

## ВЛИЯНИЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ И ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА НА ЭТАПЫ ФОРМИРОВАНИЯ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ *IN VITRO*

Е.М. ПЕРЕПЕЛИЦЫНА, Т.С. ГЕРГЕЛЮК, М.В. СИДОРЕНКО

Отделение биотехнических проблем диагностики Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Киев  
E-mail: olenaquail@rambler.ru

*Исследовано влияние Т-лимфоцитов и интерферона-гамма на жизнедеятельность популяции клеток рака молочной железы при формировании многоклеточных опухолевых сфероидов. Показаны этапы образования многоклеточных опухолевых сфероидов и возможные пути реализации проопухолевого влияния Т-лимфоцитов и интерферона-гамма через изменение экспрессии эстрогенового рецептора и рецептора эпидермального фактора роста. В результате установлена корреляция между типом гуморального воздействия, степенью экспрессии эстрогенового рецептора, а также рецептора эпидермального фактора роста и интенсивностью образования опухолевых микроагрегатов.*

**Ключевые слова:** многоклеточные опухолевые сфериды, Т-лимфоциты, интерферон-гамма, эстрогеновый рецептор, рецептор эпидермального фактора роста.

**Введение.** Рак молочной железы (РМЖ) на сегодняшний день является наиболее распространенным злокачественным заболеванием у женщин. Среди всех видов злокачественных новообразований РМЖ составляет более 32 % [1]. Стремительный рост заболеваемости обусловлен бессимптомным течением начальных стадий заболевания и многоликостью этапов предрака и рака МЖ. Это затрудняет раннюю диагностику и ухудшает результаты лечения. Поэтому изучение ранних цитологических стадий формирования опухолевого микроузла, возможных механизмов его взаимодействия с клеточным микроокружением и признаков прогрессии опухолевого процесса представляется важным и актуальным. Кроме того, остается нерешенной задача борьбы с метастазированием первичной опухоли, что существенно снижает срок жизни онкологических больных. Несмотря на успехи традиционной химиотерапии, продолжается поиск методов вовлечения в борьбу с новообра-

зованием механизмов межклеточных гуморальных взаимодействий, которые участвуют в процессах регенерации, воспаления и органогенеза. Исследования последних лет показали, что одним из подходов может быть использование интерферонов — специфических цитокинов, которые могут модулировать пролиферацию, дифференцировку и апоптоз опухолевых клеток [2–5]. В связи с этим цель предлагаемой работы состояла в определении влияния Т-лимфоцитов и интерферона-гамма на этапы формирования опухолевых микроагрегатов клетками аденокарциномы молочной железы линии MCF-7.

Общепризнано тесное взаимодействие опухолевых клеток и элементов иммунной системы, в частности Т-лимфоцитов, посредством гуморальных сигналов — цитокинов и хемокинов [6–8]. Цитокины влияют на активность цитотоксических лимфоцитов и макрофагов, регулируют клеточный и гуморальный иммунитет и играют важную роль в определении направления развития опухоли [9, 10]. Т-лимфоциты (CD4 + Th1) секретируют INF- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  и CD4 + Th2 — IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, а клетки рака молочной железы обычно экспрессируют широкий спектр рецепторов к этим цитокинам и хемокинам. Эту систему злокачественные клетки используют для паракринного стимулирования роста опухоли и метастазирования [11, 12], привлечения клеток иммунной системы [12]. Недавние исследования показали, что существует тесная связь между активностью Т-клеточной деятельности, особенно уровнем секреции INF- $\gamma$ , и терапевтическим эффектом схем противоопухолевой терапии [7, 13, 14]. Влияние INF- $\gamma$  на клетки осуществляется через различные молекулярные пути. Маркерными белками для РМЖ, осуществляющими передачу гуморальных сиг-

налов в клетку, являются эстрогеновые рецепторы (ЭР) и рецепторы эпидермального фактора роста (р-ЭФР) [15–17]. В литературе приводится много исследований, подтверждающих влияние INF- $\gamma$  на уровень экспрессии ЭР и р-ЭФР, однако зачастую их результаты противоречивы [18–21]. В то же время общепризнано, что уровень экспрессии ЭР и р-ЭФР коррелирует с пролиферативной и метастазирующей активностью опухолевых клеток [12, 22–24], а также с чувствительностью клеток РМЖ к противоопухолевым препаратам [2, 4, 7, 9, 25]. Определение влияния Т-лимфоцитов и INF- $\gamma$  на рост и развитие опухолевой популяции от монослойной культуры до микроузла позволило бы ответить на некоторые фундаментальные и практические вопросы цитологии опухоли молочной железы. Понимание клеточных и молекулярных механизмов взаимодействия опухолевых клеток и Т-лимфоцитов дало бы возможность повысить эффективность противоопухолевой терапии и использовать противоопухолевые механизмы организма более полно.

