

УДК 576.54:578.23:616-006.04

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ, СЕКРЕТИРУЮЩИХ IFN- β ИЛИ IL-21, ПРИ СО-КУЛЬТИВИРОВАНИИ С КЛЕТКАМИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЛЬЮИСА

И. Н. ВАГИНА, Е. А. ЗАХАРУК, Л. И. СТРОКОВСКАЯ, Ю. В. ВАГИН, В. И. КАШУБА

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Украина, 03680, Киев, ул. Акад. Заболотного, 150
e-mail: ira_vag@ukr.net

Цель. Изучение влияния, трансдуцированных бакуловиральными векторами (БВ) эмбриональных фибробластов мыши (C57Fb), продуцирующих цитокины интерферон- β (IFN- β) и интерлейкин-21 (IL-21), на выживаемость и пролиферацию клеток аденокарциномы легких Льюиса (LL). **Методы.** Конструирование БВ, трансдукция клеток, флуоресцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия. **Результаты.** Показано, что более чувствительными к антипролиферативному действию IFN- β и IL-21 оказались клетки аденокарциномы. Эффективность ингибирования пролиферации опухолевых клеток LL была выше при со-культивировании гетерологичных клеток C57Fb/IFN β :LL. При со-культивировании клеток C57Fb, трансдуцированных БВ с геном IL-21 человека, и клеток LL наблюдалось незначительное ингибирование пролиферации клеток аденокарциномы. Эмбриональные фибробласты оказывают ингибирующее воздействие на клетки аденокарциномы при их совместном культивировании. **Выводы.** Интерферон- β , синтезируемый эмбриональными фибробластами C57Fb или опухолевыми клетками LL, трансдуцированными БВ с геном мышинового Ifn- β , ингибировал пролиферацию злокачественных клеток аденокарциномы мыши при их совместном культивировании *in vitro*. Интерлейкин-21, продуцируемый трансдуцированными опухолевыми клетками LL, эффективно подавлял пролиферацию этих клеток.

Ключевые слова: интерферон- β (IFN- β), интерлейкин-21 (IL-21), эмбриональные фибробласты (C57Fb), клетки аденокарциномы (LL), бакуловиральные векторы (БВ).

Введение. В последнее время большое внимание уделяется генной терапии как перспективной стратегии лечения онкологических заболеваний. Мощным инструментом генной терапии является использование генетически модифицированных клеток в качестве векторов для передачи различных терапевтических агентов [1]. Особый интерес вызывает изучение роли цитокинов в генной терапии. Цитокины регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, влияют на выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференциацию, функциональную активность и апоптоз, а также обеспечивают согласованность действия иммунной, эндокринной и нервной систем на клеточном уровне в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия [2]. Важная особенность цитокинов заключается в том, что они не производятся «в запас», не депонируются (хотя некоторые из них могут содержаться в цитоплазматических гранулах), не циркулируют долго по кровеносной системе, а «живут» короткое время и оказывают местное воздействие на ближайшие клетки-мишени. Связывание цитокинов с рецепторами клеток-мишеней приводит через ряд промежуточных этапов к активации соответствующих генов. Время синтеза цитокинов, как правило, бывает коротким: лимитирующим фактором служит нестабильность молекул мРНК. Большинство цитокинов секретируются индуцированно. Для биологических эффектов цитокинов характерна полифункциональность и плейотропность. Этим обеспечивается запас прочности и надёжность системы цитокиновой регуляции [3].

В нашей работе в качестве активных веществ, используемых в противоопухолевой терапии, исследовались цитокины — интерферон- β (IFN- β) и интерлейкин-21 (IL-21). Известно, что IFN- β усиливает апоптоз и оказывает антипролиферативное влияние на опухолевые клетки, осуществляет подавление ангиогенеза в опухолевых тканях, снижает частоту метастазирования, оказывает иммуномодулирующее воздействие, обладает противовирусной активностью [4, 5]. Однако клиническое применение IFN- β показало незначительную эффективность терапии для большинства солидных опухолей. Вероятно, это связано с его высокой токсичностью при системном введении и коротким периодом полураспада в организме [6]. Доставка интерферона к опухоли с помощью векторных клеток призвана обойти проблему токсичности терапевтических доз IFN- β и обеспечить увеличение их локальной концентрации в опухолевых тканях. Интерлейкин-21 (IL-21) — плеiotропный цитокин с выраженным противоопухолевым влиянием. Основным механизмом, с которым связывают противоопухолевое действие IL-21, обусловлен активацией различных субпопуляций киллерных клеток [7]. Исследования с использованием мышиных моделей опухолей *in vivo*, а также клинические испытания у пациентов с солидными опухолями показали, что IL-21 может функционировать как мощный противоопухолевый агент [8]. Интерлейкины-21 человека и мыши, а также их рецепторы характеризуются приблизительно 60 % гомологией аминокислотных последовательностей и сходной функцией [7].

