

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-006.+612.1

Повещенко А.Ф.^{1,3}, Соловьева А.О.¹, Зубарева К.Э.¹, Стрункин Д.Н.⁴,
Грицык О.Б.², Повещенко О.В.^{1,3}, Шурлыгина А.В.², Коненков В.И.¹

Изучение миграции и распределения клеток костного мозга трансплантированных животным с меланомой B16

¹ ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии», 630060, Новосибирск, Новосибирск, Россия, ул. Тимакова, д. 2

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» 630117, г. Новосибирск, Россия, ул. Тимакова, д. 4

³ ФГБОУ ВПО НГПУ, 630126, г. Новосибирск, Россия, ул. Вилюйская, д. 28

⁴ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», 630099, Новосибирск, Россия, ул. Ядринцовская, д. 14

Цель — выявление особенностей миграции и распределения сингенных клеток костного мозга (ККМ) и его субпопуляции (МСК) после их трансплантации в органы реципиента-носителя меланомы B16. **Методика.** В работе использовались мыши самцы и самки линии C57Bl/6. **Индукция опухолевого роста:** имплантировали клетки меланомы B16 подкожно в заднюю правую лапу самок мышей C57Bl/6 в дозе $2,5 \times 10^5$ клеток/мышь. Изучение миграции и распределения *in vivo* ККМ и МСК осуществляли при помощи генетического маркера — специфической последовательности Y-хромосомы самцов линии C57Bl/6 при сингенной внутривенной трансплантации самкам с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на Authorized Termal Cyler — Light Cyler 480 II/96 (Roche). Введение суспензии неразделенных клеток костного мозга, мезенхимальных стволовых клеток от самцов-доноров мышам-реципиентам (сингенным реципиентам самкам C57Bl/6) с последующим выделением органов реципиентов проводилось через определенные временные интервалы, затем из органов реципиентов выделяли ДНК. **Результаты.** Показано, что клетки костного мозга, позитивные по Y-хромосоме, мигрируют как в лимфоидные (лимфатические узлы, селезенку, костный мозг), так и в нелимфоидные органы (печень, сердце, головной мозг, кожу) сингенных реципиентов. Помимо миграции клеток из костного мозга в другие органы, существует и обратный путь миграции клеток из кровотока в костный мозг. Развитие у интактных мышей линии C57Bl/6 меланомы B16 стимулирует процессы миграции трансплантированных ККМ и МСК в костный мозг. Установлено, что при опухолевом росте усилена миграция трансплантированных клеток костного мозга, в том числе и популяции МСК, в костный мозг. На ранней стадии формирования опухоли миграционная активность МСК в опухоль выше по сравнению с неразделенной фракцией костного мозга. На поздних стадиях формирования опухоли неразделенная популяция клеток костного мозга интенсивнее мигрирует в опухоль по сравнению с популяцией МСК. **Заключение.** Обсуждается возможность использования МСК костного мозга для таргетной терапии опухолевых заболеваний, так как миграция МСК в опухолевую ткань может быть использована для эффективной доставки противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: C57Bl/6; перевиваемая опухоль B16 меланомы; клетки костного мозга; мезенхимальные стромальные клетки; миграция; маркер миграции — специфическая последовательность Y-хромосомы.

Для цитирования: Повещенко А.Ф., Соловьева А.О., Зубарева К.Э., Стрункин Д.Н., Грицык О.Б., Повещенко О.В., Шурлыгина А.В., Коненков В.И. Изучение миграции и распределения клеток костного мозга трансплантированных животным с меланомой B16. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 10–21. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.10-21

Для корреспонденции: Повещенко Александр Федорович, доктор мед. наук зав. лаб. физиологии протективной системы, ФГБНУ НИИКЭЛ, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru

Поступила 20.09.2016

Poveshchenko A.F.^{1,3}, Solovieva A.O.¹, Zubareva K.E.¹, Strunkin D.N.¹, Gricyk O.B.²,
Poveshchenko O.V.^{1,3}, Shurlygina A.V.², Konenkov V.I.¹

Study of migration and distribution of bone marrow cells transplanted animals with B16 melanoma

¹ FGBNU «Institute of Clinical and Experimental Lymphology», Novosibirsk, st. Timakova, 2, Russia

² FGBNU «Institute of Physiology and Fundamental Medicine», st. Timakova, 4, Novosibirsk

³ FGBOU VPO State Pedagogical Universitet, 630126, Novosibirsk, Str. Viluiskaya, 28, Russia

⁴ FGBNU «Institute of Fundamental and Clinical Immunology», Novosibirsk, Str. Yadrinsovskaya 14, Russia

Purpose. Reveal features migration and distribution of syngeneic bone marrow cells (BMC) and subpopulations (MSC) after transplantation into the recipient carrier B16 melanoma bodies. **Methods.** We used mouse male and female C57BL/6 mice. Induction of Tumor Growth: B16 melanoma cells implanted subcutaneously into right hind paw of female

C57BL/6 mice at a dose of 2.5×10^5 cells / mouse. migration study in vivo distribution and BMC and MSC was performed using genetic markers — Y-chromosome specific sequence line male C57Bl/6 syngeneic intravenous transplantation in females using the polymerase chain reaction (PCR) in real time on Authorized Thermal Cycler — Light Cycler 480 II / 96 (Roche). Introduction suspension of unseparated bone marrow cells, mesenchymal stem cells from donor to recipient male mice (syngeneic recipient female C57BL/6), followed by isolation of recipients of organs was performed at regular intervals, then of organ recipients isolated DNA. Results. It was shown that bone marrow cells positive for Y-chromosome in migrate lymphoid (lymph nodes, spleen, bone marrow) or in non-lymphoid organs (liver, heart, brain, skin) syngeneic recipients. In addition to the migration of cells from the bone marrow to other organs, there is a way back migration of cells from the circulation to the bone marrow. B16 melanoma stimulates the migration of transplanted MSCs and BMC in bone marrow. It is found that tumor growth enhanced migration of transplanted bone marrow cells, including populations of MSCs in the bone marrow. In the early stages of tumor formation MSC migration activity higher than the BMC. In the later stages of tumor formation undivided population of bone marrow cells migrate to the intense swelling compared with a population of MSCs. **Conclusion.** The possibility of using bone marrow MSCs for targeted therapy of tumor diseases, because migration of MSCs in tumor tissue can be used to effectively deliver anticancer drugs.

Keywords: C57BL/6; B16 melanoma; bone marrow cells; mesenchymal stromal cells; Y-chromosome marker migration.

