

Д. В. Черкашина, А. С. Лебединский, Ю. А. Петренко,
Н. И. Штеменко*, А. Ю. Петренко

ТОРМОЖЕНИЕ РОСТА КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА У КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА И БИОРЕГУЛЯТОРОВ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК

(Представлено акад. НАН Украины А. М. Гольцевым)

Исследовано влияние мезенхимальных стромальных клеток (МСК) жировой ткани взрослого человека и бесклеточных биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток (БСПК) на развитие карциномы Герена у крыс. В качестве источника БСПК использовали цитозоль фетальных тканей человека мезенхимально-мезодермального происхождения (8–10 недель гестации). Эксперименты начинали на 8-е сут после инокуляции опухоли, БСПК и МСК вводили внутривентально. Установлено, что в течение периода наблюдения в контрольной группе погибло почти 50 % животных, в БСПК-группе — лишь 20 %, а в МСК-группе выживаемость достигла 100 %. Введение животным как БСПК, так и МСК к 21-м сут эксперимента на 40 % тормозило рост опухоли. Эти различия начали проявляться с 16-х сут эксперимента, сопровождаясь повышением сывороточных маркеров повреждения, и сохранялись до его конца. Обсуждаются возможные механизмы реализации эффектов БСПК и МСК, в том числе путем регуляции прооксидантно-антиоксидантного баланса в опухоли. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения бесклеточных БСПК и МСК, выделенных из жировой ткани взрослых доноров, в комплексной терапии низкодифференцированных опухолей.

Ключевые слова: карцинома Герена, мезенхимальные стромальные клетки, биорегуляторы стволовых и прогениторных клеток, торможение роста опухоли, прооксидантно-антиоксидантный баланс, восстановленный глутатион.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61015 Харьков

*Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара,

49050 Днепропетровск

© Д. В. Черкашина — к.б.н. (daria_cherkashina@ukr.net), А. С. Лебединский — к.б.н.,

Ю. А. Петренко — к.б.н., Н. И. Штеменко — д.б.н., А. Ю. Петренко — д.б.н., 2010.

В настоящее время не вызывает сомнения актуальность поиска новых подходов к терапии злокачественных новообразований. Пристальное внимание исследователей в области экспериментальной и клинической онкологии привлекают мезенхимальные стромальные клетки (МСК) разного происхождения. Основной причиной такого интереса является способность этих клеток мигрировать в опухоль и интегрироваться в ее строму [27], что позволяет рассматривать их в качестве носителей для селективных агентов, поражающих только трансформированные клетки. При этом следует отметить, что клетки стромы выполняют в организме широкий спектр функций, принимая участие в регуляции различных процессов, в том числе пролиферации и дифференцировки, поэтому они способны активно влиять на развитие новообразований.

До сих пор не существует однозначного мнения о влиянии МСК на развитие опухолей, так как в разных модельных системах показано, что они способны ингибировать, стимулировать или вовсе не влиять на рост опухоли. Так, например, резко выраженное торможение опухолевой прогрессии наблюдалось на моделях карциномы Льюиса и саркомы Капоши [15, 16, 22]. Другими авторами показано, что введение фетальных или зрелых МСК совместно с опухолевыми клетками может способствовать росту опухоли, который сопровождается более обширным некрозом и ангиогенезом по сравнению с мышами, которым вводили только опухолевые клетки [15]. Кроме того, в некоторых случаях при введении реципиенту опухолевых клеток образование опухоли происходит только в присутствии МСК, при этом злокачественный процесс развивается независимо от места введения МСК. На модели рака яичников не выявлено влияния МСК, выделенных из костного мозга или из жировой ткани, на опухолевый рост [15]. И, наконец, на модели опухоли *Renca* показано, что МСК оказывали различное действие на кинетику подкожного опухолевого роста, что зависело от соотношения количества вводимых клеток опухоли и МСК: скорость роста опухоли не изменялась при введении эквивалентного количества клеток, увеличивалась при 10-кратном увеличении количества МСК, а при 10-кратном уменьшении происходила полная редукция новообразования [15]. Таким образом, существующие на сегодня данные свидетельствуют, что направленность влияния МСК зависит от целого ряда факторов, в том числе этиологии новообразования.

МСК обладают основными свойствами мультипотентных стволовых клеток, способны к самоподдержанию и дифференцировке в нескольких направлениях. МСК взрослого организма обнаружены и выделены не только из костного мозга, но и из кожи, жировой и мышечной тканей, головного мозга и т. д. [26]. Наше внимание привлекли стромальные клетки, изолированные из жировой ткани и выделяющиеся простотой получения (малоинвазивная технология) при наличии всех необходимых характеристик, позволяющих отнести эти клетки к МСК [5].

В настоящее время уже сформулирована и доказана концепция приоритета паракринного действия МСК на окружающие клетки. Это связано с широким спектром продуцируемых ими биологически активных веществ, в том числе цитокинов, факторов роста, хемокинов и других субстанций [24, 33]. Именно этими свойствами некоторые авторы объясняют и противоопухолевую активность МСК

[22, 27]. В нашей лаборатории в течение нескольких лет проводились исследования влияния бесклеточного цитозоля фетальных тканей мезенхимально-мезодермального происхождения, содержащего белковые и пептидные биорегуляторы стволовых и прогениторных клеток (БСПК), на течение ряда экспериментальных патологий. Показана эффективность его применения при остром токсическом гепатите, хроническом отравлении алкоголем, циррозе печени и на модели долгосрочного гипотермического хранения изолированной печени [12, 13, 17, 20]. Было выявлено позитивное действие БСПК на прооксидантно-антиоксидантное, энергетическое, метаболическое и морфологическое состояние поврежденных органов. Эти факты определили наш выбор цитозоля фетальных тканей в качестве “препарата сравнения” для МСК, позволяющего дифференцировать действие биологически активных веществ и, собственно, клеток.

