

# Снижение витальности опухолевых клеток ведет к усилению их тромбогенных свойств

## Decreased vitality of tumor cells leads to an enhancement of their thrombogenic properties

А.Д. Корнейчук<sup>1,2#</sup>, И.С. Колесникова<sup>1</sup>.

A. D. Korneichuk<sup>1,2,#</sup>, I.S. Kolesnikova<sup>1</sup>.

1. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый МЦТП ФХФ РАН, Москва, Россия

2. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва, Россия

# Автор для переписки: korneichuk.ad18@physics.msu.ru

1. Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 30 Sred-nyaya Kalitnikovskaya st., Moscow, 109029, Russia

2. Dmitry Rogachev National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 1 Samory Mashela st., Moscow, 117997, Russia

Получено: 05.04.2025

Принято к публикации: 17.04.2025

Опубликовано: 30.06.2025

EDN: SPLYET

DOI: 10.65189/2949-0758-2025-4-2-12-17

### Аннотация

Тромбоциты способны экранировать циркулирующие опухолевые клетки от иммунного ответа организма, способствуя гематогенному метастазированию некоторых солидных опухолей, однако, механизмы данного взаимодействия изучены не до конца. Данный процесс моделируется *in vitro* в феномене агрегации тромбоцитов, индуцируемой опухолевыми клетками. Для агрегации тромбоцитов в данных условиях необходимо присутствие плазмы крови, обеспечивающей окружение для развертывания каскада генерации тромбина по внешнему пути от тканевого фактора, который экспрессируется на поверхности большинства опухолевых клеток. В ходе предыдущих экспериментов было установлено, что на агрегацию тромбоцитов предположительно может влиять жизнеспособность, или витальность, опухолевых клеток, зависящая от условий инкубации. Целью данной работы является исследование влияния условий инкубации опухолевых клеток на их способность индуцировать агрегацию тромбоцитов в присутствии плазмы *in vitro*.

**Ключевые слова:** Тромбоциты, Опухолевые клетки, Витальность клеток, Рак-ассоциированный тромбоз.

### Annotation

It is known that platelets are capable of shielding circulating tumor cells from the body's immune response, promoting hematogenous metastasis of some solid tumors. However, the mechanisms of this interaction are not yet fully understood. This process can be modeled *in vitro* through the phenomenon of tumor cell-induced platelet aggregation (TCIPA). For platelet aggregation to occur under these conditions,

the presence of blood plasma is essential. The plasma provides the environment necessary for the thrombin generation cascade, which can be initiated via the extrinsic pathway by tissue factor expressed on the surface of most tumor cells. Previous experiments have suggested that the vitality of tumor cells, which depends on pre-experimental incubation conditions, may influence platelet aggregation. The aim of this work is to investigate how the pre-experimental incubation conditions of tumor cells affect their ability to induce platelet aggregation in the presence of plasma *in vitro*.

**Key words:** Platelets, Tumor cells, Cell vitality, Tumor cell-induced platelet aggregation.

### Введение

В современном мире онкологические заболевания продолжают оставаться одной из главных проблем медицины. Онкология занимает второе место среди причин смерти до 70 лет, уступая лишь сердечно-сосудистым заболеваниям [1]. В ходе развития заболевания могут возникать различные осложнения, в том числе тромботические. Рак-ассоциированный тромбоз является второй по частоте причиной смерти онкологических пациентов после смерти от самого рака [2]. Риск развития венозной тромбоземболии у раковых больных повышается в 4-7 раз по сравнению со здоровыми [3].

### Агрегация тромбоцитов в присутствии опухолевых клеток

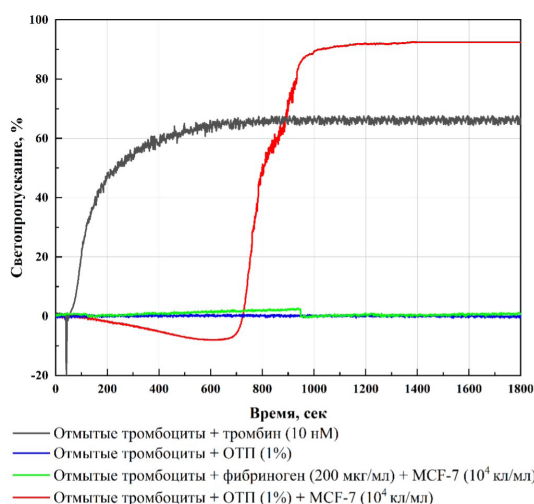
Известно, что опухолевые клетки способны взаимодействовать с тромбоцитами, как в месте первичного очага, так и в кровотоке [4]. Тромбоциты могут способствовать гематогенному метастазированию, образуя в кровотоке гетероагрегаты с опухолевыми клетками, в составе