For citation: Poveshchenko A.F., Solovieva A.O., Zubareva K.E., Strunkin D.N., Gricik O.B., Poveshchenko O.V., Shurlygina A.V., Konenkov V.I. Study of migration and distribution of bone marrow cells transplanted animals with B16 Melanoma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(2): 10–21. (in Russ.) DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.10-21

For correspondence: Alexandr F. Poveshchenko, Doctor of Medical Science, Head of the Laboratory of Physiology protective system. Institute of Clinical and Experimental Lymphology, 630060, Novosibirsk, st. Timakova, 2, Russia, e-mail: poveshchenkoa200@mail.ru

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Poveshchenko A.F., <http://orcid.org/0000-0002-4433-7110>

Solovieva A.O., <http://orcid.org/0000-0002-7740-8456>

Zubareva K.E., <http://orcid.org/0000-0001-9181-1498>

Gricik O.B., <http://orcid.org/0000-0002-6176-670X>

Strunkin D.N., <http://orcid.org/0000-0003-4357-7443>

Poveshchenko O.V., <http://orcid.org/0000-0001-9956-0056>

Shurlygina A.V., <http://orcid.org/0000-0002-3576-9456>

Konenkov V.I., <http://orcid.org/0000-0001-7385-6270>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 20.09.2016

Введение

Миграция является фундаментальным свойством клеток, участвующим в поддержании гомеостаза, регенерации и иммунной защите организма. Миграционная активность и характер распределения клеток после трансплантации зависит от множества факторов, таких, как тканевая принадлежность трансплантированных клеток, количество введенных и путь введения клеток, их тип и микроокружение [1, 2]. Миграционная активность трансплантированных клеток играет ключевую роль в эффективности клеточной терапии, поскольку для осуществления своих функций — дифференцировки в клетки поврежденной ткани, выделение ростовых факторов, цитокинов и др., клет-

ки должны мигрировать в патологический очаг. Отсутствие либо наличие патологического очага (воспаление, повреждение, опухолевый рост и др.) также влияет на миграцию и распределение трансплантированных клеток [3].

Костный мозг содержит два типа стволовых клеток: гемопоэтические стволовые и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), которые функционально взаимодействуют и находятся в специализированном микроокружении, влияющем на их миграцию, эффективность их приживания после трансплантации, секрецию цитокинов и ростовых факторов. МСК костного мозга, обладают набором уникальных свойств (наиболее важным из которых

является пластичность), которые делают их идеально подходящими, для клеточной терапии в регенеративной медицине [1].

Принципиально важным вопросом для трансплантологии и регенеративной медицины является вопрос эффективности использования при лечении тех или иных патологий трансплантации цельного (неразделенного на субпопуляции) костного мозга или его отдельных популяций например мезенхимальных стромальных клеток костного мозга.

Таким образом, изучение влияния опухолевого процесса у реципиента на миграционную активность разных типов трансплантируемых клеток актуально, имеет фундаментальное и прикладное значение. Не ясны особенности распределения трансплантированных МСК предшественников по сравнению с цельной неразделенной популяцией костного мозга в норме и в условиях опухолевого роста в органах животного-опухоленосителя. Успешность клеточной терапии с использованием МСК также зависит не только от способности клеток восстанавливать поврежденные ткани и регулировать процессы репарации, но также, главным образом, от их способности мигрировать в поврежденные ткани и органы с целью адресной доставки препаратов, например при лечении опухолей.

Цель — выявление особенностей миграции и распределения клеток костного мозга (цельной, неразделенной популяции клеток) и его субпопуляции (МСК) после сингенной трансплантации в лимфоидных и не лимфоидных органах здорового реципиента и реципиента-носителя меланомы В16.

Методика

В работе использовались мыши самцы и самки линии С57В1/6 в возрасте 8—12 нед., число реципиентов в каждой исследуемой группе составляло 8—10 животных. Животные находились на стандартной сбалансированной диете в виварии СО РАМН. Эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Индукция опухолевого роста. Клетки меланомы В16 в дозе $2,5 \times 10^5$ клеток/мышь имплантировали подкожно в заднюю правую лапу самок мышей С57В1/6 6—8-недельного возраста.

Изучение миграции и распределения in vivo ККМ и МСК при помощи генетического маркера — специфической последовательности Y-хромосомы самцов линии С57В1/6 при сингенной внутривенной трансплантации самкам. Для изучения миграции и распределения клеток донора в организме был использован маркер специфической последовательности

Y-хромосомы самцов-доноров клеток костного мозга, наличие которого количественно оценивалось в органах сингенных реципиентов самок с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на Authorized Thermal Cycler — Light Cycler 480 II/96 (Roche). Y-хромосома является маркером трансплантированных клеток доноров.

Проводили выделение ДНК из органов реципиента и определение ее концентрации. ДНК, содержащая маркер трансплантированных клеток костного мозга сингенных самцов (специфическую последовательность Y-хромосомы), выделяли при помощи стандартной обработки додецилсульфатом натрия (SDS) с протеиназой К и методом высаливания [4]. Пробы ДНК приводили к единой концентрации, амплифицировали в реакционной смеси, содержащей мышьяные праймеры специфичные для Y-хромосомы [5]. Для амплификации целевой последовательности были использованы следующие последовательности праймеров: 5'- TCCAGGCTGGTCCGAAACTCATTT-3', 5'- ACATGAACAACGCCTTGGGCTTCA -3' и зонд 5'- [FAM]- tccactggcctgtgtggcattgcagttat-<BHQ1>-3'. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 20 пмоль каждого праймера, 20 пмоль зонда, 5 мкл ДНК. Условия реакции амплификации: денатурация 95°C в течение 5 мин, 40 циклов: денатурация 95°C 20 с, отжиг праймеров 65°C 20 с, и элонгация 72°C 20 с.

Для определения абсолютного количества маркерного гена в образцах использовали серию разведений стандарта, в качестве которого была использована плаزمиды с наработанным геном Zfy Y-хромосомы. Поскольку в клетках самца содержится по 2 копии гена Zfy Y-хромосомы, количество трансплантированных клеток в образце рассчитывалось по формуле:

$$N = A/2,$$

где N — количество Y-позитивных клеток; A — количество гена, определенного в образце.

В реакцию брали ДНК образцов одинаковой концентрации, из 100 тыс. клеток.

В качестве внутреннего контроля был использован ген «домашнего хозяйства» β-актина, присутствующий в одинаковых количествах во всех клетках.

В качестве позитивного и негативного контроля использовали ткань интактных самцов и самок соответственно. Введение суспензии неразделенных клеток костного мозга, МСК от самцов-доноров мышам-реципиентам (сингенным реципиентам самкам С57В1/6) с последующим выделением органов реципиентов проводилось через определенные временные интервалы, проводилось выделение ДНК из органов. Выделение органов реципиентов (самок линии С57В1/6) производили через 1 ч, 3, 7 сут. после трансплантации донорских клеток. Для исследования выделялись лимфатические узлы паховые, аксилляр-

ные, селезенка, печень, сердце, кожа, мышцы бедра, головной мозг, костный мозг. Выделенные органы замораживались при температуре -70°C .

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи программы Statistica 6,0 (StatSoft, США). Полученные данные проверяли на нормальность распределения, согласно критериям Колмогорова—Смирнова. Значимость различий между выборочными величинами независимых выборок оценивали при помощи непараметрического критерия Крускала—Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки статистической значимости различий использовался непараметрический критерий Манна—Уитни. Результаты выражались в количестве Y-позитивных клеток на 100 тысяч клеток реципиента \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

Результаты и обсуждение

1. Влияние меланомы B16 на миграционную активность неразделенной популяции клеток костного мозга и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Для изучения влияния опухоли на миграционную активность трансплантированных клеток мы провели сравнительный анализ количественного распределения клеток костного мозга в течение 2 нед. после трансплантации в норме и в условиях опухолевого роста. В качестве опухолевой модели использовали меланому B16, характеризующуюся агрессивностью и быстрым ростом, поэтому выбор временных точек для анализа распределения трансплантированных клеток был обусловлен ограниченным сроком жизни опухоленосителей (в среднем 21 сут), а также динамикой роста опухоли. Через 1 ч после введения клеток опухоль еще не сформирована. Через 7 сут. после введения клеток (на 11-е сут. после прививки опухоли) опухоль видна макроскопически, размер около $0,9 \text{ см}^3$. Через 14 сут. размер опухоли достигает 2 см^3 , видны очаги некроза опухолевой ткани. Данная модель исследования позволяет описать влияние опухоли на миграционную активность трансплантированных клеток.

