DOI: 10.12737/article_5c55fb17a02054.31513592

Ю.П. Семочкина¹, А.В. Родина¹, Е.Ю. Москалева¹, Е.С. Жорова², В.П. Сапрыкин², С.С. Арзуманов¹, В.В. Сафронов³

ЗЛОКАЧЕСТВЕННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ РАЗНЫХ ТКАНЕЙ МЫШИ ПОСЛЕ СМЕШАННОГО ГАММА-НЕЙТРОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ IN VITRO

1. Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва. E-mail: Moskaleva_EY@nrcki.ru; 2. Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва;

3. Лаборатория космического материаловедения, Калуга, Россия

Ю.П. Семочкина – м.н.с.; А.В. Родина – в.н.с., к.б.н.; Е.Ю. Москалева – в.н.с., д.б.н., проф., член Европейского общества по радиационным исследованиям (ERRS); Е.С. Жорова – в.н.с., к.б.н.; В.П. Сапрыкин – в.н.с., д.м.н.; С.С. Арзуманов – зам. руководителя отдела, к.ф.-м.н.; В.В. Сафронов – с.н.с., к.ф.-м.н.

Реферат

<u>Цель</u>: Изучение возможности злокачественной трансформации контрольных и облученных мезенхимальных стромальных стволовых клеток (МСК) из костного (КМ) и головного (ГМ) мозга и из жировой ткани (ЖТ) мыши и секреции ряда цитокинов этими клетками при действии смешанного ү-нейтронного (ү,n) излучения и ү-излучения.

<u>Материал и методы</u>: МСК выделяли и культивировали по общепринятым протоколам. γ,n-облучение проводили коллимированным пучком нейтронов и гамма-квантов на специальной станции ядерного реактора ИР-8. МСК облучали на 29 пассаже в дозах 0,05; 0,5 и 2 Гр, культивировали на протяжении 10 пассажей и трансплантировали подкожно по 1×10⁶ клеток сингенным мышам линии C57BL/6. γ-облучение МСК проводили на гамма-установке ГУТ-200М в дозах 0,1–6 Гр. Уровень цитокинов в культуральной среде МСК определяли с помощью иммуноферментного метода.

<u>Результаты</u>: Обнаружено уменьшение ОБЭ при увеличении дозы облучения от 0,5 до 2,0 Гр. Максимальное среднее для всех МСК значение ОБЭ, равное 5,5, наблюдали при дозе 0,5 Гр. При увеличении дозы до 2 Гр ОБЭ в среднем снижалась до 2,5, а при увеличении дозы γ-излучения до 4,0 Гр – до 2,0. Действие γ,n-излучения на МСК из костного мозга мыши в дозах 0,05–2 Гр приводит к их злокачественной трансформации, а трансплантация облученных МСК КМ сингенным мышам вызывает развитие фибросарком с активной пролиферацией клеток. При введении контрольных МСК КМ и контрольных и облученных МСК ГМ и МСК ЖТ опухоли обнаружены не были. При подкожном введении МСК ЖТ, как и в случае МСК ГМ, после действия γ-излучения в дозах 0,1, 1 и 6 Гр, в отличие от МСК КМ, опухоли обнаружены не были. Опухоли содержали включения из производных тканей мезенхимного происхождения – мышечной, жировой, хрящевой и костной. В случае опухоли, развившейся после трансплантации подвергнутых γ,n-облучению в дозе 0,05 Гр МСК КМ, был обнаружен метастаз в плечо с проникновением опухолевых клеток между мышечными волокнами. Из опухолей получены линии клеток перевиваемой фибросаркомы мыши. При анализе уровня цитокинов TGFβ, VEGF, HGF и IL6 их наиболее высокий уровень обнаружен в культуральной среде МСК ЖТ. При действии γ,n-излучения и γ-излучения имеет место изменение профиля секреции исследованных цитокинов.

Заключение: Показана высокая чувствительность МСК КМ к злокачественной трансформации при действии γ,пизлучения и устойчивость к трансформации МСК ГМ и МСК ЖТ мыши к действию γ- и γ,п-излучения. Наиболее высокий уровень секреции цитокинов TGFβ, VEGF, HGF и IL6 МСК обнаружен в культуральной среде МСК ЖТ. Изменение профиля секреции цитокинов после облучения зависело от дозы и типа облучения.

Ключевые слов: мезенхимальные стволовые клетки, злокачественная трансформация, радиационный канцерогенез, у,п-излучение, у-излучение, нейтроны, костный мозг, головной мозг, жировая ткань, цитокины, мыши

Поступила: 03.08.2018. Принята к публикации: 29.11.2018

Введение

Прогресс в развитии лучевой терапии связан с использованием ускоренных частиц – протонов и тяжелых ионов [1], а также получаемых на ядерных реакторах нейтронов [2]. При облучении опухоли протонными пучками в пике Брегга на нормальные ткани пациента в поле облучения и рядом с ним действуют нейтроны, которые образуются в результате взаимодействия протонов с оборудованием и с тканями тела пациента. Аналогичная ситуация будет иметь место и в космических кораблях при дальних космических полетах. Действие таких нейтронов может приводить к развитию вторичных опухолей, риск развития которых в настоящее время неизвестен [3, 4].

Мезенхимальные стромальные стволовые клетки (МСК) – долгоживущие клетки, присутствующие практически во всех органах и тканях. Поэтому полагают, что велика вероятность того, что МСК могут трансформироваться в опухолевые стволовые клетки в результате накопления спонтанных и индуцированных мутаций и тем самым инициировать рост опухолей [5]. Ранее мы показали возможность развития опухолей из облученных *in vitro* в дозах 1 и 6 Гр МСК костного мозга (КМ) после их подкожного введения сингенным мышам и отсутствие опухолей при введении контрольных и облученных МСК из головного мозга (ГМ) мыши при действии γ-излучения [6]. Из МСК КМ, облученных в дозе 0,1 Гр, опухоли не развивались. При гистологическом исследовании радиационно-индуцированных опухолей они были классифицированы как многокомпонентные мезенхимомы [7].

