

УДК 66.047

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ГОЛОВЫ И ШЕИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОПОЛИМЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА**М.С. Холина¹, Н.В. Белишев¹, А.П. Бонарцев¹, Д.С. Святославов², С.И. Самойлова², И.В. Решетов², К.В. Шайтан¹**¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

Введение. Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) занимает особое нишу среди опухолевых заболеваний: он занимает 6 место по заболеваемости среди всех видов рака, а эффективность лечения традиционными методами противораковой терапии (хирургическое вмешательство, лучевая терапия и химиотерапия) составляет лишь 50 % [1,2]. Данное исследование направлено на разработку близкой к условиям *in vivo* экспериментальной клеточной 3D-модели ПРГШ, которая позволит более детально изучить различные процессы, происходящие при развитии опухоли, ее метастазировании и других процессов, ассоциированных с этим заболеванием. Кроме того, полученная модель может служить новейшим инструментом для диагностики эффективности и безопасности, как отдельных противораковых агентов, так и комплексных подходов, направленных на борьбу с раком [3]. ПРГШ является гетерогенным заболеванием, в его формировании и развитии играют роль множество факторов: различные типы клеток, ассоциированные с данным типом рака (иммунные, стволовые, эпителиальные клетки и др.), влияние микроокружения и ниши, в которой прогрессирует опухоль. Экспериментальная 3D-модель опухоли, или в данном случае, многоклеточный гетерогенный сфероид, в состав которого входят: биосовместимые микросферы из поли-3-оксибутирата, а также клетки различных типов: опухолевые клетки линии НЕР-2 и мезенхимальные стволовые клетки (МСК) является перспективным инструментом для изучения различных, ранее не изученных процессов взаимодействия рака и других факторов, влияющих на его развитие [4].

Материалы и методы. МСК были выделены в нашей лаборатории по протоколу, описанному ранее [5]. МСК и опухолевые клетки линии НЕР-2 культивировали в пластиковых чашках Петри диаметром 10 см, с регулярной сменой полной питательной среды (раз в 3 дня), в состав которой входили: питательная среда ДМЕМ (ПанЭко, Россия), 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Biological Industries, Израиль) и 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 5 %-содержания CO₂ и температуре 37 °С. При достижении 80 % конфлюэнтности, жизнеспособность клеток оценивалась с помощью окрашивания трипановым синим при помощи подсчета в камере Горяева (Freshney).

В качестве источника поли-3-оксибутирата (ПОБ), использовался штамм-продуцент *Azotobacter chroococcum* 7Б [6]. Для получения микросфер из поли-3-оксибутирата, диаметр которых составил 40 и 90 мкм, применялся метод «water-in-oil-water». В качестве порообразователя использовался 5 %-ый карбонат аммония. Подробные детали метода были описаны ранее [4].

В работе были получены два типа сфероидов: моно-сфероиды, в состав которых входили клетки линии НЕР-2 и микросферы, а также гетерогенные ко-сфероиды, состоящие из клеток НЕР-2 и первичных МСК крысы. Для получения сфероидов использовали методы «висячая капля» и «культивирование на низкоадгезионной поверхности». Метод «висячей капли» был описан ранее [7]. Однако использовались некоторые модификации: объем капель был увеличен до 50 μl, период культивирования (до созревания сфероидов) составил 5 суток, микросферы были внесены в среду ДМЕМ и были разведены до концентрации 10–20 микросфер на сфероид. Метод получения сфероидов при «культивировании на низкоадгезионной поверхности» (soft agar) был описан ранее [8], но в данном исследовании, для культивирования сфероидов использовались 48-луночные планшеты (Corning, США). Используемое соотношение клеток МСК/НЕР-2 в ко-сфероидах 1:1. Для изготовления сфероидов, обоих описанных выше типов, использовалось от 3 до 5 тыс. клеток на сфероид. Период созревания сфероидов для метода «висячей капли» составил 5 суток, для метода «культивирование на низкоадгезионной поверхности» около 7 суток. Морфология и целостность полученных сфероидов оценивалась с помощью световой микроскопии.

При достижении срока созревания проводилось промывания сфероидов 10-кратным раствором PBS (фосфатно-солевой буфер). Образцы помещали в смесь для фиксации (2 % формалин, 0,2 % глутаральдегид в PBS) и инкубировали в течении суток. Образцы последовательно промывали в растворах этанола с повышающейся концентрацией: 30 %, 50 %, 70 %, 82 % и 96 %. Далее, сфероиды дважды промывали в смеси 100 % гексаметилдисилазана (HMDS) и 96 % спирта (1:1) и инкубировали в течении 10 минут в 100 %-ом HMDS, а затем снова помещали образцы в 100 %-ый HMDS, в котором образцы содержались до полного испарения реактива (около суток). По завершению данного процесса, образцы напылялись золотом. Для получения снимков использовался микроскоп CAMSCAN – S4.