Для исследования распределения трансплантированных клеток костного мозга по органам интактного реципиента неразделенную популяцию клеток костного мозга самцов доноров (содержащих эндогенный маркер Y-хромосому) трансплантировали интактным самкам реципиентам. Через 1 ч, 3, 7 и 14 сут. после трансплантации ККМ органы самок-реципиентов анализировали на количественное содержание маркера (специфической последовательности Y-хромосомы трансплантированных клеток самца) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Было показано, что через 1 час после трансплантации клетки были обнаружены в крови, печени, селезенке, легких, костном мозге, сердце и лимфоузлах. Кожа и головной мозг не содержали Y-позитивных клеток. Максимальное количество трансплантированных клеток обнаружено в крови по сравнению со всеми другими органами (1800 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$) (рис. 1). Через 3 сут. после трансплантации Y-позитивные клетки покидают кровяное русло и распределяются по всем исследуемым органам с максимальными показателями в головном мозге и костном мозге (770 и 750 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, соответственно, $p < 0,01$). В печени на данном сроке отмечается статистически значимо более низкий уровень накопления маркера по сравнению с другими органами (3 Y-позитивных клетки/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$) (рис. 1). К 7-м сут. клетки накапливаются в основном в селезенке (4442 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$) и в костном мозге (2190 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$). В крови, сердце, головном мозге реципиента на данном сроке Y-позитивные клетки не обнаружены (рис. 1). Через 2 нед. после трансплантации маркер трансплантированных клеток определялся во всех исследуемых органах. На данном сроке клетки аккумулируются в основном в лимфатических узлах (3190 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $p < 0,01$). Кроме того, на данном сроке отмечено появление трансплантированных клеток костного мозга в крови реципиента (430 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток).

Итак, через 1 ч после введения клетки находятся в основном в крови реципиента. Однако через 3 сут. трансплантированные клетки выходят из кровяного русла и распределяются по органам, в основном аккумулируются в костном и головном мозге. Через 1 нед. после трансплантации максимальное количество Y-позитивных клеток содержат селезенка и костный мозг. Через 2 нед. трансплантированные клетки аккумулируются в лимфатических узлах реципиента и появляются в крови.

Для анализа влияния опухолевого роста на миграцию и распределение трансплантированных ККМ мы использовали опухолевую модель меланомы B16. Нами показано, что через 1 ч после трансплантации (3-и сут. после прививки опухоли) клетки костного мозга детектировались в печени, селезенке, легких, костном мозге, сердце, лимфоузлах, крови и опухоли. В головном мозге, коже, околоопухолевых лимфоузлах трансплантированных клеток не обнаружено. На данном сроке максимальное количество клеток определялось в крови реципиента-опухоленосителя (12000 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципи-

ента, $\rho < 0,01$). Также отмечается высокий показатель миграции трансплантированных клеток в костный мозг (1213 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента) по сравнению с остальными органами, где определяются единичные Y-позитивные клетки (рис. 2, А).

Через 3 сут. после трансплантации ККМ (7 сут. после прививки опухоли) маркер трансплантированных клеток определялся во всех исследуемых органах, кроме крови. В печени показатель накопления ККМ статистически значимо выше по сравнению с другими исследуемыми органами (1400 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $\rho < 0,01$). Минималь-

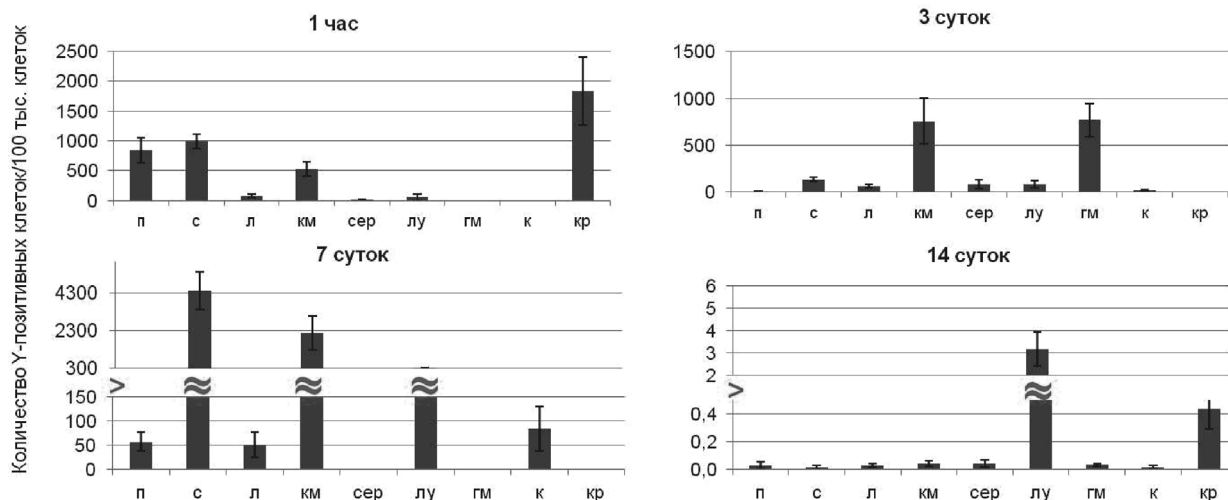


Рис. 1. Количественный анализ трансплантированных клеток в органах реципиента методом ПЦР в режиме реального времени. Клетки костного мозга самца (содержащие Y-хромосому) вводили самкам реципиентам. Через 1 ч, 3 сут., 7 сут., 14 сут. определяли количество трансплантированных клеток в органах самок-реципиентов методом ПЦР в режиме реального времени.

По оси ординат — количество Y-позитивных клеток на 100 тыс. клеток органов самки-реципиента. Данные представлены как $M \pm \sigma$. Сокращения: п — печень, с — селезенка, км — костный мозг, сер — сердце, лу — лимфатические узлы, гм — головной мозг, л — легкие, к — кожа, кр — кровь.