Развитие адронной терапии, сопровождающейся действием вторичных нейтронов на нормальные ткани, и гамма-нейтронной терапии опухолей [2] делает актуальным изучение особенностей действия такого излучения на нормальные клетки, в том числе на стволовые клетки, для оценки возможности их злокачественной трансформации, особенно при действии у,п-излучения в области малых доз. В связи с этим целью настоящей работы являются определение ОБЭ γ,п-изучения реактора ИР-8 и исследование возможности злокачественной трансформации контрольных и облученных МСК из КМ и ГМ мыши при действии смешанного γ,п-излучения, а МСК из жировой ткани (ЖТ) – при действии и γ- и γ,п-излучения.

Материал и методы

Выделение и культивирование МСК

МСК выделяли из костного и головного мозга мышей линии C57BL/6 в возрасте 1-2 мес после умерщвления животных путем цервикальной дислокации, как описано ранее [6]. Головной мозг извлекали, промывали культуральной средой DMEM/F12 и измельчали скальпелем в чашке Петри в той же среде. Клетки собирали центрифугированием (400g, 10 мин), осадок дважды промывали средой, ресуспендировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 50 мкг/мл гентамицина (LifeTechnologies, США) и переносили суспензию клеток в культуральные флаконы. Через сутки проводили смену культуральной среды, удаляя не прикрепившиеся клетки. МСК ГМ культивировали в СО₂-инкубаторе при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % СО, в среде DMEM/F12, содержащей 10 % ФБС и 50 мкг/мл гентамицина. По достижении 80-85 % конфлюентности клетки рассевали, используя раствор трипсин-ЭДТА (Sigma, США), содержащий 0,05 % трипсина и 0,02 % ЭДТА.

Для выделения МСК КМ костный мозг получали из бедренных и большеберцовых костей путем промывания полости фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 50 ед/мл гепарина и 25 мкг/мл гентамицина с помощью иглы 18G. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 200g. Супернатант удаляли, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM/F12, содержащей 10 % ФБС и 50 мкг/мл гентамицина и переносили в культуральные флаконы 25 см² в плотности 40 тысяч клеток/см² на 24 ч для прикрепления к пластиковой поверхности. Через 24 ч неприкрепившиеся клетки удаляли, прикрепившиеся клетки, которые составляли популяцию МСК КМ, промывали 2 раза ФСБ и культивировали до достижения субконфлюентного состояния в СО₂-инкубаторе, после чего пересевали с помощью раствора трипсин-ЭДТА и использовали в экспериментах после 25-го пассажа.

МСК выделяли из ЖТ мышей линии C57BL/6 в возрасте 2 мес, как описано в работе [8]. Фрагменты ЖТ измельчали ножницами, затем гомогенизировали в среде DMEM/F12 (Gibco, CША) без сыворотки. К суспензии фрагментов жировой ткани в среде добавляли раствор коллагеназы (Sigma, CША) (конечная концентрация 0,08 %) и инкубировали суспензию при перемешивании 1 ч при 37 °С. Собирали клетки с помощью центрифугирования (1200 об/мин, 10 мин). Осадок клеток ресуспендировали в среде DMEM/F12 с 10 % ФБС (HyClone, США) для нейтрализации коллагеназы, собирали клетки с помощью центрифугирования (1200 об/мин, 10 мин), ресуспендировали в среде DMEM/F12 с 10 % ФБС и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США) и переносили в культуральный флакон с площадью 75 см² (Corning, США). После прикрепления (через 24 ч) клетки промывали ФСБ (Sigma, США), вносили культуральную среду и культивировали до достижения субконфлуентного состояния при 37 °С, в увлажненной атмосфере 5 % CO₂. По достижении 80–85 % конфлюентности клетки рассевали, используя раствор трипсин-ЭДТА (Gibco, США), содержащий 0,05 % трипсина и 0,02 % ЭДТА.

Аналогичным образом выделяли опухолевые МСК из опухолей, развившихся из облученных МСК КМ, но вместо коллагеназы использовали раствор аккутазы.

Облучение и расчет доз облучения клеток при действии смешанного у,п-излучения реактора ИР-8

Облучение образцов проводилось в коллимированном пучке нейтронов и у-квантов ядерного реактора. Условия облучения и расчет поглощенных доз подробно изложены в работе [9]. Плотность нейтронного потока, приведенная к 1 МВт мощности реактора, равнялась $(0,71 \pm 0,07) \times 10^7$ см⁻²с⁻¹. Энергетический диапазон нейтронов - от 0,5 эВ до 10 МэВ. Энергетический спектр этих нейтронов - это спектр Ферми, для которого зависимость нейтронного потока N(E) от энергии нейтронов E имеет вид $N(E) \sim 1/E$. При облучении у-квантами мощность амбиентного эквивалента дозы, также приведенная к 1 МВт мощности реактора, равнялась 1,14 ± 0,23 Зв/час. Энергетический диапазон у-квантов - от 0,1 до 4,0 МэВ. Зависимость плотности потока у-квантов от энергии приведена в работе [9]. В разных сериях облучения мощность реактора менялась от 4,5 до 6,5 МВт. Полагалось, что в этом диапазоне плотности нейтронного и у-потоков пропорциональны мощности реактора. Расчетная (с использованием программного пакета Geant4) мощность поглощенной в образце дозы, приведенная к 1 МВт мощности реактора, равнялась 0,6 ± 0,1 Гр/ч. Из них 0,2 Гр/ч обусловлено облучением нейтронами, а 0,4 Гр/ч – ү-квантами. МСК облучали на 29 пассаже в дозах 0,05; 0,5 и 2 Гр.

