

Doi: 10.31116/tsitol.2018.05.05

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МОНОЦИТОПОДОБНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

© Л. В. Марченко, А. Д. Никитина, Н. Д. Аксенов, Л. В. Смагина,
Б. А. Маргулис, И. В. Гужова*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;
* электронный адрес: irina.guzh@gmail.com*

Иммуносупрессивные свойства опухоли обеспечиваются составляющими ее микроокружение (МО) клетками иммунной системы, в том числе макрофагами. Последние обеспечивают опухолевым клеткам приобретение более агрессивного фенотипа и способности к метастазированию. Наивный макрофаг, мигрируя внутрь тела солидной опухоли, встречается с новыми субпопуляциями опухолевых клеток, и его функции изменяются. В нашем исследовании была использована схема последовательного сокультивирования клеток эпидермоидной карциномы человека A431 с моноцитоподобными клетками THP-1, модулирующая продвижение макрофага по опухоли. Исследовали свойства макрофагов и опухолевых клеток в зависимости от этапа сокультивирования, а оценивали цитокиновый профиль МО и уровень матриксных металлопротеиназ (ММП) 2 и 9. Мы продемонстрировали, что именно первая встреча наивного моноцита с опухолевыми клетками вызывает значительные изменения пролиферативных и миграционных свойств клеток A431, высвобождение проопухолевых цитокинов во внеклеточное пространство и поляризацию моноцитов в M2-фенотип. Одним из анализируемых цитокинов, появление которого в МО значительно возрастало после 1-го этапа сокультивирования, был TNF- α , известный индуктор апоптоза, который способствовал массовой гибели клеток THP-1, в основном уже приобретших проопухолевый фенотип. Наши данные указывают на то, что функция макрофагов зависит от цитокинового профиля в МО, и представляют один из сценариев взаимодействия раковых и стромальных клеток в реальной опухоли.

Ключевые слова: микроокружение опухоли, макрофаги, цитокины, A431, THP-1.

Принятые сокращения: МО — микроокружение опухоли, ММП — матриксные металлопротеины, TNF- α — фактор некроза опухоли, IL — интерлейкин, ЭМП — эпителиально-мезенхимный переход, GFP — зеленый флуоресцентный белок, TRAIL — лиганд, индуцирующий апоптоз через TNF.

Опухолевые клетки поддерживают свою жизнеспособность во многом благодаря наличию микроокружения (МО), которое состоит из стромальных и иммунных клеток, белков, ростовых факторов, молекул РНК, везикулярных частиц, микроэлементов и других компонентов (Witz, 2008). Некоторые клетки МО при контакте с опухолью утрачивают свою защитную функцию и становятся проопухолевыми. Это приводит к тому, что злокачественные опухоли избегают иммунной атаки со стороны хозяина, хотя обладают всеми чертами, необходимыми для активации иммунного ответа: клетки опухолей часто несут мутантные или неправильно процессированные белки, которые могут вызвать иммунную реакцию организма, причем в районе опухоли часто развивается воспалительная реакция (Munn, Bronte, 2016).

Согласно общепринятой в последние годы точке зрения, способность опухоли избегать иммунной атаки со стороны хозяина обеспечивается населяющими ее Т-лимфоцитами, макрофагами, дендритными клетками и другими представителями иммунной системы. Попадая в опухолевую ткань, эти клетки начинают синтезировать иммуносупрессивные цитокины, что приводит к повышению концентрации миелоидных супрессорных кле-

ток (MDSC) в опухоли, к активации регуляторных Т-лимфоцитов Fox3⁺ (Tregs), поляризации опухолеассоциированных макрофагов в M2-фенотип и подавлению пролиферации Т-клеток (Razavi et al., 2016). Кроме того, опухолеассоциированные макрофаги помимо секреции способствующих росту опухоли цитокинов поддерживают локальный непрерывный процесс воспаления, который в свою очередь благоприятствует генетической нестабильности опухолевых клеток (Mantovani et al., 2008; Hanahan, Weinberg, 2011).

К списку цитокинов, концентрация которых возрастает в МО, относятся интерлейкины IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 и факторы TGF-1 β и TNF- α . Провоспалительный цитокин IL-1 β благодаря активации сигнального пути IL-1 β /IL-1RI/IL-1RAcP провоцирует эпителиально-мезенхимный переход (ЭМП) опухолевых клеток (Jimenez-Gardino et al., 2017). Другой провоспалительный цитокин, IL-6, является резидентом МО большого количества опухолей, в частности немелкоклеточного рака легкого (Abulaiti et al., 2013), рака молочной железы (Chang et al., 2013), простаты (Giri et al., 2001), поджелудочной железы (Lesina et al., 2011) и опухолей другого происхождения. IL-6 через свой рецептор IL-6R и Ja-

pus-сигнальный путь активирует STAT3, а это приводит к усиленной пролиферации опухолевых клеток, приобретению ими устойчивости к противоопухолевым препаратам, индукции ЭМП и в конечном итоге ведет к усилению метастазирования (Mace et al., 2013; Domingues et al., 2017).

IL-8, который также замечен в МО опухолей разного гистогенеза, может высвобождаться из опухолеассоциированных фибробластов, попавших под влияние опухоли, и самих опухолевых клеток (Domingues et al., 2017). IL-8 рекрутирует в опухолевый очаг новые наивные клетки иммунной системы, стимулирует ангиогенез опухоли (Suarez-Carmona et al., 2015) и ЭМП опухолевых клеток (Sanmamed et al., 2014).

Еще одним фактором, регулирующим МО, является TNF- α , плейотропный цитокин, который играет ключевую роль в регуляции апоптоза, опухолевого ангиогенеза, воспаления и иммунитета. TNF- α может играть как про-, так и противоопухолевую роль (Ham et al., 2016). Продуцируемый клетками МО, TNF- α стимулирует экспрессию других цитокинов, промежуточных продуктов активных форм кислорода, оксида азота и простагландинов (Balkwill, 2009). TNF- α участвует почти на всех этапах канцерогенеза и выполняет различные функции, зависящие от типа опухоли и МО: при высоких концентрациях TNF- α коррелирует с регрессией опухоли, а при продолжительно низких концентрациях, напротив, способствует прогрессии опухоли, стимулируя экспрессию других факторов роста и цитокинов (Balkwill, 2009).