**Материалы и методы. Монослойная культура (2D).** Клетки линии MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) любезно предоставлены Банком линий из тканей человека и животных Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого. Монослойную культуру культивировали при стандартных условиях (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>, 100 % влажности) в питательной среде RPMI («Sigma», США) с 10 % фетальной сыворотки («Sigma», США), 2 мМ L-глутамина («Sigma», США) и 40 мг/мл гентамицина («Biorpharma», Украина). Стартовая плотность посадки клеток составляла 20 · 10<sup>4</sup> кл/см<sup>2</sup>. Перед использованием в эксперименте клетки культивировали 2 сут.

**Суспензионная культура.** Культура Т-лимфоцитов (хроническая Т-клеточная лейкемия, МТ-4) предоставлена Банком линий из тканей человека и животных Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого. Клетки МТ-4 характеризуются как дифференцированная клеточная линия лимфоцитов периферической крови с устойчивой секреторной способностью [26]. Клетки инкубировали суспензионной культурой в питательной среде RPMI в тех же условиях, что и MCF-7. Плотность клеточной суспензии

поддерживали на уровне 7–9 · 10<sup>5</sup> кл/мл. Смену среды и пересев культуры осуществляли каждые 2 сут. При этом клеточная культура центрифугировалась 10 мин при 1000 об/мин. Надосажок (кондиционированная среда от интактных Т-лимфоцитов) отбирали в эксперимент, а клеточный осадок ресуспендировали и рассеивали в свежую среду.

Для активации цитокиновой секреции отдельные образцы культуры МТ-4 инкубировали в течение 2 сут с иммуногенным веществом Poly(I) : Poly(C) («Sigma», США) в концентрации 8 мкг/мл. Через 2 сут среду заменяли на свежую без добавления Poly(I):Poly(C) и клетки культивировали еще 2 сут. Кондиционированную среду от активированных к синтезу интерферона гамма-Т-лимфоцитов собирали так же, как уже было описано.

**Сфероидная культура (3D).** Многоклеточные опухолевые сфероиды (МОС) получали с помощью метода Келми [27], модифицированного нами [28]. Кратко, клетки монослойной культуры после 4 сут инкубирования снимали с субстрата при помощи 0,25 % трипсин-версена и помещали в питательную среду с 5 % карбоксиметилцеллюлозы в концентрации 5 · 10<sup>5</sup> кл/мл. Затем плашки инкубировали на шейкере при ротации 50 об/мин в течение 3–5 ч. Замену половины культуральной среды производили каждые 2 сут. Сфероидную культуру поддерживали в течение 6 сут.

**Схема эксперимента.** Клетки MCF-7 рассеивали в 2D культуре. После первого пассажа сформировали четыре группы образцов: 1) контроль; 2) инкубирование с кондиционированной средой от интактных Т-лимфоцитов и 3) от активированных Т-лимфоцитов; 4) инкубирование с INF- $\gamma$  в концентрации 10<sup>3</sup> МЕ/мл (Ингарон, «Фармаклон», РФ). Кондиционированные среды от культуры Т-лимфоцитов добавляли к культуре MCF-7 в соотношении 1:1 со свежей средой через 24 ч после посева клеток в монослойную культуру. В эти же сроки добавляли INF- $\gamma$ . После 6 сут инкубирования клетки переносили в культуру 3D и культивировали еще 6 дней. Каждые 2 сут в культурах 2D и 3D меняли питательную среду с поддержанием исходных условий культивирования.

Для характеристики клеточной популяции проводили подсчет живых и мертвых клеток в

адгезии и суспензии на 1, 2, 4, 6-е сутки инкубирования культуры 2D. Размер многоклеточных сфероидов в культуре 3D оценивали с помощью фотографирования и измерения параметров агрегатов на 6-й день инкубирования. Для обработки изображений использовали программу Stemi2000 («Zeiss», Германия) с пересчетом объема агрегатов по формуле Vijercvig [29].