которых клетки способны избежать иммунного ответа организма и агрессивного воздействия потока, перемещаясь к месту экстравазации [5].

Одним из предложенных механизмов агрегации тромбоцитов, индуцированной опухолевыми клетками, является попадание тромбоцитов в фибриновую сеть, образующуюся вокруг клетки в кровотоке вследствие запуска каскада плазменного свертывания тканевым фактором, экспонированным на поверхности опухолевых клеток [6].

Опухолевые клетки способны напрямую активировать плазменный каскад свертывания крови. Клетки злокачественной опухоли имеют на своей поверхности повышенную концентрацию тканевого фактора (ТФ) – трансмембранного гликопротеина, экспрессируемого в норме клетками практически всех тканей организма (за исключением эндотелия и клеток крови) [7] – и могут высвобождать ТФ-положительные макровезикулы [8]. Тканевой фактор активирует внешний путь плазменного каскада свертывания [9], результатом которого является генерация тромбина [10] и дальнейшее образование фибринового сгустка [11]. Тромбин – II фактор свертывания, обеспечивающий превращение фибриногена в фибрин [12]. Также помимо этого он является одним из сильных активаторов тромбоцитов. Для некоторых типов злокачественных опухолей характерна избыточная экспрессия тканевого фактора [13].

В своем исследовании Zera и др. показали, что тканевой фактор, экспрессируемый на поверхности клеток рака молочной железы, вызывает генерацию тромбина, активацию и агрегацию отмытых в буфере тромбоцитов (ОТ) в присутствии минимального (1%) количества обедненной тромбоцитами плазмы крови (ОТП) [14]. На Рис.1 приведен типичный вид агрегационной кривой тромбоцитов в присутствии



**Рисунок 1. Агрегация отмытых тромбоцитов в ответ на добавление различных активаторов [6].**

опухолевых клеток и 1% ОТП в сравнении с классической агрегацией, индуцированной тромбином. Отличительной особенностью подобной агрегации по сравнению с агрегацией при активации тромбином в отсутствии плазмы является наличие «двух волн» агрегации.

В ходе проведенной ранее серии агрегометрических экспериментов с опухолевыми клетками в присутствии обедненной тромбоцитами плазмы (ОТП), нами было замечено, что при продолжительной работе с клетками в течение нескольких часов наблюдается сокращение времени начала агрегации в повторяющихся постановках при одинаковой конечной концентрации клеток. В связи с этим было сделано предположение, что на агрегацию может оказывать влияние степень жизнеспособности, или витальности, клеток в момент добавления в систему, которая, вероятно, может зависеть от условий инкубации в течение продолжительной серии экспериментов.

Цель работы – исследовать влияние условий инкубации опухолевых клеток перед проведением эксперимента на агрегацию тромбоцитов в присутствии опухолевых клеток и плазмы.

## Материалы и Методы

### Реагенты

В ходе проведения исследования были использованы PGI<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, цитрат натрия и апираза производства Sigma-Aldrich (США).

Буфер Tyrode's содержал 137 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 12 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), 0,35% БСА (бычий сывороточный альбумин) и 5,5 мМ глюкозы-D(+) безводной в воде Milli-Q. Все реагенты, использованные в приготовлении буфера, произведены Sigma-Aldrich (США).

Для работы с клетками были использованы клеточный буфер HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Thermo Fisher Scientific (США)), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Himedia (Индия)), гентамицин (ПанЭко (Россия), A011), L-глутамин (ПанЭко (Россия), Ф033Е), фетальная бычья сыворотка (FBS, Himedia (Индия), RM10971-500ml).

