

на правах рукописи

**Трифорова
Кристина Эдуардовна**

**Особенности распределения штамма мезенхимальных стволовых клеток в условиях
опухолевого роста после сингенной трансплантации мышам линии *C₅₇BL/6***

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Кольцово
2015**

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Новосибирской области.

Научные руководители:

Нечаева Елена Августовна, кандидат медицинских наук, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Повещенко Александр Федорович, доктор медицинских наук, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии»

Официальные оппоненты:

Гуляева Людмила Федоровна, доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»

Омельянчук Леонид Владимирович, доктор биологических наук, ФГБУ «Институт молекулярной и клеточной биологии» СО РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт молекулярной патологии и патоморфологии»

Защита состоится «19 » февраля 2016 г. в 09-00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.01 при ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» по адресу: р.п. Кольцово, Новосибирского района, Новосибирской области, 630559, тел. 8(383) 336-60-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и на интернет-сайте <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор _____ В.А. Белявская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Развитие современной биотехнологии во многом связано с использованием культивируемых *in vitro* клеток различного происхождения. В последние годы растет число публикаций, посвященных применению клеточных технологий для противоопухолевой терапии. Большинство этих сообщений посвящено применению мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для адресной доставки различных терапевтических агентов в область опухолевого очага, что позволяет значительно минимизировать токсическое воздействие препарата на здоровые ткани (*Studený et al., 2002, Miletic et al., 2007; Gunnarsson et al., 2010; van Eekelen et al., 2010*).

Применение мезенхимальных стволовых клеток для доставки противоопухолевых препаратов основано на гипотезе о том, что в условиях канцерогенеза стволовые клетки мигрируют преимущественно в опухолевую ткань. Тропизм МСК к злокачественным образованиям впервые был продемонстрирован в работе М. Studený, в которой авторы применили МСК для доставки интерферона бета в область локализации опухолевого очага (*Studený et al., 2002*). В последующих работах МСК были использованы для доставки к опухолям различных терапевтических агентов, например, цитокинов (*Studený et al., 2004*), пролекарств (*Kucerova et al., 2007*), онколитических вирусов (*Nakamura et al., 2004, Yong et al., 2009*), антиангиогенных веществ (*Batchelor et al., 2007*) и других.

Однако свойство МСК мигрировать в очаг новообразования не является абсолютно доказанным и требует дополнительного экспериментального подтверждения. Поскольку на сегодняшний день все больше появляется данных о том, что трансплантированные МСК обнаруживаются не только в опухолевой ткани, но и в других тканях, таких, как, печень, селезенка, головной мозг (*Wolf et al., 2005; Bexell et al., 2009, Мелешина и др., 2012*). Возможно, причины такого расхождения экспериментальных данных связаны с применением различных методов детектирования МСК после трансплантации (флуоресцентные и биолюминесцентные способы визуализации, различные виды томографии, ПЦР, флуоресцентная микроскопия и другие), которые обладают различной степенью чувствительности и специфичности.

Кроме того, на распределение МСК после трансплантации влияет множество других факторов, таких, как способ введения клеток, ксеногенная или сингенная трансплантация МСК и опухоли, источник мезенхимальных стволовых клеток (костный мозг, жировая ткань, пуповинная кровь и другие), тип опухолевых клеток, срок проведения исследования после трансплантации клеток (1 час, сутки, месяцы).

Таким образом, учитывая расхождение экспериментальных данных, применение различных методов визуализации трансплантированных МСК, различных экспериментальных моделей, установление особенностей распределения МСК после внутривенной трансплантации в условиях канцерогенеза является актуальной задачей.

Цели и задачи

Целью данного исследования является установление особенностей распределения МСК после внутривенной трансплантации в условиях опухолевого роста на модели меланомы B16-F10.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Получение и морфофункциональная характеристика штамма мезенхимальных стволовых клеток костного мозга мышей линии *C₅₇BL/6*.
2. Изучение миграционной активности МСК в условиях опухолевого роста и влияния МСК на пролиферацию клеток линии B16-F10 в системе *in vitro*.
3. Оценка влияния внутривенного введения МСК на выживаемость животных – опухоленосителей и рост меланомы B16-F10.
4. Изучение распределения МСК после внутривенного введения в организме интактных мышей и при наличии опухолевого процесса методом ПЦР в режиме реального времени.
5. Исследование распределения МСК в организме животных – носителей меланомы B16-F10 при помощи флуоресцентной микроскопии.

Научная новизна

Впервые получен штамм мезенхимальных стволовых клеток костного мозга мышей линии *C₅₇BL/6*, который обладает стабильными свойствами, безопасен и перспективен для проведения фундаментальных научных исследований и доклинической оценки мезенхимальных стволовых клеток в качестве средства доставки противоопухолевых препаратов.

Впервые продемонстрированы различия в распределении мезенхимальных стволовых клеток после внутривенной трансплантации в организме интактных мышей и мышей с привитой меланомой B16-F10.

Практическая значимость

Получен и заложен на хранение в коллекцию культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» штамм мезенхимальных стволовых клеток костного мозга мышей линии *C₅₇BL/6*. Штамм охарактеризован в соответствии с требованиями к диплоидным и перевиваемым культурам клеток.

Разработана стандартная операционная процедура «Выделение мезенхимальных стволовых клеток костного мозга мышей линии *C₅₇BL/6*», которая внедрена в работу отдела клеточных технологий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВПО Новосибирского государственного педагогического университета (Новосибирск).

Положения, выносимые на защиту

1. Стабильность характеристик штамма мезенхимальных стволовых клеток костного мозга мышей линии *C₅₇BL/6* позволяет использовать его для проведения фундаментальных научных исследований и доклинической оценки МСК в качестве средства доставки противоопухолевых препаратов.
2. Особенности распределения мезенхимальных стволовых клеток после системного введения зависят от наличия и стадии опухолевого роста.
3. На поздних стадиях канцерогенеза миграция мезенхимальных стволовых клеток изменятся с направленностью преимущественно в костный мозг.

Апробация работы. По результатам работы опубликовано 3 статьи, из них 2 в журналах из списка научных журналов, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России, также материалы работы представлены на всероссийских и международных конференциях, по итогам которых опубликовано 7 тезисов.

Личный вклад. Экспериментальные исследования, представленные в диссертации, проводились либо лично автором, либо при непосредственном участии автора. Автор принимал активное участие в обработке экспериментальных данных, обсуждении и опубликовании результатов.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 105 страницах текста, содержит 20 рисунков. Список литературы содержит 141 ссылку на зарубежные и отечественные работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мезенхимальные стволовые клетки были получены из костного мозга мышей линии *C₅₇BL/6*. Была оценена способность МСК к адипогенной и остеогенной дифференцировке путем добавления в ростовую питательную среду соответствующих индукторов, а также определен их иммунофенотип методом проточной цитофлуориметрии. Миграционная активность МСК была оценена при помощи двухкамерной культуральной системы при помощи набора «Cell invasion assays kit» (Helikon, США). Пролиферативную активность опухолевых клеток оценивали с помощью МТТ-теста.

Влияние внутривенной трансплантации МСК на выживаемость животных-опухоленосителей и кинетику роста меланомы B16-F10 проводили следующим образом. Самкам мышей линии *C₅₇BL/6* в лапу подкожно вводили суспензию клеток меланомы B16-F10 в дозе 250×10^3 клеток/мышь. Через 3 дня после трансплантации опухолевых клеток животные были разделены на 2 группы случайным образом, по 10 животных в каждой группе: животным первой группы внутривенно вводили физиологический раствор, животным второй группы – суспензию МСК в дозе 500×10^3 клеток/мышь. Контролем служили интактные животные. Через 12 суток после трансплантации опухоли и последующие дни до гибели животных измеряли объем опухоли. Животные находились в эксперименте до естественной гибели.

Исследование распределения МСК после трансплантации проводили следующим образом. Через 3 дня после трансплантации опухолевых клеток животным в хвостовую вену внутривенно вводили суспензию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток самца в дозе 500×10^3 клеток/мышь в 500 мкл фосфатно-солевого буфера. Затем животные были разделены на 2 группы по 16 особей в каждой группе: первая группа для проведения количественного анализа содержания трансплантированных МСК с помощью ПЦР в реальном времени, вторая группа – флуоресцентной микроскопии. Через 1 час, 3, 7 и 14 суток после введения мезенхимальных стволовых клеток животных умерщвляли методом дислокации шейных позвонков. Органы забирали для дальнейших исследований с помощью ПЦР в режиме реального времени либо флуоресцентной микроскопии.

