

УДК 576

# Влияние TNF и VEGF на свойства эндотелиальных клеток Ea.hy926 в модели многоклеточных сфероидов

С. Ш. Гапизов<sup>1,2\*</sup>, Л. Е. Петровская<sup>1</sup>, Л. Н. Шингарова<sup>1</sup>, Е. В. Свирщевская<sup>1</sup>, Д. А. Долгих<sup>1,2</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: gsultan3@gmail.com

Поступила в редакцию 29.11.2017

Принята к печати 27.02.2018

**РЕФЕРАТ** Клетки эндотелия играют ключевую роль в развитии воспаления и неоангиогенеза при онкологических и хронических воспалительных заболеваниях. Клетки в составе 3D-культур наиболее приближены к условиям, в которых они находятся в органах и тканях человека при различных патологиях. Поэтому создание модели 3D-культур на основе эндотелиальных клеток линии Ea.hy926 является актуальной задачей клеточной биологии. Впервые показано, что культивирование клеток в статичных условиях на антиадгезивной подложке приводит к образованию сфероидов (3D-культур). Изучена экспрессия ICAM-1 и VEGFR-2, а также продукция цитокинов клетками Ea.hy926, культивируемыми в 2D- и 3D-условиях в присутствии TNF и VEGF. Методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии показано, что TNF как в 2D-, так и в 3D-культурах значительно усиливает экспрессию молекулы клеточной адгезии ICAM-1, но не влияет на уровень VEGFR-2. В спонтанных 3D-культурах наблюдалась повышенная продукция как провоспалительных (IL-8, IL-6, IP-10), так и противовоспалительных (IL-10, TGF- $\beta$  1–3) факторов по сравнению с 2D-условиями, что показано как методом проточной цитометрии, так и кПЦР. Под действием TNF в 3D-культурах секреция IL-10, GM-CSF и IL-6 повышается в 11, 4,7 и 1,6 раза соответственно по сравнению с 2D-культурами. Таким образом, использование 3D-культур клеток Ea.hy926 представляется перспективным для изучения эффектов противо- и провоспалительных агентов на клетки эндотелия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** молекула межклеточной адгезии, 2D- и 3D-культуры, рецептор фактора роста эндотелия сосудов-2, фактор некроза опухоли, эндотелиальные клетки.

**СОКРАЩЕНИЯ** 2D- и 3D-культуры – культивирование клеток на пластике и в объеме соответственно; кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция; ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии; IFN – интерферон гамма; IL – интерлейкин; TNF – фактор некроза опухоли альфа; VCAM-1 – молекула клеточной адгезии сосудов; VEGF A – фактор роста эндотелия сосудов; VEGFR-2 – рецептор фактора роста эндотелия сосудов.

## ВВЕДЕНИЕ

Рак и хронические воспалительные заболевания различных органов и тканей человека представляют серьезную медицинскую и социальную проблему. Показано, что ключевую роль в развитии и поддержании воспаления при таких заболеваниях, как ревматоидный артрит, псориаз, болезнь Крона и других, играет фактор некроза опухоли альфа (TNF) [1, 2]. Как воспалительный процесс, так и опухолевый рост сопровождаются гипоксией тканей, что приводит к образованию новых кровеносных сосудов под дей-

ствием фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), секретируемого клетками эпителия в условиях гипоксии [3, 4]. Известно, что в сосудах опухоли значительно повышен уровень экспрессии интегрин  $\alpha\beta_3$  клетками эндотелия [5]. Показано, что TNF и VEGF стимулируют экспрессию молекул адгезии и воспаления на клетках эндотелия, в частности, ICAM-1 и VCAM-1, рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR-2), PECAM-1, P- и E-селектинов, выход фактора Виллебранда из телец Вейбла – Паладе, а также усиливают секрецию цитокинов

IL-6, IL-8, фактора хемотаксиса моноцитов 1 (MCP-1) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) [6–11]. Изменение экспрессии поверхностных белков эндотелия обеспечивает торможение лейкоцитов в участках воспаления, их адгезию и трансэндотелиальную миграцию [12]. Ответ *in vitro* соответствует процессам, происходящим *in vivo* под действием провоспалительных стимулов, что позволяет использовать культуру клеток эндотелия для моделирования процессов воспаления в целом организме.

Использование терапевтических средств, направленных на подавление роста сосудов, частично тормозит патологический процесс. В частности, разработаны и применяются в клинике антитела к VEGF (Бевацизумаб) и низкомолекулярный ингибитор VEGF (Афлиберцепт), антитела к TNF (Адалimumаб, Инфликсимаб и Этанерцепт), ряд антител к интегринам, таких, как Ведолизумаб и антитела к  $\alpha\beta 7$ -интегрину [13–15]. На стадии клинических испытаний находятся ингибитор  $\alpha\beta 3$ -интегрин Циденгитид, антитела Этарацизумаб и другие препараты [16–18]. Недостатком низкомолекулярных препаратов является достаточно быстро формирующаяся у больного резистентность к ним [19]. Антитела также обладают рядом недостатков, в частности, высокая стоимость производства рекомбинантных гуманизированных антител ограничивает число больных, которым доступен такой вид терапии. С другой стороны, антитела имеют большую молекулярную массу, препятствующую глубокому проникновению в ткани [19, 20].

Разработка аналогов антител и создание иммунokonъюгатов с противоопухолевыми препаратами и/или ингибиторами роста сосудов на их основе позволяют усовершенствовать терапию онкологических и хронических воспалительных заболеваний, а также расширить круг больных, получающих адекватную терапию [19]. Для первичного скрининга новых препаратов требуется клеточная модель *in vitro*, свойства которой максимально приближены к условиям *in vivo*. В настоящее время взаимодействие противовоспалительных препаратов с эндотелиальными клетками анализируют с использованием первичных культур, полученных из пуповинной вены здоровых доноров (HUVES, human umbilical vein endothelial cells) или гибридную линию Ea.hy926 [21–23]. Предпочтительным является использование стабильной линии, так как функциональные характеристики HUVES могут зависеть от качества выделения клеток и от донора; кроме того, донорские клетки не всегда доступны, а количество пассажей первичных клеток ограничено [24]. Функциональные характеристики HUVES и Ea.hy926 во многом совпадают, в частности, оба типа клеток отвечают измене-

нием экспрессии молекул адгезии и продукцией IL-6 и IL-8 под действием TNF [25–27].