Любая солидная опухоль представляет собой объемное образование, и наивный макрофаг, мигрируя внутрь тела опухоли, встречается с новыми и новыми популяциями опухолевых клеток. Что происходит с макрофагами по мере их продвижения по опухолевой ткани, как меняется их фенотип, как меняется цитокиновый профиль МО и как на эти события реагируют опухолевые клетки? Целью настоящей работы было найти ответы на эти вопросы.

Материал и методика

Клетки эпидермоидной карциномы человека A431 и клетки моноцитарной лейкемии THP-1 (суспензионная культура) были получены из Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки обеих клеточных линий культивировали в среде DMEM (Gibco, США) с содержанием 4.5 мг/мл глюкозы, 2 mM L-глутамин, 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) и 0.05 мг/мл гентамицина (Биолот, Санкт-Петербург) в атмосфере 6 % CO₂ при 37 °C. Моноцитоподобные клетки THP-1 традиционно используют в качестве модели недифференцированных макрофагов (Старикова и др., 2005).

Для того чтобы имитировать процесс продвижения макрофага внутри опухолевой ткани и, возможно, для приобретения ими нового фенотипа мы применили модель *in vitro* поэтапного «обучения» макрофагов. Клетки A431 высевали в чашки Петри 10 см в концентрации 60 тыс./мл накануне эксперимента. После того как клетки прикреплялись ко дну чашки, вносили клетки THP-1 в соотношении 1 : 1. Сокультивирование проводили 24 ч, после чего обученные макрофаги (1-й этап) пересаживали к свежим клеткам A431, посеянным накануне, в аналогичных соотношениях (рис. 1). Для того чтобы выдер-

жать соотношение 1 : 1 на всех этапах сокультивирования, на 1-м этапе совместное культивирование проводили в трех чашках Петри, на 2-м — в двух и на 3-ем — в одной. Суспензионные клетки THP-1 собирали с помощью пипетирования. При каждом пересеве считали число мертвых клеток в культуре с помощью окрашивания трипановым синим и камеры Ньюбауэра. После каждого этапа отдельно собирали клетки A431, THP-1 и кондиционированную среду, в которой проводили сокультивирование, замораживали и хранили при –80 °C. Всего было проведено по 6 повторов каждого этапа.

Содержание цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF- α в кондиционированной среде после каждого из трех этапов сокультивирования клеток оценивали с помощью мультиплексного иммунологического анализа на магнитных микросферах и технологии MilliPlex согласно рекомендациям фирмы-производителя (Merck, Германия). Milliplex Human Cytokine Magnetic Panel HCYTOMAG-60K была любезно предоставлена компанией Merck. Было проведено два независимых измерения цитокинового профиля культуральной среды.

Активность MMP клеток A431 в процессе совместного культивирования с макрофагами оценивали с помощью зимографии. Для этого после каждого из трех этапов сокультивирования удаляли суспензионные клетки THP-1, клетки A431 тщательно промывали PBS и вносили бессывороточную среду, в которой клетки культивировали в течение 18 ч. Среду отбирали, центрифугировали при 3000 g 5 мин и смешивали с буфером для проб, содержащим SDS. Акриламидные гели для электрофореза полимеризовали в присутствии 1 мг/мл желатина. Пробы подвергали электрофорезу в полученных гелях и отмывали от SDS 2.5%-ным раствором Тритона X-100 2 раза по 30 мин. Затем гели инкубировали в реакционном буфере (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂ и 0.05 % Brij 35) в течение 12 ч. После прохождения протеолитической реакции гели окрашивали красителем Кумасси синим R-250 и выявляли неокрашенные зоны с мол. массой, соответствующей MMP-2 и MMP-9.

Оценка экспрессии маркера проопухолевых макрофагов (F4/80). Наивные клетки THP-1 и клетки THP-1, собранные после 1-го этапа сокультивирования, окрашивали антителами к маркеру F4/80 (Cell Signaling, США) на холоде (4 °C) в течение 2 ч, после чего отмывали с помощью холодного PBS, фиксировали в 4%-ном растворе формалина и окрашивали вторичными антителами, меченными Alexa-647 (Invitrogen, США). Ядра окрашивали с помощью 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI; Sigma, США). Для выявления контакта между опухолевыми клетками A431 и клетками THP-1 (представляющих в наших экспериментах макрофаги) использовали клетки THP-1, трансдуцированные с помощью лентивирусной конструкции геном зеленого флуоресцентного белка GFP. Клетки A431 высевали на покровные стекла в лунки 24-луночной платы в концентрации 60 тыс./мл и на следующее утро вносили в эти же лунки клетки THP-1-GFP в соотношении 1 : 1. Культивирование проводили в течение 24 ч, после чего стекла с клетками тщательно промывали холодным PBS и фиксировали в растворе 4%-ного формальдегида, окрашивали фаллоидином, меченным Alexa 633 (Life Technology, США). Ядра окрашивали DAPI. Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа TSL SP 5 (Leica, Германия) с использованием лазеров с длинами волн 405 и 647 нм.