Полученные результаты исследования статистически обрабатывали с использованием программы Statistica 6,0 for Windows (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и морфофункциональная характеристика штамма мезенхимальных стволовых клеток костного мозга мышей линии C₅₇BL/6. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга широко используют в различных экспериментальных моделях, в том числе для исследования свойств МСК и применения данного типа клеток в качестве средства доставки противоопухолевых агентов в клетки-мишени. В настоящее время получено большое количество мезенхимальных стволовых клеток из различных тканей и органов животных. Тем не менее, на сегодняшний день в Российской коллекции клеточных культур штаммы мезенхимальных стволовых клеток животных не зарегистрированы.

В рамках данного исследования в отделе клеточных технологий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» получен и охарактеризован штамм мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга мыши BMMSC-C₅₇BL/6. Из бедренных и большеберцовых костей самцов мышей линии C₅₇BL/6 выделяли аспират костного мозга. Получение МСК из аспирата костного мозга мышей было основано на способности этих клеток адгезироваться к пластику при стандартных условиях культивирования.

Клетки МСК культивировали в течение 7-10 суток, каждые 3 суток проводили смену ростовой питательной среды. Клетки выращивали в ростовой питательной среде Игла МЕМ с 10 % сыворотки крови плодов коровы, 200 мМ/L-глутамина, 40 мкг/мл гентамицина в СО₂ инкубаторе при 37 °С. Посевная концентрация составляла $(1,0-2,0) \times 10^6$ клеток в 1 мл, кратность посева 1:2, частота пассирования 7 – 10 суток. Для посева культур клеток в качестве диспергента применяли 0,25 %-ный раствор трипсина и 0,02 %-ный раствор Версена в соотношении 1:2. Клетки исследовали на микробиологическую стерильность и отсутствие микоплазм. По данным микробиологического контроля при высеве на набор селективных сред было показано, что клетки штамма свободны от грибковой и бактериальной контаминации. Исследованием штамма после окрашивания ДНК-связывающим красителем Хехст 33342 было подтверждено отсутствие контаминации микоплазмой.

После проведения контролей и наработки достаточного количества материала клетки МСК криоконсервировали на 5-ом пассаже. Для этого наработанную суспензию клеток ресуспендировали в среде для криоконсервации, содержащей питательную среду Игла МЕМ с добавлением 10 % сыворотки крови плодов коровы и 10 % глицерина. Клетки разводили до концентрации $1,5 \times 10^6$ в ампуле и замораживали до температуры минус 196 °С в жидком азоте. В результате было получено 8 ампул. Количество жизнеспособных клеток в результате восстановления после криоконсервации составляло 75-80 %.

Исследованы морфологические признаки, культуральные свойства и видовая идентичность штамма BMMSC-C₅₇BL/6. Клетки, выделенные из костного мозга мышей, характеризовались высокой степенью гетерогенности, которая выражалась в

существовании в культуре разных клеточных типов, отличающихся по морфологии и скорости пролиферации. Первичная культура клеток была представлена как веретеновидными, треугольными и звездчатыми клетками с однородной цитоплазмой, так и клетками округлой или неправильной формы без отростков с неоднородной цитоплазмой. После проведения 3–4-х пассажей культура состояла преимущественно из веретеновидных фибробластоподобных клеток с небольшим овальным ядром, которые пролиферировали и формировали характерные потоки.

Кроме того, были исследованы культуральные свойства полученного штамма. Клетки BMMSC-*C₅₇BL/6* - субстрат-зависимы и поддерживаются на питательной среде Игла MEM с добавлением 10 % сыворотки крови плодов коровы. После пересева клетки входят в лаг-период продолжительностью не менее 24 часов, который сменяется периодом экспоненциального роста. В конце этого периода клетки достигают полного монослоя и входят в период покоя. Формирование клеточного монослоя завершалось через 7-10 суток после пересева (рис. 1). Культура клеток стабильна на протяжении 10-ти последовательных пассажей.

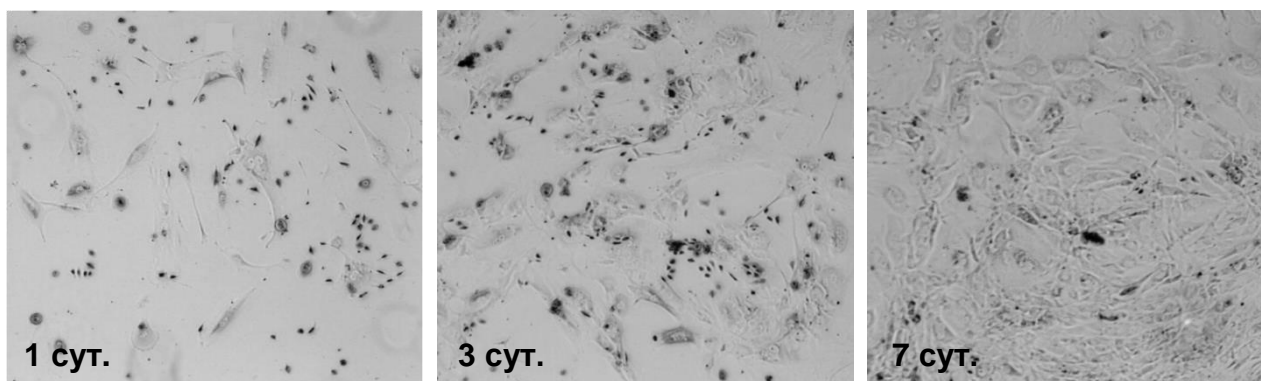


Рис. 1. Формирование клеточного монослоя штамма BMMSC-*C₅₇BL/6* в течение 7 суток(фазово-контрастная микроскопия). Увеличение x100.

Видовую идентичность изучали методом ПЦР в режиме реального времени через оценку уровня специфической последовательности гена *zinc finger protein 2 Y* (*Zfy2*) хромосомы. Ген *Zfy2* расположен на регионе Y хромосомы мышей, который определяет пол. Показано, что образцы ДНК, выделенной из клеток штамма BMMSC-*C₅₇BL/6*, содержали специфическую последовательность гена *Zfy2*.

Для подтверждения мезенхимальной природы клеток, полученных из костного мозга мышей, необходимо было оценить способность адгезироваться к пластику при стандартных условиях культивирования; экспрессию молекул адгезии CD105, CD73и CD90 и отсутствие экспрессии CD45, CD34; способность дифференцироваться в остеобласты и адипоциты *in vitro*. Поэтому полученный штамм клеток был исследован на соответствие данным критериям.

После прохождения 3-4-х пассажей клетками штамма BMMSC-*C₅₇BL/6* показано, что субпопуляция клеток с фенотипом CD73⁺ составляла 86,5 %, с фенотипом CD90⁺– 78,1 %, с фенотипом CD105⁺– 84,7 %, тогда как субпопуляция гемопоэтических клеток с фенотипом CD34⁺– 3,9 % и CD45⁺– 0,03 %.

В ответ на адипогенную индукцию в течение 3-х недель исследуемые клетки формировали липидные включения, отчетливо заметные после окрашивания жирорастворимым красителем, что свидетельствовало о дифференцировке в адипоциты (рис. 2А).

В ответ на остеогенную индукцию через 3 недели культивирования отмечено постепенное изменение морфологических особенностей стволовых клеток – клетки приобретали более округлую форму, внутри клеток появлялись специфические отложения кальция, что подтверждено окрашиванием ализариновым красным (рис. 2Б).

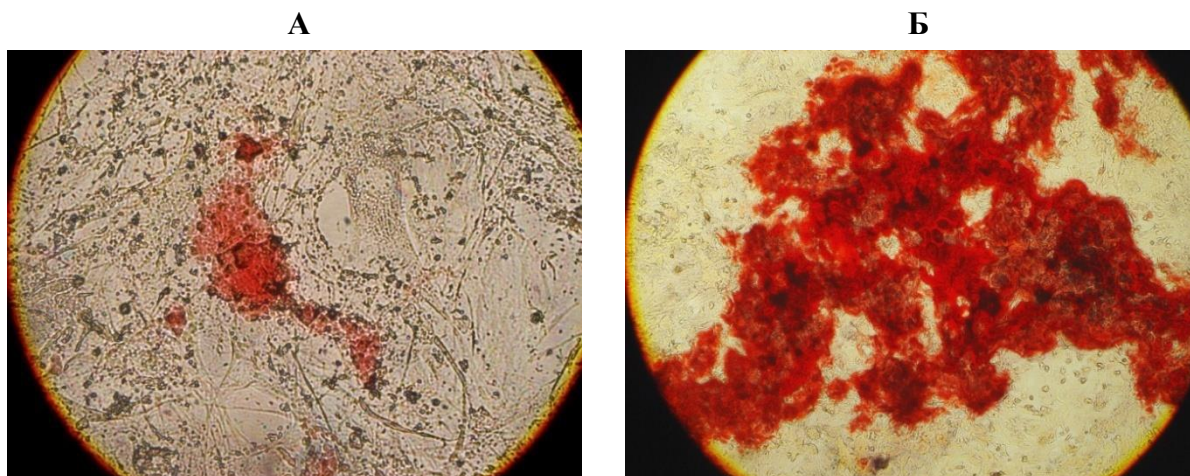


Рис. 2. Результаты адипогенной и остеогенной индукции дифференцировки клеток штамма BMMSC-*C₅₇BL/6* (фазово-контрастная микроскопия): А, культура дифференцированных в адипоциты МСК на 21 сутки культивирования. Окраска масляным красным. Увеличение $\times 100$. Б, культура дифференцированных в остеоциты МСК на 21 сутки культивирования. Очаг минерализации окрашен ализариновым красным. Увеличение $\times 100$.

