

КЛЕТКИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО РЯДА КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПРЕДШЕСТВЕННИК САРКОМ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ИМПЛАНТИРОВАННЫМ ИНОРОДНЫМ ТЕЛОМ

© Т. Г. Мойжесс,¹ Ю. М. Васильев

Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва;

¹электронный адрес: 7012002@inbox.ru

Работа посвящена проблеме происхождения клеток-предшественников сарком, индуцируемых у мышей имплантацией инородного тела (пластинок из поливинилхлорида). Известно, что эти клетки находятся среди клеток монослоя, покрывающего поверхность пластинки еще без признаков роста опухоли через 6 мес и более после имплантации. Мы исследовали наличие признаков эндотелия у клеток мезенхимного типа, выращенных при культивировании клеток с поверхности имплантированной пластинки, через 9 и 14 мес после имплантации. Было показано, что полученные клетки действительно являлись предшественниками сарком, хотя и обладали разным опухолевым потенциалом в зависимости от срока с момента имплантации. Мы изучали поведение таких предопухолевых клеток в культурах 2D (на пластике) и 3D (на матригеле). Показано, что такие клетки на пластике в плотном монослое дают рост эндотелиального типа (cobblestone). При посеве на матригель они организуются в более или менее типичные капилляроподобные структуры, которые в дальнейшем образуют вторичные сети из тубулоподобных выростов. Такое поведение также характерно для эндотелиальных клеток. Эти наблюдения позволяют сделать вывод о возможности происхождения ИТ-сарком из клеток эндотелия.

Ключевые слова: ИТ-канцерогенез, ИТ-саркомы, матригель, эндотелиальные клетки.

При имплантации экспериментальным животным (крысам, мышам) инородного тела (ИТ) (как правило, пластмассовых пластинок) после продолжительного латентного периода в непосредственной близости от имплантата часто возникают опухоли — так называемые ИТ-саркомы. Этот вид канцерогенеза (ИТ-канцерогенез), известный уже в течение нескольких десятилетий (Александр, Хорнинг, 1961; Мойжесс, 1981), представляется уникальным по патогенезу. Генез большинства экспериментальных опухолей, индуцируемых химическими канцерогенами, четко зависит от молекулярной структуры вводимых молекул, которые, как показывает большинство данных, связываются с ДНК и вызывают мутации в определенных локусах генома (Турусов и др., 2004). Сходным образом повреждения ДНК, вызываемые ионизирующей и ультрафиолетовой радиацией, лежат в основе радиационного канцерогенеза (Виленчик, 1987). Включение вирусного генома в геном инфицированных клеток лежит в основе ряда вирусных опухолей (Альтштейн, 2004). В отличие от всех этих моделей канцерогенез, вызываемый имплантацией ИТ, не зависит от прямых воздействий имплантированного материала на геном, а связан с иными факторами. ИТ может быть совершенно инертным, а степень его канцерогенности растет с площадью поверхности имплантированной пластинки; та же пластинка, измельченная в порошок, становится неканцерогенной, хотя ее состав не изменился. Причина этого феномена во многом остается неясной (Мойжесс, 2008).

Один из вопросов, важных для понимания механизмов ИТ-канцерогенеза, это вопрос о клетках-предшественниках этих сарком. В ранних работах (Brand, 1971; Мойжесс, Пригожина, 1973) было доказано присутствие клеток-предшественников ИТ-сарком среди клеток монослоя на поверхности имплантированной пластинки через 6 мес и более после имплантации, поскольку при пересадке таких пластинок сингенным реципиентам еще через 1—9 мес у них возникают опухоли из клеток доноров. Однако вопрос о происхождении клеток-предшественников этих сарком остается открытым.

Задача настоящей работы — получить новые характеристики клеток-предшественников ИТ-сарком в культуре, в частности посредством культивирования на матригеле, позволяющем повысить уровень дифференцировки клеток (Kleinman et al., 1986).

Материал и методика

Мыши. Для имплантации использовали 3—4-месячных самцов мышей линии СВА, а для трансплантации клеток — F1(СВА×С57В1) из питомника «Столбовая».

