

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА
И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 591

**Т-КАДГЕРИН ПОДАВЛЯЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК МЫШИНОЙ
МЕЛАНОМЫ V16F10 *in vitro* И ОПУХОЛЕВЫЙ АНГИОГЕНЕЗ НА МОДЕЛИ
ХОРИОАЛЛАНТОИСНОЙ МЕМБРАНЫ КУРИНОГО ЭМБРИОНА¹**

© 2010 г. Е. И. Юрлова, К. А. Рубина, В. Ю. Сысоева, Г. В. Шаронов, Е. В. Сёмина*,
Е. В. Парфёнова*, В. А. Ткачук

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
119192 Москва, Ломоносовский пр-т, д.31, корп. 5

*Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России
121552 Москва, 3-я Черепковская ул., д.15а

E-mail: rkseniya@mail.ru

Поступила в редакцию 19.12.08 г.

Окончательный вариант получен 08.02.10 г.

Исследовано влияние Т-кадгерина на пролиферацию и пигментацию клеток мышинной меланомы V16F10 в условиях *in vitro*, а также на рост и неоваскуляризацию опухолевых масс, сформированных клетками V16F10, на модели хориоаллантаоисной мембраны куриного эмбриона. Обнаружено, что в культуре клеток мышинной меланомы при гиперэкспрессии Т-кадгерина пролиферативная активность клеток по сравнению с контрольными клетками снижается. В экспериментах *in vivo* показано, что гиперэкспрессирующие Т-кадгерин клетки V16F10 хуже приживаются на хориоаллантаоисной мембране, чем контрольные. Кроме того, обнаружено, что контрольные клетки мышинной меланомы чаще, чем гиперэкспрессирующие Т-кадгерин клетки формируют опухоли площадью более 0.1 мм², а количество сосудов, подрастающих к опухолевым массам, сформированным гиперэкспрессирующими Т-кадгерин клетками, достоверно ниже аналогичного показателя для контрольных клеток. Таким образом, показано, что гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках V16F10 подавляет пролиферацию этих клеток *in vitro*, а также рост опухолевых масс, сформированных клетками меланомы на хориоаллантаоисной мембране, и их неоваскуляризацию *in vivo*.

Ключевые слова: Т-кадгерин, опухолевый ангиогенез, ангиогенез в хориоаллантаоисной мембране.

Т-кадгерин – уникальный представитель суперсемейства кадгеринов. В отличие от “классических” кадгеринов он не имеет ни трансмембранного, ни цитоплазматического доменов и удерживается на плазматической мембране при помощи гликозил-фосфатидилинозитольного (ГФИ) якоря (Ranscht, Dours-Zimmermann, 1991). Изначально Т-кадгерин был клонирован из эмбрионального мозга цыплят (Ranscht, Dours-Zimmermann, 1991); позднее был идентифицирован его гомолог у человека, названный кадгерин-13 (Tanihara et al., 1994), а также обнаружена его экспрессия в различных органах и тканях взрослого организма. Максимальный уровень экспрессии Т-кадгерина был выявлен в сердечно-сосудистой (Ivanov et al., 2001) и нервной системах (Takeuchi et al., 2000).

К настоящему времени установлена роль Т-кадгерина в регуляции роста нейронов в эмбриогенезе. Во время формирования задних конечностей кури-

ного эмбриона прорастающие к своим мишеням аксоны избегают тканей, где клетки экспрессируют Т-кадгерин. Таким образом, в клетках каудального склеротома и в формирующихся мышцах Т-кадгерин функционирует как молекула-навигатор, определяющая траекторию прорастания аксонов и место формирования синаптического контакта (Fredette, Ranscht, 1994). Культивирование нейронов на субстратах, содержащих рекомбинантный Т-кадгерин, приводит к ингибированию роста аксонов, что позволяет предположить гомофильный механизм взаимодействия между молекулами Т-кадгерина на соседних клетках (Fredette et al., 1996).

Известно, что некоторые молекулы участвуют в регуляции как ангиогенеза, так и нейрогенеза. Так, один из основных регуляторов ангиогенеза – сосудисто-эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor, VEGF) – может регулировать и нейрогенез, в частности определять жизнеспособность нейронов и прорастание аксонов (Cao et al., 2004; Bikfalvi, 2006). В свою очередь нейрорегуляторы, такие как сигнальные молекулы или их рецепторы, экспрессируются в сосудистой системе и участвуют в ангиогенезе (Autiero et al., 2005; Bikfalvi,

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 08-04-01024-а) и Федеральным агентством по науке и инновациям (госконтракт № 02.512.11.2222).

2006). Известно также, что формирование нервной и сердечно-сосудистой систем в эмбриогенезе происходит параллельно, в результате чего крупные сосуды и нервы во многих случаях располагаются в непосредственной близости друг от друга. Поскольку Т-кадгерин экспрессирован и в нервной, и в сердечно-сосудистой системах, мы предположили, что он, подобно действию в нервной системе, может играть роль молекулы-навигатора, определяющей траекторию роста сосудов (Рубина и др., 2007).

В сердечно-сосудистой системе Т-кадгерин экспрессируется в эндотелиальных и гладкомышечных клетках (ГМК), перичитах и кардиомиоцитах (Doyle et al., 1998; Ivanov et al., 2001). Мы также обнаружили, что экспрессия Т-кадгерина возрастает при различных заболеваниях, связанных с патологическим ангиогенезом. Так, было показано, что экспрессия Т-кадгерина возрастает в клетках сосудистой стенки при атеросклеротических поражениях и рестенозе (Ivanov et al., 2001; Kudrjashova et al., 2002a). С помощью баллонной ангиопластики у крысы было показано, что повышенная экспрессия Т-кадгерина коррелирует с поздними стадиями формирования неонгимы и совпадает с фазой активной миграции и пролиферации сосудистых клеток (Kudrjashova et al., 2002b). В сосудах, прорастающих в опухоль, была обнаружена повышенная экспрессия Т-кадгерина в эндотелиальных клетках (Wyder et al., 2000; Adachi et al., 2005). Эти данные позволяют предполагать, что Т-кадгерин играет важную роль в миграции и пролиферации сосудистых клеток, а также, возможно, участвует в регуляции ангиогенеза в норме и при патологии (Рубина и др., 2007). Также было обнаружено, что Т-кадгерин играет роль супрессора роста нейробластомы и опухолей многих органов, включая молочную железу, легкие, простату, мочевого пузыря (Lee, 1996; Sato et al., 1998; Takeuchi et al., 2000; Takeuchi, Ohtsuki, 2001). Трансфекция клеток карциномы молочной железы кДНК Т-кадгерина значительно подавляет пролиферацию клеток в культуре, что также сопровождается изменением фенотипа раковых клеток с инвазивного на фенотип, характерный для нормальных эпителиальных клеток (Lee, 1996). Гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках нейробластомы приводит к подавлению инвазии клеток, а также к потере их способности отвечать усилением пролиферации на добавление эпидермального фактора роста (epidermal growth factor, EGF) (Takeuchi et al., 2000). Гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках глиомы С6 сопровождается уменьшением клеточной миграции, а также подавлением роста и пролиферации клеток за счет остановки клеточного цикла на стадии G₂ (Huang et al., 2003).

В нашей работе на моделях *in vitro* и *in vivo* проведено исследование влияния Т-кадгерина на пролиферацию и пигментацию клеток мышинной меланомы В16F10, а также на способность клеток меланомы формировать опухолевые массы на хорио-аллантаинской мембране и на их неоваскуляризации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использованы клетки мышинной меланомы В16F10, выращенные в CO₂-инкубаторе в атмосфере с 5%-ным CO₂ при 37°C с использованием среды RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) ("HyClone", США), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2мМ L-глутамин ("GIBCO", США).