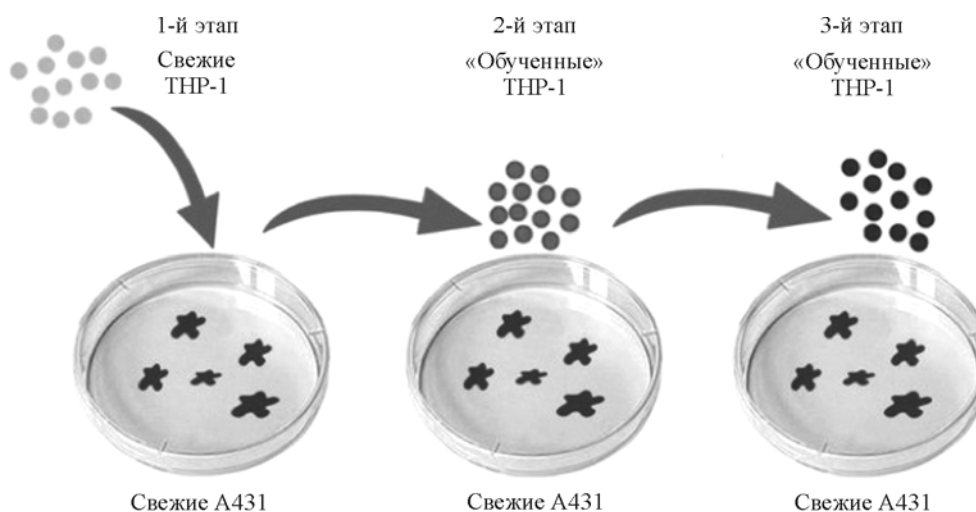


Рис. 1. Схема поэтапного сокультивирования опухолевых клеток A431 с клетками THP-1, имитирующими в нашем исследовании макрофаги.

Моноцитоподобные интактные клетки THP-1 вносили в соотношении 1 : 1 в культуру клеток A431 и сокультивировали в течение 24 ч, после чего уже «обученные» клетки THP-1 собирали и переносили в чашку со свежими A431. Процедуру повторяли еще 2 раза.

Проточная цитофлуориметрия. Наивные клетки THP-1 и клетки THP-1, собранные после трех этапов сокультивирования, инкубировали в полной культуральной среде с антителами к F4/80 (Abcam, Великобритания) в течение 2 ч при 4 °C, вторичными антимышиными антителами, меченными Alexa 488 и реактивом Annexin-V Alexa Fluor TM 633 (оба Life Technology, США), для определения уровня апоптоза. Клетки анализировали с помощью цитометра CytoFlex Flow (Beckman Coulter, США), используя лазеры с длинами волн 488 и 647 нм.

Иммуноблоттинг. Для выявления маркеров дифференцировки макрофагов с проопуховым фенотипом клетки THP-1, прошедшие 1-й и 2-й этапы обучения, собирали, центрифугировали и трижды промывали в растворе PBS. К сухому клеточному осадку добавляли лизирующий буфер High RIPA: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Тритона X-100, 0.5 % SDS, 1 % DOC, 2 mM EDTA и 100-кратный раствор ингибитора протеаз (Mammalian Inhibitor Protease, Sigma). После трех циклов замораживания-оттаивания лизат центрифугировали при 10 000 об/мин, в супернатанте определяли концентрацию белка по методу Брэдфорд (Bradford, 1976). Лизаты клеток (по 20 мкг на дорожку) использовали для электрофореза и иммуноблоттинга. Мембрану последовательно инкубировали с антителами к аргиназе 1 (Arg-1, маркеру макрофагов M2) и вторичными антимышиными антителами, меченными пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания). Для контроля равномерности нанесения белковых проб использовали антитела к GAPDH (Abcam, Великобритания).

Оценку миграции и пролиферации клеток A431 проводили сразу после сокультивирования с клетками THP-1 в режиме реального времени с помощью прибора xCELLigence RTCA DP (Biosciences, Inc.). В лунки 16-луночной E-платы, на дно которых напылен золотой электрод, сопротивление которого изменяется в зависимости от площади соприкосновения клеток с поверхностью лунки, вносили клетки A431 (по 200 тыс./мл) после 1, 2 и 3-го этапов совместного культивирования. Измерение сопротивления (импеданс) проводили каждые

10 мин в течение 36 ч. Оценку миграционных свойств клеток A431 после совместного культивирования с клетками THP-1, прошедшими 1, 2 или 3 этапа обучения, проводили с помощью камер Бойдена (Boyden chambers) или планшетов с двуполостными лунками с полупроницаемой перегородкой, на нижнюю поверхность которой напылен золотой электрод (для измерения миграционных свойств клеток в режиме реального времени). Клетки A431 после совместного культивирования с обученными THP-1 сеяли в среде без сыворотки в концентрации 100 тыс./мл, либо в верхнюю полость лунки планшета, либо в верхнюю полость камеры Бойдена. В нижнюю полость помещали культуральную среду, содержащую 10 % фетальной сыворотки. Измерение сопротивления (импеданс) на нижней стороне полости проводили каждые 10 мин в течение 24 ч. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения прибора RTCA, Software 1.2. Клетки в камере Бойдена окрашивали красителем Гимза, клетки из внутренней части камеры удаляли с помощью ватной палочки, оставшиеся на внешней поверхности камеры клетки фотографировали (камера AxioCamERc5S; Zeiss, Германия).

Статистическая обработка. Анализ проводили при помощи программы Microsoft Excel 2010 для малых выборок. Данные представлены средними значениями со стандартными отклонениями. Статистически значимыми считали различия при $P < 0.05$. Каждый эксперимент повторяли 2—4 раза.