Таким образом, штамм BMMSC-*C₅₇BL/6* обладал признаками, характерными для мезенхимальных стволовых клеток, включая фибробластоподобную морфологию, иммунофенотип, способность адгезироваться к пластику при стандартных условиях культивирования, а также способность дифференцироваться в адипогенном и остеогенном направлении.

В дальнейшем полученный штамм BMMSC-*C₅₇BL/6* был использован для исследования влияния опухолевого процесса на миграционную активность стволовых клеток в экспериментах *in vitro*, а также для сингенной трансплантации мышам линии *C₅₇BL/6*.

Изучение миграционной активности МСК в условиях опухолевого роста и влияния МСК на пролиферацию клеток линии B16-F10 в системе *in vitro*. Исследование миграционной способности МСК к опухолевым клеткам в системе *in vitro* является отражением способности этих клеток достигать очага опухолевого образования. Суть метода заключается в изучении направленного вертикального перемещения МСК сквозь поры специальной мембраны к опухолевым клеткам.

В результате проведенных экспериментов выявлено, что при инкубации МСК в присутствии опухолевых клеток меланомы B16-F10 миграционная активность МСК была

в 2,9 раз выше, чем при культивировании в бессывороточной питательной среде (рис. 3). Такое увеличение миграционной активности МСК к опухолевым клеткам вероятно можно объяснить действием опухолевых хемоаттрактантов, стимулирующих тропность МСК.

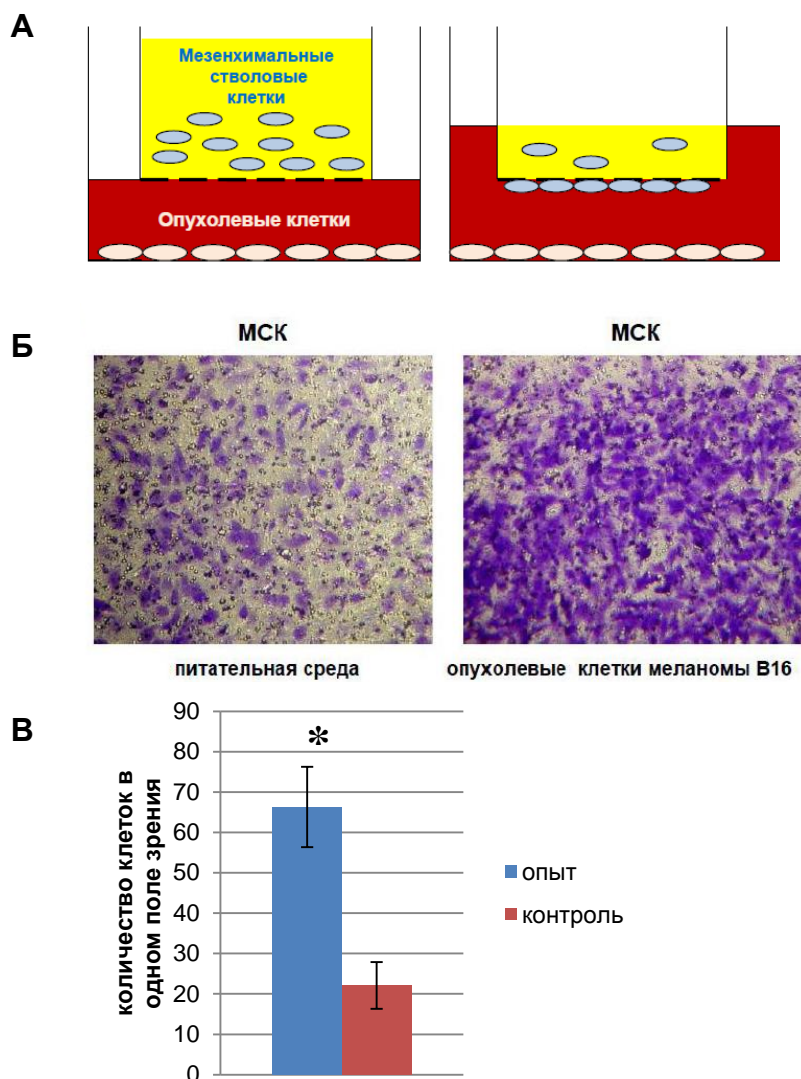


Рис. 3. Исследование миграционной активности МСК к опухолевым клеткам в системе *in vitro*.

А, схема эксперимента исследования миграционной активности мезенхимальных стволовых клеток к опухолевым клеткам с помощью двухкамерной культуральной системы. Исследуемые МСК помещали в специальные вставки с мембраной, имеющей поры. Вставки с МСК переносили в лунки планшета, в которых заранее культивировали опухолевые клетки. Далее клетки совместно культивировали в течение 48 часов. Мезенхимальные стволовые клетки за это время проникали сквозь поры мембраны и адгезировались на внешней стороне вставки.

Б, окрашенные кристалл фиолетовым мезенхимальные стволовые клетки, которые мигрировали сквозь поры мембраны и адгезировались на внешней стороне вставки через 48 часов совместного культивирования с бессывороточной питательной средой (контроль) либо с опухолевыми клетками меланомы B16-F10 (опыт).

В, гистограмма отображает среднее количество мигрировавших МСК к опухолевым клеткам меланомы B16-F10 (опыт) либо к питательной среде (контроль) в одном поле зрения.

Примечание: * - достоверность различия по сравнению с количеством МСК, мигрировавшим к питательной среде $p < 0,01$ (U- критерий Манна-Уитни).

Кроме того, нами было исследовано влияние на выживаемость опухолевых клеток меланомы B16-F10 при совместном культивировании с МСК в двухкамерной культуральной системе. Для этого МСК помещали в специальные вставки с мембраной, имеющей поры. Вставки с МСК переносили в лунки планшета, в которых заранее

культивировали опухолевые клетки меланомы B16-F10. Далее клетки совместно культивировали в течение 48 часов. Параллельно в качестве негативного контроля опухолевые клетки культивировали в ростовой питательной среде в течение 48 часов. Влияние МСК на жизнеспособность опухолевых клеток оценивали с помощью МТТ – теста.

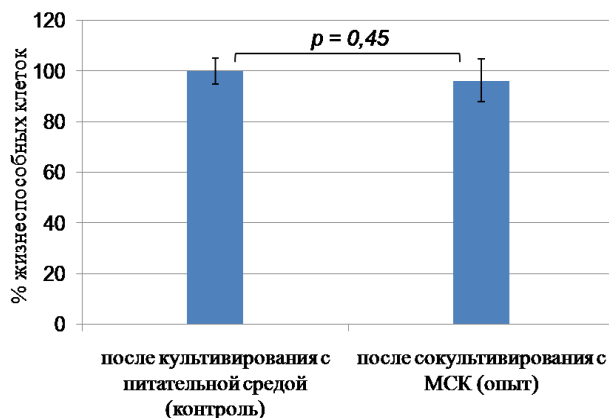


Рис. 4. Выживаемость опухолевых клеток меланомы B16-F10 в условиях совместного культивирования с МСК в двукамерной культуральной системе.

В результате проведенного исследования статически значимых различий между выживаемостью опухолевых клеток при совместной инкубации с МСК и со стандартной питательной средой не выявлено (рис. 4).

Влияние внутривенной трансплантации МСК на выживаемость животных-опухоленосителей и кинетику роста меланомы B16-F10. После изучения миграционной активности МСК к опухолевым клеткам в системе *in vitro* исследовали влияние внутривенной трансплантации МСК на выживаемость животных-опухоленосителей и кинетику роста меланомы B16-F10.

В результате проведенного исследования установлено, что внутривенное введение сингенных мезенхимальных стволовых клеток на 3 сутки после прививки опухоли мышам не повлияло на динамику развития опухоли (рис. 5Б). Ускорения роста опухоли не наблюдалось. Анализ кривой выживаемости Каплана-Мейера показал, что статистически значимые различия между контрольной группой и группой с внутривенным введением МСК отсутствуют ($p = 0,51$) (рис. 5В).

Таким образом, отсутствие статистически значимых различий между контрольной и опытной группой в проведенных испытаниях может свидетельствовать о безопасности применения мезенхимальных стволовых клеток на данной экспериментальной модели.

