

*На правах рукописи*

МИЩЕНКО

Полина Викторовна

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ  
КЛЕТОК НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Владивосток – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения  
Российской академии наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор **Хотимченко Юрий Степанович**

**Официальные опоненты:**

**Обухов Дмитрий Константинович**, доктор биологических наук, профессор,  
Санкт-Петербургский государственный университет, профессор кафедры  
цитологии и гистологии

**Деев Роман Вадимович**, кандидат медицинских наук, Институт фундаментальной  
медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета,  
ассистент кафедры морфологии и общей патологии

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт  
экспериментальной медицины»

Защита диссертации состоится « 12 » февраля 2016 г. в 10 часов на заседании  
диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном  
бюджетном учреждении науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского  
Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041,  
Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423) 2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В.  
Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук:  
<http://www.wimb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/23-mishchenko-polina-viktorovna>

Автореферат разослан «\_\_\_» декабря 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета, кандидат биологических наук

*Ващенко*

Ващенко Марина  
Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Мультиформная глиобластома, или астрацитома IV степени злокачественности по классификации ВОЗ является наиболее распространенной, первичной, высоко инвазивной глиальной опухолью головного мозга человека (Carlsson et al., 2014; Omuro et al., 2014; Frosina, 2015; Siegel et al., 2015) с крайне неблагоприятным прогнозом. Выживаемость больных при условии выполнения всех современных протоколов комплексного лечения составляет 6-12 мес (Vredenburgh et al., 2009; Arko et al., 2010; Frosina, 2015). Наряду с запоздалой диагностикой и отсутствием специфических диагностических маркеров, высокая пролиферативная активность и выраженная инфильтрация паренхимы мозга опухолевыми клетками в процессе инвазивного роста мультиформной глиобластомы являются главными причинами смерти этой категории больных (Carlsson et al., 2014).

В последние годы процессы инвазивного роста мультиформной глиобластомы связывают с опухолевыми стволовыми клетками, представляющими особую группу клеток опухоли (Bjerkvig et al, 2005; Vomken et al., 2010; Cheng et al, 2011; Clevers, 2011). Данный тип клеток был впервые идентифицирован при лейкозах и солидных опухолях (Sullivan et al., 2010). Важнейшей особенностью опухолевых стволовых клеток является способность восстанавливать ДНК, поврежденную воздействием облучения и химиотерапии (Vomken et al., 2010; Vinogradov, Wei, 2012). Клетки этого типа обладают мультипотентностью, способностью к самостоятельной миграции и имеют крайне высокий пролиферативный потенциал (Yu, Cao, 2012; Neryanto et al., 2015).

Опухолевые стволовые клетки представлены крайне неоднородной популяцией, именно поэтому лекарств и технологий, способных эффективно убивать этот тип клеток, практически не существует (Huang et al., 2010; Fabian et al., 2013). Поиск путей и механизмов, способных донести терапевтическое воздействие до молекулярных мишеней, свойственных данному типу клеток, является одним из магистральных направлений исследовательских изысканий в биологии и медицине (Frank et al., 2010; Hossein et al., 2011; Palmer et al., 2011; Hua et al, 2013).

В этом ключе особые перспективы связаны с терапевтическим применением аутологических стволовых клеток (Petrosiute et al., 2012). Среди потенциальных механизмов противоопухолевого действия стволовых клеток в литературе описан феномен их направленной миграции в неопластический очаг (Kim et al., 2010), арест цикла опухолевых клеток в фазе G1, подавление неопластического ангиогенеза, усиление воспалительной реакции и непосредственный запуск апоптоза (Kucerova et al., 2010; Калинина и др., 2011). Применение стволовых клеток в комплексном лечении мультиформной глиобластомы может существенно снизить токсичность химиотерапии, донести терапевтический сигнал до опухолевых клеток, инфильтрирующих паренхиму мозга и воздействовать на опухолевые стволовые клетки (Porada, Almeida-Porada, 2010; Tan et al., 2014; Tran, Damaser, 2015).

Внедрение биомедицинских клеточных технологий в протоколы комплексного лечения мультиформной глиобластомы требует всесторонней оценки противоопухолевого потенциала тканеспецифических стволовых клеток на моделях инвазивных глиальных злокачественных новообразований. Это позволит установить важные закономерности, идентифицировать ключевые особенности и определить принципиальные направления модификации стволовых клеток для повышения эффективности существующих схем лечения мультиформной глиобластомы.

**Цель настоящей работы:** изучить антипролиферативный потенциал гемопоэтических стволовых клеток и показать эффективность их трансплантации на модели экспериментальной глиобластомы.

**Задачи:**

1. Изучить антипролиферативный эффект гемопоэтических CD34+ стволовых клеток в отношении клеток глиомы C6 *in vitro*;
2. Проанализировать процесс взаимодействия гемопоэтических стволовых и опухолевых клеток глиомы C6 *in vitro*;
3. На модели экспериментальной глиобластомы изучить выживаемость и функциональный статус крыс с глиомой C6 после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток;

4. Исследовать противоопухолевый эффект гемопоэтических стволовых клеток у животных с глиомой С6 при их комбинированном введении с химиопрепаратом темозоломид.

**Научная новизна.** Установлено, что клетки глиомы линии С6 обладают иммуноцитохимическими признаками опухолевых стволовых клеток. Исследован противоопухолевый потенциал гемопоэтических CD34+ стволовых клеток человека на экспериментальной модели мультиформной глиобластомы. Установлено *in vitro*, что антипролиферативный эффект гемопоэтических CD34+ стволовых клеток в отношении клеток глиомы достигает максимума по мере увеличения числа стволовых клеток. Показано, что при совместном культивировании при изначальном соотношении гемопоэтических стволовых и опухолевых клеток глиомы С6 1:1 в процессе их взаимодействия происходит обмен цитоплазматическими белками, в процессе которого количество гемопоэтических стволовых клеток уменьшается. Показано, что трансплантация гемопоэтических CD34+ стволовых клеток экспериментальным животным с глиомой С6 улучшает их функциональный статус. Установлено, что трансплантация гемопоэтических CD34+ стволовых клеток лабораторным крысам с глиобластомой улучшает их функциональное состояние и увеличивает выживаемость после экспериментальной химиотерапии.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные по изучению взаимодействия гемопоэтических стволовых и опухолевых клеток глиомы С6 важны для понимания роли стволовых клеток в процессах канцерогенеза. Доказана прямая связь между числом стволовых клеток в зоне неоплазии и темпами прогрессирования злокачественных новообразований. Доказано, что применение стволовых клеток после курса химиотерапии темозоломидом замедляет темпы прогрессирования опухоли и увеличивает продолжительность жизни лабораторных животных. Работа позволяет экспериментально обосновать возможность направленной миграции стволовых клеток в опухолевый очаг. По результатам проведенной работы созданы теоретические предпосылки для разработки новых молекулярно-биологических подходов к терапии мультиформной глиобластомы.