Результаты

Совместное культивирование клеток A431 с моноцитоподобными клетками THP-1 приводит к изменению фенотипа последних. Для того чтобы понять, влияют ли опухолевые клетки в нашей модели на свойства и фенотип клеток THP-1, модулирующих в нашем исследовании макрофаги, мы исследовали изменения морфологии клеток THP-1 с помощью конфокальной микроскопии. При сокультивировании с клетками A431 клетки THP-1 изменяют свою

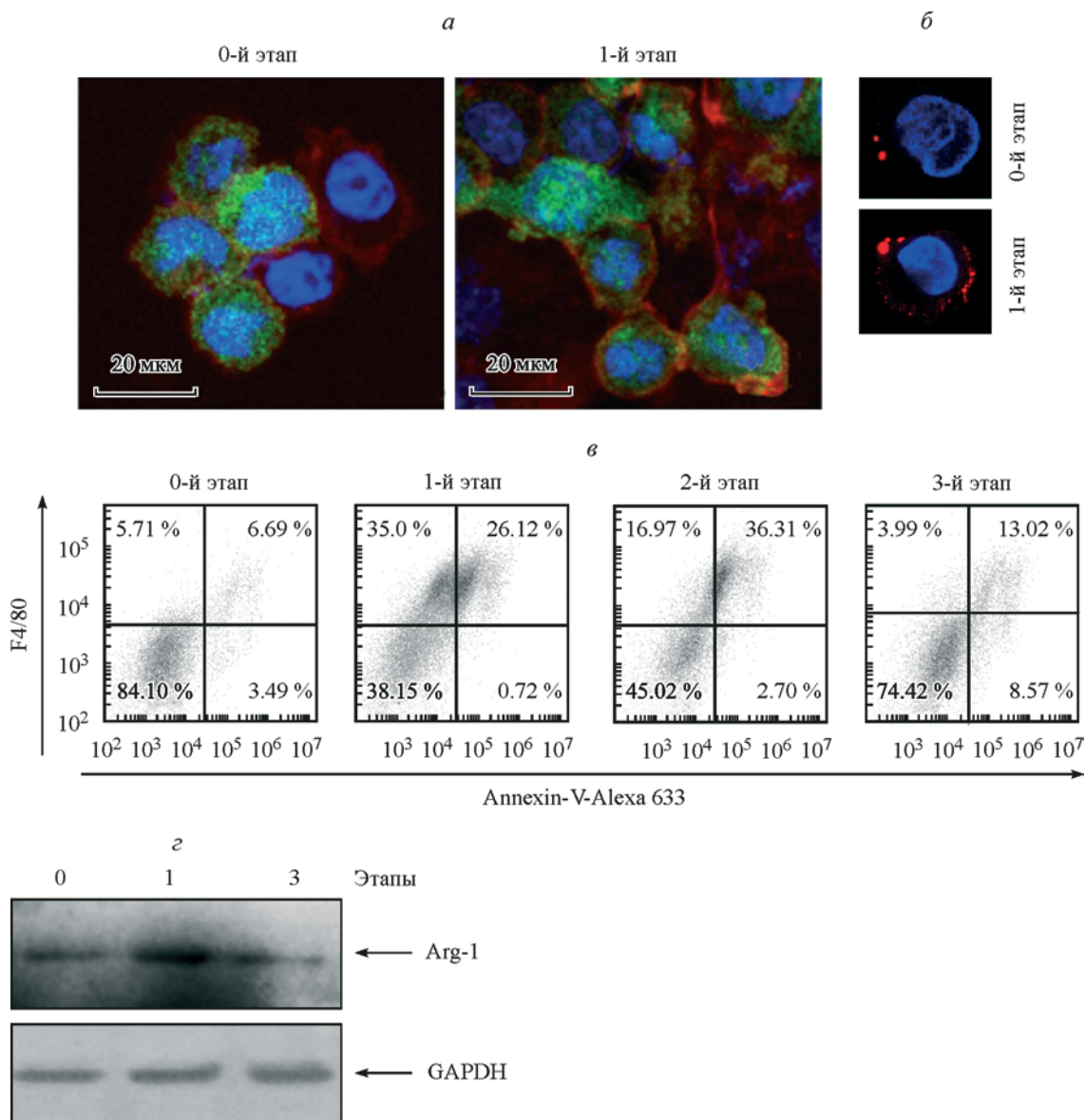


Рис. 2. Приобретение черт проопухолевого фенотипа моноцитоподобными клетками THP-1 в результате совместного культивирования с раковыми клетками A431.

а — клетки THP-1-GFP (зеленый цвет; инфицированы геном зеленого флуоресцентного белка) сокультивировали с клетками A431 в течение 24 ч, фиксировали и окрашивали фаллоидином, меченным Alexa 633 (красный цвет). *б* — клетки THP-1 после 1-го этапа сокультивирования с клетками A431 окрашивали антителами против маркера проопухолевого фенотипа F4/80 (красный цвет); ядра клеток окрашивали DAPI (*а, б*, синий цвет). *в* — гистограммы проточной цитометрии клеток THP-1, собранных после сокультивирования с клетками A431 на 1, 2 и 3-м этапах и окрашенных антителами против маркера проопухолевого фенотипа F4/80 и реактивом Annexin-V (количество клеток THP-1, приобретших маркер F4/80, возрастает после 1-го этапа сокультивирования и далее понижается в связи с гибелью F4/80-клеток по механизму апоптоза). *з* — иммуноблот лизатов клеток THP-1 с антителами против маркера проопухолевого фенотипа Arg-1 после 1-го и 2-го этапов совместного культивирования с клетками A431.

сферическую форму на распластанную, для которой характерны адгезионные контакты (рис. 2, *а*). Это одно из подтверждений макрофагальной дифференцировки, так как циркулирующие в крови моноциты имеют округлую шарообразную форму (Eligini et al., 2013).

Чтобы проверить, сопряжены ли изменения морфологии моноцитов с их переходом к проопухолевому фенотипу, мы использовали конфокальную микроскопию и проточную цитофлуориметрию с окраской клеток антителами к маркеру макрофагов M2 — F4/80 и маркером апоптоза — Annexin-V. Это позволило нам оценить, какая доля клеток THP-1, приобретших проопухолевый фенотип, погибла по механизму апоптоза.

Небольшое количество наивных клеток THP-1 до сокультивирования экспрессирует на своей поверхности маркер M2-фенотипа F4/80 (рис. 2, *б, в*), но после 1-го этапа сокультивирования доля клеток, положительных по этому маркеру, выросла до 61.12 %. Однако 42.04 % клеток этой субпопуляции были комитированы к апоптозу, о чем свидетельствуют данные проточной цитофлуориметрии (рис. 2, *в*). Вопреки нашим ожиданиям по мере обучения клетки THP-1, представляющие в нашем исследовании макрофаги, не приобретали, а теряли проопухолевый фенотип. После 2-го этапа сокультивирования 52.28 % клеток несли маркер F4/80 и 67.02 % от этого количества встали на путь апоптоза (рис. 2, *в*).