### Клеточная культура

Клеточная линия MCF-7 выращивалась в среде DMEM, содержащей 1% гентамицина, 1% L-глутамина и 10% фетальной бычьей сыворотки. Клетки выращивались в стерильном инкубаторе при температуре +37°C и 5%-м содержании CO<sub>2</sub>. Конечная концентрация опухолевых клеток в постановке – 10<sup>4</sup> кл/мл. Измерение концентрации клеток в суспензии проводилось на проточном

цитометре CytoFLEX.

Выбранная конечная концентрация опухолевых клеток значительно превышает наблюдаемую *in vivo* при гематогенном метастазировании, однако она является наиболее часто используемой в экспериментах, связанных с изучением явления взаимодействия опухолевых клеток и тромбоцитов *in vitro* [14], [15].

#### *Отмытые тромбоциты*

Забор цельной венозной крови производился в день эксперимента у здоровых доноров в вакуумные пробирки с цитратом натрия 3,8% (соотношение кровь: цитрат составляло 9:1).

Тромбоциты для данной работы отмывались по следующему протоколу:

Перед центрифугированием к цельной крови добавлялись  $\text{PGI}_2$  (1 мкМ) и апираза (0,1 ед/мл). Затем кровь центрифугировалась в течение 10 минут при 150g и температуре 22 °С для получения богатой тромбоцитами плазмы (БТП). После отбора БТП инкубировалась в течение 5 минут при 37 °С. Перед следующим центрифугированием к БТП добавлялся цитрат натрия (109 мМ) в пропорции 1:3 (конечная концентрация 27,25 мМ). БТП центрифугировалась в течение 10 минут при 400g и температуре 22 °С. После отбора супернатанта осадок тромбоцитов ресуспендировался в буфере Tyrode's без кальция, инкубация в течение 5 минут при 37 °С. Далее производилось измерение концентрации тромбоцитов в суспензии на проточном цитометре. После этого к суспензии тромбоцитов снова добавлялся цитрат натрия (109 мМ) в пропорции 1:3 (конечная концентрация 27,25 мМ) перед центрифугированием. Суспензия тромбоцитов центрифугировалась в течение 10 минут при 400g и температуре 22 °С. После отбора супернатанта осадок тромбоцитов ресуспендировался в буфере Tyrode's с кальцием (2 мМ  $\text{CaCl}_2$ ) до фиксированной концентрации тромбоцитов 300 тыс/мкл.

#### *Получение обедненной тромбоцитами плазмы*

Для получения обедненной тромбоцитами плазмы (ОТП) цельная венозная кровь центрифугировалась при 1600g в течение 15 минут. Отобранная БТП повторно центрифугировалась при 10000g в течение 5 минут до получения ОТП.

#### *Агрегометрия*

Регистрация агрегации тромбоцитов осуществлялась по турбидиметрическому методу Борна на анализаторе агрегации Solar AP 2110. В ходе постановки суспензия отмытых тромбоцитов объемом 300 мкл непрерывно перемешивалась со скоростью 800 об/мин при температуре +37 °С. В качестве калибровочного

референса использовался буфер Tyrode's. Частота регистрации данных составляла 1 с-1. Для одной серии экспериментов использовались тромбоциты и плазма одного донора.

Запись всех постановок производилась непрерывно 30 минут или до достижения максимального светопропускания с выходом на «плато».

Для каждой постановки анализировались максимальная агрегация и время достижения 1/2 максимума агрегации, рассчитанное с помощью аппроксимации данных агрегометрии логистической кривой.

Для обработки данных использовались статистический пакет IBM SPSS Statistics 23 (IBM, США), программы Prism 9 Graphpad (Graphpad Software, США), OriginPro 2021 Learning Edition (OriginLab Corporation, США) и Microsoft Excel (Microsoft, США). Для оценки значимости различий между тремя и более независимыми выборками проводился анализ с помощью критерия Манна-Уитни. Критический уровень значимости принимался равным 5%.