Наиболее широко в клеточной терапии для передачи терапевтических агентов используются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые обладают тропизмом к опухоли и, в то же время, не являются иммуногенными [9–11]. В последнее время, возрастает интерес к исследованию возможностей применения эмбриональных и фетальных фибробластов, в частности, мышиных эмбриональных фибробластов (МЭФ) в модельных экспериментах по регенеративной и клеточной терапии. Недавно появилось несколько сообщений о том, что МЭФ фенотипически, генотипически и функционально подобны МСК [12, 13]. В частности, МЭФ и МСК характеризуются адгезией к пластику, клоногенностью, мультипотентностью, имеют идентичные антигены клеточной поверхности, обладают способностью дифференцироваться в остециты, адипоциты и хондроциты [12, 14, 15]. Эти уникальные особенности делают МЭФ привлекательной моделью

для дальнейшего исследования в качестве потенциального источника для конструирования клеточных векторов, обеспечивающих доставку терапевтических агентов непосредственно в опухолевое микроокружение. Модифицируя клетки *in vitro* можно контролировать эффективность доставки в них генетической информации, уровень экспрессии целевых генов и секреции белка еще до введения в организм, что повышает безопасность переноса генетического материала. Эффективным инструментом генетической модификации клеток являются рекомбинантные вирусные векторы. Для доставки генов цитокинов в МЭФ использовали векторы, сконструированные на основе вирусов ядерного полиэдрома насекомых *Autographa californica* Multiple NucleoPolyhedrovirus (AcMNPV). Бакуловирусы в качестве векторов для генной терапии имеют ряд преимуществ: широкий спектр трансдуцируемых типов клеток при отсутствии выраженной цитотоксичности; неспособность вирусов реплицироваться в клетках млекопитающих; возможность инфицировать как делящиеся, так и не делящиеся клетки; способность, благодаря структуре генома, включать большие (до 30 тыс. н. п.) фрагменты гетерологичной ДНК; отсутствие патогенности для человека и животных [16]. Результаты, представленные нами ранее и данные литературы свидетельствуют об эффективности использования бакуловирусных векторов (БВ) для переноса экзогенов в клетки млекопитающих [17, 18].

В представленной работе исследовалось влияние цитокинов — IFN- β мыши и IL-21 человека, продуцируемых трансдуцированными эмбриональными фибробластами — на выживаемость и пролиферацию злокачественных клеток аденокарциномы мыши при их со-культивировании.

Материалы и методы

Бакуловирусные векторы и трансдукция эмбриональных фибробластов. Бакуловирусные векторы получали на основе вируса ядерного полиэдрома AcMNPV в экспрессионной системе Bac-to-Bac (Invitrogen). Были сконструированы следующие БВ векторы: Ac-M-IFN β , содержащий ген мышиного *Ifn- β* под регуляцией промотора β -актина цыпленка в составе кассеты CAG, включающей также IE-энхансер цитомегаловируса и сигнал полиаденилирования гена β -глобина кролика; Ac-IFN-GFP, содержащий два гена — репортерный *eGfp*, под регуляцией промотора CMV, и ген мышиного *Ifn- β* , под регуляцией кассеты CAG; а также Ac-

CMV-IL21 с геном интерлейкина человека *IL-21*, под регуляцией промотора CMV. В качестве контрольных БВ векторов использовали: Ac-GFP с репортерным геном *eGfp*; под регуляцией полиэдрина промотора; Ac-M-GFP с репортерным геном *Gfp* под регуляцией кассеты CAG; Ac-M-S18 с геном митохондриального рибосомального белка *S18-2*. Вирус концентрировали центрифугированием при $100000g$ [19]. Титр вирусных препаратов после амплификации и концентрирования составлял 4×10^8 бляшкообразующих единиц/мл (БОЕ). Трансдукцию проводили в оптимизированных нами условиях [20].

Клеточные линии. В работе использовали клетки аденокарциномы легких Льюиса (LL) мыши, полученные из Банка Клеточных Линий (Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого, НАН Украины) и мышинные эмбриональные фибробласты линии C57BL/6j. Эмбриональные фибробласты выделяли методом ферментативной дезагрегации мягких тканей 13,5-дневных эмбрионов мышей [21], в эксперименте использовали 2–3 пассажи. Все линии клеток культивировали в среде DMEM (Sigma) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки FBS (Sigma), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37 °С в CO₂ инкубаторе. Монослойную культуру клеток насекомых Sf21 выращивали в среде TC-100 (Sigma) с добавлением 10 % FBS при 28 °С.