Облучение клеток при действии у-излучения

Клетки в культуральной среде подвергали действию γ-излучения от источника кобальт-60 на установке «ГУТ-200М» при комнатной температуре в дозе 0,1 Гр при мощности дозы 0,01 Гр/мин, а в дозах 1–6 Гр – при мощности дозы 0,75 Гр/мин.

Определение клоногенной активности МСК

МСК снимали с подложки с использованием раствора трипсин-ЭДТА 0,05 % (Gibco, США) и облучали в полной культуральной среде в суспензии при комнатной температуре. Сразу после воздействия необлученные МСК из разных тканей и МСК после действия ү,п-излучения в дозах 0,05; 0,5 и 2 Гр высевали в 6-луночные платы (Corning, США) в количестве 100 клеток на лунку. После действия ү-излучения в дозе 4 Гр МСК высевали по 200 клеток на лунку в среде DMEM/F12, содержащей 10 % ФБС, и культивировали на протяжении 14 сут. Перед окрашиванием колоний культуральную среду удаляли, клетки промывали ФСБ, окрашивали колонии 0,5 % раствором кристаллвиолета в метаноле в течение 10 мин, промывали ФСБ, высушивали на воздухе, сканировали и подсчитывали количество колоний.

Исследование туморогенной активности МСК

МСК культивировали до достижения 29 пассажа, подвергали действию ү,n-излучения в дозах 0,05; 0,5 и 2 Гр и затем культивировали in vitro еще в течение 10 пассажей для того, чтобы в клеточной популяции могли накопиться трансформированные клетки с онкогенным потенциалом в соответствии с выбранным ранее протоколом [2, 3]. Клетки культур контрольных и облученных МСК из КМ, ГМ и ЖТ вводили сингенным мышам линии C57BL/6 массой тела 18-20 г (по 5 мышей в группе) подкожно в область правой лопатки в количестве 1 млн в 0,2 мл раствора ФСБ. В случае МСК ЖТ, кроме того, исследовали таким же образом туморогенную активность контрольных и облученных МСК после действия у-излучения в дозах 0,1; 1 и 6 Гр, как это было сделано ранее в отношении МСК КМ и ГМ [2]. Животных наблюдали в течение 6 мес при еженедельном осмотре и пальпации области введения МСК.

Мыши находились в виварии Курчатовского комплекса НБИКС-технологий по 5 животных в клетке в обычных условиях на стандартном рационе (Ресурсный центр нейрокогнитивных исследований).

Гистологическое исследование

После развития опухолей размером не менее 1 см в диаметре животных умерщвляли с помощью цервикальной дислокации, вскрывали, извлекали опухоли и анализировали внутренние органы для выявления метастазов. Для гистологического исследования кусочки опухолей фиксировали в 10 %-м нейтральном формалине, затем подвергали обычной гистологической обработке с заливкой в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Микроскопию препаратов проводили на микроскопе AxioImager D2 (CarlZeiss, Германия).

Приготовление культуральной среды, кондиционированной МСК

Для сбора кондиционированной среды МСК культивировали в чашках Петри диаметром 10 см. При достижении 90 % конфлюентности, культуральную среду заменяли на среду с содержанием 5 % ФБС, через 48 ч среду собирали, аликвотировали и хранили при –80 °С. МСК снимали с подложки и подсчитывали количество клеток.

Определение содержания цитокинов в культуральной среде, кондиционированной МСК

Определение уровня цитокинов VEGF, HGF, IL-6, G-CSF, TGFβ, FGF и IL-10 в КС МСК проводили с помощью иммуноферментного анализа при использовании наборов фирмы R&D Systems в соответствии с указаниями фирмы и выражали в единицах пг/мл/млн клеток.

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов определения клоногенной активности проводили по критерию Стьюдента с использованием компьютерной программы Origin. Данные представляли в виде средних значений и стандартной погрешности среднего. Статистическую обработку результатов определения частоты злокачественной трансформации МСК КМ проводили с использованием непараметрического теста Т Шеллинга–Вольфейля [10]. Достоверными считали результаты при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Дозовые зависимости выживаемости МСК разных типов, оцениваемой по клоногенной активности клеток, при действии ү- и ү,n-излучения представлены на рис. 1.

По этим данным были определены равноэффективные дозы ү- и ү,п-излучения для клоногенной активности МСК, выделенных из разных органов, и



Рис. 1. Зависимости выживаемости культивируемых *in vitro* МСК из костного (а) и головного мозга (б) и из жировой ткани (в) мышей от дозы ү- (1) и ү,n-облучения (2)



Рис. 2. Значения относительной биологической эффективности (ОБЭ) ү,п-излучения для МСК из костного (кружки) и головного (треугольники) мозга и из жировой ткани (квадраты) мышей

найдена величина ОБЭ смешанного ү,п-излучения. Значение (коэффициент) ОБЭ рассчитывали как отношение дозы ү-излучения к поглощенной дозе ү,пизлучения, вызывающей равное снижение выживаемости МСК. Полученные результаты представлены на рис. 2.

Обнаружено уменьшение ОБЭ с увеличением дозы излучения в диапазоне от 0,5 до 4,0 Гр. Максимальное усредненное для всех МСК значение ОБЭ, равное 5,5, наблюдали при дозе 0,5 Гр. При увеличении дозы до 2 Гр ОБЭ в среднем снижалась до 2,5, а при увеличении до 4,0 Гр – до 2,0.

Исходя из полученных значений ОБЭ, для изучения туморогенного действия ү,п-излучения были выбраны дозы близкой биологической эффективности – 0,05; 0,5 и 2 Гр. Необлученные клетки служили контролем. Туморогенную активность МСК ЖТ при действии γ-излучения изучали после облучения МСК в дозах 0,1; 1 и 6 Гр, выбранных ранее при исследовании МСК КМ и МСК ГМ [6, 7]. Данные о частоте и времени появления опухолей представлены в табл. 1.