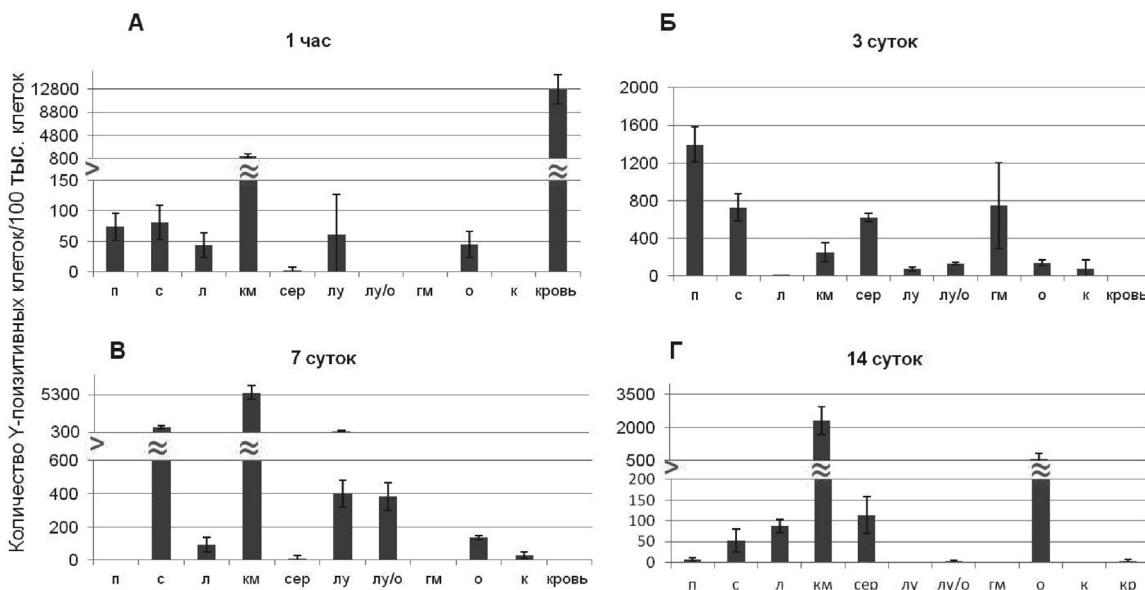


Рис. 2. Анализ количественного распределения трансплантированных клеток костного мозга в органах реципиента-опухоленосителя методом ПЦР в режиме реального времени. Самкам мышей С57В1 трансплантировали клетки меланомы В16. Через 3 сут. после прививки опухоли внутривенно вводили клетки костного мозга самцов мышей С57В1 (содержащие Y-хромосому). Через 1 ч, 3 сут., 7 сут., 14 сут. определяли количество трансплантированных клеток в органах самки — реципиента методом ПЦР в режиме реального времени.

По оси ординат — количество Y-позитивных клеток на 100 тыс. клеток органов самки-реципиента. Данные представлены как $M \pm \sigma$. Сокращения: п — печень, с — селезенка, л — легкие, км — костный мозг, сер — сердце, лу — лимфатические узлы, гм — головной мозг, к — кожа, кр — кровь, о — опухоль, лу/о — околоопухолевые лимфоузлы.

ное накопление маркера отмечается в легких реципиента (4,1 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента $\rho < 0,01$) (рис. 2, Б). Отмечено, что значимых различий между накоплением трансплантированных ККМ в ткани опухоли и околоопухолевых лимфоузлах на данном сроке не обнаружено (138 и 129 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, соответственно, $\rho = 0,78$) (рис. 2, Б).

Через 1 нед. после введения ККМ (11 сут. после прививки опухоли, объем опухоли $\sim 0,9 \text{ см}^3$), Y-позитивные клетки обнаружены в костном мозге, лимфоузлах, селезенке, околоопухолевых лимфоузлах, опухоли, легких, сердце, коже. В печени, головном мозге и крови Y-позитивных клеток не обнаружено. В основном на данном сроке клетки аккумулируются в костном мозге (5554 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $\rho < 0,01$) (рис. 2). Кроме того высокий показатель накопления ККМ обнаружен в селезенке (950 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $\rho < 0,01$). Показано, что в регионарных лимфатических лимфоузлах и околоопухолевых лимфоузлах статистически значимых различий между уровнем накопления маркера не выявлено (400 и 380 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $\rho = 0,77$) (рис. 2). В опухоли на данном сроке маркера клеток донора статистически значимо меньше по сравнению с околоопухолевыми лимфатическими узлами (140 и 382,8 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $\rho < 0,01$) (рис. 2, В).

Через 2 нед. после трансплантации ККМ (объем опухоли $\sim 1,4 \text{ см}^3$) клетки детектировались в костном мозге, опухолевой ткани, печени, селезенке, легких, сердце, околоопухолевых лимфоузлах и крови. Максимальное количество маркера трансплантированных клеток определялось в костном мозге реципиента (2280 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $\rho < 0,01$), также отмечается высокое накопление клеток в опухолевой ткани по сравнению с остальными исследуемыми органами (560 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента, $\rho < 0,01$) (рис. 2, Г).

Итак, через 1 ч после трансплантации максимальное количество клеток определяется в крови и в костном мозге реципиента-опухоленосителя, через 3 сут. Y-позитивные клетки из крови мигрируют в периферические органы, максимальное количество трансплантированных клеток определяется в печени. Через 7 и 14 сут. большинство трансплантированных клеток находится в костном мозге. Необходимо отметить, что в опухолевой ткани показано постепенное увеличение количества Y-позитивных клеток (рис. 2).

Влияние опухолевого роста на миграционную активность и распределение трансплантированных кле-

ток костного мозга оценивали путем сравнения количественного соотношения мигрировавших клеток в органах интактного реципиента и реципиента-опухоленосителя меланомы В16.

Количество трансплантированных ККМ в селезенке интактного реципиента через 1 ч после введения значительно выше по сравнению с количеством трансплантированных клеток в селезенке реципиента-опухоленосителя (1000 и 80 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $\rho = 0,00003$). На 3-и сут. трансплантированные клетки выходят из селезенки интактного реципиента, тогда как у опухоленосителя количество мигрировавших клеток в селезенке возрастает (135 и 728 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $\rho = < 0,01$). Через 1 нед. количество Y-позитивных клеток в селезенке интактного животного достигает своего максимума и значительно превышает показатель миграции Y-позитивных клеток в селезенку при опухолевом росте (4424 и 947 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $\rho = < 0,01$). Через 2 нед. количество трансплантированных ККМ в селезенке интактного реципиента падает и ρ_{YFBVO} не отличается от показателя миграции на опухолевой модели (53 и 15 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно) (рис. 3).

Костный мозг реципиентов-опухоленосителей через 1 ч после трансплантации содержал статистически значимо больше Y-позитивных клеток по сравнению с таковым интактного реципиента (1213 и 529 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $\rho = 0,00002$). Через 3 сут. количество трансплантированных клеток в костном мозге реципиента-опухоленосителя снижается, в то время как в костном мозге интактного реципиента происходит постепенное накопление трансплантированных клеток (251 и 754 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $\rho = 0,0002$). Однако через 1 нед. после трансплантации происходит существенное повышение количества Y-позитивных клеток в костном мозге реципиента-опухоленосителя (5541 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента) и превышает количество трансплантированных клеток в костном мозге интактного реципиента (2193 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента). Через 2 нед. количество Y-позитивных клеток в костном мозге в норме и при опухолевом росте снижается, однако в костном мозге реципиента — опухоленосителя их значительно больше по сравнению с количеством трансплантированных клеток в костном мозге интактного реципиента (2309 и 42 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $\rho < 0,01$) (рис. 3).

Показано, что активность миграции в лимфатические узлы реципиентов двух групп в течение 7 сут. имеет схожую динамику. Однако на 14-е сут. количество ККМ в лимфоузлах интактного животного значительно возрастает (321 через 7 сут. и 3190 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента через 14 сут., p<0,01), тогда как при опухолевом росте лимфоузлы реципиента на 14-е сут. после трансплантации не содержали Y-позитивные клетки (рис. 3).

