

УДК 616-006.484-085:576.362:59.07

ФЕНОМЕН НАПРАВЛЕННОЙ МИГРАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ К ОЧАГУ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ КАК ОСНОВА ИННОВАЦИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ И АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

И.С. Брюховецкий¹, А.С. Брюховецкий^{2,3}, В.П. Чехонин⁴, В.П. Баклаушев⁴, Ю.С. Хотимченко⁵

¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690059, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17),

² Клиника восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита» (115478, г. Москва, Каширское шоссе, 23, стр. А), ³ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России (115682 г. Москва, Ореховый бульвар, 28), ⁴ Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского (119991, г. Москва, Кропоткинский пер., 23),

⁵ Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690091, г. Владивосток, ул. Суханова, 8)

Ключевые слова: нейральные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, глиобластома.

Миграция в очаг поражения представляет собой фундаментальное свойство стволовых клеток млекопитающих. Это свойство открывает перспективы их практического применения в онкологии для адресной транспортировки лекарственных молекул. Доказана возможность целенаправленной миграции в очаг глиомы эмбриональных и взрослых нейральных стволовых клеток, но их применение ограничено. С практических позиций целесообразно использование гемопоэтических стволовых клеток. Целью работы стало изучение целенаправленной миграции гемопоэтических стволовых клеток к очагу экспериментальной глиомы С6. Работа выполнена на крысах линии Вистар с использованием нейровизуализационного, общеморфологического, иммуногистохимического и иммунофлуоресцентного методов. Полученные данные подтверждают возможность целенаправленной миграции гемопоэтических стволовых клеток к очагу глиальной опухоли в головном мозге у экспериментальных животных.

Одной из основных функций стволовых клеток (СК) взрослых млекопитающих является целенаправленная миграция к патологическому очагу для реализации генетически детерминированных программ репарации и саногенеза [1]. Этот феномен для эмбриональных нейральных СК показан в ряде экспериментальных нейробиологических работ [2, 7, 11]. В патологической зоне мозга нейральные СК либо замещают клеточный дефект, либо модулируют компенсаторно-восстановительные процессы. Возможность целенаправленной миграции СК открывает широкие перспективы для их применения в онкологической практике.

Лечение опухолей мозга, в частности злокачественных глиом, представляет собой чрезвычайно сложную задачу из-за большой инвазивности этих новообразований и необходимости преодоления противоопухолевыми лекарственными молекулами гематоэнцефалического барьера. В литературе описан высокий потенциал направленной миграции эмбриональных нейральных СК в головной мозг к очагу метастазов меланомы, мышинной аденокарциномы легкого, а также человеческой глиобластомы [3, 4]. Вместе с тем миграция также является одним из фундаментальных свойств нейральных

СК взрослых млекопитающих [1, 7]. В зрелом мозге они постоянно мигрируют из субвентрикулярной зоны в обонятельную луковицу, где трансформируются в интернейроны [5]. Взрослые нейральные СК также способны накапливаться в опухолевом очаге [6]. Более того, при совместном культивировании их с клетками различных линий глиобластомы они подавляют рост опухолевых клеток и вызывают их гибель. С учетом высокого тропизма нейральных СК к нейроэпителиальным опухолям их неоднократно предлагалось использовать в качестве переносчиков противоопухолевых препаратов и для эффективного преодоления гематоэнцефалического барьера с целью доставки лекарственного вещества к месту действия [3]. Более того, обсуждается также вопрос о возможности использования эндогенных клеток-предшественников не только в качестве транспортной системы, но и как источник восстановления поврежденных тканей центральной нервной системы [7, 13]. Однако существуют экспериментальные данные о возможном происхождении глиальных опухолей из нейральных СК и клеток-предшественников, что подтверждается общностью выявляемых генетических нарушений [6, 8]. С этих позиций представляется целесообразным использовать с терапевтической целью СК, непосредственно не вовлеченные в онкологический процесс. С практической точки зрения наиболее оправданным представляется использование гемопоэтических СК, мобилизованных из кровяного русла. Существуют разноречивые данные о тропности этих клеток к очагам глиальных опухолей, однако известно, что они довольно инертны по отношению к нормальной нервной ткани [9]. Цель настоящей работы состояла в изучении возможности целенаправленной миграции гемопоэтических СК к очагу экспериментальной глиомы в головном мозге крыс.

