

УДК 577.3

МОДЕЛЮВАННЯ АНГІОГЕНЕЗУ *IN VITRO* З ВИКОРИСТАННЯМ 3D-КУЛЬТУР ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН

Гарманчук Л.В.

ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка
e-mail: liudmylagarmanchuk@rambler.ru

Надійшла до редакції 28.02.2010

Для дослідження механізмів диференціювання ендотеліоцитів, які є основною клітинною мішенню, що залучається в пухлинний ангіогенез, було порівняно дві моделі росту клітин: 2D- та 3D-вимірні культури. Для цього використовували клітинну лінію ендотелію МАЕС. Генерацію сфероїдів проводили з використанням КМ-целюлози. Для ініціації диференціювання до клітин додавали 1 нг/мл VEGF, 1 нг/мл ВВЕ, 5 нг/мл ФМА та поміщали на субстрат, покритий агарозним гелем (0,5%) з додаванням 0,02% фібринектину. Порівнювали площу міграції клітин із сфероїдів в терміни інкубації від 1 до 15 діб. Було показано, що площа мігруючих клітин із сфероїдів збільшується рівномірно по периметру радіально від краю сфероїда до периферії зони мігруючих клітин та залежить від терміну інкубації ендотеліоцитів. Для 2D-росту клітин закономірностей направленої міграції та формування прокапілярних структур не відмічено.

Ключові слова: ендотеліальні клітини, 2D- та 3D-вимірні культури.

ВСТУП

Раніше нами з використанням лінії ендотеліальних клітин миші МАЕС було розроблено експериментальну модель в системі *in vitro* для проведення скринінгу прота антиангіогенних чинників по відношенню до різних фаз ангіогенезу, що включає:

- дослідження мітогенного ефекту проангіогенних факторів росту (EGF, VEGF); для цього клітини культивували до досягнення повного конфлюенту (стаціонарна фаза росту клітинної популяції) та за відсутності сироваткових факторів в середовищі інкубації [1];

- визначення прямого цитотоксичного ефекту по відношенню до активно проліферуючих ендотеліальних клітин – використовували клітини за експоненційного росту [2];

- дослідження електрокінетичного та метастатичного потенціалу ендотеліальних клітин [3].

З даних літератури відомо, що для моделювання ангіогенезу *in vitro* існують так звані 2-хвимірні культури ендотеліоцитів, за яких клітини культивують на штучних адгезивних матриксах таких як фібронектин, колаген IV типу, желатин. З використанням таких штучних матриксів було показано регуляцію утворення прокапілярних структур [4, 5]. Результати отримані з використанням Матригелей та колагенових гелей демонструють формування не лише прокапілярних структур, а й здатність виконання механічної функції ендотеліальними клітинами [6-9]. За умов довготривалого культивування ендотеліальних клітин досліджується роль прота антиангіогенних чинників, а також вплив співкультивування ендотеліальних клітин з перицитами, що сприяють формуванню прокапілярних структур [10, 11]. В той же

час, використання моделей для короткострокового культивування ендотеліальних клітин вимагає субконфлюенту для формування прокапілярних структур. Тому, за таких умов проліферація та міграція клітин з метою формування структур обмежена відсутністю певних чинників паракринної регуляції в середовищі мікрооточення. Деякі із адгезивних матриць, зокрема желатинова не має достатньої протеолітичної активності з тим, щоб формувались прокапілярні структури. Також важливим чинником може бути наявність/відсутність певного відсотку сироватки в середовищі культивування ендотеліальних клітин, що може також бути лімітуючим фактором при формуванні прокапілярних структур [11]. Таким чином, двухвимірні моделі відіграють певну роль для розуміння позаклітинного матриксу для судинного морфогенезу, однак не відображають адекватно всі етапи фізіологічного ангіогенезу. Однак, більш вагоме значення у дослідженні ангіогенезу *in vitro* на сьогодні мають так звані трьохвимірні моделі, які ґрунтуються на здатності активувати ендотеліальні клітини вбудовуватись в трьохвимірні підложки [12]. Трьохвимірна матриця може складатись з колагенового гелю, згустка плазми, очищеного фібрину, Матригелю або суміші цих компонентів. Для активації диференціювання також використовуються цитокіни, які сприяють міграції та вбудовуванню ендотеліальних клітин в трьохвимірні структури позаклітинних матриксів [13]. При впливі факторів мікрооточення, що сприяють ангіогенезу в таких трьохвимірних структурах можна досліджувати ефективність ангіогенезу за кількістю та довжиною утворених структур.