Использовали пластинки из поливинилхлорида, любезно предоставленного фирмой Мелодия (Москва, Россия). Имплантировали пластинки размером 22×15 мм с закругленными углами. Толщина пластинки 1.17 мм. Стерилизовали пластинки в течение 2 ч в 50%-ном этило-

вом спирте. Непосредственно перед имплантацией пластинок помещали в стерильный физиологический раствор. Имплантацию пластинок под кожу производили под эфирным наркозом через поперечный разрез кожи у хвоста с двух боков. Пластинку помещали в согнутом виде в стеклянную трубку диаметром 1 см с поршнем. Трубку вводили через разрез под кожу и поршнем выталкивали пластинку, которая вследствие упругости расправлялась под кожей. Разрез зашивали хирургическим шелком и смазывали йодом. Обычно шов заживал через 7 сут.

Получение *in vitro* культуры клеток-предшественников сарком. Через 9 и 14 мес с момента подкожной имплантации пластинок вместе с окружающей их соединительнотканной капсулой вырезали, пластинку извлекали и с ее поверхности с помощью резинового шпателя снимали клетки в среду RPMI (ПанЭко, Россия), содержащую 10 % эмбриональной сыворотки коров (FCS; Standard Quality, фирма PAA, Австрия) и гентамицин в концентрации 0.09 мг/мл. Клетки прикреплены к поверхности пластинок достаточно непрочны. Полноту снятия клеток с пластинок оценивали визуально и контролировали под фазово-контрастным микроскопом. Клетки выращивали на пластике — в чашках Петри, многоруночных планшетах, флаконах 25 см (Corning Incorporated, США). Первоначально клетки, снятые с пластинок, помещали в чашку Петри диаметром 10 см и культивировали 10 сут без смены среды в термостате при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. После этого выросший монослой снимали 0.2%-ным трипсином (Sigma, США) на растворе Версена (ПанЭко, Россия) и рассаживали из расчета 1 : 4 во флаконы. Хороший рост давали клетки приблизительно с 50 % пластинок, что соответствует частоте возникновения опухолей при данном виде канцерогенеза. Клетки выдерживали более 10 пассажей, хотя были требовательны к качеству сыворотки. Были получены культуры 1542 и 1014 (через 14 мес *in vivo*), а также Ipl, IIpl и CBAII (через 9 мес *in vivo*).

Получение клонов клеток-предшественников сарком. Культуры 1542 и Ipl клонировали после 5 и 3 пассажей соответственно. Клетки снимали с подложки 0.2%-ным трипсином на растворе Версена. Производили серию разведений суспензии до концентрации 10 клеток в 1 мл среды. В лунки 96-луночного планшета помещали по 100 мкл полученной суспензии. Клетки культивировали в среде RPMI, содержащей 20 % FCS, при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Рост клонов контролировали под фазово-контрастным микроскопом. Отбирали колонии, образующие правильный круг. Выросшие колонии пересаживали в 12-луночные планшеты и далее во флаконы 25 см. Было получено 5 клонов культуры 1542 (испытаны с матригелем 2n и 2lun) и 9 клонов культуры Ipl (испытаны с матригелем F10 и C7).

Тестирование опухолеродности клеток-предшественников сарком. Клетки с пластинок, изначально имплантированных мышам CBA, пересаживали в мышей F1 (CBA×C57Bl). При возникновении опухолей их перевивали на мышей родительских линий, чтобы подтвердить их происхождение из клеток CBA.

Культивирование клеток в матригеле. После разморозки жидкий матригель (BD Biosciences, Великобритания) разливали по 250 мкл в лунки 24-луночного планшета. Последний помещали в термостат при 37 °С на 30 мин для гелеобразования, затем рассевали клетки по 10⁵ на лунку.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что все полученные клетки обладали опухолевым потенциалом, но в различной степени. При прививке мышам 600 тыс. клеток, выращенных *in vitro* на пластике после 14-месячного срока *in vivo*, спустя 1 мес образовались саркомы. В случае 9-месячного срока прививка суспензией клеток под кожу мышам опухоль не дала за период наблюдения 3—15 мес (пока мышцы были живы). Однако те же клетки, привитые под кожу мышам в виде выращенного на пластинке монослоя, через несколько месяцев (от 3 до 8) развивали опухоли. Таким образом, эти клетки тоже являются предшественниками будущих сарком, но нуждаются для завершения процесса малигнизации в дополнительное время взаимодействия с микроокружением, создающимся в капсуле вокруг имплантированной пластинок.