### *Результаты и обсуждение*

*Ухудшение состояния опухолевых клеток после снятия с клеточной поверхности сокращает время агрегации.*

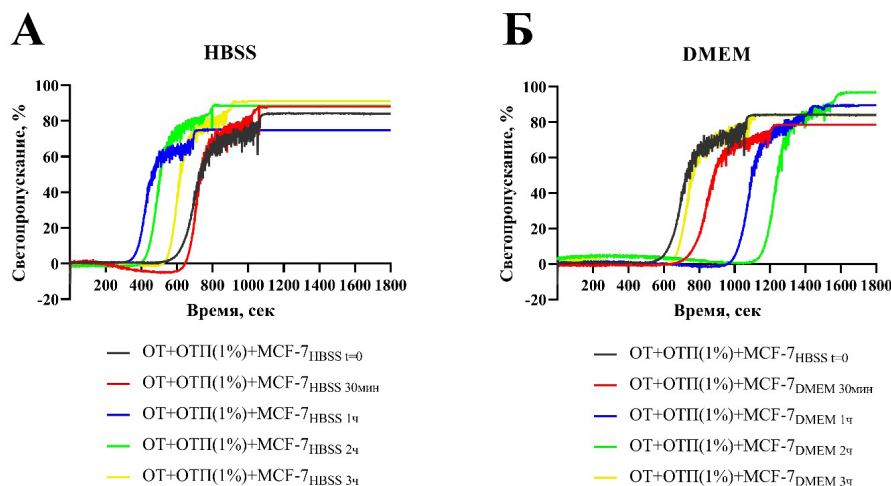
Суспензия опухолевых клеток разделялась между двумя пробирками в один экспериментальный день: в первой клетки сразу ресуспендировались в клеточном буфере HBSS, во второй оставались в питательной среде, в которой они были ресуспендированы после снятия с матраса.

Клетки из пробирки с буфером HBSS в течении 10-15 минут после снятия добавлялись к суспензии отмытых тромбоцитов в присутствии кальция и 1% плазмы. Данная постановка принималась контрольной для последующих. Далее пробирка помещалась в термостат с температурой 37 °С и с интервалами 30 мин, 1 час, 2 часа и 3 часа от старта контрольной постановки клетки добавлялись в повторные постановки (Рис.2А).

Клетки в пробирке с питательной средой после контрольной постановки помещались в термостат с температурой 37 °С и с интервалами 30 мин, 1 час, 2 часа и 3 часа от старта контрольной постановки часть клеточной суспензии центрифугировалась, ресуспендировалась в буфере Tyrode's и добавлялась в аналогичные постановки (Рис.2Б).

По результатам постановок с клетками в HBSS наблюдались статистически значимые изменения во времени агрегации по прошествии 3 часов в сравнении с контрольной постановкой (Рис.3В). Так пребывание опухолевых клеток в HBSS в течение 3 часов сократило время





**Рисунок 2.** Типичные кривые агрегации суспензии отмытых тромбоцитами плазмы (ОТ) в присутствии кальция и 1% обедненной тромбоцитами плазмы (ОТП) при добавлении опухолевых клеток линии MCF-7, инкубированных в HBSS (А) или в питательной среде DMEM (Б).

достижения 1/2 максимума агрегации в среднем на ~200 секунд. Также по прошествии 3 часов наблюдалось значимое увеличение средней мгновенной скорости агрегации в первые 10 минут постановки (Рис. 4А). На основании этого было сделано предположение, что при попадании в буфер вместо питательной среды клетки испытывают сильный стресс, индуцирующий апоптотические процессы в клетке, которые в свою очередь вызывают повышение экспрессии фосфатидилсерина и тканевого фактора на поверхности. Ранее в исследованиях было показано, что во взаимодействии между опухолевыми клетками и тромбоцитами ключевую роль играет плазменное свертывание крови: тромбоциты образуют с опухолевыми клетками гетеро-агрегат, активируясь от связывания тромбина и запутываясь в фибриновой сети, образующейся вокруг клетки в потоке, и тем самым защищают их от агрессивного воздействия кровотока [6]. Известно, что апоптотические опухолевые клетки демонстрируют повышенную экспрессию фосфатидилсерина и тканевого фактора [16]. Тканевой фактор, расположенный на поверхности опухолевых клеток, способен индуцировать внешний путь плазменного свертывания, результатом которого является запуск генерации тромбина и дальнейшее образование фибринового сгустка. Фосфатидилсериновые поверхности играют важную роль в плазменном каскаде свертывания, так как именно на них происходит сборка ключевых для процесса белковых комплексов [17]. Повышенная экспрессия ФС способна многократно усилить прокоагулянтный потенциал системы. Предположительно, именно повышение экспрессии фосфатидилсерина и тканевого фактора на клеточной поверхности при долгом пребывании клеток в буфере HBSS может являться причиной сокращения времени