Нами, при дослідженні впливу VEGF на клітини в стаціонарній фазі росту через 96 годин інкубації було зафіксовано формування прокапілярних структур [1].

Однак, контактне гальмування, обумовлене щільністю конфлюенту в 2-D культурах, призводило через деякий час до відкріплення клітин від субстрату та загибель. Метою даної роботи було визначення впливу VEGF та анти-VEGF на здатність формування прокапілярних структур за умов 2-D та 3-D росту ендотеліальних клітин при довготривалому культивуванні.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

MAEC – клітинна лінія ендотеліальних клітин, отримана із аорти мишей лінії BALB/c [14]. Клітини інкубували в середовищі DMEM (Sigma, США) з додаванням 10% ETC (Sigma, США), 2мМ L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину при 37°С за вологих умов, 5% CO₂. Генерацію сферодів проведено як описано [15] з модифікацією субстрату покриттям фібронектином [9]. Отримані сфероди висаджували на фібронектиновий субстрат в середовищі культивування DMEM (Sigma),

що містило 2% ETC (Sigma), 1 нг/мл екстракту мозку із великої рогатої худоби (BBE, Clonetics) та 0,24% КМ-целюлози. Для ініціації диференціювання до 2D- та 3D-культур додавали VEGF (1 нг/мл), очищений як описано [1] та 5 нг/мл ФМА (форболові ефіри). Культивування клітин проводили впродовж 15 днів із заміною середовища кожні 3 дні. Формування прокапілярних структур оцінювали за розмірами з використанням інвертованого мікроскопу Axiovert 40°С при збільшенні 10x/0,25 Ph 1Var1, за допомогою програми для обрахунку площі міграції (Axiovision).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами дослідження було виявлено, що за однакових умов мікрооточення клітини із 2D- та 3D-культур розповсюджуються по субстрату по-різному (рис. 1).