**Методология и методы диссертационного исследования.** В данной работе были применены методы культивирования клеток взрослых млекопитающих. Для прижизненного отслеживания клеток в *in vitro* и *in vivo* в экспериментах применялся метод окраски живых клеток флуоресцентными красителями, методы проточной цитофлуориметрии, непрерывного мониторинга состояния клеточных культур, иммуноцитохимического исследования. Опухоли головного мозга были созданы при помощи экспериментальной стереотаксической хирургии с последующим их определением МРТ-диагностикой и общеморфологическом и иммуногистохимическом исследовании. Изучение влияния стволовых клеток на опухолевые процессы, выживаемость и объемы опухолевых узлов у животных в сочетании с экспериментальной химиотерапией проводили с исследованием функционального статуса экспериментальных животных.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Нативные гемопоэтические стволовые клетки обладают выраженным противоопухолевым потенциалом.
2. Противоопухолевая эффективность гемопоэтических стволовых клеток достигает максимума после применения цитостатических противоопухолевых препаратов.

**Степень достоверности результатов.** Фактические материалы, представленные в диссертации, полностью соответствуют первичной документации – протоколам исследований. Достоверность полученных результатов и выводов основывается на достаточном объеме выборки и статистической обработке с расчетом стандартного отклонения и критерия достоверности, использовании современных методов исследования, корректном анализе полученных данных.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены на I Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 4-6 декабря 2013 г); XII Всероссийской научно-практической конференции Отечественные противоопухолевые препараты (Москва 31 марта – 1 апреля, 2015 г); на ежегодных научных конференциях Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (Владивосток, 2014 г, 2015 г).

**Публикации.** Основные результаты работы опубликованы в виде 9 статей, 8 из них в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа представлена в виде 147 страниц машинописного текста, состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», заключения и выводов. В работе 26 рисунков и 5 таблиц. Список литературы содержит 250 источников.

**Личный вклад автора:** Экспериментальная часть работы была выполнена соискателем самостоятельно. Соискатель непосредственно участвовал в анализе и интерпретации полученных результатов, в представлении результатов на конференциях и подготовке публикаций по результатам исследований.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность сотрудникам кафедры «Клеточной биологии и генетики» Школы естественных наук ДВФУ, сотрудникам «Клиники восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита» (г. Москва), сотрудникам Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина, сотрудникам ООО «Инновационный медицинский центр» (г. Черкесск) за методологическую помощь и продуктивное научное сотрудничество.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации – проект №14.575.21.0038 (уникальный идентификатор проекта RFMEF157514X0038).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточные культуры.** Криобирки с клетками *глиомы линии С6*, *фибробластами* и *гемопозитическими стволовыми клетками человека (ГСК)* размораживали 5 мин при 37°C, переносили содержимое в 15 мл фальконы соответственно культуре, добавляли свежей среды Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), центрифугировали при 120g 3 мин. Сливали супернатант, добавляли DMEM + 10% фетальную бычью сыворотку (FBS) и 100X антибиотик-антимикотик. Клетки высевали в 25 см<sup>2</sup> культуральные флаконы по 10<sup>3</sup> клеток на 1 см<sup>2</sup> – для глиомы С6; в 75 см<sup>2</sup> флаконы по 2х10<sup>4</sup> клеток на 1 см<sup>2</sup> – для ГСК и в 25 см<sup>2</sup> флаконы по 15х10<sup>3</sup> клеток на 1 см<sup>2</sup> для фибробластов. Перед экспериментом

культуру клеток С6 и фибробластов снимали раствором TrypLE Express Enzyme (TrypLe) 7 мин 37°C и 15 мин 37°C соответственно, а культуру ГСК переносили в 15 мл фалькон, клетки центрифугировали при 120g 3 мин, сливали супернатант, добавляли DMEM + 10% FBS и 100X антибиотик-антимикотик. На всех этапах работы производили подсчет всех клеток в камере Горяева и оценивали их жизнеспособность путем окрашивания 0,4% трипановым синим.

**Флуоресцентные красители.** Перед внесением в смешанные культуры клетки глиомы С6, ГСК и фибробласты были обработаны флуоресцентным клеточным трейсером Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Molecular Probes; V12883) – CFDA SE, либо флуоресцентным клеточным трейсером CellTracker Red CMTPX Dye (Molecular Probes; C34552) – RED CMTPX. Одним из важнейших свойств клеточных трейсеров CFDA SE, RED CMTPX, является то, что флуоресцирующий краситель, связанный с белком, передается при митозе, слиянии клеток, отслеживании клеток *in vivo*, но важно, что он не проникает в близлежащие клетки.

**Проточная цитофлуориметрия.** Для подсчета клеток глиомы С6 и ГСК при совместном культивировании использовали метод проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки глиомы С6 культивировали до 90% слоя конfluence при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, обрабатывали раствором TrypLe 7 мин при 37°C, перемещали в 15 мл фалькон, добавляли DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик, центрифугировали при 120g 5 мин и окрашивали RED CMTPX. ГСК размораживали 5 мин при 37°C, перемещали в 15 мл фалькон, добавляли DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик, центрифугировали при 120g 5 мин и окрашивали CFDA SE. Глиому С6 и ГСК вносили в 12-луночные планшеты в соотношении 1:1 для совместного культивирования (по 4×10<sup>4</sup> клеток каждого вида в лунку). В качестве контроля высаживали ГСК и глиому С6 в отдельные лунки. После культивирования на сроках 3, 24, 48, 72 и 96 ч клетки подвергали ферментативной диссоциации (350 мкл TrypLe, 5 мин), переносили в отдельные пробирки соответственно лунке, добавляли DMEM + 10% FBS, центрифугировали при 120g 6 мин, сливали супернатант, затем в каждую пробирку добавляли PBS 0,1M 400 мкл и анализировали на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter.

**Иммуноцитохимическое исследование.** Для иммуноцитохимического исследования клетки глиомы линии С6 после культивирования в течение 2 сут



фиксировали: 4% ПФА – 20 мин при 4°C, 3 раза по 10 мин, промывали PBS 0,1M pH 7,4 + 0,2% tween 20 + 0,2% triton-x-100 + бычий сывороточный альбумин (БСА) 0,3% (рабочий раствор PBS). Иммуоцитохимическую окраску проводили по схеме: первичные антитела против Oligodendrocyte 4 – белка ранних олигодендроцитов 1:50 (R&G Systems; MAB1326; мышинные); GFAP – кислого фибриллярного белка 1:50 (Abcam; 7260; мышинные); p53 – белка, регулятора клеточного цикла 1:100 (Novex; AHO0152; мышинные); tubulin-β-III – белка микротрубочек нейронов 1:100 (Abcam; 7751; мышинные); нестина – нейрального маркера стволовости клеток 1:100 (Sigma-Aldrich; 5413; кроличьи); S100 – кальций-связывающего белка 1:100 (Abcam; ab868; кроличьи); CXCR4 – маркера миграции клеток 1:100 (Abcam; ab2074; кроличьи) в течение 18-20 ч, отмывали рабочим раствором 3 раза по 10 мин; вторичные антитела, конъюгированные с Alexa 488 1:500 (против мыши), либо вторичные антитела, конъюгированные с Alexa 633 1:500 (против кролика) – 2 ч при 37°C, отмывали рабочим раствором PBS 3 раза по 10 мин, ядра контрастировали DAPI 7 мин при 22°C, отмывали рабочим раствором PBS 2 раза по 10 мин и заключали в mowiol. Контроль на вторичные антитела проводили без использования первичных антител. Для анализа флуоресценции и визуализации иммуоцитохимической окраски использовали конфокальный (лазерный сканирующий) микроскоп Zeiss LSM 710 META (Carl Zeiss, Jena, Germany).

