

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ОПУХОЛИ МЕТОДАМИ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО БИОИМИДЖИНГА

УДК 575.1/2:611-018.82:612.419

Поступила 13.07.2012 г.

- © **А.В. Мелешина**, аспирант кафедры биомедицины¹;
Е.И. Черкасова, к.б.н., зав. лабораторией биоинженерии тканей¹;
Е.А. Сергеева, к.ф.-м.н., научный сотрудник²;
М.С. Клешнин, младший научный сотрудник²;
И.В. Турчин, к.ф.-м.н., зав. лабораторией биофотоники²;
Е.В. Киселева, к.б.н., научный сотрудник³;
Э.В. Даширмаев, к.б.н., научный сотрудник³;
М.В. Ширманова, к.б.н., научный сотрудник⁴;
С.А. Лукьянов, д.б.н., академик РАН, зав. лабораторией молекулярных технологий⁵;
 зав. лабораторией флюоресцентного биоимиджинга⁴;
Е.В. Загайнова, д.м.н., зам. директора по науке НИИ ПФМ⁴; зав. кафедрой биомедицины¹

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского —
 Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

²Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород, 603155, ул. Ульянова, 46;

³Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334, ул. Вавилова, 26;

⁴Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005,
 пл. Минина и Пожарского, 10/1;

⁵Институт биоорганической химии РАН им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,
 Москва, 179971, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Цель исследования — изучение патогенеза развития опухоли при взаимодействии с мезенхимными стволовыми клетками, трансфицированными геном красного флюоресцентного белка, с применением метода прижизненного биоимиджинга.

Материалы и методы. Использовали мезенхимные стволовые клетки из клеток стромы жировой ткани (СКЖТ), выделенных из кусочков жировой ткани человека. СКЖТ были трансфицированы геном красного флюоресцентного белка Turbo FP635 (ЗАО «Евроген», Россия) методом лентивирусной трансфекции. Опухоли были привиты мышам линии *nude* подкожной инъекцией опухолевых клеток Hela Kyoto (рак шейки матки). Меченные флюоресцентным белком СКЖТ вводили животным на разных стадиях канцерогенеза (0 и 8 дней после прививки опухолевой культуры) различными способами: локально — в область формирования опухолевого узла и системно — внутривенно в хвостовую вену. Были сформированы следующие группы животных: 1-я — ранняя стадия канцерогенеза (сразу после инъекции) и системное введение СКЖТ; 2-я — ранняя стадия канцерогенеза и локальное введение СКЖТ; 3-я — стадия сформированной опухоли (8 дней) и системное введение СКЖТ. Контролем служили животные с привитой опухолью без введения стволовых клеток.

Результаты. СКЖТ, выделенные и охарактеризованные с помощью иммуноцитохимического анализа, имели фенотип мезенхимных стволовых клеток (экспрессировали CD105, CD49d, STRO-1) и дифференцировались в условиях *in vitro* в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях при культивировании в индукционных средах. Эффективность трансфекции СКЖТ геном красного флюоресцентного белка Turbo FP635 составила 75%. Показано, что исследуемый тип стволовых клеток — СКЖТ, меченных красным флюоресцентным белком Turbo FP635, при системном введении способен мигрировать в селезенку, а при системном и местном введениях — в костный мозг, легкие и ткани опухоли реципиента. Методы флюоресцентного биоимиджинга и лазерной сканирующей микроскопии могут быть использованы для изучения взаимодействия опухоли и мезенхиальных стволовых клеток. Они эффективно дополняют друг друга в получении общих знаний о распределении мигрирующих флюоресцентных клеток.

Для контактов: Мелешина Александра Викторовна, тел. моб. +7 920-035-55-09; e-mail: almele@ya.ru

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки (МСК); клетки стромы жировой ткани (СКЖТ); красный флюоресцентный белок Turbo FP635; опухоль Hela Kyoto; прижизненный биоимиджинг; лазерная сканирующая микроскопия; трансфекция; канцерогенез.

English

The Study of the Interaction of Mesenchymal Stem Cells and the Tumour Using the Methods of Fluorescent Bioimaging

A.V. Meleshina, Postgraduate, the Department of Biomedicine¹;
E.I. Cherkasova, PhD, Head of Tissue Biological Engineering Laboratory¹;
E.A. Sergeeva, PhD, Research Worker²;
M.S. Kleshnin, Junior Research Worker²;
I.V. Turchin, PhD, Head of Biophotonics Laboratory²;
E.V. Kiseleva, PhD, Research Worker³;
E.V. Dashinimaev, PhD, Research Worker³;
M.V. Shirmanova, PhD, Research Worker⁴;
S.A. Lukyanov, D.Bio.Sc., Academician of Russian Academy of Sciences, Head of Molecular Technologies Laboratory⁵; Head of Fluorescence Bioimaging Laboratory⁴;
E.V. Zagaynova, D.Med.Sc., Deputy Director for Science of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine⁴; Head of the Department of Biomedicine¹

¹Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky — National Research University, Gagarin Avenue, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

²Institute of Applied Physics of Russian Academy of Sciences, Ul'yanova St., 46, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603155;

³Institute of Developmental Biology named after N.K. Koltsova of Russian Academy of Sciences, Vavilova St., 26, Moscow, Russian Federation, 119334;

⁴Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

⁵Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya St., 16/10, Moscow, Russian Federation, 179971

The aim of the investigation is to study the pathogenesis of tumour development when interacting with mesenchymal stem cells transfected by a gene of red fluorescent protein using the method of vital bioimaging.

Materials and Methods. There were used adipose-derived adult stem (ADAS) cells taken from human adipose tissue. ADAS were transfected by a gene of red fluorescent protein Turbo FP635 (Close Joint Stock Company "Eurogene", Russia) by the method of lentiviral transfection. Tumours were implanted to nude mice by subcutaneous injection of Hela Kyoto tumour cells (cervical cancer). ADAS labeled by fluorescent protein were injected to animals at different stages of carcinogenesis (0 and 8 days after tumour culture injection) by various ways: locally — in the tumour node forming region, and systemically — intravenously, in caudal vein. There were formed the following groups of animals: 1st group — an early stage of carcinogenesis (immediately after the injection) and systemic injection of ADAS; 2nd group — an early stage of carcinogenesis and local injection of ADAS; 3rd group — the stage of developed tumour (8 days) and systemic injection of ADAS. The control group consisted of the animals with induced tumour without stem cells injection.