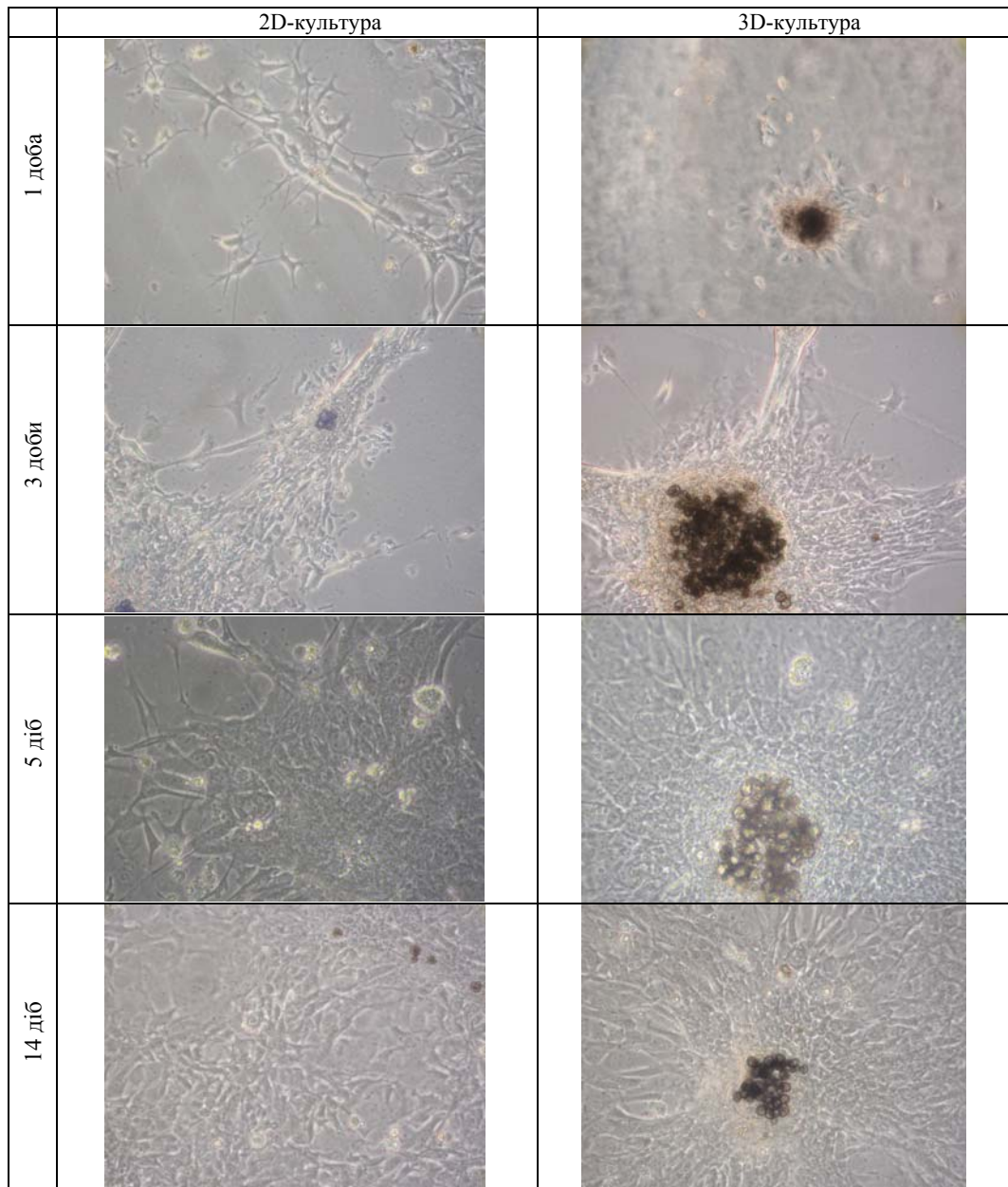


Рис. 1. Диференціювання ендотеліальних клітин in vitro із 2D- та 3D-культур.

Таблиця 1.

Показники площі сфероїдів, площі міграції клітин та їх співвідношення

Термін інкубації 3D- культур	Площа сфероїду ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$)	Площа міграції клітин ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$)	Співвідношення площі міграції клітин до площі сфероїда
1 доба	3,8±1,7	5,1±1,3	1,34
3 доби	4,2±1,8	8,9±0,9	2,11
5 діб	7,7±1,4	13,9±2,1	1,8
7 діб	6,3±0,6	18,3±2,5	2,9
11 діб	11,6±3,7	85,3±4,9	7,32
14 діб	3,7±0,4	93,4±5,6	25,24

Якщо із 2D-культур поширення по субстрату носило хаотичний характер, то міграція клітин із сфероїдів відбувалась радіально від центру до периферії. Також зафіксовано, що відношення площі сфероїда до площі, на яку розповсюджуються клітини, зменшується з часом інкубації клітин. Так, через добу після висадження клітин співвідношення площі міграції та заселення клітинами субстрату до площі сфероїда становило 1,34; через 3 доби – 2,1; на 5 добу спостерігалось незначне зниження цього показника – 1,8 (табл. 1).

Проте, як свідчать наведені дані, спостережуване зниження обумовлено не лише площею міграції клітин, а й збільшенням площі сфероїдів (див. рис.1, табл. 1), що вказує на активну проліферацію клітин у сфероїдах (час подвоєння популяції ендотеліальних клітин лінії МАЕС, визначений за умов експоненційного росту в 2D-культурах становить 22±2 годин [1]). Починаючи з 5 доби інкубації площа міграції клітин із сфероїдів поступово збільшується і співвідношення площі міграції клітин по субстрату до площі сфероїдів досягає 25,24 на 14 добу інкубації.

ВИСНОВКИ

Таким чином було виявлено, що площа мігруючих клітин із сфероїдів збільшується рівномірно по периметру від краю сфероїда та залежить від терміну інкубації клітин. Для 2D-росту клітин закономірностей направленої міграції та формування прокапілярних структур не зафіксовано.