Для оценки уровня экспрессии рецепторов эстрогенов и эпидермального фактора роста культуру 2D высевали на покровные стекла в шестилуночную планшету (плотностью  $2 \cdot 10^4$  кл/см<sup>2</sup>). Условия культивирования и микроокружения соответствовали приведенным ранее в описании эксперимента. Экспрессию рецепторов анализировали после 2 сут инкубирования с помощью иммуоцитохимического окрашивания. Для эстрогенового рецептора использовали антитела к ЭР клона EP1 («Dako», США, № IR08461), для p-ЭФР — клон SP9 («Diagnostic BioSystem», США, № RPMD020). Визуализацию рецепторов осуществляли согласно методике, рекомендованной производителем, с использованием системы PolyVue HRP/DAB Detection system («Diagnostic BioSystem», США, № PV100D). Количественную оценку экспрессии рецепторов выполняли путем пересчета гистологического индекса согласно рекомендациям производителя. При статистическом анализе и оценке достоверности данных использовали критерий Стьюдента.

#### Результаты исследований и их обсуждение.

На первом этапе формирования опухолевой популяции рассматривали пролиферацию клеток — родоначальниц опухолевого клона. Для этого был проведен анализ количества живых опухолевых клеток в монослойной (2D) культуре при изменении условий микроокружения (рис. 1, см. вклейку).

В контрольных образцах в течение 4 сут культивирования количество живых клеток в культуре 2D увеличивалось в 3,5 раза. Затем это число начинало снижаться, и на 6-е сутки сокращалось на 19 % по сравнению с 4-ми сутками. Инкубирование клеток MCF-7 с IFN- $\gamma$  приводило к увеличению интенсивности пролиферации на первых двух сутках культивирования. В последующем на 4-е сутки эксперимента прирост клеточной массы ос-

тавлялся, а на 6-е — начиналось снижение. Так, к 4-м суткам культивирования количество клеток составляло 79 % контрольного уровня, на 6-е сутки снижалось до 57 % от контроля в этот период. В то же время кондиционированная среда от интактных Т-лимфоцитов оказывала стимулирующее влияние на пролиферацию опухолевых клеток только на 4-е сутки инкубирования. Так, за 4 сут количество живых клеток увеличивалось в 3,9 раза, снижаясь к 6-м суткам на 39 % по сравнению с 4-ми сутками. Другую картину пролиферативной активности наблюдали в культуре при добавлении кондиционированной среды от активированных Т-клеток. К 4-м суткам культивирования количество клеток увеличивалось в 2,5 раза, а к 6-м — в 3 раза по сравнению со стартовой концентрацией, без этапа снижения численности опухолевых клеток. Таким образом, клеточная популяция демонстрировала постепенный и постоянный прирост количества живых клеток в течение 6 сут наблюдений.

Способность опухолевых клеток к субстрат-независимому росту лежит в основе процессов миграции и метастазирования. Данные, полученные на первом этапе, дают представление о гуморальном влиянии на общее количество живых клеток в монослойной культуре. При этом существенным показателем миграционной активности опухолевых клеток являются изменения их адгезионной способности при различных условиях микроокружения. Для того чтобы оценить адгезионный и метастазирующий потенциал опухолевой популяции, мы исследовали, как меняется состав адгезионной и суспензионной фракций культуры 2-D на протяжении 6 сут культивирования (рис. 2, см. вклейку).

По нашим данным, после 4 сут культивирования в трех из четырех образцов (контроль, с IFN- $\gamma$  и кондиционированной средой от интактных Т-клеток) количество живых клеток в адгезионной фракции резко снижается, а в суспензионной — возрастает. Так, в контроле из  $9,63 \cdot 10^5$  кл/мл в адгезии осталось  $6,11 \cdot 10^5$  (63 %), при культивировании с IFN- $\gamma$  из  $7,36 \cdot 10^5$  кл/мл — только  $1,56 \cdot 10^5$  (21 %), а с кондиционированной средой от интактных Т-клеток из  $10,94 \cdot 10^5$  кл/мл — всего лишь  $0,78 \cdot 10^5$  (7 %) (рис. 2, а). В то же время ко-

личество живых клеток в суспензионной фракции возросло: в контроле с  $0,16$  до  $2,29 \cdot 10^5$  кл/мл (в 13 раз), в образцах с IFN- $\gamma$  — с  $0,17$  до  $3,23 \cdot 10^5$  (в 18 раз), а с кондиционированной средой от интактных Т-лимфоцитов — до  $6,25 \cdot 10^5$  кл/мл (в 41 раз) (рис. 2, б). В процентном отношении к числу клеток адгезионной фракции это составляет 38, 207 и 801 % соответственно. Только образец культуры MCF-7 с кондиционированной средой от активированных Т-клеток демонстрировал медленное увеличение количества живых клеток в адгезии и стабильно низкое число клеток в суспензии (рис. 2, б).