Анализ клеточной пролиферации. Схема эксперимента по со-культивированию заключалась в следующем: клетки C57Fb/IFNβ, C57Fb/IFNβ-GFP и C57Fb/IL21 или LL/IFNβ, LL/IFNβ-GFP и LL/IL21, через 24 часа после окончания трансдукции снимали с культуральных чашек. Затем их смешивали в соотношении 1 : 10 с клетками аденокарциномы мыши и высевали на лунки 6-луночной плашки в концентрации (2×10^4 : 2×10^5 клеток/лунку). В контрольных вариантах со-культивирования (C57Fb:LL; C57Fb/GFP:LL; LL/GFP : LL) клетки рассеивали в таком же количестве и соотношении как в опытных группах (1 : 10). Также в качестве контроля использовали клетки C57Fb и LL, трансдуцированные вышеупомянутыми БВ, культивируемые отдельно (2×10^5 клеток/лунку), а в качестве «чистого» контроля — клетки LL и C57Fb (не трансдуцированные) культивируемые отдельно (2×10^5 клеток/лунку). Во всех вариантах клетки культивировали в течение 5 суток в стандартных условиях без замены культуральной среды, снимали с культуральных чашек обработкой раствором

трипсина с EDTA, ресуспендировали в PBS с добавлением сыворотки (10 % FBS). Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева на 5 сутки в опытных и контрольных образцах. Эксперимент повторяли трижды. Через 24 часа после окончания трансдукции клетки анализировали под флуоресцентным микроскопом Микмед-2ЕС. Эффективность трансдукции определяли по количеству клеток, экспрессирующих светящийся белок, с использованием цитофлуориметра Coulter Epics XL. Подготовку клеток осуществляли, как описано ранее [20].

Статистический анализ результатов проводили с использованием Student t-test с презентацией данных в программе Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Предварительно нами была проведена проверка влияния БВ с генами *lfn-β* или *IL-21* на пролиферацию трансдуцированных клеток аденокарциномы и эмбриональных фибробластов мыши. Анализ результатов культивирования клеток LL, либо клеток C57Fb, трансдуцированных БВ с геном мышинного *lfn-β*, показал, что на 5-й день культивирования количество этих клеток уменьшается по сравнению со всеми контрольными вариантами (Рис. 1, Рис. 2). Так, количество клеток LL, трансдуцированных БВ Ac-M-IFNβ или Ac-IFNβ-GFP (Рис. 1, варианты 4 и 5: $4,0 \times 10^5$; $3,3 \times 10^5$ клеток/лунку, соответственно), достоверно уменьшалось ($p < 0,001$) по сравнению с контролем (варианты 1, 2, 3). Количество клеток LL, трансдуцированных БВ с геном *IL-21* (Рис. 1, вариант 6), также достоверно уменьшалось по сравнению с этим показателем в контрольных вариантах ($p < 0,01$).

Подсчет клеток C57Fb/IFNβ и C57Fb/IFNβ-GFP (Рис. 2) показал достоверное уменьшение их количества (варианты 4, 5) по сравнению со всеми контрольными вариантами ($p < 0,001$). Следует отметить, что количество клеток C57Fb/GFP и C57Fb/S18 достоверно уменьшалось по сравнению с «чистым» контролем ($p < 0,05$). Ранее нами было показано, что трансдукция клеток C57Fb контрольным бакуловирусом Ac-FastMam приводит к небольшому повышению синтеза эндогенного интерферона, который в течение 24 часов снижается до уровня более низкого, чем в клетках без трансдукции [22]. Эти данные согласуются с установленными ранее [23]. Вероятно, наблюдаемый эффект связан с индукцией эндогенного интерферона или других цитокинов в ответ на трансдукцию этих

клеток БВ, а также зависит от экспрессии введенных трансгенов. Количество клеток C57Fb, трансдуцированных БВ с геном *IL-21* (Рис. 2), достоверно снижалось по сравнению с этим показателем в «чистом» контроле ($p < 0,01$), однако совпадало с количеством клеток в контрольных вариантах 2 и 3. Следовательно, *IL-21* не оказывал существенного влияния на пролиферацию клеток C57Fb *in vitro*. Таким образом, к антипролиферативному эффекту *IFN-β* оказались чувст-

вительными как опухолевые клетки LL, так и нормальные клетки C57Fb, однако количество клеток LL/*IFNβ* и LL/*IFNβ*-GFP уменьшалось в 8–10 раз, а клеток C57Fb/*IFNβ* и C57Fb/*IFNβ*-GFP в 2–3 раза по сравнению с этим показателем в «чистом» контроле. Это свидетельствует о том, что клетки аденокарциномы более чувствительны к секретируемым цитокинам *IFN-β* и *IL-21*.

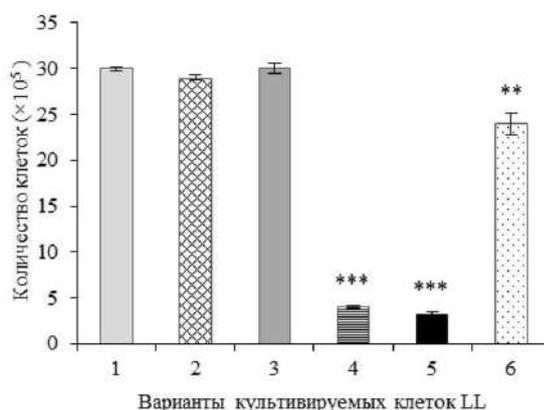


Рисунок 1. Результаты культивирования клеток аденокарциномы LL, трансдуцированных различными БВ: 1 — контрольные клетки LL; 2 — LL /GFP; 3 — LL/S18; 4 — LL/*IFNβ*; 5 — LL/*IFNβ*-GFP; 6 — LL/*IL21*. Различия достоверны при ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем

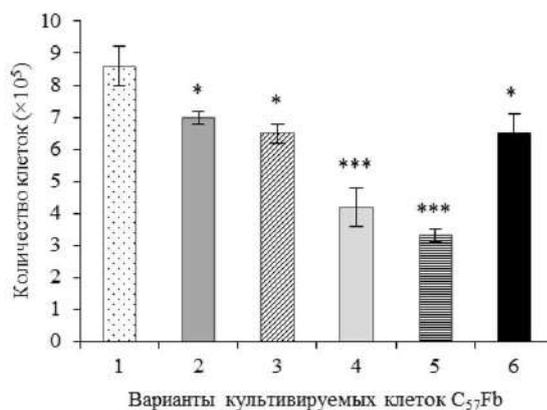


Рисунок 2. Результаты культивирования эмбриональных фибробластов C57Fb, трансдуцированных различными БВ: 1 — контрольные клетки C57Fb; 2 — C57Fb/GFP; 3 — C57Fb/S18; 4 — C57Fb/*IFNβ*; 5 — C57Fb/*IFNβ*-GFP; 6 — C57Fb/*IL21*. Различия достоверны при * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем

Известно, что БВ обеспечивают временную экспрессию экзогенов в непермиссивных клетках млекопитающих, благодаря отсутствию реплика-

ции в этих клетках вирусной ДНК и постепенной ее потере в ходе клеточного деления. Однако, транзиторная трансдукция, несмотря на короткий

период гиперэкспрессии трансгена, более предпочтительна, так как при этом уменьшается риск инсерционного мутагенеза [24]. Для проверки эффективности трансдукции клеток LL и C57Fb бакуловирусным вектором Ac-M-GFP, через 24 часа после трансдукции определяли количество GFP положительных клеток с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлюорометрии. БВ Ac-GFP, содержащий репортерный ген *eGFP* под полиэдриновым промотором, трансдуцировал 99 % Sf21 клеток насекомых (Рис. 3а). Однако экспрессия репортерного

гена *eGFP* в составе вектора Ac-M-GFP под регуляцией промотора β-актина цыпленка в составе кассеты CAG значительно снижалась (до 5 %) в клетках насекомых (Рис. 3б). Эффективность трансдукции опухолевых клеток LL составляла 63 %, а клеток C57Fb — 70 % (Рис. 3в; Рис. 3г). Как было показано нами ранее и по данным работ других авторов экспрессия репортерного белка GFP может длиться до 30 суток (в зависимости от типа клеток, генетических конструкций и условий трансдукции), но постепенно уменьшается, сохраняется в одиночных клетках [20, 23].

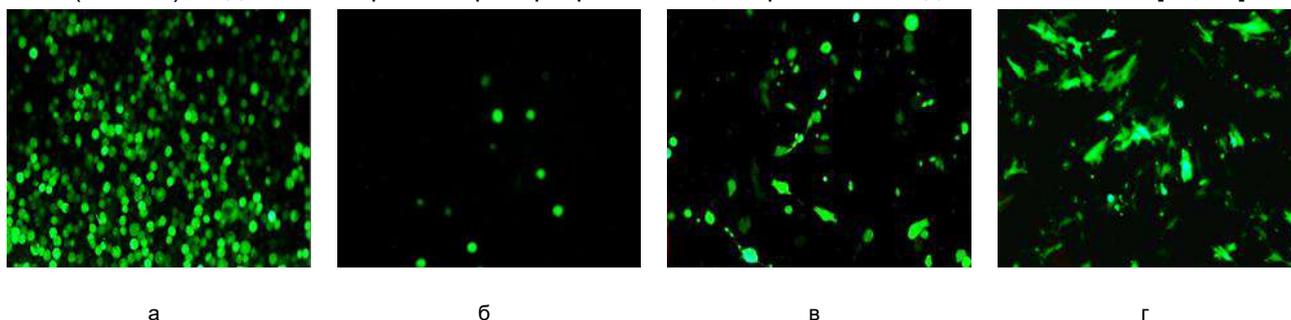


Рисунок 3. Эффективность экспрессии репортерного гена *eGFP* в клетках насекомых и млекопитающих (24 часа после трансдукции): а — Sf-21 клетки насекомых, трансдуцированные БВ Ac-GFP; клетки трансдуцированные БВ Ac-M-GFP: б — Sf-21 клетки насекомых; в — клетки аденокарциномы Льюиса; г — эмбриональные фибробласты мыши

Проведенный нами ранее ПЦР анализ экспрессии гена *lfn-β* в эмбриональных фибробластах C57Fb, трансдуцированных БВ Ac-M-IFNβ показал, что в течение 120 часов на уровне мРНК ген *lfn-β* экспрессируется на высоком уровне, практически равном тому, который наблюдался сразу после трансдукции [22].