Для сфероидов, полученных с помощью метода «висячей капли», было проведено окрашивание и проверка экспрессии маркеров CD44 и цитокератина 19 (для моно-сфероидов НЕР-2 и микросферами), а также упомянутыми маркерами CD44 и цитокератина 19 (в качестве метки раковых клеток) и поверхностными маркерами МСК: CD90 и CD45, которые использовались для ко-сфероидов МСК/НЕР-2 без микросфер. При окрашивании внутриклеточным маркером цитокератин 19 были проведены фиксация и пермеабилзация образцов, протокол которых был опубликован на официальном сайте Abcam [9]. В данном эксперименте использовался проточный цитометр FACSAria. SORP.

Результаты. Были получены два типа высокопористых микросфер с диаметром примерно 40 и 90 мкм, структура которых была охарактеризована с помощью СЭМ.

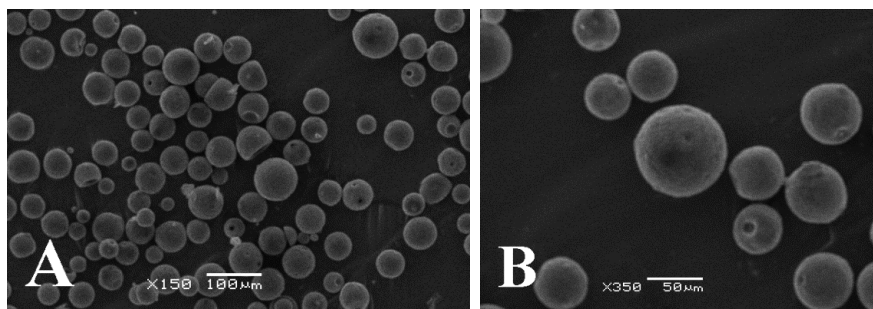


Рисунок 1. Микросферы диаметром 90 мкм (А), микросферы диаметром 40 мкм (В).

В более ранних экспериментах по созданию ко-сфероидов МСК/Нер-2 нами было выявлено, что метод «культивирование на низкоадгезионной поверхности» не пригоден для получения данного типа сфероидов или требует доработки [10]. Полученные данным методом ко-сфероиды оценивали с помощью световой микроскопии и было отмечено, что их структура нарушена, они имеют дефекты структуры и формы (Рис. 2). Предполагается, что такие дефекты образуются в областях скопления МСК, возможно, по причине формирования слабых межклеточных контактов между клетками разных типов.

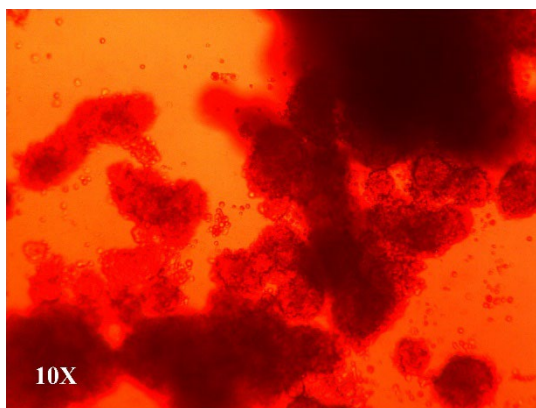


Рисунок 2. Ко-сфероид МСК/НЕР-2 полученный методом «культивирование на низкоадгезионной поверхности»

Используя метод «висячей капли» мы получили ко-сфероиды МСК/Нер-2, обладающие необходимой бездефектной морфологией. Как показали более ранние исследования, проводимые в нашей лаборатории, для получения моно-сфероидов НЕР-2 с микросферами пригоден метод «культивирования на низкоадгезионной поверхности». Другими словами, с помощью двух различных методик мы получили два различных типа сфероидов, которые охарактеризовали с помощью СЭМ (Рис. 3). Структура и морфология данных клеточных агрегатов полностью удовлетворяла предъявляемым к ним требованиям.

Анализ экспрессии маркеров, характерных для различных клеточных линий, дал неоднозначные результаты, которые требуют дальнейшего подтверждения.