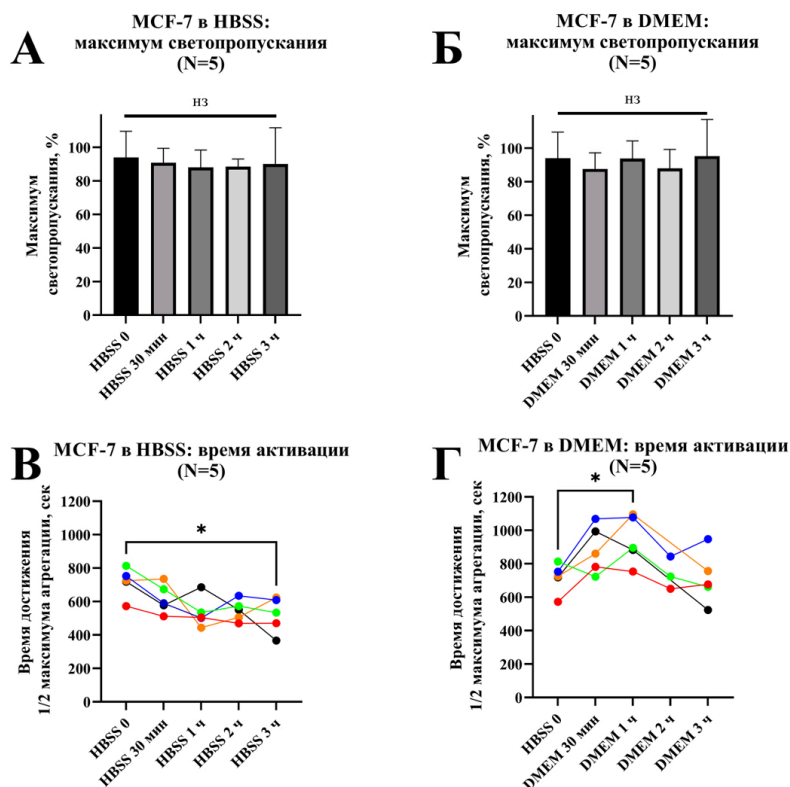
начала агрегации и увеличения средней скорости агрегации в исследуемой постановке. Данная гипотеза требует дальнейшего исследования с применением дополнительных методов в будущем.

Для клеток, инкубированных в среде, наблюдались статистически значимые изменения во времени агрегации по прошествии 1 часа в сравнении с контрольной постановкой. При добавлении клеток через 1 час после пребывания в среде наблюдалось увеличение времени достижения 1/2 максимума агрегации в среднем на ~200 секунд. С увеличением времени инкубации клеток в среде время активации увеличивается и достигает своего пика через 1 час после начала эксперимента, затем идет на спад и по прошествии 3 часов уравнивается с значением контрольной постановки (Рис.3Г). А также в отличие от инкубации в HBSS средняя мгновенная скорость в первые 10 минут агрегации оставалась в среднем постоянной и не изменялась значимо на протяжении 3 часов (Рис.4В). Согласно выдвинутой ранее гипотезе, возможно, нахождение в питательной среде вместо буфера HBSS после снятия поддерживает исходную витальность клеток на некоторое время, после чего клетки также начинают умирать, экспрессируя тканевой фактор и фосфатидилсерин.