Материал и методы. Клеточная культура крысиной глиомы линии С6 была получена из ФГБУ «Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского» Минздрава России. Замороженную в жидком азоте аликвоту клеток глиомы С6 в количестве 1×10^6 быстро размораживали, отмывали

центрифугированием от диметилсульфоксида, ресуспендировали в 12 мл полной среды (DMEM, 20% FBS, 2 mM L-глутамин, 25 mM HEPES, антибиотик-антимикотик 10000 ед./мл) и высаживали в 15-сантиметровые культуральные матрасы (Costar). Культивирование глиомы продолжали до образования монослоя. Далее клетки глиомы суспендировали с помощью ферментативной диссоциации (Try PLE Express, Invitrogen), в течение 10 мин при температуре 37 °С, отмывали от фетальной сыворотки раствором Хэнкса и ресуспендировали в диссоциирующем буфере (Invitrogen). Подсчет клеток производили в камере Горяева, проверяли их жизнеспособность окрашиванием трипановым синим и готовили аликвоты по $0,5 \times 10^6$ клеток, которые хранили в 1 мл среды.

Моделирование глиобластомы *in vivo* выполняли с помощью внутримозговой стереотаксической имплантации клеток С6. Работу проводили на 30 половозрелых самках крыс линии Вистар массой 200–220 г в начале эксперимента. Клетки глиомы (5×10^5 клеток на животное) под кетаминным наркозом имплантировали в область каудопутамена с помощью стереотаксического аппарата Narishige (Japan) по координатам атласа мозга крысы Swanson: Ap-1; L 3,0; V 4,5, TBS-2,4 мм [10]. Клетки вводили с помощью гамльтоновского микрошприца, соединенного с инфузоматом, со скоростью 3 мкл/мин в объеме 10–15 мкл.

Гистологическое исследование проводили через 2 часа и через 3, 8, 15, 21 сутки после имплантации. Животных выводили из эксперимента посредством глубокого наркотизирования, перфузировали трансортально 4% параформальдегидом и серийные срезы толщиной 40 мкм приготавливали на замораживающем микротоме (Reichert). Окрашивание препаратов проводили несколькими способами: для общего морфологического анализа срезы окрашивали по Нисслю (0,1% крезилвиолет на 0,1 М ацетатном буфере, pH 3,3) и 0,1% толуидиновым синим на том же буфере. Для визуализации очагов некроза в опухоли выполняли комбинированное окрашивание толуидиновым синим и 0,1% ванадиевокислым фуксином (VAF) по методу И.В. Викторова [12].

Магнитно-резонансную томографию (МРТ-диагностику) головного мозга экспериментальным животным проводили на МР-томографе Biospec (Bruker) с применением специальной магнитной катушки для мелких лабораторных животных с напряженностью магнитного поля 15 Тл. Животных наркотизировали кетаминном и выполняли венесекцию бедренной вены, в которую вводили пластиковую бранюлю (G27), соединенную с длинным проводником, заполненным физраствором. После этого крыс помещали в магнитную катушку и получали стандартные T1- и T2-взвешенные изображения головного мозга во фронтальной и аксиальной проекциях. Затем в канюлированную бедренную вену вводили МРТ-контраст («Магневист») и, не меняя геометрии, повторяли T1-режим. Полученные

T1-взвешенные изображения с контрастированием сравнивали с аналогичными изображениями до введения контраста. МРТ выполняли 10 крысам на 8-е и 18-е сутки после имплантации клеток глиомы С6. Для определения объема опухоли на сканах МРТ измеряли площадь глиомы (в автоматическом режиме), которую затем умножали на толщину скана. Суммарный объем глиомы определяли как сумму объемов опухоли на каждом скане. После МРТ крыс выводили из эксперимента, готовили гистологические срезы мозга и сравнивали их с МРТ-изображениями.