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что часть адгезионных клеток опухолевой популяции после 4 сут культивирования открепляются (диссоциируют) от поверхности и переходят в суспензионную фракцию. Наиболее интенсивно этот процесс наблюдался в культуре, которая инкубировалась с кондиционированной средой от интактных Т-лимфоцитов и наименее — в культуре, к которой добавлялась среда от активированных Т-лимфоцитов. Очевидно, что полученные результаты напрямую связаны с плотностью клеточной культуры, которая наблюдалась на 6-е сутки, и соответственно с интенсивностью пролиферации опухолевых клеток при различных воздействиях.

Для выяснения возможных механизмов реализации наблюдаемых эффектов исследовали влияние факторов микроокружения на уровень экспрессии ЭР и p-ЭФР клетками MCF-7 в четырех группах: 1) контроль; 2) при инкубировании MCF-7 с IFN- $\gamma$ ; 3) при инкубировании MCF-7 с кондиционированной средой от интактных Т-лимфоцитов (и-Т-лимфоцитов) и 4) от активированных Т-лимфоцитов (а-Т-лимфоцитов). Подсчет гистологического индекса проводили на базе 20 полей зрения при 400-кратном увеличении (табл. 1 и 2).

Увеличение уровня экспрессии ЭР по отношению к контролю происходило в такой последовательности: образцы с и-Т-лимфоцитами, а-Т-лимфоцитами и IFN- $\gamma$ . Менялось также соотношение клеток, не экспрессирующих ЭР (ЭР<sup>-</sup>), со средним уровнем экспрессии ЭР (ЭР<sup>+</sup>) и повышенным уровнем экспрессии ЭР (ЭР<sup>++</sup>). Так, в контрольных образцах это рас-

пределение выглядело как 1:1:1. При инкубировании с кондиционированной средой от и-Т-лимфоцитов соотношение менялось в сторону увеличения экспрессии ЭР — 1,7:3,3:4. При инкубировании со средой от а-Т-лимфоцитов и IFN- $\gamma$  эта тенденция поддерживалась и усиливалась — 0,3:1,7:8 (рис. 3, см. вклейку).

Таким образом, гуморальные факторы от а-Т-лимфоцитов стимулировали увеличение экспрессии ЭР более чем в два раза. IFN- $\gamma$  также существенно повышал уровень экспрессии ЭР опухолевыми клетками. Так, при контрольном показателе, составлявшем 33,5 %, процент ЭР<sup>++</sup> клеток при инкубации с IFN- $\gamma$  повышался до 81,5, а с кондиционированной средой от активированных Т-лимфоцитов — до 78,5. В то же время инкубирование со средой от интактных Т-лимфоцитов привело к повышению процента ЭР<sup>++</sup> клеток лишь до 40. Возможно, что именно IFN- $\gamma$  играет ключевую роль в активации процессов пролиферации и роста опухо-

Таблица 1. Процент клеток MCF-7, экспрессирующих эстрогеновый рецептор, в различных условиях культивирования

Воздействие	Клетки		
	ЭР <sup>-</sup>	ЭР <sup>+</sup>	ЭР <sup>++</sup>
Контроль	$36,0 \pm 3,5$	$37,0 \pm 0,0$	$33,5 \pm 2,75$
и-Т-лимфоциты	$17,0 \pm 2,5$	$32,0 \pm 2,0$	$40,0 \pm 8,0$
а-Т-лимфоциты	$5,5 \pm 0,56$	$16,5 \pm 3,5$	$78,5 \pm 3,5$
IFN- $\gamma$	$3,3 \pm 0,35$	$18,6 \pm 1,0$	$81,5 \pm 0,85$

Таблица 2. Процент клеток MCF-7, экспрессирующих рецептор эпидермального фактора роста, при культивировании с кондиционированной средой от интактных и активированных Т-лимфоцитов и IFN- $\gamma$

Воздействие	Клетки		
	p-ЭР <sup>-</sup>	p-ЭР <sup>+</sup>	p-ЭР <sup>++</sup>
Контроль	$11,0 \pm 1,2$	$70,0 \pm 6,1$	$20,0 \pm 2,4$
и-Т-лимфоциты	$6,0 \pm 0,56$	$74,0 \pm 6,9$	$20,0 \pm 1,7$
а-Т-лимфоциты	$20,0 \pm 1,8$	$64,0 \pm 5,7$	$16,0 \pm 1,3$
IFN- $\gamma$	$33,0 \pm 3,0$	$46,0 \pm 3,9$	$11,0 \pm 0,9$

левой популяции, а одним из путей реализации стимула является повышение экспрессии эстрогенового рецептора, что в свою очередь повышает чувствительность клеток к пролиферативным сигналам микроокружения.

