

**На правах рукописи**

**Соловьева Анастасия Олеговна**

**ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННАЯ МИГРАЦИЯ  
И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА  
ПРИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ МЕЛАНОМЕ B16**

**03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Новосибирск – 2014**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» (Новосибирск)

**Научные руководители:**

академик РАН,  
доктор медицинских наук,  
профессор

**Коненков Владимир Иосифович**

доктор медицинских наук

**Повещенко Александр Федорович**

**Официальные оппоненты:**

**Гуляева Людмила Федоровна**, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза ФГБУ НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН;

**Постникова Ольга Алексеевна**, доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой информатики и математики ГБОУ ВПО Новосибирского государственного медицинского университета МЗ РФ

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр клинической и экспериментальной и медицины» Сибирского отделения РАМН (Новосибирск)

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г. в \_\_\_\_ час. на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 001.037.01 в ФГБУ «НИИ региональной патологии и патоморфологии» СО РАМН по адресу: 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2, тел. 334-84-38.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НИИ региональной патологии и патоморфологии» СО РАМН.

<http://pathomorphology.soramn.ru/>

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета

Молодых Ольга Павловна

**ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы.** Миграция является фундаментальным свойством клеток, участвующих в поддержании гомеостаза, регенерации и иммунной защите организма. Направленная миграция трансплантированных клеток необходима для эффективности клеточной терапии, поскольку для осуществления своих функций – дифференцировки в клетки поврежденной ткани, выделение ростовых факторов, цитокинов и др., – клетки должны мигрировать в патологический очаг.

Миграционная активность и характер распределения клеток после трансплантации зависят от множества факторов, таких как тканевая принадлежность трансплантированных клеток (Morita Y., 2011), количество введенных клеток (Sergeev S.A., 2011), пути введения клеток (Соколова И.Б., 2007; Григорян А.С., 2010; Zhong J.F., 2002; Aicher A., 2003), тип трансплантированных клеток и их микроокружение (Park S.K., 2007; Burst V., 2013; Li Q., 2013). Отсутствие либо наличие патологического очага (воспаление, повреждение, опухолевый рост и др.) также влияет на миграцию и распределение трансплантированных клеток.

Изучение миграции и распределения клеток после трансплантации является обязательным этапом при разработке клеточной терапии различных заболеваний ([Sensebé L.](#), 2013; [Terrovitis J.V.](#), 2010). Интерес исследователей в области клеточной терапии привлекает не только цельная, неразделенная, популяция клеток костного мозга, но и отдельные его популяции

Клетки костного мозга являются ключевым звеном в иммунном ответе, участвуют во многих патологических состояниях, в том числе и при онкологических заболеваниях, и являются перспективными для клеточной терапии. Поэтому изучение их миграционной активности, влияния степени дифференцировки, опухолевого роста, их микроокружения на распределение в организме реципиента имеет важное фундаментальное и прикладное значение. Сравнивая распределение низкодифференцированных клеток костного мозга и зрелых дифференцированных лимфоидных клеток селезенки, возможно описать влияние степени дифференцировки на миграционную активность клеток.

Костный мозг содержит два типа стволовых клеток: гемопоэтические стволовые и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, которые функционально взаимодействуют и находятся в специализированном микроокружении, влияющем на их миграцию, эффективность их приживления после трансплантации, секрецию цитокинов и ростовых факторов. Изучение влияния микроокружения на распределение трансплантированных клеток необходимо для поиска оптимального материала для трансплантации. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга обладают набором уникальных свойств, которые делают их идеально подходящими, как для клеточной терапии в регенеративной медицине, так и, возможно, в качестве средства доставки терапевтических агентов. Пластичность ММСК является основанием для их практического использования в заместительной терапии при лечении заболеваний внутренних органов, при которых восполнение погибших клеток паренхимы возможно только за счет внешних источников. Однако свойство ММСК мигрировать в поврежденные ткани, в опухоли не является абсолютно доказанным и требует экспериментального подтверждения. Актуальными и не вполне выясненными вопросами являются особенности распределения трансплантированных мезенхимальных стромальных клеток-предшественников костного мозга по сравнению с цельной неразделенной популяцией костного мозга в норме и в условиях опухолевого роста.

Существует высокий уровень сложности в отношении оценки влияния клеток костного мозга на канцерогенез. Исследуя распределение клеток костного мозга в норме и при опухолевом росте, мы изучаем не только способность трансплантированных клеток мигрировать в опухолевую ткань, но также влияние опухолевых клеток на их миграцию и распределение.

Таким образом, исследование важнейшего свойства клеток – миграции имеет фундаментальное значение. Изучение влияния степени дифференцировки трансплантируемых клеток и наличия опухолевого процесса у реципиента на миграционную активность данных клеток является не только актуальной фундаментальной задачей, но и задачей, имеющей прикладное значение.

**Цель исследования** – выявить особенности миграции и распределения клеток костного мозга и селезенки после трансплантации в лимфоидных и не лимфоидных органах здорового реципиента и реципиента-носителя меланомы B16.

**Задачи исследования:**

1. Провести исследование миграционной активности и распределения трансплантированных клеток костного мозга и спленоцитов в лимфоидные (лимфатические узлы, селезенку, костный мозг) и нелимфоидные органы (печень, сердце, головной мозг, кожу) в организме интактного сингенного реципиента.

2. Сравнить особенности миграции и распределения трансплантированных клеток нефракционированного костного мозга и фракции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в организме реципиента-носителя меланомы B16.