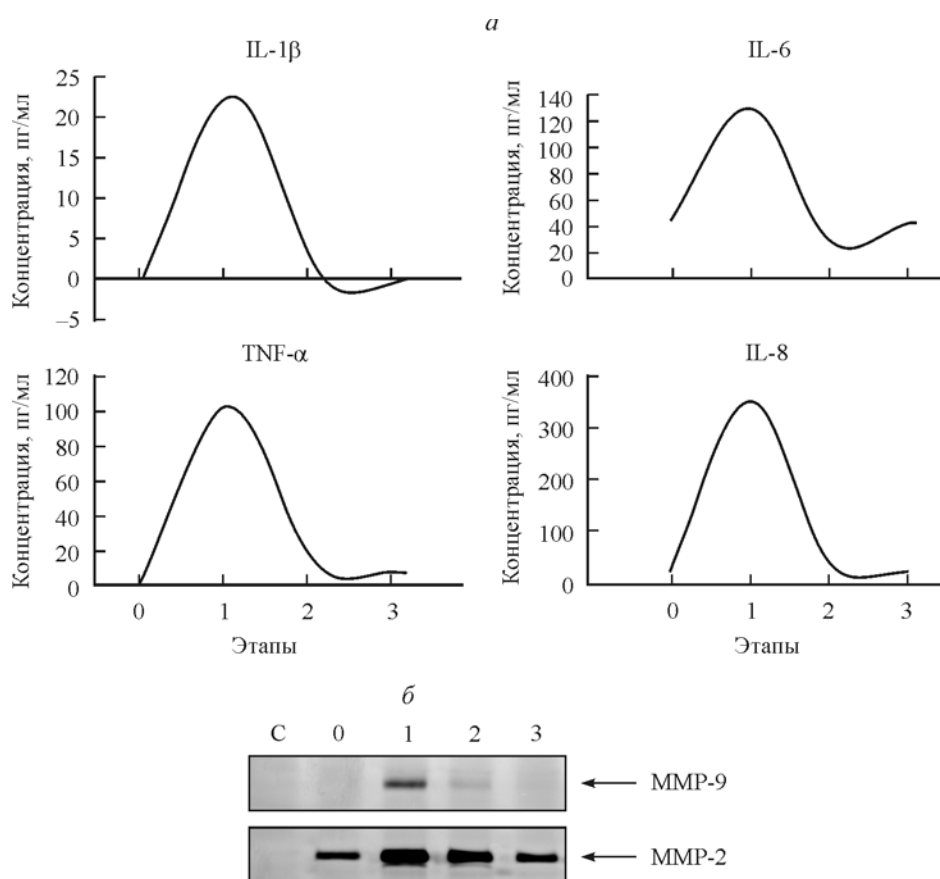


Рис. 3. Изменение концентрации цитокинов (а) и уровня MMP (б) в среде совместного культивирования клеток А431 и ТНР-1.

а — кондиционированную культуральную среду, собранную с клеток А431 после 1, 2 и 3-го этапов сокультивирования с клетками ТНР-1, исследовали с помощью мультиплексного иммунологического анализа на магнитных микросферах и технологии MilliPlex. б — данные зимографии после 1, 2 и 3-го этапов сокультивирования: С — контрольная среда, 0 — среда от интактных клеток А431.

К 3-му этапу только 17.01 % клеток были положительными по F4/80 и 76.03 % от этого количества были положительными по Annexin-V (рис. 2, в).

Данные об утрате клетками ТНР-1 проопухолевого фенотипа макрофагов М2 в процессе сокультивирования с агрессивными опухолевыми клетками были подтверждены с помощью другого маркера проопухолевых макрофагов — Arg-1. В нормальных условиях клетки ТНР-1 экспрессируют невысокий уровень Arg-1 (рис. 2, з). При сокультивировании с клетками А431 уровень Arg-1 в клетках ТНР-1 резко повышается уже на 1-м этапе, но при последующих этапах приближается к контрольному (рис. 2, з).

Совместное культивирование клеток А431 с клетками ТНР-1 приводит к изменению цитокинового секрета. Цитокиновые профили в МО (IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF- α) определяли с помощью мультиплексного иммунологического анализа на магнитных микросферах и технологии MilliPlex. Результаты этого эксперимента показали, что встреча опухолевых клеток с наивными клетками ТНР-1, модулирующими макрофаги (1-й этап), приводит к значительному повышению количества всех четырех цитокинов в среде сокультивируемых клеток. Ко 2-му этапу уровень цитокинов возвратился к контрольному значению и по мере обучения макрофагов больше не вырос.

Кроме цитокинов важными игроками в МО являются MMP — основные ферменты, расщепляющие белковые

компоненты внеклеточного матрикса. Избыточная деградация внеклеточного матрикса является характерной чертой процесса метастазирования. MMP секретируются в основном под действием провоспалительных цитокинов, а главным их источником считаются активированные макрофаги, нейтрофилы, фибробласты, а также эндотелиальные и опухолевые клетки (Бережная, 2009). Чтобы понять, происходит ли изменение уровня MMP в среде в процессе сокультивирования клеток А431 с клетками ТНР-1, мы оценили активность MMP-2 и MMP-9 с помощью зимографии. Уровень активности MMP-2 и MMP-9 в культуральной среде, полученной в результате сокультивирования клеток А431 и ТНР-1, значительно возрастал на 1-м этапе и постепенно понижался в процессе обучения (рис. 3, б).

Сокультивирование клеток А-431 с клетками ТНР-1 приводит к усилению пролиферативных и миграционных свойств опухолевых клеток. Чтобы понять, способны ли обученные макрофаги влиять на свойства опухолевых клеток, такие как способность к пролиферации или к миграции, мы провели три этапа обучения клеток ТНР-1 (рис. 1) и после каждого этапа исследовали пролиферативные и миграционные свойства клеток А431.