Различия в активности миграции в печень реципиентов двух групп отмечаются только в первые 3 сут. Через 1 ч после введения Y-позитивных клеток в печени интактных реципиентов значимо больше по сравнению с печенью реципиентов-опухоленосителей (847 и 74 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента соответственно, p<0,01). В течение 3-х сут. в печени интактных реципиентов значительно снижа-

ется количество Y-позитивных клеток (3 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента), тогда как при опухолевой нагрузке миграция трансплантированных клеток в печень увеличивается к 3-м сут. после трансплантации (1396 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента). В последующие 2 нед. печень реципиентов как в норме так и при опухолевом росте содержит единичные Y-позитивные клетки (рис. 3, Г).

В легких интактного реципиента через 3 сут. после трансплантации определяется статистически значимо большее количество трансплантированных ККМ по сравнению с легкими реципиента-опухоленосителя (66,6 и 4,1 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента соответственно, p = 0,00001). Однако в течение 2 нед. количество Y-позитивных клеток в легких реципиента-опухоленосителя возрастает. Через

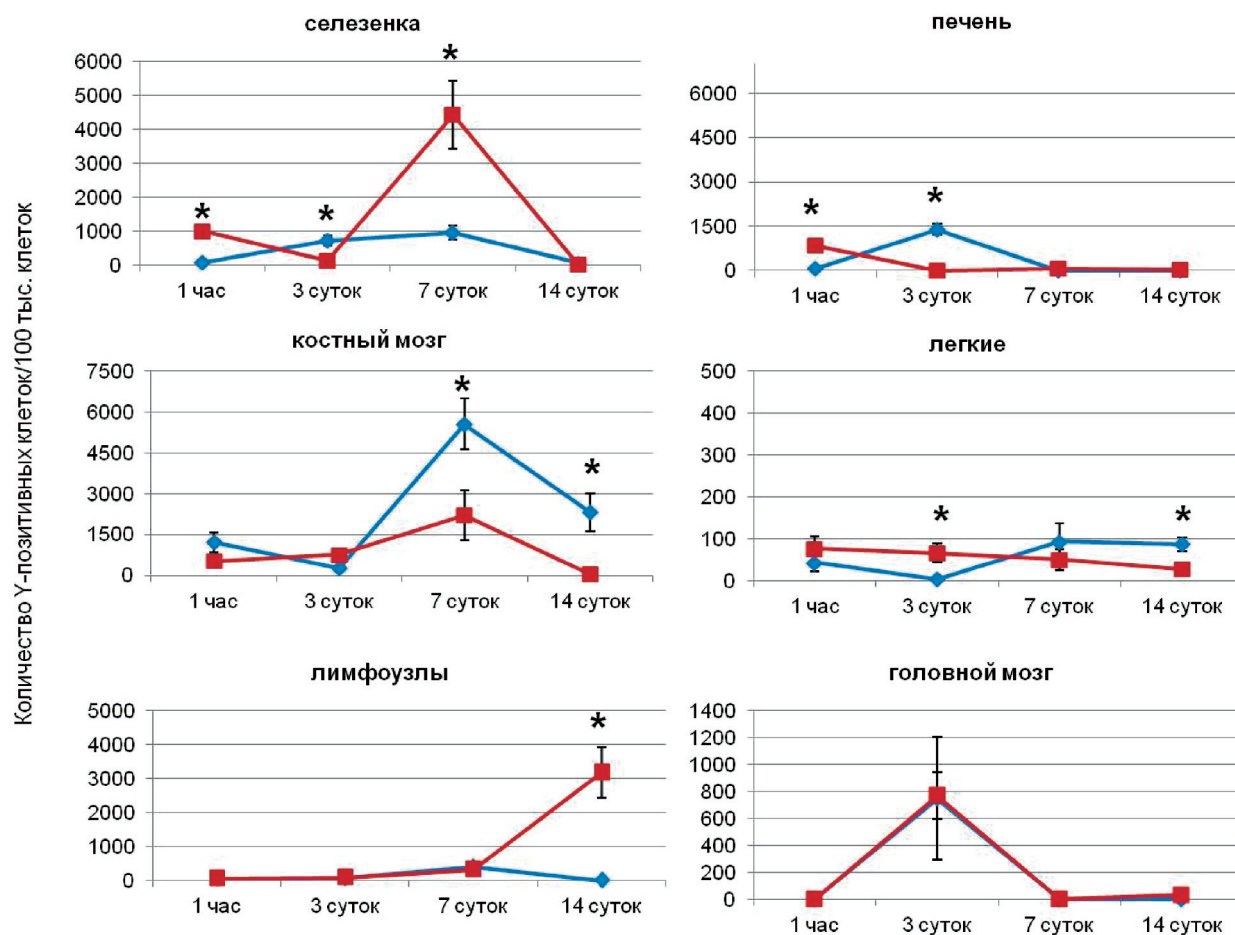


Рис. 3. Сравнительный анализ количественного распределения трансплантированных клеток костного мозга в норме и в условиях опухолевого роста методом ПЦР в режиме реального времени. В качестве реципиентов – интактные самки мышей линии С57 В1 (красные линии) и самки мышей С57В1-носители меланомы В16 (синие линии). Клетки костного мозга самца мышей С57В1 (содержащие Y-хромосому) внутривенно вводили 2 группам реципиента в одинаковой дозе. Через 1 ч, 3 сут., 7 сут., 14 сут. определяли количество трансплантированных клеток в органах самки – реципиента методом ПЦР в режиме реального времени. По оси абсцисс – время после трансплантации клеток костного мозга. По оси ординат – количество Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток органов самки – реципиента. Данные представлены как М±σ. * – p<0,01.

14 сут. после трансплантации в легких реципиента-опухоленосителя Y-позитивных клеток статистически значимо больше по сравнению с легкими интактного реципиента ($p = 0,0002$)

В сердце реципиентов-опухоленосителей определяется статистически значимо большее количество трансплантированных клеток по сравнению с интактными реципиентами через 3 сут. (263,2 и 84,9 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $p = 0,00002$) и через 14 сут. (115,5 и 40 Y-позитивных клеток/ 10×10^4 клеток реципиента соответственно, $p = 0,0007$) (рис. 3).

Активность миграции трансплантированных ККМ в головной мозг не зависит от опухолевого роста, поскольку количество мигрировавших Y-позитивных клеток не отличалось в головном мозге интактного реципиента и реципиента-опухоленосителя (рис. 3).