Использованные в эксперименте гемопоэтические CD34⁺-клетки (h_CD34⁺-клетки) были предоставлены ЗАО «Клиника восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита» (г. Москва). Для выделения популяции CD34⁺-клеток человека использовали метод иммуномагнитной сорбции (технология EasySep – Stemcell Tech Inc). Декстрановые иммуномагнитные микрочастицы, конъюгированные с антителами к антигену CD34, инкубировали с препаратом мононуклеарных клеток, полученных путем обогащающего центрифугирования из периферической крови человека после мобилизации клеток красного костного мозга колониестимулирующими факторами. После 15 мин инкубации пробирку с клетками помещали в магнитный штатив. CD34⁺-клетки, содержавшие на себе магнитные микрочастицы, иммобилизовали и от остальных клеток отмывали фосфатным буфером. Пробирку извлекали из магнитного штатива, оставшиеся клетки собирали и анализировали на проточном иммуноцитофлуориметре с применением антител к CD34⁺. Чистота популяции составила 95,7%.

Для введения h_CD34⁺-клеток в паренхиму головного мозга животных с глиомой С6 их метили CFDA и вводили в контралатеральное полушарие на 0-й (n = 5) и 15-й (n = 5) день после введения клеток С6-глиомы. Координаты введения: Ap-1; D 3,0; V 4,5, TBS-2,4 мм [10]. Крыс обеих групп выводили из эксперимента через 1 (по 1 животному), 7 (по 2 животных) и 14 (по 3 животных) суток. Мозг крыс перфузировали, фиксировали и готовили гистологические срезы толщиной 50 мкм. Распределение клеток визуализировали при помощи флуоресцентной микроскопии.

Для внутривенного введения h_CD34⁺-клеток крысам с глиомой С6 их метили иммунофлуоресцентным трейсером (Invitrogen) и вводили внутривенно через 15 дней после установления модели (n = 15 и 5 – без метки) в количестве 2,5·Е6 на крысу. Через 3 (n = 5/2) и 5 (n = 5/3) дней крыс выводили из эксперимента. За 15 мин до этого внутривенно вводили лектин, меченный родамином для флуоресцентной визуализации сосудов. Приготовленные гистологические срезы толщиной 50 мкм анализировали на флуоресцентном микроскопе.

Экспериментальная часть работы была одобрена этическим комитетом Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

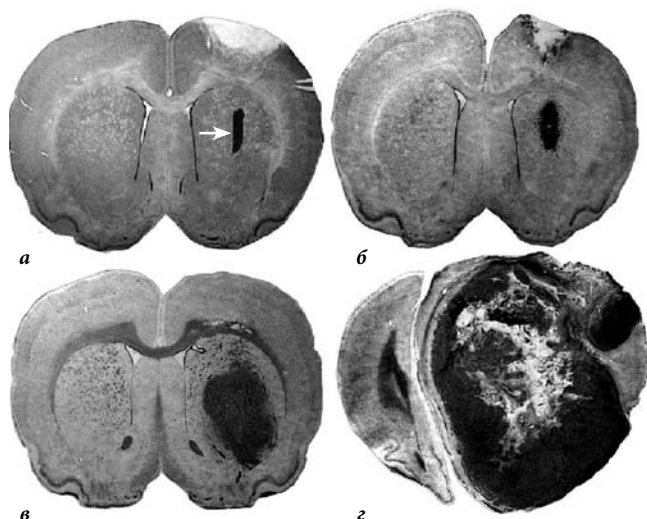


Рис. 1. Общий вид имплантированной глиомы С6:
 а – через 2 часа (стрелка – место имплантации), б – через 3 суток, в – через 15 суток, г – через 28 суток. Окр. толуидиновым синим с VAF, $\times 20$.