Сокультивирование клеток А431 с клетками ТНР-1, прошедшими обучение с опухолевыми клетками в течение 2-го и 3-го этапов, существенно не влияло на скорость роста опухолевых клеток (рис. 4, а), однако после

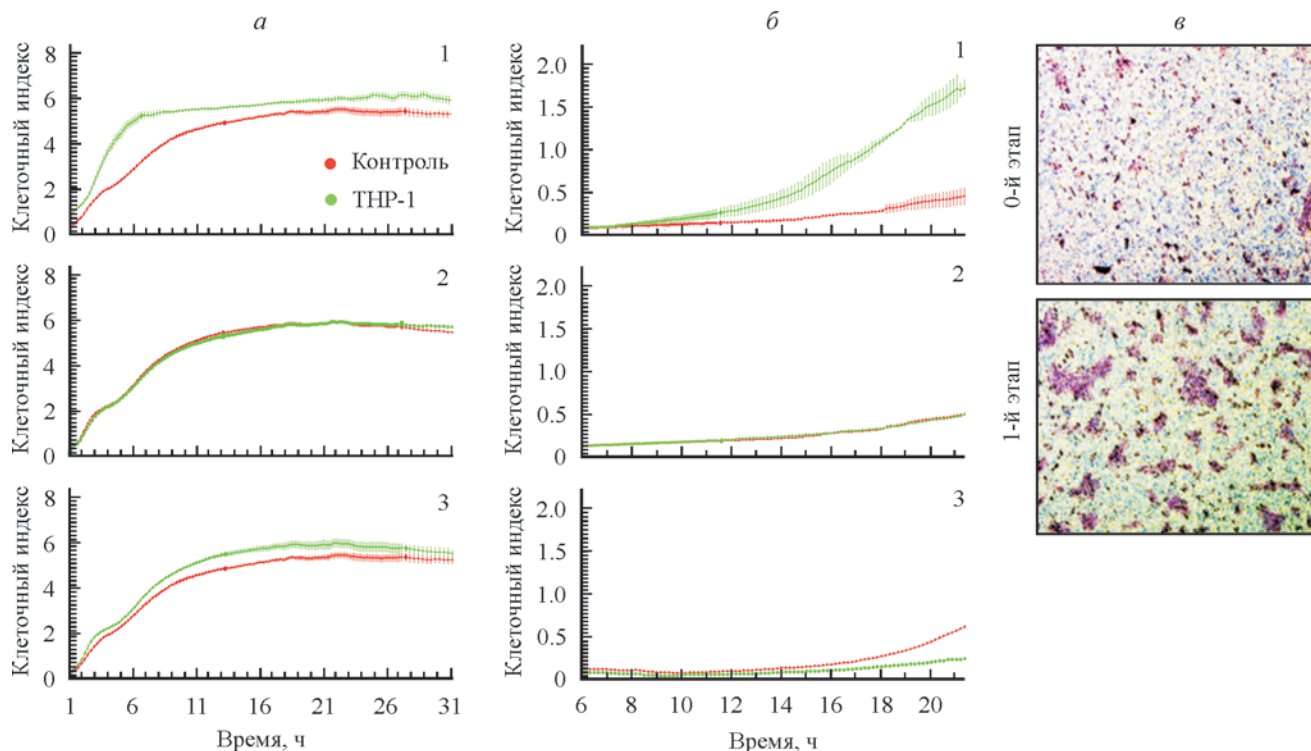


Рис. 4. Усиление пролиферативных и миграционных свойств опухолевых клеток A431 после сокультивирования с моноцитоподобными клетками ТНР-1.

После 1, 2 и 3-го этапов сокультивирования с клетками ТНР-1 клетки А431 высевали в лунки Е-плат для анализа пролиферации (а) или СИМ-плат для анализа миграционных свойств (б) прибора xCELLigence. в — данные миграционного теста с помощью камер Бойдена и окраски мигрирующих клеток красителем Гимза (синий цвет).

сокультивирования с наивными ТНР-1 клеточный индекс, отражающий скорость пролиферации клеток А431, значительно увеличивался по сравнению с клеточным индексом интактных клеток А431 (рис. 4, а). В экспериментах по изучению миграционных свойств опухолевых клеток наивные ТНР-1 оказали наиболее значительное влияние на способность опухолевых клеток к миграции по сравнению с клетками ТНР-1, прошедшими 2 или 3 этапа сокультивирования (рис. 4, б). Данные, полученные с использованием камеры Бойдена (рис. 4, в), подтвердили результаты экспериментов с применением прибора xCELLigence: после совместного культивирования клеток А431 с наивными клетками ТНР-1 (1-й этап) гораздо большее количество клеток прошло сквозь поры проницаемой мембраны и оказалась на ее нижней стороне (рис. 4, в).

Обсуждение

Опухлеассоциированные макрофаги неравномерно распределяются в пространстве опухоли, как было показано в недавнем исследовании на опухолях молочной железы человека (Tashireva et al., 2017). Локализация макрофагов в определенных структурах опухоли может влиять на поведение опухолевых клеток и коррелировать с повышенным количеством метастатических узлов у пациентов (Tashireva et al., 2017). Функция макрофагов также зависит от их локализации в МО (Budakov et al., 2017), а это значит, что поведение и дифференцировка макрофагов определяются цитокиновым профилем в той или иной точке опухолевого узла (Stakheyeva et al., 2017). В наших

экспериментах мы попытались воспроизвести *in vitro* те события, которые происходят с макрофагами, попавшими в МО, по мере их прохождения внутрь опухоли.