При культивировании на поверхности матригеля клеток, давших рост на пластике, все испытанные клетки в течение первых 4—8 ч после посева выстраивали более или менее типичный рисунок капиллярноподобной сети (рис. 1). На следующие сутки большая часть этих структур распадалась на округлые агрегаты клеток, часть которых затем, обычно в случае клеток с большим опухолевым потенциалом, давала длинные тубулоподобные выросты. В течение 10—12 сут количество таких выростов увеличивалось, они ветвились, между ними возникали анастомозы, образуя сетевидные структуры (рис. 2, а). Похожие тубулоподобные выросты наблюдались при культивировании на матригеле клеток опухоли, образованной клетками 1542, привитыми под кожу мышам в виде суспензии (рис. 2, б).

При культивировании на пластике клетки, размножаясь, давали монослой, характерный для клеток мезенхимного типа. В редкой культуре эти клетки имели характерный фенотип (с многочисленными отростками, оканчивающимися мелкими расширениями). На 2—4-м пассаже в плотном монослое клеток появлялись фокусы роста, характерные для эпителия и эндотелия. Такая смешанная культура (культура Ipl) с двумя типами роста (мезенхимным и эпителиально-эндотелиальным) была клонирована с целью установить общность происхождения составляющих ее клеток. Получено 9 клонов, клетки 5 из них в 1-м пассаже на флаконах обладали морфологией, характерной для мезенхимных клеток. Далее при пассировании клетки этих клонов утрачивали указанную морфологию, становились полигональными со сглаженными краями. В дальнейших пассажах в плотном монослое эти клоны давали рост полностью эндотелиально-эпителиальный (cobblestone) В остальных 4 клонах эта картина наблюдалась уже в 1-м пассаже (рис. 3). Отметим, что после замораживания и хранения в азоте эти культуры утрачивали способность к характерному для эндотелия росту и возвращались к мезенхимной морфологии. Причина этого явления требует специального изучения.

Таким образом, мы показали, что обитающие на поверхности имплантированных пластинок клетки-предшественники ИТ-сарком проявляют *in vitro* некоторые признаки, характерные для культивируемого эндотелия: 1) образуют на пластике монослой эндотелиального типа; 2) образуют капиллярноподобные структуры при посеве на матригель; 3) образуют вторичные сети из тубулоподобных выростов (secondary sprouting) при дальнейшем культивировании на матригеле.

