

56. Krogh A. The number and distribution of capillaries in muscles the calculations of the oxygens pressure head necessary for supplying the tissue // *J. Physiol.* 1919. Vol. 52. P. 409.
57. Kroll S., El-Gindi J., Thanabalasundaram G. [et al.]. Control of the blood-brain barrier by glucocorticoids and the cells of the neurovascular unit // *Ann. NY Acad. Sci.* 2009. No. 1165. P. 228–239.
58. McCaffrey G., Staatz W.D., Quigley C.A. [et al.]. Tight junctions contain oligomeric protein assembly critical for maintaining blood-brain barrier integrity in vivo // *J. Neurochem.* 2007. Vol. 103, No. 6. P. 2540–2555.
59. Mehta D., Malik A.B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability // *Physiol. Rev.* 2006. Vol. 86, No. 1 P. 279–367.
60. Nitta T., Hata M., Gotoh S. [et al.]. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice // *J. Cell. Biol.* 2003. No. 161. P. 653–660.
61. Pries A.R., Kuebler W.M. Normal endothelium // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2006. Vol. 176, No. 1. P. 1–40.
62. Reitsma S., Slaaf D.W., Vink H. [et al.]. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization // *Pflugers. Arch.* 2007. Vol. 454, No. 3. P. 345–359.
63. Sajja R.K., Prasad S., Cucullo L. Impact of altered glycaemia on blood-brain barrier endothelium: an in vitro study using the hC-MEC/D3 cell line // *Fluids Barriers CNS.* 2014. Vol. 11, No. 1. P. 8.
64. Siddiqui M.R., Komarova Y.A., Vogel S.M. [et al.]. Caveolin-1-eNOS signaling promotes p190RhoGAP-A nitration and endothelial permeability // *J. Cell. Biol.* 2011. Vol. 193, No. 5. P. 841–850.
65. Speziale S., Sivaloganathan S. Poroelastic theory of transcapillary flow: effects of endothelial glycocalyx deterioration // *Microvasc. Res.* 2009. Vol. 78, No. 3. P. 432–441.
66. Samorajski T., Mc Cloud J. Alkaline phosphomonoesterase and blood-brain permeability // *Lab. Invest.* 1961. No. 10. P. 492–501.
67. Song Y., Fukuda N., Bai C. [et al.]. Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice // *J. Physiol.* 2000. Vol. 525, Pt 3. P. 771–779.
68. Stamatovic S.M., Keep R.F., Wang M.M. [et al.]. Caveolae-mediated internalization of occludin and claudin-5 during CCL2-induced tight junction remodeling in brain endothelial cells // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284. No. 28. P. 19053–19066.
69. Stensaas L.J. Pericytes and perivascular microglial cells in the basal forebrain of neonatal rabbit // *Cell a. Tissue Res.* 1975. Vol. 158, No. 4. P. 517–541.
70. Wang H., Wang A.X., Aylor K. [et al.]. Nitric oxide directly promotes vascular endothelial insulin transport // *Diabetes.* 2013. Vol. 62, No. 12. P. 4030–4042.

Поступила в редакцию 03.12.2015.

#### Регуляторный потенциал капилляров мозга

В.М. Черток, А.Г. Черток

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690650, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

**Резюме.** В обзоре представлены материалы, свидетельствующие об активной роли капилляров в регуляции кровообращения. Эндотелий играет важную роль в проницаемости гематоэнцефалического барьера, прежде всего, через освобождение химических посредников, которые оказывают влияние, как на эндотелиальные клетки, перициты и астроглию, так и на не клеточные компоненты капилляров. Механизмы, регулирующие динамическое равновесие между этими компонентами многообразны, сложны и не до конца изучены, но уже сейчас очевидно, что все они обладают потенциальными возможностями для участия в управлении функциями капилляров.

**Ключевые слова:** микроциркуляция, нейроны, сосудистый эндотелий, газотрансммиттеры.

УДК 616.831-006.6-092.81. DOI 10.17238/1609-1175.2016.2.81

Светлой памяти учителя –  
профессора Павла Александровича Мотавкина – посвящается.

## СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ИНДУЦИРУЮТ МИГРАЦИЮ НОРМАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК

И.С. Брюховецкий<sup>1,2</sup>, И.В. Дюйзен<sup>1,2,4</sup>, В.Е. Шевченко<sup>1,3</sup>, Ю.С. Хотимченко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Дальневосточный федеральный университет (690091, Владивосток, ул. Суханова, 8), <sup>2</sup> Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690059, Владивосток, ул. Пальчевского 17), <sup>3</sup> Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (115478, Москва, Каширское шоссе, 23), <sup>4</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

**Ключевые слова:** мультиформная глиобластома, нейральные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, опухольевые стволовые клетки.

### CANCER STEM CELLS OF GLIOBLASTOMA INDUCE THE MIGRATION OF NORMAL STEM CELLS

I.S. Bryukhovetskiy<sup>1,2</sup>, I.V. Duyizen<sup>1,2,4</sup>, V.E. Shevchenko<sup>1,3</sup>, Yu.S. Khotimchenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Far Eastern Federal University, School of Biomedicine (8 Sukhanova St. Vladivostok 690091 Russian Federation), <sup>2</sup> A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690059 Russian Federation), <sup>3</sup> N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (23 Kashirskoe HW Moscow 115478 Russian Federation), <sup>4</sup> Pacific States Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation)

**Background.** The research objective is a comparative evaluation of abilities glioblastoma cells to attract various types of tissue-specific

stem cells (SC), as well as identifying the principal similarities and differences between normal and tumor SC.

**Methods.** The study had 3 stages: 1) the study of human SC migration processes to cells of malignant tumors in vitro; 2) comparison of cellular proteomes of some SC including tumor SC; 3) study of SC migration in vivo. It was used modern cellular and post-genomic technologies.

**Results.** Neural SC had a higher mobility as compared to the multipotent mesenchymal SC and fibroblasts. We received the data on a sufficiently high affinity tumor glioblastoma SC and normal SC. Administration of mesenchymal SC labeled with fluorochrome to animals with glioma showed that the maximum number of these cells (57,6±8,9%) was recorded in the brain.

**Conclusions.** The transplantation of SC is the one of the main directions in the treatment of cancer due to high capacity of a cell transplant to find the damage zone. Among all the cells of glioblastoma, tumor SC have the best ability to attract normal SC.

Брюховецкий Игорь Степанович – канд. мед. наук, заведующий лабораторией молекулярной и клеточной нейробиологии Школы биомедицины ДВФУ; e-mail: briukhovetski.iis@dvfu.ru

Critical differences of cellular proteomes allows considering the mesenchymal SC as the best tool for influencing tumor glioblastoma SC.

**Keywords:** glioblastoma multiforme, neural stem cells, mesenchymal stem cells, tumor stem cells.

Pacific Medical Journal, 2016, No. 2, p. 81–89.