В организме мелкие сосуды и капилляры состоят преимущественно из эндотелиоцитов; в более крупных сосудах стенка формируется эндотелиальными клетками, соединительной тканью и гладкими мышцами. Монокультура эндотелиальных клеток во многом моделирует структуру капилляров, при этом использование многоклеточных сфероидов эндотелиальных клеток позволяет изучить эффекты различных препаратов не только на эндотелиальные клетки, но и на их ассоциаты с соединительным матриксом, формируемым в 3D-культурах [28–31]. Ранее предпринимались попытки получения 3D-культур эндотелиальных клеток методом клиностагирования [32–35]. Этот метод основан на вращении культуры клеток в гравитационном поле, что приводит к формированию сфероидов на поверхности монослойной культуры. Целью данной работы была разработка статичной модели 3D-культур эндотелиальных клеток линии Ea.hy926 и сравнительное изучение ответа на TNF и VEGF в 2D- и 3D-культурах.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирм Bio-Rad (США), Sigma (США), Merck (США), Panreac (Испания), «ПанЭко» (Россия). Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ. Использовали рекомбинантные белки TNF (получен в лаборатории инженерии белка ИБХ РАН) и VEGFA165 (Protein Synthesis, Россия).

#### Клеточные культуры

В работе использовали клеточную линию человека Ea.hy926 эндотелиального происхождения (ATCC, CRL-2922), предоставленную А.А. Соколовской (НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН) с разрешения Dr. C.-J. Edgell (University of North Carolina). Клетки инкубировали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% инактивированной бычьей фетальной сыворотки (HyClon, США), 50 мгк/мл сульфата гентамицина и 2 мМ L-глутамин («ПанЭко»). Для формирования трехмерных культур поверхность лунок 24-луночного планшета (Costar) покрывали поли-2-гидроксиэтилметакрилатом (pHEMA) (Sigma). В каждую лунку высевали по  $500 \times 10^3$  клеток в 1 мл ростовой среды. Клетки культивировали в стандартных условиях в  $CO_2$ -инкубаторе в течение 48 ч до формирования конфлюэнтного монослоя (2D-культуры) или сфероидов (3D-культуры).

#### Конфокальная микроскопия

Для анализа экспрессии молекул поверхностной адгезии на 2D-культурах эндотелиальных кле-

ток в шестилуночные планшеты вкладывали стерильные покровные стекла, на которые наносили  $100 \times 10^3$  клеток в 200 мкл среды и инкубировали в течение 16 ч в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в стандартных условиях для получения конфлюэнтного монослоя. Для анализа 3D-культур клеток Ea.hy926 сфероиды пипетировали и переносили в лунки 96-луночного планшета. Рекомбинантные белки TNF или VEGFA добавляли в культуру в концентрации 25 нг/мл и инкубировали в течение 5 ч. Клетки окрашивали с использованием моноклональных антител мыши к ICAM-1 человека (CD56) и VEGFR-2 (Flk-1), а также вторичные антитела к IgG мыши, меченные CFL488 (Santa Cruz Biotechnology, США) или Alexa Fluor 555 (Invitrogen, США). Антитела добавляли в концентрации 0.2 мкг/мл на 1 ч. Клетки инкубировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при вращении 40 об/мин. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (Sigma). По окончании инкубации 2D- и 3D-культуры фиксировали 1% параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре и промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ). После фиксации клетки отмывали от первичных антител и инкубировали с вторичными антителами в ФСБ (разведение 1 : 1000) в течение 40 мин при 37°C. После отмывки клетки полимеризовали при помощи среды Mowiol 4.88 (Calbiochem, Германия) на предметных стеклах и оставляли на ночь при комнатной температуре. Изображения получали и анализировали с помощью конфокального микроскопа Nikon Eclipse TE2000-E (Япония).

### Проточная цитофлуориметрия

Экспрессию поверхностных молекул ICAM-1 и VEGFR-2 во всех образцах оценивали с помо-

щью проточного цитофлуориметра FACScan (BD, США). Для получения суспензии клетки из 2D- и 3D-культур обрабатывали раствором трипсин/EDTA («ПанЭко»), отмывали в ФСБ с 1% бычьим сывороточным альбумином и 0.05%  $\text{NaN}_3$  (ФСБА), добавляли антитела соответствующей специфичности и инкубировали в течение 60 мин при 4°C в темноте. После отмывки клетки окрашивали вторичными флуоресцентно мечеными антителами (60 мин, 4°C в темноте). Перед анализом в образцы добавляли пропидий йодид (0.5 мкг/мл) для дифференциального окрашивания мертвых клеток. В каждой пробе анализировали 10000 клеток. Результаты обрабатывали в программе WinMDI 2.9.

### Продукция гуморальных факторов

Продукцию цитокинов и хемокинов клетками Ea.hy926, культивируемыми в 2D- и 3D-условиях, анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием микрочастиц по протоколу производителя (BioRad, США) на приборе FACS Calibur (BD, США).

### Количественная ПЦР (кПЦР)

Суммарную мРНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) и очищали от примеси ДНК обработкой ДНКазой I (Fermentas, США). Синтез кДНК проводили с использованием набора First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, США). Концентрацию мРНК и кДНК определяли с помощью прибора NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени (кПЦР) со специфическими праймерами (табл. 1) [36] и смесью qPCRmix-HS SYBR («Евроген»,

Таблица 1. Праймеры, использованные в кПЦР [36]

Ген	Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'	Размер ампликона, п.н.	$T_{пл}$ , °C
β-актин	BAf	TCATGTTTGAGACSTTCAACAC	512	55
	BAr	GTCTTTGCGGATGTCCACG		
GM-CSF	GMf	CTGCTGCTGAGATGAATGAAACAG	195	55
	GMr	GCACAGGAAGTTTCCGGGGT		
ICAM-1	ICAMf	ACCATGGAGCCAATTTCTC	590	51
	ICAMr	ACAATCCCTCTCGTCCAG		
IL-6	IL6d	GATGCAATAACCACCCCTGACCC	173	52
	IL6r	CAATCTGAGGTGCCCATGCTAC		
VEGFR-2	VEGFR2f	ATGCTCAGCAGGATGGCAA	320	53
	VEGFR2r	TTTGGTTCTGTCTTCCAAAGT		

Россия) на приборе Lightcycler 480 (Roche, США). Реакционная смесь включала 50 нг кДНК, праймеры (0.120 мкМ на образец), смесь qPCRmix-HS SYBR (5x) и воду MilliQ. Температуру отжига подбирали в соответствии с температурой плавления праймеров. Обработку результатов осуществляли последовательно в программах Convert Light-Cycler 480 и LineRegPCR. Экспрессию каждого гена анализировали в трех повторностях.

### Статистика

Полученные данные анализировали параметрическими методами с помощью программы Excel; для цитометрических данных использовали программу Cell Quest. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Экспрессия молекул адгезии клетками Ea.hy926 в 2D- и 3D-культурах

В норме клетки эндотелия, выстилающие сосуды, соединены между собой молекулами адгезии ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 и рядом других, связанных с молекулами актина, что обеспечивает быструю перестройку цитоскелета, необходимую для экстравазации лейкоцитов в ткани при воспалении [6]. В отличие от эндотелиальных клеток, эпителиальные клетки соединены более плотными кадгеринowymi контактами, которые связаны с кератиновыми филаментами цитоскелета. Эпителиальные клетки формируют 3D-культуры разной степени плотности, что зависит от количества кадгеринowych контактов [37]. Ранее не было попыток получить 3D-культуры эндотелиальных клеток, аналогичных культурам эпителиальных клеток. Клиностазированные культуры, в ряде статей называемые 3D-культурами, представляют собой монослойные культуры, выращиваемые при вращении в гравитационном поле [32–35]. При культивировании в течение 5–6 дней на поверхности монослоя появляются сфероиды, которые используют для анализа [33]. Однако при таком длительном культивировании нельзя оценить эффекты быстродействующих факторов, например TNF.

В данной работе клетки Ea.hy926 культивировали на антиадгезивной подложке рНЕМА, в результате чего в течение 18 ч формировались кластеры клеток размером 200–400 мкм, неразбиваемые при пипетировании (рис. 1Б), что подтверждает формирование межклеточных контактов по всей поверхности клетки. В 2D-культуре клетки формируют плотный монослой, в котором клетки образуют контакты только по периметру (рис. 1А). Конфокальный анализ

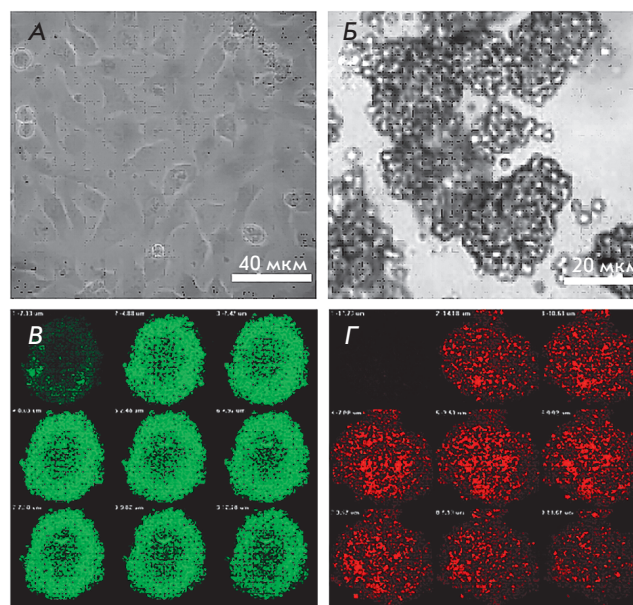
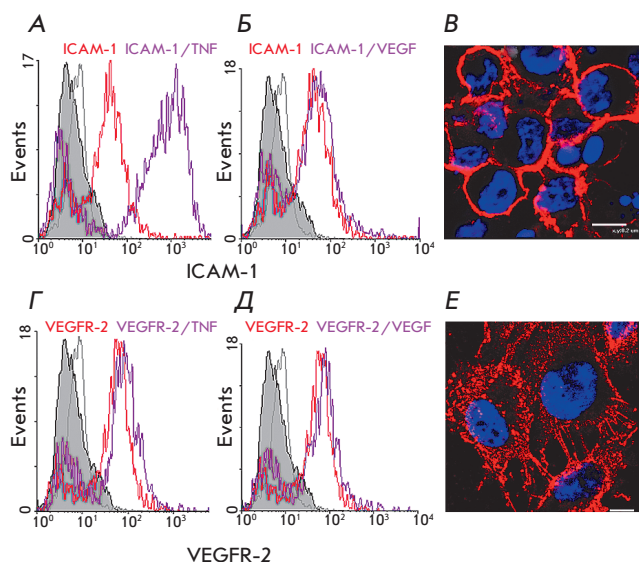


Рис. 1. Морфология клеток Ea.hy926 в 2D- и 3D-условиях культивирования. Клетки Ea.hy926 через 48 ч после переноса в планшет для клеточных культур (А) или в планшет с антиадгезивным покрытием рНЕМА (Б), световой микроскоп. Z-стеки 3D-культур, окрашенных антителами к ICAM-1 (В, зеленый) и VEGFR-2 (Г, красный), полученные методом конфокальной микроскопии

3D-культур выявил различный уровень экспрессии молекул адгезии в зависимости от расположения клеток в культуре. Так, в 3D-культурах Ea.hy926 уровень экспрессии ICAM-1 выше в клетках поверхностного слоя (рис. 1В), в то время как VEGFR-2 равномерно экспрессируется всеми клетками сфероиды (рис. 1Г). Снижение экспрессии молекул адгезии внутри сфероиды связано с формированием иерархии клеток. Наличие адгезионных контактов по всей поверхности клетки снижает экспрессию молекул адгезии – клетка находится в равновесном состоянии. На поверхности сфероиды клетки имеют контакт с нижним слоем и не имеют контактов на поверхности, что стимулирует экспрессию молекул адгезии и имитирует репарацию повреждения в эпителиальных тканях. VEGFR-2, в отличие от ICAM-1, экспрессируется равномерно по всему объему сфероиды. Таким образом, показано, что эндотелиальные клетки, подобно эпителиальным, способны формировать сфероиды с внутренней иерархией в статичных культурах.