Результаты исследования. Гистологический анализ выявил наличие опухоли у всех животных. Новообразование увеличивалось в соответствии со сроком, прошедшим после введения (рис. 1). Спустя 2 часа размер очага глиомы вместе с треком составлял $1,9 \pm 0,2\%$ от общей площади срезов каудопутамена; к 21-м суткам происходило более чем тридцатикратное увеличение размеров опухоли ($61,8 \pm 9,8\%$ от общей площади срезов). У двух крыс, которых удалось наблюдать до 28 суток, глиома занимала $84,9 \pm 2,9\%$ площади срезов полушария, прорастала и разрушала базальные ядра, мозолистое тело и нижние слои коры мозга; наблюдалась выраженная внутричерепная дислокация и компенсаторное уменьшение объема контрлатерального полушария (рис. 1, г). Клетки глиомы характеризовались различной формой, размером, а также выраженным полиморфизмом ядер, что соответствовало гистологической картине мультиформной глиобластомы человека (рис. 2, а, б). Вследствие повышенного содержания рибонуклеопротеидов глиомные клетки окрашивались крезилвиолетом и толуидином более интенсивно, чем нормальная нервная ткань. Это позволило хорошо дифференцировать основной очаг опухоли и крупные очаги инвазии при световой микроскопии (рис. 2, в). Распространение опухоли происходило по перивазальным и периневральным пространствам (рис. 2, а, г). Окрашивание ванадиево-кислым фуксином позволило визуализировать погибшие ацидофильные клетки, которые избирательно окрашивались в гранатовый цвет. С помощью VAF и толуидина в опухолевой ткани были обнаружены зоны центрального некроза, местами трансформирующиеся в кисты (рис. 1, г и 3, а), а также многочисленные мелкие очаги, содержащие дегенерирующие опухолевые клетки (рис. 3, б).

МРТ также выявила наличие опухоли в стриатуме у всех исследованных крыс. При этом в T2-взвешенном

