

Создание сфероидов из солидных опухолей человека для оценки продукции про-/противовоспалительных цитокинов

Научный руководитель – Данилова Анна Борисовна

Просекина Елизавета Андреевна

Студент (магистр)

Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет,
Санкт-Петербург, Россия

E-mail: elizaveta.prosekina@gmail.com

3D-модели сохраняют важнейшие характеристики опухолей, такие как структура, рецепторный состав, секреция растворимых веществ - цитокинов и хемокинов, которые способствуют привлечению клеток иммунной системы из периферической крови в опухолевый очаг, развитию воспаления. Повышенная секреция подобных факторов опухолевыми клетками коррелирует с плохим прогнозом лечения и подавлением специфического противоопухолевого иммунного ответа [1]. Таким образом, возникает потребность в создании трёхмерных моделей для исследования продукции про-/противоопухолевых факторов, способных вызывать мобилизацию клеток иммунной системы, их анергию, а также изменять характеристики опухолевых клеток, увеличивая пролиферативные и инвазивные свойства.

Цель исследования: Произвести сравнительную оценку продукции иммуносупрессивных цитокинов и хемокинов клетками солидных опухолей, культивируемых в 2D- и 3D-системах.

Материалы и методы: В исследовании были использованы 18 культур опухолевых клеток: меланомы кожи (8), рака легкого (1), рака почки (1), рака молочной железы (2), рака толстой кишки (1), леймиосаркомы (1), остеосаркомы (1), миксофибросаркомы (2), рабдомиосаркомы (1), полученные из операционного материала пациентов и криоконсервированные в биобанке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Клетки культивировали в монослое (2D-формат) и в виде сфероидов (3D-формат), полученных методом «висячей капли» в стандартных условиях. Забор кондиционированной среды осуществлялся через 7 дней. Уровень продуцируемых цитокинов (IL-10, MIF) и хемокинов (MIP-1a/CCL3, SCYB16/CXCL16) определяли с помощью мультиплексного анализатора Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, США). MICA выявляли методом ИФА в «сэндвич»-варианте с использованием набора DuoSet ELISA Kit (R&D Systems, США). Было проанализировано 18 образцов супернатантов для 2D-культур и 18 образцов для сфероидов. Для анализа использовали критерий Уилкоксона для связанных выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Систематизацию, статистический анализ и визуализацию данных проводили с помощью R v. 3.6.2.

Результаты: Концентрация исследуемых цитокинов и хемокинов в супернатантах опухолевых клеток зависела от гистотипа культуры и увеличивалась после культивирования в 3D-формате во всех случаях. Наблюдали статистически значимое увеличение продукции IL-10 в 3D культуре по сравнению с монослоем: медиана 116,71 (7,70-649,19) пг/мл и 17,32 (минимум 1,42 - максимум 107,39) пг/мл; $p=0,00006$, соответственно. Показано статистически значимое различие концентрации хемокина CCL3: 1,82 (0,11-20,24) пг/мл по сравнению с 3,88 (1,10-1230,28) пг/мл в монослое и опухолях, соответственно ($p=0,00427$). Секреция MIF также статистически значимо изменялась в зависимости от условий культивирования: 33,54 (3,084 - 82,662) пг/мл в 2D культурах до 62,053 (37,649-175,306) пг/мл

в сфероидах ($p=0,00855$). Опухолевые клетки, растущие в монослойной культуре, продуцировали меньше CXCL16: (2,55 (0,14-374,17) пг/мл по сравнению со сфероидами: 9,04 (2,0-408,62) пг/мл; $p=0,00427$. Наблюдали статистически значимое увеличение продукции MICA в 3D культуре: 363,56 (57,68-3537,50) пг/мл по сравнению с монослоем: 90,20 (15,63-1818,50) пг/мл; $p=0,000008$.

Выводы: Созданы индивидуальные трехмерные модели из клеток солидных опухолей пациентов, в которых воспроизведены ключевые характеристики опухолевого микроокружения. Показано, что в 3D-формате опухолевые клетки характеризуются более выраженной секреторной активностью в отношении целого спектра иммуносупрессивных факторов и факторов, обеспечивающих их подвижность.

Источники и литература

- 1) Noy R., Pollard J.W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy // Immunity. 2014. V. 41. № 1. P. 49–61.