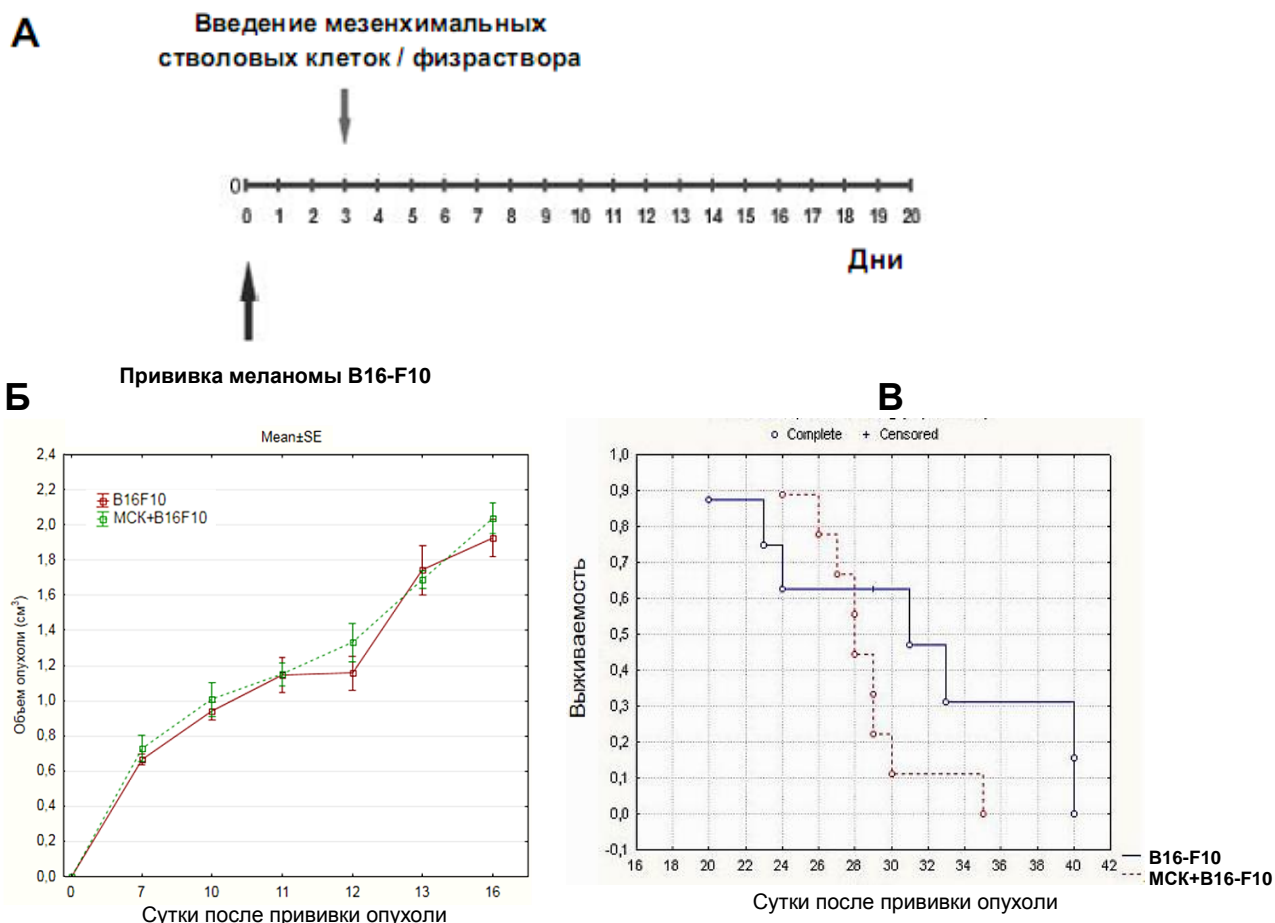


Рис. 5. Влияние внутривенной трансплантации МСК на кинетику роста меланомы B16-F10 и выживаемость животных – опухоленосителей:

А, схема эксперимента. Всем животным подкожно вводили суспензию опухолевых клеток меланомы B16-F10, через 3 суток после прививки опухоли внутривенно вводили мышам первой группы физраствор, мышам второй группы – мезенхимальные стволовые клетки.

Б, влияние внутривенной трансплантации МСК на кинетику роста меланомы B16-F10. У всех животных в процессе исследования измеряли объем опухоли на 7, 10, 11, 12, 13 и 16 суток после прививки опухоли. Статистически значимых различий объема опухолей групп с введением МСК и физраствора не выявлено. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

В, влияние трансплантации МСК на выживаемость животных – носителей опухоли оценивали с помощью метода Каплан-Майера. Значимые различия выживаемости животных с внутривенным введением стволовых клеток и физраствора по критерию Вилкоксона не обнаружены ($p = 0,51$, разницу считали достоверной при $p < 0,05$).

Распределение МСК в организме здоровых животных и животных – носителей меланомы B16-F10 через 1 час после трансплантации. Результаты анализа количественного распределения МСК на раннем сроке (через 1 час) после трансплантации в организме здоровых животных и животных – носителей меланомы B16-F10, когда опухоль визуальнo не детектировалась, показаны на рисунке 6.

Установлено, что максимальное количество МСК через 1 час после трансплантации в организме интактных животных и животных – носителей меланомы B16-F10 накапливается в легких ($p < 0,005$).

Кроме того, большое количество МСК выявлено в крови здоровых реципиентов $((550 \pm 40)/10^5)$ и мышей с привитой опухолью $((336 \pm 71)/10^5)$. В сердце интактных животных $((560 \pm 84)/10^5)$ и животных-опухоленосителей $((292 \pm 32)/10^5)$ также обнаружено значительное число трансплантированных МСК.

Между накоплением введенных МСК в селезенке здоровых мышей $((147 \pm 40)/10^5)$ и мышей – опухоленосителей $((184 \pm 36)/10^5)$ статистически значимых отличий не выявлено ($p = 0,56$).

Необходимо отметить, что в организме интактных животных МСК были детектированы в печени $((328 \pm 34)/10^5)$ и костном мозге $((11 \pm 3)/10^5)$, тогда как в условиях опухолевого роста в данных органах МСК не были обнаружены.

Отмечено небольшое количество МСК в лимфатических узлах $((76 \pm 13)/10^5)$ и головном мозге $((104 \pm 9)/10^5)$ мышей с привитой меланомой B16-F10, при этом в норме в этих органах МСК не детектированы. На данном сроке в околоопухолевых лимфатических узлах и опухолевой ткани введенные МСК не выявлены.

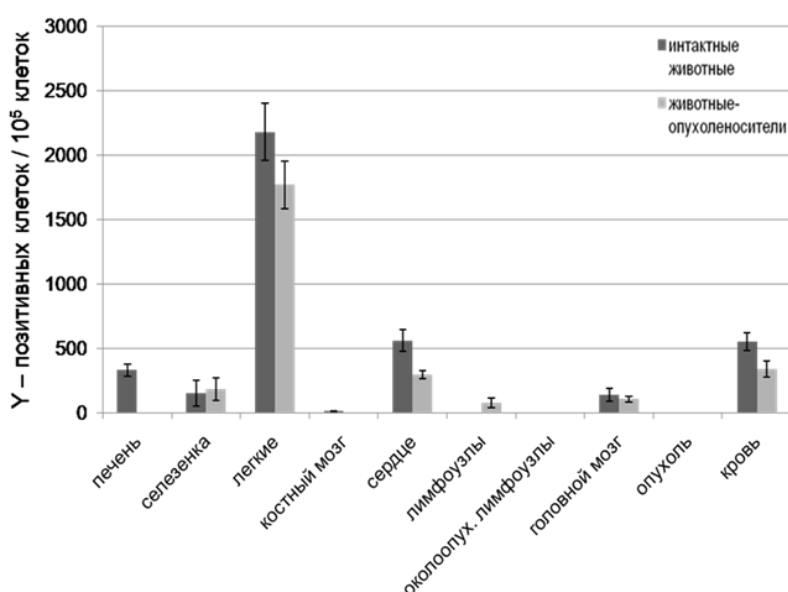


Рис. 6. Распределение МСК в организме здоровых животных и животных – носителей меланомы B16-F10 через 1 час после трансплантации клеток. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. Примечание: p – достоверность различия показателей накопления Y-позитивных клеток в органах интактных животных по сравнению с животными – опухоленосителями (U- критерий Манн-Уитни). Разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

Таким образом, при внутривенном введении МСК мышам с привитой меланомой B16-F10 распределение этих клеток по органам и тканям в первый час после трансплантации не отличается от распределения у здоровых животных.

Распределение МСК в организме здоровых животных и животных – носителей меланомы B16-F10 через 3 суток после трансплантации. Через 3 суток после трансплантации МСК объем опухоли достигал $0,5 \text{ см}^3$, что составляет 25 % от максимального объема.