Таким образом, суммируя приведенные данные, можно предположить существенное участие IFN- $\gamma$  в стимулировании экспрессии ЭР опухолевыми клетками. При отсутствии в культуральной среде эстрадиола только повышенная экспрессия ЭР не влечет за собой увеличения пролиферации клеток. А вот синергия действия IFN- $\gamma$  и цитокинов, секретируемых Т-лимфоцитами, а также усиление на этом фоне пролиферативного сигнала, поступающего к клеткам от кондиционированной среды от а-Т-лимфоцитов, ведет к стойкой пролиферации опухолевых клеток.

Поскольку участие рецепторов семейства ЭФР в опухолевом процессе общепризнано [12, 17, 21, 25], нас интересовало, какие факторы микроокружения и каким образом влияют на их экспрессию (табл. 2 и рис. 4, см. вклейку).

Согласно нашим данным IFN- $\gamma$  и, в меньшей степени, кондиционированная среда от активированных Т-лимфоцитов повышают процент клеток, не экспрессирующих р-ЭФР (р-ЭФР<sup>-</sup>), до 33 и 20 % соответственно при контрольном уровне 11 %. Одновременно интактные Т-лимфоциты не изменяют контрольных показателей экспрессии р-ЭФР опухолевыми клетками (табл. 2). Показательно также распределение клеток по группам: нет экспрессии (р-ЭФР<sup>-</sup>), средний уровень экспрес-

сии (р-ЭФР<sup>+</sup>), повышенный уровень экспрессии (р-ЭФР<sup>++</sup>). В контрольных образцах это распределение можно выразить как 1:7:2. При инкубировании с кондиционированной средой от и-Т-лимфоцитов соотношение достоверно не изменялось (0,6:7,4:2), а при инкубировании со средой от а-Т-лимфоцитов (2:6,4:1,6) и IFN- $\gamma$  (3,3:4,6:1,1) наблюдалось снижение уровня экспрессии р-ЭФР и увеличение числа клеток, не экспрессирующих р-ЭФР. Снижение иммунологического окрашивания р-ЭФР может быть связано с несколькими процессами. Одним из них, по данным литературы, является снижение аффинности рецептора к антителам с помощью уменьшения количества сайтов связывания рецептора [30]. Таким действием на р-ЭФР характеризуется именно IFN- $\gamma$ . По результатам нашего эксперимента р-ЭФР не может рассматриваться как возможный путь стимулирования роста опухолевой популяции посредством IFN- $\gamma$  и кондиционированной среды от а-Т-лимфоцитов.

Следующим этапом развития опухолевой популяции (после пролиферации и миграции) является формирование многоклеточных опухолевых сфероидов-микрометастазов. Число и размер образованных многоклеточных сфероидов зависит от целого ряда факторов, среди которых можно отметить количество живых клеток в суспензии, способность клеток к пролиферации в суспензии, межклеточную когезию, адгезию клеток к поверхности. В нашем эксперименте многоклеточные сфероиды получены после 6 дней инкубирования при поддержании постоянного уровня гуморально-

**Таблица 3. Объем многоклеточных опухолевых сфероидов, полученных после 6 дней культивирования монослойной культуры клеток MCF-7 с IFN- $\gamma$ , кондиционированной средой от интактных и активированных Т-лимфоцитов**

Воздействие	Геометрические размеры, мкм		V = 0,4·a·b, мм <sup>3</sup>
	a	b	
Контроль	367,50 ± 30	299,00 ± 25	0,014
IFN- $\gamma$	639,30 ± 59	465,50 ± 43	0,055
и-Т-лимфоциты	3628,23 ± 279	2566,59 ± 234	10,97
а-Т-лимфоциты	1902,52 ± 170	1780,15 ± 160	2,41

*Примечание.* a – большой диаметр опухолевых сфероидов, b – меньший диаметр.

го воздействия при смене среды и постоянной ротации культуры. Объем и количество полученных сфероидов измерялись в 10 полях зрения при 80-кратном увеличении (рис. 5, см. вклейку, и табл. 3)

Согласно полученным данным многоклеточные опухолевые сфероиды наименьшего объема образовывались в контрольной культуре (0,014 мм<sup>3</sup>). При инкубировании с IFN- $\gamma$  средний объем опухолевого сфероида был в 3,9 раза больше по сравнению с контролем и составлял 0,055 мм<sup>3</sup>. Сфероиды еще большего объема получены при культивировании с кондиционированной средой от активированных Т-лимфоцитов – 2,41 мм<sup>3</sup>, что в 172 больше контрольных образцов. Наибольший объем опухолевых сфероидов зафиксирован при инкубировании опухолевых клеток с кондиционированной средой от интактных Т-лимфоцитов – 10,97 мм<sup>3</sup>, что выше контроля в 8583,6 раза. Одновременно количество полученных микроагрегатов было обратно пропорционально их размерам (рис. 5 и табл. 3).