**Моделирование опухоли головного мозга *in vivo*** выполняли с помощью внутримозговой стереотаксической имплантации клеток крысиной глиомы линии С6. Было использовано 230 половозрелых самок крыс общей массой 200-220 г в начале эксперимента. Животных наркотизировали путем внутрибрюшинного введения смеси, содержащей Золетил 100 + Рометар в соотношении 1:4 из расчета 10 мг/кг массы тела животного. В стерильных условиях рассекали мягкие ткани, в соответствии с ранее установленными координатами, накладывали трепанационное отверстие в черепе, используя микродрель производства Harvard Bioscience Company. Клетки вводили с помощью гамильтоновского шприца со скоростью 3 мкл/мин в область каудопутамена с помощью стереотаксического аппарата для крыс Narishige (Japan) по координатам атласа мозга крысы (Paxinos, Watson, 2007): Ap-1; L 3,0; V 4,5, TBS-2,4 мм.

**Химиотерапия.** В работе был использован цитостатический алкилирующий химиопрепарат с действующим веществом темозоломид, производства Shering-Plough Labo N.V. (Belgia) под торговым названием Temodal.

**Морфологическое и иммуногистохимическое исследование** проводили на 10, 14, 21, 28, 35 сут после имплантации глиомы. Крыс наркотизировали и перфузировали трансаортально 4% ПФА. Для морфологического анализа тканей парафиновые срезы головного мозга толщиной 7 мкм депарафинировали и окрашивали гематоксилин-эозином и 0,1% толуидиновым синим на 0,1 М ацетатном буфере рН 3,5. При иммуногистохимическом исследовании использовали метод иммунопероксидазной реакции выявления ряда глиальных и пролиферативных маркеров, который состоит из этапов: фиксация кусочков ткани (4% ПФА 12 ч), промывка в PBS; заливка в парафин; получение серийных парафиновых срезов толщиной 7 мкм; прединкубация в растворах, блокирующих эндогенную пероксидазную активность и неспецифическое связывание антител; обработка срезов в растворе первичных антител (4°C, 24 ч); обработка вторичными антителами и постановка иммунопероксидазной реакции. В работе использованы первичные поликлональные мышинные и кроличьи антитела против GFAP – глиального кислого фибриллярного белка (Vector Laboratories; G 805), iba-1 – микроглия/макромаг-специфического белка (Abcam; 107159), PCNA – ядерного антигена пролиферирующих клеток (Abcam; ab29) в разведении 1:200, 1:300 и 1:2000 соответственно. Вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена PI-1000 (anti-rabbit); PI-2000 (anti-mouse) 1:300 фирмы Vector Laboratories. Для проведения иммунопероксидазной реакции использовали хромоген NovaRED substrate kit (Vector Laboratories; SK-4800). Затем срезы отмывали 0,1М PBS, обезвоживали и заключали в бальзам. Препараты просматривали в световом микроскопе Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия).

**Эксперимент *in vitro*.** 24-луночные планшеты заполняли DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик. На I этапе, окрашенные трейсером CFDA SE ГСК, вносили в неокрашенную культуру клеток глиомы С6 в соотношении 3:1; 1:1; 1:3 и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> 120 ч. На II этапе ГСК человека окрашивали RED CMTPX, вносили их в культуру с опухолевыми клетками, окрашенными

CFDA SE в соотношении 3:1; 1:1; 1:3 и культивировали 120 ч. На третьем этапе эксперимента ГСК окрашивали CFDA SE и вносили в культуру опухолевых клеток, окрашенных RED CMTPX в соотношении 3:1; 1:1; 1:3 и культивировали 120 ч. Взаимодействие клеток определяли путем перехода флуоресцентных красителей при помощи системы мультифотонной лазерной микроскопии компании Olympus. Количество клеток определяли по числу флуоресцирующих объектов с помощью системы Cell-IQ (CM Technologies) в полностью автоматизированном режиме.

**Эксперимент *in vivo*** поставлен в три этапа. Для моделирования опухоли головного мозга крысам на I этапе работы проводили подбор оптимального количества клеток. I группе (N=15) введено  $2 \times 10^5$  клеток С6, II группе (N=15) –  $5 \times 10^5$ , III группе (N=15) –  $2 \times 10^6$  клеток. На II этапе для исследования миграции ГСК в зону опухоли на 10 сут после имплантации клеток глиомы животным вводили ГСК в количестве  $4 \times 10^5$  в 400 мкл NaCl в хвостовую вену. Крысы были разделены на три группы: группа С6+ГСК (N=30) – с глиомой С6 и введением окрашенных CFDA SE ГСК в хвостовую вену; группа С6 (N=30) – с глиомой С6, на 10 сут вводили в хвостовую вену NaCl; группа контроль – интактные крысы (N=30). Миграцию клеток исследовали на 3, 5 и 7 сут после введения ГСК при помощи гистологического анализа головного мозга крыс. Оценку функционального статуса крыс проводили по неврологическому протоколу Тупера и Валаса (Tupper, Wallace, 1980). На III этапе работы проведена химиотерапия животным с глиомой С6. I группу «Контроль» составили животные с глиомой С6 (N=30). II группа «темозоломид» (N=30) – крысы с глиомой и проведением терапии темозоломидом в дозе 50 мг/кг массы животного с 10 по 14 сут после имплантации опухолевых клеток. III группа «Темозоломид + клетки» (N=30) состояла из крыс с глиомой С6, которым после терапии темозоломидом в дозе 50 мг/кг массы животного с 10 по 14 сут после имплантации опухолевых клеток проводилась трансплантация ГСК в хвостовую вену в количестве  $4 \times 10^5$  клеток. Экспериментальная часть работы, в том числе использование человеческого материала для исследовательских целей, была одобрена этическим комитетом ИБМ ДВО РАН.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**1. Антипролиферативный эффект гемопоэтических стволовых клеток в отношении глиомы С6 *in vitro*.** ГСК активно взаимодействуют с клетками С6 при совместном культивировании, что тормозит пролиферацию опухолевых клеток (рисунок 1). Ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток глиомы становится более очевидным по мере увеличения численности ГСК.