Мультиформная глиобластома – агрессивная злокачественная опухоль головного мозга человека. Прогноз ее неблагоприятен, стандартное лечение неэффективно, медиана выживаемости больных – 6–12 месяцев. Одну из ведущих причин резистентности этой опухоли к лечению связывают с наличием в ее клеточной популяции стволовых элементов, обладающих уникальными сигнальными и морфогенными свойствами [11].

Опухолевые стволовые клетки (СК) – это особая группа клеток, обладающих максимальной независимостью от внешних сигналов. Сравнительно небольшого количества их достаточно для быстрого запуска процессов инвазивного роста и метастазирования. Клетки этого типа мультипотентны, способны к бесконечному самообновлению и обладают самой высокой пролиферативной активностью среди всех клеток глиобластомы. К особенностям опухолевых СК относятся гипоксический тип метаболизма и способность восстанавливать поврежденную ДНК [9,15].

Длительное время считалось, что появление опухолевых СК вызвано системными нарушениями контроля за пролиферацией дифференцированных клеток. Но в последние годы в качестве основного источника их происхождения рассматриваются нормальные СК. Современная концепция канцерогенеза расценивает злокачественные опухоли как генетическое заболевание ядра нормальной СК, вследствие чего ее потомки – опухолевые СК – не распознаются и не уничтожаются иммунной системой [1]. Эффективных способов уничтожить опухолевые СК в организме больного в настоящее время практически не существует, что позволяет отнести поиск решения этой проблемы к числу приоритетных направлений науки.

Одним из подходов к ее решению можно назвать создание таргетных химиопрепаратов, способных поражать отдельные мишени, свойственные данному типу клеток. Однако опухолевые СК – это исключительно гетерогенная популяция с широким спектром адаптационных возможностей, которая в ответ на любое сублетальное воздействие реагирует появлением новых, более устойчивых клонов. В работах ряда известных биологов звучит мысль, что опухолевые СК – особая форма выживания эукариотических клеток, продукт непрерывной борьбы за существование [4]. Уничтожение такой цели требует высокоточного и сверхсильного воздействия, превосходящего адаптационные возможности объекта, что возможно при появлении принципиально нового инструмента, адекватного степени сложности этих клеток.

Действенным инструментом в данной области могут стать собственные СК больного. Уже доказана их способность мигрировать в опухолевый очаг и активно взаимодействовать с клетками новообразования

[2, 3]. Предложены технологии адресной доставки лекарственных веществ, наночастиц металлов и других противоопухолевых средств с использованием миграционного потенциала СК. Разработаны методы продукции СК-специфических антител непосредственно в зоне неоплазии [7, 13]. Однако такая терапия все еще носит симптоматический характер и не нацелена на опухолевые СК. Причина создавшейся ситуации заключается в отсутствии ясного ответа на вопросы: к каким именно клеткам опухоли мигрируют СК, какова роль этого феномена в канцерогенезе, и какие именно линии СК нужно использовать для разработки и создания противоопухолевых клеточных технологий? Ответы на эти вопросы и определяют основной вектор прикладных и фундаментальных исследований в этой области.

Цель настоящей работы – сравнительная оценка способностей клеток глиобластомы привлекать различные типы тканеспецифических СК, а также выявление принципиальных сходств и отличий между нормальными и опухолевыми СК.

**Материалы и методы.** Работа выполнялась в три этапа: 1) изучение процессов миграции СК человека к клеткам злокачественных опухолей *in vitro*; 2) сравнение клеточных протеомов некоторых СК, в том числе опухолевых СК; 3) изучение миграции СК *in vivo*.

На первом этапе использованы опухолевые СК (CD133<sup>+</sup>), сепарированные из глиобластомы человека линий U87 и U251, нативные клетки данных новообразований, а также клетки линии MCF7 рака молочной железы человека и клетки линии A549 рака легкого человека. Оценивали способность данных типов опухолевых элементов индуцировать миграционную активность нейрональных и мезенхимальных СК, а также фибробластов.

Опухолевые клетки в количестве  $5 \times 10^3$  вносили в культуральные вставки, закрепленные в лунках 12-луночного планшета (рис. 1). Пространство планшета заполняли нейральными, мезенхимальными СК и фибробластами в количестве  $5 \times 10^3$ . Предварительно клетки были окрашены флуоресцентным маркером CellTracker Red CMTPX Dye (Molecular Probes, США). Культивирование проводили в автоматическом режиме

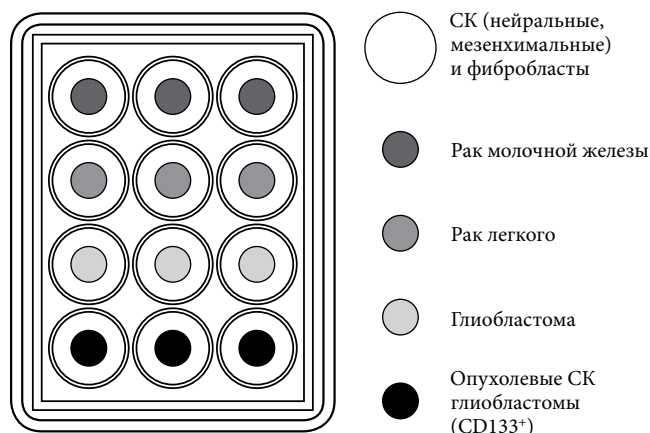


Рис. 1. Общая схема эксперимента по изучению процессов направленной миграции тканеспецифических СК.

при стандартных условиях. Подсчет числа клеток, переместившихся к стенкам культуральных вставок, выполняли с использованием системы интеллектуального мониторинга Cell IQ (CM Technologies, США) через 120 часов совместного культивирования.

В работе применялись клетки линий U87 (ATCC HTB-14) и U251 (ATCC, Manassas) глиобластомы человека, линии MCF7 (ATCC, HTB-22) аденокарциномы молочной железы человека и линии A549 (ATCC, CCL-185) рака легких человека.

Все клеточные линии культивировали при 37 °С, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>, в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотик-антимиотик «100X» (Gibco, США). Культуральную среду обновляли каждые 72 часа. Для проведения эксперимента клетки снимали при помощи TrypLE 7 мин при 37 °С, центрифугировали при 120g 3 мин, сливали супернатант, добавляли свежей среды DMEM. Подсчет проводился в камере Горяева, жизнеспособность клеток определяли путем окрашивания 0,4 % трипановым синим.

Для выделения из линий U87 и U251 пула опухолевых СК клетки глиобластомы суспензировали в растворе диспазы/колагеназы (Roche: Dispase – 0,8 Ед./мл PBS; Collagenase – 0,1 Ед./мл PBS; инкубация 1 час при 37 °С). Инактивировали энзиматическую реакцию EDTA, центрифугировали 5 мин, при 800g. Ресуспензировали клетки в среде DMEM/F12. Культивирование осуществляли во флаконах T75 при 37 °С в 5 % CO<sub>2</sub>. Добавление свежих ростовых факторов проводили каждые 72 часа. Прикрепившиеся клетки культивировали до достижения 80 % конfluence, пассировали из расчета 1:3. При достижении достаточного количества клеток проводили селекцию элементов иммунофенотипа CD133<sup>+</sup> методом иммуносортинга (autoMACS Pro) с использованием магнитных шариков с иммобилизованными на них антителами к CD133 (Miltenyi Biotec, США). Клетки CD133<sup>+</sup> культивировали в упомянутой выше среде, их чистоту проверяли проточной цитометрией с антителами к CD133 (BD Accuri C6).