При действии ү,п-излучения за 6 мес наблюдения опухоли были обнаружены только при трансплантации облученных MCK KM: у 1 из 5 мышей, облученных в дозе 0,05 Гр, у 3 из 5 мышей, облученных в дозе 0,5 Гр, и у 1 из 5 мышей, облученных в дозе 2 Гр, при этом ни у одной из контрольных мышей опухоли обнаружены не были (табл. 1). Результаты, касающиеся частоты появления опухолей у мышей при трансплантации облученных MCK KM, мы рассматриваем как предварительные, требующие дальнейших исследований для установления количественных закономерностей развития таких опухолей от дозы ү,п-облучения MCK KM. При введении контрольных и облученных во всех исследованных дозах MCK ГМ и MCK ЖТ опухоли Таблица 1

Частота и время появления опухолей у мышей после подкожного введения контрольных и облученных MCK KM, MCK ГМ и MCK ЖТ

МСК	Доза, Гр	Время развития	Частота разви-	
MCK		опухоли, мес	тия опухолей*	
MCK-KM	0	-	0/5	
ү,n-излучение	0,05	5	1/5	
	0,5	5	3/5**	
	2	5	1/5	
МСК-ГМ	0	-	0/5	
ү,n-излучение	0,05	-	0/5	
	0,5	-	0/5	
	2	-	0/5	
МСК-ЖТ	0	-	0/5	
ү,n-излучение	0,05	-	0/5	
	0,5	-	0/5	
	2	-	0/5	
МСК-ЖТ	0	-	0/5	
ү-излучение	0,1	-	0/5	
	1	-	0/5	
	6	-	0/5	

Примечание:^{*} – в числителе количество мышей с опухолями, в знаменателе – количество мышей в группе; ^{**} – отличия от контроля статистически значимы по критерию Т Шеллинга–Вольфейля, $p \le 0.05$

обнаружены не были ни при действии ү,п-излучения (табл. 1), ни при действии ү-излучения [6, 7 и табл. 1 для МСК ЖТ].

Таким образом, при действии как ү,п-излучения, так и ү-излучения на МСК мыши в близком по влиянию на их выживаемость диапазоне доз, развитие опухолей из этих клеток обнаружено только у мышей, которым вводили облученные МСК КМ. При введении контрольных МСК КМ в одном из четырех независимых экспериментов, проведенных в различное время в течение двух лет, было обнаружено развитие опухоли у 1 из 5 мышей в одной серии опытов, т. е. у 1 из 20 мышей.

Новообразования, развившиеся из облученных МСК КМ, представляли собой инкапсулированные узлы, локализованные в подкожной клетчатке. В одном случае при введении МСК КМ после действия у,п-излучения в дозе 0,05 Гр, были обнаружены 2 узла, один из которых представлял собой опухоль, а второй – гипертрофированное плечо правой передней лапы (рис. 3а, б).

При гистологическом исследовании показано, что мышцы этого плеча инфильтрированы опухолевыми клетками (рис. 3в). Возможно, это контактный метастаз, при котором клетки распространяются по серозным оболочкам, прилежащим к узлу опухоли. Это предположение подтверждается тем, что, как было показано ранее, при введении мышам МСК КМ, облученных в дозе 6 Гр при действии γ-излучения, обнаруживали цепочку расположенных рядом опухолевых узлов [7]. С другой стороны, нельзя исключить и проникновение опухолевых клеток в мышцу плеча по кровеносным или лимфатическим сосудам. Ранее ни при подкожном, ни при внутривенном ведении МСК при



Рис. 3. Опухоль (а, слева) и метастаз в плечо (а и б, справа), развившиеся у мыши из введенных подкожно МСК КМ после ү,п-облучения; б – слева здоровая левая передняя лапа, справа – инфильтрированная опухолевыми клетками правая передняя лапа; в – инфильтрат опухолевых клеток между мышцами плеча и вокруг кровеносного сосуда

макроскопическом исследовании животных образования метастазов не наблюдали.

При гистологическом исследовании обнаружено, что большую часть в исследованных опухолях занимают участки переплетающихся клеточно-волокнистых тяжей с признаками низкодифференцированной фибросаркомы, которые состоят из незрелых фибробластоподобных клеток и коллагеновых волокон (рис. 4а). В этих участках клетки преимущественно веретеновидные с узкой цитоплазмой. Соотношение клеточных и волокнистых структур варьирует с преобладанием клеточного компонента. Опухоль характеризуется скорее мономорфизмом, чем полиморфизмом. Умеренно выраженный полиморфизм клеток проявляется в размере, форме, интенсивности окраски ядер и соотношении размеров ядра и цитоплазмы. Как правило, в ядрах наблюдается четко структурированный хроматин и оформленные четкие 1-2 ядрышка. Об активной пролиферации клеток опухоли свидетельствует множество митозов - до 10 на поле зрения при ув. 400 (рис. 4а). Различные формы патологических митозов демонстрируют высокую степень малигнизации опухоли (рис. 5).

В областях с более выраженным полиморфизмом опухолевые клетки иногда крупные, неправильных очертаний с ядрами разнообразной формы и размеров с четкой ядерной мембраной. Цитоплазма клеток бледная, пенистая, или вакуолизированная. Встречаются участки с дегенеративными изменениями клеток – набухание и пикноз ядер (рис. 46).

В опухолях имеются включения из производных нескольких тканей мезенхимного происхождения.

Жировой компонент опухолей представлен вкраплениями жировых клеток или их скоплениями (рис. 4в). В структуре опухолей наблюдаются элементы мышечной ткани. Это одиночные мышечные волокна, возникшие, вероятно, из МСК, тяжи, пронизывающие опухоль или пучки волокон (рис. 4г). Встречаются участки образования хрящевой и костной ткани (рис. 4 д, е) и участки недифференцированной мезенхимоподобной ткани. Она представлена полиморфными клетками – звездчатыми, веретенообразными, овальными, заключенными в аморфную миксоматозную основную субстанцию с небольшим количеством сосудов капиллярного или синусоидного типа. Клетки образуют синцитий.