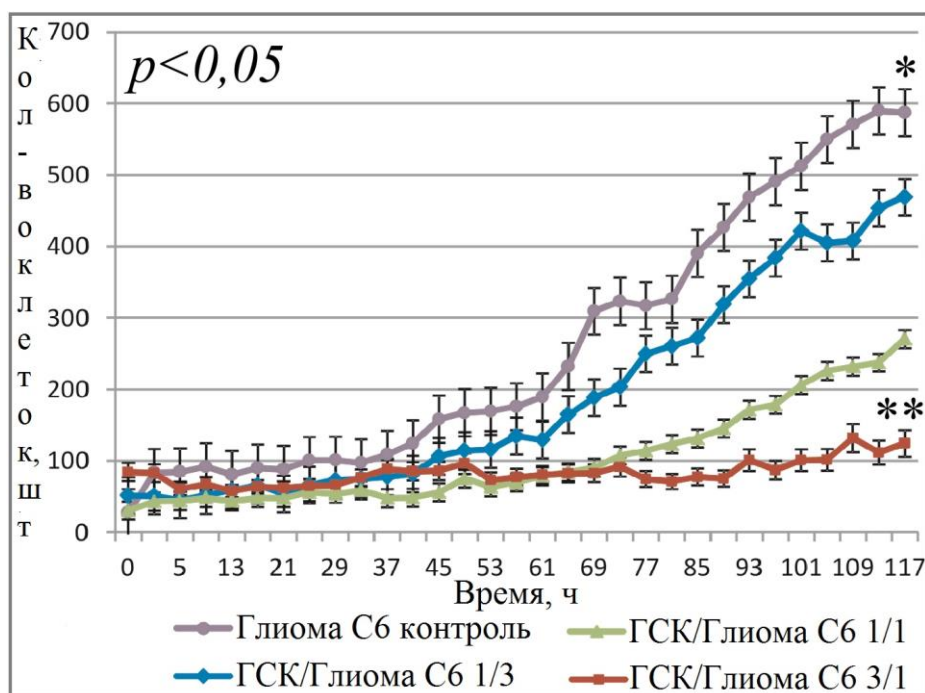


Рисунок 1 – Динамика роста клеток глиомы С6 в кокультурах с ГСК в соотношениях 1/1, 1/3, 3/1. Указаны планки стандартного отклонения.

**2. Особенности антипролиферативного действия гемопоэтических стволовых клеток в отношении глиомы С6 *in vitro*.** На I этапе эксперимента ГСК были внесены в неокрашенную культуру клеток глиомы. Через 1 ч культивирования мы визуализировали ГСК округлой формы при  $\lambda=488$  нм (рисунок 2А), также хорошо были видны клетки глиомы в виде округлых, веретеновидных и полигональных образований в фазовом контрасте. Через 24 ч в цитоплазме опухолевых клеток стали появляться включения CFDA SE, а спустя 72 ч практически все клетки глиомы содержали в цитоплазме включения зеленого красителя (рисунок 2Б). Через 96 ч наблюдений клетки глиомы в сочтанной культуре С6/ГСК отвечали активной флуоресценцией при воздействии лазера с  $\lambda=488$  нм. Спустя 120 ч наблюдения мы не могли идентифицировать ГСК в смешанной культуре, что может объясняться их дифференцировкой, гибелью или

слиянием с опухолевыми клетками. На II этапе мы вносили ГСК обработанные RED CMTPX в культуру клеток глиомы С6, окрашенных CFDA SE. На III этапе – наоборот. На всех этапах эксперимента через 48 ч мы наблюдали накопление клеточного красителя в клетках глиомы С6. Данное явление было максимально выражено спустя 96 и 120 ч.

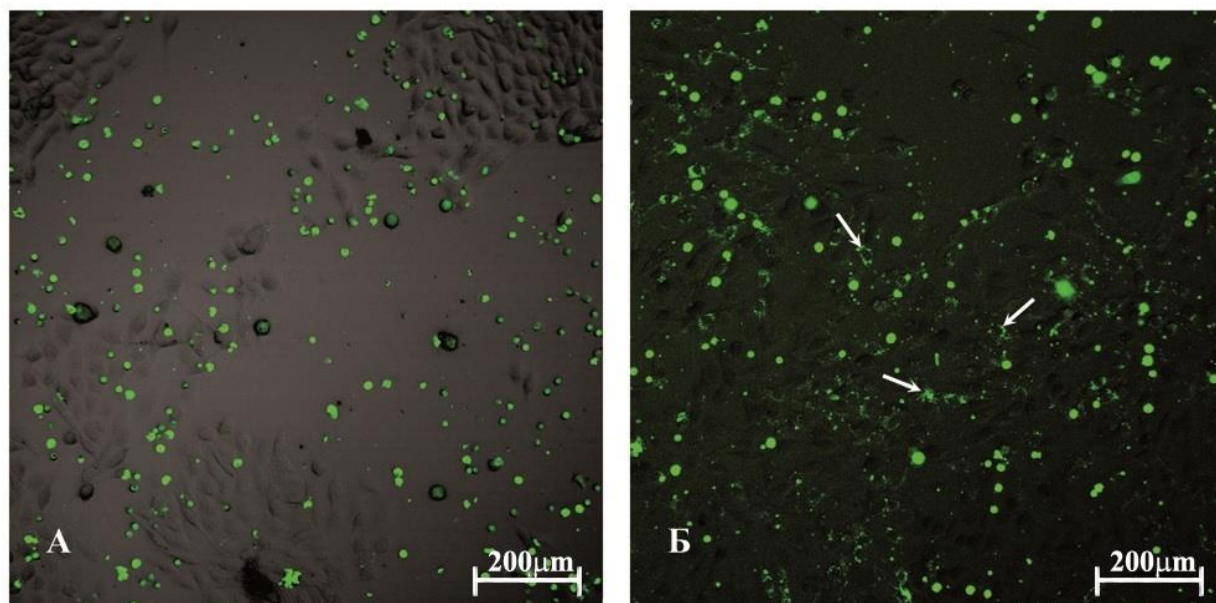


Рисунок 2 – Взаимодействие ГСК и опухолевых клеток С6 *in vitro*. Конфокальная сканирующая микроскопия. I этап эксперимента. А – флуоресценция ГСК (окрашены CFDA SE,  $\lambda=488$  нм) в культуре клеток С6 (неокрашены) через 1 ч кокультивирования. Б – накопление CFDA SE клетками глиомы через 72 ч.

По результатам анализа по совместному культивированию ГСК и глиомы С6 в соотношении 1:1, проведенного на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter на сроках 24, 48, 72 и 96 ч, нами было показано, что активное взаимодействие клеток происходит на 24-48 ч. Мы наблюдали популяцию клеток, содержащих двойную окраску на 24 ч  $26,31 \pm 1,79\%$ , на 48 ч –  $36,81 \pm 4,61\%$ . По мере увеличения срока культивирования наблюдалась тенденция к исчезновению ГСК, к 24 ч в смешанной культуре количество ГСК составило 47,45%, а к 96 ч этот показатель был 0,73%. Причем в контролях, количество ГСК и клеток глиомы С6 закономерно увеличивается.