Культура нейральных СК человека из обонятельного эпителия верхней носовой раковины предоставлена клиникой восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита». После выделения и обработки раствором диспазы/колагеназы (Roche, инкубация 1 час при 37 °С), клетки ресуспензировали в среде DMEM/F12 и культивировали до образования цитосфер, которые характеризовали по экспрессии нестина, тимоцитарного антигена-1, белка нейрофиламентов (NF200) и глиального фибриллярного кислого протеина. Методом иммуносепарации на магнитных шариках нейральные СК выделяли по маркеру клеточной поверхности CD133.

Культура мультипотентных мезенхимальных СК предоставлена клиникой восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита». Клетки получали из костного мозга по методу M.F. Pittenger [12]. Культуру характеризовали методом проточной

цитометрии по экспрессии основных поверхностных антигенов: CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>.

Фибробласты (ATCC PCS-420-013) культивировали в среде DMEM плюс 10 % FBS, 10 нг/мл EGF (Gibco; PHG0311), 10 нг/мл FGF-β (Gibco; PHG0023), антибиотик-антимикотик «100X». Культуральную среду заменяли на новую каждые 4 дня. Культивирование продолжали до достижения 70 % слоя конfluence. Клетки снимали при помощи ферментативной диссоциации 0,25 % раствором трипсина в течение 5 мин при 37 °С. Центрифугировали при 120g 3 мин. Оценивали жизнеспособность окрашиванием 0,4 % трипановым синим и проводили подсчет в камере Горяева (перед использованием в эксперименте обрабатывали флуоресцентным красителем).

На втором этапе для сравнительного картирования клеточных протеомов нейральных, мезенхимальных и опухолевых СК глиобластомы готовили лизаты клеточных культур. В работе использована комбинация высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Для достижения целей эксперимента воспользовались методологией двумерного разделения триптических пептидов на катионообменной, а затем – обращено-фазовой колонке. Для оценки изменения экспрессии белков применяли метод label-free, так как он дает корректные количественные результаты для СК.

Клетки лизировали в Mammalian Cell Lysis Kit (Sigma, США). Образцы очищали от низкомолекулярных соединений, рассчитывали количество лизата, в котором содержалось 300 мкг белка, и упаривали досуха при 60 °С в вакуумном испарителе CentriVar. Проводили энзиматический гидролиз образцов и по 3 мкл растворов анализировали масс-спектрометрически для контроля трипсинолиза. По окончании реакции содержимое упаривали досуха при 60 °С, проводили разделение триптических пептидов, и полученные фракции повторно упаривали до 100 мкл при 60 °С на центрифужном испарителе Eppendorf Concentrator 5301 (Германия). Анализ триптических пептидов проводили на нанопроточном хроматографе Dionex Ultimate 3000 в сочетании с масс-спектрометром LTQ Orbitrap XL с источником ионизации. Разделение пептидов осуществляли на колонке Acclaim C18 PepMap100, снабженной предколонкой.

Для идентификации белков масс-спектры конвертировали программой Proteome Discoverer 1.0 (Thermo). Поиск белков осуществляли на локальном сервере с помощью программы Mascot Server 2.3.02 (Matrix Science, Великобритания). Идентифицированные белки сортировали по шкале MudPIT, отображая их на уровне значимости  $p < 0,05$ . Полученные списки идентифицированных белков вместе с хромато-масс-спектрами загружали в программу Skyline 1.2.0.3303 и получали площади пиков пептидов в каждой пробе. Затем суммировали площади всех пиков каждого белка и нормализовывали относительно полной площади всех белков, идентифицированных в пробе.

На третьем этапе оценивали миграционную активность мезенхимальных СК в организме животных с привитой глиобластомой. Эксперимент выполнен на 50 половозрелых крысах-самках породы Вистар, массой тела не более 220 г на момент начала исследования. Контрольную группу сформировали 25 животных. В основную группу вошли 25 крыс, которым в головной мозг стереотаксически имплантировали  $2 \times 10^5$  клеток глиобластомы линии С6. Развитие опухоли подтверждали с помощью высокоразрешающей компьютерной томографии с контрастированием. Характеризировали центральную хвостовую вену и всем животным вводили СК окрашенные флуоресцентными трейсерами CellTracker Red CMTPX Dye и Vybrant CFDA SE (Molecular Probes). Содержание и уход за крысами, а также выведение их из эксперимента осуществлялся в соответствии с требованиями стандартов GLP и Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Работа одобрена комиссией по биомедицинской этике Школы биомедицины ДВФУ (протокол № 1 от 15.02.2015 г.). Клетки глиобластомы культивировали согласно общепринятому протоколу, описанному выше. Перед внесением в культуру их обрабатывали флуоресцентным красителем.

Перед началом эксперимента проведено иммуноцитохимическое типирование состава опухоли. После фиксации в 4% параформальдегиде, промывки в растворе 0,1М PBS (pH 7,4), 0,2% tween 20, 0,2% triton-X100 и блокировки неспецифического связывания в 0,3% BSA клетки инкубировали в первичных антителах, специфичных к белку p53, нестину, глиальному фибриллярному кислом протеину, тубулину- $\beta$ III, белку S100 и рецептору хемокинов 4-го типа (CXCR4). После отмывки наносили видоспецифические вторичные антитела, конъюгированные с Alexa 488 и с Alexa 633, на 2 часа при 37°C. Ядра контрастировали DAPI (Molecular Probes; D1306) и после отмывки заключали в Mowiol (Sigma-Aldrich; 324590). Контрольные образцы окрашивали без использования первичных антител.

Моделирование глиобластомы *in vivo* осуществляли с помощью внутримозговой стереотаксической имплантации (Narishige, Japan). Животных наркотизировали путем внутривентрикулярного введения смеси, содержащей золетил-100 и рометар (1:4, из расчета 10 мг/кг массы тела). В стерильных условиях рассекали мягкие ткани, в соответствии с установленными координатами микродрелью накладывали трепанационное отверстие. Клетки опухоли вводили с помощью гамильтоновского шприца в область каудопутамена по координатам атласа мозга крысы (Paxinos, 2007): Ар – 1 мм; L – 3 мм, V – 4,5 мм, TBS – 2,4 мм, скорость – 3 мкл/мин.