В одном из опухолевых узлов среди мышечных волокон обнаружена микроскопическая трубчатая косточка длиной 1,5 мм с диафизом, двумя эпифизами, отчетливой хрящевой метафизарной пластинкой и полостями, заполненными не идентифицированным клеточным содержимым (рис. 6).

Из опухолей, развившихся при трансплантации подвергнутых ү,п-облучению в дозе 0,5 Гр МСК КМ сингенным мышам, были получены линии опухолевых клеток, точно так, как ранее такие же линии были получены из опухолей, развившихся из ү-облученных в дозах 1 и 6 Гр МСК КМ [6]. Трансплантация таких опухолевых МСК сингенным мышам при подкожном введении (по 5 мышей в группе) приводила к развитию опухолей у 100 % животных уже через 2 нед после введения.

При гистологическом исследовании все развившиеся из опухолевых МСК опухоли имели признаки низ-



Рис. 4. Строение опухолей, развившихся при подкожном введении облученных *in vitro* при действии γ,n-излучения МСК костного мозга. (a) – участок фибросаркомы; (б) – клетки опухоли с признаками полиморфизма и дегенеративных изменений; (в) – жировые клетки в опухоли; (г) – образование в опухоли мышечных волокон; (д), (е – очаги образования хрящевой и костной ткани



Рис. 5. Патологические митозы в клетках опухоли, развившейся из облученных при действии γ,n-излучения в дозе 0,5 Гр МСК костного мозга после их подкожной трансплантации сингенным мышам

кодифференцированной фибросаркомы. Элементы мезенхимоподобной ткани и включения в виде мышечных волокон, элементов хрящевой и костной ткани в таких опухолях отсутствовали (рис. 7). Это позволяет полагать, что наблюдаемые в опухолях из облученных МСК КМ производные тканей мезенхимного происхождения (рис. 5) происходят из нетрансформированных нормальных МСК, сохраняющих способность к пролиферации и дифференцировке в микроокружении опухоли.



Рис. 6. Микроскопическая трубчатая косточка с диафизом, двумя эпифизами, одной хрящевой метафизарной пластинкой и полостями, заполненными красным костным мозгом, обнаруженная в одном из опухолевых узлов среди мышечных волокон



Рис. 7. Фибросаркомы, сформировавшиеся через 2 нед после подкожного введения сингенным мышам культур МСК, полученных из опухолей, развившихся из подвергнутых ү,п-облучению в дозе 0,5 Гр (а) и ү-облучению в дозе 6 Гр (б) МСК из костного мозга

Для исследования особенностей ответа МСК из разных тканей мыши на действие ү- и ү,п-излучения было проведено определение уровня секреции ряда цитокинов контрольными и облученными МСК. Данные о концентрации цитокинов в культуральной среде, кондиционированной МСК КМ, ГМ и ЖТ, представлены в табл. 2, а их изменения через 10 пассажей после облучения – в табл. 3.

При анализе уровня цитокинов в МСК разного происхождения обнаружено (табл. 2), что при длительном культивировании уровень секреции TGFβ для всех исследованных МСК практически одинаков. В то же время уровень секреции цитокинов VEGF и HGF был максимальным в МСК ЖТ. Уровень VEGF в культуральной среде, кондиционированной МСК ЖТ, был в 10 раз выше, чем в среде МСК КМ и в 20 раз выше, чем в среде МСК ГМ.

Аналогичная ситуация имела место в отношении фактора HGF: его секреция в MCK ЖТ была в 8 раз выше, чем в MCK KM и в 3,7 раза выше, чем в MCK ГМ. Максимальный уровень секреции IL6 обнаружен в MCK ГМ: он был в 34 раза выше, чем в MCK KM, и в 2 раза выше, чем в MCK ЖТ. Цитокины G-CSF, FGF и IL-10 в культуральной среде контрольных и облученных MCK из KM, ГМ и ЖТ мыши обнаружены не были. Таблица 2

Цитокин	Концентрация цитокинов, пг/мл/млн клеток				
	МСК КМ	МСК ЖТ	МСК ГМ		
VEGF	346,3 ± 26,7*	3602,7 ± 450,1	$181,8 \pm 85,1^*$		
HGF	760,0 ± 292,1*	5992,0 ± 1540,3	1631,0 ± 668,2		
IL6	30,0 ± 4,7* #	578,7 ± 154,2	1015,7 ± 339,2		
TGFβ	136,0 ± 62,1	144,7 ± 50,8	$141,4 \pm 73,1$		

Уровень секреции цитокинов МСК, полученными из разных тканей контрольных мышей

Примечание: * – отличие от МСК ЖТ достоверно, p < 0,05; # – отличие от МСК ГМ, достоверно, p < 0,05

Таблица 3

Изменение уровня секреции цитокинов МСК, полученными из разных тканей мышей, после действия ү- и ү,n-излучения

11	Доза, Гр		Концентрация цитокинов #, %			
цитокин			МСК КМ	МСК ЖТ	МСК ГМ	
VEGF	ү-излучение	0	100±10	100±5	100±8	
		0,1	83±8	87±7	124±19	
		1,0	110±17	85±13	189±33	
		6,0	169±6*	74±4*	166±27	
HGF		0	100±9	100±6	100±9	
		0,1	105±5	77±23	181±38	
		1,0	125±9	53±13*	321±44*	
		6,0	108±27	111±12	262±95	
IL6		0	100±8	100±7	100±11	
		0,1	142±44	102±7	142±17	
		1,0	150±29	88±26	192±44	
		6,0	99±21	194±82	180±42	
TGFβ		0	100±11	100±5	100±7	
		0,1	99±11	96±8	99±2	
		1,0	118±6	105±19	190±67	
		6,0	109±15	123±32	152±49	
VEGF	ү,n-излучение	0	100±10	100±5	100±8	
		0,05	242±6*	91±11	60±9*	
		0,5	314±11*	99±10	54±11*	
		1,0	284±10*	98±12	74±7*	
HGF		0	100±9	100±6	100±9	
		0,05	278±12*	59±6*	120±9	
		0,5	99±14	93±11	51±6*	
		1,0	82±8	92±12	86±7	
IL6		0	100±8	100±7	100±11	
		0,05	0±0*	164±10*	0±0*	
		0,5	0±0*	123±8	59±6*	
		1,0	0±0*	144±15*	86±7	
TGFβ		0	100±11	100±5	100±7	
		0,05	211±6*	0±0	600±25*	
		0,5	273±5*	70±5*	1236±35*	
		1,0	303±10*	100±5	327±21*	