### **3. Экспериментальная модель злокачественной глиальной опухоли головного мозга *in vitro* и *in vivo*.**

**Иммуноцитохимическая характеристика модели *in vitro*.** 96%±6,8 клеток глиомы С6 окрашивалось антителами к нестину – одному из ключевых маркеров стволовых клеток нейрального ряда. 46%±3,7 клеток глиомы – к белку Oligodendrocyte 4 и 76%±5,3 клеток – к кальций-связывающему белку астроцитарной глии S100, что свидетельствует о принадлежности глиомы С6 к клеткам нейроэпителиального ряда. 55,8%±4,8 опухолевых клеток С6 окрасились антителами к белку Tubulin-β-III, который является основным компонентом микротрубочек, формирующих цитоскелет. Часть популяции клеток 19,63%±4,92 окрашивалась к антителам против CXCR4, который является рецептором хемокинов и играет важную роль в процессах инвазии опухолевых клеток.

Реакция к белку GFAP свойственна 38%±4,6 клеток С6. Полученные данные позволяют рассматривать клетки глиомы как тканеспецифические нейральные стволовые клетки. 88%±3,8 опухолевых клеток окрашиваются антителами к мутантному белку p53 – регулятору клеточного цикла, что отвечает на вопрос об их принципиальных отличиях от здоровых стволовых клеток.

**Гистологическая и иммуногистохимическая характеристика модели *in vivo*.** После имплантации опухолевых клеток глиомы С6 в головной мозг крыс было проведено морфологическое исследование, которое на 14 сут выявило в месте имплантации опухолевых клеток очаг продолговатой формы с нерезкими контурами, участками инвазии в мозговую паренхиму и множеством новообразованных кровеносных сосудов. Опухоль была представлена скоплением клеток с ядрами разнообразной формы и размера, полостями, содержащими дегенерирующие клетки с пикнотизированными ядрами. Инвазивный рост сопровождался инфильтрацией мозговой ткани опухолевыми клетками, которые создавали вторичные очаги и запускали процессы неопластического ангиогенеза (рисунок 3А). Окраска маркером iBa-1 выявила преобладание микроглиоцитов в опухолевом очаге (56,2%) и их повышенное накопление на стороне поражения в тканях, рядом с первичным очагом (17,8%), что свидетельствовало об активном участии микроглиоцитов в процессах инвазивного роста (рисунок 3Б). Выявлена пролиферация микроглиоцитов, наряду с опухолевыми и эндотелиальными

клетками, как в зоне неоплазии, так и прилегающих к ней участках мозга и кровеносных сосудах (рисунок 3Г). На 14 сут GFAP-позитивные клетки, содержали большое количество ветвистых отростков различной длины, располагались вдоль границ первичного узла и концентрировались вокруг неопластической ткани, но отсутствовали в опухоли (рисунок 3В). Площадь окрашивания GFAP-позитивной глии на стороне опухоли (19,8%) и тканях противоположного полушария (16,5%) существенно не отличалась. На 21 сут морфологическая картина меняется. Группировка неопластических клеток вокруг новообразованных кровеносных сосудов становится более плотной, однако их миграция в окружающую паренхиму мозга становится более выраженной. Основную массу опухоли начинают занимать обширные зоны некроза (рисунок 4А).

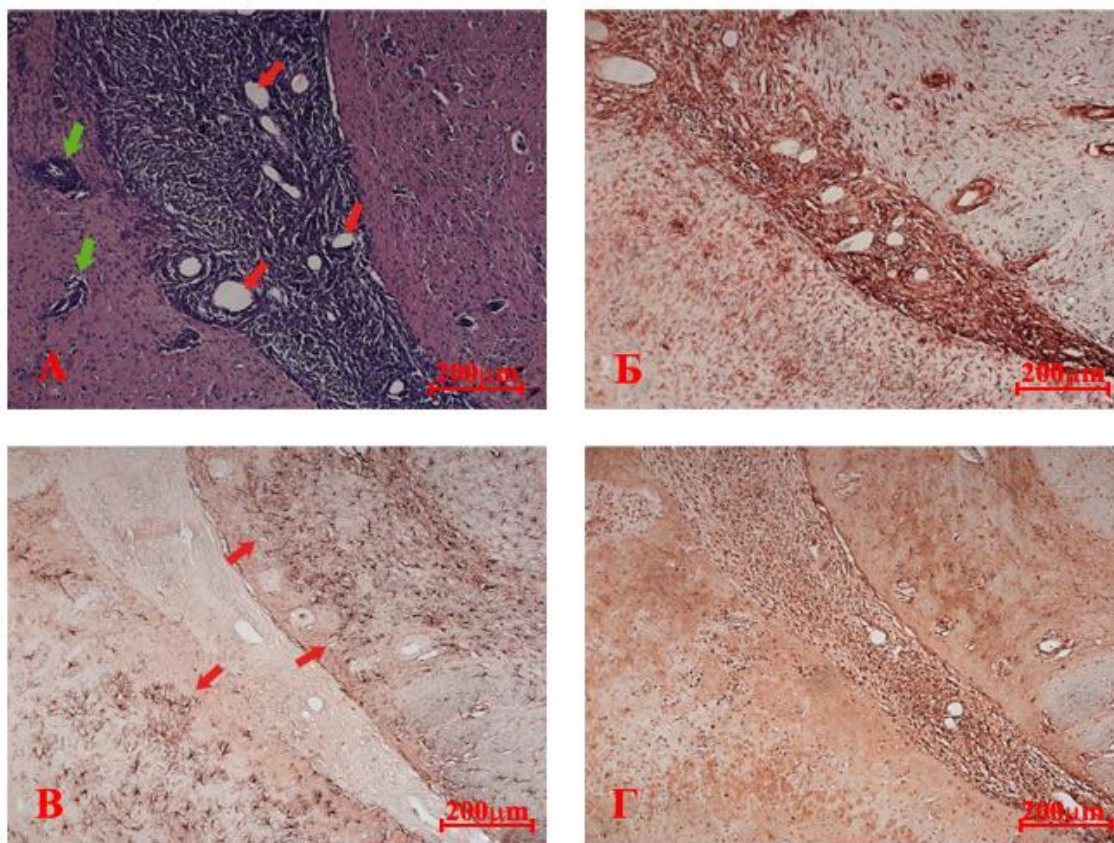


Рисунок 3 – Морфология опухолевого узла в мозге крыс на 14 сут после имплантации клеток глиомы. А – опухолевый очаг с кровеносными сосудами (красные стрелки) и вторичными очагами (зеленые стрелки). Окраска гематоксилин-эозин. Б – микроглия опухолевого очага. Окраска антителами к *iba-1*. В – GFAP-позитивные клетки, окружающие опухолевый очаг. Окраска антителами к GFAP. Г – пролиферация в опухоли. Окраска антителами к PCNA.

Количество *iba-1*-позитивных клеток в опухолевой ткани уменьшается (24,3%), подобно опухолевым клеткам они окружают новообразованные кровеносные сосуды (рисунок 4Б) и упираются в зоны некроза. В опухоли только зоны некроза интенсивно окрашиваются антителами к GFAP, что свидетельствует о накоплении в этих областях глиального фибриллярного кислого белка (рисунок 4В). Опухоль равномерно окрашивается маркерами пролиферации (рисунок 4Г).