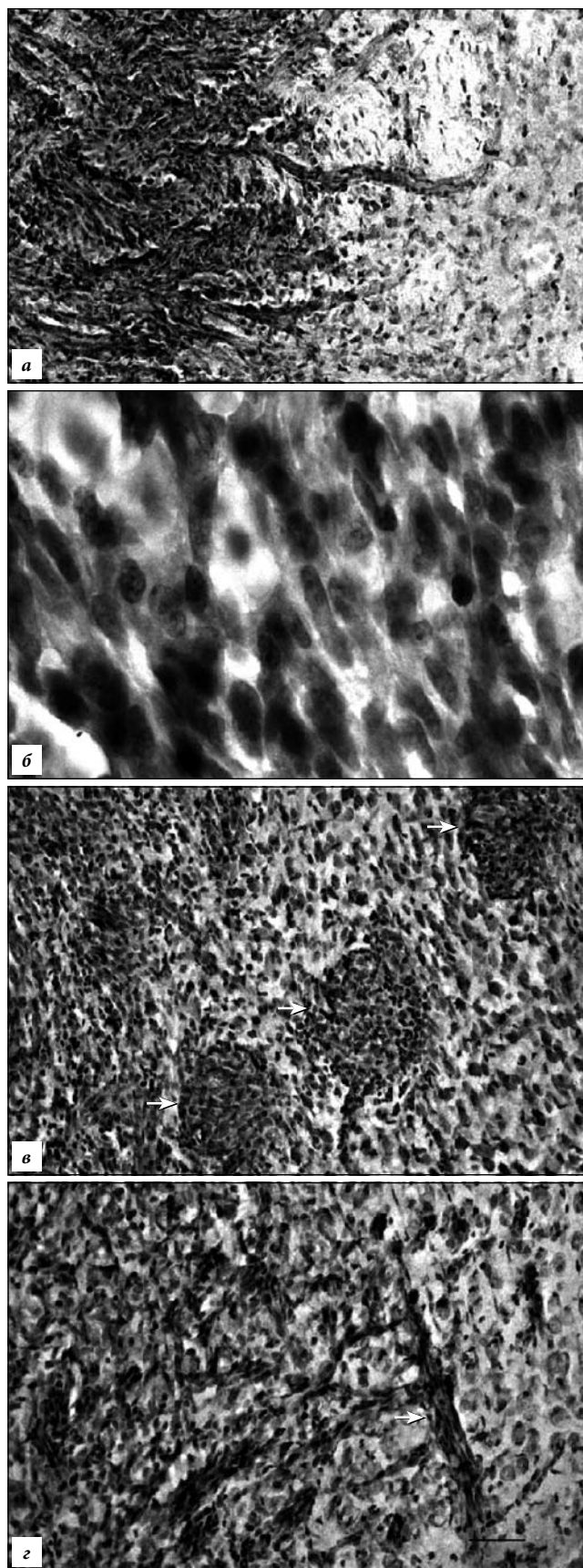


Рис. 2. Гистологическая характеристика глиомы С6:
 а – общий вид опухоли, б – ядерный полиморфизм, в – перивазальная инвазия (стрелки), г – периневральная инвазия (стрелка). Окр. крезил-виолетовым и толуидиновым синим; а – $\times 100$, б – $\times 1000$, в, г – $\times 200$.

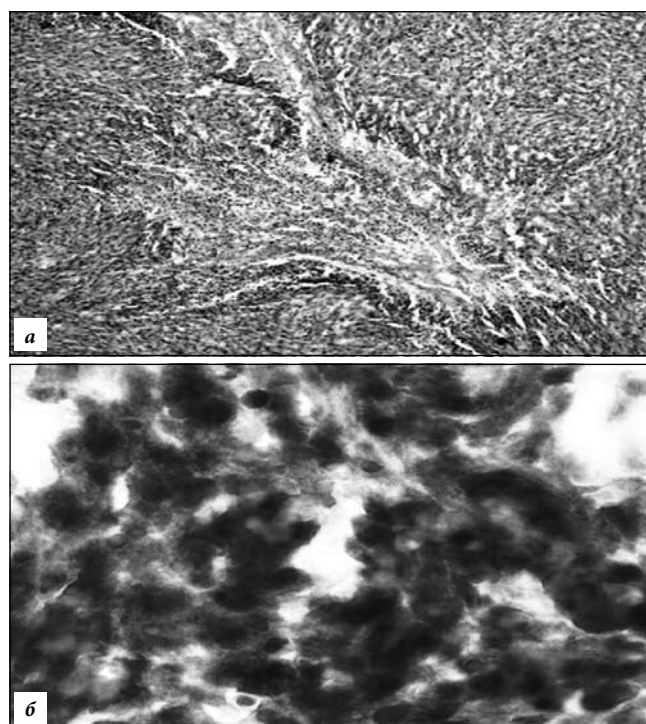


Рис. 3. Некроз клеток опухоли на 21-е сутки после имплантации:

а – зона центрального некроза, *б* – мелкие очаги некроза опухолевых клеток. Окр. толуидиновым синим с VAF; *а* – $\times 100$, *б* – $\times 1000$.

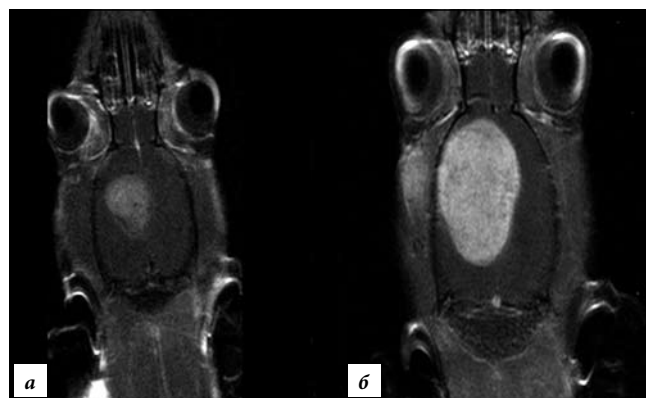


Рис. 4. МРТ головного мозга крысы с глиомой С6:

а – 8-е сутки после имплантации, *б* – 18-е сутки после имплантации; T1-взвешанное изображение, контрастированное «Магневистом».