Наиболее значимые отличия миграции и распределения трансплантированных клеток костного мозга показаны в костном мозге, селезенке, лимфатических узлах, печени и сердце. При опухолевом росте преобладает миграция трансплантированных клеток в костный мозг через 1 ч, 7 и 14 сут., причем максимальные показатели количества трансплантированных клеток

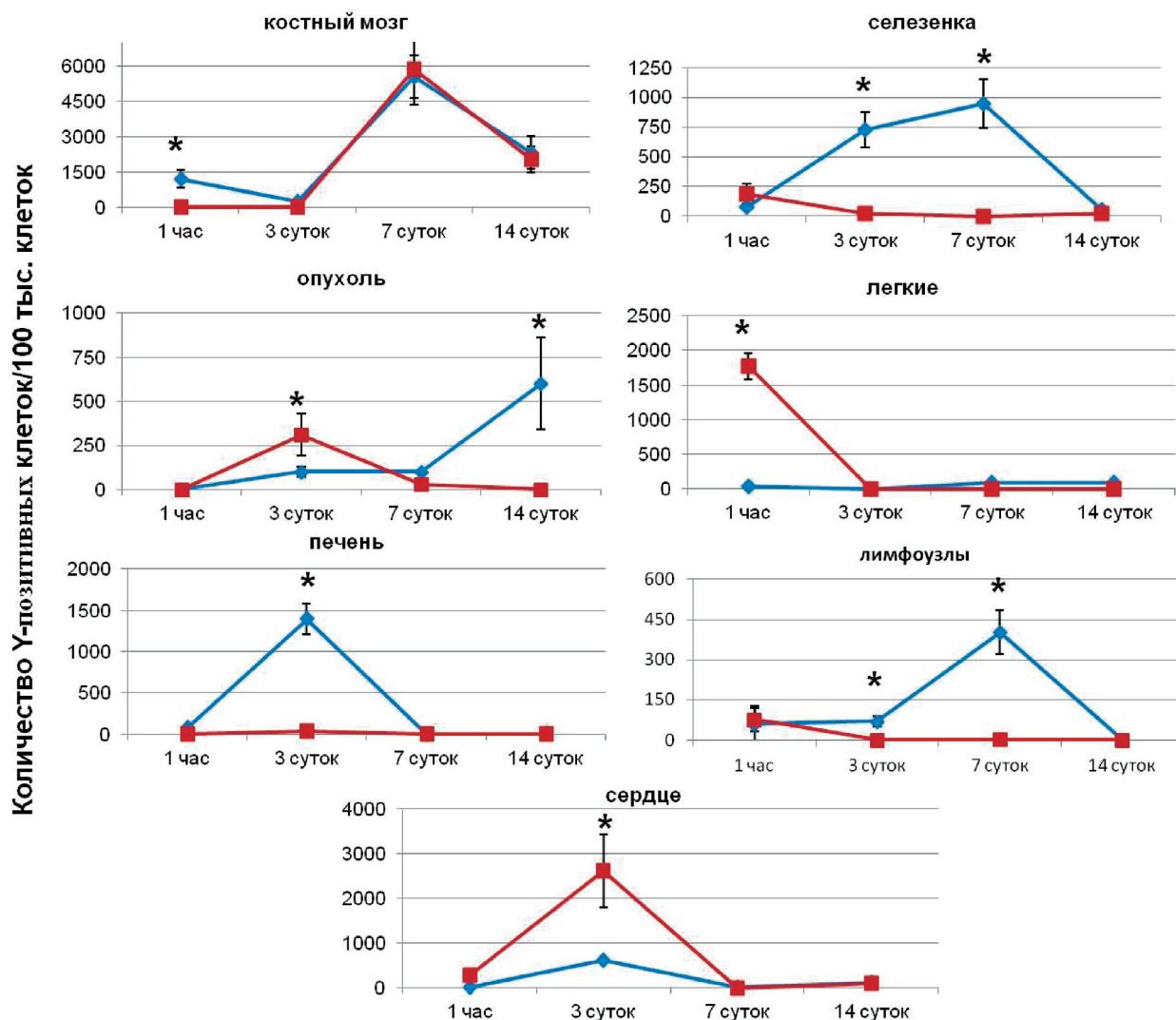


Рис. 4. Сравнительный анализ количественного распределения трансплантированных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга и неразделенной популяции костного мозга в условиях опухолевого роста методом ПЦР в режиме реального времени.

В качестве реципиентов: самки мышей С57В1 – носители меланомы В16.

Не разделенную популяцию костного мозга (синие линии) и МСК (красные линии) самца мышей С57В1 (содержащие Y-хромосому) внутривенно вводили самкам-реципиентам в одинаковой дозе. Через 1 ч, 3 сут., 7 сут., 14 сут. определяли количество трансплантированных клеток в органах самки – реципиента методом ПЦР в режиме реального времени. По оси X – время после трансплантации клеток. По оси ординат – количество копий маркерного гена Zfy клеток самца на 100 тыс. клеток органов самки – реципиента. Данные представлены как М±σ. * – $p < 0,01$.

отмечаются через 7 сут. после трансплантации. В организме интактного реципиента аналогичная динамика распределения трансплантированных клеток отмечается в селезенке. Обнаружено, что опухолевый рост не влияет на миграционную активность трансплантированных ККМ в головной мозг.

Было показано, что через 1 ч после трансплантации Y-позитивные ККМ определяются в основном в крови реципиента-опухоленосителя (рис. 2). В свою очередь, основная масса трансплантированных МСК на данном сроке обнаружена в легких реципиента (рис. 2, 4, 5). Также через 1 ч после трансплантации отмечается отличие миграционной активности ККМ и МСК в костный мозг и сердце реципиента (рис. 2, 4, 5). В костный мозг интенсивнее мигрирует неразделенная фракция костного мозга (1213 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента), тогда как трансплантированные МСК в костном мозге не обнаружены (рис. 2, 4). Показана более интенсивная миграция МСК в сердце реципиента по сравнению с ККМ (293 и 33 Y-позитивных клеток/10x10⁴ клеток реципиента соответственно, p = 0,0003). В остальных исследуемых органах через 1 ч после трансплантации различий в количестве мигрировавших ККМ и МСК не определялось (рис. 4).

Через 3 сут. после трансплантации ККМ мигрируют в печень и селезенку реципиента-опухоленосителя (рис. 2, 4), тогда как максимальный показатель

миграции МСК обнаружен в сердце и опухоли реципиента (рис. 4).

На 7-е сут. после трансплантации (опухоль достигает размеров ~0,9 см³) как ККМ, так и МСК активно мигрируют в костный мозг реципиента-опухоленосителя (рис. 2, 4). Отмечается более высокий показатель миграции ККМ в опухоль, селезенку, легкие, лимфоузлы и околоопухолевые лимфоузлы по сравнению с МСК (рис. 4).

Через 2 нед. (опухоль достигает размеров ~2 см³), обнаружено большее количество трансплантированных ККМ в опухоли и легких реципиентов-опухоленосителей. Y-позитивные МСК в основном определяются в костном мозге и околоопухолевых лимфоузлах (рис. 4).

Таким образом, трансплантированные ККМ и МСК КМ имеют различную динамику распределения по организму реципиента-опухоленосителя, однако в костном мозге через 7 и 14 сут. определялось одинаковое количество Y-позитивных ККМ и МСК

В ткани опухоли Y-позитивные клетки определяются только через 3 сут. после трансплантации, причем количество трансплантированных МСК больше по сравнению с количеством трансплантированных ККМ. Однако через 2 нед. МСК не определяются в ткани опухоли, а количество ККМ возрастает по сравнению с начальными временными точками.

Механизмы миграции клеток, связаны с цитокинами, хемокинами и их клеточными рецепторами.