Results. ADAS isolated and characterized with the help of immunocytochemical analysis had the phenotype of mesenchymal stem cells (there were expressed CD105, CD49d, STRO-1) and were differentiated *in vitro* in adipogenic, osteogenic, and chondrogenic approaches in induction media cultivation. The efficiency of transfection of ADAS by red fluorescent protein Turbo FP635 was 75%. The stem cells under study — ADAS labeled by red fluorescent protein Turbo FP635 in systemic injection were shown to be able to migrate in spleen, and in systemic and local injection — in bone marrow, lungs, and recipient's tumour tissues. The methods of fluorescent bioimaging and laser scanning microscopy can be used to study the interaction between the tumour and mesenchymal stem cells. They effectively complement each other in gaining general knowledge of the distribution of migratory fluorescent cells.

Key words: mesenchymal stem cells (MSC); adipose-derived adult stem (ADAS) cells; red fluorescent protein Turbo FP635; tumour Hela Kyoto; vital bioimaging; laser scanning microscopy; transfection; carcinogenesis.

В настоящее время изучение роли стволовых клеток (СК) в туморогенезе идет по двум направлениям: фундаментальная наука исследует клеточную пластичность и генетические механизмы, лежащие в основе возникновения и развития раковых заболеваний, прикладная — возможности использования СК различного происхождения для клеточной терапии при лечении и профилактике онкологических заболеваний.

При изучении различных экспериментальных моделей «опухоль—стволовая клетка» установлено, что СК способны спонтанно трансформироваться в злокачественные клетки [1] и поддерживать развитие уже существующих опухолей [2, 3]. В исследованиях на животных (*in vivo*) [4] показано, что СК способствуют опухолевому росту и активно участвуют в неоангиогенезе опухоли; в создании ниши для поддержа-

ния роста и жизнедеятельности опухолевых клеток; в модулировании иммунного ответа организма для снижения толерантности к неоплазии; в образовании метастазов [4].

С другой стороны, данные исследований *in vitro* [5] свидетельствуют, что СК также способны негативно воздействовать на рост опухолевых клеток в культуре, а именно: снижать уровень пролиферации опухолевых клеток; участвовать в апоптозе опухолевых клеток; ингибировать инвазию опухолевых клеток.

Таким образом, роль СК различного происхождения (гемопозитических, стромальных, тканеспецифических, мезенхимных) в онкогенезе остается предметом активных исследований. Новые знания важны как для понимания механизмов поддержания неопластического роста, так и для поиска новых подходов к терапии опухолей.

Мезенхимные СК являются предшественниками клеток тканей мезенхимального происхождения и обладают уникальными иммунными и проангиогенными свойствами. Клетки с характеристиками мезенхимных СК помимо костного мозга найдены во многих органах и тканях взрослого организма: скелетных мышцах, стенках сосудов, зубной пульпе, в жировой ткани и др. Мезенхимные СК жировой ткани (СКЖТ) не отличаются по морфологии, иммунному фенотипу и дифференцировочным потенциалам от таковых клеток костного мозга, однако при этом имеют несколько несомненных достоинств:

доступность и нетравматичность получения (источником являются липоаспиранты жировой ткани пациента);

простота введения и поддержания в культуре; широкий спектр возможных дифференцировок.

Для анализа участия СК в онкогенезе и наблюдения распределения их в организме реципиента, как правило, используются флюоресцентные методы биомедицинского имиджинга. Благодаря появлению ярких флюоресцирующих агентов, работающих в области «окна прозрачности» тканей, разработке технологий конъюгации и направленной доставки флюорофора, а также появлению компактных источников и высокочувствительных приемников оптического излучения методы флюоресцентного биоимиджинга помогли совершить настоящий прорыв в исследовании многих биологических процессов [6–8]. Большинство методов флюоресцентного биоимиджинга основаны на экзогенном введении флюорофора (или его предшественника) в организм (клетку) и обнаружении флюоресценции маркированных объектов в естественном окружении. В качестве маркеров (генетических меток) наибольший интерес представляет использование флюоресцентных (GFP-подобных) белков различных групп, гены которых внедряются в исследуемые клетки (раковых линий, мезенхимных СК), что позволяет отслеживать местоположение маркированных клеток и их продуктов, а также происходящие с ними изменения [9].

Среди методов флюоресцентного биоимиджинга на первый план выходят наблюдения *in vivo* на уровне организма, которые открывают возможности обозреть

биологический объект в его целостности, а также продолжительно изучать функции и процессы на одном животном, учитывая индивидуальные особенности. Наиболее простой реализацией прижизненного флюоресцентного имиджинга на уровне организма является поверхностный флюоресцентный имиджинг, который дает возможность оперативно (1–2 с) оценить размеры флюоресцирующей области, находящейся вблизи поверхности исследуемого биологического объекта. Использование высокочувствительных приемников позволяет обнаруживать также глубинную флюоресценцию, при этом изображение глубинных источников флюоресценции существенно размывается из-за сильного рассеяния света биотканями.

Цель исследования. В рамках данной работы нами решались следующие задачи:

1) выделение, изучение и трансфекция красным флюоресцентным белком стромальных стволовых клеток жировой ткани;

2) изучение патогенеза развития опухоли при взаимодействии со стволовыми клетками с применением метода прижизненного поверхностного флюоресцентного имиджинга;

3) исследование миграции меченых стволовых клеток в потенциальные ниши организма.

Материалы и методы.

Клеточная культура. Использовали стромальные клетки жировой ткани, выделенные из липоаспирантов или кусочков жировой ткани человека, полученных при абдоминальной пластической операции. СКЖТ выделяли по методу P.A. Zuk [10] с модификациями. Для выявления потенции данных клеток дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях СКЖТ культивировали в соответствующих индукционных средах [10, 11]. Для определения маркеров мезенхимных СК проведен иммуноцитохимический анализ [12]. СКЖТ были трансфицированы геном красного флюоресцентного белка Turbo FP635 (ЗАО «Евроген», Россия) методом лентивирусной трансфекции. Этот белок имеет максимум поглощения на длине волны 585 нм и пик эмиссии на длине волны 635 нм (рис. 1).

Опухолевые модели. Использованы самки бестимусных мышей линии *nude* в возрасте 6 мес массой 20 г. Опухоли были привиты в левое бедро подкожной инъекцией 5 млн опухолевых клеток Hela Kyoto (рак шейки матки), суспендированных в 100 мкл фосфатно-солевого буфера.