Таким образом, присутствие в клеточном микроокружении IFN- $\gamma$  приводит к запуску взаимосвязанных процессов: стимулирование экспрессии ЭР, снижение экспрессии (аффинности) р-ЭФР, снижение пролиферации и адгезионных характеристик опухолевых клеток. В результате происходит образование большого числа мелких опухолевых сфероидов. При культивировании опухолевых клеток с кондиционированной средой от активированных к секреции IFN- $\gamma$  Т-лимфоцитов получены данные, которые описывают схожее направление развития опухолевой популяции. С одной стороны, это подтверждает участие именно IFN- $\gamma$  и ЭР в молекулярных механизмах описанных клеточных реакций. С другой стороны, сочетание действия IFN- $\gamma$  и цитокинов  $\alpha$ -Т-лимфоцитов приводит к своего рода клоногенному отбору опухолевых клеток, способных активно пролиферировать в ограниченных условиях микроокружения и формировать сфероиды. В то же время при культивировании MCF-7 со средой от интактных Т-лимфоцитов происходит интенсивная пролиферация клеток в монослойной культуре с последующим выходом клеток в суспензию. Способность клеток к когезии и субстрат-независимому росту приводит

к образованию небольшого числа крупных опухолевых агрегатов. При этом близкий к контрольному уровень экспрессии ЭР позволяет предположить, что стимулирование пролиферации реализуется через механизмы, не зависящие от ЭР.

Нами установлено, что IFN- $\gamma$  демонстрирует двойственное влияние на опухолевую популяцию. С одной стороны, отмечается снижение пролиферации опухолевых клеток, адгезионных характеристик и активности р-ЭФР, что подтверждается исследованиями других авторов [18, 21, 30]. IFN- $\gamma$  также снижает активность матричных металлопротеиназ (ММП) и участвует в регуляции активности TNF- $\alpha$  [31]. Предполагается, что антипролиферативный эффект связан с усилением клеточной дифференцировки. Повышение экспрессии ЭР подтверждает это предположение. Известный на данный момент рецепторный профиль стволовых опухолевых клеток характеризуется именно отсутствием дифференцировочных маркеров и низким уровнем экспрессии рецепторов ЭР. С другой стороны, присутствие в клеточном микроокружении на фоне высокого титра IFN- $\gamma$  других провоспалительных цитокинов и факторов роста имеет сочетанное действие на опухолевые клетки [8, 9]. Поскольку основные этапы развития опухолевой популяции (пролиферация, адгезия, экспрессия ЭР и р-ЭФР) с кондиционированной средой от активированных Т-лимфоцитов повторяют тенденцию, которая наблюдалась при инкубировании клеток MCF-7 с IFN- $\gamma$ , мы предполагаем, что именно IFN- $\gamma$  вызывал наблюдаемую в эксперименте реакцию клеток. Образование большого числа мелких опухолевых агрегатов свидетельствует о сохранении высокой метастазирующей способности клетками линии MCF-7 как после инкубирования с IFN- $\gamma$ , так и со средой от  $\alpha$ -Т-лимфоцитов.

Кондиционированная среда от интактных Т-лимфоцитов, несомненно, стимулировала опухолевый рост, но иным образом. Повышалась интенсивность пролиферации, снижалась адгезия, несколько повышалась экспрессия ЭР, а р-ЭФР оставалась на уровне контроля. В результате получены единичные опухолевые сфероиды большого объема. Возможно, что крупные опухолевые сфероиды образовывались пу-

тем слияния и пролиферации более мелких агрегатов, поскольку во всех трех видах эксперимента в культуру 3D внесено одинаковое количество живых клеток.

Исследования последних лет, посвященные изучению взаимосвязи (корреляции) между размерами опухолевого агрегата и тяжестью течения заболевания, свидетельствуют, что существует прямая связь между размерами метастазирующего фокуса в периферических лимфатических узлах и присутствием дополнительных метастазов в непериферических лимфатических узлах [32]. Кроме того, для «успешной» пролиферации в новом микроокружении, кроме прочих условий, диаметр микроагрегата должен быть не менее 0,1 мм [33, 34]. Поэтому велика вероятность, что в условиях организма в присутствии соответствующего гормонального фона модельная ситуация, полученная нами в эксперименте, может получить развитие в множественных метастазах. Поэтому разносторонняя оценка состояния иммунной системы пациента имеет определяющее значение при планировании тактики лечения, а понимание фундаментальных механизмов межклеточного взаимодействия откроет новые пути противоопухолевой терапии.