В данном эксперименте оценивали миграционную активность мультипотентных мезенхимальных СК, полученных из костного мозга крыс. Клетки вымывали с помощью иглы и фосфатно-солевого буфера, два раза промывали средой DMEM и центрифугировали (800g, 10 мин). Суспензию фильтровали через нейлоновый

фильтр с диаметром пор 100 мкм. Перед введением животным клетки характеризовали методом проточной цитометрии, окрашивали флуоресцентными красителями – CFDA SE (экссизия 488 нм, эмиссия 492/517 нм) и CMTPX (экссизия 546 нм, эмиссия 577/602 нм).

Для гистологического исследования спустя 7 и 14 дней с момента введения трансплантата крыс глубоко наркотизировали и перфузировали трансаортально 4% забуференными параформальдегидом. Серийные срезы головного мозга толщиной 20 и 40 мкм готовили на криостатном микротоме или делали парафиновые срезы толщиной 7 мкм. Срезы окрашивали по стандартному протоколу гематоксилином и эозином и 0,1% толуидиновым синим на 0,1М ацетатном буфере (pH 3,5). Препараты анализировали на световом и конфокальном микроскопах.

Данные иммуноцитохимического и иммуногистохимического анализа подвергали статистической обработке, используя дисперсионный анализ ANOVA, сравнение разностей средних проводили по методу Тьюки. Результаты выражали в виде средних значений и стандартной ошибки. Все статистические тесты выполнены с использованием пакета Graph Pad Prism 4.00.

**Результаты исследования.** Миграция стволовых клеток *in vitro*. Нейральные СК обладали большей подвижностью в сравнении с мультипотентными мезенхимальными СК и фибробластами. Миграционная активность нейральных СК зависела от типа опухолевых клеток в совместной культуре. Нейральные СК наиболее активно мигрировали к опухолевым СК двух типов глиобластомы. При этом несепарированные клетки глиобластомы обладали несколько меньшей способностью индуцировать миграцию нейральных СК, однако опухолевые клетки ненейронального происхождения в значительно меньшей степени индуцировали процессы миграции нейральных СК (рис. 2).

Мультипотентные мезенхимальные СК, несколько уступая нейральным в способности мигрировать к клеткам глиобластомы, тем не менее, активнее двигались по направлению к опухолям из клеток эктодермального происхождения. В нашем эксперименте дифференцированные фибробласты также демонстрировали способность к миграции к опухолевым клеткам различных типов, однако в значительно меньшей степени, чем нейральные и мезенхимальные СК. В целом, из всех типов опухолевых клеток наибольшим аттрактивным потенциалом для подвижных элементов обладали сепарированные CD133<sup>+</sup>-клетки линий U87 и U251.

По современным представлениям, опухолевые СК определяют ключевые свойства глиобластомы – терапевтическую резистентность и инвазивный потенциал. Следует отметить, что состав использованных нами культур глиобластомы весьма различился по числу опухолевых СК. Популяция CD133<sup>+</sup>-клеток составляла  $1,3 \pm 2,8\%$  от общего числа элементов линии U87 и  $3,4 \pm 2,6\%$  от общей популяции клеток линии U251 глиобластомы человека. В этой связи прямая зависимость между числом опухолевых СК в сочетанной

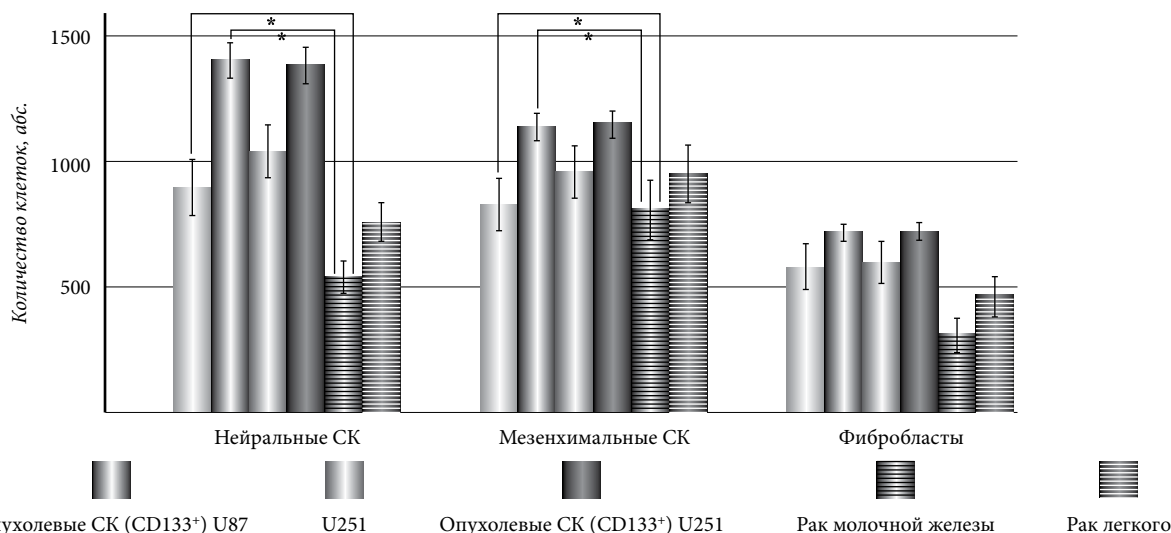


Рис. 2. Количество нейральных и мезенхимальных СК, а также дифференцированных клеток, мигрировавших через культуральную вставку в ходе 120-часового эксперимента (\*  $p < 0,05$ ).

культуре и способностью привлекать СК наводит на мысль о том, что запуск и поддержание миграционной активности к опухоли обеспечивается именно субпопуляцией СК, находящихся в ее составе.

Следует обратить внимание, что наблюдавшаяся в эксперименте относительно слабая способность культур клеток рака молочной железы и рака легкого привлекать СК не должна вводить в заблуждение. Рак молочной железы – гормонально зависимая злокачественная опухоль, которая по распространенности и масштабу летальности уступает только раку легких – заболеванию, лидирующему в статистике онкологической смертности среди лиц обоих полов. Не исключено, что способность привлекать СК определяется как молекулярным фенотипом опухоли, а также может быть связана с многочисленными пассажами данной линии *in vitro*, приводящими к потере ряда важных сигнальных механизмов.

Кроме того, обращал на себя внимание тот факт, что нейральные СК проявляли максимальную тропность в отношении опухолей нейроэпителиального происхождения и значительно уступали мезенхимальным СК в активности по отношению к опухолям иного тканевого происхождения. Можно предполагать, что вектор миграционной активности более выражен между клетками, имеющими единый гистогенетический источник и, соответственно, сходные транскриптомный и протеомный профили. В этой связи детальный анализ метаболических карт нормальных и опухолевых СК может пролить свет на вопрос об источниках онкогенетической трансформации и определить возможные мишени адресного воздействия на опухолевые СК и механизмы его реализации.

*Протеомные профили нейрональных, мезенхимальных и опухолевых СК.* После проведения лизиса клеток количество общего белка в лизатах составило: нейральные СК (образец 1) –  $2032 \pm 85$  мкг/мл, опухолевые СК линии U87 (образец 2) –  $2150 \pm 360$  мкг/мл, мультипотентные мезенхимальные СК (образец 3) –  $3198 \pm 281$  мкг/мл.