Трансфекция клеток мышинной меланомы и получение поликлональных культур. Клетки В16F10 стабильно подвергали трансфекции полноразмерной кДНК Т-кадгерина человека, клонированной в плазмиду для эукариотической экспрессии рсDNA3.1 ("Invitrogen", США) с устойчивостью к антибиотику гентимицину G418 ("Invitrogen", США) (Rubina et al., 2005). Путем отбора в среде, содержащей селективный антибиотик G418 в концентрации 2 мг/мл, получали поликлональную культуру клеток мышинной меланомы В16F10, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин. Для контрольных экспериментов клетки меланомы В16F10 подвергали трансфекции контрольной плазмидой рсDNA3.1 с устойчивостью к гентимицину G418 и путем отбора в среде, содержащей селективный антибиотик G418 в концентрации 2 мг/мл, получали поликлональную культуру контрольных клеток. Трансфекцию клеток проводили с использованием реагента Lipofectamine 2000 согласно протоколу фирмы-производителя ("Invitrogen", США). Гиперэкспрессию Т-кадгерина в клетках меланомы В16F10 (клетки Т⁺) подтверждали с помощью методов иммунофлуоресцентного окрашивания и иммуноблоттинга.

Иммунофлуоресцентная окраска клеток мышинной меланомы. За 1 сут до окраски контрольные и гиперэкспрессирующие Т-кадгерин клетки в стерильных условиях высевали на стекла, обработанные 5%-ным раствором Тритона X-100 ("ДиаЭм", Россия). Клетки перед окраской промывали буфером ФСБ ("Биолот", Россия) в течение 5 мин при комнатной температуре, а затем фиксировали в 4%-ном формальдегиде ("Panreac", Испания) в течение 10 мин. Далее стекла с фиксированными клетками промывали три раза по 5 мин в ФСБ и инкубировали 10 мин в 0.2%-ном растворе Тритона X-100. После трехкратной отмывки в ФСБ на препараты наносили нормальную сыворотку донора вторых антител (осла) (1 : 10, "Sigma", США) на 30 мин, после чего препараты вновь отмывали три раза по 5 мин в ФСБ, а затем наносили поликлональные антитела кролика против Т-кадгерина человека (1 : 100, "ProSci Inc.", США) на 60 мин. После трехкратной отмывки в ФСБ препараты помещали в раствор вторых антител осла, конъюгированных с флуорохромом Alexa594 ("Sigma", США) на 60 мин. Ядра клеток докрашивали флуоресцентным красителем DAPI ("Sigma", США). После трехкратной отмывки в ФСБ стекла заключали в среду Mounting Medium Vectashield™ ("Vector Lab.", США). Получен-

ные препараты анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200M, Германия. Документирование изображений производили с помощью цифровой видеокамеры AxioCam ("Zeiss", Германия) и программы Axiovision 3.1.

Иммуноблоттинг. Чашки Петри с культурой клеток V16F10 охлаждали на льду 30 мин, после чего три раза промывали холодным ФСБ по 5 мин. Затем к клеткам добавляли лизис-буфер: 100 мМ трис-HCl ("Sigma", США), pH 8.1; 1%-ный Тритон X-100 ("ДиаЭм", Россия), 5 мМ CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate, "Apllichem", Германия), 5 мМ ЭДТА ("ПанЭко", Россия), 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ, "Sigma", США), коктейль ингибиторов протеинкиназ (1 : 100, "Sigma", США) по 200 мкл на одну чашку Петри диаметром 100 мм. Клетки лизировали 15 мин, полученный лизат центрифугировали 30 мин при 30000 g и +4°C. Концентрацию тотального белка в лизатах клеток определяли на спектрофотометре Bio Photometer ("Eppendorf", США) по методу Брэдфорд при длине волны 595 нм (Bradford, 1976). Полученные лизаты хранили при температуре -20°C. Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в присутствии 20%-ного ДДС ("ДиаЭм", Россия) при постоянном напряжении 140 В. Анализируемые образцы смешивали с буфером, содержащим 4% β-меркаптоэтанола ("Sigma", США), и наносили на 7.5%-ный гель ДДС/ПАГ толщиной 1 мм из расчета 30 мкл раствора белков на лунку. Для определения молекулярных масс белков использовали стандартную коммерческую смесь предокрашенных белков ("BioRad", США). После электрофореза перенос белков из геля на PVDF-мембрану Immobilon ("Millipore", США), предварительно смоченную буфером для электропереноса, осуществляли с помощью метода полусухого электроблоттинга, используя прибор Trans-BLOT SD Semi-Dry Transfer Cell ("BioRad", США) при постоянном напряжении 25 В в течение 30 мин. После блоттинга мембрану промывали в буфере TBS/Tween (1.5 M NaCl, 100 мМ трис, 1% Tween 20 ("Sigma", США), а затем инкубировали в таком же буфере, содержащем 5%-ное обезжиренное молоко, в течение 14 ч при +4°C. Далее мембрану инкубировали с антителами кролика против Т-кадгерина (1 : 700, "Santa Cruz Biotechnology", США) в течение 60 мин при комнатной температуре. Мембрану промывали в TBS/Tween три раза по 15 мин и инкубировали в растворе вторых антител козла (1 : 25000, "Sigma", США) против антител кролика в течение 60 мин при комнатной температуре, а затем опять в три раза по 15 мин в том же буфере. Для визуализации белка, связавшегося с антителами, использовали двухкомпонентную ECL-систему и экспонировали мембраны с использованием пленки Superfilm ECL ("Amersham Biosci.", США).

Оценка пролиферации клеток мышшиной меланомы in vitro. Контрольные (T-V16F10) и гиперэкспрессирующие (T⁺V16F10) Т-кадгерин клетки мышши-

ной меланомы V16F10 в количестве 1×10^6 высевали на чашки Петри диаметром 60 мм. Каждые 24 ч клетки снимали с чашки с помощью 0.25%-ного раствора трипсина ("ПанЭко", Россия) и производили подсчет абсолютного числа клеток в камере Горяева. Общая длительность эксперимента составляла 120 ч.

Оценка распределения клеток мышшиной меланомы по фазам клеточного цикла с помощью метода проточной цитометрии. Клетки T-V16F10 и T⁺V16F10 мышшиной меланомы снимали с чашек с помощью 0.25%-ного раствора трипсина, который затем удаляли с помощью центрифугирования. После этого суспензию клеток фиксировали ледяным 70%-ным этанолом в течение 2 ч при -20°C и окрашивали в течение 30 мин при комнатной температуре раствором йодистого пропидия (50 мкг/мл), содержащем 200 мкг/мл РНКазы А ("Invitrogen", США) и 0.1% Тритона X-100. Содержание ДНК в клетках определяли по флуоресценции йодистого пропидия в диапазоне длин волн 60–625 нм (при возбуждении длинной волны 488 нм) методом проточной цитометрии с помощью клеточного сортера MoFlo ("DakoCytomation", Дания). Эксперимент повторяли четыре раза.

Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программы для математического анализа распределения клеток по стадиям клеточного цикла ModFit LT 3.2 ("Verity Software House", США). Для исключения клеточного дебриса, клеточных агрегатов и нестабильности сигнала исходные данные обрабатывали с использованием двумерных гистограмм: прямого светорассеяния, бокового светорассеяния; ширины импульса, прямого светорассеяния; времени, интенсивности флуоресценции Р1 соответственно. Для анализа клеточного цикла использовали одномерные гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции Р1. Различали три стадии клеточного цикла: G_0/G_1 , S и G_2/M . Для расчета относительного содержания клеток в этих фазах экспериментальную гистограмму описывали в виде линейной комбинации трех модельных функций распределения: для клеток в фазах G_0/G_1 и G_2/M использовали однокомпонентные гауссовы функции, а для фазы S — однокомпонентную трапецеидальную функцию.

Оценка степени пигментации культуры клеток мышшиной меланомы in vitro. За 1 сут до окраски клетки мышшиной меланомы T-V16F10 и T⁺V16F10 в стерильных условиях высевали на стекла, обработанные 5%-ным раствором Тритона X-100. Перед окраской стекла с клетками промывали буфером ФСБ и фиксировали в 4%-ном формальдегиде в течение 10 мин, после чего стекла с фиксированными клетками дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации (70, 96 и 100°), помещали на 5 мин в ксилол и заключали в среду Cytoseal XYL ("Richard-Allan Sci.", США). Производили подсчет числа пигментированных клеток на 1000 клеток в пяти полях зрения с помощью микроскопа Zeiss Axiovert 200M, Германия. Документирование изображений произ-

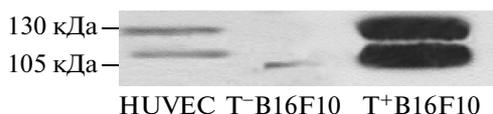


Рис. 2. Экспрессия Т-кадгерина клетками мышинной меланомы V16F10 (иммуноблоттинг лизатов клеток): T⁺V16F10 – клетки мышинной меланомы, гиперэкспрессирующие Т-кадгерин; T-V16F10 – контрольные клетки мышинной меланомы; HUVEC – эндотелиальные клетки пуповины человека (положительный контроль).

водили с помощью цифровой видеокамеры AxioCam (“Zeiss”, Германия) и обработки изображения в программе Axiovision 3.1. Эксперимент проводили в пяти параллелях и повторяли пять раз.

Модель хориоаллантаической мембраны куриного эмбриона. Для изучения ангиогенеза *in vivo* использовали модель хориоаллантаической мембраны куриного эмбриона по методике, описанной ранее (West et al., 2003). Яйца инкубировали при температуре 37°C. На 7-е сут инкубации клетки мышинной меланомы T-V16F10 и T⁺V16F10 имплантировали через окошко в скорлупе в хориоаллантаическую мембрану куриного эмбриона на 30–31-й стадии развития (Humburger, Hamilton, 1951). Клетки имплантировали в виде суспензии в среде для культивирования RPMI 1640 (10% ФБС, 100 ед/мл пеницилина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин). Общий объем вводимой под хориоаллантаическую мембрану среды, согласно описанной ранее методике (West et al., 2003), составлял 500 мкл, а концентрация клеток – 1 млн на 500 мкл среды. Хориоаллантаическую мембрану анализировали через 3 сут после введения клеток T-V16F10 и T⁺V16F10 с использованием стереомикроскопа Olympus SZX 16 и камеры AxioCam HRc (“Zeiss”, Германия) и программного обеспечения AxioVision 3.1.

Статистический анализ данных проводили с использованием программы Statistica 6.0, применяя непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Данные выражали в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, а m – стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы V16F10. Гиперэкспрессию Т-кадгерина после трансфекции плазмидой pcDNA3.1, содержащей кДНК Т-кадгерина, с последующей селекцией на антибиотике G418 подтверждали с помощью метода иммунофлуоресцентного окрашивания клеток (рис. 1, вклейка) и иммуноблоттинга (рис. 2) лизатов клеток мышинной меланомы. В культуре клеток меланомы T⁺V16F10, как и в культивируемых эндотелиальных клетках HUVEC, Т-кадгерин экспрессируется в виде предшественника и зрелой формы с

молекулярными массами 130 и 105 кДа соответственно (рис. 2).

Исследование влияния экспрессии Т-кадгерина на пролиферацию клеток мышинной меланомы in vitro. Пролиферацию клеток мышинной меланомы T-V16F10 и T⁺V16F10 в культуре оценивали, подсчитывая их число на чашках Петри каждые 24 ч в течение 120 ч. Через 120 ч культивирования число контрольных (T-V16F10) клеток увеличилось в 26.99 раз, тогда как число T⁺V16F10 – всего в 13.3 раза. Различия в числе клеток через 24, 48, 96 и 120 ч были статистически значимы ($p < 0.05$) (рис. 3).

Таким образом, клетки мышинной меланомы T⁺V16F10 хуже пролиферируют *in vitro* по сравнению с контрольными.

Исследование влияние экспрессии Т-кадгерина на распределение клеток мышинной меланомы по фазам клеточного цикла. С помощью окрашивания ДНК клеток мышинной меланомы флуоресцентным красителем йодистым пропидием и последующего однопараметрического анализа гистограмм распределения ДНК с использованием проточной цитометрии было обнаружено, что средний процент контрольных клеток (T-V16F10), находящихся в фазах G₂/M клеточного цикла, составляет 14.3 ± 1.4 , тогда как для клеток T⁺V16F10 аналогичный показатель равен 3.8 ± 1.9 (рис. 4). Также были выявлены достоверные различия по количеству клеток, находящихся в фазе клеточного цикла S: для контрольных клеток этот показатель составлял 10.7 ± 1.9 , а для клеток T⁺V16F10 – 35.9 ± 1.0 (рис. 4).

Таким образом, в ходе исследования были обнаружены изменения в распределении клеток мышинной меланомы T⁺V16F10 по стадиям клеточного цикла по сравнению с контрольными T-V16F10, в том числе наблюдали достоверное увеличение количества клеток T⁺V16F10 в S-фазе и снижение их в фазах G₂/M клеточного цикла. Эти изменения в структуре клеточного цикла клеток меланомы при гиперэкспрессии Т-кадгерина, вероятно, и приводят к значительному снижению роста этих клеток *in vitro*.

Исследование влияния экспрессии Т-кадгерина на степень пигментации культуры клеток мышинной меланомы in vitro. При исследовании влияния Т-кадгерина на степень пигментации культуры клеток мышинной меланомы было обнаружено, что средний показатель числа пигментированных T⁺V16F10-клеток на 1000 клеток составляет 27 ± 1.47 , для контрольных (T-V16F10) клеток аналогичный показатель равен 20 ± 1.43 (рис. 5). Таким образом, гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках меланомы вызывает достоверное увеличение количества пигментированных клеток в популяции по сравнению с контролем.