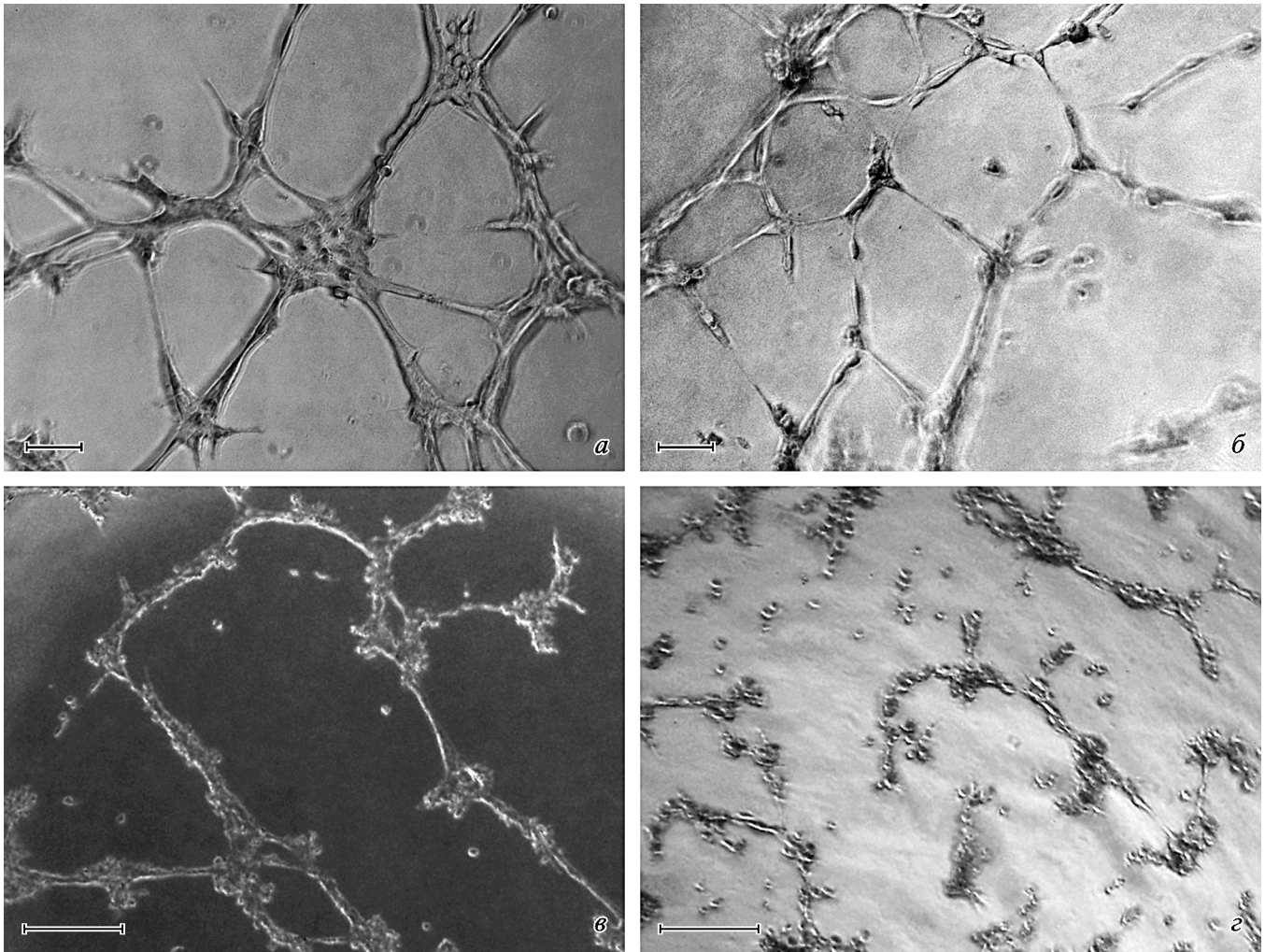


Рис. 1. Рост клеток-предшественников ИТ-сарком на матригле. Капилляроподобные структуры на поверхности матригеля через 5 ч после посева.

a, б — клетки (культура 1542), выращенные на пластике из клеток монослоя с поверхности имплантированной пластинки, через 14 мес после имплантации; клетки клона 2п (*a*) и клона 2 lup (*б*). *в, г* — культура Ipl (9 мес после имплантации); клетки клона F10 (*в*) и клона C7 (*г*). Фазовый контраст. Масштабные линейки — 200 (*a, б*) и 50 (*в, г*) мкм.