изображении наблюдали не только очаг опухоли, но и выраженный перифокальный отек, превышающий по объему размер самой глиомы. Проведение МРТ головного мозга в динамике позволило охарактеризовать интенсивность роста глиомы в выбранных условиях. Спустя 8 суток после имплантации средний объем опухоли составлял $121 \pm 18 \text{ мм}^3$, и, таким образом, опухоль увеличивалась в объеме более чем в 10 раз за неделю (рис. 4, а). Спустя 18 суток после имплантации средний объем глиомы, по данным МРТ, составил $368,2 \pm 54,0 \text{ мм}^3$, что более чем в 30 раз превышало введенный объем опухолевых клеток (рис. 4, б). Эти данные соответствовали динамике роста глиомы, определенной с помощью морфологических методов.

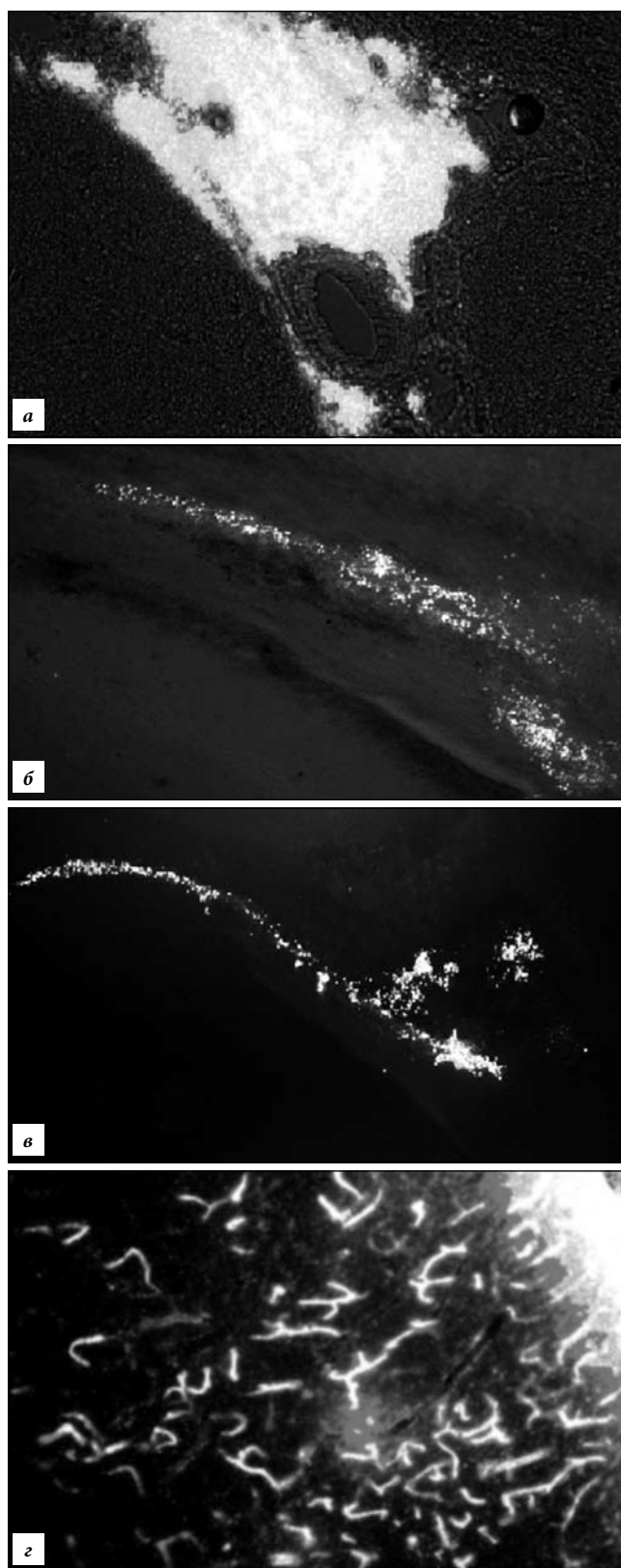


Рис. 5. Флуоресценция гемопоэтических СК в мозге крысы с глиомой С6:

а – клеточный препарат, введенный в контрлатеральное полушарие на 1-й день после трансплантации опухоли, *б* – миграция СК в сторону полушария с опухолью на 7-й день после трансплантации, *в* – миграция СК в сторону полушария с опухолью на 14-й день после трансплантации, *г* – локализация СК и микрососудов в зоне опухолевого роста; *а* – $\times 600$, *б-г* – $\times 1000$.

На рис. 5 представлена направленная миграция гемопоэтических СК, введенных в контрлатеральное полушарие на сторону очага экспериментальной глиомы. Этот процесс был достаточно демонстративен на 7-е и 14-е сутки. Непосредственно в очаге патологии клеток обнаружено не было. Мы объясняем это тем, что глиома С6 является очень агрессивной опухолью; только двум животным удалось прожить больше трех недель после имплантации, поэтому клетки, меченные флуоресцентным трейсером, скорее всего, не успевали достичь неопластического очага. Однако вопрос поступления СК в зону опухоли, связанный с созданием определенных условий хоуминга, требует дополнительных исследований. Вместе с тем ясно, что гемопоэтические СК, введенные в кровеносное русло, успешно достигали очага глиомы, где они обнаруживались в микрососудах в зоне опухоли (рис. 5, г). За пределами патологического очага гемопоэтические СК отсутствовали.