Установлено, что максимальное количество МСК через 3 суток после трансплантации в организме интактных животных и животных – носителей меланомы B16 накапливается в сердце ($p < 0,005$) (рис. 7). При этом количество трансплантированных клеток в сердце животных – носителей меланомы B16-F10 $((2600 \pm 809)/10^5)$ достоверно выше ($p = 0,0007$), чем в сердце здоровых животных $((503 \pm 90)/10^5)$. Необходимо

отметить, что через 3 суток после трансплантации как в норме, так и в условиях опухолевого роста МСК уже не детектировались в крови, что свидетельствует о миграции введенных МСК из кровеносного русла в строма органов.

В головном мозге мышей с привитой меланомой B16-F10 обнаружено достоверно более высокое число трансплантированных МСК ($(1200 \pm 456)/10^5$) по сравнению с этим органом intactных мышей ($(62 \pm 6)/10^5$) ($p = 0,001$). Количество введенных клеток в селезенке intactных мышей ($(79 \pm 12)/10^5$) было достоверно выше по сравнению с накоплением клеток в этом органе реципиентов – опухоленосителей ($(12 \pm 4)/10^5$) ($p = 0,001$).

В лимфатических узлах ($(27 \pm 3)/10^5$), в ткани легких ($(14 \pm 2)/10^5$) и в костном мозге ($(29 \pm 4)/10^5$) intactных животных обнаружено небольшое число МСК, тогда как у мышей с привитой меланомой B16-F10 введенные клетки в этих органах не выявлены. В отличие от нормы, в условиях онкогенеза трансплантированные стволовые клетки в незначительном количестве накапливались в печени ($(36 \pm 6)/10^5$).

На данном сроке зарегистрировано значительное количество трансплантированных МСК в опухолевой ткани ($(314 \pm 39)/10^5$), но не выявлено в околоопухолевых лимфатических узлах.

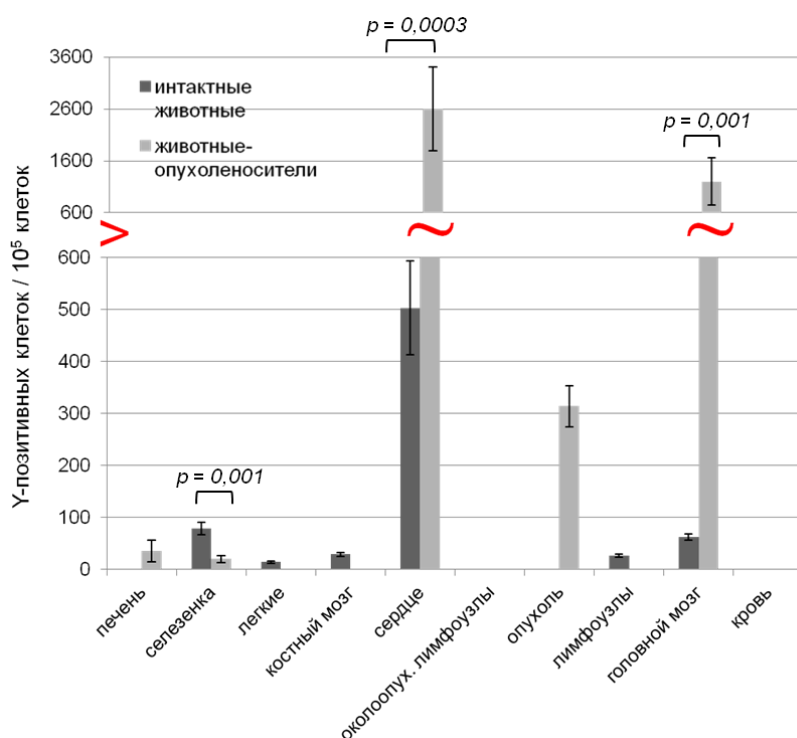


Рис. 7. Распределение МСК в организме здоровых животных и животных – носителей меланомы B16-F10 через 3 суток после внутривенного введения клеток. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. Примечание: p – достоверность различия показателей накопления Y-позитивных клеток в органах intactных животных по сравнению с животными – опухоленосителями (U- критерий Манн-Уитни). Разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

Распределение МСК в организме здоровых животных и животных – носителей меланомы B16-F10 через 7 суток после трансплантации. Через 7 суток после трансплантации МСК объем опухоли достигал $0,5 \text{ см}^3$, что составляет 50 % от максимального объема.

Необходимо отметить, что через неделю после трансплантации количество трансплантированных МСК в исследуемых органах здоровых реципиентов значительно снизилось. Единичные трансплантированные клетки обнаружены в печени ($(3 \pm 1)/10^5$),

селезенке $((3 \pm 1)/10^5)$, костном мозге $((4 \pm 1)/10^5)$ и головном мозге $((12 \pm 2)/10^5)$ здоровых животных (рис. 8).

В отличие от распределения МСК в организме здоровых реципиентов, у реципиентов с привитой меланомой B16-F10 отмечено значительное количество МСК в костном мозге $((5850 \pm 1519)/10^5)$, что статистически значимо выше, чем накопление МСК в костном мозге $((4 \pm 1)/10^5)$ интактных животных ($p = 0,0003$).

В опухолевой ткани через неделю после трансплантации клеток также отмечено небольшое число МСК $((30 \pm 8)/10^5)$. Кроме того в печени $((4 \pm 1)/10^5)$, селезенке $((5 \pm 1)/10^5)$, легких $((4 \pm 1)/10^5)$, головном мозге $((5 \pm 1)/10^5)$, лимфатических узлах $((3 \pm 1)/10^5)$ и сердце $((3 \pm 1)/10^5)$ животных – носителей меланомы B16-F10 детектированы единичные МСК.

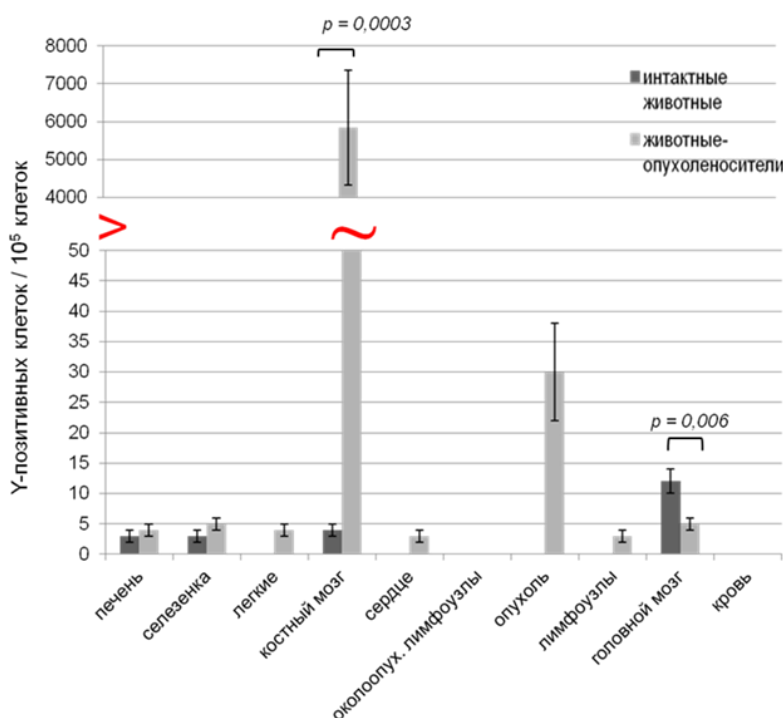


Рис. 8. Распределение МСК в организме здоровых животных и животных – носителей меланомы B16-F10 через 7 суток после трансплантации клеток. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. Примечание: p – достоверность различия показателей накопления У-позитивных клеток в органах интактных животных по сравнению с животными – опухоленосителями (U-критерий Манн-Уитни). Разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

Таким образом, можно сделать вывод, что опухолевый процесс стимулирует миграцию и/или пролиферацию МСК в костном мозге через неделю после трансплантации МСК на стадии сформированной опухоли.

Распределение МСК в организме здоровых животных и животных – носителей меланомы B16-F10 через 14 суток после трансплантации. Через 14 суток после трансплантации МСК объем опухоли достигал максимального объема 2 см^3 , в ткани опухоли начинались некротические процессы (рис. 9).

В костном мозге мышей – носителей меланомы B16-F10 выявлено значительное количество МСК $((2010 \pm 540)/10^5)$, что достоверно выше чем количество МСК в костном мозге здоровых животных $((39 \pm 8)/10^5)$ ($p = 0,00007$).

Помимо этого в околоопухолевых лимфатических узлах обнаружено большое число МСК $((460 \pm 140)/10^5)$, тогда как в остальных лимфатических узлах мышей – опухоленосителей введенные клетки не найдены, что доказывает влияние опухолевого процесса на распределение МСК.