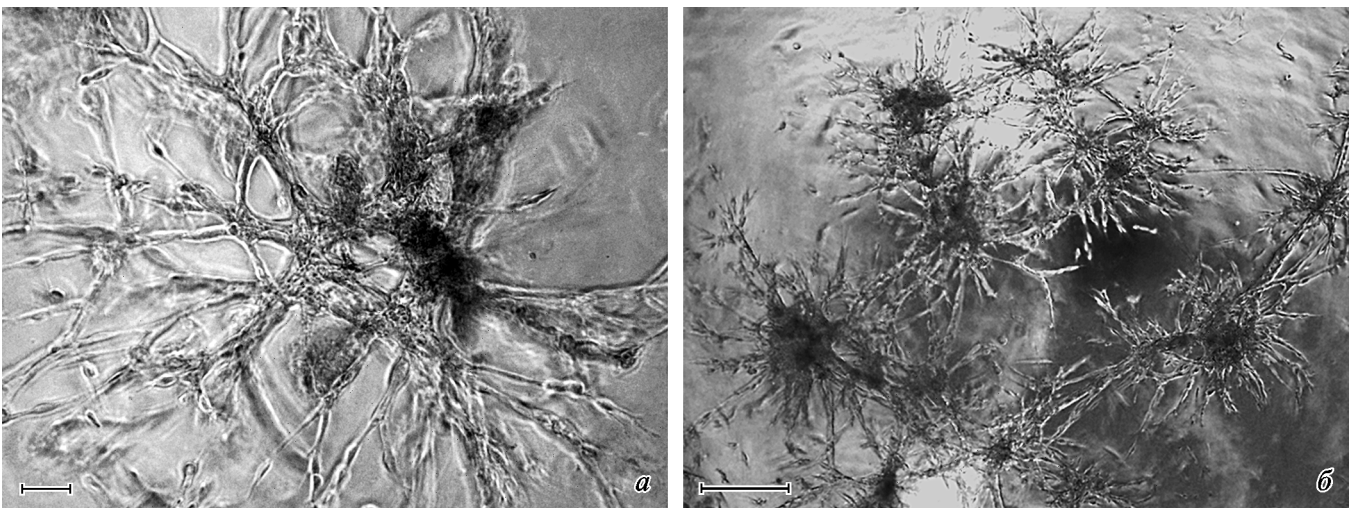


Рис. 2. Образование тубулоподобных выростов при культивировании на матригле.

a — культура 1542, клетки клона 2 lup; структуры, выросшие вокруг агрегатов клеток после коллапса первичных капилляроподобных структур (см. рис. 1), 8 сут на матригле; *б* — структуры, выросшие из культуры клеток опухоли, образованной клетками 1542, привитыми в виде суспензии под кожу мыши, 5 сут на матригле. Фазовый контраст. Масштабные линейки — 200 (*a*) и 50 (*б*) мкм.

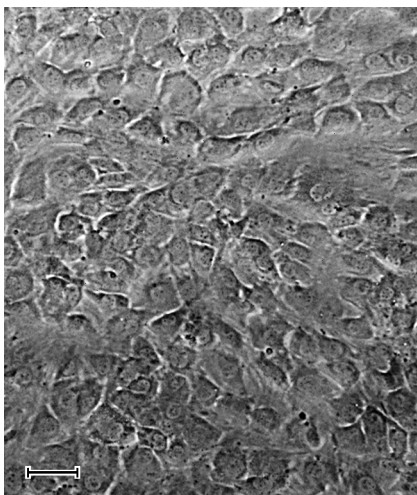


Рис. 3. Рост клеток-предшественников ИТ-сарком на пластике. Культура Ipr1, клетки клона С9, пассаж 4. Густой монослой эндотелиально-эпителиального типа (cobblestone). Фазовый контраст. Масштабная линейка — 200 мкм.

Явление тубулоподобных выростов было показано впервые в работе (Castellon et al., 2002), в которой эндотелиальные клетки сетчатки быка подвергали воздействию различных ангиогенных факторов при культивировании на матрикеле. Было обнаружено, в частности, что при длительном культивировании такие клетки образуют тубулоподобные разрастания вокруг агрегатов клеток, остающихся после коллапса капилляроподобных структур при выполнении краткосрочного теста на эндотелий. В наших экспериментах клетки-предшественники ИТ-сарком обладали сходной морфологией вторичных структур, что дает дополнительное свидетельство в пользу эндотелиальной природы наших клеток. Этот феномен, по нашему мнению, можно рассматривать также как пример возможности дифференцировки опухолевых клеток в культуре *in vitro*, аналогичный в некотором отношении классическому наблюдению Тимофеевского (1947): при культивировании веретенчатых сарком (согласно патогистологическому диагнозу) среди веретеновидных клеток со временем появлялись мышечные структуры (многоядерные миосимпласты, пронизанные миофибриллами), что позволило определить истинное происхождение сарком как рабдомиосарком.