Дизайн эксперимента. Меченные флюоресцентным белком СКЖТ вводили животным на разных стадиях канцерогенеза: 0 дней (сразу после инъекции) и 8 дней после прививки опухолевой культуры. Клетки в количестве 1,5 млн были инъектированы животным различными способами: локально — в область формирования опухолевого узла и системно — внутривенно в хвостовую вену. Были сформированы следующие группы (каждая из трех животных):

1-я — ранняя стадия канцерогенеза (0 дней) и системное введение СКЖТ;

2-я — ранняя стадия канцерогенеза и локальное введение СКЖТ;

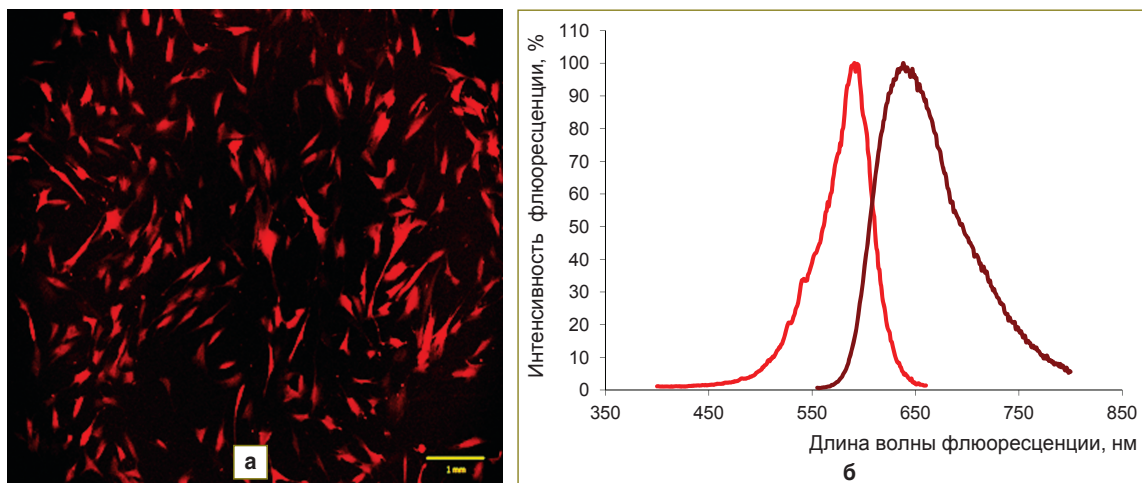


Рис. 1. СКЖТ, трансфицированные геном белка Turbo FP635: а — флуоресцентное изображение (флуоресцентный микроскоп Olympus X71, Япония/Германия; возбуждение флуоресценции — 545–580 нм, регистрация — 610–650 нм), $\times 10$; б — спектр возбуждения и эмиссии белка Turbo FP635 (www.evrogen.ru)

3-я — стадия сформированной опухоли (8 дней) и системное введение СКЖТ;

контрольная группа — с привитой опухолью без введения СК.

Введение меченых клеток на ранних стадиях канцерогенеза было основано на предположении, что СКЖТ могут служить источником создания неопластической сосудистой сети и включаться в стромальные структуры опухоли. Локальное введение СК использовали для моделирования взаимодействия тканеспецифичных СКЖТ с опухолевыми тканями в области формирования узла, системное — для моделирования взаимодействия опухоли с СКЖТ, мигрирующими из других ниш (например, костного мозга). На стадии сформированной опухоли (зрелые система кровообращения и строма) СКЖТ вводили для проверки влияния мезенхимных СК на дальнейшее развитие опухоли: усиление роста, инвазия и образование метастазов. Во всех трех группах животных предполагалось зафиксировать возможные дополнительные ниши пролиферации мезенхимных СК (костный мозг, селезенка). Также внимание уделяли органам возможного перераспределения СКЖТ в организме реципиента (легкие) и органам выведения продуктов распада (почки, печень). Опухолевый рост измеряли с помощью штангенциркуля через каждые 2–3 дня.

Расчет объема опухолей. Изменение объема опухолей рассчитывали по формуле Шрека в модификации И.С. Амосова с соавт. [13]:

$$V=0,5 \times [(a+b)/2]^3,$$

где V — объем опухоли, мм^3 ; a , b — разнонаправленные размеры опухоли, мм .

Мониторинг миграции меченых СКЖТ методом поверхностного флуоресцентного имиджинга. Для прижизненного мониторинга миграции флуоресцентно-меченых клеток в организме реципиента использовали установку для поверхностного флюо-

ресцентного имиджинга, разработанную в ИПФ РАН (Н. Новгород, Россия). В ходе измерений животное помещали в «черную» камеру и освещали широким световым пучком в узком спектральном диапазоне (для возбуждения флуоресценции белка Turbo FP635 использовали излучение на длине волны 585 нм с полосой 20 нм). Флуоресценция, возбужденная на поверхности животного, регистрировалась охлаждаемой CCD-камерой (ORCA II BT-512G, Hamamatsu Photonics K.K., Япония). Для разделения флуоресценции и зондирующего излучения на объектив CCD-камеры был установлен интерференционный фильтр (Chroma Technology Co., США) с полосой пропускания 628–672 нм. Время экспозиции CCD-камеры составляло 2 с. Перед проведением измерений животных наркотизировали внутрибрюшинной инъекцией Золетила (Vibrac, Франция) в концентрации 20 мг/мл и горизонтально фиксировали на подставке. Наблюдение флуоресценции белка проводили сразу после инъекции и в дальнейшем каждый день в течение 14 сут.

Наблюдение меченых СКЖТ методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (ЛСМ). Для анализа распределения меченых клеток в организме реципиента по органам *ex vivo* внутривенной инъекцией Золетила в концентрации 40 мг/мл животных выводили из эксперимента. Далее осуществляли забор образцов органов размером 3–4 мм и мазков костного мозга для исследования на установке ЛСМ (LSM 510 META 23, Carl Zeiss, Германия) на основе моторизованного инвертированного микроскопа (Axiovert 200M), оснащенной спектральным модулем для детектирования спектров эпифлуоресценции в видимом диапазоне с разрешением 10 нм. Конфокальные изображения были получены с помощью масляно-иммерсионного объектива с увеличением 63. Регистрация флуоресцентных изображений осуществлялась при однофотонном возбуждении аргонным лазером на длине волны 543 нм мощностью 12 мкВт на образце.

Результаты.

Характеристика СКЖТ. Данные клетки были выделены и охарактеризованы с помощью иммуноцитохимического анализа. Установлено, что СКЖТ имеют фенотип мезенхимных СК (экспрессируют CD105, CD49d, STRO-1) и способны дифференцироваться в условиях *in vitro* в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях при культивировании в индукционных средах. Для трансфекции использовались СКЖТ на ранних пассажах культивирования. Эффективность трансфекции СКЖТ геном красного флуоресцентного белка Turbo FP635 составила 75% (см. рис. 1, а).