Обработка данных высокоэффективной жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии программой Mascot Server позволила идентифицировать 1664 белка во всех пробах. В результате обработки данных программой Skyline 3,1 были определены уровни: в образце 1 – 1447 белков по 11176 пептидам (диапазон молекулярных весов от 3,53 до 3908,10 кДа), в образце 2 – 1225 белков по 13674 пептидам (диапазон молекулярных весов от 4,60 до 3908,10 кДа), в образце 3 – 842 белков по 10932 пептидам (диапазон молекулярных весов от 5,02 до 1017,07 кДа). Динамический диапазон для идентифицированных белков составлял семь порядков, что позволило выявить низкокопийные протеины.

Далее из протеомных профилей сравниваемых групп были исключены белки, идентифицированные только в одном типе клеток. Из 1664 белков получили группу сравнения А – нейральные и опухолевые СК (1052 белка), и группу сравнения Б – мультипотентные мезенхимальные и опухолевые СК (607 белков). Результаты в группе сравнения А (63,2% идентичных белков) отражали близость морфофункциональных фенотипов нейральных и опухолевых СК глиобластомы человека, как особого типа клеток, имеющих специфическую дифференцировку и локализацию в центральной нервной системе. В группе сравнения Б выявлено только 607 (36,5%) идентичных белков в анализируемых протеомах.

Полученные данные позволяют сделать заключение о достаточно высоком родстве опухолевых СК глиобластомы и нормальных СК, что в значительной степени объясняет их лучшую подвижность, но не позволяет рассматривать в качестве потенциального средства терапии. При этом значительные различия протеомов опухолевых и мезенхимальных СК позволяют предположить, что эти клетки в значительно меньшей степени вовлечены в неопластический процесс в головном мозге, следовательно, в большей мере сохранили регуляторные свойства. Хорошая способность этих элементов мигрировать к опухолевым CD133<sup>+</sup>-клеткам

линий U87 и U251 позволяет рассматривать их как наиболее перспективный инструмент для воздействия на опухолевые СК глиобластомы. По этим соображениям оценка миграционного потенциала *in vivo* проводилась только с использованием мультипотентных мезенхимальных СК.

*Миграция мультипотентных мезенхимальных СК к клеткам глиомы in vivo.* *In vivo* для моделирования опухолевого процесса у животных были использованы клетки глиобластомы линии С6. Предварительный иммуноцитохимический анализ (рис. 3) позволил выявить в составе культуры 98,8±13,3% клеток, позитивных к нестину и 82,3±16,4% клеток, имеющих реактивность к мутантному белку p53. Часть клеток была иммунопозитивна к белку CXCR4 (53,7%), кальций-связывающему белку S100 (9,4%), глиальному фибриллярному кислом протеину (7,2%) и тубулину-βIII (9,3%). Стереотаксическая имплантация клеток глиомы в мозг крыс приводила к быстрому формированию опухолей, визуализируемых методом высокоразрешающей компьютерной и магнитно-резонансной томографии.

При морфологическом исследовании, опухоль была представлена клетками разнообразной формы с различным количеством ядер. Ткань опухоли содержала многочисленные микрососуды, что свидетельствовало о высокой скорости метаболических процессов. По периферии опухолевого очага клетки глиомы вторгались в дистрофически измененную паренхиму мозга. На некотором удалении от первичного узла клетки группировались, формируя конгломераты, из которых возникали вторичные, сателлитные очаги, в центре которых формировался питающий кровеносный сосуд. С 20-го дня наблюдения в неопластической ткани начинались процессы гибели опухолевых элементов. Появление некрозов в центре опухолевого узла на некотором расстоянии от питающих кровеносных сосудов указывало на принципиальную неспособность кровеносной сети обеспечить потребности быстрорастущей ткани. Опухолевые клетки формировали плотные узловое скопления вокруг питающего кровеносного сосуда, обнаруживая характерную картину «розеол» на фоне участков некроза, занимающих основное место в морфологической картине (рис. 4).

Введение меченных флуорохромом мезенхимных СК животным с глиомой позволило определить особенности их распределения в мозге и паренхиматозных органах. Максимальное число этих СК на всех сроках наблюдения (57,6±8,9%) было зафиксировано в мозге. Спустя 7 суток после введения участки флуоресценции обнаруживались в паренхиме мозга в непосредственной близости от опухоли, размеры флуоресцирующих объектов соответствовали величине трансплантированных клеток (10–20 мкм). Достигая неопластического узла, эти клетки образовывали большие скопления на границе со здоровой тканью (более 100 клеток в поле зрения) и диффузно проникали в ткань опухоли. Спустя 14 дней СК хорошо визуализировались как вдоль границ опухоли, так и в глубине новообразования (рис. 5).

Флуоресценция клеток, окрашенных CFDA SE (эксцизия 488 нм, эмиссия 492/517 нм), сохранялась дольше, чем CMTPX (эксцизия 546 нм, эмиссия 577/602 нм). В мозге животных контрольной группы (без опухоли) на 7-е сутки были обнаружены только одиночные объекты, флуоресцирующие в спектре, соответствующем ранее установленному диапазону, и совпадающие с размерами единичных клеток. Большая часть трансплантированных клеток, демонстрирующих устойчивый сигнал, располагалась вблизи или в составе стенок паренхиматозных сосудов, или локализовалась в мозговой паренхиме, где СК длительно сохраняли флуоресценцию, спектральные характеристики которой отличались от автофлуоресценции мозговой ткани.

В паренхиматозных органах животных экспериментальной группы единичные флуоресцирующие объекты, соответствующие требуемым параметрам, выявлялись в легких, селезенке и костном мозге до 7 суток после введения. На 14-й день в органах крыс контрольной и экспериментальной групп трансплантированных клеток не обнаружено. Большинство исследованных органов содержало клетки, обладающие автофлуоресценцией, интенсивность которой в тканях крыс контрольной группы оценивали при тех же параметрах, что и у экспериментальных животных.

В легких, селезенке и печени была отмечена слабая флуоресценция, однако ее спектр отличался от параметров флуоресценции введенных клеток. В почках такой сигнал давали эпителиоциты канальцев, в легочной ткани – небольшая популяция альвеолоцитов и клетки межальвеолярных септ с вытянутыми или округлыми телами. Следует отметить, что в случае, если у животного в легочной паренхиме наблюдаются признаки воспаления, число аутофлуоресцирующих клеток в этой зоне значительно возрастало, что отмечено как в контроле, так и в эксперименте (рис. 6).

**Обсуждение полученных данных.** Трансплантация стволовых клеток – одно из магистральных направлений в лечении злокачественных опухолей за счет высокой способности клеточного трансплантата самостоятельно находить зону повреждения. Сегодня она является единственным методом, способным радикально изменить судьбу пациентов при ряде гемобластозов. Важнейшим этапом лечения онкогематологических заболеваний и некоторых других форм новообразований является облучение и высокодозная химиотерапия. Уничтожая собственные гемолимопоэтические клетки, эти факторы разрушают их локальное микроокружение в костном мозге, а трансплантируемые в последующем СК сами мигрируют в область повреждения, заселяют и ремоделируют ее, формируя новые условия локальной микросреды [8].