Интенсивность свободнорадикальных процессов в опухолевых клетках является важной характеристикой их резистентности к экзогенным воздействиям, и “неуязвимость” трансформированных клеток приписывают именно высокой активности системы антиоксидантной защиты, которая эффективно препятствует развитию оксидативных повреждений клеток опухоли [18]. Важнейшую роль в этой защите отводится восстановленному глутатиону (*GSH*), высокий уровень которого предупреждает активацию апоптотического пути гибели клеток [34]. Нами было показано, что БСПК нормализуют прооксидантно-антиоксидантный баланс в печени и головном мозге крыс при токсических повреждениях, однако вопрос направленности их действия, равно как и МСК, в случае развития солидной опухоли оставался открытым.

В качестве тест-системы мы использовали карциному Герена — классическую модель низкодифференцированной, нематазирующей солидной опухоли, которая в короткие сроки интенсивно прогрессирует и приводит к значительной смертности экспериментальных животных.

Таким образом, целью работы было изучение действия МСК и цитозоля фетальной ткани (ЦФТ) на выживаемость животных, опухолевую прогрессию и прооксидантно-антиоксидантный баланс в опухоли у крыс с карциномой Герена.

Материал и методы. Эксперименты проводили на разнополых крысах линии Вистар ($n = 37$), предоставленных Днепропетровским аграрным университетом. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Этического комитета Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, согласованными с “Общими принципами экспериментов на животных”, принятыми на I Национальном конгрессе по биоэтике (Киев, 2004) на основании правил “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других исследовательских целях” (Страсбург, 1986). Для наркоза использовали диэтиловый эфир.

Получение МСК и БСПК. МСК человека были получены, как описано в работе [5], из жировой ткани взрослого донора после его письменного согласия. В качестве источника БСПК использовали ЦФТ мезенхимально-мезодермального происхождения человека 8–10 недель гестации (полученных после письменного разрешения

донора в результате планового прерывания беременности). Гомогенат тканей подвергали двухэтапному высокоскоростному ультрацентрифугированию для получения постмикросомальной фракции (содержащей водорастворимые компоненты) [12, 13]. БСПК хранили при температуре -80°C (в условиях морозильной камеры). Все работы по получению БСПК и МСК проводили в стерильных условиях.

Экспериментальная модель. Для формирования модели карциномы Герена животным подкожно в область бедра вводили 20 % суспензию клеток опухоли. Эксперименты начинали на 8-е сут после перевивания [32], когда животным внутрибрюшинно вводили физиологический раствор, БСПК или МСК. Животные были подразделены на следующие группы: 1 — интактная (норма — животные не подвергались какому-либо воздействию), 2 — контрольная (введение физиологического раствора из расчета 0,3 мл/100 г), 3 — БСПК-группа (введение ЦФТ из расчета 0,3 мл/100 г), 4 — МСК-группа (введение суспензии МСК в количестве 350000 кл./0,3 мл).

Наблюдение за животными осуществляли в течение 21 сут, после чего выводили из эксперимента путем декапитации. На 8-е, 13-е, 16-е и 21-е сут после инокуляции производили забор крови из хвостовой вены для изучения маркеров повреждения.

В ходе наблюдений контролировалась смертность в экспериментальных группах; на 9-е, 13-е, 16-е и 21-е сут после инокуляции измеряли размер опухоли для оценки динамики увеличения объема *in vivo*. Размеры определяли при помощи штангенциркуля путем замера наибольшего и наименьшего диаметров. Объем опухоли (см^3) рассчитывали согласно формуле

$$A \cdot B^2 / 2,$$

где A — наибольший диаметр опухоли, B — наименьший диаметр опухоли [11]. После выведения животных из эксперимента опухоль выделяли и определяли ее массу. Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле

$$\text{ТРО} = 100 (V_k - V_o) / V_k,$$

где V_k — объем (масса) опухоли в контрольной группе, V_o — объем (масса) опухоли в опытной группе.

Биохимический анализ. Биохимический анализ проводили при помощи спектрофотометра “Cary-50” (Австралия). В сыворотке крови исследовали активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и содержание ТБК-активных продуктов при помощи экспресс-наборов “LaChema” (Чехия). Гомогенаты опухоли (20 %, w/v) готовили на 50 мМ трис-НСl, 50 мМ NaCl (pH 7,4).

Базальный уровень ТБК-активных продуктов определяли в гомогенатах опухоли по методу [21], основанному на колориметрии интенсивности поглощения комплекса вторичных продуктов ПОЛ с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). К 0,2 мл гомогената приливали 3 мл 2 % ортофосфорной кислоты, затем вносили 1 мл 0,8 % ТБК. Пробу кипятили на водяной бане 45 мин. После охлаждения приливали 4 мл *n*-бутанола, перемешивали и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин. Интенсивность поглощения бутанольной фракции (пмоль ТБК-активных продуктов/мг белка) определяли против холостой пробы при 535 нм.

Интенсивность индуцированного ПОЛ определяли по скорости накопления ТБК-активных продуктов в ходе инкубации гомогенатов опухоли в прооксидант-

ном буфере, содержащем 0,25 мМ аскорбата и 12 мкМ FeSO_4 , при 37 °С [8]. Аликвоты суспензии отбирали в начале и в конце инкубации. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 30 % ТХУ на льду. Затем приливали 0,5 мл H_2O , пробы центрифугировали 10 мин при 3000 об./мин. К супернатанту приливали 0,1 мл 5М HCl и 1 мл 0,6 % ТБК и помещали в кипящую водяную баню на 15 мин. После охлаждения в пробах измеряли поглощение при 535 нм. Интенсивность индуцированного ПОЛ выражали в пмоль ТБК-активных продуктов/(мин·мг белка).