Динамика изменений опухолей. По данным измерений линейного размера опухолей и флуоресцентного биоимиджинга в ходе работы не удалось выявить различий в динамике роста опухолей в экспериментальных моделях (как с введением, так и без введения стволовых клеток). По-видимому, экзогенное введение СКЖТ существенно не влияет на рост опухолей.

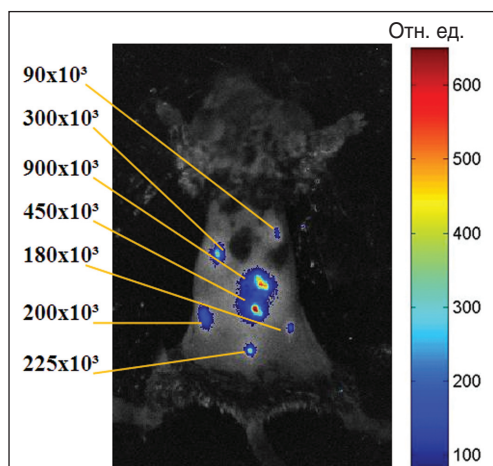


Рис. 2. Определение чувствительности установки поверхностного флуоресцентного биоимиджинга *in vivo* для визуализации СКЖТ, меченных белком Turbo FP635. Наблюдения различного количества меченых стволовых клеток, указаны места инъекций

Мониторинг миграции меченых СКЖТ методом поверхностного флуоресцентного имиджинга *in vivo*. С целью определения чувствительности установки для детекции меченых СК в предварительных экспериментах изучена флуоресценция подкожно инъецированных флуоресцентных клеток в разных концентрациях. Минимальное количество флуоресцентных СКЖТ, детектируемое установкой, составило 90 тыс. клеток (рис. 2).

В процессе наблюдения за животными с опухолями всех четырех групп с помощью установки для поверхностного флуоресцентного имиджинга получено 90 изображений.

В контрольной группе животных в процессе всего наблюдения роста опухолей регистрировали невысокую автофлуоресценцию тканей, обусловленную присутствием эндогенных порфириновых структур [14, 15], максимум возбуждения которых лежит в районе 400–500 нм, а спектр эмиссии имеет два пика — 635 и 690 нм. Фоновый сигнал на полученных изображениях связан с неидеальностью интерференционного фильтра, которая приводит к появлению артефактов, обусловленных неравномерным рассеянием зондирующего излучения на коже животного (пигментация и дефекты кожного покрова).

В 1-й группе (ранняя стадия онкогенеза и системное введение СКЖТ) флуоресценция меченых СКЖТ отмечена у всех животных в области селезенки, она была обнаружена на 9-й день и сохранялась до 14 сут (рис. 3). В опухолевых тканях у этих животных флуоресценции, соответствующей скоплению меченых СКЖТ, обнаружить не удалось.

Во 2-й группе животных (ранняя стадия онкогенеза и локальное введение СКЖТ) зарегистрирована флуоресценция места инъекции меченых СКЖТ, которая постепенно затухала и к 3-м суткам не визуализировалась совсем. Флуоресценции, соответствующей скоплению меченых СКЖТ в других тканях и органах животного, выявить не удалось. Время наблюдения составило 14 сут (рис. 4).

В 3-й группе животных (сформированная опухоль и системное введение СКЖТ) на 5-е сутки обнару-

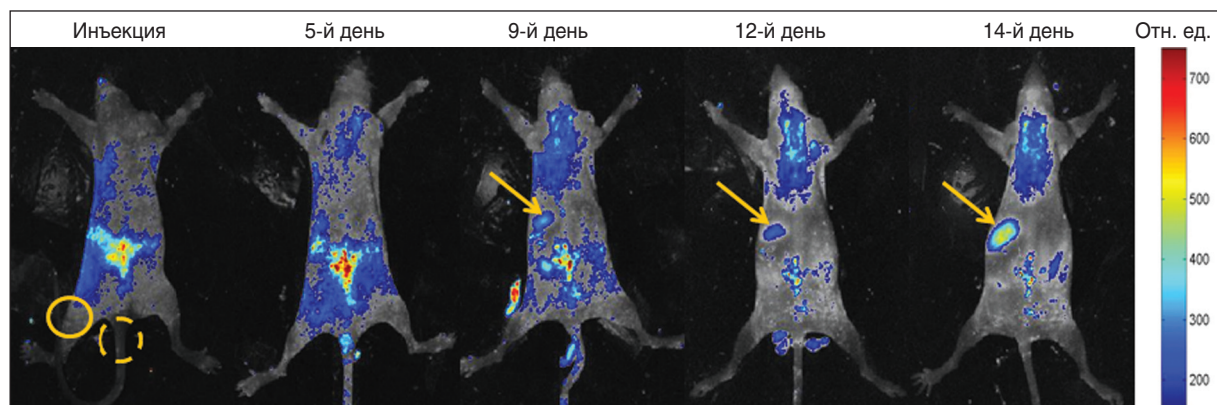


Рис. 3. Мониторинг миграции флуоресцентно-меченых СКЖТ методом флуоресцентного биоимиджинга у животных 1-й группы (ранняя стадия канцерогенеза, системное введение СКЖТ). Сплошной линией указано место инъекции опухолевых клеток, пунктирной — место инъекции флуоресцентно-меченых СКЖТ, стрелками — локализация флуоресцентно-меченых СКЖТ

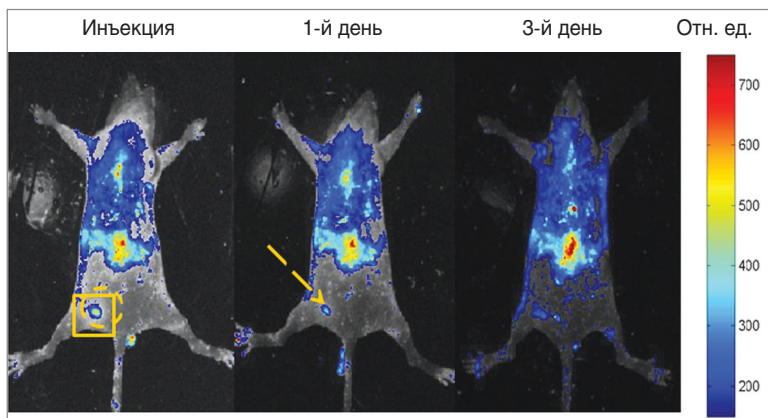


Рис. 4. Мониторинг миграции флуоресцентно-меченых СКЖТ методом флуоресцентного биоимиджинга у животных 2-й группы (ранняя стадия канцерогенеза, локальное введение СКЖТ). Квадратом указано место иъекции опухолевых клеток, пунктирной линией — место иъекции флуоресцентно-меченых СКЖТ, пунктирной стрелкой — флуоресценция места иъекции