Примечание: [#] – уровень секреции цитокинов контрольными МСК приведен в табл. 2; * – отличие от контроля достоверно, p < 0.05

Действие ү,п-излучения приводило к повышению уровня секреции VEGF в MCK KM и его снижению MCK ГМ. В MCK ЖТ уровень секреции этого цитокина не изменялся. При действии ү-излучения имела место аналогичная тенденция в отношении VEGF в MCK KM, но в MCK ЖТ его уровень снижался, а в MCK ГМ – возрастал.

После ү,п-излучения в дозе 0,05 Гр отмечено увеличение уровня HGF в MCK KM и его снижение в MCK ЖТ. При остальных дозах наблюдалось снижение уровня этого цитокина в MCK ГМ. При действии γ-излучения уровень секреции этого цитокина в MCK KM не менялся, в MCK ЖТ – снижался, а в MCK ГМ – возрастал.

При действии ү,п-излучения обнаружены эффекты снижения секреции IL6 в МСК КМ и в МСК ГМ при всех дозах (в МСК КМ – до 0) и повышения в МСК ЖТ. При действии ү-излучения имеет место тенденция к увеличению секреции IL6 в МСК КМ и МСК ГМ при постоянстве его уровня в МСК ЖТ.

Таким образом, при γ , n-облучении обнаружено более выраженное, чем при γ -облучении, изменение уровня секреции цитокинов: повышение уровня VEGF и TGF β и снижение уровня IL6 в МСК KM, а также повышение уровня TGF β и снижение уровня IL6 в МСК ГМ.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что действие у,n-излучения на МСК КМ мыши может приводить к их злокачественной трансформации, а трансплантация облученных в дозах 0,05-2 Гр МСК КМ сингенным мышам сопровождается развитием злокачественных опухолей с признаками низкодифференцированной фибросаркомы. При этом статистически значимые различия в количестве развившихся после ү,n-облучения опухолей обнаружены только при облучении МСК КМ в дозе 0,5 Гр. При дозе 0,05 Гр обнаружено 2 опухоли только у 1 из 5 мышей, при отсутствии опухолей из контрольных клеток у 5 мышей (*p* > 0,05 по сравнению с контролем). Однако этот случай оказался уникальным, поскольку развитие опухоли сопровождалось появлением контактного метастаза (второй опухоли) в мышцу плеча мыши. И, даже если допустить, что эта опухоль - результат спонтанной злокачественной трансформации МСК КМ, этот случай уникален и интересен даже как case report, поскольку это явление обнаружено впервые при анализе более чем 25 опухолей, развившихся из облученных в разных дозах МСК КМ при их трансплантации сингенным животным, и ранее не описано в литературе. Полученные результаты коррелируют с данными о высокой частоте развития опухолей при действии нейтронов [11-13]. Дальнейшие исследования будут направлены, в первую очередь, на изучение количественных закономерностей частоты развития опухолей от дозы ү,n-облучения МСК КМ в диапазоне низких доз.

Обнаруженное присутствие недифференцированной мезенхимоподобной ткани и элементов включения из производных тканей мезенхимного происхождения – мышечных волокон, элементов жировой, хрящевой и костной ткани – по-видимому, свидетельствует о сохранении в использованных МСК КМ наряду с трансформированными клетками и полноценных МСК, которые сохраняют способность пролиферировать и дифференцироваться в микроокружении опухоли.

Важно подчеркнуть, что МСК ГМ и МСК ЖТ оказались устойчивыми к злокачественной трансформации при действии как ү,п-излучения, так и ү-излучения, т. к. развитие опухолей было обнаружено при введении только облученных МСК КМ. Ни из контрольных, ни из облученных МСК ГМ и МСК ЖТ опухоли не развивались. Причины высокой устойчивости этих клеток к злокачественной трансформации пока не ясны.

Следует отметить, что при действии как у,пизлучения, так и ү-излучения имеет место изменение профиля секреции исследованных цитокинов, зависящее как от дозы излучения, так и от типа излучения. Не обнаружено корреляции развития опухолей из МСК КМ с особенностями секреции цитокинов в этих клетках по сравнению с МСК ГМ и ЖТ. При этом можно отметить значительно более низкий уровень секреции цитокинов VEGF, HGF и IL6 в MCK KM по сравнению с МСК ГМ и, особенно, с МСК ЖТ. Логично было ожидать более высокого уровня образования опухолей из МСК с более высоким уровнем секреции VEGF, обеспечивающего рост сосудов в опухоли, и с более высоким уровнем активности факторов роста, которой обладают цитокины VEGF, HGF и IL6, наблюдаемом в МСК ЖТ и ГМ. Однако связи туморогенной активности МСК с уровнем секреции этих цитокинов не установлено. Возможно, сочетание низкого уровня секреции указанных цитокинов в МСК КМ при высоком уровне секреции иммуносупрессирующего фактора ТGFβ обеспечивает поддержание жизнеспособности и роста трансформированных МСК в организме сингенных мышей.

Выводы

- Для МСК мышей обнаружено уменьшение величины ОБЭ смешанного реакторного ү,п-излучения от 5,5 до 2,0 при увеличении поглощенной дозы от 0,5 до 4,0 Гр.
- Действие ү,п-излучения на МСК из костного мозга мыши в дозах 0,05–2 Гр приводит к их злокачественной трансформации, а трансплантация облученных МСК костного мозга сингенным мышам вызывает развитие фибросарком.
- Обнаружена устойчивость МСК из головного мозга и из жировой ткани мышей к злокачественной трансформации при действии как ү-, так и ү,пизлучения.
- 4. В МСК из костного мозга обнаружен низкий уровень секреции цитокинов HGF и IL6 по сравнению с МСК из головного мозга и жировой ткани. Дей-

ствие и ү-, и ү,n-излучения приводит к изменению профиля секреции цитокинов, зависящему от дозы и от типа излучения.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ №15-29-01234.

This work was partially supported by RFBR grant N 15-29-01234

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Zacharatou Jarlskog C., Paganetti H. Risk of developing second cancer from neutron dose in proton therapy as function of field characteristics, organ, and patient age // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2008. Vol.72. № 1. P. 228–235. DOI: 10.1016/j. ijrobp.2008.04.069.
- Мусабаева Л.И., Головков В.М. Терапия быстрыми нейтронами в онкологии // Сибирский онкологический журнал. 2015. № 2. С. 88–94.
- 3. Taddei P.J., Mirkovic D., Fontenot J.D. et al. Stray radiation dose and second cancer risk for a pediatric patient receiving craniospinal irradiation with proton beams // Phys. Med. Biol. 2009. Vol. 54. № 8. P. 2259–2275. DOI: 10.1088/0031-9155/54/8/001.
- 4. Newhauser W.D., Durante M. Assessing the risk of second malignancies after modern radiotherapy // Nat. Rev. Cancer. 2011. Vol. 11. № 6. P. 438–448. DOI: 10.1038/nrc3069.
- Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection // ICRP Publication 131 // Ann. ICRP. Vol. 44. № 3/4. P. 7–357. DOI: 10.1177/0146645315595585.
- Москалева Е.Ю., Семочкина Ю.П., Родина А.В. и соавт. Влияние облучения на мезенхимальные стволовые клетки костного и головного и мозга мыши и их способность индуцировать опухоли // Радиац. биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 3. С. 245–256.
- 7. Moskaleva E.Yu., Zhorova E.S., Semochkina Yu.P. et al. Characteristics of tumors that have developed in mice injected with syngenic irradiated mesenchymal stem cells of bone marrow // Cell Tissue Biol. 2017. Vol. 11. № 5. P. 381–388.
- 8. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // Tissue Eng. 2001. Vol. 7. № 2. P. 211–228. DOI: 10.1089/107632701300062859.
- 9. Арзуманов С.С., Сафронов В.В., Стрепетов А.Н. Определение поглощенной в биологическом образце дозы при смешанном гамма-нейтронном облучении // Журнал техн. физики. 2018. Т. 8. № 10. С. 1581–1584.
- Малета Ю.С., Тарасов В.В. Непараметрические методы статистического анализа в биологии и медицине. – М.: МГУ. 1982. 178 с.
- Wolf C., Lafuma J., Masse R. et al. Neutron RBE for induction of tumors with high lethality in Sprague-Dawley rats // Radiat. Res. 2000. Vol. 154. № 4. P. 412–420.
- Broerse J.J., van Bekkum D.W., Zoetelief J., Zurcher C. Relative biological effectiveness for neutron carcinogenesis in monkeys and rats // Radiat. Res. 1991. Vol. 128. (Suppl 1). P. S128–S135.
- Kamiya K., Inoh A., Fujii Y. et al. High mammary carcinogenicity of neutron irradiation in rats and its promotion by prolactin // Jpn. J. Cancer Res. 1985. Vol. 76. № 6. P. 449–456.

Для цитирования: Семочкина Ю.П., Родина А.В., Москалева Е.Ю., Жорова Е.С., Сапрыкин В.П., Арзуманов С.С., Сафронов В.В. Злокачественная трансформация мезенхимальных стволовых клеток из разных тканей мыши после смешанного гамма-нейтронного облучения *in vitro* // Мед. радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 1. С. 5–14. DOI: 10.12737/article_5c55fb17a02054.31513592 DOI: 10.12737/article_5c55fb17a02054.31513592

Malignant Transformation of Mesenchymal Stem Cells from Different Mouse Tissues after Mixed Gamma-Neutron Irradiation in vitro

Yu.P. Semochkina¹, A.V. Rodina¹, E.Yu. Moskaleva¹, E.S. Zhorova², V.P. Saprykin², S.S. Arzumanov¹, V.V. Safronov³

1. NRC Kurchatov Institute, Moscow, Russia. E-mail: Moskaleva_EY@nrcki.ru;

2. A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia;

3. Research Center "Space Materials Science", Kaluga, Russia

Yu.P. Semochkina – Junior Researcher; A.V. Rodina – Leading Researcher, PhD Biol.; E.Yu. Moskaleva – Leading Researcher, Prof. Dr. Sci. Biol., Member of ERRS; E.S. Zhorova – Leading Researcher, PhD Biol.; V.P. Saprykin – Leading Researcher, Dr. Sci. Med.; S.S. Arzumanov – Deputy Head of Department, PhD Phys.-Math.; V.V. Safronov – Senior Researcher, PhD Phys.-Math.

Abstract

<u>Purpose</u>: To study the possibility of malignant transformation of control and irradiated mesenchymal stromal stem cells (MSC) from the bone marrow (BM) and brain (BR) and from the adipose tissue (AT) of mice and some cytokines secretion after mixed γ ,neutron (γ , n) irradiation and γ -irradiation.

<u>Material and methods</u>: MSCs were isolated and cultured according to generally accepted protocols. γ , n-irradiation was carried out by a collimated beam of neutrons and gamma rays at a special station of the nuclear reactor IR-8. MSCs were irradiated at the 29th passage at doses of 0.05; 0.5 and 2 Gy, were cultured for 10 passages and transplanted subcutaneously 1×10⁶ cells to C57BL/6 syngeneic mice. MSCs AT were irradiated at the facility GUT-200M (⁶⁰Co) at doses 1–6 Gy. The level of cytokines in the culture medium of MSC was measured by an ELISA.

<u>Results</u>: A decrease in RBE was observed after radiation dose increasing from 0.5 to 4.0 Gy. The maximum of RBE for all MSCs, equal to 5.5, was observed at a dose of 0.5 Gy. After the dose increasing to 2 Gy an average RBE decreased to 2.5, and at dose 4.0 Gy RBE it was 2.0. Tumors were detected after 5 months after transplantation into syngeneic mice of MSC BM irradiated at doses of 0.05; 0.5 and 2 Gy. After transplantation of control MSCs BM and of control and irradiated MSCs BR and MSC AT, no tumors were detected. After subcutaneous injection of γ -irradiated at doses of 0.1; 1 and 6 Gy MSC AT, unlike MSCs BM, no tumors were detected. Histological examination of tumors revealed signs of a low-grade fibrosarcoma with active proliferation and a high degree of malignancy. Tumors contained inclusions from the derivatives of several tissues of mesenchymal origin – muscular, fatty, cartilaginous and bone. In the case of a tumor that developed after transplantation of MSCs BM exposed to γ ,n-radiation at a dose of 0.05 Gy, the contact metastasis was detected in the shoulder with the penetration of tumor cells between the muscle fibers. From the tumors, the mouse fibrosarcoma cell lines were obtained. The highest level of cytokines VEGF, HGF and IL6 was found in the culture medium of MSC AT. The level of TGF β secretion was practically the same in all studied MSCs. After γ ,n-irradiation an increase of VEGF secretion in MSC BM, a decrease of IL6 secretion in MSC BM and MSC BR, and an increase in its secretion in MSC AT were detected.

<u>Conclusions</u>: The obtained results testify the high sensitivity of MSC BM to malignant transformation after ionizing irradiation and the much higher resistance of mouse MSC BR and MSC AT. The mechanisms of these differences are yet not known. The highest level of cytokines VEGF, HGF and IL6 was found in the culture medium of MSC AT. After the action of γ -radiation, as well as after the action of γ -radiation, the secretion profile of the investigated cytokines was changed, depending both on the dose and on the type of radiation.

Key words: mesenchymal stem cells, malignant transformation, carcinogenesis, *y*-irradiation, *y*,*n*-irradiation, neutrons, bone marrow, brain, adipose tissue, cytokines, mice

REFERENCES

- 1. Zacharatou Jarlskog C, Paganetti H. Risk of developing second cancer from neutron dose in proton therapy as function of field characteristics, organ, and patient age. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2008;72(1):228-35. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2008.04.069.
- 2. Musabaeva LI, Golovkov VM. Fast neutron therapy for cancer patients. Siberian Journal of Oncology. 2015;2:88-94. (Russian.)
- Taddei PJ, Mirkovic D, Fontenot JD, Giebeler A, Zheng Y, Kornguth D, Mohan R, Newhauser WD. Stray radiation dose and second cancer risk for a pediatric patient receiving craniospinal irradiation with proton beams. Phys Med Biol. 2009 Apr 21;54(8):2259-75. DOI: 10.1088/0031-9155/54/8/001.
- Newhauser WD, Durante M. Assessing the risk of second malignancies after modern radiotherapy. Nat Rev Cancer. 2011;11(6):438-48. DOI: 10.1038/nrc3069.
- 5. Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection. ICRP Publication 131. Ann. ICRP 44(3/4): 7-357. DOI: 10.1177/0146645315595585.
- 6. Moskaleva EYu, Semochkina YuP, Rodina AV, Chukalova AA, Posypanova GA. Effects of γ -radiation on mesenchymal stem cells from mouse bone marrow and brain and their ability to induce tumors. Radiat Biol Radioecol. 2017;57(3):245-56. (Russian.)
- 7. Moskaleva EYu, Zhorova ES, Semochkina YuP, et al. Characteristics of tumors that have developed in mice injected

with syngenic irradiated mesenchymal stem cells of bone marrow. Cell and Tissue Biology, 2017;11(5):381-8.

- 8. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // Tissue Eng. 2001;7(2):211-28. DOI:10.1089/107632701300062859.
- 9. Arzumanov SS, Safronov VV, Strepetov AN. Determination of the absorbed dose in a biological sample after mixed gammaneutron irradiation. J. Techn. Physics. 2018;88(10):1581-4.
- 10. Maleta YuS, Tarasov VV. Non-parametric methods of statistical analysis in biology and medicine. Moscow. MSU. 1982. (Russian.)
- 11. Wolf C, Lafuma J, Masse R, Morin M, Kellerer AM. Neutron RBE for induction of tumors with high lethality in Sprague-Dawley rats. Radiat Res. 2000;154(4):412-20.
- 12. Broerse JJ, van Bekkum DW, Zoetelief J, Zurcher C. Relative biological effectiveness for neutron carcinogenesis in monkeys and rats. Radiat Res. 1991;128(1 Suppl):S128-35.
- 13. Kamiya K, Inoh A, Fujii Y, Kanda K, Kobayashi T, Yokoro K. High mammary carcinogenicity of neutron irradiation in rats and its promotion by prolactin. Jpn J Cancer Res. 1985;76(6):449-56.

For citation: Semochkina YuP, Rodina AV, Moskaleva EYu, Zhorova ES, Saprykin VP, Arzumanov SS, Safronov VV. Malignant Transformation of Mesenchymal Stem Cells from Different Mouse Tissues after Mixed Gamma-Neutron Irradiation *in vitro*. Medical Radiology and Radiation Safety. 2019;64(1):5-14. (Russian).

DOI: 10.12737/article_5c55fb17a02054.31513592