Учитывая, что исследовавшиеся нами клетки в процессе малигнизации могли утратить некоторые свойства исходных, нет оснований предполагать, что они обладают полным набором характеристик, присущих нормальным эндотелиальным клеткам. Поэтому при их исследовании мы применили метод культивирования на матрикеле,

который повышает уровень дифференцировки клеток и, в частности в нашем случае, может позволить исследуемым клеткам проявить какие-либо из свойств, которыми они изначально обладали, и тем самым идентифицировать их происхождение. Вопрос заслуживает дальнейшего изучения с применением методик определения маркеров дифференцировки эндотелия.

Авторы благодарят И. Ю. Житняк за помощь в подготовке к печати рисунков и И. А. Гамалей за ценные замечания, способствовавшие существенному улучшению текста статьи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-01473а).

Список литературы

- Александр П., Хорнинг Э. 1961. Индукция опухолей с помощью имплантации под кожу пластмассовых пластинок по методу Оппенгеймера. В кн.: Механизмы канцерогенеза. М.: ИЛ. 25—41.
- Альтштейн А. Д. 2004. Вирусный канцерогенез и роль вирусов в возникновении опухолей человека. В кн.: Канцерогенез. М.: Медицина. 251—361.
- Виленчик М. М. 1987. Нестабильность ДНК и отдаленные последствия воздействия излучений. М.: Энергоатомиздат. 192 с.
- Мойжесс Т. Г. 1981. Канцерогенез, индуцируемый инородными телами. В кн.: Явления индукции и дифференцировки при опухолевом росте. М.: Наука. 70—105.
- Мойжесс Т. Г. 2008. О канцерогенезе, индуцируемом инородными телами. Биохимия. 73 (7) : 949—963.
- Мойжесс Т. Г., Пригожина Е. Л. 1973. Локализация предопухолевых элементов при пластмассовом канцерогенезе. Бюл. эксперим. биол. мед. 9 : 92—94.
- Тимофеевский Ф. Д. 1947. Эксплантация опухолей человека. М.: Изд-во АМН СССР. 157 с.
- Турусов В. С., Белицкий Г. А., Пылев Л. Н., Кобляков В. А. 2004. Механизмы действия и классификация химических канцерогенов. В кн.: Канцерогенез. М.: Медицина. 204—225.
- Brand K. G., Buoen L. C., Brand I. 1971. Foreign-body tumorigenesis: timing and location of preneoplastic events. J. Nat. Cancer Inst. 47 : 829—836.
- Castellon R., Hamdi K., Sacerio I., Aoki A. M., Kennedy C., Ljubimov A. V. 2002. Effects of angiogenic growth factor combinations on retinal endothelial cells. Exp. Eye Res. 74 : 523—535.
- Kleinman H. K., McGarvey M. L., Hassell J. R., Star V. L., Cannon F. B., Laurie G. W., Martin G. R. 1986. Basement membrane complexes with biological activity. Biochemistry. 25 : 312—318.

Поступила 11 IV 2013

CELLS OF ENDOTHELIAL LINEAGE (OR ENDOTHELIAL-LIKE CELLS)
AS POSSIBLE PROGENITOR CELLS OF SARCOMAS INDUCED BY IMPLANTED FOREIGN BODY*T. G. Moizhess,¹ Ju. M. Vasiliev*

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow;

¹ e-mail: 7012002@inbox.ru

This study is dedicated to the problem of the origin of progenitor cells of sarcomas induced by implantation of a foreign body (polyvinylchloride plates) to mice. It is known that such cells are found among the cells of the monolayer covering the surface of implanted plate without any signs of tumor growth in 6 and more months after implantation. We studied the existence of endothelial features of mesenchymal type cells that had been grown by culturing the cells from the implanted plate surface in 9 and 14 months after implantation. We have shown that these cells are really the precursors of FB sarcomas though they had different tumor potential depending on the period since implantation moment. We studied the behavior of these pretumor cells in 2D (on plastic) and 3D (on matrigel) cultures. We have found that in the case of a dense monolayer on plastic such cells show growth of endothelial type (cobblestone). When sown on matrigel they are organized in more or less typical capillary-like structures that subsequently form secondary branching vascular-like structures named «secondary sprouting». Such behavior is also characteristic for endothelial cells. This observations allow us to postulate the possibility of endothelial origin of FB sarcomas.

Key words: FB carcinogenesis, FB sarcomas, matrigel, endothelial cells.