3. Изучить тканевую локализацию трансплантированных клеток в органах реципиента-опухоленосителя меланомы B16 методами витального маркирования ДНК.

4. Исследовать влияние трансплантации клеток костного мозга и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на выживаемость животных-опухоленосителей меланомы B16 и рост опухоли.

5. Разработать биочип для количественного анализа распределения клеток, оценки путей их миграции в организме реципиента и провести сравнение результатов микрочипового анализа, анализа флуоресценции электрофореграммы и данных, полученных при помощи ПЦР в режиме реального времени.

**Научная новизна.** Впервые определен характер распределения в организме реципиента трансплантированных клеток костного мозга, находящихся на различных этапах дифференцировки: неразделенной популяции клеток костного мозга, богатой недифференцированными клеткам и спленоцитов. Показано, что лимфоидные клетки с различной функциональной активностью имеют сходную картину миграции и распределения по органам реципиента, однако клетки костного мозга, состоящие в основном из малодифференцированных клеток, имеют более высокий показатель ремиграции в костный мозг.

Проведена оценка влияния опухолевого роста на миграцию и распределение неразделенной популяции клеток костного мозга и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга. Установлено, что при опухолевом росте усилена миграция трансплантированных клеток костного мозга, в том числе и популяции ММСК, в костный мозг реципиента. На ранней стадии формирования опухоли миграционная активность ММСК 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 отдельной популяцией ММСК.

**Теоретическая значимость и практическая значимость работы.** Результаты, полученные в ходе исследования, дополняют и расширяют имеющиеся представления о миграционной активности и распределении трансплантированных клеток в зависимости от степени их дифференцировки и клеточного микроокружения. Данные о распределении ММСК и неразделенной фракции клеток костного мозга у животных-опухоленосителей важны как для понимания механизмов поддержания неопластического роста, так и поиска новых подходов к терапии опухолей.

Доказаны различия временной динамики распределения трансплантированных ММСК и неразделенной популяции клеток костного мозга и селезенки, что значимо для разработки протоколов трансплантации различных типов клеток. Разработан биочип для оценки

миграционной активности клеток. Оценена эффективность микрочипового анализа для исследования распределения клеток в организме. Предложенный метод биочипового анализа миграции является основой для расширения исследований миграционной активности различных клеточных типов на разных патологических моделях, поскольку позволяет проанализировать одновременно множество образцов.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Внутривенная трансплантация клеток костного мозга и селезенки приводит к их миграции и продолжительной персистенции в лимфоидных и нелимфоидных органах и тканях животных-реципиентов.

2. На интенсивность и направленность клеточной миграции из крови в органы и ткани существенное влияние оказывает степень дифференцировки трансплантируемых клеток.

3. На разных стадиях опухолевого роста миграционная активность клеток костномозгового происхождения различной степени дифференцировки значительно изменяется с преимущественной направленностью миграции в костный мозг.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы доложены на конференциях «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» (Новосибирск, 2008); IV Всероссийском симпозиуме с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (Санкт-Петербург, 2010); IV Съезде лимфологов России (Москва, 2011); VII Всероссийской конференции по патологии клетки (Москва, 2010); Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» (Новосибирск, 2011); XI Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» (Новосибирск, 2013); I Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Новосибирск, 2014); 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology (Milan, Italy, 2013); I Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2013).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 18 печатных работы, из них 6 статей в журналах рекомендованных ВАК для публикаций материалов диссертационных работ.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов, иллюстрирована 6 таблицами и 20 рисунком. Библиографический указатель включает 240 источников, в том числе 224 зарубежных.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использованы мыши линии C57Bl и CBA в возрасте 8 – 12 нед (всего 600 мышей). Животные находились на стандартной сбалансированной диете в виварии СО РАМН. Эксперименты проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Исследование одобрено этическим комитетом «НИИКЭЛ».

Суспензию костного мозга выделяли из бедренных и большеберцовых костей самцов мышей. Суспензию спленоцитов выделяли из селезенок самцов. Клетки костного мозга либо спленоциты вводили в хвостовую вену сингенным самкам-реципиентам. Выделение органов (лимфатические узлы, селезенка, печень, сердце, кожа, головной мозг, костный мозг) реципиентов-самок производили через 1 ч, 24 ч, 1 и 3 мес после трансплантации клеток костного мозга либо спленоцитов доноров-самцов. Распределение трансплантированных клеток по органам реципиента проводили с помощью ПЦР путем определения специфической последовательности Y-хромосомы.

ММСК были получены из костного мозга мышей линии C57Bl. Выделение ММСК

было основано на способности данной популяции клеток адгезироваться к пластику при стандартных условиях культивирования. Была оценена способность ММСК к адипогенной и остеогенной дифференцировке, а также определен их иммунофенотип.

Оценку распределения ММСК и нефракционированного костного мозга по органам интактного реципиента и реципиента-носителя меланомы В16 через 1 ч, 3, 7 и 14 сут после внутривенного введения клеток проводили методом ПЦР в режиме реального времени на Authorized Thermal Cycler – Light Cycler 480 II/96 (Roche). Для этого самкам мышей линии С57В1 подкожно вводили суспензию клеток меланомы В16, через 3 дня после трансплантации опухолевых клеток животным внутривенно вводили суспензию ММСК самца либо нефракционированный костный мозг, параллельно – интактным животным внутривенно вводили эти же клетки. Через 1 ч, 3, 7 и 14 сут после введения клеток у животных забирали органы (легкие, опухоль, кровь, лимфатические узлы, селезенка, печень, сердце, кожа, головной мозг, костный мозг) для дальнейших исследований с помощью ПЦР в режиме реального времени. Количественный анализ содержания трансплантированных клеток самца в органах самок проводили путем оценки количества специфической последовательности гена *Zfy2* (zinc finger protein 2) Y-хромосомы в нормированных образцах ДНК, выделенных из органов реципиентов.

Для оценки распределения трансплантированных клеток при помощи флуоресцентной микроскопии самкам мышей линии С57В1 через 3 дня после прививки клеток меланомы В16 в хвостовую вену вводили суспензию флуоресцентно меченных ММСК либо клеток костного мозга самца. Через 1 ч, 3, 7 и 14 сут после введения клеток выделяли органы (опухоль, сердце, кожу, лимфатические узлы, легкие, печень, селезенку, головной мозг, костный мозг). Выделенные органы животных фиксировали, замораживали и готовили криосрезы при помощи микротомы-криостата «НМ 560 MV» (Германия, Microm). Детекцию флуоресцентно меченых клеток в тканях реципиента проводили с помощью флуоресцентного микроскопа («Аxioplan - 2 MOT», Zeiss).

Для оценки влияния трансплантации нефракционированного костного мозга либо ММСК на выживаемость животных-опухоленосителей и рост опухоли самкам мышей линии С57В1 в заднюю лапу подкожно вводили суспензию клеток меланомы В16. Через 3 дня после трансплантации опухолевых клеток животные были разделены на 3 группы случайным образом, по 10 животных в каждой группе: животным первой группы внутривенно вводили физиологический раствор, животным второй группы – суспензию ММСК, животным третьей группы – суспензию нефракционированного костного мозга. Контролем служили интактные животные. Через 12 сут после трансплантации опухоли и последующие дни до гибели животных измеряли объем опухоли. Животные находились в эксперименте до естественной гибели.

Для разработки микрочиповой методики анализа распределения трансплантированных клеток в организме реципиента использовались ампликоны исследуемых образцов после ПЦР. Ампликоны наносились на стандартные слайды для микрочипового анализа. Печать слайдов осуществлялась контактным методом на споттере SpotArray 24 Microarray Printing System (Perkin Elmer, США). Закрепление ДНК-проб проводилось фотохимически, путем облучения в UV диапазоне ( $\lambda=240$  нм). Для получения флуоресцентной гибридационной картины микрочипа проводилась гибридизация с использованием олигонуклеотида, модифицированного по 5'-концу красителем Cy3 с добавлением нормировочного олигонуклеотида, модифицированного красителем Cy5. Сканирование микрочипа осуществлялось с использованием конфокального сканера ScanArray Express (Perkin Elmer). Количественный анализ интенсивности свечения спотов микрочипа проводился с помощью стандартного программного обеспечения ScanArray Express (Perkin Elmer).

Полученные результаты исследования статистически обрабатывали с использованием программы Statistica 6,0 for Windows (StatSoft, США). Полученные данные проверяли на

нормальность распределения согласно критериям Колмогорова-Смирнова, результаты описаны в виде среднего арифметического и стандартного отклонения. Достоверность различий оценивали по критериям Манна-Уитни (в независимых группах). Различия считали достоверными при  $p < 0,01$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Динамика распределения трансплантированных клеток костного мозга и спленоцитов по органам интактного реципиента.** Нами установлено, что максимальные показатели накопления маркера клеток костного мозга обнаружены через 1 и 3 мес после трансплантации в костном мозге. Минимальное накопление Y-позитивных клеток за весь период исследования было обнаружено в коже (табл. 1, 2, А). В первый час после введения максимальное количество маркера введенных клеток было обнаружено в печени и селезенке. В течение первых суток происходит равномерное перераспределение трансплантированных клеток, максимальные значения на данном сроке отмечены в печени, селезенке, костном мозге, сердце, головном мозге, достоверных различий содержания маркера между данными органами не обнаружено. Минимальное количество Y-позитивных клеток обнаружено в коже (см. табл. 1, 2, А). Максимальные показатели накопления донорских клеток костного мозга через 1 месяц определялись в костном мозге и в селезенке. Через три месяца максимальное количество маркера клеток костного мозга определяется в костном мозге и в печени реципиента (см. табл. 1, 2, А).

**Таблица 1. Количественное распределение трансплантированных клеток костного мозга и спленоцитов по органам реципиента (M±δ)**

Время после трансплантации	1 час		24 часа		1 месяц		3 месяца	
	ККМ	спл	ККМ	спл	ККМ	спл	ККМ	спл
Печень	111±13,4	81,1±6,3	71,0±5,9	75,7±9,7	102,4±12,5	84,5±10,5	124,5±14,6	121,8±8,6
Селезенка	107,9±13,2	129,1±7,8	81,0±12,6	95,0±15,5	126,8±3,3	131,0±15,5	98,5±11,1	120,3±1,8
Костный мозг	93,4±8,5	97,1±8,2	65,1±7,7	84,5±8,2	137,9±17,4	88,3±6,9	131,9±7,9	98,9±7,8
Сердце	50,8±7,8	80,2±8,2	76,4±8,6	62,7±5,1	47,8±8,3	60,6±5,4	69,6±8,2	86,7±5,0
Лимфоузлы	87,3±5,5	108,3±8,4	43,8±13,7	102,3±8,6	85,0±10,7	138,6±14,5	43,2±7,7	133,0±6,3
Гол.мозг	61,4±8,6	34,5±11,0	84,8±11,2	71,8±7,2	81,8±8,1	72,8±9,7	96,7±9,1	25,8±6,5
кожа	9,59±2,4	1,1±0,3	12,8±4,0	3,2±1,1	25,0±7,4	17,5±6,7	10,9±3,5	25,3±4,4

**Примечание:** ККМ – клетки костного мозга, спл – спленоциты.

Через 1 ч после введения спленоцитов, максимальное количество маркера определяется в селезенке. Наряду с высоким показателем миграции клеток в селезенку, на данном сроке, клетки аккумулируются в лимфатических узлах и в костном мозге. Через 24 ч после трансплантации клетки распределяются более равномерно по органам, достоверных отличий между количеством Y-позитивных клеток в печени, селезенке, лимфатических узлах, костном мозге, головном мозге не обнаружено. Через 1 мес после введения клеток отмечается максимальное накопление трансплантированных клеток в селезенке и лимфатических узлах. Через 3 мес селезенка, лимфатические узлы, печень также содержали максимальное количество Y-позитивных клеток (табл. 1, 2, Б).

**Таблица 2. Достоверности различий полуколичественного содержания трансплантированных клеток костного мозга (А) и спленоцитов (Б) в органах реципиента**

А	1 час	24 часа	1 месяц	3 месяца
п/с	0,29	0,11	0,002	0,003
п/лу	0,00002	0,006	0,02	0,0002
п/сер	0,001	0,24	0,0007	0,0008
п/км	0,003	0,37	0,001	0,74
п/гм	0,001	0,94	0,004	0,003
п/к	<0,01	<0,01	0,003	0,0005
с/лу	0,002	0,004	0,0002	0,0002
с/сер	0,0001	0,19	0,0002	0,0009
с/км	0,003	0,08	0,13	0,0002
с/гм	<0,01	0,02	0,0002	0,36
с/к	<0,01	<0,01	0,0002	0,0003
лу/сер	0,002	0,0004	0,0008	0,002
лу/км	0,17	0,009	0,0002	0,0002
лу/гм	<0,01	0,0006	0,005	0,0007
лу/к	<0,01	<0,01	0,0008	0,29
сер/км	0,0005	0,04	0,0002	0,0002
сер/гм	0,01	0,17	0,0006	0,004
сер/к	<0,01	<0,01	0,03	0,004
км/гм	0,003	0,01	0,0002	0,0002
км/к	<0,01	<0,01	0,0002	0,0003
гм/к	<0,01	<0,01	0,002	0,002

Б	1 час	24 часа	1 месяц	3 месяца
п/с	0,003	0,09	0,002	0,70
п/лу	0,0002	0,1	0,0001	0,026
п/сер	0,74	0,07	0,004	<0,01
п/км	0,003	0,09	0,19	0,017
п/гм	0,0008	0,74	0,87	<0,01
п/к	0,002	0,0002	0,001	<0,01
с/лу	0,002	0,31	0,29	0,030
с/сер	0,0002	0,0004	0,0002	0,0002
с/км	0,0002	0,31	0,004	0,008
с/гм	0,0002	0,14	0,009	<0,01
с/к	0,0004	<0,01	<0,01	<0,01
лу/сер	0,009	<0,01	<0,01	0,0002
лу/км	0,049	0,2	0,003	0,0003
лу/гм	0,0003	0,002	0,001	<0,01
лу/к	0,0002	0,0002	<0,01	<0,01
сер/км	0,30	0,0006	0,0002	0,36
сер/гм	0,29	0,14	0,1	<0,01
сер/к	0,006	0,0002	0,89	<0,01
км/гм	0,0006	0,24	0,09	<0,01
км/к	0,0004	<0,01	<0,01	<0,01
гм/к	0,94	0,004	0,005	0,0002

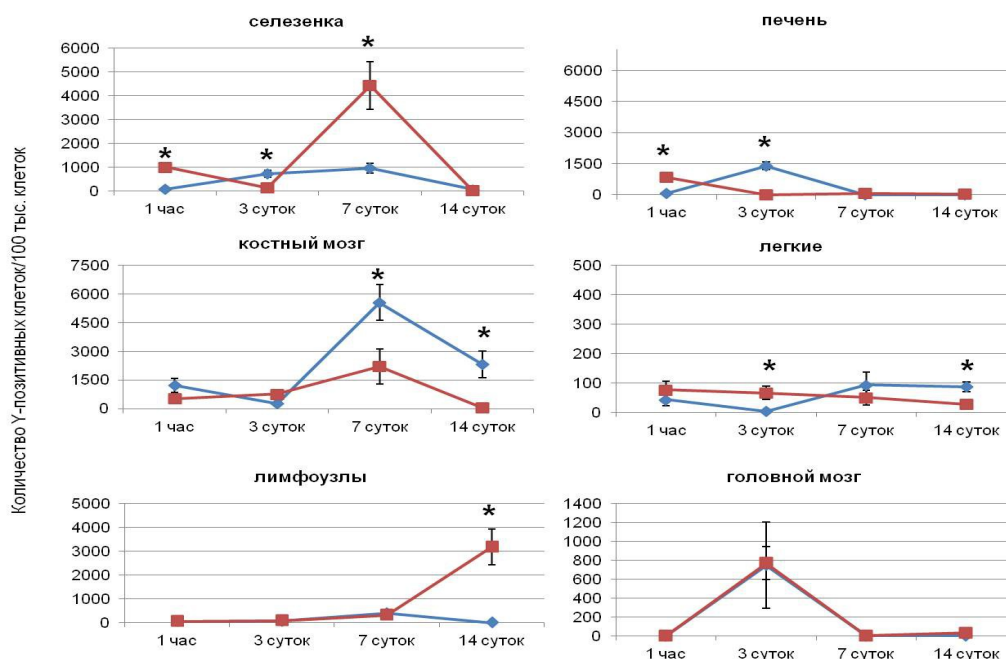
**Примечание:** п – печень, с – селезенка, км – костный мозг, сер – сердце, лу – лимфатические узлы, гм – головной мозг, к-кожа.

**Влияние меланомы В16 на миграционную активность неразделенной популяции клеток костного мозга.** Изучение влияния опухолевого роста на распределение трансплантированных клеток костного мозга показало, что количество трансплантированных ККМ в селезенке интактного реципиента через 1 час после введения значительно выше по сравнению с количеством трансплантированных клеток в селезенке реципиента-опухоленосителя ( $998 \pm 123$  и  $81 \pm 28$  Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток реципиента соответственно,  $p=0,00003$ ). На третьи сутки трансплантированные клетки выходят из селезенки интактного реципиента, тогда как у опухоленосителя количество мигрировавших клеток в селезенке возрастает ( $135 \pm 23$  и  $728 \pm 146$  Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток реципиента соответственно,  $p=0,000005$ ). Через неделю количество Y-позитивных клеток в селезенке интактного животного достигает своего максимума и значительно превышает показатель миграции Y-позитивных клеток в селезенку при опухолевом росте ( $4424 \pm 1005$  и  $947 \pm 203$  Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток реципиента соответственно,  $p=0,000055$ ). Через две недели количество трансплантированных ККМ в селезенке интактного реципиента падает и достоверно не отличается от показателя миграции на опухолевой модели ( $53 \pm 27$  и  $15 \pm 10$  Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток реципиента соответственно,  $p=0,034$ ) (рис.1).

Количество Y-позитивных клеток в костном мозге реципиентов-опухоленосителей через один час после трансплантации было достоверно больше, чем в костном мозге интактного реципиента ( $1213 \pm 358$  и  $529 \pm 126$  Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток реципиента соответственно,  $p=0,00002$ ). Через трое суток количество трансплантированных клеток в костном мозге реципиента-опухоленосителя снижается, в то время как в данном органе интактного реципиента происходит постепенное накопление трансплантированных клеток ( $251 \pm 97$  и  $754 \pm 242$  Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток реципиента соответственно,  $p=0,0002$ ). Через неделю после трансплантации происходит существенное повышение количества Y-позитивных клеток в костном мозге реципиента-опухоленосителя ( $5541 \pm 925$  Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток реципиента) и превышает количество трансплантированных клеток в костном мозге интактного реципиента ( $2193 \pm 921$  Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток реципиента) ( $p=0,00008$ ). Через две недели 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 КМ интактного реципиента ( $2309 \pm 695$  и  $42 \pm 20$  Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток реципиента соответственно,  $p=0,00009$ ) (рис. 1).



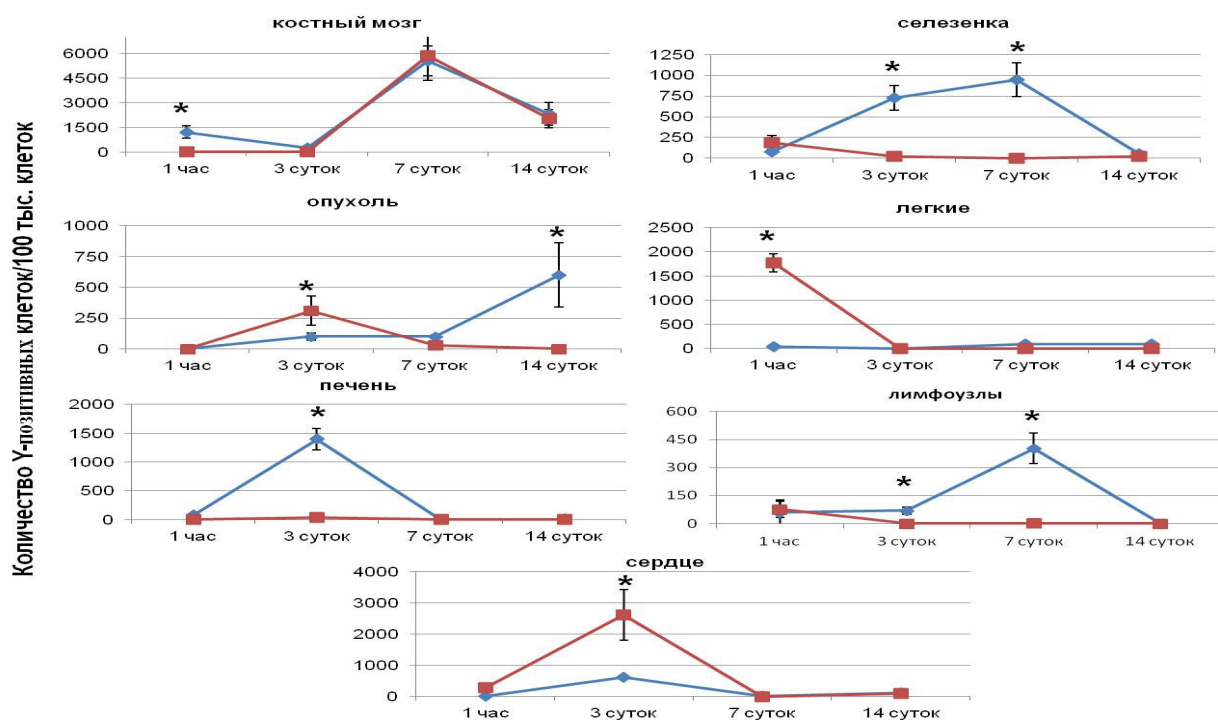
**Рис. 1.** Сравнительный анализ количественного распределения трансплантированных клеток костного мозга в норме и в условиях опухолевого роста методом ПЦР в режиме реального времени.

В качестве реципиентов – интактные самки мышей линии C57 Bl (■—■) и самки мышей C57Bl-носители меланомы B16 (◆—◆). По оси абсцисс – время после трансплантации клеток костного мозга. По оси ординат – количество Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток органов самки - реципиента. \* -  $p < 0,01$ .

**Влияние меланомы B16 на миграционную активность ММСК костного мозга.** Показано, что по мере роста опухоли, начиная с 9-х суток после прививки меланомы B16 (7-е сутки после трансплантации ММСК), максимальное количество Y-позитивных клеток определялось в костном мозге реципиента-опухоленосителя, тогда как у интактного реципиента в костном мозге определялось значительно более низкое количество введенных клеток ( $5850 \pm 1519$  и  $4 \pm 1$  Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток реципиента, соответственно,  $p=0,00007$ ). Также на данном сроке отмечалось большее количество трансплантированных клеток в опухолевой ткани по сравнению с остальными исследуемыми органами ( $30 \pm 8$  Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток реципиента). Через 14 сут после трансплантации ММСК (17 сут после прививки меланомы) костный мозг реципиента-опухоленосителя также содержал достоверно большее количество Y-позитивных клеток по сравнению с костным мозгом интактного реципиента ( $2010 \pm 540$  и  $39 \pm 15$  Y-позитивных клеток/ $10 \times 10^4$  клеток реципиента, соответственно,  $p=0,0003$ ).

**Распределение нефракционированной популяции клеток костного мозга и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в организме реципиента-носителя меланомы B16.** Было показано, что через час после трансплантации Y-позитивные ККМ определяются в основном в крови реципиента-опухоленосителя. В свою очередь, основная масса трансплантированных ММСК на данном сроке обнаружена в легких реципиента. На седьмые сутки после трансплантации клеток (опухоль достигает размеров  $\sim 0,9 \text{ см}^3$ ) как ККМ, так и ММСК активно мигрируют в костный мозг реципиента-опухоленосителя. Отмечается более высокий показатель миграции ККМ в опухоль, селезенку, лег-

кие, лимфоузлы и лимфоузлы, регионарные к опухоли по сравнению с ММСК (рис. 2).



**Рис. 2.** Сравнительный анализ количественного распределения трансплантированных ММСК 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. п – печень, с – селезенка, л – легкие, км – костный мозг, сер – сердце, лу – лимфатические узлы, лу/о – лимфатические узлы регионарные к опухоли, км – головной мозг, о – опухоль, к – кожа, кр – кровь.

Через 2 нед (опухоль достигает размеров  $\sim 2 \text{ см}^3$ ) обнаружено большее количество трансплантированных ККМ в костном мозге и опухоли реципиентов–опухоленосителей. Y-позитивные ММСК в основном определяются в костном мозге и лимфатических узлах регионарных к опухоли.

**Изучение распределения трансплантированных ККМ в органах реципиентов-носителей меланомы В16 при помощи флуоресцентной микроскопии.** Результаты, полученные при помощи флуоресцентной микроскопии криосрезов опухолевой ткани и других органов показали, что тканевая локализация меченых клеток изменяется в зависимости от времени после трансплантации.

В легких через 1 ч после трансплантации флуоресцентные клетки костного мозга определялись в просветах капилляров, в межальвеолярных перегородках, а также единичные меченые клетки содержались в просвете альвеол.

В печени флуоресцентные клетки находились в просветах капилляров в виде мелких групп (2 – 4 элемента). Капилляры красной пульпы селезенки также содержали мелкие скопления флуоресцентных клеток. В лимфатических узлах трансплантированные клетки локализовались в капиллярах.

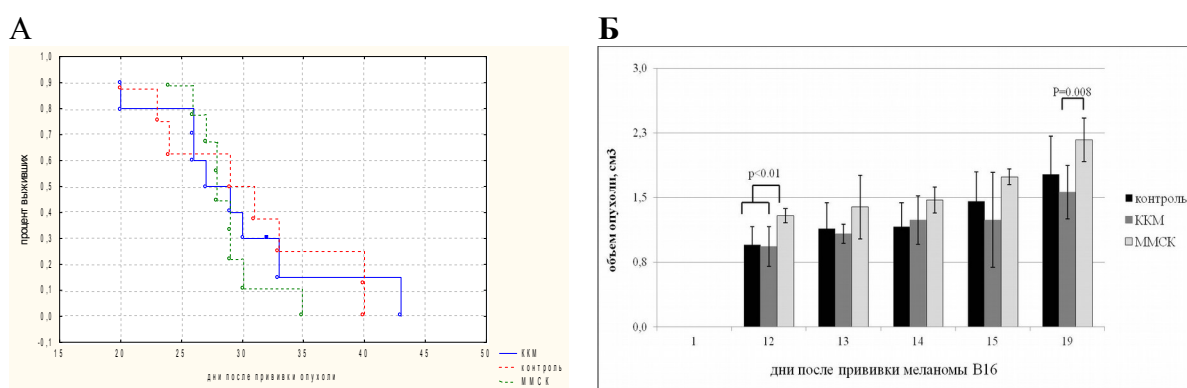
Через трое суток после введения, Ноеchst–позитивные клетки были обнаружены в эпителии среднего бронха легких реципиентов. В селезенке на данном сроке окрашенные клетки образовывали мелкие группы в красной пульпе. В лимфоузлах трансплантированные клетки локализовались в корковом слое.

