблюдали яркую иммунофлуоресцентную реакцию с использованием антител к поверхности фибробластов человека на монослойной культуре, однако на гистологических срезах присутствовала довольно слабая реакция. Поэтому для дифференциации эпителиальных клеток и фибробластов применили антитела к виментину. На срезах взаимодействующих агрегатов наблюдали ярко окрашенные фибробласты, однако слабая реакция присутствовала и в клетках HeLa, что соответствует литературным данным (рис. 4, 5, см. вклейку). При этом характер реакции в клетках резко отличался. Применение антител к эпителиальным антигенам позволило выявить положительную реакцию в клетках HeLa, которая в фибробластах отсутствовала (рис. 2, 3, см. вклейку).

Таким образом, на гистологических срезах нам удалось зафиксировать участки контакта опухолевых и стромальных клеток. Именно они станут предметом наших дальнейших исследований в аспекте внутриклеточного сигналинга в опухолевых клетках и фибробластах.

Предложенная нами модель изучения взаимодействия опухоли и стромы будет полезна при изучении как фундаментальных механизмов канцерогенеза, так и при поиске мишеней для противоопухолевой терапии.

K. A. Shkarina, O. V. Cherednyk, I. O. Tykhonkova, A. I. Khoruzhenko

In vitro model for study the interaction between tumor and stromal cells

State Key Laboratory on Molecular and Cellular Biology
Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

Aim. To develop a model to study the interaction between tumor and stromal cells in three-dimensional culture. **Methods.** Cultivation of HeLa cell lines and human dermal fibroblasts in monolayer and three-dimensional culture, immunofluorescent and immunohistochemical analysis. **Results.** In this work we present an approach based on a direct interaction between the cells of multicellular tumor spheroids and spheroids of fibroblasts. Subsequent immunofluorescence analysis allows to determine an origin of cells in the area of their contact. **Conclusions.** This model will be useful to study the basic mechanisms of carcinogenesis, and to find targets for anticancer therapy.

Keywords: interaction of stromal and tumor cells, three-dimensional cultures of malignant cells, multicellular spheroids.

K. A. Shkarina, O. V. Cherednyk, I. O. Tykhonkova, A. I. Khoruzhenko

Model *in vitro* для дослідження взаємодії стромальних клітин і клітин пухлинного походження

Резюме

Мета. Розробити модель для вивчення взаємодії пухлинних і стромальних клітин за умов тривимірної культури. **Методи.** Культивування клітин лінії HeLa і дермальних фібробластів людини в моношаровій і тривимірній культурі, імунофлуоресцентний та імуногістохімічний аналіз. **Результати.** Запропоновано підхід, що базується на дослідженні безпосередньої взаємодії клітин багатоклітинних сфероїдів пухлинних клітин і сфероїдів фібробластів. Подальший імунофлуоресцентний аналіз дає можливість визначити походження клітин у зоні їхнього контакту. **Висновки.** Описана модель буде корисною як для вивчення базових механізмів канцерогенезу, так і за пошуку мішеней для протипухлинної терапії.

Ключові слова: взаємодія стромальних і пухлинних клітин, тривимірні культури злоякісних клітин, багатоклітинні сфероїди.

REFERENCES.

1. Kalluri R., Zeisberg M. Fibroblasts in cancer // *Nat. Rev. Cancer.*—2006.—6, N 5.—P. 392–401.
2. Pietras K., Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma // *Exp. Cell Res.*—2010.—316, N 8.—P. 1324–1331.
3. Xing F., Saidou J., Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment // *Front Biosci.*—2010.—15.—P. 166–179.
4. Cirri P., Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin // *Am. J. Cancer Res.*—2011.—1, N. 4.—P. 482–497.
5. Joyce J. A., Pollard J. W. Microenvironmental regulation of metastasis // *Nat. Rev. Cancer.*—2009.—9, N 4.—P. 239–252.
6. Wadlow R. C., Wittner B. S., Finley S. A., Bergquist H., Upadhyay R., Finn S., Loda M., Mahmood U., Ramaswamy S. Systems-level modeling of cancer-fibroblast interaction // *PLoS One.*—2009.—4, N 9.—e6888.
7. Nyga A., Cheema U., Loizidou M. 3D tumor models: novel *in vitro* approaches to cancer studies // *J. Cell Commun. Signal.*—2011.—5, N 3.—P. 239–248.
8. Yamada K. M., Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D // *Cell.*—2007.—130, N 4.—P. 601–610.
9. Lin R. Z., Chang H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research // *Biotechnol. J.*—2008.—3, N 9–10.—P. 1172–1184.
10. Miki Y., Ono K., Hata S., Suzuki T., Kumamoto H., Sasano H. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating *in vivo* environment // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*—2012.—131, N 3–5.—P. 68–75.
11. Hirschhaeuser F., Menne H., Dittfeld C., West J., Mueller-Klieser W., Kunz-Schughart L. A. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again // *J. Biotechnol.*—2010.—148, N 1.—P. 3–15.
12. Khoruzhenko A. I. Optimization of tumor cell culture conditions in soft agar for subsequent immunohistochemical analysis // *Biopolym. Cell.*—2012.—28, N 4.—P. 302–305.

Received 01.12.12