#### EFFECT OF T-LYMPHOCYTES AND INTERFERON-GAMMA ON THE STAGES OF MULTICELLULAR TUMOR SPHEROIDS FORMATION *IN VITRO*

*O. Perepelytsina,  
T. Gergeliuk, M. Sydorenko*

Department for biotechnical problems of diagnostic Institute for problems of cryobiology and cryomedicine NAS Ukraine, Kyiv  
E-mail: olenaquail@rambler.ru

In our work we studied the effect of T lymphocytes and interferon-gamma on the vital activity of the breast cancer cells population and formation of multicellular tumor spheroids. We demonstrated the stages of multicellular tumor spheroids formation and the possible ways to implement antitumor influence of T lymphocytes and interferon-gamma through a change in estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor expression. Our results shown a correlation between the type of humoral influence, the degree of expression of estrogen receptor and epidermal growth factor receptor and the intensity of tumor microaggregates formation.

#### ВПЛИВ Т-ЛІМФОЦИТІВ ТА ІНТЕРФЕРОНУ-ГАММА НА ЕТАПИ ФОРМУВАННЯ БАГАТОКЛІТИННИХ ПУХЛИННИХ СФЕРОЇДІВ *IN VITRO*

*О.М. Перепелицына,  
Т.С. Гергелюк, М.В. Сидоренко*

Досліджено вплив Т-лімфоцитів та інтерферону-гамма на життєдіяльність популяції клітин раку молочної залози при формуванні багатоклітинних пухлинних сфероїдів. Продемонстровано етапи утворення багатоклітинних пухлинних сфероїдів та можливі шляхи реалізації протипухлинного впливу Т-лімфоцитів та інтерферону-гамма через зміну експресії естрогенового рецептора та рецептора епідермального фактора росту. В результаті продемонстровано кореляцію між типом гуморального впливу, рівнем експресії естрогенового рецептора, а також рецептора епідермального фактора росту та інтенсивністю утворення пухлинних мікроагрегатів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Молочная железа: рак и предраковые состояния* / Под ред. В.И. Гарутинова. – Киев: Полиграфист, 2006. – 415 с.
2. Chatterji U., Riby J.E., Taniguchi T. et al. Indole-3-carbinol stimulates transcription of the interferon gamma receptor 1 gene and augments interferon responsiveness in human breast cancer cells // *Carcinogenesis*. – 2004. – 25, № 7. – P. 1119–1128.
3. Pestka S., Langer J.A., Zoon K.C., Samuel C.E. Interferons and their actions // *Annu Rev Biochem*. – 1987. – 56. – P. 727–777.
4. Jazieh A.R., Kyasa M.J., Hutchins L. Phase I clinical trial of tamoxifen and interferon alpha in the treatment of solid tumors // *J. Appl. Res.* – 2004. – 4, № 3. – P. 464–469.
5. Ning Y., Riggins R.B., Mulla J.E. et al. Interferon gamma restores breast cancer sensitivity to fulvestrant by regulating STAT1, IRF1, NFκB, BCL2 family members, and signaling to caspase-dependent apoptosis // *Mol. Cancer Ther.* – 2010. – 9, № 5. – P. 1274–1285.
6. Chavey C., Bibeau F., Gourgou-Bourgade S. et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content // *Breast Cancer Res.* – 2007. – 9, № 1. – R15.
7. Nishikawa H., Sacaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity // *Int. J. Cancer.* – 2010. – 127. – P. 759–767.
8. Erdman S.E., Potahidis T. Cancer inflammation and regulatory T cells // *Int. J. Cancer.* – 2010. – 127. – P. 768–779.
9. Walser T.C., Fulton A.M. The role of chemokines in