Влияние Т-кадгерина на способность клеток мышинной меланомы V16F10 формировать опухоли на хориоаллантаической мембране куриного эмбриона. Для выявления такого влияния под хориоаллантаическую мембрану куриного эмбриона вводили

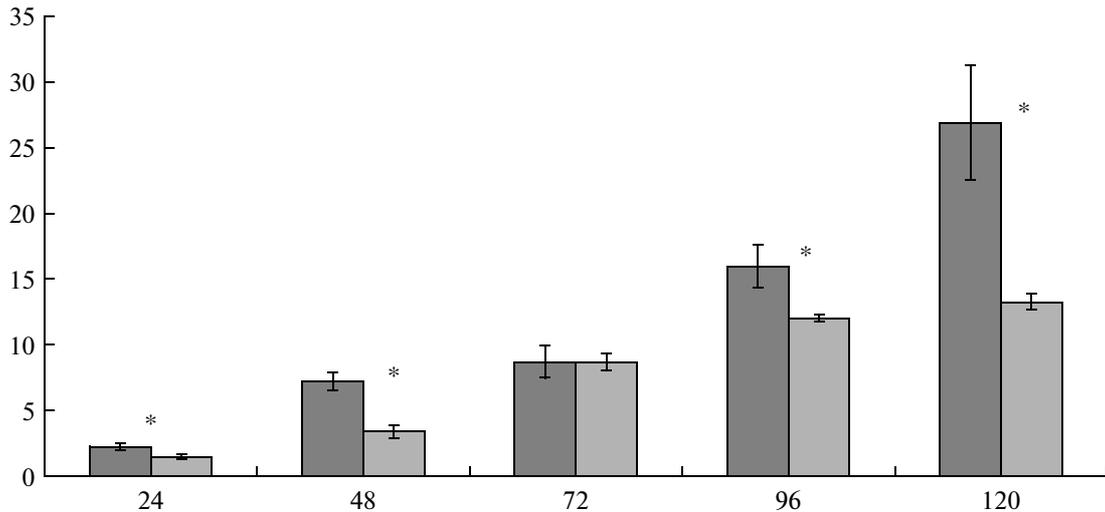


Рис. 3. Сравнение контрольных (T⁻V16F10, ■) и гиперэкспрессирующих Т-кадгерин (T⁺V16F10, □) клеток мышиной меланомы по пролиферативной активности *in vitro*.

По оси абсцисс – время культивирования, ч; по оси ординат – общее число клеток, ×10⁶.

* Различия достоверны, *p* < 0.05.

клетки T⁻V16F10 и T⁺V16F10 в виде суспензии в ростовой среде RPMI 1640 и анализировали количество, состав и васкуляризацию формирующихся опухолевых масс. Всего в эксперименте использовали 223 куриных яйца; шесть яиц служили контролем среды: в два яйца вводили ростовую среду RPMI 1640, в другие два – RPMI 1640 + 10% ФБС, в последние два – ФБС.

После введения клеток через 3–4 сут на поверхности хориоаллантаической мембраны куриного эмбриона наблюдали формирование различного числа опухолевых масс: от 0 до 10 при введении кон-

трольных клеток T⁻V16F10 и от 0 до 6 при введении клеток T⁺V16F10. При увеличении срока культивирования клеток *in vivo* на поверхности хориоаллантаической мембраны с 3 до 7 сут число и размер опухолевых масс существенно не изменялись. В контрольных экспериментах не наблюдали проявления воспалительных реакций.

При сравнительном анализе способности клеток мышиной меланомы T⁻V16F10 и T⁺V16F10 приживаться и формировать опухолевые массы на хориоаллантаической мембране было обнаружено, что клетки T⁺V16F10 по сравнению с T⁻V16F10 реже

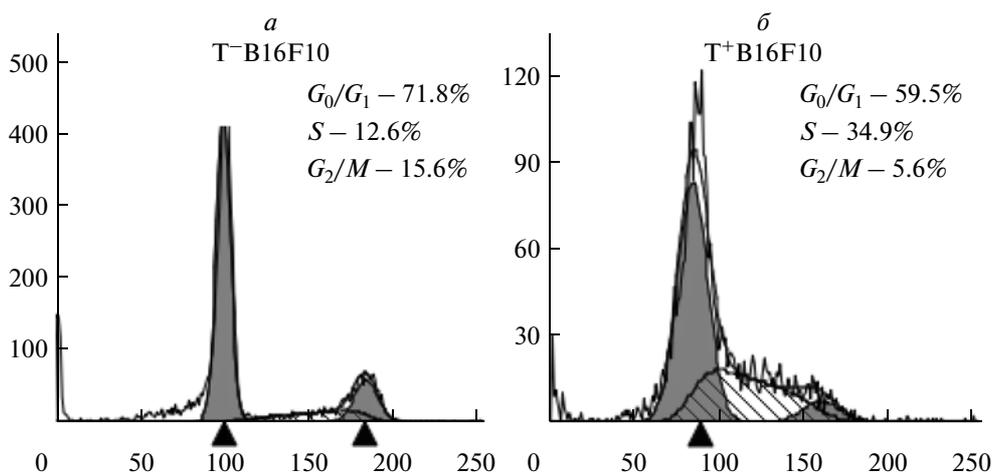


Рис. 4. Распределение контрольных (а) и гиперэкспрессирующих Т-кадгерин (б) клеток мышиной меланомы по фазам клеточного цикла: G₀/G₁ (■), S (▨), G₂/M (■). Экспериментальные гистограммы (“шумная” кривая) представлены в виде линейной комбинации модельных функций распределения; относительное содержание клеток в фазах G₀/G₁, S и G₂/M отмечено на гистограммах.

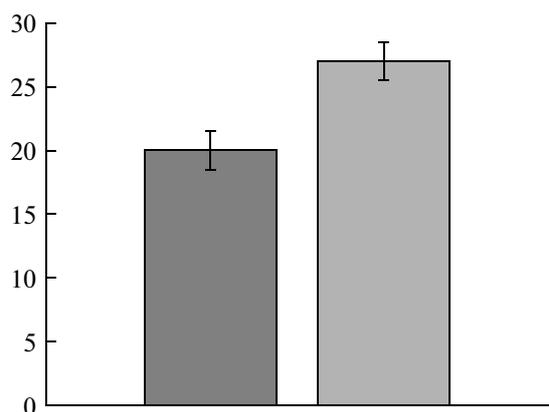


Рис. 5. Сравнение степени пигментации культуры контрольных (■) и гиперэкспрессирующих Т-кадгерин (■) клеток мышинной меланомы, число пигментированных клеток на 1000 клеток.

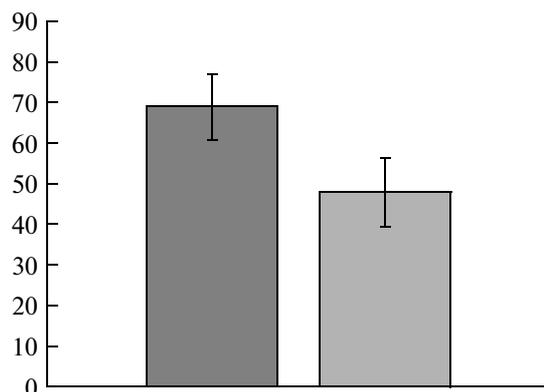


Рис. 6. Сравнение контрольных (■) и гиперэкспрессирующих Т-кадгерин (■) клеток мышинной меланомы по их способности приживаться на хориоаллантаоической мембране куриного эмбриона, % выживаемости.

приживаются. Клетки T⁺V16F10 формировали опухолевые массы в 48 ± 8.48 , а T⁻V16F10 – в $69 \pm 8.1\%$ случаев (рис. 6).

При сравнительном анализе размеров (крупные и небольшие) и степени пигментации (пигментированные и непигментированные или слабо пигментированные) опухолевых масс на хориоаллантаоической мембране были обнаружены различные варианты формирования опухолей как при введении клеток T⁻V16F10, так и T⁺V16F10.