На 28 сут опухоль достигала больших размеров, что сопровождалось выраженным отеком вещества головного мозга. Опухолевая ткань содержала огромное количество новообразованных микрососудов со сгруппированными вокруг них опухолевыми клетками, которые граничили с обширными зонами некрозов (рисунок 5А).

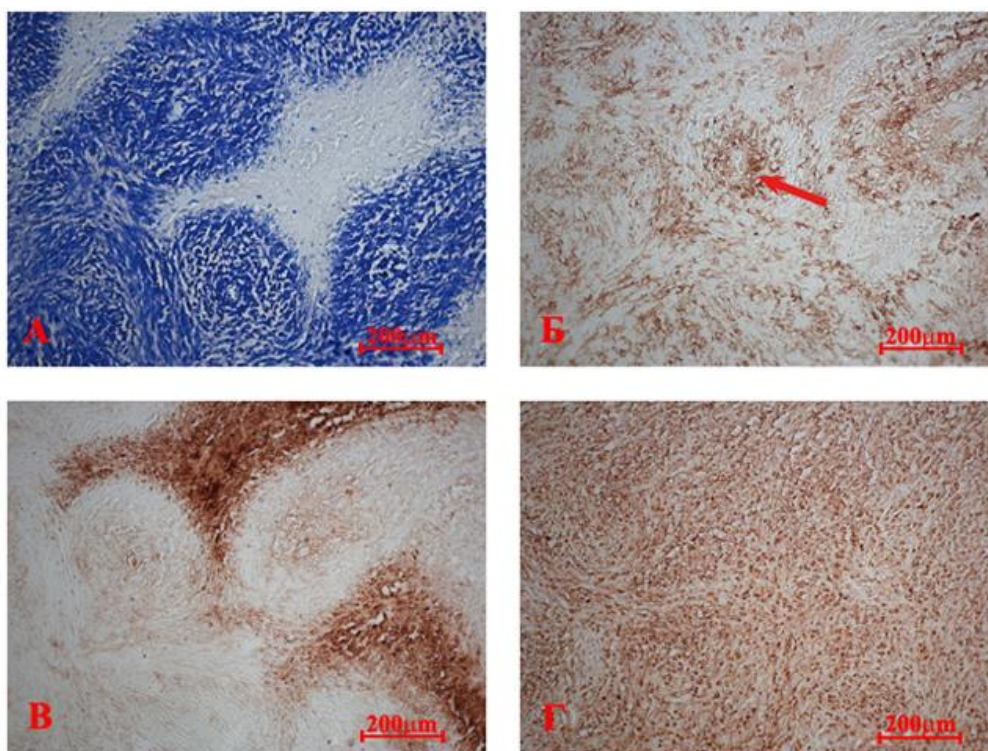


Рисунок 4 – Морфология опухолевого очага в мозге крыс на 21 сут. А – обширные некрозы в опухоли (светлые зоны). Окраска толуидиновый синий. Б – микроглиоциты в опухоли, окружающие кровеносный сосуд. Окрашивание антителами к *iba-1*. В – опухолевый очаг с обширными некрозами, окрашенными антителами к GFAP (темно-коричневые зоны). Г – активно делящиеся опухолевые клетки неопластического очага. Окраска маркером пролиферации к PCNA.

Микроглиоциты группировались вокруг кровеносных сосудов и распределялись по опухоли, следуя вектору инвазии опухолевых клеток в



паренхиму мозга, их количество в неопластическом очаге (31,9%) и околоопухолевом пространстве (8,2%) существенно не изменилось (рисунок 5Б). В опухолевой ткани появлялись единичные GFAP-позитивные клетки, расположенные на некотором удалении от кровеносных сосудов. GFAP-позитивные глиоциты (7,8%) были отмечены в мозговой ткани непосредственно граничащей с опухолью (рисунок 5В). Окраска антителами к белку PCNA свидетельствовала о высокой интенсивности пролиферативных процессов в области инвазии опухолевых клеток в паренхиму мозга (рисунок 5Г).

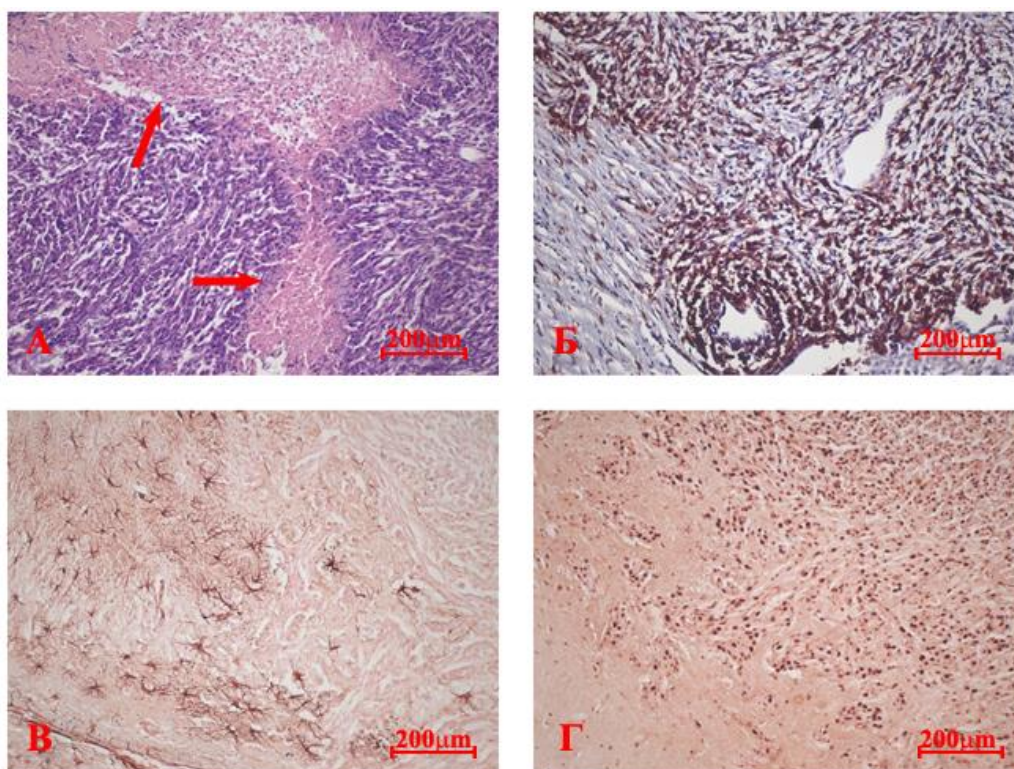


Рисунок 5 – Морфология опухолевого очага мозга крысы на 28 сут. А – зона опухоли с обширными некрозами. Окраска гематоксилин-эозин. Б – скопление микроглиоцитов вокруг кровеносных сосудов. Окраска антителами к *iba-1* + гематоксилин. В – астроглиальные клетки в 500 мкм от опухоли. Окраска антителами к GFAP. Г – пролиферирующие клетки на границе с опухолью мозга в зоне инвазии. Окраска антителами к PCNA.