В сердце животных с привитой опухолью также детектированы трансплантированные МСК ($(83 \pm 17)/10^5$), тогда как у здоровых животных в этом органе клетки не выявлены. Установлено статистически значимо более высокое содержание МСК в головном мозге мышей – носителей опухоли ($(20 \pm 7)/10^5$) по сравнению с накоплением МСК в этом органе интактных мышей ($(4 \pm 1)/10^5$) ($p = 0,003$).

Между количеством МСК ткани селезенки здоровых мышей ($(17 \pm 8)/10^5$) и мышей с привитой опухолью ($(22 \pm 10)/10^5$) статистически значимых различий не выявлено.

На данном сроке выявлено небольшое число МСК в крови интактных мышей ($(35 \pm 7)/10^5$), тогда как в кровеносном русле мышей – носителей меланомы B16-F10 трансплантированные клетки не выявлены. Стоит также отметить, что через 2 недели после трансплантации клеток МСК в опухолевой ткани не выявлены.

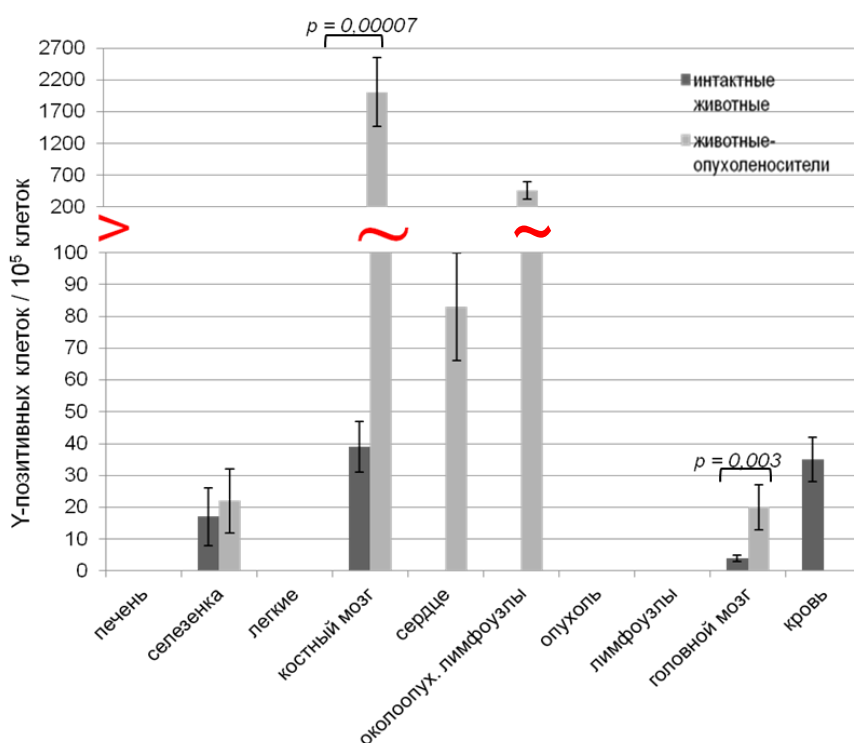


Рис. 9. Распределение МСК в организме здоровых животных и животных – носителей меланомы B16-F10 через 14 суток после трансплантации клеток. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. Примечание: p – достоверность различия показателей накопления Y-позитивных клеток в органах интактных животных по сравнению с животными – опухоленосителями (U-критерий Манн-Уитни). Разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

Исследование распределения МСК в организме животных – носителей меланомы B16-F10 при помощи флуоресцентной микроскопии. Для дополнительного подтверждения результатов ПЦР была выполнена флуоресцентная микроскопия срезов органов мышей с привитой меланомой B16-F10, которым вводили флуоресцентно меченные МСК.

Через 1 час после введения МСК методом флуоресцентной микроскопии меченные клетки были обнаружены в срезах ткани легкого, сердца и селезенки (рис. 10), что подтверждает результаты, полученные с помощью ПЦР. В остальных исследованных органах меченные клетки не детектированы, тогда как методом ПЦР через 1 час после введения небольшое количество трансплантированных клеток также выявлено в лимфатических узлах и головном мозге мышей с привитой меланомой B16-F10.

Через 3 суток после трансплантации МСК флуоресцентные клетки определялись в срезах ткани сердца, головного мозга и опухолевой ткани (рис. 11), что совпадает с результатами ПЦР. В остальных исследованных органах окрашенные МСК не выявлены,

тогда как с помощью ПЦР небольшое число введенных клеток также обнаружено в селезенке и печени мышей-опухоленосителей.

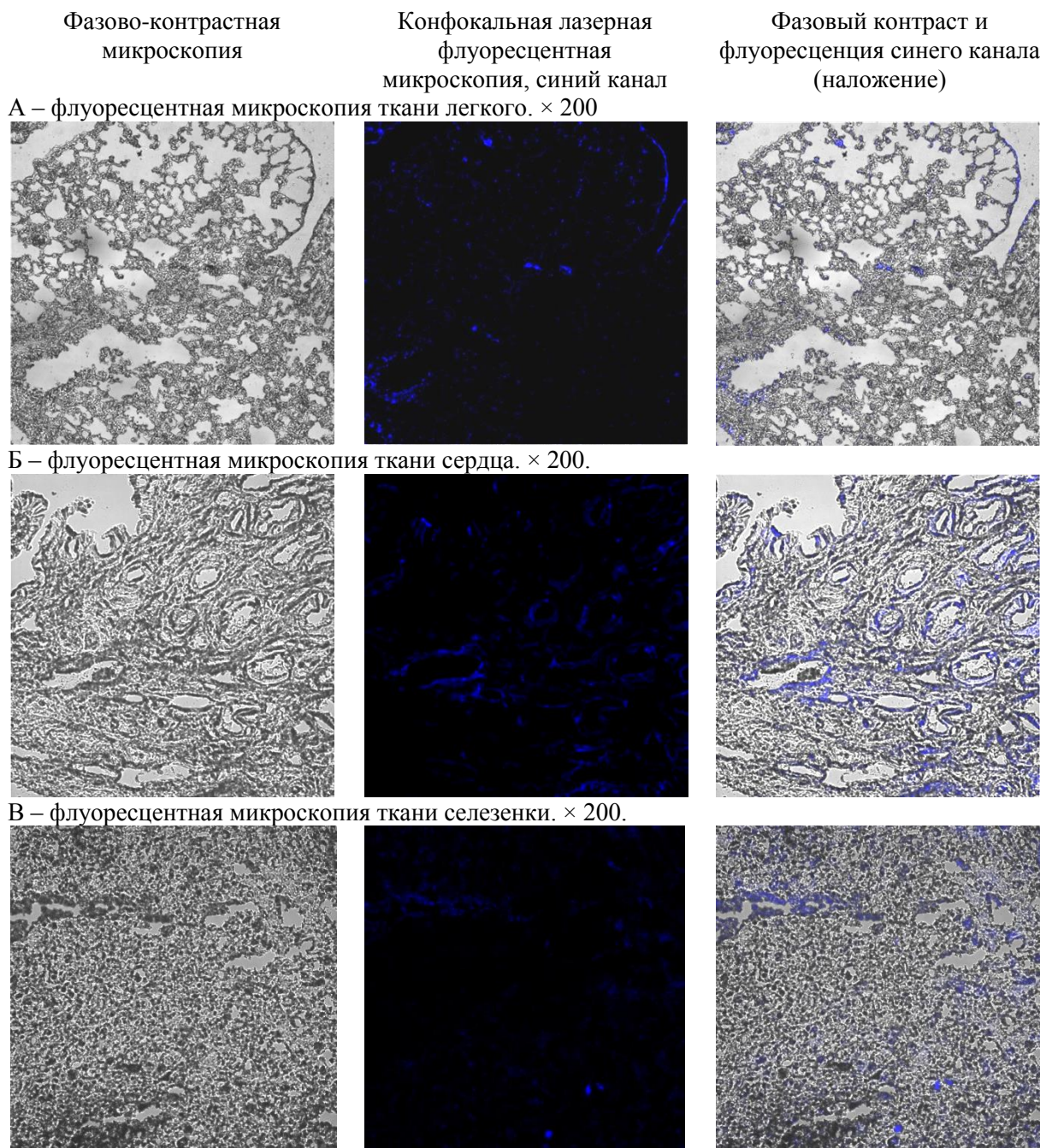


Рис. 10. Флуоресцентная микроскопия срезов органов мышей – носителей меланомы B16-F10 через 1 час после трансплантации МСК.

Через 7 суток после трансплантации (стадия сформированной опухоли) МСК, окрашенные красителем Хехст 33342, были обнаружены в срезах костного мозга и опухолевой ткани (рис. 12). Методом ПЦР у реципиентов с привитой меланомой B16-F10 также определено значительное количество МСК в этих органах. В других исследованных органах методом флуоресцентной микроскопии стволовых клеток выявить не удалось, тогда как с помощью ПЦР единичные клетки были обнаружены в печени, селезенке, легких, головном мозге, лимфатических узлах и сердце.