Активность ферментов системы антиоксидантной защиты в гомогенатах опухоли измеряли при постоянном термостатировании и перемешивании. Условия определения для каждого из них были следующие: каталаза — 0,01 М К-фосфатный буфер (pH 7,4), 0,5 мМ ЭДТА, 15 мМ H_2O_2 , $t = 37$ °С, длина волны 240 нм [7]; GSH-пероксидаза — 0,3 М KH_2PO_4 (pH 7,0), 3 мМ ЭДТА, 1,5 мМ NaN_3 , 32,5 мМ GSH, 7,5 мМ H_2O_2 , $t = 23$ °С, длина волны 260 нм [29]; GSH-редуктаза — 0,1 М К-фосфатный буфер (pH 7,4), 0,1 мМ NADPH, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мМ GSSG, $t = 37$ °С, длина волны 340 нм [10]; Г6ФДГ — 0,13 М трис- HCl (pH 7,6), 80 мМ MgCl_2 , 3,5 мМ NADP^+ , 7,5 мМ глюкозо-6-фосфата, $t = 37$ °С, длина волны 340 нм [30].

Содержание восстановленного глутатиона в опухоли оценивали по интенсивности образования его комплекса с аллоксаном, который имеет максимум поглощения при 305 нм [6]. Содержание белка в гомогенатах опухоли определяли биуретовым методом, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин V фракции ("Sigma", США).

Данные выражали в виде $M \pm m$. Достоверность различий определяли по непараметрическому критерию Вилкоксона—Манна—Уитни.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что в течение периода наблюдения в контрольной группе погибло почти 50 % животных (смертность особенно увеличилась в последние дни эксперимента). В БСПК-группе количество погибших крыс снизилось до 20 %, а в МСК-группе наблюдалась 100 %-я выживаемость животных до конца эксперимента (рис. 1). Как видно из рис. 2, в течение всего срока наблюдения (с 9-х по 21-е сут после инокуляции) на всех этапах наблюдалось значительное увеличение объема опухоли. При этом, независимо от группы, значения на каждом последующем этапе были достоверно выше, чем на предыдущем. Так, в контрольной группе на 13-е сут объем увеличивался в 4,6 раза по сравнению с 9-ми, на 16-е — в 2,1 раза по сравнению с 13-ми, а на 21-е — в 2 раза по сравнению с 16-ми.

Введение животным как МСК, так и БСПК на начальных этапах наблюдения (9-е и 13-е сут после инокуляции) не влияло на динамику роста опухоли. Так, на 9-е сут объем опухоли в контрольной группе составил $(2,3 \pm 0,8)$ см³, в БСПК-группе — $(2,6 \pm 0,4)$ см³, а в МСК-группе — $(3,9 \pm 1,8)$ см³. Однако уже с 16-х суток наблюдалось досто-

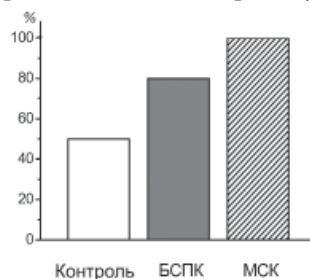


Рис.1. Выживаемость животных с карциномой Герена под влиянием БСПК и МСК.

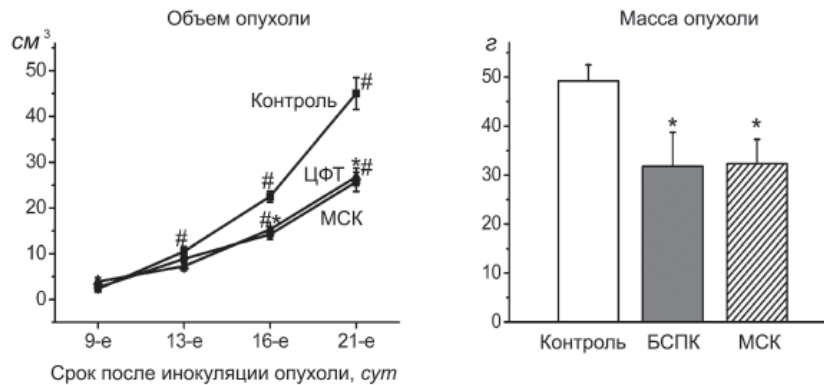


Рис. 2. Динамика роста и масса карциномы Герена у крыс на 21-е сут эксперимента; * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем, # — $P < 0,05$ по сравнению с предыдущим сроком наблюдения.

верное снижение (в 1,5 раза) объема опухоли в МСК — и БСПК-группах по сравнению с контрольной. К концу эксперимента достоверные различия сохранились: объем опухоли стал меньше в 1,7 раза и был на уровне $(45,0 \pm 7,9)$ см³ (контроль), $(25,7 \pm 4,7)$ см³ (БСПК-группа) и $(26,8 \pm 3,8)$ см³ (МСК-группа) (см. рис. 2). Расчет коэффициента ТРО по объему показал, что как для БСПК, так и для МСК он составляет 40–43 %.