Таким образом, стереотаксическая имплантация  $2 \times 10^5$  клеток глиомы в головной мозг крыс в сжатые сроки воспроизводит сложный каскад межклеточных взаимодействий между ОСК и локальным микроокружением, ведущий к изменению внутритканевой иерархии и позволяет получить экспериментальную модель глиобластомы человека. Морфологически опухоль характеризуется

высокой агрессивностью, инвазивным ростом, клеточным полиморфизмом, интенсивной пролиферацией опухолевых клеток, ангиогенезом, быстрым формированием очагов некроза, выраженной реакцией астроцитарной глии, окружающей неопластическую ткань. Клетки микроглии, интенсивно инфильтрирующие опухоль, концентрируются в зонах инвазивного роста, сопровождают миграцию опухолевых клеток в паренхиму мозга и являются проводником процессов инвазии.

#### 4. Оценка эффективности гемопоэтических стволовых клеток до и после применения химиотерапии.

##### *Феномен направленной миграции ГСК к глиоме головного мозга крыс.*

На гистологических срезах в сосудах головного мозга были обнаружены ГСК на 3 и 5 сут после их введения в хвостовую вену крыс.

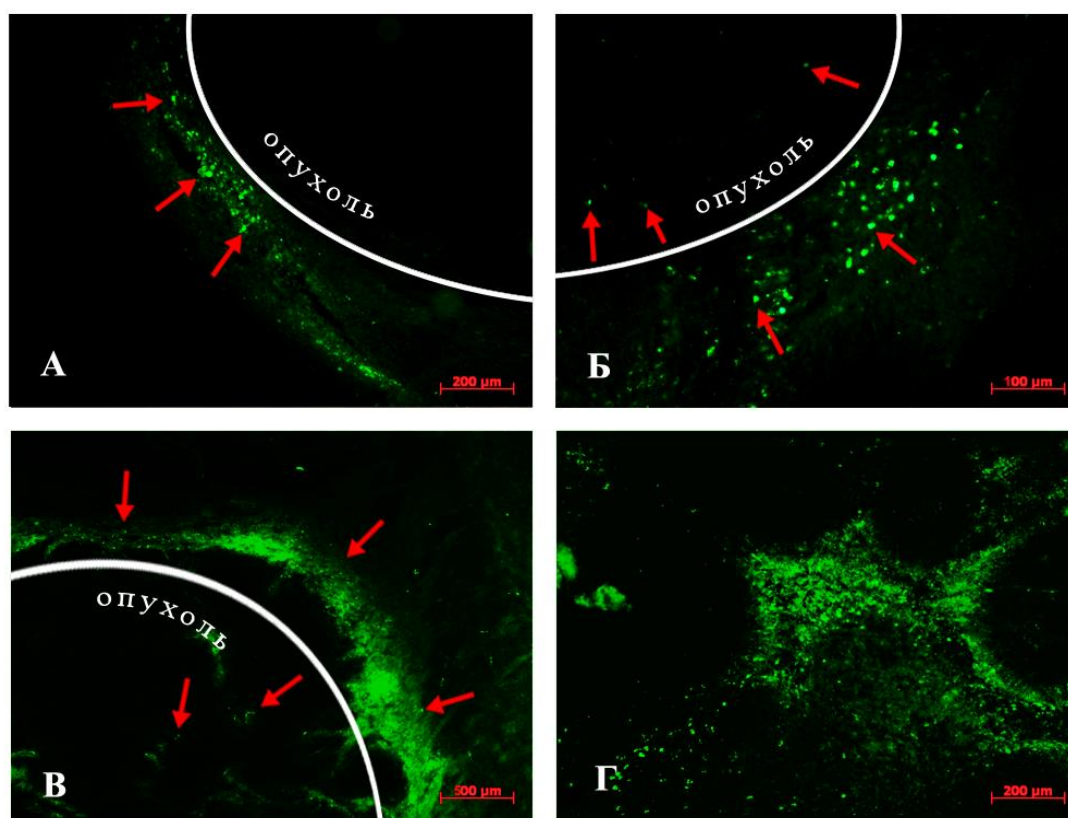


Рисунок 6 – Гистология головного мозга крыс. Миграция окрашенных CFDA SE ГСК к опухолевому очагу. А – миграция ГСК на 5 сут после введения. Б – скопление ГСК вокруг опухоли на 5 сут после введения, единичные клетки проникают в неопластический очаг. В – формирование вала ГСК вокруг опухоли на 7 сут после введения. Г – скопление ГСК в зоне некроза на 7 сут после введения. Конфокальная сканирующая лазерная микроскопия.

Нами было показано, что ГСК мигрируют к неопластическому очагу, скапливаясь вокруг зоны опухоли (рисунок 6А). Единичные клетки проникают в опухоль (рисунок 6Б). На 7 сут миграция ГСК становится все более очевидной, клетки формируют вал вокруг опухоли (рисунок 6В), также мы наблюдали скопление ГСК в зонах некроза (рисунок 6Г).

В нашем эксперименте ГСК, введенные в системный кровоток, мигрировали к опухоли, проникали в неопластическую ткань и накапливались в зонах максимально выраженной гипоксии. Средняя продолжительность жизни животных с глиомой С6, получивших трансплантацию стволовых клеток, составила  $29,56 \pm 1,94$  дней с начала эксперимента. Большая часть крыс группы «С6+ГСК» длительно не обнаруживала грубых признаков поражения центральной нервной системы. Эти животные длительное время оставались более активными по сравнению с контролем, не отказывались от еды и не обнаруживали значительной потери массы тела. Трансплантация ГСК улучшала функциональный статус экспериментальных крыс. Это позволяет рассматривать индуцированную гипоксией миграцию ГСК в опухолевый очаг как стратегически важный клеточный механизм противоопухолевой защиты. Таким образом, миграция ГСК в область неопластического повреждения представляет собой многоуровневый регуляторный механизм.

***Оценка эффективности гемопозитических стволовых клеток при введении в организм животных с глиомой С6 после системного применения химиотерапевтического препарата темозоломид.*** Средняя продолжительность жизни группы «Контроль» составила  $27,23 \pm 5,82$  сут после операции. Животные быстро теряли массу тела, наблюдалась быстро нарастающая неврологическая симптоматика, с последующим развитием комы. Средняя продолжительность жизни группы «Темозоломид» составляла  $46,2 \pm 3,6$  сут и была достоверно выше, чем в контроле ( $p < 0,05$ ). Общее состояние животных было менее тяжёлым, чем в группе «Контроль», характеризовалось большей стабильностью и менее резким развитием тяжелых неврологических нарушений. Продолжительность жизни животных группы «Темозоломид+клетки», получавших химиотерапию с последующим введением ГСК составила  $62,8 \pm 4,85$  сут и была достоверно выше,