Ранее в экспериментах с клиностазированными культурами Ea.hy926 выявили различия в экспрес-





**Рис. 2.** Анализ экспрессии ICAM-1 и VEGFR-2 на клетках линии Ea.hu926 под действием TNF и VEGFA методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии. А, Б, Г, Д – по оси абсцисс отложена средняя интенсивность флуоресценции, по оси ординат количество событий. Клетки Ea.hu926 выращивали в 2D-условиях до достижения монослоя, в течение последних 5 ч культивирования добавляли 25 нг/мл TNF (А и Г) или 25 нг/мл VEGF (Б и Д). Экспрессия клетками определенных белков отображается в виде пиков флуоресценции антител, связанных с белками. Пик, обозначенный сплошным серым цветом, – неокрашенные клетки; клетки со вторичными антителами – серая линия (отрицательный контроль); неактивированные клетки, окрашенные специфическими антителами, – красная линия; клетки, окрашенные специфическими антителами, после стимуляции факторами – фиолетовая линия. В и Е – репрезентативные конфокальные изображения клеток, окрашенных антителами к ICAM-1 (В, красный) и VEGFR-2 (Е, красный). Ядра клеток окрашены Hoechst 33342 (синий). Длина мерного отрезка – 5–8 мкм

сии молекул адгезии, а также в спонтанной и TNF-индуцированной продукции цитокинов, причем обнаружено как подавление [38], так и стимуляция продукции ряда белков [39]. Экспрессию молекул адгезии в статичных 2D- и 3D-культурах Ea.hu926 в ответ на активацию TNF и VEGF анализировали, используя предварительно подобранные условия активации клеток. Методом проточной цитометрии анализировали экспрессию ICAM-1, VEGFR-2, интегрин  $\alpha\upsilon\beta 3$  и VCAM-1 в 2D-культуре под действием TNF и VEGF как в ранних культурах (24 ч инкубации), так и в «старых» (72–96 ч инкубации). Кроме того, изучали динамику изменения экспрессии поверхностных молекул под действием факторов. Изменения экспрессии интегрин  $\alpha\upsilon\beta 3$  и VCAM-1 не наблюдали (данные не приведены). VEGF также не оказывал стимулирующего действия ни на одну из молекул адгезии. Соответственно в дальнейшем изучали эффект TNF. Установлено, что наиболее эффективно TNF действует на ранние культуры (18–24 ч), причем быстро и с максимумом через 2–10 ч после добавления TNF с последующим снижением до значений в контроле через 24–36 ч. Показано, что через 5 ч после добавления TNF экспрессия ICAM-1 на ранних культурах увеличивается в 13 раз, а экспрессия VEGFR-2 практически не меняется (рис. 2, табл. 2). На рис. 2 приведены полученные методом конфокальной микроскопии микрофотографии 2D-культур, окрашенных антителами к ICAM-1 и VEGFR-2 (рис. 2В,Е), показывающие характерную мембранную локализацию этих молекул.

Сравнительные данные по экспрессии ICAM-1 и VEGFR-2 под действием TNF и VEGF для 2D- и 3D-культур Ea.hu926 приведены на рис. 3. Показано, что в 3D-культурах формируется более гомогенный пул клеток. Так, в 2D-культурах 10–20% клеток не экспрессируют молекул адгезии (пик в зоне аутофлуоресценции), а в 3D-культурах

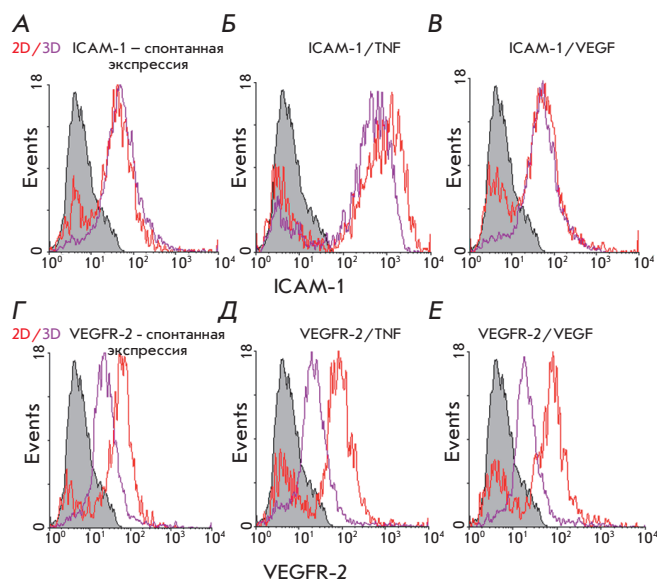
**Таблица 2.** Влияние TNF и VEGF на экспрессию ICAM-1 и VEGFR-2 на клетках Ea.hu926 в 2D- и 3D-культурах

Культура	Экспрессия	Контроль	TNF	p	VEGF	p
2D	ICAM-1	49 ± 11	<b>862 ± 148*</b>	< 0.001	57 ± 14	> 0.05
3D	ICAM-1	70 ± 15	<b>630 ± 93</b>	< 0.001	63 ± 14	> 0.05
2D	VEGFR-2	59 ± 11	71 ± 18	> 0.05	67 ± 16	> 0.05
3D	VEGFR-2	32 ± 8**	35 ± 8**	>0.05	28 ± 7**	> 0.05

Данные приведены в относительных единицах флуоресценции.