Через неделю после трансплантации клеток костного мозга (11 сут после прививки

опухоли) существенное содержание меченых клеток отмечалось в мозговом веществе лимфоузлов (мозговые синусы, мягкотные тяжи). В легких флуоресцентные клетки располагались в альвеолярной ткани и в эпителии бронхов среднего калибра. В печени и селезенке регистрировались единичные меченые трансплантированные клетки в паренхиме. В костном мозге и опухолевой ткани клетки костного мозга располагались диффузно. В сердце на данном сроке флуоресцентные клетки определялись в эндотелии капилляров миокарда.

Через 2 нед флуоресцентно-меченные клетки диффузно располагались в костном мозге реципиента и в ткани опухоли.

**Анализ влияния трансплантации неразделенной фракции костного мозга и ММСК на выживаемость животных и рост опухоли.** Было показано, что внутривенная трансплантация ККМ и ММСК на третьи сутки после прививки опухоли по сравнению с контрольной группой достоверно не повлияла на выживаемость животных–опухоленосителей ( $p=0,93$ , разницу считали достоверной при  $p<0,01$ ) (рис. 3А).



**Рис. 3.** Влияние трансплантации клеток костного мозга и ММСК на выживаемость животных–опухоленосителей меланомы В16 по Каплану-Майеру (А) и рост опухоли (Б).

В результате анализа влияния трансплантации клеток было показано, что на 12 сутки после прививки опухоли (9 суток после трансплантации клеток) объем опухоли в группе ММСК был достоверно больше по сравнению с группой ККМ и контрольной группой. Через 19 суток после прививки меланомы В16 объем опухоли в группе ММСК был достоверно больше по сравнению с группой ККМ. В свою очередь размеры меланомы В16 в группе ККМ и контрольной группе достоверно не отличались (рис. 3Б).

**Разработка биочипа для оценки миграционной активности изучаемых клеток.** Была проведена количественная нормировка контрольного олигонуклеотида, в результате чего был определен диапазон рабочей концентрации нормировочных олигонуклеотидов, который составляет 0,3-25  $\mu\text{M}$ , при дальнейшем увеличении концентрации происходит насыщение поверхности аминослайда. Проведено сравнение результатов микрочипового анализа, анализа флуоресценции электрофореграмм и данных, полученных при помощи ПЦР в режиме реального времени. Показано, что максимальное количество Y-позитивных клеток определено в печени и селезенке тремя способами, минимальное в коже реципиента. Всеми тремя способами показано, что в лимфатических узлах маркера трансплантированных клеток больше, по сравнению с сердцем реципиента, количество маркера трансплантированных клеток в печени и селезенке реципиента не отличалось достоверно. Таким образом, показано удовлетворительное количественное соответствие результатов микрочипового анализа, результатов анализа электрофореграмм и данных, полученных при помощи ПЦР в режиме реального времени.

## ВЫВОДЫ

1. Клетки костного мозга и клетки селезенки, маркируемые по Y-хромосоме, мигрируют как в лимфоидные (лимфатические узлы, селезенку, костный мозг), так и в не лимфоидные органы (печень, сердце, головной мозг, кожу) сингенных реципиентов и определяются в течение 3 мес наблюдения.

2. Интенсивность миграции клеток костного мозга и селезенки различается и варьирует в зависимости от органа и срока после введения. Минимальные показатели миграции и/или накопления Y-позитивных клеток костного мозга и спленоцитов донора характерны для кожи через 24 ч после трансплантации. Максимальные показатели миграции спленоцитов в лимфатические узлы через 1 мес после трансплантации достоверно выше по сравнению с показателями миграции клеток костного мозга.

3. 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.

4. Обнаружена миграция спленоцитов в костный мозг. Максимальные показатели миграции и/или накопления Y-позитивных спленоцитов донора регистрируются в костном мозге через 24 ч, затем эти показатели снижаются и достоверно ниже показателей миграции клеток костного мозга.

5. Развитие у мышей меланомы B16 стимулирует процессы миграции трансплантированных клеток костного мозга и мезенхимальных стромальных клеток в костный мозг.

6. Выделенные из костного мозга мезенхимальные стромальные клетки мигрируют из периферической крови в опухолевую ткань меланомы B16 с меньшей интенсивностью в сравнении с общей популяцией клеток костного мозга.

7. Разработанный в процессе работы биочип для идентификации последовательности ДНК Y-хромосомы позволяет получать сопоставимые с ПЦР результаты для одномоментной оценки распределения меченых клеток по различным органам и тканям реципиента.