чем в контроле ( $p < 0,05$ ). Изначально введенные ГСК в хвостовую вену крыс визуализировались как в области опухоли, так и на некотором расстоянии от нее. Очевидно, в процессе роста глиомы они мигрировали вслед за неопластическими клетками в паренхиму мозга, и возможно, взаимодействовали с ними. Неврологическое исследование длительное время не выявляло грубых нарушений. Объем опухоли у экспериментальных животных существенно отличался. Наименьший объем выявлен у групп «Темозоломид»  $115,76 \pm 9,25$  мм<sup>3</sup> и «Темозоломид+клетки»  $114,74 \pm 5,54$  мм<sup>3</sup>. Эти значения достоверно ( $p < 0,05$ ) меньше размеров опухоли в группе «Контроль»  $202,09 \pm 39,72$  мм<sup>3</sup>. Обращает внимание, что достоверно высокий показатель выживаемости у крыс группы «Темозоломид+клетки» сочетался с минимальным объемом опухоли, при этом наименьшее значение размера опухолевого узла у животных группы «Темозоломид» не сочетались с достоверным увеличением продолжительности жизни крыс этой группы. В свою очередь, увеличение продолжительности жизни животных группы «Темозоломид+клетки» по сравнению с крысами, получившими только химиотерапию, следует объяснить отчетливым противоопухолевым действием ГСК. Взаимодействие стволовых и опухолевых клеток в головном мозге крыс представляется комплексным и сложным. Применение темозоломида приводит к радикальному уменьшению объема опухоли. Введение ГСК после курса химиотерапии достоверно ( $p < 0,05$ ) увеличивает продолжительность жизни животных, по сравнению с группой, получавших только темозоломид. Таким образом, выживаемость, как главный критерий эффективности терапии в онкологии, с использованием клеточной трансплантации достоверно увеличивается. Идентификация механизмов этого явления и разработка более тонких методов и деликатных технологий управления процессами клеточной индукции входит в число приоритетных задач ближайшего будущего.

## ВЫВОДЫ

1. Гемопозитические стволовые клетки *in vitro* тормозят пролиферацию клеток глиомы С6; выраженность антипролиферативного эффекта гемопозитических стволовых клеток в отношении клеток глиомы С6 возрастает по мере увеличения числа гемопозитических стволовых клеток в культуре.

2. В процессе взаимодействия гемопозитических стволовых и опухолевых клеток *in vitro* при изначальном соотношении 1:1 наблюдается обмен цитоплазматическими белками, в ходе которого количество гемопозитических стволовых клеток в смешанной культуре уменьшается.

3. Клетки глиомы линии С6 имеют иммунофенотипические признаки опухолевых стволовых клеток: содержат  $96,7 \pm 6,8\%$  нестин-положительных клеток,  $19,63 \pm 4,92\%$  CXCR4-положительных клеток и  $88,4 \pm 3,8\%$  клеток, окрашенных к мутантному белку p53.

4. Имплантация клеток глиомы линии С6 в головной мозг лабораторных крыс позволяет в сжатые сроки получить инвазивную опухоль, идентичную мультиформной глиобластоме человека.

5. Трансплантация гемопозитических стволовых клеток в организм животного с экспериментальной глиобластомой улучшает функциональный статус лабораторных животных.

6. Введение гемопозитических стволовых клеток после применения цитостатического химиопрепарата темозоломид снижает темпы прогрессирования опухоли, уменьшает размеры опухолевого узла и увеличивает выживаемость животных с экспериментальной глиобластомой.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ****Публикации в научных журналах, рекомендованные ВАК:**

1. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Кумейко В.В., **Мищенко П.В.**, Хотимченко Ю.С. Стволовые клетки в канцерогенезе мультиформной глиобластомы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 2. С. 13-19.
2. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., **Мищенко П.В.**, Хотимченко Ю.С. Роль системных механизмов миграции и хоуминга стволовых клеток в развитии злокачественных опухолей центральной нервной системы и разработке новых методов противоопухолевой терапии // Российский биотерапевтический журнал. 2013. Т. 12, № 3. С. 3-12.
3. Брюховецкий И.С., **Мищенко П.В.**, Хотимченко Ю.С., Брюховецкий А.С. Обоснование в эксперименте *in vitro* феномена направленной миграции гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток взрослых млекопитающих к клеткам крысиной глиомы линии С6 // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2014. Т. 25, №1-2. С. 31-38.
4. Брюховецкий И.С., **Мищенко П.В.**, Толоч Е.В., Хотимченко Р.Ю., Брюховецкий А.С. Взаимодействие гемопоэтических стволовых и опухолевых клеток *in vitro* // Тихоокеанский медицинский журнал. 2014. № 3. С. 31-37.
5. Брюховецкий И.С., **Мищенко П.В.**, Толоч Е.В., Хотимченко Р.Ю., Брюховецкий А.С. Миграция гемопоэтических стволовых клеток человека к клеткам глиобластомы линии U87 *in vitro* // Российский биотерапевтический журнал. 2014. Т. 13, № 4. С. 31-36.
6. Брюховецкий И.С., **Мищенко П.В.**, Толоч Е.В., Хотимченко Ю.С., Зайцев С.В., Брюховецкий А.С. Гемопоэтические стволовые клетки с индуцированным апоптозом эффективно подавляют рост клеток глиомы *in vitro*, но запускают новый механизм образования опухолевых стволовых клеток // Гены и клетки. 2014. Т. 9, № 4. С. 70-75.

7. Bryukhovetskiy I., Bryukhovetskiy A., Khotimchenko Y., **Mischenko P.**, Tolok E., Khotimchenko R. Combination of the multipotent mesenchymal stromal cell transplantation with administration of temozolomide increases survival of rats with experimental glioblastoma // *Molecular Medicine Reports*. 2015. V. 12. P. 2828-2834.
8. Bryukhovetskiy I.S., **Mischenko P.V.**, Tolok E.V., Zaitcev S.V., Khotimchenko Y.S., Bryukhovetskiy A.S. Directional migration of adult hematopoietic progenitors to C6 glioma *in vitro* // *Oncology Letters*. 2015. V. 9, № 4. P. 1839-1844.

**Работы, опубликованные в других изданиях:**

9. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., **Мищенко П.В.**, Меркулов И.А., Хотимченко Ю.С. Стволовые клетки в терапии злокачественных опухолей головного мозга: реальность и перспективы // *Клиническая практика*. 2013. № 4. С. 45-57.

**Работы, опубликованные в материалах всероссийских конференций:**

10. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Мищенко П.В., Хотимченко Ю.С. Патотропизм взрослых предшественников гемопоэза к глиоме С6 в эксперименте *in vitro* как стратегический аргумент при выборе клеточных линий для создания инновационных способов лечения мультиформной глиобластомы // *Материалы I Национального конгресса по регенеративной медицине – Москва: МЕДИ Экспо, 2013. С. 38-39.*
11. Брюховецкий И.С., Мищенко П.В., Толлок Е.В., Хотимченко Р.Ю., Зайцев С.В., Брюховецкий А.С. Стволовые клетки с индуцированным апоптозом подавляют рост клеток глиомы *in vitro*, но запускают новый механизм образования опухолевых стволовых клеток // *Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции "Отечественные противоопухолевые препараты"* – Москва: Российский биотерапевтический журнал. 2015. Т. 14, № 1. С. 65.

МИЩЕНКО

Полина Викторовна

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ  
КЛЕТОК НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук