

УДК 602.9:611.018:616-006:636.028

Кладницька Л.В., к.вет.н., доцент, **Мазуркевич А.Й.**, д.вет.н., професор,
Гарманчук Л.В., д.б.н., професор, **Величко С.В.**, к.б.н.,
Ковпак В.В., к.вет.н., ст.викл.

Національний університет біоресурсів і природокористування України

**ВПЛИВ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН
НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИЙ ПУХЛИННИЙ РІСТ І ПРОЦЕСИ
МЕТАСТАЗУВАННЯ У МИШЕЙ C57BL/6 З ТРАНСПЛАНТОВАНОЮ
МЕТАСТАТИЧНОЮ КАРЦИНОМОЮ ЛЕГЕНЬ ЛЬЮІС**

Мета дослідження – вивчення впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на пухлинний ріст та рівень метастазування в мишей C57BL/6 з перецпленою метастатичною карциномою легень Льюїс.

Досліди проводили на самцях мишей C57BL/6 2-3-місячного віку, вагою 20-22 г. Алогенні мезенхімальні стовбурові клітини отримували культивуванням первинного матеріалу, що був виділений з кісткового мозку мишей C57BL/6. Культивування клітин проводили за 37°C, 100 % вологості і 5 % CO₂ у середовищі DMEM із додаванням 20 % фетальної сироватки телят та 1 % антибіотика-антимікотика. Мишам внутрішньом'язово інокулювали клітинну суспензію метастатичної карциноми легень Льюїс (LLC) у концентрації 1x10⁶/0,1 мл розчину Хенкса. Після інокуляції пухлинних клітин миші були розділені на контрольну і дослідну групи по 8 тварин у кожній. Мишам дослідної групи на 8-й день після інокуляції пухлинних клітин вводили внутрішньовенно алогенні МСК 4-го пасажу в кількості 1,25x10⁴. На 20-ту добу досліду визначали масу первинної пухлини, рівень метастазування, кількість, розміри та загальний об'єм метастазів. Розвиток пухлинного процесу в тварин контрольної і дослідної груп суттєво відрізнялися. Застосування алогенних МСК сприяло збільшенню ваги первинної пухлини на 29% . p<0.05. При цьому пухлинний процес переходить в васкулярну стадію швидше, що засвідчує показник розмірів метастазів 0,5-2,0 мм. Загальний об'єм метастазів за впливу алогенних МСК у 2,9 раза більший ніж у тварин контрольної групи p<0,05.

Ключові слова: алогенні мезенхімальні стовбурові клітини, миші, карцинома легень Льюїс, первинна пухлина, метастази, загальний об'єм метастазів.

УДК 602.9:611.018:616-006:636.028

Кладницкая Л.В., к.вет.н., доцент, **Мазуркевич А.Й.**, д.вет.н., професор,
Гарманчук Л.В., д.б.н., професор, **Величко С.В.**, к.б.н.,
Ковпак В.В., к.вет.н., ст.преп.

**ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТОЛОВОХ
КЛЕТОК НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ОПУХОЛЕВЫЙ РОСТ И
ПРОЦЕССЫ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ У МЫШЕЙ C57BL/6 С
ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ КАРЦИНОМОЙ
ЛЕГКИХ ЛЬЮИС**

Цель исследования - изучение влияния алогенных мезенхимальных стволовых клеток на опухолевый рост и уровень метастазирования в мышей C57BL/6 с трансплантированной метастатической карциномой легких Льюис.

Опыты проводили на самцах мышей C57BL/6 2-3-месячного возраста, весом 20-22 г. Аллогенные мезенхимальные стволовые клетки получали культивированием первичного материала, который был выделен из костного мозга мышей C57BL/6. Культивирование клеток проводили при 37°C, 100% влажности и 5% CO₂ в среде DMEM с добавлением 20 % фетальной сыворотки телят и 1% антибиотика-антимикотика. Мышам внутримышечно инокулировали клеточную суспензию метастатической карциномы легких Льюис (LLC) в концентрации 1x10⁶ / 0,1 мл раствора Хэнкса. После инокуляции опухолевых клеток мыши были разделены на контрольную и опытную группы по 8 животных в каждой. Мышам опытной группы на 8-й день после инокуляции опухолевых клеток вводили внутривенно аллогенные МСК 4-го пассажа в количестве 1,25x10⁴. На 20-е сутки опыта определяли массу первичной опухоли, уровень метастазирования, количество, размеры и общий объем метастазов. Развитие опухолевого процесса у животных контрольной и опытной групп существенно отличались. Применение аллогенных МСК способствовало увеличению массы первичной опухоли на 29%, $p < 0,05$. При этом опухолевый процесс переходит в васкулярную стадию быстрее, что соотносится с показателем размеров метастазов 0,5-2,0 мм. Общий объем метастазов при воздействии аллогенных МСК в 2,9 раза больше, чем у животных контрольной группы $p < 0,05$.

Ключевые слова: аллогенные мезенхимальные стволовые клетки, мыши, карцинома легких Льюис, первичная опухоль, метастазы, общий объем метастазов.

УДК 602.9:611.018:616-006:636.028

Kladnytska L.V., c.vet.sc., Associate Professor,

Mazurkiewich A.Y., d.vet.sc., Professor

Harmanchchuk L.V., d.biol.sc. Professor

Velichko S.V., c.biol.sc.,

Kovpak V.V., c.vet.sc., Associate Professor

INFLUENCE ALLOGENIC MESENCHYMAL STEM CELLS ON EXPERIMENTAL TUMOR GROWTH AND THE METASTASIS IN MICE C57BL/6 WITH TRANSPLANTANT METASTATIC LEWIS LUNG CARCINOMA

The aim - to study MSCs effect on tumor growth and metastasis rate in mice C57BL/6 with transplant metastatic Lewis lung carcinoma.

Experiments were performed on three-week-old male C57BL/6 mice, weighing 20-22 g. Allogeneic mesenchymal stem cells obtained by cultivation of primary material that was isolated from the bone marrow of mice C57BL/6. Cell culture was performed at 37 ° C, 100% humidity and 5% CO₂ in DMEM with addition of 20% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic-antimycotics. Mice were intramuscularly inoculated cell suspension metastatic Lewis lung carcinoma (LLC) in concentrations 1x10⁶ / 0,1 ml Hanks solution. After tumor cell inoculation mice were divided into control and experimental groups of 8 animals each. Mice experimental group on day 8 after inoculation of tumor cells injected intravenously allogeneic MSCs 4th passage in the number 1,25x10⁴. On the 20th day of the experiment determined the primary

tumor weight, metastasis rate, the number, size and total volume of metastases. The development of tumor in animals of the control and experimental groups were significantly different. The use of allogeneic MSCs contributed to an increase in weight of the primary tumor in 29%, $p < 0.05$. This process goes on tumor vascular stage rather confirming indicator of the size of metastases 0.5-2.0 mm. Overall, capacity for metastasis impact of allogeneic MSCs 2.9 times greater than in animals of the control group $p < 0.05$.

Key words: *allogeneic mesenchymal stem cells, mouse, Lewis lung carcinoma, primary tumor, metastasis, total volume of metastases*

В останні роки багато досліджень присвячено стовбуровим клітинам, зокрема змінам, які відбуваються в системах, органах і цілісному організмі за їх впливу. Мета цих досліджень - вивчення біологічної функції мезенхімальних стовбурових клітин з метою застосування для корекції функцій систем і органів, або як допоміжної ланки при терапевтичних заходах при усуненні патологічних процесів.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) відомі як стромальні клітини-попередники, що знаходяться в кістковому мозку, здатні до самооновлення і можуть диференціюватися в мезодермальний клітинний клон, в тому числі клітини кістки, хряща, строми, жирової тканини, сполучної тканини, м'язів і сухожилків [1-3]. Сприятливі ефекти МСК переважно викликані безліччю біоактивних молекул, які вони виділяють. МСК володіють природженим тропізмом до місць травми, запалення. Відомо, що пухлинні клітини секретують і виділяють у мікрооточення фактори, подібні до тих, які виділяються при запальних реакціях, що є пусковим механізмом для міграції МСК в пухлинну тканину [4-7].

Значна кількість дослідників отримали дані щодо впливу МСК на патогенез та прогресію пухлини [8-11].

В експериментах на тваринах було виявлено, що застосування ксеногенних МСК, отриманих з жирової тканини людини, у щурів з експериментальною моделлю карциноми Герена призвело до значного збільшення % виживаності, а на 21-у добу експерименту було відмічено інгібування росту пухлини на 40 % [12]. Дані інших дослідників свідчать про те, що алогенні МСК ефективно інгібують ріст саркоми Капоші в людини [13].

У літературі описано, що МСК секретують ангіогенні чинники, фактори росту, цитокіни, які впливають на ендотеліальні клітини *in vitro* і індукують ангіогенез *in vivo* [14]. Існують дані, що ангіогенез, васкуляризація пухлини і розвиток пухлинного процесу тісно пов'язані між собою. Зокрема деякі автори вважають, що застосування МСК людини у мишей системно або безпосередньо у контакті з пухлиною за штучно індукованого пухлинного процесу зменшує ріст пухлини. При цьому ж доведено, що МСК людини у мишей з трансплантованою саркомою індукують ангіогенез, але не міняють загального патологічного ангіогенезу пухлини [15]. МСК здатні індукувати неоангіогенез в пробірці [16,17] і в природних умовах [18-20], крім того, вони можуть диференціюватися в ендотеліальні клітини [21,22] або перичити [23]. В деяких

моделях пухлин уведення МСК викликало проангіогенний ефект [24] і збільшення росту пухлини [25]. На противагу цьому, в іншій моделі пухлин, МСК інгібували ангіогенез [26].

Взаємодія МСК і пухлинних клітин, вплив МСК на мікросередовище самої пухлини, а також на біологічні властивості пухлинних клітин є складним процесом, остаточно не з'ясованим, і тому актуальність цього питання не викликає сумніву.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на самцях мишей C57BL/6 вагою 20-22г віком 2-3 місяці. Всі дослідження на тваринах були проведені відповідно до Правил належної лабораторної практики щодо використання експериментальних тварин [27] та з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та принципів «Міжнародної Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986).

Як модель метастазування використали епідермоїдну карциному легень Льюїс (LLC). Клітини LLC культивували за стандартних умов у середовищі DMEM із додаванням 10 % фетальної сироватки телят (FBS) та 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, USA) за 37°C, 100 % вологості і 5 % CO₂.

Самцям мишей C57Bl/6 2-3-місячного віку, вагою 20-22 г внутрішньом'язово інокулювали клітинну суспензію метастатичної карциноми легень Льюїс у концентрації $1 \times 10^6 / 0,1$ мл розчину Хенкса. Після інокуляції пухлинних клітин миші були розділені на контрольну і дослідну групи по 8 тварин у кожній. Мишам дослідної групи на 8-й день після інокуляції пухлинних клітин вводили внутрішньовенно алогенні МСК 4-го пасажу в концентрації $1,25 \times 10^4$ на тварину.

Алогенні МСК отримували культивуванням первинного матеріалу, що був виділений з кісткового мозку мишей C57BL/6 [28]. Культивування клітин проводили за стандартних умов у середовищі DMEM із додаванням 20 % фетальної сироватки телят (FBS) та 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, USA) за 37°C, 100 % вологості і 5 % CO₂ (рис.1).

На 20-ту добу досліду визначали вплив алогенних МСК на масу первинної пухлини, рівень метастазування, розміри метастазів. Для цього мишей піддавали евтаназії, вилучали задні кінцівки, видаляли пухлину, зважували, препарували легені. Легені фіксували у розчині Буена, витримували 24 години. Потім легені розрізали на лопаті і візуально рахували кількість метастазів розміром 0,5 – 3,5 мм з кроком 0,5 мм. Об'єм метастазу розраховували за формулою $V = 0,524 \times D^3$, де V – об'єм метастазу (мм³), D – діаметр метастазу (мм) [29].

Результати досліджень. Пік метастазування епідермоїдної карциноми легень Льюїс припадає на 18-24 добу. Тому саме у цей період ми досліджували вплив алогенних МСК на біологічні властивості первинної пухлини та процес метастазування.

Показник маси первинної пухлини тісно пов'язаний із кількістю віддалених метастазів, їх розмірами і, як наслідок, рівнем злоякісності пухлинного процесу. За введення алогенних МСК мишам з трансплантованою карциномою легень Льюїс ми отримали, що маса первинної пухлини на 29 % ($p < 0,05$) більше у тварин дослідної групи порівняно з контролем (табл. 1).