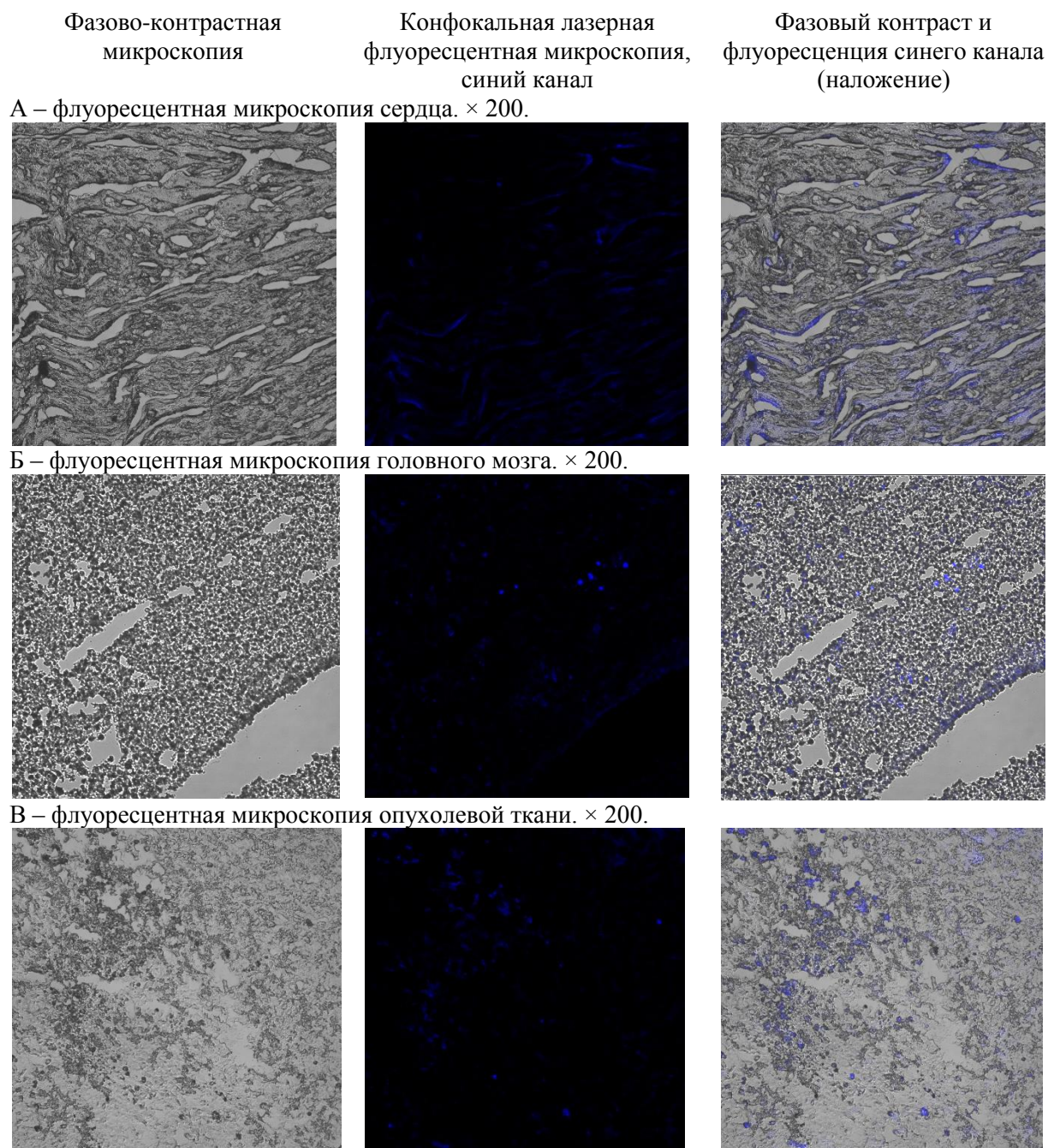


Рис. 11. Флуоресцентная микроскопия срезов органов мышей – носителей меланомы B16-F10 через 3 суток после трансплантации МСК.

Через 14 суток после введения стволовых клеток (поздняя стадия канцерогенеза) меченные МСК обнаружены в срезах костного мозга и околоопухолевого лимфатического узла (рис. 13). Методом ПЦР также значительное число трансплантированных клеток выявлено в костном мозге и околоопухолевых лимфатических узлах. С помощью флуоресцентной микроскопии в остальных органах флуоресцентно окрашенные клетки не детектированы, тогда как методом ПЦР МСК также определены в сердце, головном мозге и селезенке.

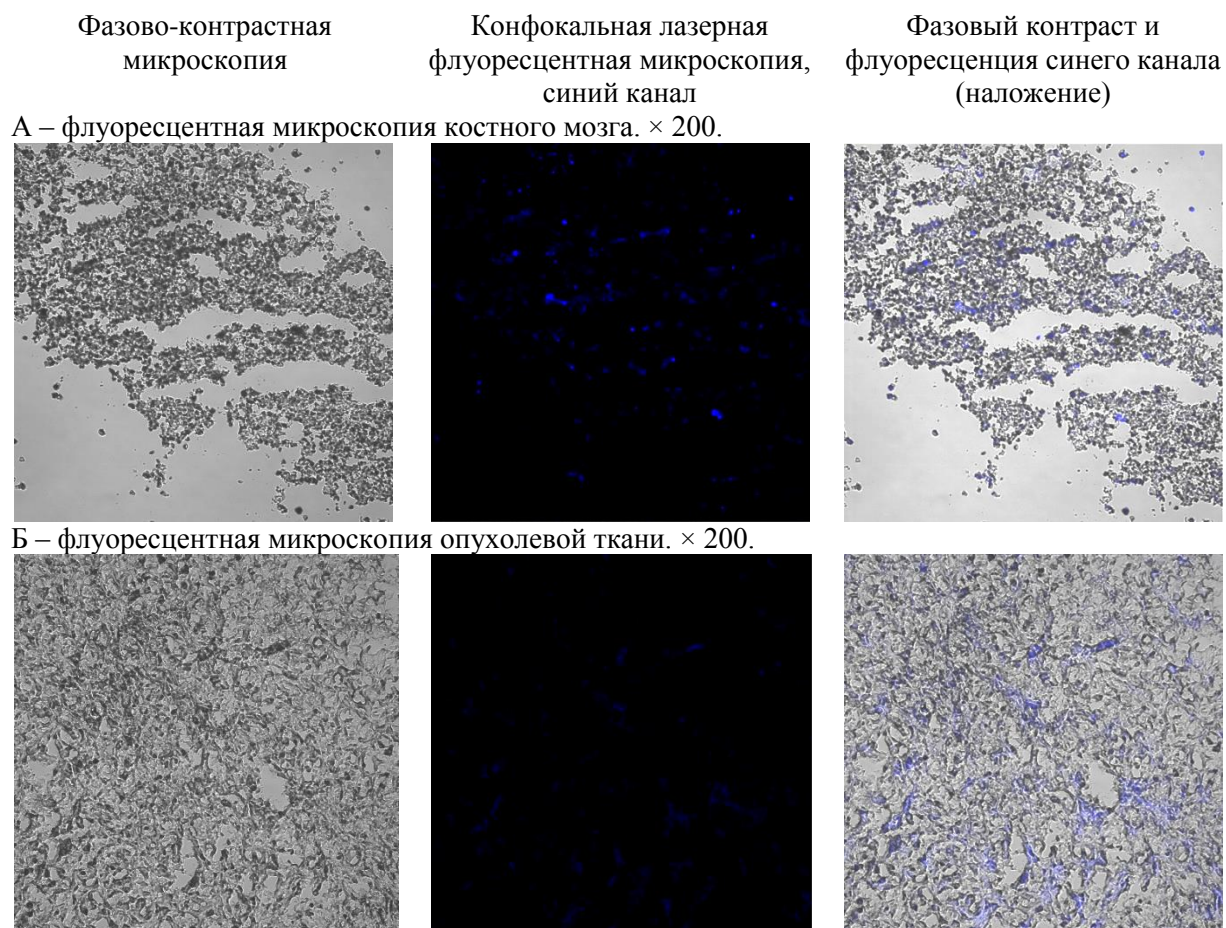


Рис. 12. Флуоресцентная микроскопия срезов органов мышей – носителей меланомы В16-F10 через 7 суток после трансплантации МСК. $\times 200$.