\*TNF и VEGF добавляли в концентрации 25 нг/мл в течение последних 5 ч инкубации. Экспрессию оценивали методом проточной цитометрии. Жирным шрифтом отмечен эффект статистически значимого повышения экспрессии под действием TNF по сравнению с контролем.

\*\*Статистически значимое снижение экспрессии VEGFR-2 в 3D по сравнению с 2D.



**Рис. 3.** Сравнение экспрессии ICAM-1 и VEGFR-2 на клетках линии Ea.h926, культивируемых в 2D- и 3D-условиях, под действием TNF и VEGFA методом проточной цитометрии. По оси абсцисс отложена средняя интенсивность флуоресценции, по оси ординат – количество событий. Клетки Ea.h926 выращивали в 2D- или 3D-условиях в течение 3 сут и окрашивали антителами к ICAM-1 (А–В) или VEGFR-2 (Г–Е). В культуры добавляли в течение последних 5 ч 25 нг/мл TNF (Б, Д) или 25 нг/мл VEGF (В, Е). Сплошным серым цветом показан пик аутофлуоресценции неокрашенных клеток, красной линией – 2D-культуры, окрашенные специфическими антителами, фиолетовой – 3D-культуры, окрашенные таким же образом

это значение значительно меньше (0–5%). В отличие от ICAM-1 спонтанная экспрессия VEGFR-2 в 3D-культурах снижается в 2 раза, несмотря на отсутствие первого пика (табл. 2, рис. 3Г). Во всех 3D-культурах экспрессия VEGFR-2 была статистически значимо ниже, чем в 2D-условиях культивирования, что показывает роль контактных взаимодействий в экспрессии VEGFR-2 клетками Ea.h926.

Экспрессия ICAM-1 как в 3D-, так и в 2D-культурах усиливалась под действием TNF, но повышение было менее выраженным, чем в 2D-культурах (в 7 и 11 раз соответственно). При этом появлялась негативная популяция, как и во всех 2D-культурах (рис. 3Б). VEGF не влиял на экспрессию молекул адгезии в 3D-культурах.

В целом влияние различных факторов на уровень экспрессии молекул адгезии в 3D-культурах было незначительным по сравнению с влиянием на 2D-культуры.

### Продукция цитокинов клетками Ea.h926 в 2D- и 3D-культурах

Один из показателей активации эндотелиальных клеток – продукция ими гуморальных факторов: цитокинов, хемокинов, ростовых факторов. Поскольку изменения уровня экспрессии молекул адгезии под действием VEGF не было обнаружено, продукцию цитокинов в 2D- и 3D-культурах анализировали только в присутствии TNF. Определяли продукцию 11 факторов, включая IL-2, -4, -6, -8, -10, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , трансформирующие факторы роста бета (TGF- $\beta$ ) 1–3 и хемокин IP-10. Обнаружено, что в отсутствие TNF клетки Ea.h926 продуцировали существенное количество только IL-8 (13.4 нг/мл) и TGF- $\beta$ 1 (7.5 нг/мл), причем продукция в 3D-культурах была значимо выше (в 2–3 раза) (рис. 4А,Б). Под действием TNF продукция IL-8 в 2D-культурах (19 нг/мл) возрастала до спонтанного уровня в 3D-культурах (22 нг/мл) и не изменялась в самих 3D-культурах (рис. 4В,Г). Обработка TNF приводила к продукции цитокинов, сравнимой в 2D и 3D-культурах, которая убывала в ряду IL-6 > IL-10 > IL-2 > IFN- $\gamma$  > IL-4 (рис. 4В,Г). Отношение спонтанной и индуцированной TNF продукции 3D/2D приведено на рис. 4Д,Е. Спонтанные 3D-культуры продуцировали статистически значимо больше (в 2–5 раз) IL-8, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  1–3, IP-10, при этом в них практически отсутствовали (ниже порога чувствительности метода в 2D-культурах) IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , GM-CSF (рис. 4Д). В TNF-стимулированных культурах основное различие заключалось в продукции GM-CSF и IL-10 (рис. 4Е). Секретция IL-10 3D-культурами увеличилась в 11 раз, GM-CSF в 4.7 раза, IL-6 в 1.6 раза по сравнению с 2D-культурами. В то же время в 3D-культурах уменьшилась секреция IL-4 в 2 раза, IFN- $\gamma$  в 1.4 раза, TGF- $\beta$ 2 и TGF- $\beta$ 3 в 1.6 раза по сравнению с 2D-культурами (рис. 4Е).

### Сравнение синтеза мРНК и белков клетками Ea.h926 в 2D- и 3D-культурах

Анализ ранних событий в культурах Ea.h926 после активации TNF оценивали по экспрессии генов ICAM-1, VEGFR-2, GM-CSF и IL-6 с помощью кПЦР. Данные по кПЦР нормированы по экспрессии мРНК актина и приведены в виде значений относительной экспрессии генов (ОЭГ), которая подсчитана по формуле  $OЭГ = 2^{-ddCt}$  [40]. Использование этого метода позволяет оценить, во сколько раз изменилось количество копий гена в 2D- и 3D-культурах, активированных TNF, по сравнению с контролем (рис. 5А). Можно также сравнить экспрессию гена в 3D- и 2D-условиях в присутствии TNF и без него (рис. 5В). На рис. 5 приведены результаты сравнения экспрессии VEGFR-2 и ICAM-1 в культурах