Таблиця 1

Показники маси первинної пухлини та об'єму метастазів у мишей C57BL/6 з трансплантованою карциномою легень Льюїс, M+m, n=8

	LLC (контроль)	LLC (МСК)
Маса пухлини, г	1,83±0,08	2,57±0,21*
Об'єм метастазів	10,28±0,85	29,62±6,50*

Примітка. * - $p < 0,05$ відносно тварин контрольної групи

За дисперсійним аналізом ці дані підтверджуються високою силою впливу $\eta^2_x = 0,74$ при $p < 0,05$ і ми можемо стверджувати, що застосування МСК за перебігу пухлинного процесу чинить сильний вплив на збільшення показника маси первинної пухлини. На нашу думку, це можна пояснити наступним. Відомо, що строма пухлини складається з позаклітинного матриксу і різних типів мезенхімальних клітин, включаючи макрофаги, ендотеліальні клітини, лімфоцити, перицити, фібробласти і міофібробласти. Ці клітини строми взаємодіють з пухлинними клітинами і при безпосередньому контакті і через паракринні сигнальні механізми, що опосередковані секрецією розчинних факторів, в тому числі цитокінів, хемокінів і факторів росту. Взаємодія між пухлинними і стромальними клітинами регулює ріст пухлини, метастази, ангиогенез. МСК також мігрують в пухлинну тканину, де вони включаються до пухлинної строми [4] і через вищевказані механізми стимулюють проліферацію клітин пухлини, що підтверджується нашими даними.

Розмір, загальний об'єм віддалених метастазів та їх кількість засвідчує рівень злоякісності процесу пухлиноутворення, а також дає можливість прогнозу протікання останнього. Встановлено, що показник загального об'єму метастазів у тварин дослідної групи суттєво підвищений, а саме у 2,9 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем (див.табл. 1). Це підтверджує і дисперсійний аналіз. Застосування МСК у мишей з трансплантованою карциномою легень Льюїс чинить сильний вплив на збільшення показника загального об'єму метастазів $\eta^2_x = 0,74$, $p < 0,05$.

Ріст пухлин залежить від ступеня розвитку в них судинної сітки. В новоутвореннях діаметром менше 1 мм поживні речовини і кисень надходять із тканинної рідини шляхом дифузії. Для живлення більш крупних новоутворень необхідна васкуляризація їх тканини. Треба зауважити, що у тварин дослідної групи за впливу МСК зареєстровано появу метастазів розміром 0,5 - 2 мм, тоді як у контролі розмір метастазів не перевищував 1 мм. Таким чином, можна сказати, що за впливу МСК пухлинний процес швидше переходить у васкулярну стадію, тобто можна говорити про підвищення рівня злоякісності останнього.

Висновки:

1. Таким чином, застосування алогенних МСК чинить вплив на перебіг пухлинного процесу у мишей з трансплантованої карциномою легень Льюїс.
2. Застосування алогенних МСК сприяє збільшенню показника ваги первинної пухлини на 29% ($p < 0,05$).
3. За впливу алогенних МСК пухлинний процес переходить у васкулярну стадію швидше, що засвідчує більший розмір метастазів 0,5 - 2 мм.
4. Показник загального об'єму метастазів за впливу алогенних МСК у 2,9 раза більший ніж у тварин контрольної групи ($p < 0,05$).
5. Застосування МСК у мишей з трансплантованої карциномою легень Льюїс чинить сильний вплив на збільшення показника загального об'єму метастазів ($\eta^2x = 0,74$, $p < 0,05$) та маси первинної пухлини ($\eta^2x = 0,74$, $p < 0,05$).

Література

1. Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997, 276:71–74.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284:143–147.
3. Deans RJ, Moseley AB: Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000, 28:875–884.
4. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F: Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 2008, 15:730–738
5. Dvorak HF: Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986, 315:1650–1659.]
6. Sun Z, Wang S, Zhao R. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J.Hematol Oncol*, 2014, Feb 6;7(1):14. doi: 10.1186/1756-8722-7-14 (in English)
7. Klopp AH, et al. Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2007;67:11687–95
8. Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, Ye L, Zhang X: Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res* 2008, 18:500–507.
9. Li L, Tian H, Chen Z, Yue W, Li S, Li W: Inhibition of lung cancer cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011, 43:143–148.
10. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA: Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007, 449:557–563.
11. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F: Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One* 2009, 4:e4992.]