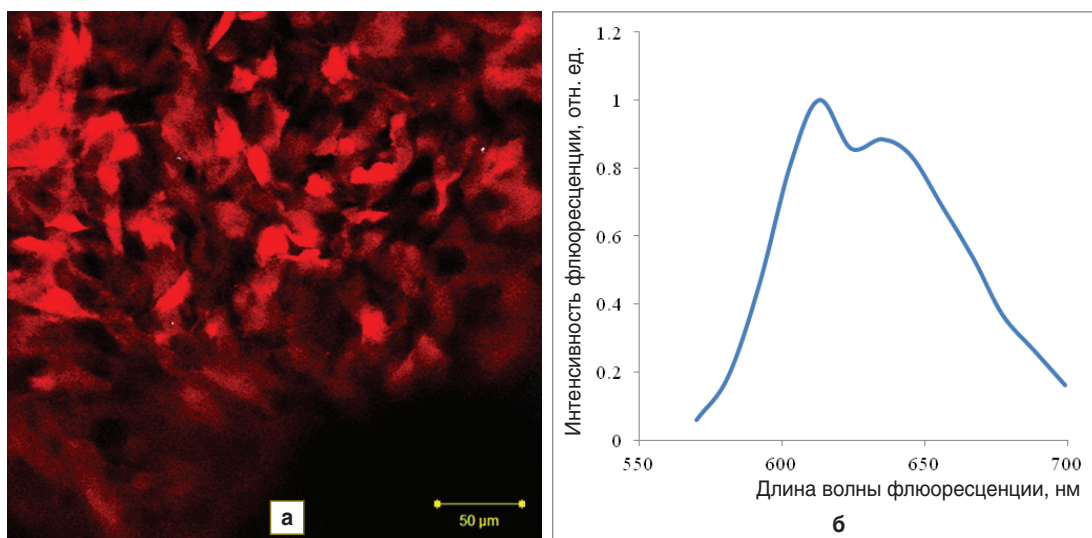


Рис. 5. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии СКЖТ, меченных белком Turbo FP635: а — флуоресцентное изображение клеток (возбуждение флуоресценции 543 нм, регистрация 650–710 нм); б — соответствующий им спектр флуоресценции в диапазоне 597–694 нм, x40

жена флуоресценция СКЖТ в области селезенки. Отмечалось нарастание флуоресценции в последующие дни (вплоть до 10-х суток) аналогично первой группе. Флуоресценции меченых СКЖТ в опухолевом узле и нишах не выявлено.

Мониторинг миграции меченых СКЖТ методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Для верификации результатов, полученных методом поверхностного флуоресцентного имиджинга, был использован метод ЛСМ. Для получения контрольного спектра белка Turbo FP635 на установке ЛСМ анализировали спектральные характеристики культуры СКЖТ, экспрессирующей этот белок, для дальнейшего сравнения со спектрами тканей исследуемых органов. В отличие от спектра очищенного плазмидного белка Turbo FP635 (см. рис. 1, б) полученный спектр клеток, трансфицированных генным вектором этого белка, имел два выраженных пика — на 613 и 635 нм (рис. 5). Появление дополнительного пика могло быть связано либо с мутацией белка при культивировании СКЖТ, либо с влиянием автофлуоресценции клеток.

В контрольной группе была оценена интенсивность

автофлуоресценции органов и тканей опухоли при возбуждении лазерным излучением на длине волны 543 нм. Установлено, что в коже, мышцах, сердце, мозге, легких, кишечнике и опухолевой ткани автофлуоресценция крайне низкая, однако в тканях селезенки, почек и печени она выражена (рис. 6), при этом спектральные характеристики тканей отличаются от спектра флуоресцентно-меченых СКЖТ и не имеют двух выраженных пиков на 613 нм и 635 нм.

В опытных группах, где животным вводили меченые СКЖТ, также отмечена выраженная автофлуоресценция тканей селезенки, почек и печени при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 543 нм, которая перекрывала флуоресценцию Turbo FP635. Однако у этих животных были обнаружены участки флуоресценции, соответствующей спектру клеток с белком Turbo FP635, в тканях с низким уровнем автофлуоресценции: опухоли, костном мозге и легких (рис. 7, а), что свидетельствовало о накоплении (пролиферации) меченых клеток в этих нишах.

В опухолевых тканях обнаружена флуоресценция меченых СКЖТ у животных 2-й группы (рис. 7, б). У животных других опытных групп флуоресценции, со-