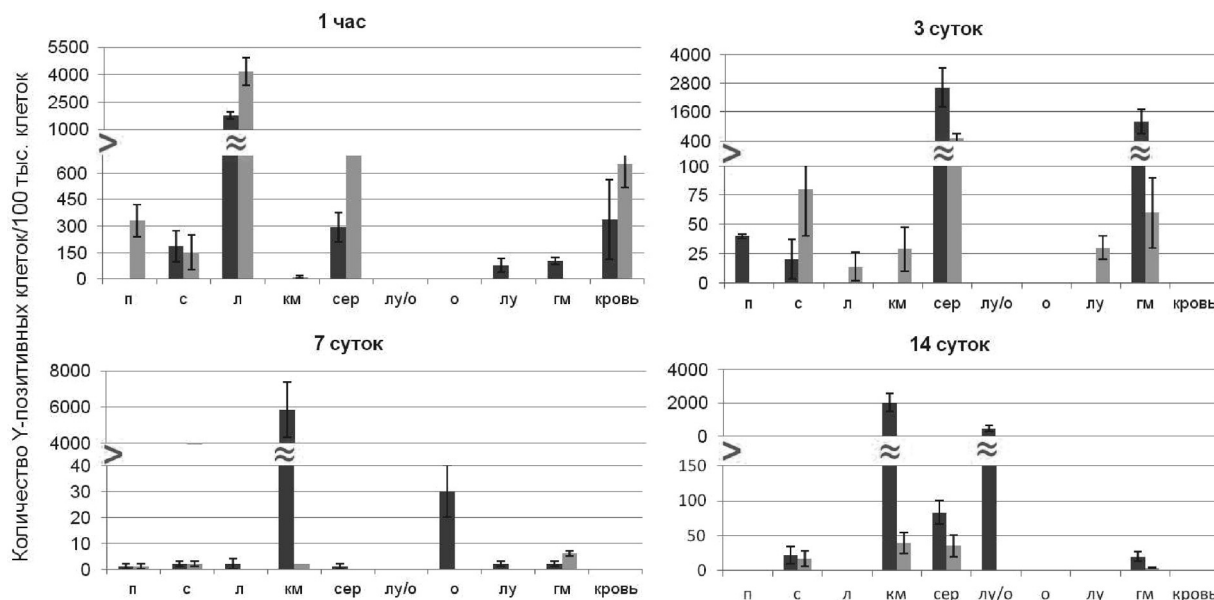


Рис. 5. Сравнительный анализ количественного распределения трансплантированных МСК в органах реципиента-опухоленосителя и интактного реципиента методом ПЦР в режиме реального времени.

По оси ординат — количество Y-позитивных клеток на 100 тыс. клеток органов самки-реципиента. Данные представлены как M ± σ. Сокращения: п — печень, с — селезенка, л — легкие, км — костный мозг, сер — сердце, лу/о — околоопухолевые лимфотические узлы, лу — лимфатические узлы, гм — головной мозг, о — опухоль, кр — кровь.

Важным цитокином, регулирующим миграцию клеток служит фактор стромальных клеток-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1), решающую роль в синтезе которого играет тканевая гипоксия [6]. Блокада индуцируемого гипоксией фактора 1 (HIF-1) приводит к снижению синтеза SDF-1 и снижению адгезивной способности стволовых клеток в культуре. Взаимодействие хемокина SDF-1 и рецептора CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) является ключевым в регуляции хоминга и миграции стволовых клеток, оно контролирует прикрепление, заселение костного мозга стволовыми клетками, развитие и выход зрелых клеток костного мозга в циркуляцию крови. Активация SDF-1/CXCR4 происходит в ответ на воспалительные, хемотаксические стимулы, такие, как ИЛ-6, выделяющиеся в очаге воспаления, инфаркте, инсульте, травме, опухоли, при образовании новых сосудов, для рекрутирования эндотелиальных клеток предшественников. Миграционная активность в печень, легкие, кости и другие нелимфоидные органы, вероятно, также связана с высокой экспрессией в данных органах хемокина SDF1.

Миграция лимфоцитов из кровяного русла во вторичные лимфоидные ткани (лимфатические узлы или Пейеровы бляшки) происходит при взаимодействии хоминг-рецепторов с сосудистыми адресинами на поверхности клеток высокого эндотелия в этих тканях [7]. Как видно из полученных результатов, процессы миграции клеток-предшественников костного мозга тесно связаны с их последующей пролиферацией и дифференцировкой. Так, например, увеличение количества маркера в органах через 1 и 24 ч больше объяснимы именно миграцией и перераспределением клеток, а через 1 и 3 мес., вероятно, больше свидетельствуют о пластичности клеток, пролиферации и дифференцировке трансплантированных клеток в органах. Рядом авторов показано, что при внутривенной трансплантации МСК уже в первые часы после трансплантации обнаруживаются практически во всех органах, однако через 2 сут. количество введенных клеток в организме реципиента уменьшается [8]. В нашем исследовании обнаружено, что клетки костного мозга мигрируют во все органы и ткани, в том числе и в головной мозг, причем уровень определяемого маркера клеток донорского происхождения постепенно увеличивается, что может свидетельствовать о пролиферации и дифференцировке трансплантируемых клеток. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что мезенхимальные клетки костного мозга обладают способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и мигрировать от места введения к различным областям головного мозга [9].

Трансплантированные клетки не только мигрируют и интегрируются в ткани, но и химеризируют их. Предполагается, что понятие дифференцировки трансплантированных стволовых клеток может подразумевать дифференцировку, трансдифференцировку, клеточное слияние [10], перенос поверхностных антигенов (трогоцитоз) [11]. Клеточное слияние подразумевает слияние клеточных мембран, цитоплазм и ядер, в результате чего клетки содержат хромосомы и клеток хозяина, и трансплантированных клеток [10]. Во время трогоцитоза происходит перенос только поверхностных антигенов, без слияния цитоплазм и ядер. Трансдифференцировка заключается в способности дифференцированных клеток изменять свой фенотип и дифференцироваться в другой клеточный тип без дедифференцировки [12].

Данные о влиянии клеток костного мозга на опухолевый рост противоречивы. Одни авторы утверждают, что клетки костномозгового происхождения стимулируют рост опухоли, в основном за счет участия в формировании стромы опухоли, неоангиогенеза, стимуляции метастазирования [13], установления иммунологической толерантности [14]. Результаты исследования других авторов свидетельствуют об ингибирующем влиянии клеток костного мозга на туморогенез [15]. Очевидно, это объясняется тем, что костный мозг содержит различные популяции клеток, которые обладают противоопухолевой активностью. Для исследования влияния опухолевого роста на миграционную активность клеток костного мозга мы сравнили количественное соотношение мигрировавших клеток в органах интактного реципиента и реципиента-носителя меланомы В16. Через 1 ч после введения клеток (3 сут. после прививки опухоли) опухоль еще не сформирована. Через 7 сут. после введения клеток (11 сут. после прививки опухоли) опухоль видна макроскопически, размер опухоли около 0,9 см³. Через 14 сут. размер опухоли достигает 2 см³, видны очаги некроза опухолевой ткани.

Наиболее значимые отличия миграции и распределения трансплантированных клеток обнаружены в костном мозге, селезенке и лимфатических узлах. При опухолевом росте преобладает миграция трансплантированных клеток в костный мозг, тогда как в нормальных условиях миграционная активность выше в селезенку реципиента.