Обсуждение полученных данных. Имплантация крысам клеток глиомы линии С6 позволяет получить стандартную и воспроизводимую модель глиобластомы человека. Экспериментальная опухоль характеризуется быстрым инфильтративным ростом, выраженным отеком вещества мозга с его деструкцией и участками геморрагий, что сопровождается картиной клинических симптомов. МРТ позволяет визуализировать первичный очаг опухоли и область перифокального отека. Глиома С6 крыс, как и мультиформная глиобластома человека, накапливает гадолиний, содержащий контраст «Магневист», что позволяет детально визуализировать ее объемы в Т1 взвешенном режиме. Динамический анализ МРТ в различных режимах позволяет отслеживать скорость роста опухоли, динамику перифокального отека и внутричерепной дислокации. Гемопоэтические стволовые клетки, имплантированные в полушарие, противоположное опухолевому очагу, так же как и введенные внутривенно, демонстрируют общее свойство стволовых клеток – целенаправленно мигрировать к очагу патологии. Данное свойство может быть использовано для суперселективной доставки иммунолипосомальных конструкций, содержащих противоопухолевые химиопрепараты или другие молекулы цитотоксического или цитостатического действия. Кроме того, возможна суперселективная доставка рентгеноконтрастных веществ, радиоизотопных препаратов, сигнальных белков и наноконструкций, повышающих чувствительность опухолевых клеток к традиционным способам терапии. Перспективной представляется стратегия использования гемопоэтических СК как транспортной системы адресной доставки биологической информации для локальной модуляции процессов апоптоза, что требует продолжения исследований в данном направлении.

Литература

1. Викторов И.В. Стволовые клетки мозга млекопитающих: биология стволовых клеток *in vivo* и *in vitro* // Известия РАН. Серия биологическая. 2001. № 6. С. 646–655.
2. Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточное взаимодействие. М.: Медицина, 2003. 288 с.