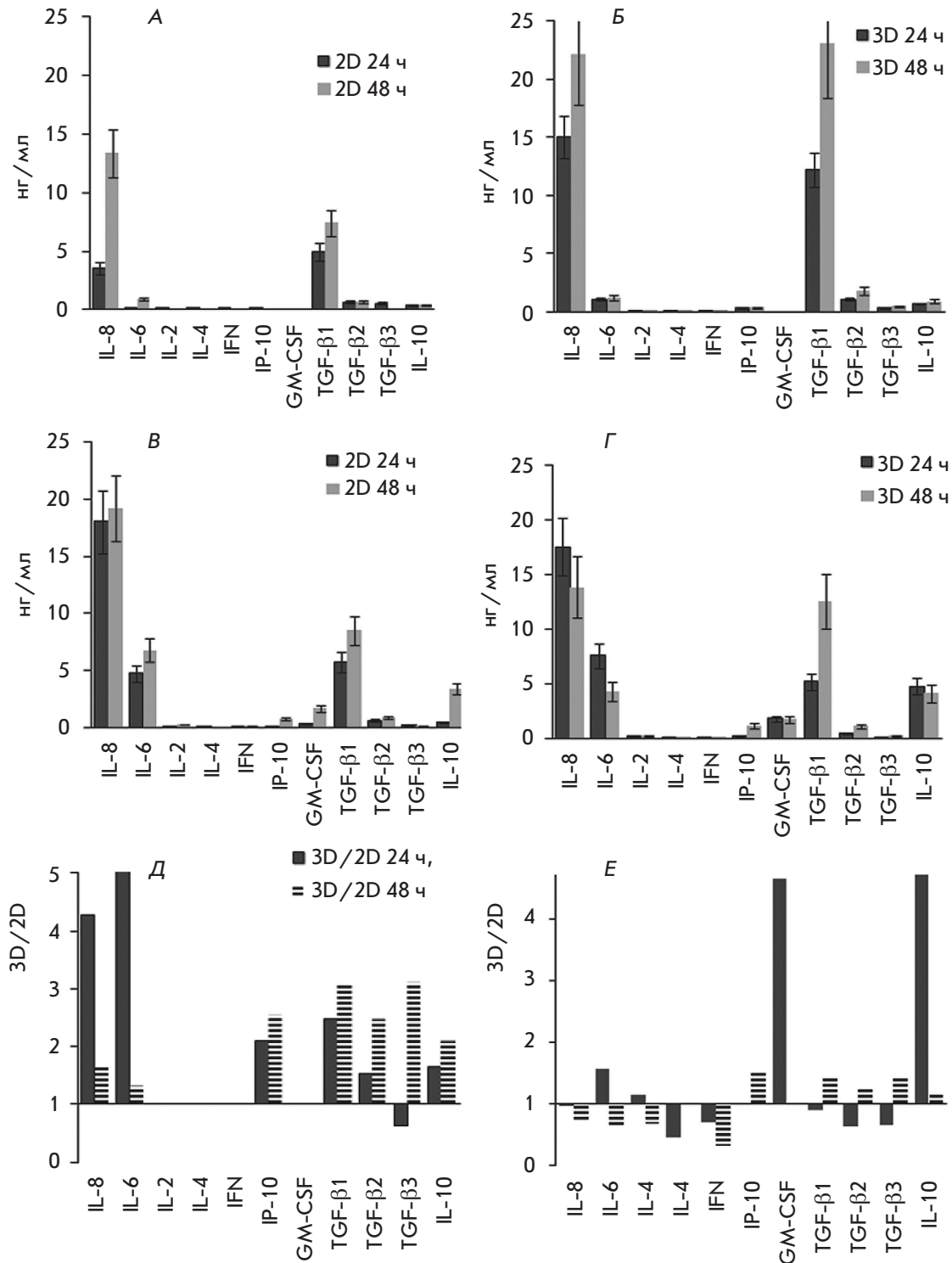
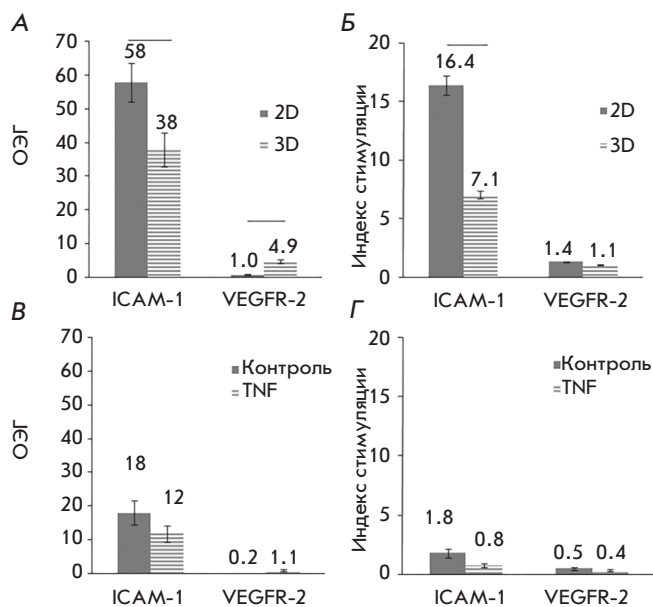
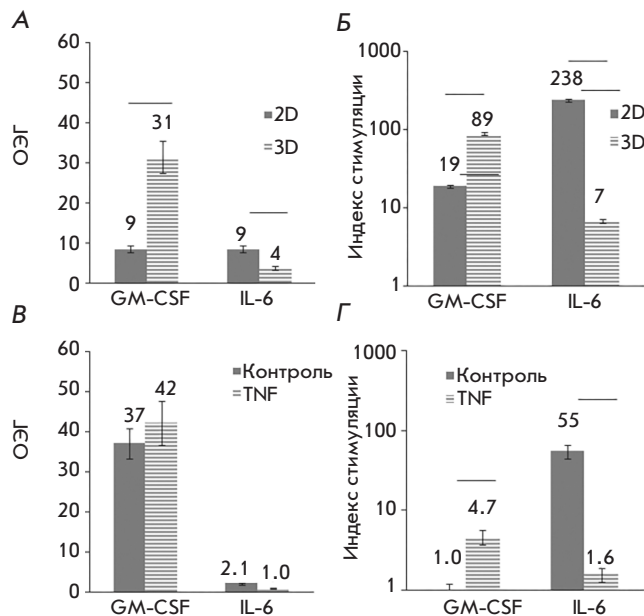