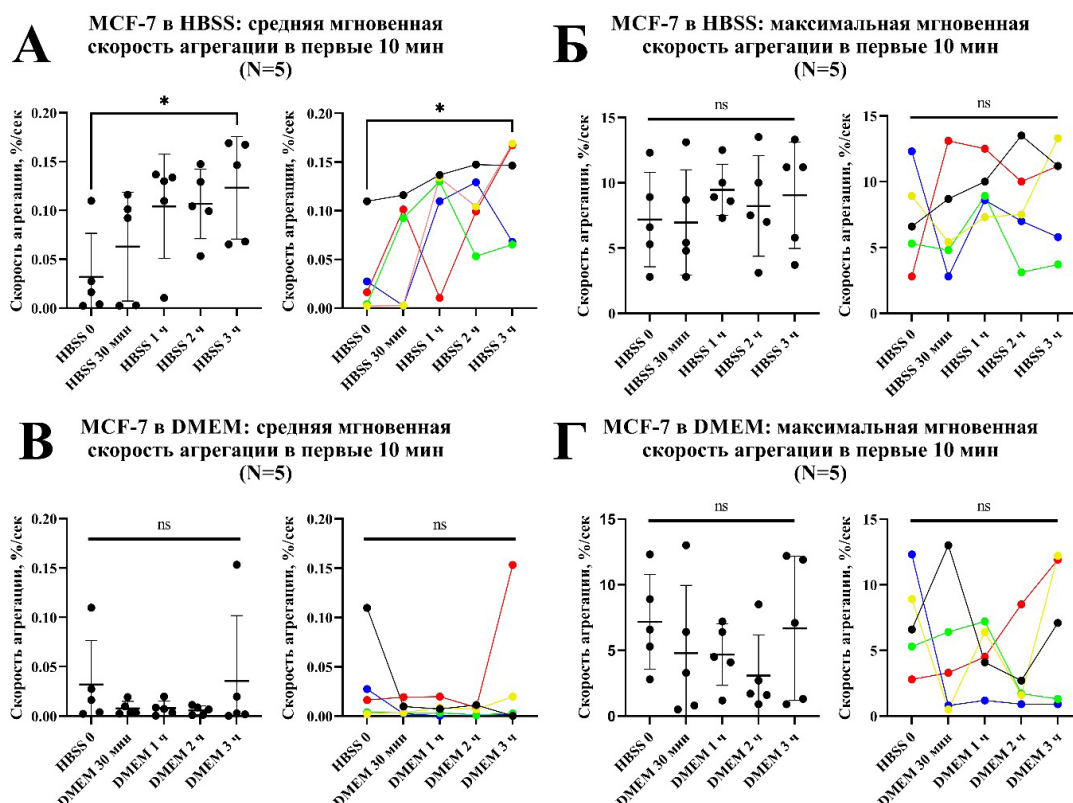
Значимых изменений в максимальном светопропускании (Рис. 3А, Б) и в максимальной мгновенной скорости в первые 10 мин постановки (Рис. 4Б, Г) в обоих случаях не наблюдалось.

### Заключение

Таким образом, эксперименты с инкубацией клеток в буфере и в питательной среде показали, что ухудшение состояния клеток после снятия с клеточной поверхности увеличивает среднюю мгновенную скорость агрегации и сокращает время начала агрегации тромбоцитов в присутствии плазмы и опухолевых клеток. Так



**Рисунок 3.** Агрегация суспензии отмытых тромбоцитов (ОТ) в присутствии кальция и 1% обедненной тромбоцитами плазмы (ОТП) при добавлении опухолевых клеток линии MCF-7, инкубированных в HBSS или в питательной среде DMEM (n=5). А, Б – максимальное светопропускание, В, Г – время достижения 1/2 максимума агрегации. \* –  $p < 0.05$



**Рисунок 4.** Агрегация суспензии отмытых тромбоцитов (ОТ) в присутствии кальция и 1% обедненной тромбоцитами плазмы (ОТП) при добавлении опухолевых клеток линии MCF-7, инкубированных в HBSS или в питательной среде DMEM (n=5). А, В – средняя мгновенная скорость агрегации в первые 10 мин постановки, Б, Г – максимальная мгновенная скорость агрегации в первые 10 мин постановки. \* –  $p < 0.05$

пребывание опухолевых клеток в буфере вместо клеточной среды в течение 3 часов сокращает время достижения 1/2 максимума агрегации в среднем на ~200 секунд. Зависимость экспрессии

тканевого фактора и фосфатидилсерина от условий инкубации клеток требует дополнительных исследований. Однако уже сейчас можно отметить, что пребывание клеток

в питательной среде по сравнению с буфером позволяет дольше поддерживать оптимальную степень витальности для воспроизводимости показателей агрегации в рамках одной серии экспериментов, что увеличивает возможное временное окно работы с опухолевыми клетками и делает это предпочтительным методом хранения клеток перед добавлением в постановку.