В этой связи до недавнего времени направленную миграцию СК в область повреждения было принято рассматривать только в репаративном аспекте. В индигировании этого процесса принимают участие многочисленные факторы, высвобождающиеся в очаге повреждения и воздействующие на соответствующие рецепторы СК. Доказана роль фактора стромальных

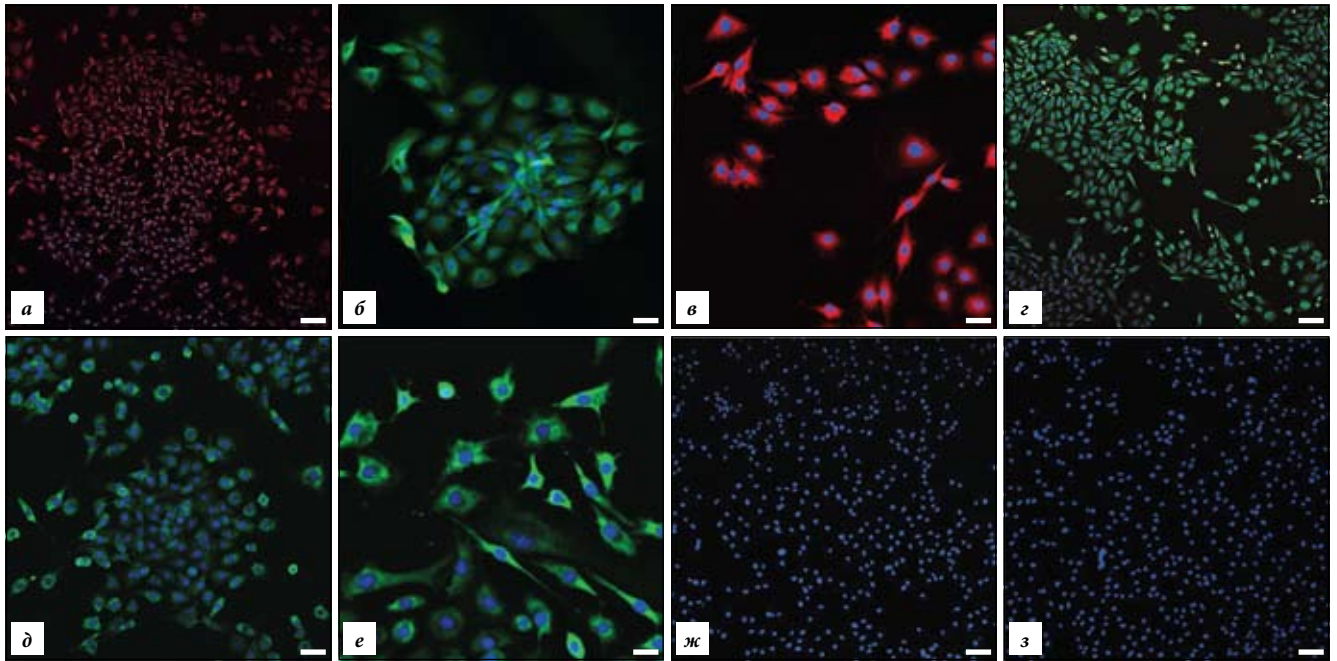


Рис. 3. Иммуноцитохимическая характеристика клеток глиобластомы линии Сб:

окраска антителами к нестину (а), белку p53 (б), белку CXCR4 (в), тубулину-βIII (г), белку S100 (д), кисломю глиальному фибриллярному протеину (е); а, в – флуоресценция вторичных антител Alexa 633, б, г, д, е – флуоресценция вторичных антител Alexa 488, отсутствие флуоресценции при контрольном окрашивании вторичными антителами Alexa 488 (ж) и Alexa 633 (з); ядра клеток докрашены DAPI. Мультифотонная сканирующая лазерная микроскопия. Масштаб: а, г, д, ж, з – 100 мкм, б, е – 20 мкм, в – 30 мкм.

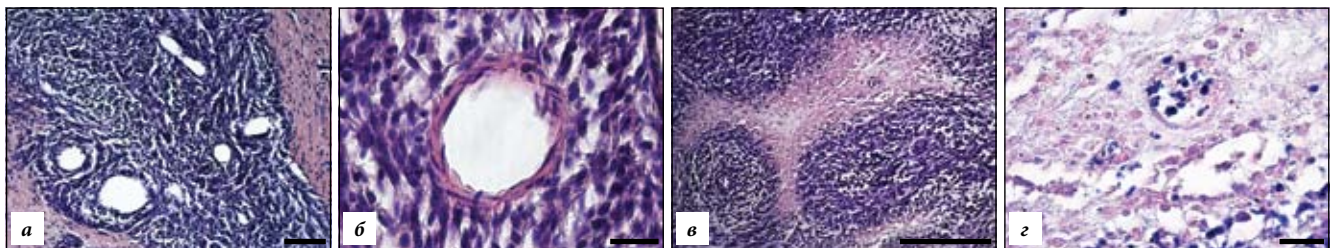


Рис. 4. Опухоль в мозге крысы:

а – опухолевая ткань с новообразованными кровеносными сосудами, 20-е сутки; б – формирование кровеносного сосуда среди опухолевых клеток сателлитного очага; в – ангиоцентрическая группировка опухолевых клеток; г – зоны некроза в опухолевой ткани, 30-е сутки. Окр. гематоксилином и эозином. Масштаб: а – 100 мкм, б, г – 20 мкм, в – 200 мкм.

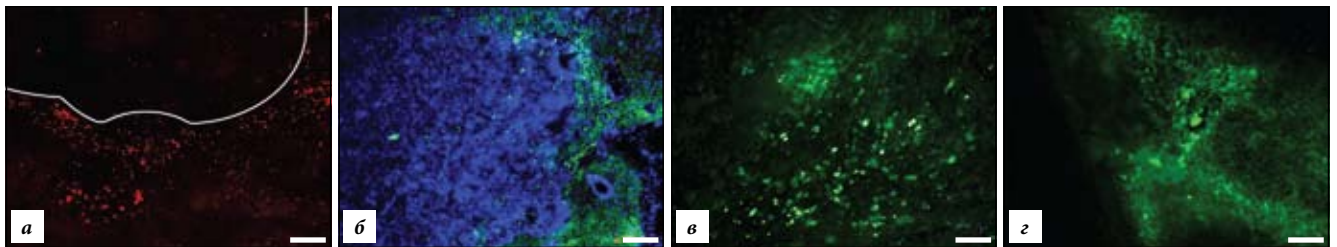


Рис. 5. Распределение мезенхимальных СК в мозге крысы с глиобластомой:

а, б – мигрирующие клетки локализованы вдоль границ неопластического узла; в, г – миграция стволовых клеток в паренхиму опухоли. Окраска прижизненным трейсером: а – Red CMTPX (546 нм), б, в, г – Vybrant CFDA SE (488 нм); флуоресцентная лазерная микроскопия. Масштаб: а, б – 50 мкм, в, г – 100 мкм.