Рис. 4. Продукция гуморальных факторов клетками Ea.hy926, культивируемых в 2D- и 3D-условиях. Клетки Ea.hy926 культивировали в 24-луночных планшетах до достижения адгезии или на антиадгезивной подложке для формирования 3D-культур, после этого в среду добавляли 25 нг/мл TNF. Супернатанты собирали через 24 и 48 ч после добавления TNF. Продукция растворимых факторов в 2D- (А и В) или в 3D- (Б и Г) культурах без активации (А и Б) и после активации TNF (В и Г). Отношение концентрации факторов в культурах 3D/2D без стимуляции (Д), после добавления TNF (Е). Концентрацию определяли методом проточной цитометрии с использованием микрочастиц по протоколу производителя (BioRad) с использованием калибровочных кривых



**Рис. 5.** Анализ экспрессии VEGFR-2 и ICAM-1 в культурах клеток Ea.hu926 без добавления и после добавления TNF методами кПЦР и проточной цитометрии. Клетки Ea.hu926 выращивали в 2D- (А и Б) и 3D- (В и Г) условиях в течение 18 ч для формирования монослоя или сфероидов, после чего добавляли 25 нг /мл TNF. Через 5 ч часть культур использовали для получения мРНК, синтеза кДНК и кПЦР (А и В). Параллельные культуры инкубировали в течение 36 ч и анализировали методом проточной цитометрии после окрашивания антителами к VEGFR-2 и ICAM-1 (Б и Г). Статистически значимая разница (< 0.05) обозначена планками. Данные представлены в виде относительной экспрессии генов (ОЭГ) (А и В). ОЭГ подсчитывали по формуле  $OЭГ = 2^{-ddCt}$  [40], где сравнивали 2D-культуры с TNF против контроля без TNF и 3D-культуры с TNF против контроля без TNF (А). Таким же образом сравнивали 3D с 2D в присутствии TNF и без него (В). Цитометрические данные представлены как отношение MFI в культуре с TNF к контролю без TNF (Б) или в 3D-культуре к 2D-культуре (Г)

клеток Ea.hu926 без стимуляции и после стимуляции TNF в течение 5 ч методами кПЦР (рис. 5А,В) и проточной цитометрии (рис. 5Б,Г). Под действием TNF значительно повышался синтез мРНК ICAM-1 как в 2D-, так и в 3D-культурах (рис. 5А), что коррелировало с данными проточной цитометрии (рис. 5Б). Эффект TNF был ниже в 3D-культурах. Что касается экспрессии VEGFR-2, то по данным кПЦР она усиливалась, незначительно, но достоверно (рис. 5В), при этом уровень белка, оцененный цитометриче-



**Рис. 6.** Анализ продукции GM-CSF и IL-6 в культурах клеток Ea.hu926 без добавления и после добавления TNF методами кПЦР и проточной цитометрии. Культивирование и анализ результатов такие же, как в рис. 5

ским методом, не менялся. Различие данных может быть связано с неоптимальными условиями проведения кПЦР (различная длина праймеров, табл. 1). В любом случае влияние TNF на экспрессию гена ICAM-1 было существенно большим, чем на VEGFR-2.

Аналогичным образом анализировали экспрессию генов GM-CSF и IL-6. РНК выделяли через 5 ч после добавления TNF. Для анализа синтеза белков использовали параллельные культуры, надосадов собирали через 30 ч после активации TNF.

На рис. 6 приведены результаты определения уровня спонтанного и TNF-индуцированного синтеза мРНК и продукции белков GM-CSF и IL-6. Под действием TNF усиливался как синтез мРНК, так и продукция обоих белков. Стимуляция GM-CSF была более выражена в 3D-, а IL-6 – в 2D-культурах (рис. 6А,Б). Сравнение эффективности синтеза мРНК и белков в 2D- и 3D-культурах не выявило различий в уровне экспрессии генов (рис. 6В). Спонтанная продукция GM-CSF была одинаковой в 2D- и 3D-условиях, тогда как в 3D-культурах продукция IL-6 была значительно выше. При стимуляции TNF различия снижались, и в 3D-культурах наблюдалась большая продукция как GM-CSF, так и IL-6 (рис. 6Г).



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые показано, что культивирование клеток эндотелиального типа Ea.hu926 возможно в статических условиях на антиадгезивной подложке. В спонтанных культурах Ea.hu926 в 3D-условиях продукция как провоспалительных, так и противовоспалительных факторов повышена по сравнению с 2D-условиями, что позволяет проводить более детальный анализ при тестировании новых терапевтических агентов. Активация TNF сходным образом влияет на клетки Ea.hu926, культивируемые в 2D-или 3D-условиях, за исключением усиления в 4–5 раз продукции GM-CSF и IL-10 в 3D-культурах. Наиболее характерными маркерами клеток Ea.hu926 являются молекула адгезии ICAM-1 и растворимые факторы IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ 1, IL-10. 3D-культуры удобны для манипуляций, их можно переносить в новые планшеты, например 96-луночные, что позволяет изучать панель препаратов в разных разведении-

ях. Для анализа методом конфокальной микроскопии не требуется выращивания клеток на предметных стеклах. Все это делает 3D-культуру клеток Ea.hu926 удобной для скрининга новых противовоспалительных и ангиостатических препаратов. ●