- the biology and therapy of breast cancer // *Breast Dis.* – 2004. – **20**. – P. 137–143.
10. *Cancer immunotherapy at the crossroads cytokine* / Ed. J.H. Finke, R.M. Bukowski. – New Jersey: Humana Press, 2004. – 386 p.
  11. Müller A., Homey B., Soto H. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis // *Nature.* – 2001. – **410**, № 6824. – P. 50–56.
  12. Joslin E.J., Lauffenburger D.A. Autocrine growth factor signaling in motility // *Cell Motility in Cancer Invasion and Metastasis* / Ed. A. Wells. – Springer, 2006. – P. 89–111.
  13. Dorsey R., Kundu N., Yang Q. et al. Immunotherapy with interleukin-10 depends on the CXC chemokines inducible protein-10 and monokine induced by IFN- $\gamma$  // *Cancer Res.* – 2002. – **62**, № 9. – P. 2606–2610.
  14. Holt D.M., Ma X., Kundu N. et al. Modulation of host natural killer cell functions in breast cancer via prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 // *J. Immunother.* – 2012. – **35**, № 2. – P. 179–188.
  15. Edwards D.P. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone // *J. Physiol.* – 2005. – **67**. – P. 335–376.
  16. Murphy L.C. Mechanisms of hormone independence in human breast cancer // *In vivo.* – 1998. – **12**, № 1. – P. 95–106.
  17. Suo Z., Risberg B., Karlsson M.G. et al. The expression of EGFR family ligands in breast carcinomas // *Int. J. Surg. Pathol.* – 2002. – **10**. – P. 91–99.
  18. Burova E., Vassilenko K., Dorosh V. et al. Interferon gamma-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor // *FEBS Lett.* – 2007. – **581**, № 7. – P. 1475–1480.
  19. Horvath C.M. The Jak-STAT pathway stimulated by interferon gamma // *Sci. STKE.* – 2004. – **2004**, № 260. – P. tr8.
  20. Kassi E., Moutsatsou P. Estrogen receptor signaling and its relationship to cytokines in systemic lupus erythematosus // *J. Biomed. Biootechnol.* – 2010. – **2010**. – P. 1–14.
  21. Paul G., Marchelletta R.R., McCole D.F., Barrett K.E. Interferon- $\gamma$  alters downstream signaling originating from epidermal growth factor receptor in intestinal epithelial cells: functional consequences for ion transport // *J. Biol. Chem.* – 2012. – **287**, № 3. – P. 2144–2155.
  22. Geisler J. Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2003. – **86**, № 3/5. – P. 245–253.
  23. Lewis-Wambi J.S., Jordan V.C. Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit // *Breast Cancer Res.* – 2009. – **11**, № 3. – P. 206.
  24. Schiff R., Osborne C.K. Endocrinology and hormone therapy in breast cancer : New insight into estrogen receptor- $\alpha$  function and its implication for endocrine therapy resistance in breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2005. – **7**. – P. 205–211.
  25. Diaz A., Batista A.E., Montero E. Interferon-alpha conditioned sensitivity to an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human lung cancer cell line with intermediate expression of the receptor // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2009. – **29**, № 8. – P. 433–440.
  26. Harada S., Koyanagi Y., Yamamoto N. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay // *Science.* – 1985. – **229**, № 4713. – P. 563–566.
  27. Kelm J.M., Timmins N.E., Brown C.J. et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types // *Biotechnol. Bioeng.* – 2003. – **83**, № 2. – P. 173–180.
  28. Garmanchouk L.V., Perepelytsina E.M., Sydorenko M.V. Formation of multicellular aggregates under different conditions of microenvironment // *Cytology and Genetics.* – 2010. – **44**, № 1. – P. 19–22.
  29. *Spheroid culture in cancer research* / Ed. R. Rolf. – Boca Raton : CRC Press, 1992. – 352 p.
  30. Hamburger A.W., Pinnamaneni G.D. Increased epidermal growth factor receptor gene expression by  $\gamma$ -interferon in human breast carcinoma cell line // *Brit. J. Cancer.* – 1991. – **64**. – P. 64–68.
  31. Owen J.L., Iragavarapu-Chryulu V., Lopez D.M. T cell-derived matrix metalloproteinase-9 in breast cancer: friend or foe // *Breast Dis.* – 2004. – **20**. – P. 145–153.
  32. *Cancer metastasis and the lymphovascular system: basic for rational therapy* / Ed. S.P.L. Leong. – Springer, 2007. – 309 p.
  33. Van Akkoi A.C.J., Bouwis M.G., van Geel A.N. et al. Morbidity and prognosis after therapeutic lymph node dissections for malignant melanoma // *Eur. J. Surg. Oncol.* – 2007. – **33**. – P. 102–108.
  34. Arya M., Ahmed H., Silhi N. et al. Clinical importance and therapeutic implications of the pivotal CXCL12-CXCR4 (chemokine ligand-receptor) interaction in cancer cell migration // *Tumor Biol.* – 2007. – **28**, № 3. – P. 123–131.

Поступила 16.04.13