3. Aboody K.S., Najbauer J., Schmidt N.O. et al. Targeting of melanoma brain metastases using engineered neural stem/progenitor cells // *Neuro Oncol.* 2006. Vol. 8. P. 119–126.
4. Ahmed A.U., Thaci B., Alexiades N.G. Neural stem cell-based cell carriers enhance therapeutic efficacy of an oncolytic adenovirus in an orthotopic mouse model of human glioblastoma // *Mol. Ther.* 2011. Vol. 19. P. 1714–1726.
5. Doetsch F., Caillé I., Lim D.A. et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain // *Cell.* 1999. Vol. 97. P. 703–716.
6. Holland E.C., Celestino J., Dai C. et al. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice // *Nat. Genet.* 2000. Vol. 25. P. 55–57.
7. Noble M. Can neural stem cells be used to track down and destroy migratory brain tumor cells while also providing a means of repairing tumor-associated damage? // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. P. 12393–12395.
8. Nonaka D., Laser J., Tucker R., Melamed J. Immunohistochemical evaluation of necrotic malignant melanomas // *Am. J. Clin. Pathol.* 2007. Vol. 127. P.787–791.
9. Omari K.M., Dorovini-Zis K. CD40 expressed by human brain endothelial cells regulates CD4⁺ T cell adhesion to endothelium // *J. Neuroimmunol.* 2003. Vol. 134. P. 166–178.
10. Swanson L.W. *Brain Maps: Structure of the Rat Brain.* 2nd Edition. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V. 1998.
11. Tabatabai G., Bähr O., Möhle R. et al. Lessons from the bone marrow: how malignant glioma cells attract adult haematopoietic progenitor cells // *Brain.* 2005. Vol. 128. P. 2200–2211.
12. Victorov I.V., Prass K., Dirnagl U. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin // *Brain Res. Protoc.* 2000. Vol. 5. P. 135–139.
13. Walzlein J.H., Synowitz M., Engels B. et al. The antitumorigenic response of neural precursors depends on subventricular proliferation and age // *Stem Cells.* 2008. Vol. 26. P. 2945–2954.

Поступила в редакцию 24.01.2013.

THE PHENOMENON OF DIRECTED MAMMALIAN STEM CELL MIGRATION TOWARD AN EXPERIMENTAL GLIOBLASTOMA SITE AS A BASIS OF INNOVATIVE ANTITUMOR TECHNOLOGY AND TARGETED DRUG DELIVERY

I.S. Bryukhovetskiy¹, A.S. Bryukhovetskiy^{2,3}, V.P. Chekhonin⁴, V.P. Baklaushchev⁴, Yu.S. Khotimchenko⁵

¹A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690059 Russian Federation), ²Clinics of interventional and restorative neurology and therapy "Neurovita" (23, Bild. A Kashirskoe Av. Moscow 115478 Russian Federation), ³Federal Research Centre of specialized types of medical care and technologies of the Federal Medical-Biological Agency of Russia (28 Orekhoviy Boulevard, Moscow 115682 Russian Federation), ⁴V.P. Serbskii State Research Center for Social and Forensic Psychiatry of Ministry of Health of The Russian Federation (23 Kropotkinskiy Per. Moscow 119991 Russian Federation), ⁵School of Biomedicine, Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690091 Russian Federation)

Summary – Migration to the lesion is a fundamental property of stem cells of mammals. This property offers good prospects for their practical applications in oncology for targeted transport of drugs. The opportunity of purposeful migration into the area of glioma embryonic and adult neural stem cells, but their use is limited. With the practices of appropriate use hematopoietic stem cells. The aim of the work was to study the ability of the targeted migration to the site of an experimental glioma C6 line. Work carried out on Wistar rats, used neuroimaging, histological, immunohistochemical and immunofluorescence techniques. The results confirm the possibility of purposeful migration of hematopoietic stem cells to the site of glial brain tumors in experimental animals.

Key words: neural stem cells, hematopoietic stem cells, glioblastoma.