Так как при оценке объема опухоли существует вероятность ошибки, обусловленная человеческим фактором, после декапитации животных опухоли извлекали и определяли их массу. При этом полученные относительно объема данные подтвердились: масса новообразования в МСК — и БСПК-группах была ниже, чем в контрольной, в 1,5 раза и находилась на уровне $(49,2 \pm 3,3)$ г, $(31,8 \pm 3,1)$ г и $(32,3 \pm 2,5)$ г для контрольной, БСПК и МСК-групп, соответственно (см. рис. 2). В данном случае коэффициент ТРО составил 35 % для обеих экспериментальных групп.

При исследовании общепринятых маркеров повреждения тканей в сыворотке крови животных контрольной группы наблюдалась следующая картина: активность ЛДГ на 8-е сут после инокуляции была выше нормы в 2,9 раза, а на 13-е и 16-е — в 9 раз выше нормы и в 3 раза по сравнению с 8-ми сут наблюдения. К концу эксперимента активность ЛДГ в сыворотке несколько снижалась, но оставалась выше значений нормы в 5,8 раз. Введение крысам с карциномой БСПК или МСК достоверно снижало ее на 13-е сут эксперимента в 2–2,5 раза, причем этот эффект сохранялся для МСК-группы и на 16-е сут. В конце срока наблюдения активность ЛДГ в опытных группах находилась на уровне контроля (рис. 3).

Уровень ТБК-активных продуктов в сыворотке крови животных с карциномой Герена повышался на 8-е сут эксперимента на 20 %, а на 13-е — в 2 раза по сравнению со значениями нормы. На 16-е и 21-е сут после инокуляции он вновь снижался, продолжая превышать нормальные значения на 40 % и 20 %, соответственно. После введения МСК и БСПК на 13-е сут изменений по сравнению с кон-

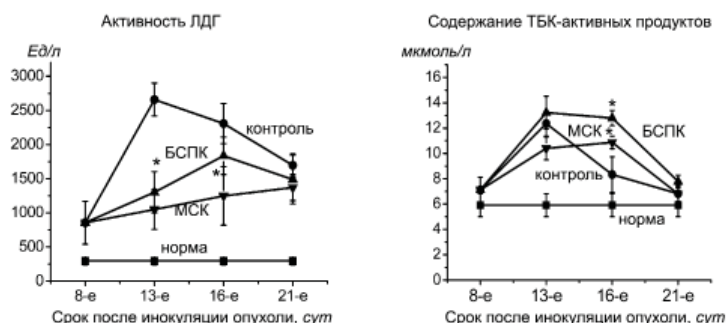


Рис. 3. Влияние БСПК и МСК на динамику маркеров повреждения в сыворотке крови крыс с карциномой Герена; * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

тролем не наблюдалось. На 16-е сут, когда в контроле наблюдалось снижение содержания ТБК-активных продуктов в сыворотке крови, в опытных группах значения этого показателя оставались на высоком уровне, превышая значения контроля в 1,3–1,5 раза. К концу эксперимента эти различия исчезали (см. рис. 3).

Таблица 1

Влияние БСПК и МСК на базальный уровень и скорость накопления ТБК-активных продуктов в опухоли крыс с карциномой Герена

Группа	Базальный уровень, нмоль/мг белка	Интенсивность индуцированного ПОЛ, нмоль/(мин·мг белка)
Контроль	$99,6 \pm 23,5$	$23,4 \pm 4,4$
БСПК	$115,0 \pm 11,8$	$23,9 \pm 4,4$
МСК	$82,4 \pm 14,7^*$	$23,1 \pm 3,7$

Примечание: * — $P < 0,05$ по сравнению с БСПК-группой.

Как видно с табл. 1, введение БСПК или МСК практически не влияло на базальный уровень ТБК-активных продуктов в опухоли по сравнению с контролем, хотя в МСК-группе наблюдалось его снижение в 1,4 раза по сравнению с БСПК-группой. При этом ни БСПК, ни МСК не влияли на интенсивность индуцированного ПОЛ в гомогенатах опухоли, характеризующую реактивность и чувствительность прооксидантной системы к экзогенным воздействиям.

При определении содержания восстановленного глутатиона в опухоли установлено, что введение животным БСПК снижало его в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой — $(0,82 \pm 0,03)$ мкмоль GSH/г ткани и $(1,24 \pm 0,2)$ мкмоль GSH/г ткани, соответственно. Применение МСК в данном случае оказалось более эффективным: уровень глутатиона в опухоли снижался в 3 раза по сравнению с контрольной группой, в 2 раза — по сравнению с БСПК-группой и достигал значений $(0,42 \pm 0,1)$ мкмоль GSH/г ткани (рис. 4).

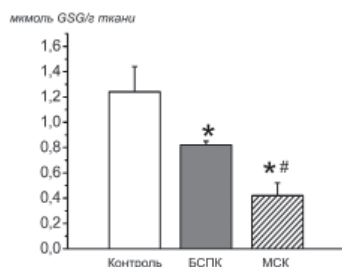


Рис.4. Влияние БСПК и МСК на содержание восстановленного глутатиона в карциноме Герена; * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем, # — $P < 0,05$ по сравнению с БСПК-группой.

Состояние системы антиоксидантной защиты в опухоли оценивали по активности ключевых ферментов — каталазы, *GSH*-пероксидазы, *GSH*-редуктазы и Г6ФДГ. Полученные данные свидетельствуют, что введение БСПК не влияло на каталазную, *GSH*-пероксидазную и Г6ФДГ активности в опухоли, вызывая повышение только *GSH*-редуктазной активности в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

В случае применения МСК наблюдалось достоверное двукратное снижение только каталазной активности по сравнению как с контролем, так и с БСПК-группой. Активности же остальных изученных ферментов оставались практически на уровне контрольной группы (см. табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют, что применение МСК из жировой ткани или бесклеточных БСПК, полученных из фетальных тканей мезенхимально-мезодермального происхождения, позволяет снизить опухолевую прогрессию у крыс с карциномой Герена и повысить выживаемость животных: при введении БСПК — до 80 %, а при использовании МСК — до 100 %. Эти эффекты сопровождаются определенными изменениями в динамике сывороточных маркеров повреждения и состоянии прооксидантно-антиоксидантной системы опухоли. Тем не менее, выявленные изменения представляются недостаточными для объяснения высокой эффективности использованных препаратов, хотя и демонстрируют несомненные различия в реализации эффектов бесклеточных биологически активных веществ и МСК.

Несомненно, что по сравнению биохимическими аспектами реализации эффектов противоопухолевой терапии показатель выживаемости является абсолютно

Таблица 2

Влияние БСПК и МСК на состояние системы антиоксидантной защиты в опухоли крыс с карциномой Герена

Группа	Каталазная активность, $\mu\text{моль } \text{H}_2\text{O}_2 / (\text{мин} \cdot \text{мг белка})$	<i>GSH</i> -пероксидазная активность, $\text{нмоль SSG} / (\text{мин} \cdot \text{мг белка})$	<i>GSH</i> -редуктазная активность, $\text{нмоль НАДФН} / (\text{мин} \cdot \text{мг белка})$	Г6ФДГ-активность, $\text{нмоль НАДФН} / (\text{мин} \cdot \text{мг белка})$
Контроль	$150,6 \pm 14,7$	$98,1 \pm 15,2$	$4,4 \pm 0,4$	$25,3 \pm 6,1$
БСПК-группа	$141,3 \pm 14,9$	$83,3 \pm 10,1$	$6,8 \pm 2,0^*$	$26,4 \pm 5,4$
МСК-группа	$76,9 \pm 14,3^{* \#}$	$107,0 \pm 20,2$	$5,6 \pm 1,6$	$20,9 \pm 4,5$

Примечание: * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем, # — $P < 0,05$ по сравнению с БСПК-группой.

приоритетным. Полученные в данной работе результаты представляются достаточно обнадеживающими; особенно это касается МСК-группы, в которой гибели животных до конца эксперимента не наблюдалось. В то же время, что касается коэффициента торможения роста опухоли, он, вероятно, не является абсолютным критерием для оценки эффективности воздействия, так как в этом случае никаких различий между БСПК — и МСК-группами мы не наблюдали. Здесь хотелось бы отметить, что сравнение однократного введения живых клеток и бесклеточных биологически активных веществ с небольшим сроком жизни при достаточно длительном сроке наблюдения, возможно, не является корректным. Вполне вероятно, что повторное введение БСПК могло бы способствовать улучшению полученных результатов, однако, в рамках данного эксперимента нас больше интересовал вопрос дифференцирования паракринного и, собственно, клеточного эффекта МСК.

При рассмотрении динамики опухолевой прогрессии и влияния на нее БСПК и МСК привлекает внимание тот факт, что реализация эффекта начинается только на 16-е сут после инокуляции и на 8-е после воздействия. Если в случае применения клеток этот эффект может быть связан со временем, необходимым для “распознавания” очага, миграции, встраивания и адаптации к микроокружению, то в случае с бесклеточными биорегуляторами всеми этими этапами можно пренебречь. Поэтому вопрос, в чем заключается причина наличия “лаг-фазы” для БСПК, остается открытым.

Неожиданные результаты были получены нами в отношении эффективности использования для оценки состояния организма общепринятых маркеров повреждения. Наиболее четко отражающим изменения в организме крыс-носителей карциномы Герена показателем оказалась ЛДГ, что, в целом, является известным фактом. Однако вызвало удивление, что к концу эксперимента, на этапе максимального увеличения размеров опухоли и количества погибших животных в контрольной группе, происходило значительное снижение значений данного показателя. Те же сомнения можно отнести и к содержанию ТБК-активных продуктов в сыворотке крови животных; здесь оно достигало пика на 13-е сут и снижалось в дальнейшем до 21-х сут, хотя данные литературы свидетельствуют, что развитие карциномы Герена приводит к повышению уровня продуктов ПОЛ в эритроцитах и нарушению функционального состояния их мембран. Наряду с этим в сыворотке крови крыс накапливаются токсические продукты метаболизма, о чем свидетельствует увеличение концентрации среднемолекулярных пептидов [1]. Здесь интересным является тот факт, что введение животным МСК и БСПК поддерживает высокий уровень ТБК-активных продуктов до 16-х сут эксперимента, когда и выявляются первые эффекты ТРО. Учитывая, что в эти же сроки в БСПК-группе повышается и активность ЛДГ, можно предположить, что одним из механизмов торможения роста карциномы Герена под влиянием БСПК является усиление некротической гибели опухолевых клеток.

Характеризуя прооксидантно-антиоксидантный баланс в опухоли у крыс с карциномой Герена, следует отметить, что здесь наблюдалась достаточно низкая интенсивность процессов ПОЛ, которая, вероятно, поддерживалась высокой каталазной активностью (на уровне печени здоровых крыс). Что касается глутатионзависимой

системы, то содержание восстановленного глутатиона находилось на невысоком уровне (для сравнения, в печени крыс — около 5–7 мкмоль/г ткани); с ним коррелировали активности *GSH*-пероксидазы и *GSH*-редуктазы. Исключение составляла Г6ФДГ, являющаяся важнейшим источником НАДФН, необходимого для поддержания окислительно-восстановительного равновесия в клетке, уровня *GSH*, митохондриального трансмембранного потенциала и резистентности к проапоптотическим сигналам [23]. Судя по всему, основным участником системы антиоксидантной защиты для карциномы Герена является каталаза. Кроме того, согласно данным литературы, опухолевые клетки способны накапливать низкомолекулярные антиоксиданты, обеспечивающие неспецифическую нейтрализацию свободных радикалов [3]. К сожалению, в рамках данной работы эти компоненты изучены не были.

Введение животным БСПК практически не влияло на все исследованные показатели, за исключением некоторого повышения активности *GSH*-редуктазы на фоне снижения содержания восстановленного глутатиона. В случае использования МСК мы наблюдали небольшое снижение базального уровня ТБК-активных продуктов в опухоли, которое сопровождалось значительным падением каталазной активности и содержания *GSH*. Здесь необходимо отметить, что снижение уровня продуктов ПОЛ в опухоли под действием МСК по сравнению со степенью угнетения антиоксидантной защиты является незначительным, поэтому останавливаться на нем мы не будем.

Несмотря на тот факт, что в контрольной группе животных содержание *GSH* невысоко, под влиянием БСПК и МСК мы наблюдали его снижение до критических значений, а в случае МСК — и падение каталазной активности. Учитывая выявленное торможение роста опухоли, эти факты требуют отдельного обсуждения. Восстановленный глутатион является важной составляющей антиоксидантной защиты — нейтрализует перекиси липидов и поддерживает в восстановленном состоянии *SH*-группы белков, что обеспечивает их функциональную активность. Редокс-потенциал клетки, в поддержании которого важную роль играет глутатион, является важным звеном в путях передачи как пролиферативных, так и апоптотических сигналов, поскольку активность многих транскрипционных факторов (*c-Fos*, *c-Jun*, *AP-1* и др.) и компонентов киназных каскадов зависит от состояния *SH*-групп. В свою очередь, супероксидный радикал и перекись водорода в низких концентрациях стимулируют деление клеток [2], а усиление их продукции выше физиологических значений может быть причиной гибели клетки, причем как некротической, так и апоптотической [4].

Многие авторы подчеркивают важную роль высокого уровня *GSH* в регуляции роста и деления клеток [2, 9]. Показано, что снижение содержания глутатиона приводит к угнетению митотической активности культур клеток различного происхождения [9, 31]. В особенности это касается ядерного пула *GSH*, который обеспечивает защиту генетического материала. При вступлении клеток в пролиферативную фазу деконденсированный хроматин становится легкодоступным для действия активных форм кислорода, снижение уровня антиоксидантов при интоксикации может приводить к необратимым повреждениям ядерного аппарата клеток печени [2]. Результатом оксидативного повреждения ДНК является остановка митоза, что

способствует прекращению роста клеточной популяции и индукции в них апоптоза.

Исходя из изложенного выше, полученные результаты, особенно в МСК-группе, позволяют предположить, что одним из механизмов реализации противоопухолевого эффекта является селективное истощение пула восстановленного глутатиона в клетках карциномы Герена, сопровождающееся угнетением ключевого фермента системы антиоксидантной защиты — каталазы, что в совокупности снижает резистентность опухолевых клеток.

Что касается БСПК, вероятно, противоопухолевый эффект связан с потерей глутатиона лишь частично, а основными мишенями в данном случае являются другие молекулярные объекты. Однако в данном случае понимание механизмов осложняется как многообразием биологически активных веществ, входящим в состав использованного “физиологического коктейля”, так и опосредованностью воздействия, учитывая путь введения БСПК. На сегодня лишь некоторые цитокины успешно используются для терапии онкологических заболеваний, в том числе интерлейкины-2, 12, колониестимулирующие факторы роста [25]. Более интенсивно разрабатываются подходы, касающиеся, напротив, селективного ингибирования рецепторов к ростовым факторам (в частности, к эпидермальному фактору роста) на поверхности опухолевых клеток, что позволяет контролировать рост и развитие новообразований [14]. Несмотря на то что раскрыт ряд молекулярных взаимодействий и паракринных эффектов цитокинов и ростовых факторов в опухолях разной этиологии, до сих пор не существует систематизированных данных, позволяющих однозначно утверждать, каким будет их влияние при изменении объекта изучения. Проведенное нами исследование является пилотным и касается лишь одной экспериментальной модели, что не дает нам возможности сформулировать какие-то конкретные выводы или рекомендации.

Чтобы подчеркнуть противоречивость рассматриваемого вопроса, хотелось бы вернуться к его истории и состоянию на текущий момент. Еще в 1999 г. в экспериментах на моделях карциномы легкого Льюиса и меланомы B16 было показано, что совместное введение МСК с опухолевыми клетками ингибирует рост первичной опухоли. Авторы не смогли идентифицировать, какие именно факторы обеспечивают такую активность МСК и предложили в качестве потенциальных кандидатов провоспалительные цитокины [19]. Сюда же могут быть отнесены и хемокины, так как было установлено, что при трансплантации МСК совместно с трансформированными клетками усиливается “проницаемость” опухоли для иммунокомпетентных клеток — моноцитов и гранулоцитов [22]. На модели саркомы Капоши показано, что систематическое введение первичной суспензии человеческих МСК эффективно тормозит опухолевую прогрессию через прямые клеточные контакты. В данном случае предлагается механизм регуляции через инактивацию *Akt*-киназы, которая ингибирует процессы апоптоза. Таким образом, по мнению авторов, для МСК специфическими мишенями являются клетки, жизненный цикл которых регулируется *Akt*-киназой, высокая экспрессия которой в норме характерна для стволовых клеток [15, 16].

Разногласия относительно влияния МСК на течение опухолевого процесса касаются как поведения, собственно, клеток, так и продуцируемых ими факторов.

МСК как фидерные клетки способны образовывать “ниши”, что в силу тропности к патологическим очагам, в том числе к трансформированным клеткам, таит в себе опасность создания зон в опухоли для стволовых раковых клеток, где они могут сохранять способность к делению и поддерживать злокачественный процесс. И здесь вновь речь заходит о биологически активных веществах, продуцируемых МСК, в том числе факторов роста эндотелия сосудов (*vascular endothelial growth factors*), стимулирующих ангиогенез [33]. Усиление их продукции приводит к повышению количества сосудов в опухоли, что только способствует ее развитию. Следующей причиной, по которой МСК могут стимулировать злокачественный рост, является их выраженная иммуносупрессорная активность, обусловленная антипролиферативным эффектом в отношении клеток иммунной системы. Однако показано, что иммуносупрессорный эффект МСК может быть классифицирован как неспецифический антипролиферативный, т. е. фактически МСК способны подавлять пролиферацию клеток лимфоидного, миелоидного и эритроидного происхождения так же, как и клетки негемопозитического ряда, в том числе и опухолевых [28].

В заключение следует отметить, что в традиционной медицине принято считать, что противоопухолевая терапия является эффективной, если коэффициент ТРО превышает 50 %. В нашем случае, к сожалению, не было получено таких результатов, однако значительное повышение выживаемости животных в условиях применения МСК и бесклеточных БСПК представляется достаточно значимым аргументом для дальнейших исследований в области их применения в комплексной терапии низкодифференцированных злокачественных новообразований эпителиального происхождения.

Література

1. Гунина Л. М., Бердинских Н. К., Гоголь С. В. и др. Применение церулоплазмينا в противоопухолевой терапии в эксперименте и в клинике // Онкология. — 2001. — 3, № 1. — С. 48–50.
2. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопр. мед. химии. — 2001. — 47, № 6. — С. 561–581.
3. Карева Н. П., Лосева М. И., Ефремов А. В. и др. Нарушения антиоксидантного статуса у больных лимфомами и возможности его коррекции // Бюл. Сибирского отделения РАМН. — 2005. — № 3. — С. 30–37.
4. Кондакова И. В., Какурина Г. В., Смирнова Л. П., Борунов Е. В. Регуляция пролиферации и апоптоза опухолевых клеток свободными радикалами // Сибирский онкол. журн. — 2005. — № 1. — С. 58–61.
5. Петренко А. Ю., Петренко Ю. А., Скоробогатова Н. Г. и др. Стромальные клетки-предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании // Журн. АМН України. — 2008. — 14, № 2. — С. 354–365.
6. Путилина Ф. Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях // Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохорова. — Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. — С.183–185.
7. Aebi H. Catalase in vitro // Methods Enzymol. — 1984. — 105. — P.121–127.
8. Buege J. A., Aust S. D. Microsomal lipid peroxidation // Methods in Enzymology / Eds: S. Fleisher, I. Packer. — New York: Academic Press, 1978. — P 302–310.
9. Cantin A. M., Paquette B., Richter M., Larivee P. Albumin-mediated regulation of cellular

- glutathione and nuclear factor kappa B activation // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2000. — **162**, № 4. — P. 1539–1546.
10. Carlberg I., Mannervik B. Glutathione reductase // *Methods Enzymol.* — 1985. — **113**. — P. 484–490.
 11. Carlsson G., Gullberg B., Hafstrom L. Estimation of liver tumor volume using different formulas — an experimental study in rats // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* — 1983. — **105**. — P. 20–23.
 12. Cherkashina D. V., Petrenko A. Y. Hepatoprotective effect of fetal tissue cytosol and its thermostable fraction in rats with carbon tetrachloride-induced hepatitis // *Bull. Exp. Biol. Med.* — 2006. — **141**, № 4. — P. 544–547.
 13. Cherkashina D. V., Semenchenko O. A., Grischuk V. P. et al. Supplementation with fetal-specific factors ameliorates oxidative liver damage during hypothermic storage and reperfusion in a rat model // *Cell Preserv. Technol.* — 2005. — **3**, № 3. — P. 203–212.
 14. Ciardiello F. Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment // *Future Oncol.* — 2005. — **1**, № 2. — P. 221–234.
 15. Jorgensen C., Lazennec G. Adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? // *Stem cells.* — 2008. — **26**. — P. 1387–1394.
 16. Khakoo A. Y., Pati S., Anderson S. A. et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. // *J. Exp. Med.* — 2006ю — **24**. — P. 1235–1247.
 17. Kovalev G. A., Cherkashina D. V. Modulating the state of the pro-oxidant-antioxidant brain system with xenopreparations under experimental chronic alcohol poisoning // *Cell Preserv. Technol.* — 2008. — **6**. — P. 108.
 18. Liou G. Y., Storz P. Reactive oxygen species in cancer // *Free Radic. Res.* — 2010. — **44**, № 5. — P. 479–496.
 19. Maestroni G. J., Hertens E., Galli P. Factor(s) from non-macrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice // *Cell. Mol. Life Sci.* — 1999. — **55**, № 4. — P. 663–667.
 20. Ochenashko O. V., Nikitchenko Y. V., Volkova N. A. et al. Functional hepatic recovery after xenotransplantation of cryopreserved fetal liver cells or soluble cell-factor administration in a cirrhotic rat model: Are viable cells necessary? // *J. Gastroent. Hepatol.* — 2008. — **23**. — P. e275–282.
 21. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* — 1979. — **95**. — P. 351–358.
 22. Ohlsson L.B., Varas L., Kjellman C. et al. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix // *Exp. Mol. Pathol.* — 2003. — **75**. — P. 248–255.
 23. Pandolfi P. P., Sonati F., Rivi R. et al. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defence against oxidative stress // *EMBOJ.* — 1995. — **14**, № 21. — P. 5209–5215.
 24. Parekkadan B., van Poll D., Suganuma K. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure // *PLoS ONE.* — 2007. — **2**, № 9. — P. e941.
 25. Parmiani G., Rivoltini L., Andreola G., Carrabba M. Cytokines in cancer therapy // *Immunol. Lett.* — 2000. — **74**, № 1. — P. 41–44.
 26. Phinney D. G., Prockop D. J. Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair — current views // *Stem cells.* — 2007. — **25**. — P. 2896–2902.
 27. Pisati F., Belicchi M., Acerbi F. et al. Effect of human skin-derived stem cells on vessel architecture, tumor growth, and tumor invasion in brain tumor animal models // *Cancer Res.* — 2007. — **67**, № 7. — P. 3054–3063.
 28. Ramasamy R., Lam E.W.-F., Soeiro I. et al. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth // *Leukemia.* — 2007. — **21**. — P. 304–310.
 29. Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase // *Science.* — 1973. — **179**. — P. 588–590.
 30. Rudack D., Chisholm E. M., Holten D. Rat liver glucose 6-phosphate dehydrogenase // *J. Biol. Chem.* — 1971. — **246**. — P. 1249–1254.
 31. Shi Z. Z., Osei-Frimpong J., Kala G. et al. Glutathione synthesis is essential for mouse development