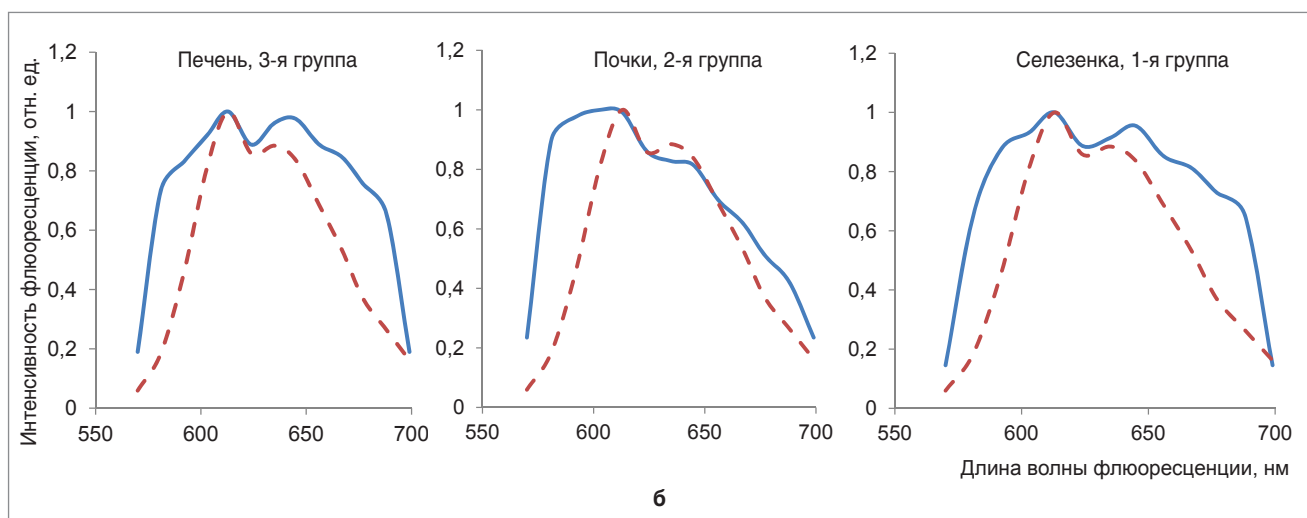
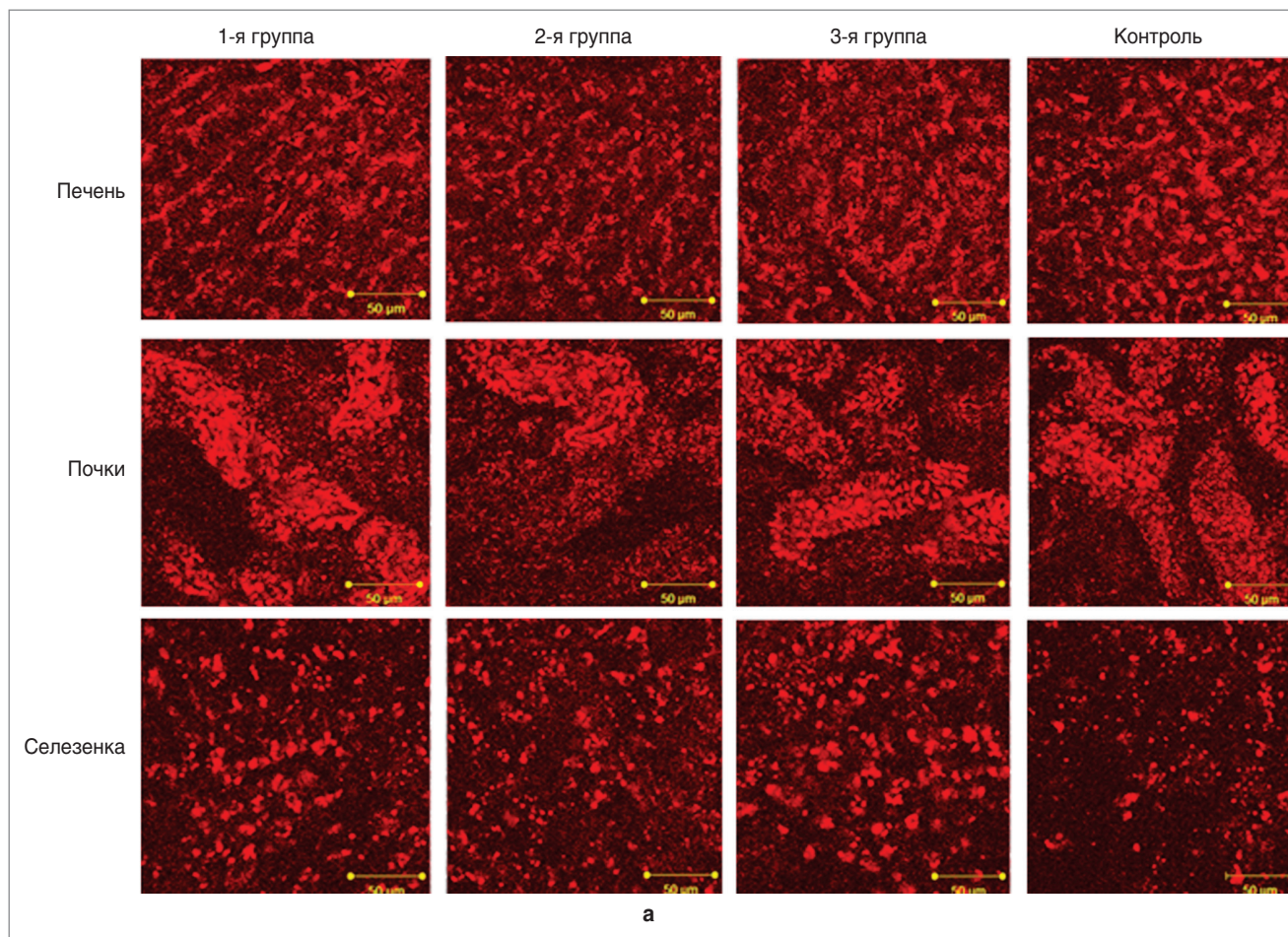


Рис. 6. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии тканей органов *ex vivo*: а — флуоресцентные изображения (возбуждение флуоресценции — 543 нм, регистрация — 650–710 нм); б — спектры флуоресценции тканей животных в диапазоне 597–694 нм из разных групп; сплошной линией указаны спектры флуоресценции тканей животных, пунктирной — спектр СКЖТ, меченных белком Turbo FP635

ответствующей скоплению меченых СКЖТ, в опухолевой ткани не выявлено.

В костном мозге обнаружены яркие скопления клеток со спектральными характеристиками меченых

СКЖТ у животных 2-й группы. Однако в костном мозге животных 1-й и 3-й групп наблюдалась только слабая автофлуоресценция.