Література

1. Гарманчук Л.В., Пяковська О.М., Соляник Г.І. Вплив проангіогенних цитокінів на проліферацію та виживання ендотеліальних клітин // *Biopolymers and Cell*. – 2010. – Vol. 26, N 3. – P. 187-193.
2. Гарманчук Л.В., Пяковская О.Н., Соляник Г.И. Первичный скрининг антиангиогенного действия противоопухолевых агентов с использованием эндотелиальных клеток // *Материалы IV съезда онкологов и радиологов СНГ. Баку, 28 сентября – 1 октября 2006 г.* – С.292.
3. Garmanchuk L.V., Pyakovskaya O.N., Yanish Yu.V., Shlyakhovenko V.A., Dasyukevich O.I., Solyanik G.I. Influence of aconitine-containing herbal extract BC1 on proliferative and electrokinetic characteristics of endothelial cells // *Exp Oncol*. – 2005. – Vol. 27, N 4. – P. 262-266.
4. Feder J., Marasa J.C., Olander J.V. The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown *in vitro* // *J. Cell Physiol*. – 1983. – Vol. 116. – P. 1-6.
5. Pelletier L., Regnard J., Fellman D., Charbord P. An *in vitro* model for the study of human bone marrow angiogenesis: Role of hematopoietic cytokines // *Lab. Invest*. – 2000. – Vol. 80. – P. 501-511.
6. Davis G.E., Camarillo C.W. Regulation of endothelial cell morphogenesis by integrins, mechanical forces, and matrix guidance pathways // *Exp. Cell Res*. – 1995. – Vol. 216. – P. 113-123.
7. Vernon R.B., Lara S.L., Drake C.J., Iruela-Arispe M.L., Angello J.G., Little C.D., Wight T.N., Sage E.H. Organized type I collagen influences endothelial patterns during "spontaneous angiogenesis *in vitro*": Planar cultures as models of vascular development *in vitro* // *Cell Dev. Biol*. – 1995. – Vol. 31. – P. 120-131.
8. Pelletier L., Regnard J., Fellman D., Charbord P. An *in vitro* model for the study of human bone marrow angiogenesis: Role of hematopoietic cytokines // *Lab Invest*. – 2000. – Vol. 80. – P. 501-511.
9. Vailhé B., Ronot X., Tracqui P., Usson Y., Tranqui L. *in vitro* angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin and is related to $\alpha_v\beta_3$ integrin localisation *in vitro* // *Cell Dev. Biol*. – 1997. – Vol. 33. – P. 763-773.
10. Iruela-Arispe M.L. Dvorak H.F. Angiogenesis: A dynamic balance of stimulators and inhibitors // *Thromb Haemost*. – 1997. – Vol. 78. – P. 67-677.
11. Nicosia R.F., Ottinetti A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta // *Lab. Invest*. – 1990a. – Vol. 63. – P. 115-122.
12. Korff T., Augustin H.G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation // *J. Cell Biol*. – 1998. – Vol. 143. – P. 1341-1135.
13. Nicosia R.F., Ottinetti A. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in Matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot *in vitro* // *Cell Dev. Biol*. – 1990b. – Vol. 26. – P. 119-128.
14. Gumcovski F., Kaminska G., Kaminski M., Morrissey L.W., Auerbach R. Heterogeneity of mouse vascular endothelium // *Blood Vessels*. – 1987. – Vol. 24. – P.11-23.
15. Перепелиціна О.М., Гарманчук Л.В., Сидоренко М.В. Багатоклітинні сфероїди клітин раку молочної залози: умови генерації та вплив сировоткових факторів // *Буковинський медичний вісник*. – 2007. – Т.11, № 3. – С. 128-133.

МОДЕЛИРОВАНИЕ АНГИОГЕНЕЗА *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 3D-КУЛЬТУР ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК**Гарманчук Л.В.**

Для исследования механизмов дифференцирования эндотелиоцитов, являющихся основной клеточной мишенью, вовлеченной в опухолевый ангиогенез, было сравнено две модели роста клеток: 2D- и 3D-мерные культуры. Для этого использовали клеточную линию эндотелия МАЕС. Генерацию сфероидов проводили с использованием КМ-целлюлозы. Для инициации дифференцирования к клеткам добавляли 10 нг/мл VEGF, 30 нг/мл ВВЕ, 5 нг/мл ФМА и помещали на субстрат, покрытый агарозным гелем (0,5%) с добавлением 0,02% фибринонектина. Сравнивали площадь миграции клеток из сфероидов в период инкубации от 1 до 15 суток. Было показано, что площадь миграции клеток из сфероидов увеличивается равномерно по периметру радиально от края сфероида к периферии зоны мигрирующих клеток и зависит от времени инкубации эндотелиоцитов. Для 2D-роста клеток закономерностей направленной миграции и формирования прокапиллярных структур не отмечено.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки, 2D- и 3D-мерные культуры.

ANGIOGENESIS MODELLING *IN VITRO* USING 3D-CULTURES OF ENDOTHELIAL CELLS**Garmanchuk L.V.**

To investigate the differentiation mechanisms of endotheliocytes, which are the main cellular target of tumor angiogenesis, two models of cell growth: 2D-and 3D-cultures – were compared. For this purpose endothelial cell line of MAEC was used. Generation of spheroids was conducted using CM-cellulose. To initiate differentiation 1 ng/ml VEGF, 1 ng/ml BBE, 5 ng/ml PMA were added and cells were placed on a substrate, coated with agarose gel (0,5%) with the addition of 0,02% fibrinonektin. The area of 3D cells migration from spheroids was compared in incubation terms from 1 to 15 days. It was shown that the area of 3D migrating cells from spheroids increases equally around the perimeter radially from spheroid edge to the periphery zone of migrating cells and depends on endotheliocytes incubation duration. For 2D-growth of cells patterns of directional migration and pro-capillary structures formation were not observed.

Key words: endothelial cells, 2D- and 3D-cultures.