*Авторы выражают благодарность сотруднице лаборатории структуры и функций генов человека ИБХ РАН С.А. Кондратьевой за помощь в обработке данных кПЦР.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-8384.2016.4 и гранта по программе «УМНИК» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Astrakhantseva I.V., Efimov G.A., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. // *Biochemistry*. 2014. V. 79. № 12. P. 1308–1321.
- Petrovskaya L.E., Shingarova L.N., Kryukova E.A., Boldyreva E.F., Yakimov S.A., Guryanova S.V., Novoseletsky V.N., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Biochemistry*. 2012. V. 77. № 1. P. 79–89.
- Arjamaa O., Aaltonen V., Piippo N., Csont T., Petrovski G., Kaarniranta K., Kauppinen A. // *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2017. Doi: 10.1007/s00417-017-3711-0
- Song H., Kim Y., Cho H., Kim S., Kang M., Kim J., Min H., Kang J., Yoon J., Kim C. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2017. Doi: 10.1165/rcmb.2016-00800C
- Bauer K., Mierke C., Behrens J. // *Int. J. Cancer*. 2007. V. 121. № 9. P. 1910–1918.
- Pober J.S., Sessa W.C. // *Nat. Rev. Immunol.* 2007. V. 7. P. 803–815.
- Bouis D., Hospers G.A., Meijer C., Molema G., Mulder N.H. // *Angiogenesis*. 2001. V. 4. № 2. P. 91–102.
- Cervenak L., Morbidelli L., Donati D., Donnini S., Kambayashi T., Wilson J.L., Axelson H., Castañón-Velez E., Ljunggren H.G., Malefyt R.D. // *Blood*. 2000. V. 96. № 7. P. 2568–2573.
- Meager A. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999. V. 10. № 1. P. 27–39.
- Galley H.F., Blaylock M.G., Dubbels A.M., Webster N.R. // *Cell Biol. Internat.* 2000. V. 24. № 2. P. 91–99.
- Melder R.J., Koenig G.C., Witwer B.P., Safabakhsh N., Munn L.L., Jain R.K. // *Nat. Med.* 1996. V. 2. № 9. P. 992–997.
- Madri J.A., Graesser D., Haas T. // *Biochem. Cell Biol.* 1996. V. 74. № 6. P. 749–757.
- Moens S., Goveia J., Stapor P., Cantelmo A., Carmeliet P. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014. V. 25. № 4. P. 473–482.
- Komaki Y., Yamada A., Komaki F., Kudravalli P., Micic D., Ido A., Sakuraba A. // *J. Autoimmunity*. 2017. V. 79. P. 4–16.
- Bergqvist V., Hertervig E., Gedeon P., Kopljär M., Griph H., Kinhult S., Carneiro A., Marsal J. // *Cancer Immunol. Immunotherapy*. 2017. V. 66. № 5. P. 581–592.
- Manegold C., Vansteenkiste J., Cardenal F., Schuette W., Woll P., Ulsperger E., Kerber A., Eckmayr J., von Pawel J. // *Invest. New Drugs*. 2013. V. 31. № 1. P. 175–182.
- Hersey P., Sosman J., O'Day S., Richards J., Bedikian A., Gonzalez R., Sharfman W., Weber R., Logan T., Buzoianu M., et al. // *Cancer*. 2010. V. 116. № 6. P. 1526–1534.
- Liu Y., Goswami R., Liu C., Sinha S. // *Mol. Pharm.* 2015. V. 12. № 7. P. 2544–2550.
- Deyev S., Lebedenko E., Petrovskaya L., Dolgikh D., Gabibov A., Kirpichnikov M. // *Russ. Chem. Rev.* 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.
- Gebauer M., Skerra A. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009. V. 13. № 3. P. 245–255.
- Oost B.A., Edgell C.-J.S., Hay C.W., MacGillivray R.T.-A. // *Biochem. Cell. Biol.* 1986. V. 64. № 7. P. 699–705.
- Edgell C.-J., McDonald C.C., Graham J.B. // *Cell Biology*. 1983. V. 80. № 12. P. 3734–3737.
- Bauer J., Marcolis M., Schreiner C., Edgell C.-J., Azizkhan J., Lazarowski E., Juliano R.L. // *J. Cell. Physiol.* 1992. V. 153. № 3. P. 437–449.
- Heiss M., Hellstrom M., Kalen M., May T., Weber H., Hecker M., Augustin H., Korff T. // *FASEB J.* 2015. V. 29. № 7. P. 3076–3084.
- Щегловитова О.Н., Склянкина Н.Н., Болдырева Н.В., Бабаянц А.А., Фролова И.С., Капкаева М.Р. // *Вест. РАМН*. 2014. V. 3. № 4. P. 31–35.
- Riesbeck K., Billström A., Tordsson J., Brodin T., Kristensson K., Dohlsten M. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998. V. 5. № 5. P. 675–682.
- Chao C., Lii C., Tsai I., Li C., Liu K., Tsai C., Chen H. // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 5263–5271.
- Hirschhaeuser F., Menne H., Dittfeld C., West J., Mueller-Klieser W., Kunz-Schughart L. // *J. Biotechnol.* 2010. V. 148. P. 3–15.
- Fennema E., Rivron N., Rouwkema J., Blitterswijk C., Boer J. // *Trends Biotechnol.* 2013. V. 31. № 2. P. 108–115.
- Page H., Flood P., Reynaud E.G. // *Cell Tissue Res.* 2013. V. 352. P. 123–131.

31. Breslin S., O'Driscoll L. // *Drug Discovery Today*. 2013. V. 18. № 5–6. P. 240–249.
32. Ma X., Sickmann A., Pietsch J., Wildgruber R., Weber G., Infanger M., Bauer J., Grimm D. // *Proteomics*. 2014. V. 14. № 6. P. 689–698.
33. Ma X., Wehland M., Schulz H., Saar K., Hübner N., Infanger M., Bauer J., Grimm D. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 5. P. 1–10.
34. Sokolovskaya A.A., Ignashkova T.I., Bochenkova A.V., Moskovtsev A.A., Baranov V.M., Kubatiev A.A. // *Acta Astronautica*. 2014. V. 99. P. 16–23.
35. Grimm D., Bauer J., Ulbrich C., Westphal K., Wehland M., Infanger M., Aleshcheva G., Pietsch J., Ghardi M., Beck M., et al. // *Tissue Engineering: Part A*. 2010. V. 16. № 5. P. 1559–1573.
36. Unger R.E., Krump-Konvalinkova V., Peters K., Kirkpatrick C.J. // *Microvascular Res*. 2002. V. 64. P. 384–397.
37. Kim J.B. // *Semin. Cancer Biol*. 2005. V. 15. № 5. P. 365–377.
38. Griffoni C., Di Molfetta S., Fantozzi L., Zanetti C., Pippia P., Tomasi V., Spisni E. // *J. Cell Biochem*. 2011. V. 112. № 1. P. 265–272.
39. Sanchez-Bustamante C., Kelm J-M., Mitta B., Fussenegger M. // *Biotechnol. Bioeng*. 2006. V. 93. № 1. P. 169–180.
40. Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.