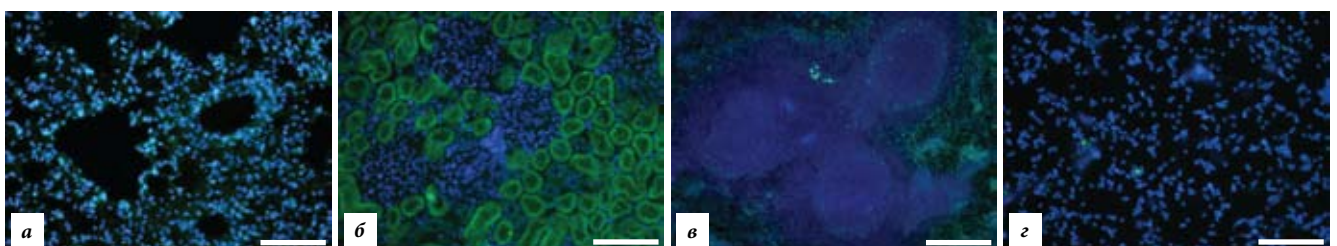


Рис. 6. Ткани паренхиматозных органов и костного мозга животных через 7 суток после трансплантации мезенхимальных СК, окрашенных Vybrant CFDA SE:

а – легкое, контрольная группа, аутофлуоресценция; б – почка, контрольная группа, аутофлуоресценция; в – флуоресценция трансплантированных клеток в селезенке животных экспериментальной группы; г – флуоресценция трансплантированных клеток в костном мозге экспериментальных животных. Ядра клеток докрашены DAPI. Масштаб: а, б – 50 мкм, в-г – 100 мкм.

клеток-1α, взаимодействующего с рецептором CXCR4 мембраны СК, обоснована роль фактора стволовых клеток, фактора роста гепатоцитов, фактора роста эндотелия кровеносных сосудов, белка хемотаксиса моноцитов, белка, ингибирующего миграцию макрофагов, и еще около 80 различных факторов, высвобождаемых поврежденными тканями [3].

Однако миграция стволовых клеток в неопластический очаг – это не только репаративный феномен. По данным нашего эксперимента, первичным источником сигналов, активирующих направленную миграцию СК к очагу малигнизации служат непосредственно опухолевые клетки. Приобретая автономность, они синтезируют цитокины, которые принципиально изменяют направление трафика СК, а, следовательно, – ход процессов регенерации. Способность нейроэпителиальных опухолей продуцировать тенасцин, фибронектин, ламинин и коллагены различных типов неоднократно доказана. Именно с высвобождением поврежденными тканями этих белков традиционно связывают процессы направленной миграции СК в зону повреждения. Кроме того, важной особенностью глиобластомы считается гипоксия, которая позволяет длительно сохранять клетки в недифференцированном состоянии и запускает экспрессию более ста генов – индукторов миграции СК [2, 3, 8, 10].

Среди всей популяции опухолевых клеток наилучшей способностью привлекать стволовые элементы обладают именно опухолевые СК, что тоже не является неожиданностью. Идентифицировано множество цитокинов, секретируемых опухолевыми СК, среди которых молекулы CH3L1, ADAM9, ADAM10, катепсины В и L1, остеопонтин, семафорин 7А и другие индукторы направленной миграции и хоуминга стволовых клеток [5, 10]. В нашем эксперименте в протеоме опухолевых СК идентифицированы 33 белка, потенциально способных влиять на процессы миграции и стволовых клеток.

Нейральные СК обладают существенно большей подвижностью в отношении опухолевых СК глиобластомы, что может быть очень важным моментом. В условиях развития опухолевого процесса в нервной ткани между нейральными и опухолевыми СК устанавливаются очень сложные взаимомодулирующие влияния. С одной стороны, известно, что развитие глиобластомы ингибирует пролиферацию нейральных СК в герминативных зонах мозга, что особенно выражено по мере увеличения возраста экспериментальных животных. С другой стороны, именно нейральные СК могут стать источником клеточного пула, рекрутируемого опухолью для усиления своего пролиферативного и метаболического потенциала. Оба типа клеток (нейральные и опухолевые СК глиобластомы) имеют много схожих морфологических и биохимических свойств: они активно пролиферируют *in vitro* и формируют нейросферы (глиомасферы), а при добавлении в среду различных факторов роста способны дифференцироваться в морфологические элементы других типов. Нестин – важнейший идентификатор нейральных

СК; этот маркер присутствует в большинстве клеток глиобластомы линии С6, использованной в нашем эксперименте. Потомки нейральных СК – нейральные прогениторные клетки – постоянно мигрируют из субвентрикулярной зоны, что отчасти объясняет их высокую мобильность в эксперименте.

Стратегической функцией СК является регуляторное межклеточное взаимодействие в патологическом очаге, что позволяет предположить возможность трансформации нейральных СК в опухолевые СК под воздействием сигналов патологически измененного матрикса и микроокружения. Обнаруженная в настоящем исследовании высокая идентичность (63,5%) протеомных профилей нейральных и опухолевых СК – весомый аргумент в пользу этой гипотезы. Напротив, мезенхимальные клетки, обладающие достаточно хорошей подвижностью в отношении опухолевых СК в совместных культурах, имеют значительно меньшее число белков, характерных для опухолевых СК, что позволяет считать данный тип клеток наименее подверженным неопластической трансформации. Эти факты дают возможность рассматривать именно этот тип СК в качестве потенциального инструмента для разработки технологий управления активностью опухолевых СК глиобластомы. Результаты проведенного исследования миграционной активности СК у животных с моделью глиомы, а также некоторые результаты других авторов, полученные на иных опухолевых моделях, подтверждают данное предположение.

При оценке распределения в организме экспериментального животного различного типа клеток экзогенного происхождения, стандартным методом является флуоресцентная лазерная микроскопия [6], однако выявленные к настоящему времени особенности тканевого распределения имплантированных СК демонстрируют не всегда однозначные результаты. Флуоресценция мультипотентных мезенхимальных СК в паренхиматозных органах описана у крыс с привитой аденокарциномой Льюис, Эрлиха и Фишера и на некоторых других экспериментальных моделях. При этом удавалось идентифицировать в опухолевой ткани только солитарные флуоресцирующие клетки на фоне значительного накопления клеточного трансплантата в потенциальных «нишах». Скопления трансплантированных клеток в организме опухоленосителя часто наблюдались в легких, селезенке и костном мозге. Данный факт принято объяснять малым количеством вводимых клеток, а также помехами, вызванными автофлуоресценцией исследуемых тканей или неадекватностью выбранного типа клеток и линий животных цели и задачам эксперимента [6, 7].