Влияние Т-кадгерина на размер формирующихся опухолевых узлов на хориоаллантаоической мембране. Крупными опухолевыми массами считали образования площадью > 0.1 , небольшими – < 0.1 мм² (рис. 7, вклейка). При наличии на хориоаллантаоической мембране нескольких опухолей проводили сравнение по площади наиболее крупной. Было обнаружено, что на хориоаллантаоической мембране клетки мышинной меланомы T⁺V16F10 в $45.5 \pm 5.9\%$ случаев формируют опухолевые массы площадью > 0.1 мм², в то время как клетки меланомы T⁻V16F10 формируют такие же опухолевые массы в $60 \pm 6.1\%$ случаев (рис. 8). Таким образом, экспрессия Т-кадгерина в клетках меланомы влияет на размер формирующихся на хориоаллантаоической мембране опухолей: при гиперэкспрессии Т-кадгерина клетки меланомы достоверно формируют более мелкие опухолевые образования, чем контрольные.

Следует отметить, что в тех случаях, когда клетки T⁺V16F10 формировали на хориоаллантаоической мембране куриного эмбриона опухолевые массы площадью > 0.1 мм², внутри них наблюдалось образование крупных лакун, заполненных кровью (рис. 9, вклейка). Ранее Маниотис с коллегами наблюдали образование аналогичных лакун в клетках меланомы человека как *in vivo*, так и *in vitro* (Maniotis et al., 1999).

Влияние Т-кадгерина на степень пигментации опухолевых масс на хориоаллантаоической мембране. Пигментированными считали опухолевые массы, полностью состоящие из клеток, окрашенных в черный цвет за счет содержания в них большого количества меланина (рис. 10, вклейка); слабо пигментированными – опухолевые массы коричневого цвета, состоящие из клеток, содержащих небольшое количество меланина (рис 11, а, вклейка), и светлые опухолевые массы с небольшими вкраплениями клеток, окрашенных в черный цвет; непигментированными – светлые образования, состоящие из клеток, не содержащих меланина (рис. 11, б).

Было обнаружено, клетки мышинной меланомы T⁺V16F10 в $73.9 \pm 9\%$ случаев формируют на хориоаллантаоической мембране куриного эмбриона пигментированные опухолевые массы, тогда как контрольные клетки T⁻V16F10 – лишь в $42.9 \pm 11\%$ случаев (рис. 12). Таким образом, экспрессия Т-кадгерина влияет на пигментацию клеток мышинной меланомы *in vivo*: при его гиперэкспрессии увеличивается либо количество клеток, продуцирующих меланин, либо степень пигментации опухолевых клеток по сравнению с контролем.

Влияние Т-кадгерина на ангиогенез на модели хориоаллантаоической мембраны. Было проанализировано число сосудов, прорастающих к опухолевым массам, сформированным клетками меланомы T⁻V16F10 и T⁺V16F10. При анализе учитывали все сосуды (крупные и мелкие), по периметру врастающие в самую крупную опухоль, сформированную клетками T⁻V16F10 или T⁺V16F10. Средний показатель числа сосудов, прорастающих к опухолевым массам, сформированным клетками T⁺V16F10, составляет 3.1 ± 0.49 , аналогичный же показатель для опухолевых масс, сформированных контрольными клетками, составляет 7.1 ± 0.83 (рис. 13).

Таким образом, экспрессия Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы влияет на васкуляризацию опухолевых масс: при его гиперэкспрессии число сосудов, подрастающих к опухоли, оказывается достоверно меньше, чем в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного исследования было обнаружено, что в культуре клеток мышинной меланомы V16F10 при гиперэкспрессии Т-кадгерина достоверно снижается пролиферация по сравнению с таковой контрольных клеток: через 24, 48, 96 и 120 ч культивирования количество клеток в культуре, гиперэкспрессирующей Т-кадгерин, было достоверно меньше, чем в контроле. Эти данные были подтверждены результатами окрашивания ДНК клеток мышинной меланомы флуоресцентным красителем йодистым пропидием и с помощью последующего однопараметрического анализа гистограммы распределения ДНК с использованием проточной цитометрии. Было обнаружено, что в культуре клеток $T^+V16F10$ количество клеток, находящихся на стадии G_2/M клеточного цикла, достоверно ниже, чем в контроле. В то же время наблюдали достоверное увеличение количества клеток, находящихся в фазе S клеточного цикла при гиперэкспрессии Т-кадгерина по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют о том, что гиперэкспрессия Т-кадгерина подавляет пролиферативную активность клеток мышинной меланомы в культуре и, возможно, вызывает задержку клеток в фазе S клеточного цикла.

In vivo на модели хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона мы обнаружили, что Т-кадгерин влияет на способность клеток приживаться: клетки $T^+V16F10$ достоверно реже приживались на мембране, чем контрольные. Кроме того, было показано, что эти клетки в меньшем проценте случаев, чем контрольные, формируют на хориоаллантоисной мембране опухолевые массы размером $> 0.1 \text{ мм}^2$. Эти особенности мы предположительно объясняем обнаруженным нами в экспериментах *in vitro* супрессорным влиянием Т-кадгерина на пролиферацию клеток меланомы. Таким образом, исходя из полученных как *in vitro*, так и *in vivo* данных можно предположить, что Т-кадгерин подавляет пролиферацию клеток меланомы V16F10.

В настоящей работе в результате анализа, проведенного на культивируемых клетках *in vitro*, было обнаружено, что при гиперэкспрессии Т-кадгерина увеличивается степень пигментации культуры клеток мышинной меланомы V16F10 по сравнению с контрольными клетками. На модели хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона обнаружено, что клетки мышинной меланомы $T^+V16F10$ в большинстве случаев формируют пигментированные опухолевые массы, тогда как контрольные - чаще непигментированные или слабо пигментированные. В целом уровень пигментации клеток мышинной

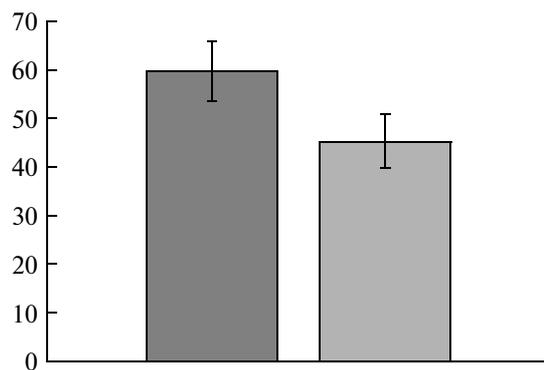


Рис. 8. Сравнение контрольных (■) и гиперэкспрессирующих Т-кадгерин (■) клеток мышинной меланомы по размеру опухолевых масс, формирующихся на хориоаллантоисной мембране куриного эмбриона, % опухолевых масс площадью $> 0.1 \text{ мм}^2$.

ной меланомы V16F10, т.е. степень развития меланосом и наличие пигментированных меланоцитов, отражает степень дифференцировки опухоли (Райхлин и др., 2003). Потеря способности к дифференцировке у большей части опухолевых клеток коррелирует с неконтролируемым ростом опухоли. Известно, что одним из подходов к противоопухолевой терапии является поиск средств, стимулирующих дифференцировку опухолевых клеток.

Таким образом, можно предполагать, что в клетках мышинной меланомы V16F10 Т-кадгерин участвует в регуляции пролиферации опухолевых клеток, а также, возможно, влияет на дифференцировку опухолевых клеток.