Стоит отметить, что для цитометрического анализа были получены моно-сфероиды Нер-2 с помощью метода «висячей капли», что сократило время получения данных структур на двое суток, в сравнении с методом «культивирование на низкоадгезионной поверхности». При этом мы не включали в состав сфероидов микросферы, т. к. это могло создать сложности при работе на проточном цитометре. Как было описано выше, мы анализировали: экспрессию цитокератина 19 и CD44, как маркеров опухолевых клеток; экспрессию CD45 и CD90 как маркеров, характерных для МСК.

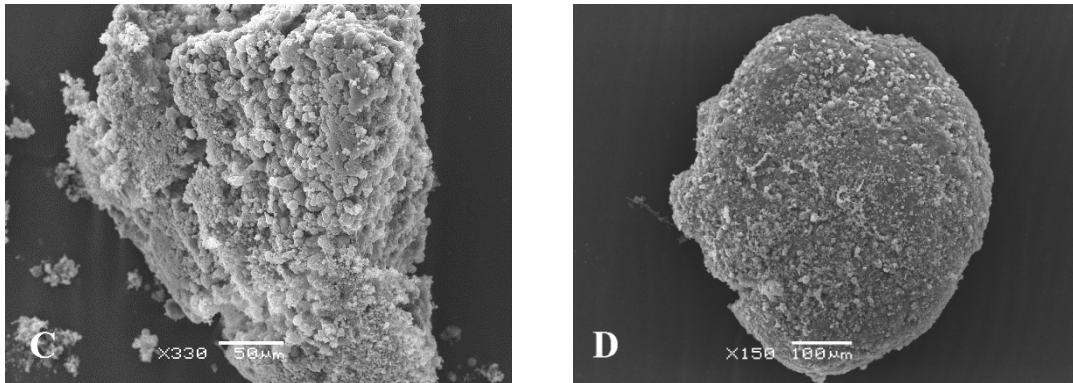


Рисунок 3. Ко-сфероид МСК/Нер-2 (С), моно-сфероид Нер-2 с микросферами диаметром 90 μм (D).

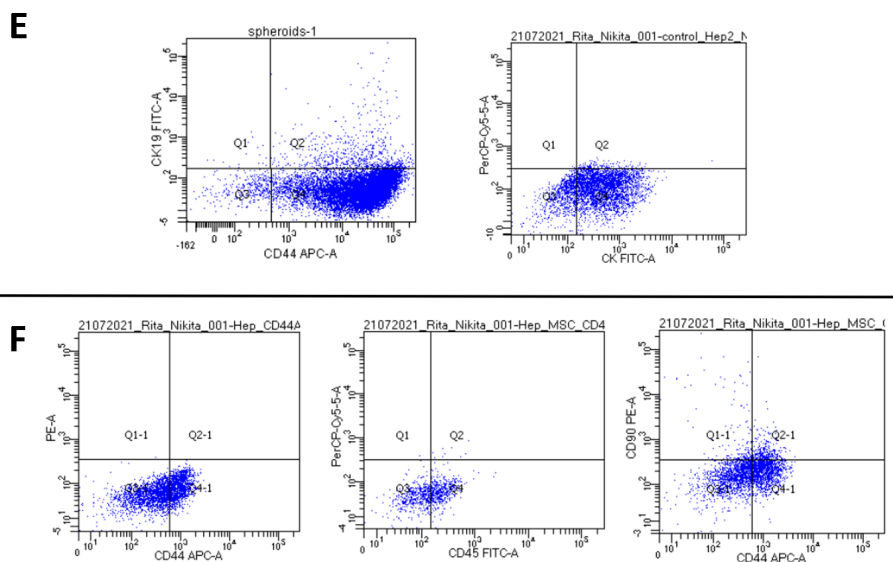


Рисунок 4. Экспрессия характерных маркеров в моно-сфероидах Нер-2(Е) и ко-сфероидах МСК/Нер-2(F). Полученные нами результаты, так же можно предоставить в виде таблицы 1.

Таблица 1. Процент экспрессия различных маркеров, характеризующих раковые клетки и МСК.