Положительные результаты, свидетельствующие о направленной миграции СК в неопластический очаг, были получены на экспериментальных моделях глиобластомы в отношении гемопоэтических, нейральных, а также фетальных и эмбриональных СК [2, 3, 10]. Можно считать, что способность привлекать СК следует отнести к категории ключевых свойств глиобластомы. Неисключено, что данное обстоятельство



связано с большим содержанием в составе культуры опухолевых СК.

Взаимодействие нормальных и опухолевых СК в зоне неоплазии формирует ряд условий, позволяющих достичь торможения опухолевой пролиферации, ангиогенеза, метастазирования, стимулировать усиление воспалительных процессов и тотальный запуск апоптоза. Некоторые механизмы такого взаимодействия уже описаны – это усиление продукции специфических цитокинов, арест цикла опухолевых клеток в фазе G1, проапоптотическая модификация СК, повышающая эффективность обмена цитоплазматических белков, эффект *by stander* и феномен молекулярной адгезии [14].

Последний феномен впервые описан научной группой Карен Эбоди в 2000 г. Его суть заключается в уникальной особенности СК следовать за опухолевой клеткой в глубину паренхимы мозга по «цитокиновому следу», достигать ее и прикрепляться к ней, «оседлав подобно наезднику» [2]. Нашей научной группой описан механизм межклеточной коммуникации между стволовыми и опухолевыми клетками посредством образования экзосом, делающих возможным активный обмен цитоплазматическими белками, подавляющими пролиферацию опухолевых клеток. Следует предположить, что модификация протеомного профиля мультипотентных мезенхимальных СК позволит создать клеточные системы, способные таргетно запускать апоптоз в неопластических СК.

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы. Среди клеток глиобластомы наилучшей способностью привлекать нормальные СК обладают опухолевые СК. Критические различия клеточных протеомов позволяют рассматривать мультипотентные мезенхимальные СК как оптимальный инструмент для воздействия на опухолевые СК глиобластомы. При введении в кровоток экспериментальных животных с глиобластомой основная часть мультипотентных мезенхимальных СК мигрирует в полушарие мозга с опухолью и приращивается в неопластическую ткань.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда. Проект 14–15–00084.*

#### Литература

1. Заридзе Д.Г. Канцерогенез. М.: Медицина., 2004. 576 с.
2. Aboody K.S., Brown A., Rainov N.G. [et al.]. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. Vol. 97, No. 23. P. 12846–12851.
3. Bryukhovetskiy I.S., Mischenko P.V., Tolok E.V. [et al.]. Directional migration of adult hematopoietic progenitors to C6 glioma *in vitro* // *Oncol. Lett*. 2015. Vol. 9, No. 4. P. 1839–1844.
4. Duesberg P., Mandrioli D., McCormack A. [et al.]. Is carcinogenesis a form of speciation? // *Cell Cycle*. 2011. Vol. 10, No. 13. P. 2100–2114.
5. Formolo C.A., Williams R., Gordish-Dressman H. [et al.]. Secretome signature of invasive glioblastoma multiforme // *J. Proteome Res*. 2011. Vol. 10, No. 7. P. 3149–3159.
6. Furia L., Pelicci P., Faretta M. Confocal microscopy for high-resolution and high-content analysis of the cell cycle // *Curr. Protoc. Cytom*. 2014. Vol. 70, No. 7. P. 1–14.
7. Hide T., Makino K., Nakamura H. [et al.]. New treatment strategies to eradicate cancer stem cells and niches in glioblastoma // *Neurol. Med. Chir*. 2013. Vol. 53, No. 11. P. 764–772.
8. Kidd S., Spaeth E., Dembinski J.L. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using *in vivo* bioluminescent imaging // *Stem Cells*. 2009. Vol. 27, No. 10. P. 2614–2622.
9. Lathia J.D., Mack S.C., Mulkearns-Hubert E.E. [et al.]. Cancer stem cells in glioblastoma // *Genes Dev*. 2015. Vol. 29, No. 12. P. 1203–1217.
10. Moore X.L., Lu J., Sun L. [et al.]. Endothelial progenitor cells “homing” specificity to brain tumors // *Gene therapy*. 2004. Vol. 10, No. 11. P. 811–818.
11. Omuro A., De Angelis L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review // *JAMA*. 2013. Vol. 310, No. 17. P. 1842–1850.
12. Pittenger M.F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow // *Methods Mol. Biol*. 2008. Vol. 449. P. 27–44.
13. Soltanian S., Matin M.M. Cancer stem cells and cancer therapy // *Tumour Biology*. 2011. Vol. 32, No. 3. P. 425–440.
14. Stupp R., Hegi M.E. Brain cancer in 2012: molecular characterization leads the way. National review // *Clinical Oncology*. 2013. Vol. 10, No. 2. P. 69–70.
15. Tabatabai G., Weller M. Glioblastoma stem cells // *Cell and Tissue Research*. 2011. Vol. 343, No. 3. P. 459–465.

*Поступила в редакцию 10.02.2016.*

#### Стволовые клетки глиобластомы индуцируют миграцию нормальных стволовых клеток

И.С. Брюховецкий<sup>1,2</sup>, И.В. Дюйзен<sup>1,2,4</sup>, В.Е. Шевченко<sup>1,3</sup>, Ю.С. Хотимченко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Дальневосточный федеральный университет (690091, Владивосток, ул. Суханова, 8), <sup>2</sup> Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690059, Владивосток, ул. Пальцевого 17), <sup>3</sup> Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (115478, Москва, Каширское шоссе, 23), <sup>4</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

**Введение.** Цель работы – сравнительная оценка способностей клеток глиобластомы привлекать различные типы тканеспецифических стволовых клеток (СК), а также выявление принципиальных сходств и отличий между нормальными и опухолевыми СК.

**Материалы и методы.** Работа выполнялась в три этапа: 1) изучение процессов миграции СК человека к клеткам злокачественных опухолей *in vitro*; 2) сравнение клеточных протеомов некоторых СК, в том числе опухолевых СК; 3) изучение миграции СК *in vivo*. Использовались современные клеточные и постгеномные технологии.

**Результаты исследования.** Нейральные СК обладали большей подвижностью в сравнении с мультипотентными мезенхимальными СК и фибробластами. Получены данные о достаточно высоком родстве опухолевых СК глиобластомы и нормальных СК. Введение меченных флуорохромом мезенхимных СК животным с глиомой показало, что максимальное число этих клеток (57,6±8,9%) фиксировалось в мозге.

**Обсуждение полученных данных.** Трансплантация СК – одно из магистральных направлений в лечении злокачественных опухолей за счет высокой способности клеточного трансплантата самостоятельно находить зону повреждения. Среди всех клеток глиобластомы наилучшей способностью привлекать нормальные СК обладают опухолевые СК. Критические различия клеточных протеомов позволяют рассматривать мезенхимальные СК как оптимальный инструмент для воздействия на опухолевые СК глиобластомы.

**Ключевые слова:** мультиформная глиобlastoma, нейральные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, опухолевые стволовые клетки.