Предполагается, что накопление раковых клеток в костном мозге является основополагающим фактором метастазирования опухоли, такие клетки обозначаются диссеминированными опухолевыми клетками [16]. Возможно, интенсивная миграция трансплантированных клеток в костный мозг реципиентов-носителей меланомы В16 опосредована хемоаттрактантами диссеминированных опухолевых клеток. Существует

также теория, согласно которой метастазирование опухолевых клеток происходит путем слияния костно-мозговых лимфоидных клеток с опухолевыми клетками, такие гибридные клетки обладают способностью к направленной миграции и неконтролируемому росту [17].

В работе было оценено влияние опухолевого роста на миграцию и распределение неразделенной популяции клеток костного мозга введенных внутривенно. Показано, что у мышей реципиентов-носителей меланомы B16 по мере роста опухоли, введенные клетки аккумулируются в костном мозге и опухолевой ткани, тогда как у интактных животных-реципиентов максимальное количество Y-позитивных клеток через 14 сут. после трансплантации детектируется в лимфатических узлах. Также было оценено влияние опухолевого роста на миграцию и распределение трансплантированных МСК костного мозга. Показано, что по мере роста опухоли, введенные МСК накапливаются в костном мозге реципиента-опухоленосителя и в околоопухолевых лимфатических узлах. Таким образом, сравнительное исследование распределения трансплантированных ККМ и МСК в организме реципиента-опухоленосителя показало, что опухолевый рост стимулирует миграцию как ККМ, так и МСК в костный мозг реципиента-опухоленосителя.

Заключение

Клетки костного мозга, позитивные по Y-хромосоме, мигрируют как в лимфоидные (лимфатические узлы, селезенку, костный мозг), так и в нелимфоидные органы (печень, сердце, головной мозг, кожу) сингенных реципиентов и определяются в течение 1 мес. наблюдения.

Помимо миграции клеток из костного мозга в другие органы, существует и обратный путь миграции клеток из кровотока в костный мозг. Миграция созревающих в костном мозге клеток с различной стадией дифференцировки и пластичности носит непрерывный характер и является динамическим процессом.

Развитие у интактных мышей линии C57Bl/6 меланомы B16 стимулирует процессы миграции трансплантированных клеток костного мозга и мезенхимальных стромальных клеток в костный мозг.

Установлено, что при опухолевом росте усилена миграция трансплантированных клеток костного мозга, в том числе и популяции МСК, в костный мозг. На ранней стадии формирования опухоли миграционная активность МСК в опухоль выше по сравнению с неразделенной фракцией костного мозга. На поздних стадиях формирования опухоли неразделенная популяция клеток костного мозга интенсивнее мигри-

рует в опухоль по сравнению с отдельной популяцией МСК.

Таким образом, исследование свойства клеток костного мозга — миграции имеет фундаментальное значение, а изучение особенностей миграции разных популяций клеток костного мозга, в норме и при наличии опухолевого процесса у реципиента является не только актуальной фундаментальной задачей, но и задачей имеющей прикладное значение. В настоящее время активно обсуждается возможность использования МСК костного мозга для таргетной терапии опухолевых заболеваний, так как миграция МСК в опухолевую ткань может быть использована для эффективной доставки противоопухолевых препаратов.

References

1. Solovieva A.O., Zubareva K.E., Poveshchenko A.F., Nechaeva E.A., Kononov V.I. Methods of cells labeling for visualization in vivo. *Geny I kletki*. 2013; 4: 33-8. (in Russian)
2. Solovieva A.O., Poveshchenko A.F., Poveshchenko O.V., Zubareva K.E., Miller T.V., Kononov V.I. Comparative study of migration and distribution of donor cells in the bone marrow and spleen lymphoid and non-lymphoid organs at different times after transplantation in vivo in mice CBA. *Sibirskiy nauchnyy Meditsinskiy zhurnal*. 2013; 33 (4): 35-1. (in Russian)
3. Poveshchenko A.F., Kononov V.I. Mechanisms and factors of angiogenesis. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2010; 41 (2): 68-9. (in Russian)
4. Jolkowska J., Pieczonka A., Strabel T., Boruczowski D., Wachowiak J., Bader P., Witt M. Hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation: a comparison of quantitative analysis by automated DNA sizing and fluorescent in situ hybridization. *BMC Blood Disord*. 2005; 5(1):1-6.
5. Pang W. Role of muscle-derived cells in hematopoietic reconstitution of irradiated mice. *Blood*. 2000. 95. (3). 1106-110.
6. Hitchon C., Wong K., Ma G. et al. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2002; 46(10): 2587-97.
7. Tavassoli M., Hardy C.L., Aizawa S. et al. Molecular mechanism of hematopoietic stem cell binding to the supportive stroma. *Prog. Clin. Biol. Res*. 1990; 352: 87-5.
8. Li Z.H., Liao W., Cui X.L. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *Int. J. Med. Sci*. 2011; 8 (1): 74-3.
9. Kopen G.C., Prockop D.J., Phinney D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 10711-16.
10. Oren-Suissa M, Podbilewicz B. Cell fusion during development. *Trends Cell Biol*. 2007; 17: 537-46.
11. Yamanaka N., Wong C.G., Gertsenstein M. et al. Bone marrow transplantation results in human donor blood cells acquiring and displaying mouse recipient class I MHC and CD45 antigens on their surface [Electronic resource].

PLoS One. 2009; 4(12):8489. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2796175/>.

12. Rechavi O., Goldstein I., Kloog Y. Intercellular exchange of proteins: the immune cell habit of sharing. *FEBS Lett.* 2009; 583: 1792-99.

13. Zhang T., Lee Y.W., Rui Y.F. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 13:1-15.

14. Stockmann C., Schadendorf D., Klose R., Helfrich I. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling. *Front Oncol.* 2014; 4: 69.

15. Finnberg N.K., Hart L.S., Dolloff N.G., Zachary B., Rodgers Z., Dicker D.T., El-Deiry W.S. High-Resolution Imaging and Antitumor Effects of GFP Bone Marrow-Derived Cells Homing to Syngeneic Mouse Colon Tumors *Am. J. Pathol.* 2011; 179(5): 2169-76.

16. Bubnovskaya L, Kovelskaya A, Gumenyuk L, Disseminated tumor cells in bone marrow of gastric cancer patients: correlation with tumor hypoxia and clinical relevance. *J Oncol.* 2014; 2014:1-7.

17. Pawelek J.M. Fusion of bone marrow-derived cells with cancer cells: metastasis as a secondary disease in cancer. *Chin J Cancer.* 2014; Mar 5;33(3):133-9.

Сведения об авторах:

Соловьева Анастасия Олеговна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ, e-mail: solovey_ao@mail.ru

Зубарева Кристина Эдуардовна, мл. науч. сотр. лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ, e-mail: zubareva_kje@mail.ru

Грицьук Оксана Борисовна, канд. мед. наук, науч. сотр. НИИФФМ, e-mail: oks-gricik@yandex.ru

Шурлыгина Анна Вениаминовна, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. экспериментальной нейробиологии НИИФФМ, e-mail: anna_v_s@mail.ru

Стрункин Дмитрий Николаевич, канд. мед. наук, науч. сотр. НИИКЭЛ, e-mail: strunkind@mail.ru

Повещенко Ольга Владимировна, доктор мед. наук, зав. лаб. клеточных технологий НИИКЭЛ, e-mail: PoveshchenkoOV@yandex.ru

Коненков Владимир Иосифович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, директор НИИКЭЛ, e-mail: vikonenkov@gmail.com