Тип сфероида	Цитокератин 19	CD44	CD45	CD90
Моно-сфероид Нер-2	79,9 %	98,1 %	—	—
Ко-сфероид МСК/Нер-2	—	40,3/49,5 %	46,0 %	10,4 %

Высокий уровень экспрессии цитокератина 19 и CD44⁺ в моно-сфероидах Нер-2 (79,9 % и 98,1 %) говорит о высокой жизнеспособности клеток, формировании стабильного цитоскелета, а также о большой вероятности метастатической активности модели, т. к. данные маркеры являются показателями метастазирования. Отсутствие экспрессии цитокератина 19 в ко-сфероидах, говорит об ошибке в протоколе окрашивания, фиксации или пермеабилзации образцов и требует повторного окрашивания. Высокий уровень экспрессии CD44⁺ в ко-сфероидах (при соотношении клеток МСК/Нер-2 1:1), говорит значительной активности опухолевых клеток в подобной модели.

Однако, фенотип МСК в данном эксперименте должен характеризоваться экспрессией CD90⁺ и низкой экспрессией CD45⁻, тогда как в нашем случае, ситуация противоположна (46,0 % к 10,4 %). Мы можем заключить, что 10,4 % клеток, вероятно, относятся к популяции клеток МСК, тогда как 46,0 %, проявляют себя как клетки другого типа (вероятно, они подверглись дифференцировке).

Заключение. Данная работа позволяет сделать выводы, что методика формирования сфероидов «культивирование на низкоадгезионной поверхности» и метод «висячая капля» позволяет получать стабильные и морфологически приемлемые экспериментальные 3D-модели ПРГШ, как гетерогенного состава, так и гомогенные структуры, а также модели в состав которых входят биополимерные частицы. Мы зафиксировали высокую активность опухолевых маркеров в моно-сфероидах HEp-2, что говорит о хорошей перспективе использования разрабатываемой модели. Однако в данном случае, необходимо расширить спектр анализируемых онко-маркеров. Модель со-культивирования показала неоднозначные результаты: мы можем говорить о сохранении популяции стволовых клеток в модели HEp-2/МСК. Тем не менее, делать выводы о взаимовлиянии МСК на активность раковых клеток, пока рано. Были получены стабильные, охарактеризованные с помощью СЭМ модели, но анализ взаимодействия клеток между собой и со своим микроокружением требует дальнейшей работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18–29–09099.

Литература

1. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol.* 2018 Oct; 52 (Pt 2):228–240. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.01.008. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29355614.
3. Colella G, Fazioli F, Gallo M, De Chiara A, Apice G, Ruosi C, Cimmino A, de Nigris F. Sarcoma Spheroids and Organoids-Promising Tools in the Era of Personalized Medicine. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 21; 19(2):615. doi: 10.3390/ijms19020615. PMID: 29466296; PMCID: PMC5855837.
4. Меньших К.А., Воинова В.В., Бонартцев А.П. Создание 3D клеточных сфероидов на микросферах из поли-3-оксибутирата. «Биотехнология: наука и практика», VII Международная научно-практическая конференция, Севастополь, Россия, 16–20 сентября 2019.
5. И.В. Демьянова, Е.А. Акулина, Т.Х. Труонг и др. Рост мезенхимальных стволовых клеток на пленках поли-3-оксибутирата, загруженных левофлоксацином и симвастатином // Биологический журнал. – 2020. – № 4(15). – С. 4–9. – DOI 10.32743/2658–6460.2020.4.15.283.
6. V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V., Kuznetsova E.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Biosynthesis of poly(3 – hydroxybutyrate) copolymers by *Azotobacter chroococcum* 7B: a precursor feeding strategy // *Preparative Biochemistry and Biotechnology.* – 2017. V. – 47. N. – 2. – P. 173–184.
7. Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Aug 3; 107(31):13724–9. doi: 10.1073/pnas.1008117107. Epub 2010 Jul 19. PMID: 20643923; PMCID: PMC2922230.
8. Krishnamurthy S, Nör JE. Orosphere assay: a method for propagation of head and neck cancer stem cells. *Head Neck.* 2013 Jul; 35(7):1015–21. doi: 10.1002/hed.23076. Epub 2012 Jul 13. PMID: 22791367; PMCID: PMC3887391.
9. <https://www.abcam.com/protocols/flow-cytometry-intracellular-staining-protocol>
10. Kholina M.S., Menshikh K.A., Voinova V.V., Denisova K.R., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Svyatoslavov D.S., Samoylova S.I., Reshetov I.V., Shaitan I K.V., Bonartsev A.P. The co-cultivation of human cancer HEp-2 with rat mesenchymal stem cells: low attachment vs. hanging drop spheroid culturing techniques. ESAO/TERMIS ONLINE Winter School in Jaca, Spain February 24–26, 2021, Online Conference, Испания, 24–26 февраля 2021.