12. Cherkashyna D.V., Lebedinskii A.S., Buchanan J.A., Shtemenko N.I., Petrenko A.U. Guerin carcinoma growth inhibition in rats after administration mesenchymal stromal cells of human adipose tissue and bio-regulators of stem and progenitor cells. *J. A.Med.Sc. of Ukraine* 2010;16(3):492-506.
13. Khakoo A.Y. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.* 2006;203:1235-47.
14. Bronckaers A., Hilkens P., Martens W., Struys T., Lambrechts, I Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacology and Therapeutics* August 2014, Volume 143, Issue 2, Pages 181-196
15. K eramidas et al. The dual effect of mscs on tumour growth and tumour angiogenesis. *Stem Cell Research & Therapy* 2013, 4:41
16. Gruber R, Kandler B, Holzmann P, Vogeke-Kadletz M, Losert U, Fischer MB, Watzek G: Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue Eng* 2005, 11:896-903.
17. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE: Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007, 25:2648-2659.
18. Al-Khalidi A, Eliopoulos N, Martineau D, Lejeune L, Lachapelle K, Galipeau J: Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene Ther* 2003, 10:621-629.
19. Ghajar CM, Kachgal S, Kniazeva E, Mori H, Costes SV, George SC, Putnam AJ: Mesenchymal cells stimulate capillary morphogenesis via distinct proteolytic mechanisms. *Exp Cell Res* 2010, 316:813-825.
20. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C: Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004, 22:377-384.
21. Zhang G, Drinnan CT, Geuss LR, Suggs LJ: Vascular differentiation of bone marrow stem cells is directed by a tunable three-dimensional matrix. *Acta Biomater* 2010, 6:3395-3403.
22. Bexell D, Gunnarsson S, Tormin A, Darabi A, Gisselsson D, Roybon L, Scheduling S, Bengzon J: Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Mol Ther* 2009, 17:183-190.
21. Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, Salnikov AV, Moldenhauer G, Wagner W, Diehlmann A, Saffrich R, Schubert M, Ho AD, Giese N, Buchler MW, Friess H, Buchler P, Herr I: VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 2008, 99:622-631.
22. Suzuki K, Sun R, Origuchi M, Kanehira M, Takahata T, Itoh J, Umezawa A, Kijima H, Fukuda S, Saijo Y: Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Mol Med* 2011, 17:579-587.

23. Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J: Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood* 2009, 113:4197–4205.

24. Nanni P, de Giovanni C, Lollini PL, Nicoletti G, Prodi G: TS/A: a new metastasizing cell line from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis* 1983, 1:373–380.

25. Moriscot C, de Fraipont F, Richard MJ, Marchand M, Savatier P, Bosco D, Favrot M, Benhamou PY: Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells* 2005, 23:594–603.

25. Meazza R, Lollini PL, Nanni P, De Giovanni C, Gaggero A, Comes A, Cilli M, Di Carlo E, Ferrini S, Musiani P: Gene transfer of a secretable form of IL-15 in murine adenocarcinoma cells: effects on tumorigenicity, metastatic potential and immune response. *Int J Cancer* 2000, 87:574–581.

26. Andrade SP, Machado RD, Teixeira AS, Belo AV, Tarso AM, Beraldo WT: Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvasc Res* 1997, 54:253–261.

27. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. – Washington, D.C., National Academy of Press, 1996. – 140 p.

28. Mazurkevich A.Y., Kladnytska L.V., Ковпак V.V. Features conditions selection and cultivation mouse bone marrow adhesive fraction mononuclear cells// *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv / Vestnik*; 2013, Vol. 64 Issue 2, p41-43

29. Балицкий К.П., Воронцова А.Л., Лисняк И.А. Метастазирование опухолей: патогенетические аспекты. Киев: АН УССР, Наук. Думка, 1991.- 244 с
Рецензент – д.вет.н., в.о. профессора Тибінка А.М.