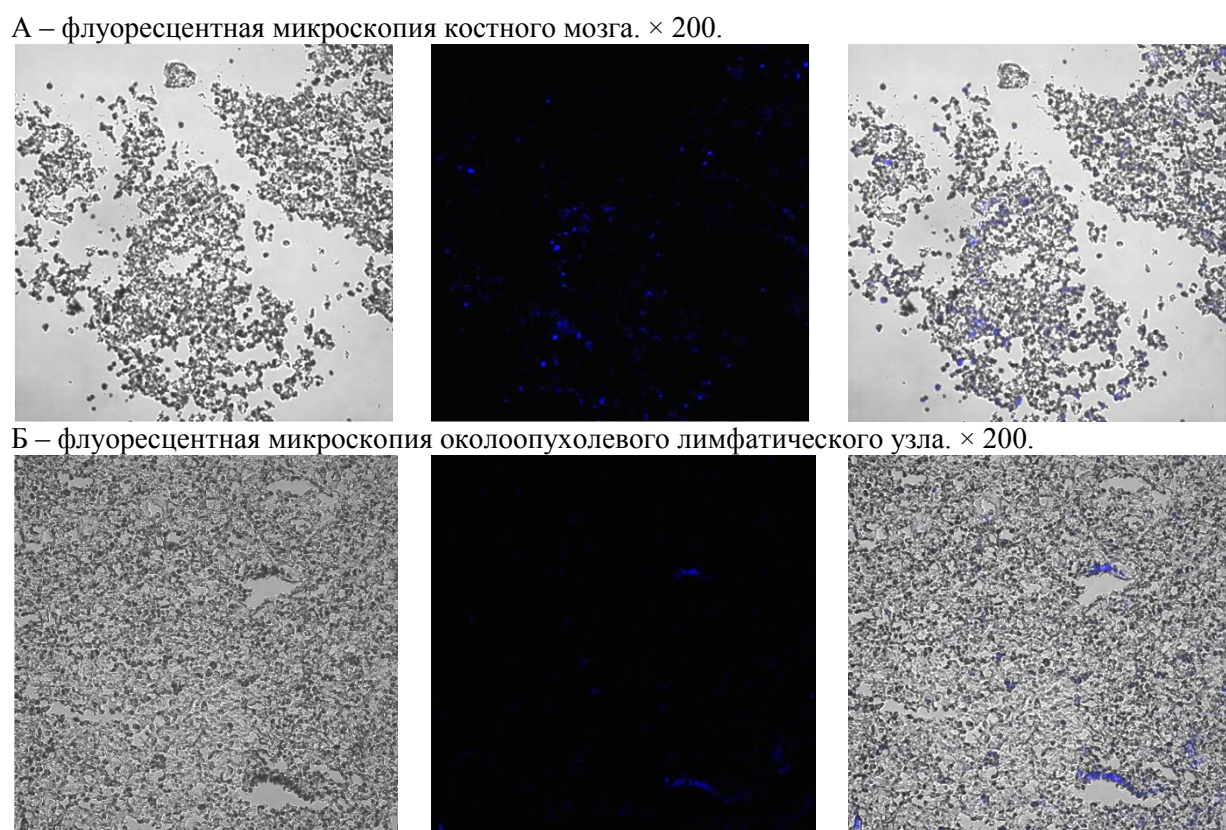


Рис. 13. Флуоресцентная микроскопия срезов органов мышей – носителей меланомы B16-F10 через 14 суток после трансплантации МСК.

ВЫВОДЫ

1. Получен, охарактеризован и заложен на хранение в коллекцию культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» штамм клеток из костного мозга мышей линии *C₅₇BL/6*, который обладал признаками, характерными для МСК, включая фибробластоподобную морфологию, иммунофенотип, способность адгезироваться к пластику при стандартных условиях культивирования, а также способность дифференцироваться в адипогенном и остеогенном направлении.

2. Установлено, что опухолевые клетки меланомы B16-F10 стимулируют миграционную активность МСК костного мозга в системе *in vitro*. В свою очередь, показано, что в условиях совместного культивирования МСК костного мозга мышей не влияют на пролиферацию опухолевых клеток.

3. Доказано, что внутривенное введение сингенных МСК через 3 суток после прививки меланомы B16-F10 не оказывает влияния на опухолевый рост и на выживаемость животных – носителей опухоли.

4. Установлены следующие особенности распределения штамма мезенхимальных стволовых клеток в условиях опухолевого роста после сингенной трансплантации мышам линии *C₅₇BL/6*:

- в опухолевой ткани максимальное количество введенных МСК выявлено через 3 суток после трансплантации по сравнению с остальными исследованными сроками;

- при внутривенном введении МСК мышам с привитой меланомой B16-F10 распределение этих клеток по органам и тканям в первый час после трансплантации не отличается от распределения у здоровых животных. При этом 50-65 % трансплантированных МСК задерживается в легких, к 3 суткам их количество в легких снижается до 0,5 %;

- через 3 суток после внутривенного введения МСК мышам с привитой меланомой B16-F10 количество введенных клеток в сердце и головном мозге в несколько раз превышает их количество у здоровых животных, к 7 суткам данная разница исчезает;

- через 7 и 14 суток после трансплантации более 2000 Y – позитивных клеток/10⁵ клеток органа реципиента обнаружены в костном мозге мышей – носителей меланомы B16-F10, тогда как в костном мозге интактных животных детектированы единичные клетки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Повещенко А.Ф., Шундрин Л.А., Авроров П.А., Соловьева А.О., Миллер Т.В., Зубарева К.Э. (Трифорова К.Э.), Волошина Т.В., Повещенко О.В., Коненков В.И. Молекулярные технологии анализа миграционной активности и распределения клеток костного мозга в условиях сингенной трансплантации // Современные наукоемкие технологии. – 2015. – № 11. – С. 22 – 30.

2. Соловьева А.О., Повещенко А.Ф., Повещенко О.В., Зубарева К. Э. (Трифорова К.Э.), Миллер Т. В., Коненков В. И. Сравнительное исследование миграции и

распределения донорских клеток костного мозга и селезенки в лимфоидные и нелимфоидные органы в разные сроки после трансплантации *in vivo* у мышей СВА // Бюллетень СО РАМН. – 2013. – № 4 (33). – С. 35 – 41.

3. Соловьева А.О., Зубарева К.Э. (Трифорова К.Э.), Повещенко А.Ф., Нечаева Е.А., Коненков В.И. Способы мечения клеток для визуализации *in vivo* // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8 (4). – С. 33 – 38.

4. Зубарева К.Э. (Трифорова К.Э.), Хрипко О.П., Нечаева Е.А. Дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из взрослых и фетальных тканей мышей / Вестник неотложной и восстановительной медицины. ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины», г. Донецк. – 2012. – Том 13 (1). – С. 58 – 60.

5. Solovieva A.O., Poveshchenko A.F., Zubareva K.E. (Trifonova K.E.), Poveshchenko O.V, Konenkov V.I. Distribution of the lymphoid cells of various functional activity after transplantation // Book of abstracts of 15th International Congress of Immunology. – Milan, Italy. – 2013. – P. 963.

6. Zubareva K.E. (Trifonova K.E.), Solovieva A.O., Poveshchenko A.F., Gritsyk O.B., Nechaeva E.A, Konenkov V.I. Spatial distribution of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in recipient's organs in the B16 melanoma model // Book of abstracts of 15th International Congress of Immunology. – Milan, Italy. – 2013. – P. 966.

7. Повещенко А.Ф., Соловьева А.О., Зубарева К.Э. (Трифорова К.Э.), Грицык О.Б., Авроров П.А., Повещенко О.В., Шурлыгина А.В., Труфакин В.А., Коненков В.И. Сравнительный анализ миграционной активности мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и неразделенной фракции клеток костного мозга после трансплантации животным опухоленосителям меланомы B16 // XI Международная конференция Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии. – Новосибирск, 08-09 октября 2013. – С. 250 – 254.

8. Соловьева А.О., Повещенко А.Ф., Повещенко О.В., Зубарева К.Э. (Трифорова К.Э.), Миллер Т.В., Покушалов Е.А., Караськов А.М., Коненков В.И. Сравнительное исследование миграции и распределения донорских клеток костного мозга и селезенки в лимфоидные и нелимфоидные органы *in vivo* у мышей СВА // XI Международная конференция Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии – Новосибирск, 08-09 октября 2013. – С. 300 – 305.

9. Зубарева К.Э. (Трифорова К.Э.), Хрипко О.П., Радаева И.Ф. Характеристика культуры мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека / Сборник тезисов V Всероссийского симпозиума с международным участием: «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии – Уфа. – 2012. – С. 153 – 154.

10. Зубарева К.Э. (Трифорова К.Э.), Хрипко О.П., Радаева И.Ф. Иммунофенотипирование фибробластоподобных клеток плаценты человека. Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье: Тезисы XV Юбилейной всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей (с международным участием). – СПб. – 2012. – С. 121 – 122.

11. Зубарева К.Э. (Трифорова К.Э.), Нечаева Е.А., Повещенко О.В., Ким И.И. Морфофункциональная характеристика культуры диплоидных клеток эмбриона человека DKL – 29. Сборник статей II Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». – СПб. – 2011. – С. 36 – 38.

Список сокращений

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

CD – номенклатура дифференцировочных антигенов клеток