Для проверки возможности использования эмбриональных фибробластов мыши, содержащих ген *lfn-β* мыши либо ген *IL-21* человека, в качестве клеточных векторов, для доставки терапевтических цитокинов, подавляющих пролиферацию злокачественных клеток LL, проводили их совместное культивирование *in vitro*. Результаты, приведенные на Рис. 4, свидетельствуют о том, что при со-культивировании клеток LL и C57Fb, трансдуцированных БВ с геном мышинового *lfn-β*, наблюдается ингибирование роста опухолевых клеток LL. Количество клеток LL при со-культивировании с клетками C57Fb/IFNβ или C57Fb/IFNβ-GFP (варианты 4 и 5) достоверно ($p < 0,001$) уменьшалось по сравнению со всеми контрольными вариантами. Таким образом, при моделировании *in vitro* взаимодействия клеток в опухоли — эмбриональных фибробластов и клеток аденокарциномы мыши — было показано, что

IFN-β, синтезируемый клетками C57Fb/IFNβ или C57Fb/IFNβ-GFP, ингибирует пролиферацию опухолевых клеток LL. Необходимо отметить, что во всех контрольных смесях (варианты 2, 3) с клетками C57Fb, количество клеток LL достоверно уменьшалось ($p < 0,01$; $p < 0,05$) по сравнению с «чистым» контролем. Ранее нами установлено, что клетки C57Fb также оказывали ингибирующее воздействие на клетки меланомы при их совместном культивировании [22]. Это свидетельствует о том, что именно взаимодействие эмбриональных фибробластов с клетками LL способствует подавлению пролиферации опухолевых клеток. Полученные результаты согласуются с данными, указывающими на то, что фибробласты мыши и человека могут подавлять пролиферацию опухолевых клеток при со-культивировании *in vitro*, а их ингибирующая способность варьирует в зависимости от донора и места происхождения фибробластов [25, 26]. При этом наблюдалось эффективное ингибирование, обусловленное влиянием сформированного монослоя фибробластов на рост опухолевых клеток, связанное с прямыми межклеточными контактами. Контактные взаимодействия опухолевых клеток с другими клетками и внеклеточным

матриксом осуществляются благодаря широкому спектру молекул адгезии, локализующихся на поверхности, как опухолевых клеток, так и фибробластов, с которыми они взаимодействуют. Так же отмечалось, что растворимые факторы, секретируемые фибробластами при со-культивировании с опухолевыми клетками, способствуют торможению пролиферации клеток опухоли и их подвижности. В нашей работе, несмотря на то, что соотношение эмбриональных фибробластов и опухолевых клеток было 1 : 10, наблюдалось

ингибирование опухолевых клеток LL в контрольных группах на 5й день совместного культивирования. Воздействие трансдуцированных БВ эмбриональных фибробластов, дополненное синтезом IFN- β , на клетки аденокарциномы усиливало подавление пролиферации опухолевых клеток при их со-культивировании. Клетки C57Fb/IFN β обеспечивали в течение 5 суток ингибирующее влияние IFN- β на клетки LL, аналогичное ранее установленному на клетках меланомы [22].

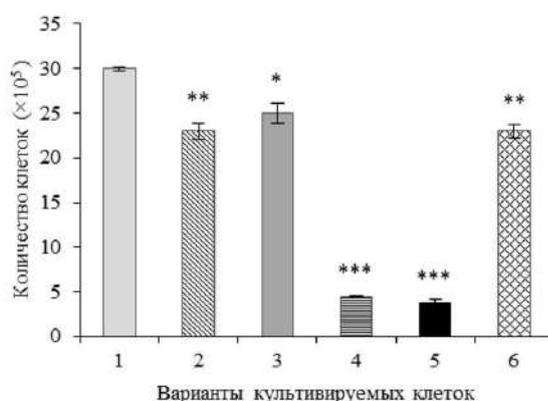


Рисунок 4. Влияние со-культивирования эмбриональных фибробластов C57Fb, экспрессирующих IFN- β или IL-21, на пролиферацию клеток аденокарциномы LL *in vitro*: 1 — контрольные клетки LL; варианты со-культивирования клеток в контроле: 2 — C57Fb : LL; 3 — C57Fb/GFP : LL; варианты со-культивирования клеток в опыте: 4 — C57Fb/IFN β : LL; 5 — C57Fb/IFN β -GFP : LL; 6 — C57Fb/IL21: LL. Различия достоверны при * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем

При со-культивировании клеток LL и клеток C57Fb/IL21 (Рис. 4, вариант 6), наблюдалось достоверное уменьшение количества клеток LL по сравнению с «чистым» контролем ($p < 0,01$), однако отличий по сравнению с контрольными вариантами 2, 3 (Рис. 4) не обнаружено. Полученные результаты свидетельствуют о том, что IL-21, продуцируемый трансдуцированными эмбриональными фибробластами, не оказал существенного влияния на пролиферацию клеток аденокарциномы *in vitro*.

Поскольку опухолевые клетки вступают в межклеточные взаимодействия, как с нормальными клетками, так и с другими опухолевыми клетками, нам представлялось интересным моделирование взаимодействия гомологичных клеток в опухоли — клеток аденокарциномы мыши с такими же опухолевыми клетками, трансдуцированными БВ с генами *Ifn- β* или *IL-21*. В данном эксперименте вместо эмбриональных фибробластов использовали клетки, аденокарциномы

трансдуцированные БВ. При совместном культивировании клеток LL, трансдуцированных БВ, содержащими ген *Ifn- β* , и не трансдуцированных клеток LL (Рис. 5), отмечено достоверное ($p < 0,001$) уменьшение количества опухолевых клеток (варианты 3, 4) по сравнению с контрольными вариантами (1, 2): $8,9 \times 10^5$ (LL/IFN β :LL) и $7,8 \times 10^5$ (LL/IFN β -GFP:LL) клеток/лунку. Таким образом, при со-культивировании гомологичных клеток (LL/IFN β :LL, LL/IFN β -GFP:LL) также как и при со-культивировании гетерологичных клеток (C57Fb/IFN β : LL, C57Fb/IFN β -GFP:LL) IFN- β , синтезируемый клетками LL или C57Fb, ингибирует пролиферацию опухолевых клеток LL. Однако, наблюдаемый эффект более выражен при совместном культивировании гетерологичных клеток. Так, на 5-й день со-культивирования опухолевых клеток LL и клеток C57Fb/IFN β или C57Fb/IFN β -GFP количество клеток LL было в 2 раза меньше по сравнению с такими же показателями, полученными при со-культивировании

гомологичных клеток (LL/IFNβ:LL и LL/IFNβ-GFP:LL). Известно, что секретируемый белок IFN-β связывается с особыми рецепторами на мембране и функционирует в качестве регулятора пролиферации клеток, как через аутокринный, так и через паракринный пути [27]. Таким обра-

зом, IFN-β, продуцируемый трансдуцированными БВ клетками C57Fb/IFNβ, C57Fb/IFNβ-GFP, LL/IFNβ и LL/IFNβ-GFP, ингибировал пролиферацию этих клеток, а при их совместном культивировании с клетками LL — подавлял пролиферацию клеток аденокарциномы.

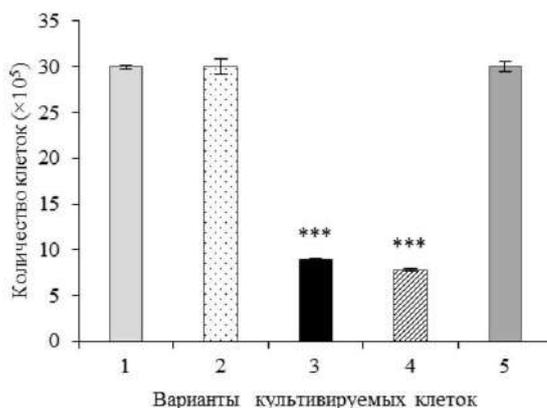


Рис. 5. Эффект со-культивирования клеток аденокарциномы LL, трансдуцированных БВ, с не трансдуцированными клетками LL *in vitro*: 1 — контрольные клетки LL; 2 — LL/GFP : LL; 3 — LL/IFNβ : LL; 4 — LL/IFNβ-GFP : LL; 5 — LL/IL21 : LL. Различия достоверны при *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем

При со-культивировании клеток LL, трансдуцированных БВ с геном *IL-21* человека, и не трансдуцированных клеток LL (Рис. 5, вариант 5) отличий по сравнению с контрольными вариантами 1, 2 (Рис. 5) не обнаружено.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эмбриональные фибробласты трансдуцированные цитокинпродуцирующими БВ с генами *Ifn-β* или *IL-21*, эффективно подавляли пролиферацию опухолевых клеток аденокарциномы Льюиса *in vitro*. Необходимо проведение дальнейших исследований для проверки возможности использования модифицированных эмбриональных фибробластов в стратегии генной терапии *in vivo*.

Выводы

Более чувствительными к антипролиферативному действию IFN-β и IL-21 оказались клетки аденокарциномы LL. Интерферон-β, синтезируемый эмбриональными фибробластами C57Fb или опухолевыми клетками LL, трансдуцированными БВ с геном мышиного *Ifn-β*, ингибировал пролиферацию злокачественных клеток аденокарциномы мыши LL при их совместном культивировании *in vitro*. Эффективность ингибирования пролиферации опухолевых клеток LL была

выше при со-культивировании гетерологичных клеток C57Fb/IFNβ:LL. При со-культивировании клеток C57Fb/IL21 и клеток LL наблюдалось незначительное ингибирование пролиферации клеток аденокарциномы. Эмбриональные фибробласты оказывают ингибирующее воздействие на клетки аденокарциномы при их совместном культивировании. Интерлейкин-21, продуцируемый трансдуцированными опухолевыми клетками LL, эффективно подавлял пролиферацию этих клеток.

Список литературы

1. Cihova M., Altanerova V., Altaner C. Stem cell based cancer gene therapy // Mol Pharm. — 2011. — Vol. 8, No 5. — P. 1480–1487.
2. Khan M. M. Role of cytokines / Immunopharmacology. — Springer, 2008. — P. 33–59.
3. Qian C., Liu X. Y., Prieto J. Therapy of cancer by cytokines mediated by gene therapy approach // Cell Res. — 2006. — Vol. 16, No 2. — P. 182–188.
4. Goodbourn S., Didcock L., Randall R. E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures // J Gen Virol. — 2000. — Vol. 81. — P. 2341–2364.
5. Kaynor C., Xin M., Wakefield J., Barsoum J., Qin X. Q. Direct evidence that IFN-beta functions as a tumor-suppressor protein // J Interferon Cytokine Res. — 2002. — Vol. 22, № 11. — P. 1089–1098.

6. Studeny M., Marini F. C., Dembinski J. L., Zompetta C., Hansen M. C., Bekele B. N., Champlin R. E., Andreeff M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents // *J Natl Cancer Inst.* — 2004. — Vol. 96, № 21. — P. 1593–1603.
7. Skak K., Kragh M., Hausman D., Smyth M. J., Sivakumar P. V. Interleukin 21: combination strategies for cancer therapy // *Nature Rev. Drug Discov.* — 2008. — Vol. 7, № 3. — P. 231–240.
8. Spolski R., Leonard W. J. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential // *Nature Rev.* — 2014. — Vol. 13, № 5. — P. 379–395.
9. Amara I., Touati W., Beaune P., Waziers I. Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for prodrug gene therapy against tumors // *Biochimie.* — 2014. — Vol. 105. — P. 4–11.
10. Serakinci N., Fahrioglu U., Christensen R. Mesenchymal stem cells, cancer challenges and new Directions // *Eur J of Cancer.* — 2014. — Vol. 50. — P. 1522–1530.
11. Mavroudi M., Zarogoulidis P. Stem cells' guided gene therapy of cancer: New frontier in personalized and targeted therapy // *J Cancer Res Ther (Manch).* — 2014. — Vol. 2, № 1. — P. 22–33.
12. Yusuf B., Gopurappilly R., Dadheech N., Gupta S., Bhonde R., Pal R. Embryonic fibroblasts represent a connecting link between mesenchymal and embryonic stem cells // *Develop Growth Differ.* — 2013. — Vol. 55, № 3. — P. 330–340.
13. Haniffa M. A., Collin M. P., Buckley C. D., Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes // *Haematologica.* — 2009. — Vol. 94, № 2. — P. 258–263.
14. Sun H., Gulbagci N. T., Taneja R. Analysis of growth properties and cell cycle regulation using mouse embryonic fibroblast cells // *Methods Mol Biol.* — 2007. — Vol. 383. — P. 311–319.
15. Saeed H., Taipaleenmaki H., Aldahmash A. M., Abdallah B. M., Kassem M. Mouse embryonic fibroblasts (MEF) exhibit a similar but not identical phenotype to bone marrow stromal stem cells (BMSC) // *Stem Cell Rev.* — 2012. — Vol. 8. — P. 318–328.
16. Airene K. J., Hu Y. C., Kost T. A., Smith R. H., Kotin R. M., Ono C., Matsuura Y., Wang S., Hertuala S. Y. Baculovirus: an Insect-derived vector for diverse gene transfer applications // *Mol Ther.* — 2013. — Vol. 21, № 4. — P. 739–749.
17. Chen C. Y., Lin C. Y., Chen G. Y., Hu Y. C. Baculovirus as a gene delivery vector: recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications // *Biotechnol Adv.* — 2011. — Vol. 29. — P. 618–631.
18. Аноприенко О. В., Вагина И. Н., Захарук Е. А., Строковская Л. И., Соломко А. П. Бакуловирусные векторы Ac-Stm-Gfp, Ac-M-Gfp and Ac-lfn-Gfp для эффективного переноса генов в клетки млекопитающих // *Вісн. Укр. тов. генет. сел.* — 2010. — Т. 8, № 1. — С. 3–9.
19. King L. A., Possee R. D. The baculovirus expression system. A laboratory guide. — London: Chapman and Hall. — 1992. — 220 p.
20. Вагина И. Н., Аноприенко О. В., Захарук Е. А., Строковская Л. И., Соломко А. П. Эффективность доставки генов бакуловирусами в клетки млекопитающих *in vitro* // *Biopolymers and cell* — 2008. — Т. 24, № 6 — С. 508–512.
21. Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E. Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual. — Woodbury, USA: Cold Spring Harbor Press. — 1994. — 332 p.
22. Vagyna I. N., Zaharuk O. A., Strokovska L. I., Vagyn Y. V., Kashuba V. I. Mouse embryonic fibroblasts expressing IFN β or IL-21 inhibit proliferation of melanoma cells *in vitro* // *Biopolym. Cell.* — 2016. — Vol. 32, № 6. — P. 433–441.
23. Chen G. Y., Shiah H. C., Su H. J., Chen C. Y., Chuang Y. J., Lo W. H., Huang J. L., Chuang C. K., Hwang S. M., Hu Y. C. Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells triggers the toll-like receptor 3 pathway. // *J Virol.* — 2009. — Vol. 83, № 20. — P. 10548–10556.
24. Смирнихина С. А. Экспрессия генов трансфицированных в мезенхимальные стволовые клетки человека // *Клеточная трансплант. и тканевая инж.* — 2010. — Т. 5, № 4. — С. 16–23.
25. Flaberg E., Guven H., Savchenko A., Pavlova T., Kashuba V., Szekely L., Klein G. The architecture of fibroblast monolayers of different origin differentially influences tumor cell growth // *Int J Cancer.* — 2012. — Vol. 131, № 10. — P. 2274–2283.
26. Alkasalias T., Flaberg E., Kashuba V., Alexeyenko A., Pavlova T., Savchenko A., Szekely L., Klein G., Guven H. Inhibition of tumor cell proliferation and motility by fibroblasts is both contact and soluble factor dependent // *PNAS.* — 2014. — Vol. 111, № 48. — P. 17188–17193.
27. Parker B. S., Rautela J., Hertzog P. J. Antitumor actions of interferons: implications for cancer therapy // *Nat Rev Cancer.* — 2016. — Vol. 16, № 3. — P. 131–144.