Мы оценили изменения фенотипа макрофагов, свойств опухолевых клеток и содержания цитокинов в культуральной среде при последовательном сокультивировании клеток А431 и ТНР-1 (рис. 1). В результате экспериментов мы выяснили, что наивные клетки ТНР-1 при первом же контакте с опухолевыми клетками значительно меняют свой фенотип на проопухолевый, о чем говорит повышенная экспрессия маркеров М2-фенотипа F4/80 и Arg-1 у клеток ТНР-1. Однако мы заметили, что 26.1 % популяции клеток ТНР-1 погибает по механизму апоптоза уже после 1-го этапа сокультивирования с клетками А431, причем среди клеток, несущих на своей поверхности маркер F4/80, уровень апоптотических клеток еще выше — 42 % (рис. 2). С каждым этапом сокультивирования доля апоптотических клеток, несущих F4/80, возрастала и достигала на 3-м этапе 76 % (рис. 2). Вследствие этого и общая доля клеток, несущих маркер F4/80 в популяции ТНР-1, также неуклонно уменьшалась (рис. 2, б).

Анализ цитокинового профиля в культуральной среде после сокультивирования клеток А431 и ТНР-1 позволил внести ясность в причины массовой гибели макрофагов. Согласно данным мультиплексного анализа, появление в клеточной среде IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF- α приходилось на 1-й этап сокультивирования (рис. 3). Важно, что среди этих цитокинов был TNF- α , известный мощный индуктор апоптоза, запускающий процесс программированной клеточной смерти через соответствующий рецептор TRAIL (TRAIL: TNF-related apoptosis-indu-

cing ligand) (Fiorucci et al., 2005), и уровень его содержания доходил до 120 пг/мл. Клетки THP-1 экспрессируют рецептор TRAIL на высоком уровне (Wei et al., 2010; Liu et al., 2017), и это делает их крайне чувствительными к действию TNF- α . Мы предполагаем, что именно выброс TNF- α индуцировал апоптоз в популяции клеток THP-1, причем апоптотная программа реализовывалась и на 1-м, и на 2-м, и на 3-м этапах, когда TNF- α в среде уже не было (рис. 3). Вероятно, гибель макрофагов, изменивших свой фенотип на проопухолевый, и стала причиной того, что эти клетки не смогли повлиять на свойства клеток A431 при дальнейшем сокультивировании. Действительно, и пролиферативные, и миграционные способности клеток A431, связанные с повышенным содержанием в среде IL-1 β , IL-6 и IL-8 (рис. 3), усилились только в результате первого контакта между наивными опухолевыми клетками и макрофагами (рис. 4), так же как и уровень MMP-2 и MMP-9 в культуральной среде (рис. 3, б).

Мы не можем сказать сегодня, насколько описанный феномен является универсальным, будет ли он повторяться при использовании других линий опухолевых клеток. Однако учитывая то, что опухоль обычно сопровождается хроническим воспалением (Balkwill, Mantovani, 2001), что позволяет ее назвать «незаживающей раной» («non-healing wound») (Dvorak, 1986), можно ожидать от опухолевых клеток секреции определенных цитокинов, влияющих на жизнь и смерть макрофагов, попадающих в ее сферу влияния. А это значит, что элементы МО не менее чем сами опухолевые клетки должны стать мишенью для противоопухолевой терапии.

Авторы благодарят Марину Прохорову (Merk) и Евгению Беляеву (Alamed) за возможность использования оборудования MagPix и помощь в анализе мультиплексных данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