Из литературных данных известно, что в нервной системе куриного эмбриона Т-кадгерин функционирует как молекула, определяющая направление роста аксонов мотонейронов (Fredette, Ranscht, 1994). Т-кадгерин экспрессируется на конусе роста аксона, а также на клетках каудальной части скле-

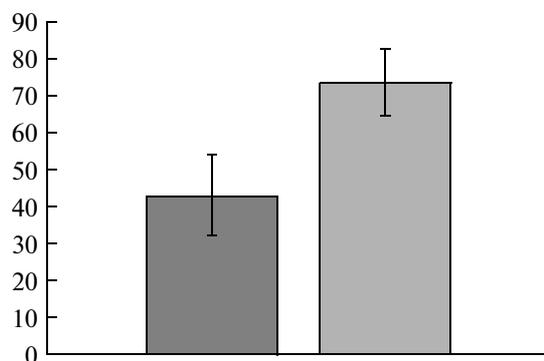


Рис. 12. Сравнение контрольных (■) и гиперэкспрессирующих Т-кадгерин (■) клеток по степени пигментации сформированных опухолевых масс на хориоаллантоисной мембране, % пигментированных опухолевых масс.

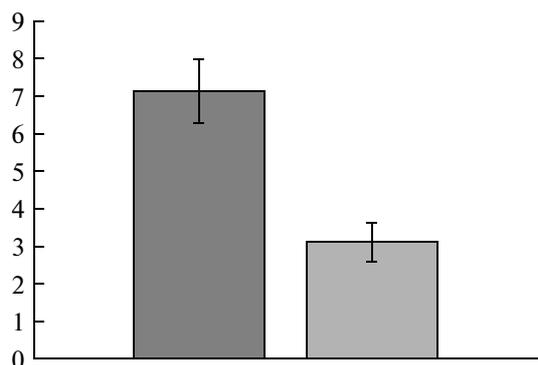


Рис. 13. Число сосудов, прорастающих к опухолевым массам, сформированным Т-кадгерин-гиперэкспрессирующими (■) и контрольными (■) клетками мышечной меланомы на хориоаллантоисной мембране.

ротом и на поверхности формирующейся мышцы, за исключением будущего синаптического контакта. Растущие аксоны избегают тканей, где клетки экспрессируют Т-кадгерин (Fredette, Ranscht, 1994). Кроме того, было обнаружено, что Т-кадгерин ингибирует рост аксонов нейронов, культивируемых *in vitro* на пластике, покрытом рекомбинантным Т-кадгеринном (Fredette et al., 1996). Из полученных данных авторы сделали вывод о том, что в основе негативного регулирования роста аксонов мотонейронов к мышечным мишеням *in vivo* лежит механизм гомофильного взаимодействия между молекулами Т-кадгерина на соседних клетках, в результате которого происходит “отталкивание” клеток и избегание аксонами тканей, где экспрессируется Т-кадгерин (Fredette et al., 1996).

Известно, что некоторые факторы, регулирующие развитие нервной системы, также способны регулировать и развитие сердечно-сосудистой системы. Это характерно для семафоринов и их рецепторов (плексинов и нейропилинов), нейтринов и их рецепторов (DCC/неогенина и Unc5), слит-лигандов и их рецепторов Robo, эфринов и эфриновых рецепторов (Weinstein, 2005). Для эфринов и их рецепторов, которые являются навигационными молекулами, регулируемыми в эмбриогенезе траекторию роста аксонов, формирование границ ромбомеров в заднем мозгу, миграцию и дифференцировку клеток нервной (Wang, Anderson, 1997) и сердечно-сосудистой систем (Adams et al., 1999), известно также, что они участвуют в регуляции опухолевого ангиогенеза (Ogawa et al., 2000). Эфрины класса А являются, как и Т-кадгерин, ГФИ-заякоренными молекулами (Eph nomenclature ..., 1997). Механизм передачи сигнала внутрь клетки через ГФИ-заякоренные эфрины до конца неясен, однако известно, что при его передаче происходит кластеризация эфринов А в липидных плотках и/или взаимодействие с адапторными белками (Gauthier, Robbins, 2003; Sharfe et al., 2003; Walker-Daniels et al., 2002). Возможно, что механизмы передачи сигнала

внутри клетки с участием Т-кадгерина, который также является ГФИ-заякоренным белком, сходны с механизмами передачи сигнала от эфринов класса А.

Известно, что высокий уровень экспрессии Т-кадгерина наблюдается не только в нервной, но и в сердечно-сосудистой системе: в сердце, аорте, сонной, подвздошной и почечных артериях (Ivanov et al., 2001). Мы предположили, что Т-кадгерин может служить регуляторной молекулой не только при нейрогенезе, но и при формировании сосудов. В нашей лаборатории на модели подкожной имплантации матригеля были получены данные, подтверждающие эту гипотезу. Было обнаружено, что при введении клеток L929, экспрессирующих Т-кадгерин, в матригеле мышам линии NUDE наблюдается достоверное уменьшение количества сосудов среднего диаметра и капилляров, прорастающих в матригель, по сравнению с контролем. При этом в экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что Т-кадгерин подавляет начальные этапы ангиогенеза – миграцию эндотелиальных клеток и формирование капилляров, – но не влияет на созревание сосудов (Rubina et al., 2007).

Основным процессом, в результате которого происходит неоваскуляризация опухолей, является ангиогенез – формирование сосудов за счет миграции и пролиферации эндотелиальных клеток из предсуществующего сосуда (Risau, 1997). Для исследования роли Т-кадгерина в прорастании сосудов при опухолевом росте *in vivo* мы выбрали модель хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона и обнаружили, что число сосудов, прорастающих к опухолевым массам, сформированным клетками T⁺V16F10, достоверно меньше аналогичного показателя для опухолевых масс, сформированных контрольными клетками. Возможно, что Т-кадгерин выполняет функцию навигационной молекулы и вызывает “отталкивание” мигрирующих в содержащую Т-кадгерин опухоль эндотелиальных клеток или прорастающих сосудов.

О роли Т-кадгерина в опухолевом ангиогенезе известно немного. Так, при формировании легочных метастазов карциномы Льюиса уровень экспрессии Т-кадгерина в сосудах, прорастающих в опухоль, повышается, в то время как в окружающей ткани Т-кадгерин не выявляется (Wyder et al., 2000). В гепатоклеточной карциноме экспрессия Т-кадгерина в эндотелиальных клетках капилляров, прорастающих в опухоль, увеличивается, в то время как в окружающей ткани и в нормальной печени Т-кадгерин не детектируется (Adachi et al., 2005). На основе полученных данных авторы делают вывод о том, что увеличение экспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках сосудов, прорастающих в опухоль, коррелирует с повышенным уровнем ангиогенеза. Однако в описанных исследованиях, как правило, основное внимание уделяется экспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках сосудов, но при этом не учитывается экспрессия Т-кадгерина в

опухолевых клетках или клетках стромы и ее возможное влияние на процессы опухолевого ангиогенеза. В отличие от этих работ мы для исследования опухолевого ангиогенеза использовали модель хориоаллантаоисной мембраны, на которой анализировали влияние Т-кадгерина, гиперэкспрессированного в опухолевых клетках, на прорастание сосудов в опухоль. Клетки меланомы, введенные под хориоаллантаоисную мембрану, при этом создавали микроокружение с высоким содержанием Т-кадгерина, что приводило к уменьшению количества прорастающих к опухоли кровеносных сосудов по сравнению с контролем. Возможно, механизм подавления роста сосудов с участием Т-кадгерина аналогичен механизму контактного ингибирования роста аксонов при формировании нервной системы (Fredette et al., 1996; Rubina et al., 2007). При контакте мигрирующих эндотелиальных клеток, эндогенно экспрессирующих Т-кадгерин, с клетками опухоли меланомы, гиперэкспрессирующими Т-кадгерин, происходит гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина на поверхности эндотелиальных клеток и клеток опухоли и “отталкивание”, что и приводит к подавлению ангиогенеза.