Представлено Г. Д. Телегесвим
Надійшла 15.04.2017

АНТИПРОЛІФЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ЕМБРІОНАЛЬНИХ ФІБРОБЛАСТІВ МИШІ, ЯКІ СЕКРЕТУЮТЬ IFN- β АБО IL-21, ПРИ СУМІСНОМУ КУЛЬТИВУВАННІ З КЛІТИНАМИ АДЕНОКАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІВ ЛЮІСА

І. М. Вагіна, О. А. Захарук, Л. І. Строковська,
Ю. В. Вагін, В. І. Кашуба

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150
e-mail: ira_vagin@ukr.net

Мета. Вивчення впливу, трансдукованих бакуловирусними векторами (БВ) ембріональних фібробластів миші (C57Fb), які продукують цитокіни інтерферон- β (IFN- β) і інтерлейкін-21 (IL-21), на виживаність і проліферацію клітин аденокарциноми Люїса (LL). **Методи.** Конструювання БВ, трансдукція клітин, флуоресцентна мікроскопія, проточна цитофлуориметрія. **Результати.** Показано, що клітини аденокарциноми виявилися більш чутливими до антипроліферативної дії IFN- β і IL-21. Ефективність інгібування проліферації пухлинних клітин LL була вище при сумісному культивуванні гетерологічних клітин C57Fb/IFN β :LL. При со-культивуванні клітин C57Fb, трансдукованих БВ з геном IL-21 людини, і клітин LL спостерігалось незначне інгібування проліферації клітин аденокарциноми. Ембріональні фібробласти C57Fb чинять інгібуючу дію на клітини аденокарциноми при їх спільному культивуванні. **Висновки.** IFN- β , що синтезується ембріональними фібробластами C57Fb або пухлинними клітинами LL, трансдукованими БВ з геном мишачого lfn- β , інгібував проліферацію злоякісних клітин аденокарциноми миші

при їх спільному культивуванні *in vitro*. IL-21, що продукується трансдукованими пухлинними клітинами LL, ефективно пригнічував проліферацію цих клітин.

Ключові слова: інтерферон-β (IFN-β), інтерлейкін-21 (IL-21), ембріональні фібробласти (C57Fb), клітини аденокарциноми (LL), бакуловірусні вектори (БВ).

ANTIPROLIFERATIVE POTENTIAL OF MOUSE EMBRYONIC FIBROBLASTS SECRETING IFN-β OR IL-21, UPON CO-CULTIVATING WITH LEWIS LUNG ADENOCARCINOMA CELLS

I. N. Vagyna, O. A. Zaharuk, L. I. Strokovska, Y. V. Vagyn, V. I. Kashuba

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 150
e-mail: ira_vag@ukr.net

Aim. Investigation of the effect of mouse embryonic fibroblasts (C57Fb), transduced with baculovirus vectors (BVs), producing IFN-β and IL-21 cytokines on survival

and proliferation of Lewis lung adenocarcinoma cells (LL).

Methods. Construction of BVs, transduction of cells, fluorescence microscopy, flow cytometry. **Results.** It was shown that adenocarcinoma cells were more sensitive to the antiproliferative effect of IFN-β and IL-21. The efficacy of inhibiting the proliferation of tumor cells LL was higher when co-cultured heterologous cells C57Fb/IFNβ: LL. Co-cultivation of C57Fb cells loaded with the BV-IL21 vector and cells LL caused a slight inhibition of adenocarcinoma cell proliferation. The mouse embryonic fibroblasts suppressed proliferation of cells LL upon co-cultivating. **Conclusions.** Interferon β synthesized by mouse embryonic fibroblasts or tumor cells LL, that were transduced with BVs carrying mouse *Ifn-β* gene, inhibited proliferation of adenocarcinoma malignant cells *in vitro*. Interleukin-21, produced by transduced tumor cells LL, effectively inhibited the proliferation of these cells.

Keywords: interferon-β (IFN-β), interleukin-21 (IL-21), mouse embryonic fibroblasts (C57Fb), lung adenocarcinoma cell line (LL), baculovirus vector (BV).