Список литературы

- Бережная Н. М.* 2009. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. I. Клетки и цитокины-участники воспаления. *Онкология*. 11 (1) : 6—17. (*Berezhnaya N. M.* 2009. Immune cells in tumor microenvironment. *Oncologiya*. 11 (1) : 6—17.)
- Старикова Э. А., Фрейдлин И. С., Соколов Д. И., Сельков С. А., Сысоев К. А., Тотолян А. А.* 2005. Влияние эндотелиальных клеток, преинкубированных с цитокинами, на фенотип и функциональную активность клеток моноцитоподобной линии THP-1. *Мед. иммунол.* 7 (5) : 6. (*Starikova E. A., Freidlin I. S., Sokolov D. I., Selkov S. A., Sysoev K. A., Totolian A. A.* 2005. Effect of endothelial cells pre-incubated with cytokines on the phenotype and functional activity of monocyte-like THP-1 cells. *Med. Immunol.* 7 (5) : 6.)
- Abulaiti A., Shintani Y., Funaki S., Nakagiri T., Inoue M., Sawabata N., Minami M., Okumura M.* 2013. Interaction between non-small-cell lung cancer cells and fibroblasts via enhancement of TGF- β signaling by IL-6. *Lung Cancer*. 82 : 204—213.
- Balkwill F.* 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*. 9 : 361—371.
- Balkwill F., Mantovani A.* 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 357 : 539—545.
- Bradford M. M.* 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248—254.
- Buldakov M., Zavyalova M., Krakhmal N., Telegina N., Vtorushin S., Mitrofanova I., Riabov V., Yin S., Song B., Cherdynitseva N., Kzhyszkowska J.* 2017. CD68⁺, but not stabilin-1⁺ tumor associated macrophages in gaps of ductal tumor structures negatively correlate with the lymphatic metastasis in human breast cancer. *Immunobiology*. 222 : 31—38.
- Chang Q., Bournazou E., Sansone P., Berishaj M., Gao S. P., Daly L., Wels J., Theilen T., Granitto S., Zhang X., Cotari J., Alpaugh M. L., de Stanchina E., Manova K., Li M., Bonafe M., Ceccarelli C., Taffurelli M., Santini D., Altan-Bonnet G., Kaplan R., Norton L., Nishimoto N., Huszar D., Lyden D., Bromberg J.* 2013. The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia*. 15 : 848—862.
- Dominguez C., David J. M., Palena C.* 2017. Epithelial-mesenchymal transition and inflammation at the site of the primary tumor. *Semin. Cancer Biol.* 47 : 177—184.
- Dvorak H. F.* 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315 : 1650—1659.
- Eligini S., Crisci M., Bono E., Songia P., Tremoli E., Colombo G. I., Colli S.* 2013. Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated *in vitro* show distinct phenotypes. *J. Cell. Physiol.* 228 : 1464—1472.
- Fiorucci G., Vannucchi S., Chiantore M. V., Percario Z. A., Affabris E., Romeo G.* 2005. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a pro-apoptotic signal transducer with cancer therapeutic potential. *Curr. Pharm. Des.* 11 : 933—944.
- Giri D., Ozen M., Ittmann M.* 2001. Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer. *Amer. J. Pathol.* 159 : 2159—2165.
- Ham B., Fernandez M. C., D'Costa Z., Brodt P.* 2016. The diverse roles of the TNF axis in cancer progression and metastasis. *Trends Cancer Res.* 11 (1) : 1—27.
- Hanahan D., Weinberg R. A.* 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144 : 646—667.
- Jiménez-Garduño A. M., Mendoza-Rodríguez M. G., Urrutia-Cabrera D., Dominguez-Robles M. C., Pérez-Yépez E. A., Ayala-Sumuano J. T., Meza I.* 2017. IL-1 β induced methylation of the estrogen receptor ER α gene correlates with EMT and chemoresistance in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 490 : 780—785.
- Lesina M., Kurkowski M. U., Ludes K., Rose-John S., Treiber M., Klöppel G., Yoshimura A., Reindl W., Sipos B., Akira S., Schmid R. M., Algül H.* 2011. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell*. 19 : 456—469.
- Liu B., Sun R., Luo H., Liu X., Jiang M., Yuan C., Yang L., Hu J.* 2017. Both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cell death in monocytic THP-1 cells. *Immunobiology*. 222 : 198—205.
- Mace T. A., Ameen Z., Collins A., Wojcik S., Mair M., Young G. S., Fuchs J. R., Eubank T. D., Frankel W. L., Bekaii-Saab T., Bloomston M., Lesinski G. B.* 2013. Pancreatic cancer-associated stellate cells promote differentiation of myeloid-derived suppressor cells in a STAT3-dependent manner. *Cancer Res.* 73 : 3007—3018.
- Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F.* 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*. 454(7203) : 436—444.
- Munn D. H., Bronte V.* 2016. Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr. Opin. Immunol.* 39 : 1—6.
- Razavi S. M., Lee K. E., Jin B. E., Aujla P. S., Gholamin S., Li G.* 2016. Immune evasion strategies of glioblastoma. *Front. Surg.* 3 : 11.
- Sanmamed M. F., Carranza-Rua O., Alfaro C., Onate C., Martín-Algarra S., Perez G., Landazuri S. F., Gonzalez A., Gross S., Rodríguez I., Muñoz-Calleja C., Rodríguez-Ruiz M., Sangro B., López-Picazo J. M., Rizzo M., Mazzolini G., Pascual J. I., Andueza M. P., Perez-Gracia J. L., Melero I.* 2014. Serum interleukin-8 reflects tumor burden and treatment response across malignancies of multiple tissue origins. *Clin. Cancer Res.* 20 : 5697—5707.

Stakheyeva M., Riabov V., Mitrofanova I., Litviakov N., Chozynzonov E., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. 2017. Role of the immune component of tumor microenvironment in the efficiency of cancer treatment: perspectives for the personalized therapy. *Curr. Pharm. Des.* 23 : 4807—4826.

Suarez-Carmona M., Bourcy M., Lesage J., Leroi N., Syne L., Blacher S., Hubert P., Erpicum C., Foidart J. M., Delvenne P., Birembaut P., Noel A., Polette M., Gilles C. 2015. Soluble factors regulated by epithelial-mesenchymal transition mediate tumour angiogenesis and myeloid cell recruitment. *J. Pathol.* 236 : 491—504.

Tashireva L. A., Denisov E. V., Gerashchenko T. S., Pautova D. N., Buldakov M. A., Zavyalova M. V., Kzhyshkowska J., Cherdyntseva N. V., Perelmuter V. M. 2017. Intratumoral heteroge-

neity of macrophages and fibroblasts in breast cancer is associated with the morphological diversity of tumor cells and contributes to lymph node metastasis. *Immunobiology.* 222 : 631—640.

Wei W., Wang D., Shi J., Xiang Y., Zhang Y., Liu S., Liu Y., Zheng D. 2010. Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces chemotactic migration of monocytes via a death receptor 4-mediated RhoGTPase pathway. *Mol. Immunol.* 47 : 2475—2484.

Witz I. P. 2008. Yin-yang activities and vicious cycles in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 68 : 9—13.

Поступила 17 I 2018

PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF MACROPHAGES AND TUMOR CELLS IN THE PROCESS OF CO-CULTIVATION

L. V. Marchenko, A. D. Nikotina, N. D. Aksenov, L. V. Smagina, B. A. Margulis, I. V. Guzhova*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

* e-mail: irina.guzh@gmail.com

Immunosuppressive activity of a tumor is provided by the constituents of its microenvironment (TME), immune cells, particularly macrophages MF that instead of protecting the organism render cancer cells more aggressive and metastatically active. The solid tumor is a spacious structure and naïve MF on its way through the tumor encounters newer cell populations and its function can be upgraded. In our study, we employed the method of sequential co-cultivation of monocyte-like THP-1 cells with A431 human epidermoid cancer cells and explored the changes in the behavior of both cell counterparts depending on co-cultivation stage, cytokine profiles and metalloproteinase 2 and 9 (MMP) activity. We have found that already first meeting of MF with tumor cells increases the latter proliferation and migration of the letter, release of pro-tumorigenic cytokines and the polarization of MF to M2 phenotype. One of the most abundant cytokines induced by the co-cultivation was tumor necrosis factor, TNF-alpha, potent inducer of apoptosis, and its release led to the massive death of THP-1 cells so that at the other stages of co-cultivation the weakened population of MF could not affect the behavior of tumor cells. In conclusion, the function of MF in TME strongly depends on its cytokine content and the data reported here figure out one of scenarios of interaction between stromal and cancer cells in a real tumor.

Key words: tumor microenvironment, macrophage, cytokine, A431, THP.