- but not for cell growth in culture // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — **97**, № 10. — P. 5101–5106.
32. *Shtemenko N., Philippe C., Shtemenko A.* Dichlorotetra- μ -isobutiratodirhenium (III): enhancement of cisplatin action and RBC-stabilizing properties // *Anticancer Res.* — 2007. — **27**, № 4B. — P. 2487–2492.
33. *Tögel F., Hu Z., Weiss K. et al.* Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* — 2005. — **289**. — P. F31–F42.
34. *Townsend D. M., Tew K. D., Tapiero H.* The importance of glutathione in human disease // *Biomed. Pharmacother.* — 2003. — **57**, № 3–4. — P. 145–155.

Одержано 12.04.2010

ПРИГНІЧЕННЯ РОСТУ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА У ЩУРІВ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЛЮДИНИ ТА БІОРЕГУЛЯТОРІВ СТОВБУРОВИХ І ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН

Д. В. Черкашина, О. С. Лебединський, Ю. О. Петренко,
Н. І. Штеменко*, О. Ю. Петренко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
61015 Харків

*Дніпропетровський національний університет ім. Олеся
Гончара, 49050 Дніпропетровськ

Вивчено вплив мезенхімальних стромальних клітин (МСК) жирової тканини дорослої людини та безклітинних біорегуляторів стовбурових та прогеніторних клітин (БСПК) на розвиток карциноми Герена у щурів. В якості джерела БСПК використовували цитозоль фетальних тканин людини мезенхімально-мезодермального походження (8–10 тижнів гестації). Експерименти починали з 8-ї доби після інюкуляції пухлини, БСПК і МСК вводили внутрішньочеревинно. Встановлено, що протягом терміну спостереження в контрольній групі загинуло майже 50 % тварин, у БСПК-групі — лише 20 %, а у МСК-групі виживаність досягла 100 %. Введення тваринам як БСПК, так і МСК на 21-у добу експерименту на 40 % гальмувало ріст пухлини. Ці відмінності почали проявлятися з 16-ї доби експерименту, супроводжуючись підвищенням сироваткових маркерів пошкодження, та зберігалися до його кінця. Обговорюються можливі механізми реалізації ефектів БСПК та МСК, у тому числі шляхом регуляції про-оксидантно-антиоксидантного балансу в пухлині. Отримані дані свідчать про перспективність застосування безклітинних БСПК та МСК, виділених із жирової тканини дорослих донорів, у комплексній терапії низькодиференційованих пухлин.

**INHIBITION OF GROWTH OF CARCINOMA GUERIN IN RATS AFTER
ADMINISTRATION OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL
STROMAL CELLS AND BIOREGULATORS OF STEM AND
PROGENITOR CELLS**

**D. V. Cherkashina, A. S. Lebedinsky, Yu. A. Petrenko,
N. I. Shtemenko*, A. Yu. Petrenko**

Institute of Cryobiology and Cryomedicine Problems NAS Ukraine, 61015 Kharkov
*Oles Gonchar Dnepropetrovsk National University, 49050 Dnepropetrovsk

The effect of adipose tissue-derived adult human mesenchymal stromal cells (MSC) and non-cellular bioregulators of stem and progenitor cells (BSPC) on the development of Guerin carcinoma in rats was studied. The cytosol of human fetal tissues of mesenchymal-mesodermal origin (8-10 weeks of gestation) was used as a source of BSPC. The experiments were started on day 8 after tumor cell inoculation. BSPC and MSC were administered intraperitoneally. During observation period almost 50 % of animals died in the control group, only 20 % — in BSPC group, whereas in MSC group 100 % of animals survived. Treatment of animals with BSPC and MSC led to a 40 % inhibition of tumor growth on experimental day 21. These differences became apparent starting day 16 of experiment; they were accompanied by an increase of serum markers of damage and were maintained up to the end of experiment. Discussed are possible mechanisms of realization of MSC and BSPC effects, especially through regulation of pro-oxidant-antioxidant balance of the tumor. The results obtained testify to the prospects of using non-cellular BSPC and adipose tissue-derived adult human MSC in combination therapy of poorly differentiated tumors.