Известно, что опухоли, не способные индуцировать прорастание новых сосудов и капилляров питаются за счет диффузии и не превышают размер 1–2 мм³ (Folkman, 1992). В отсутствие васкуляризации опухоли могут подвергаться некрозу или апоптозу (Holmgren et al., 1995; Parangi et al., 1996), в то время как прорастание новых сосудов в опухоль способствует ее росту и метастазированию. Полученные нами на модели хориоаллантаоисной мембраны данные о том, что гиперэкспрессирующие Т-кадгерин клетки линии меланомы В16F10 в меньшем проценте случаев, чем контрольные, формируют крупные опухолевые массы площадью > 0.1 мм², а число прорастающих сосудов к таким опухолевым массам достоверно меньше, чем в контроле, позволяют предположить, что Т-кадгерин ингибирует рост опухоли не только за счет подавления пролиферации самих опухолевых клеток, но и за счет ингибирования опухолевого ангиогенеза.

Авторы выражают благодарность Г.Е. Онищенко за помощь в обсуждении полученных результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Райхлин Н.Т., Небольсин В.Е., Желтухина Г.А. и др. Дифференцировка клеток меланомы человека под действием препарата дикарбамин (ультраструктурное исследование) // *Вопр. онкологии*. 2003. Т. 49. С. 351–358.
- Рубина К.А., Калинина Н.И., Парфёнова Е.В. и др. Т-кадгерин как рецептор, участвующий в регуляции ангиогенеза и ремоделирования кровеносных сосудов // *Биол. мембраны*. 2007. Т. 24. № 1. С. 65–72.
- Adachi Y., Takeuchi T., Sonobe H. et al. An adiponectin receptor, T-cadherin, was selectively expressed in intratumoral capillary endothelial cells in hepatocellular carcinoma: possible cross talk between T-cadherin and FGF-2 pathways // *Virchows Arch*. 2005. V. 5. P. 1–8.
- Adams R.H., Wilkinson G.A., Weiss C. et al. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis and sprouting angiogenesis // *Genes. Devel*. 1999. V. 13. P. 295–306.
- Autiero M., De Smet F., Claes F. et al. Role of neural guidance signals in blood vessel navigation // *Cardiovasc. Res*. 2005. V. 65. P. 629–638.
- Bikfalvi A. Angiogenesis: health and disease // *Ann. Oncol*. 2006. V. 17. P. 65–70.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Ann. Biochem*. 1976. V. 72. P. 248–254.
- Cao L., Jiao X., Zuzga D.S. et al. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory // *Nat. Genet*. 2004. V. 36. P. 827–835.
- Doyle D.D., Goings G.E., Upshaw-Earley J. et al. T-cadherin is a major glycosphosphoinositol-anchored protein associated with noncaveolar detergent-insoluble domains of the cardiac sarcolemma // *J. Biol. Chem*. 1998. V. 273. P. 6937–6943.
- Eph nomenclature committee. Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins // *Cell*. 1997. V. 90. P. 403–404.
- Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth // *Semin. Cancer Biol*. 1992. V. 3. P. 65–71.
- Fredette B.J., Ranscht B. T-cadherin expression delineates specific regions of the developing motor axon-hindlimb projection pathway // *J. Neurosci*. 1994. V. 14. P. 7331–7346.
- Fredette B.J., Miller J., Ranscht B. Inhibition of motor axon growth by T-cadherin substrata // *Development*. 1996. V. 122. P. 3163–3171.
- Gauthier L.R., Robbins S.M. Ephrin signaling: one raft to rule them all? One raft to sort them? One raft to spread their call and in signaling bind them? // *Life Sci*. 2003. V. 74. P. 207–216.
- Hamburger V., Hamilton H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo // *J. Morphol*. 1951. V. 88. P. 49–92.
- Holmgren L., O'Reilly M.S., Folkman J. Dormancy of micrometastases: balance proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression // *Nat. Med*. 1995. V. 1. P. 149–153.
- Huang Z.Y., Wu Y., Hedrick N. et al. T-cadherin-mediated cell growth regulation involves G₂ phase arrest and requires p21 (CIP1/WAF1) expression // *Mol. Cell. Biol*. 2003. V. 23. P. 566–578.
- Ivanov D., Philippova M., Antropova J. et al. Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature // *Histochem. Cell. Biol*. 2001. V. 115. P. 231–242.
- Kudrjashova E., Bashtrikov P., Bochkov V. et al. Expression of adhesion molecule T-cadherin is increased during neointima formation in experimental restenosis // *Ibid*. 2002a. V. 118. P. 281–290.
- Kudrjashova E.Iu., Bashtrikov P.P., Ivanov D.B. et al. Expression of T-cadherin in the rat carotid artery wall after balloon injury and in different rat organs // *Tsitologiya*. 2002b. V. 44. P. 285–295.

- Lee S.W. H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer // *Nat. Med.* 1996. V. 2. P. 229–235.
- Maniotis A.J., Folberg R., Hess A. et al. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry // *Am. J. Pathol.* 1999. V. 155. № 3. P. 739–752.
- Ogawa K., Pasqualini R., Lindberg R.A. et al. The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization // *Oncogene.* 2000. V. 19. P. 6043–6052.
- Parangi S., O'Reilly M., Christofori G. et al. Angiogenesis therapy of transgenic mice impairs *de novo* tumor growth // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 2002–2007.
- Ranscht B., Dours-Zimmermann M.T. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region // *Neuron.* 1991. V. 7. № 3. P. 391–402.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis // *Nature.* 1997. V. 386. P. 671–674.
- Rubina K., Talovskaya E., Cherenkov V. et al. LDL induces intracellular signaling via atypical LDL-binding protein T-cadherin // *Mol. Cell. Biochem.* 2005. V. 273. P. 33–41.
- Rubina K., Kalinina N., Potekhina A. et al. T-cadherin suppresses angiogenesis *in vivo* by inhibiting migration of endothelial cells // *Angiogenesis.* 2007. V. 10. P. 183–195.
- Sato M., Mori Y., Sakurada A. et al. The H-cadherin (CDH13) gene is inactivated in human lung cancer // *Hum. Genet.* 1998. V. 103. P. 96–101.
- Sharfe N., Freywald A., Toro A. et al. Ephrin-A1 induces c-Cbl phosphorylation and EphA receptor down-regulation in T cells // *J. Immunol.* 2003. V. 170. P. 6024–6032.
- Takeuchi T., Ohtsuki Y. Recent progress in T-cadherin (CDH13, H-cadherin) research // *Histol. Histopathol.* 2001. V. 16. P. 1287–1293.
- Takeuchi T., Misaki A., Liang S.B. et al. Expression of T-cadherin (CDH13, H-cadherin) in human brain and its characteristics as a negative growth regulator of epidermal growth factor in neuroblastoma cells // *J. Neurochem.* 2000. V. 74. P. 1489–1497.
- Tanihara H., Sano K., Heimark R.L. et al. Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin // *Cell Adhes. Comm.* 1994. V. 2. № 1. P. 15–26.
- Walker-Daniels J., Riese D.J., 2nd, Kinch M.S. c-Cbl-dependent EphA2 protein degradation is induced by ligand binding // *Mol. Cancer Res.* 2002. V. 1. P. 79–87.
- Wang H.U., Anderson D.J. Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth // *Neuron.* 1997. V. 18. P. 383–396.
- Weinstein B.M. Vessels and nerves: matching to the same tune // *Cell.* 2005. V. 120. P. 299–302.
- West D.C., Thompson W.D., Sells P.G. et al. Angiogenesis assays using chick chorioallantoic membrane // *Met. Mol. Med. Angiogen. Protocols.* 2003. V. 46. P. 107–129.
- Wyder L., Vitality A., Schneider H. et al. Increased expression of H/T-cadherin in tumor-penetrating blood vessels // *Canc. Res.* 2000. V. 60. P. 4682–4688.

T-Cadherin Suppresses the Cell Proliferation of Mouse Melanoma B16F10 and Tumor Angiogenesis in the Model of the Chorioallantoic Membrane

E. I. Yurlova^a, K. A. Rubina^a, V. Yu. Sysoeva^a, G. V. Sharonov^a, E. V. Semina^b,
E. V. Parfenova^b, and V. A. Tkachuk^a

^aLomonosov Moscow State University, pr. Lomonosovskiy 31-5, Moscow, 119192 Russia

^bRussian Cardiology Scientific Production Association, Ministry of Health and Social Development,
ul. 3-ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia
e-mail: rkseiya@mail.ru

Abstract—The influence of T-cadherin on the pigmentation and proliferation of mouse melanoma B16F10 cells *in vitro* and on the growth and neovascularization of tumor cell masses formed by the B16F10 cells in a model of the chorioallantoic membrane of a chicken embryo is studied. It is found that the proliferative activity of the cells decreases in the cell culture of mouse melanoma upon the hyperexpression of T-cadherin in comparison with the cells in the control. It is shown in experiments *in vitro* that the B16F10 cells with the hyperexpression of T-cadherin are less adaptive to the chorioallantoic membrane than the control cells. In addition, it is found that the control cells of mouse melanoma form tumors with area more 0.1 mm² more often than the cells with the hyperexpression of T-cadherin and the amount of the vessels growing to tumor cell masses formed by the cells with the hyperexpression of T-cadherin is significantly lower than the same index for the cells in the control. Thus, the hyperexpression of T-cadherin in the B16F10 cells suppresses the proliferation of these cells *in vitro* and the growth of the tumor masses formed by melanoma cells on the chorioallantoic membrane and their neovascularization *in vivo* are demonstrated.

Key words: T-cadherin, tumor angiogenesis, angiogenesis in the chorioallantoic membrane

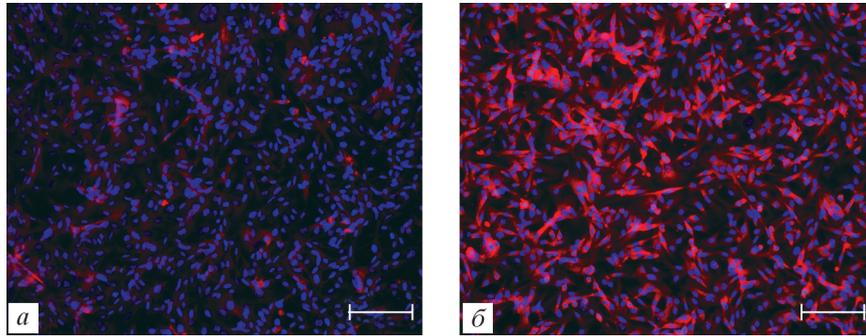


Рис. 1. Экспрессия Т-кадгерина клетками мышиной меланомы B16F10 (иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против Т-кадгерина): *a* – контрольные клетки, *б* – клетки мышиной меланомы, гиперэкспрессирующие Т-кадгерин. Масштаб: 100 мкм.

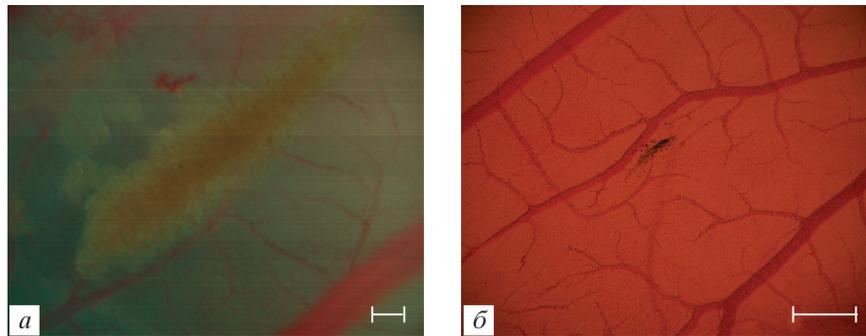


Рис. 7. Формирование крупных (*a*) и небольших (*б*) опухолевых масс клетками мышиной меланомы B16F10 на хориоаллантаической мембране куриного эмбриона: *a* – контрольные клетки, *б* – клетки мышиной меланомы, гиперэкспрессирующие Т-кадгерин. Масштаб здесь и на рис. 9–11: 0.1 мм.



Рис. 9. Крупная опухолевая масса, сформированная гиперэкспрессирующими Т-кадгерин клетками мышиной меланомы. Внутри опухоли заметны структуры, соответствующие крупным кровеносным лакунам.



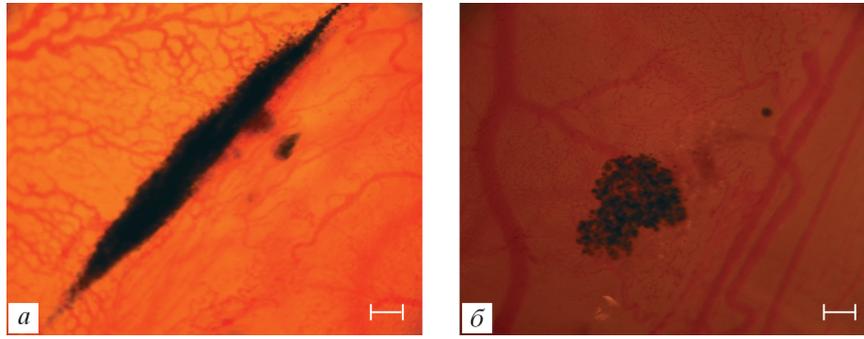


Рис. 10. Пигментированные опухолевые массы, сформированные на хориоаллантаической мембране куриного эмбриона гиперэкспрессирующими Т-кадгерин (а) и контрольными (б) клетками мышинной меланомы.

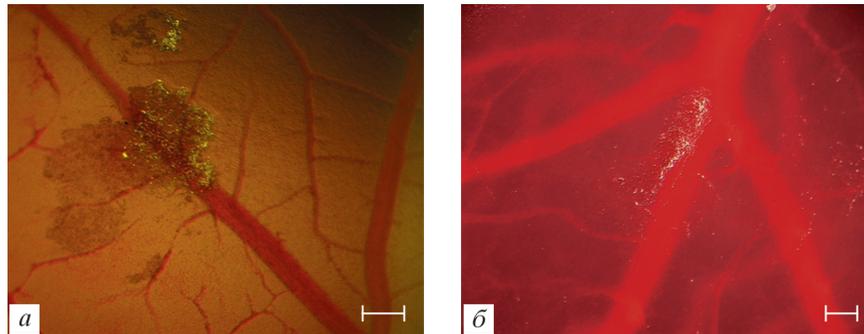


Рис. 11. Слабо пигментированная (а) и непигментированная (б) опухолевые массы, сформированные на хориоаллантаической мембране куриного эмбриона гиперэкспрессирующими Т-кадгерин (а) и контрольными (б) клетками мышинной меланомы.