В ткани легких найдены скопления клеток с флюо-

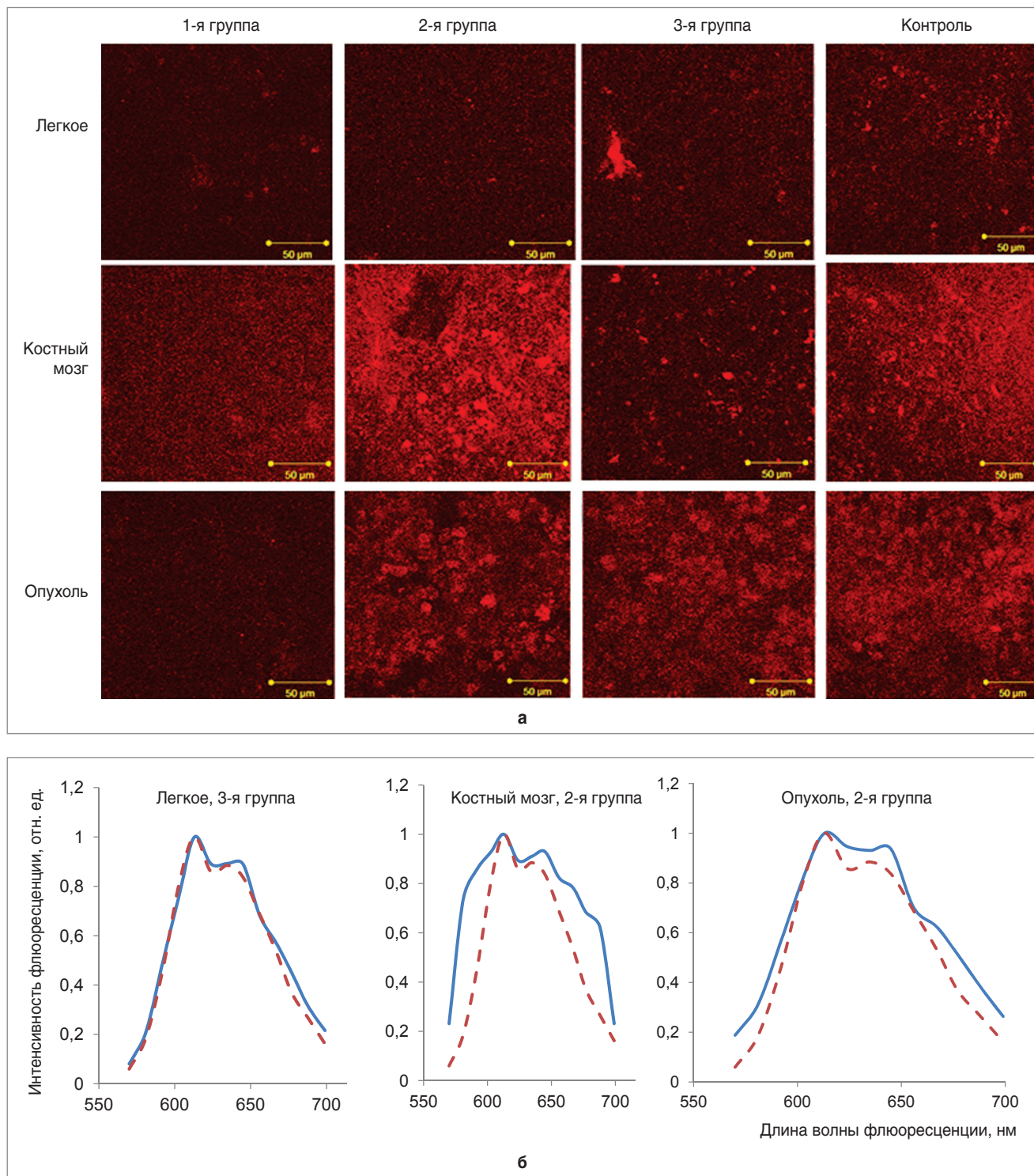


Рис. 7. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии тканей органов *ex vivo*: а — флюоресцентные изображения (возбуждение флюоресценции — 543 нм, регистрация — 650–710 нм); б — спектры флюоресценции тканей животных в диапазоне 597–694 нм из разных групп; сплошной линией указаны спектры флюоресценции тканей животных, пунктирной — спектр СКЖТ, меченных белком Turbo FP635

ресценцией, соответствующей искомому спектру, у животных 3-й группы, в остальных случаях отмечали лишь слабую автофлюоресценцию.

Обсуждение. Для изучения взаимодействия СКЖТ и опухоли, а также мониторинга миграции СКЖТ в ор-

ганизме реципиента были использованы два метода: поверхностный флюоресцентный имиджинг и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.

Методом прижизненного биоимиджинга у животных с локальным введением СКЖТ удалось наблюдать пе-

пераспределение меченых СКЖТ из зоны введения. У животных-опухоленосителей с системным введением СКЖТ на ранних стадиях канцерогенеза и при сформированной опухоли флюоресценция меченых СКЖТ была зарегистрирована в области селезенки. Флюоресценция нарастала во времени, что говорит о миграции и/или размножении меченых СКЖТ в этом органе в детектируемых количествах (более 90 тыс. клеток). Полученные результаты подтвердили известные ранее данные о селезенке как о нише для СКЖТ при системном введении [16, 17].

Невозможность обнаружить иные органы накопления СК при перераспределении их внутри организма реципиента в первых трех опытных группах животных методом поверхностного флюоресцентного имиджинга обусловлена низкой интенсивностью флюоресценции меченых СКЖТ по сравнению с автофлюоресценцией тканей животного, что вызвано следующими причинами:

1) малым количеством меченых СКЖТ в соответствующих нишах;

2) глубокой локализацией ниш (например, костный мозг, легкие). Тем не менее при достаточном количестве флюоресцентно-меченых клеток и их неглубокой локализации метод поверхностного флюоресцентного имиджинга может быть применен для подобных исследований.

Методом ЛСМ флюоресцентно-меченые СКЖТ обнаружены в опухолевых тканях животных с локальным введением клеток, что может свидетельствовать о моделировании взаимодействия СК с клетками окружающих опухолевых тканей (в частности, участие в построении кровеносных сосудов опухоли). У животных с системным введением СК в области опухолей меченые СКЖТ не найдены.

Несмотря на то, что методом прижизненного поверхностного флюоресцентного имиджинга флюоресценция тканей селезенки была зарегистрирована в группах животных с системным введением мезенхимных СК, методом ЛСМ дифференцировать флюоресценцию Turbo FP635 не удалось. Это может быть связано с выраженной автофлюоресценцией, обусловленной присутствием большого количества эндогенных порфириновых структур, входящих в состав гемоглобина, миоглобина, ферментов каталазы, пероксидазы и многочисленной группы цитохромов. Кроме того, длина волны зондирующего излучения в установке ЛСМ (543 нм) не является оптимальной для возбуждения флюоресценции белка Turbo FP635. В свою очередь, в установке для поверхностного флюоресцентного имиджинга возбуждение флюоресценции меченых СКЖТ осуществлялось на длине волны 585 нм, вследствие чего флюоресценцию СКЖТ, меченных Turbo FP635, удалось обнаружить на фоне автофлюоресценции органа.

Неожиданным результатом эксперимента оказалось присутствие меченых СКЖТ в костном мозге животных с локальным введением СКЖТ на ранней стадии канцерогенеза, тогда как в костном мозге животных других групп данные клетки не найдены.

У животных с системным введением СКЖТ на стадии сформированной опухоли выявлено еще одно мес-

то локализации меченых СКЖТ — легкие. Как известно, в подобных экспериментальных моделях легкие животных выступают в качестве пункта премиграции, где системно введенные СК накапливаются к 3–4-му дню после инъекции, а к 7-му дню эксперимента перераспределяются в организме реципиента. Вероятно, в нашем случае была обнаружена часть популяции СКЖТ и их потомков, которые не покинули ткани легких и к 14-му дню эксперимента.

Заключение. Методы флюоресцентного биоимиджинга и лазерной сканирующей микроскопии могут быть использованы для изучения взаимодействия опухоли и мезенхимных стволовых клеток. Они эффективно дополняют друг друга в получении общих знаний о распределении мигрирующих флюоресцентных клеток. Исследуемый тип клеток — стволовые клетки жировой ткани, — меченных геном красного флюоресцентного белка Turbo FP635, при системном введении способен мигрировать в селезенку, а при системном и местном введении — в костный мозг, легкие и ткани опухоли реципиента.

Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ №11-02-01199 «Флуоресцентный биоимиджинг системы «опухоль–стволовая клетка» и гранта Правительства РФ для поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых (договор №11 G34.31.0017 от 24 ноября 2010 г.), «Флуоресцентные белки: новые подходы к изучению механизмов физиологических и патологических процессов в живых системах».

Литература

- Houghton J., Stoicov C., Nomura S., Rogers A.B., Carlson J., Li H., Cai X., Fox J.G., Goldenring J.R., Wang T.C. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004; 306: 1568–1571.
- Annabi B., Naud E., Lee Y.-T., Eliopoulos N., Galipeau J. Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004; 91: 1146–1158.
- Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 51: 1–28.
- Bhowmick N.A., Neilson E.G., Moses H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004; 432: 332–337.
- Li L., Tian H., Yue W., Zhu F., Li S., Li W. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. *Journal of Cellular Physiology* 2010; 226: 1860–1867.
- Chen J., Tung C.H., Mahmood U., Ntziachristos V., Gyrko R., Fishman M.C., Huang P.L., Weissleder R. In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105(23): 2766–2771.
- Detter C., Wipper S., Russ D., Iffland A., Burdorf L., Thein E., Wegscheider K., Reichenspurner H., Reichart B. Fluorescent cardiac imaging. A Novel intraoperative method for quantitative assessment of myocardial perfusion during graded coronary artery stenosis. *Circulation* 2007; 116: 1007–1014.
- Haller J., Hyde D., Deliollanis N. Visualization of pulmonary inflammation using noninvasive fluorescence molecular imaging. *J Appl Physiol* 2008; 104: 795–802.
- Морозов Е.С., Верхуша В.В., Перский Е.Э. Флуоресцентные белки красной спектральной области. *Вестн Харьк Национ университета им. Каразина. Серия Биология* 2009; 9(856): 29–38.
- Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211–228.

11. DeUgarte D.A., Morizono K., Elbarbary A. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; 174: 101–109.

12. Lee R.H., Kim B., Choi I., Kim H., Choi H.S., Suh K., Bae Y.C., Jung J.S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14: 311–324.

13. Амосов И.С., Дегтярев В.А., Силантьева Н.К., Красноваева Г.П. Рентгенологическая оценка результатов лучевого лечения рака легкого с использованием гипокситерапии. В кн.: Использование газовых гипоксических смесей для оптимизации лучевой терапии. Обнинск; 1984; с. 54–55.

14. Девятков Н.Д., Зубкова С.М., Лапрун И.Б., Макеева Н.С. Физико-химические механизмы биологического действия лазерного излучения. *Успехи совр биол* 1987; 103(1): 31–33.

15. Карнаухов В.Н. Люминесцентный анализ клеток. Под ред. проф. А.Ю. Буданцева. Пушкино: Электронное издательство «Аналитическая микроскопия»; 2004; 131 с.

16. Bell E.L., Klimova T.A., Eisenbart J., Schumacker P.T., Chandel N.S. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia — inducible factor — dependent extension of the replicative life span during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 5737–5745.

17. Wolf D., Rumpold H., Koeck R., Gunsilius E. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted — delivery vehicles for anticancer agents. *Journal of the National Cancer Institute* 2005; 97(7): 540–542.

References

1. Houghton J., Stoicov C., Nomura S., Rogers A.B., Carlson J., Li H., Cai X., Fox J.G., Goldenring J.R., Wang T.C. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004; 306: 1568–1571.

2. Annabi B., Naud E., Lee Y.-T., Eliopoulos N., Galipeau J. Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004; 91: 1146–1158.

3. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 51: 1–28.

4. Bhowmick N.A., Neilson E.G., Moses H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004; 432: 332–337.

5. Li L., Tian H., Yue W., Zhu F., Li S., Li W. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. *Journal of Cellular Physiology* 2010; 226: 1860–1867.

6. Chen J., Tung C.H., Mahmood U., Ntziachristos V., Gyrko R.,

Fishman M.C., Huang P.L., Weissleder R. In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105(23): 2766–2771.

7. Detter C., Wipper S., Russ D., Iffland A., Burdorf L., Thein E., Wegscheider K., Reichenspurner H., Reichart B. Fluorescent cardiac imaging. A Novel intraoperative method for quantitative assessment of myocardial perfusion during graded coronary artery stenosis. *Circulation* 2007; 116: 1007–1014.

8. Haller J., Hyde D., Deliolanis N. Visualization of pulmonary inflammation using noninvasive fluorescence molecular imaging. *J Appl Physiol* 2008; 104: 795–802.

9. Morozov E.S., Verkhusha V.V., Perskiy E.E. *Vestn Khar'k Natsion universiteta im. Karazina. Seriya Biologiya — Herald of Kharkov National University named after Karasin. Series Biology* 2009; 9(856): 29–38.

10. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211–228.

11. DeUgarte D.A., Morizono K., Elbarbary A. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003. 174: 101–109.

12. Lee R.H., Kim B., Choi I., Kim H., Choi H.S., Suh K., Bae Y.C., Jung J.S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14: 311–324.

13. Amosov I.S., Degtyarev V.A., Silant'eva N.K., Krasnovaeva G.P. Rentgenologicheskaya otsenka rezul'tatov lucheвого lecheniya raka legkogo s ispol'zovaniem gipoksiterapii. V kn.: *Ispol'zovanie gazovykh gipoksicheskikh smesey dlya optimizatsii luchevoy terapii* [Radiological estimation of radiotherapy results of lung cancer using hypoxotherapy. In: The use of gas hypoxic mixtures for radiotherapy optimization]. Obninsk; 1984; p. 54–55.

14. Devyatkov N.D., Zubkova S.M., Laprun I.B., Makeeva N.S. *Uspekhi Sovr Biol — Advances in Modern Biology* 1987; 103(1): 31–33.

15. Karnaukhov V.N. Lyuminesstentnyy analiz kletok [Cell fluorescence analysis]. Pod red. prof. Budantseva A.Yu. [Budantseva A.Yu. (editor)]. *Pushchino: Elektronnoe izdatel'stvo "Analiticheskaya mikroskopiya" 2004; 131 p.*

16. Bell E.L., Klimova T.A., Eisenbart J., Schumacker P.T., Chandel N.S. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia — inducible factor — dependent extension of the replicative life span during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 5737–5745.

17. Wolf D., Rumpold H., Koeck R., Gunsilius E. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted — delivery vehicles for anticancer agents. *Journal of the National Cancer Institute* 2005; 97(7): 540–542.