## Список сокращений

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

ККМ – клетки костного мозга

КМ – костный мозг

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Повещенко О.В., Колесников А.П., Ким И.И., Ульянов Е.В., Можжерина А.Н., Янкайте Е.В., Соловьева А.О., Гертер Т.В., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. Способы выделения и условия культивирования мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека, полученной из различных источников // **Бюллетень СО РАМН. – 2008. – № 5. – С. 90-95.**

2. Коненков В.И., Соловьева А.О., Повещенко А.Ф., Повещенко О.В., Шевченко А.В. Исследование миграции клеток костного мозга в лимфоидные и нелимфоидные органы в условиях трансплантации *in vitro* сингенным реципиентам с использованием генетических маркеров // **Вестник лимфологии. – 2011. – № 2. – С. 7-13.**

3. Соловьева А.О., Повещенко А.Ф., Шевченко А.В., Повещенко О.В., Коненков В.И. Изучение динамики миграционной активности клеток костного мозга в условиях сингенной трансплантации *in vivo* у мышей СВА // **Бюллетень ВСНЦ ЭЧ СО РАМН. – 2011. –**

№ 3 (79). – С. 221-226.

4. Соловьева А.О., Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., Коненков В.И., Караськов А.М. Изучение миграции трансплантированных клеток костного мозга в ткань сердца // **Патология кровообращения и кардиохирургия.** – 2012. – № 3. – С. 75-79.

5. Коненков В.И., Покушалов Е.А., Повещенко О.В., Ким И.И., Романов А.Б., Гульева Н.А., Бернвальд В.В., Соловьева А.О., Янкайте Е.В., Повещенко А.Ф., Караськов А.М. [Характеристика фенотипа мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью](#) // **Клеточные технологии в биологии и медицине.** – 2012. – № 1. – С. 9-13.

6. Соловьева А.О., Повещенко А.Ф., Повещенко О.В., Зубарева К. Э., Миллер Т. В., Коненков В. И. Сравнительное исследование миграции и распределения донорских клеток костного мозга и селезенки в лимфоидные и нелимфоидные органы в разные сроки после трансплантации *in vivo* у мышей СВА // **Бюллетень СО РАМН.** – 2013. – № 4 (33). – С. 35-41.

7. Соловьева А.О., Зубарева К.Э., Повещенко А.Ф., Нечаева Е.А., Коненков В.И. Способы мечения клеток для визуализации *in vivo* // **Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.** – 2013. – Т. VIII (4). – С. 33-38.

8. Повещенко А.Ф., Соловьева А.О., Шевченко А.В., Коненков В.И. Использование Sry-гена, как маркера миграции трансплантированных клеток костного мозга в эксперименте // Сборник тезисов симпозиума IV Всероссийский симпозиум с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». – Санкт-Петербург, 2010. – С. 104-106.

9. Соловьева А.О., Повещенко А.Ф., Шевченко А.В., Коненков В.И. Современные методические подходы изучения миграции клеток с использованием генетических маркеров// Сборник научных трудов «VII всероссийской конференции по патологии клетки». – Москва, 2010. – С. 234-235.

10. Коненков В.И. Повещенко А.Ф., Шевченко А.В., Соловьева А.О., Повещенко О.В. Современные методы изучения миграции клеток в лимфологии // Материалы «IV Съезда лимфологов России». – Москва, 2011. – С. 72.

11. Соловьева А.О., Повещенко А.Ф., Шевченко А.В., Повещенко О.В., Коненков В.И. Изучение миграции клеток костного мозга в головной мозг // Материалы X Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии». – Новосибирск, 2011. – С. 275-276.

12. Solovieva A.O., Poveshchenko A.F., Zubareva K.E., Poveshchenko O.V., Konenkov V.I. Distribution of the lymphoid cells of various functional activity after transplantation // Book of abstracts of 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology. – Milan, Italy, 2013. – P 963.

13. Zubareva K.E., Solovieva A.O., Poveshchenko A.F., Gritsyuk O.B., Nechaeva E.A, Konenkov V.I. Spatial distribution of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in recipient's organs in the B16 melanoma model // Book of abstracts of 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology. – Milan, Italy, 2013. – P. 966.

14. Повещенко А.Ф., Соловьева А.О., Зубарева К.Э., Грицык О.Б., Авроров П.А., Повещенко О.В., Шурлыгина А.В., Труфакин В.А., Коненков В.И. Сравнительный анализ миграционной активности мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и неразделенной фракции клеток костного мозга после трансплантации животным опухоленосителям меланомы B16 // Материалы XI Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии». – Новосибирск, 2013. – С. 250-254.

15. Соловьева А.О., Повещенко А.Ф., Повещенко О.В., Зубарева К.Э., Миллер Т.В., Покушалов Е.А., Караськов А.М., Коненков В.И. Сравнительное исследование миграции и распределения донорских клеток костного мозга и селезенки в лимфоидные и нелимфоидные органы *in vivo* у мышей СВА // Материалы XI Международной конференции «Фунда-

ментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии». – Новосибирск, 2013. – С. 300-305.

16. Миллер Т.В., Соловьева А.О., Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. Использование генетического маркера при исследовании миграции клеток костного мозга в тимус // Материалы XI Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии». – Новосибирск, 2013. – С. 199-200.

17. Авроров П.А., Леготина Е.В., Соловьева А.О., Шундрин Л.А., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. Микрочиповая методика анализа распределения и динамики клеток костного мозга, трансплантированных в организм мыши линии СВА // Материалы XI Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии». – Новосибирск, 2013. – С. 13-16.

18. Соловьева А.О., Зубарева К.Э., Повещенко А.Ф., Нечаева Е.А. Распределение клеток костного мозга после трансплантации в норме и в условиях опухолевого роста // Сборник тезисов «I Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов». – Новосибирск, 2014. – С. 39-40.