### Финансирование

Исследование поддержано грантом РНФ 23-45-10039.

### Этические аспекты

Исследование с образцами крови человека было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией этических принципов и надлежащей клинической практики и одобрено этическим комитетом ЦТФ ФХФ РАН (код протокола 2 от 06.04.2021).

### Список литературы

1. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, и A. Jemal, «Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries», *CA. Cancer J. Clin.*, т. 68, вып. 6, сс. 394–424, ноя. 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
2. A. S. Kim, A. A. Khorana, и K. R. McCrae, «Mechanisms and biomarkers of cancer-associated thrombosis», 1 ноябрь 2020 г., Mosby Inc. doi: 10.1016/j.trsl.2020.06.012.
3. S. Ikushima, R. Ono, K. Fukuda, M. Sakayori, N. Awano, и K. Kondo, «Trousseau's syndrome: Cancer-associated thrombosis», 1 март 2016 г., Oxford University Press. doi: 10.1093/jjco/hyv165.
4. S. S. McAllister и R. A. Weinberg, «The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis», *Nat. Cell Biol.*, т. 16, вып. 8, сс. 717–727, 2014, doi: 10.1038/ncb3015.
5. M. Labelle и R. O. Hynes, «The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination», *Cancer Discov.*, т. 2, вып. 12, сс. 1091–1099, дек. 2012, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0329.
6. I. Tesakov и др., «Fibrin as the mediator of tumor cell interaction with platelets», *J. Mol. Med.*, т. 103, вып. 10, сс. 1179–1190, окт. 2025, doi: 10.1007/s00109-025-02580-7.
7. M. A. Panteleev, A. N. Balandina, E. N. Lipets, M. V. Ovanesov, и F. I. Ataullakhanov, «Task-Oriented modular decomposition of biological networks: Trigger mechanism in blood coagulation», *Biophys. J.*, т. 98, вып. 9, сс. 1751–1761, 2010, doi: 10.1016/j.bpj.2010.01.027.
8. F. Ender и др., «Tissue factor activity on microvesicles from cancer patients», *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, т. 146, вып. 2, сс. 467–475, фев. 2020, doi: 10.1007/s00432-019-03073-0.
9. N. A. Podoplelova и др., «Blood coagulation in the 21st century: Existing knowledge, current strategies for treatment and perspective», *Pediatr. Hematol. Immunopathol.*, т. 19, вып. 1, сс. 139–157, 2020, doi: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-139-157.
10. N. MacKman и M. Taubman, «Tissue factor: Past, present, and future», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, т. 29, вып. 12, сс. 1986–1988, 2009, doi: 10.1161/ATVBAHA.109.198929.
11. J. W. Weisel и C. Nagaswami, «Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled», *Biophys. J.*, т. 63, вып. 1, сс. 111–128, 1992, doi: 10.1016/S0006-3495(92)81594-1.
12. D. Y. Nechipurenko, A. M. Shibeko, A. N. Sveshnikova, и M. A. Panteleev, «In Silico Hemostasis Modeling and Prediction», 1 ноябрь 2020 г., Georg Thieme Verlag. doi: 10.1055/a-1213-2117.
13. W. Ruf, N. Yokota, и F. Schaffner, «Tissue factor in cancer progression and angiogenesis», *Thromb. Res.*, т. 125, сс. S36–S38, 2010, doi: 10.1016/S0049-3848(10)70010-4.
14. M. Zarà, I. Canobbio, C. Visconte, J. Canino, M. Torti, и G. F. Guidetti, «Molecular mechanisms of platelet activation and aggregation induced by breast cancer cells», *Cell. Signal.*, т. 48, вып. February, сс. 45–53, 2018, doi: 10.1016/j.cellsig.2018.04.008.
15. E. Heinmöller и др., «Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines», Springer-Verlag, 1996.
16. C. E. Hagan и др., «Apoptotic cells promote circulating tumor cell survival and metastasis», *Commun. Biol.*, т. 8, с. 1121, июл. 2025, doi: 10.1038/s42003-025-08541-7.
17. S. A. Smith, R. J. Travers, и J. H. Morrissey, «How it all starts: Initiation of the clotting cascade», *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, т. 50, вып. 4, сс. 326–336, 2015, doi: 10.3109/10409238.2015.1050550.