**Світіна Ганна Миколаївна, тимчасово не працює: &laquo;По&shy;рівняльна характеристика мезенхімальних стромальних клі&shy;тин плаценти щура і людини та вплив їх трансплантації на канцерогенез товстої кишки&raquo; (03.00.11 - цитологія, клітинна біологія, гістологія). Спецрада Д 26.001.38 у Київському на&shy;ціональному університеті імені Тараса Шевченка**

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

**На правах рукопису**

**Світіна Ганна Миколаївна**

**УДК: 616-006.04. 602:575.853.576.31**

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ**

**СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ ЩУРА І ЛЮДИНИ ТА ВПЛИВ**

**ЇХ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НА КАНЦЕРОГЕНЕЗ ТОВСТОЇ КИШКИ**

**03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія**

**Дисертація на здобуття наукового ступеня**

**кандидата біологічних наук**

 **Науковий керівник:**

**доктор біологічних наук,**

**старший науковий співробітник**

**Гарманчук Людмила Василівна**

**Київ – 2017**

**2**

**ЗМІСТ**

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ............................................................... 4**

**ВСТУП .............................................................................................................5**

**ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.................................................................................... 13**

**РОЗДІЛ 1. ПЛАЦЕНТА ЯК ДЖЕРЕЛО МУЛЬТИПОТЕНТНИХ**

**СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН............................................................................. 13**

**1.1. Поняття мультипотентних стромальних клітин .......................... 13**

**1.2. Плацента як джерело стовбурових клітин ................................... 14**

**1.3. Застосування МСК плаценти у доклінічних та клінічних**

**дослідженнях............................................................................................... 16**

**РОЗДІЛ 2. КАНЦЕРОГЕНЕЗ ТОВСТОЇ КИШКИ ......................................... 18**

**2.1. Молекулярні механізми виникнення колоректального раку ....... 18**

**2.2. Моделювання канцерогенезу товстої кишки............................... 19**

**2.3. Класифікація пухлин товстої кишки ........................................... 22**

**РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ МСК НА ПРОЦЕСИ КАНЦЕРОГЕНЕЗУ....................... 26**

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА............................................................. 30**

**РОЗДІЛ 4. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .................................... 30**

**4.1. Методи роботи з первинними культурами клітин плаценти ....... 30**

**4.2. Молекулярно-біологічні методи.................................................. 33**

**4.3. Моделювання канцерогенезу товстої кишки іn vivo та**

**трансплантація МСКП щура та людини. Схема першого експерименту .... 41**

**4.4. Моделювання канцерогенезу товстої кишки іn vivo та алогенна**

**трансплантація МСКП. Схема другого експерименту ................................ 45**

**4.5. Органне співкультивування......................................................... 50**

**РОЗДІЛ 5. ХАРАКТЕРИСТИКА МСКП ЩУРА ТА ЛЮДИНИ.................... 53**

**5.1. Методи отримання МСКП щура та їх характеристика................ 53**

**5.2. Характеристика МСКП людини.................................................. 60**

**3**

**5.3. Порівняльний аналіз МСКПщура та людини .............................. 64**

**РОЗДІЛ 6. ТРАНСПЛАНТАЦІЯ МСКП ЩУРАМ З ДМГ-ІНДУКОВАНИМ**

**КАНЦЕРОГЕНЕЗОМ ТОВСТОЇ КИШКИ..................................................... 69**

**6.1. Вплив МСКП щура і людини на канцерогенез товстої кишки.... 69**

**6.2. Розподіл та приживлення ксеногенних МСКП в організмі щура 72**

**РОЗДІЛ 7. АЛОГЕННА ТРАНСПЛАНТАЦІЯ МСКП ЩУРАМ З ДМГІНДУКОВАНИМ КАНЦЕРОГЕНЕЗОМ ТОВСТОЇ КИШКИ........................ 77**

**7.1. Аналіз канцерогенезу після алогенної трансплантації МСКП .... 77**

**7.2. Клітинна імунна відповідь у щурів з ДМГ-індукованим раком**

**товстої кишки після трансплантації МСКП ................................................ 84**

**7.3. Розподіл алогенних МСКП в організмі щура .............................. 89**

**7.4. Аналіз виживання тварин............................................................ 90**

**РОЗДІЛ 8. ОРГАННЕ СПІВКУЛЬТИВУВАННЯ ПУХЛИНИ ТОВСТОЇ**

**КИШКИ ЩУРА З МСКП ЩУРА................................................................... 96**

**УЗАГАЛЬНЕННЯ ........................................................................................ 102**

**ВИСНОВКИ ................................................................................................. 108**

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ....................................................... 109**

**4**

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

**АОМ - азоксометан**

**АЩС – аутологічна сироватка щурів**

**ДМГ – диметилгідразин**

**ЗТ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією**

**КТК – канцерогенез товстої кишки**

**ЛПС – ліпополісахарид**

**ММСК – мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини**

**МСК – мезенхімальні стромальні клітини**

**МСК КМ – мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку**

**МСКП – мезенхімальні стромальні клітини плаценти**

**МСКПл – мезенхімальні стромальні клітини плаценти людини**

**МСКПщ – мезенхімальні стромальні клітини плаценти щура**

**НСТ – нітросиній тетразолій**

**ФБС – фетальна бичача сироватка**

**ФГА – фітогемаглютінін**

**ФР – фізіологічний розчин**

**ФСБ – фосфатно-сольовий буфер**

**FISH – флуоресцентна in situ гібридизація**

**5**

**ВСТУП**

**Трансплантація мезенхімальних стромальних клітин (МСК) є**

**перспективним методом лікування багатьох соматичних захворювань [1].**

**МСК, виділені зі зрілої плаценти (МСКП) людини, відповідають критеріям**

**International Society for Cellular Therapy [2], при цьому, плацента як джерело**

**МСК має низку переваг перед іншими джерелами: отримання клітин не**

**потребує інвазивних втручань, відсутність морально-етичних проблем їх**

**використання та можливість отримати достатню кількість клітинного**

**матеріалу.**

**Дослідження впливу внутрішньовенної трансплантації МСК людини на**

**перших етапах передбачає введення клітин тваринам, і таким чином, не**

**враховуються реакції імунної системи на введення ксеногенного біологічного**

**матеріалу, які можуть змінити результат лікування [3], незважаючи на те, що,**

**як відомо, МСК можуть уникати розпізнавання аллореактивними Тклітинами та природними клітинами-кілерами [4]. Для більш точного**

**відтворення процесів необхідно використовувати алогенну трансплантацію**

**клітин, коли донор і реципієнт належать до одного виду тварин. Також**

**необхідно відмітити, що МСК виділені з різних джерел мають свої унікальні**

**особливості, що додатково може вносити зміни на результат системного**

**введення. Наприклад, залежно від методу виділення МСКП спостерігається**

**пригнічення або стимулювання проліферативної відповіді Т-лімфоцитів in**

**vitro [5].**

**Вплив МСК на розвиток пухлин вивчався з використанням in vitro**

**співкультивування [6] або моделях ксенотрансплантацій, при яких МСК**

**людського походження були трансплантовані лабораторним тваринам [7].**

**Противоречивий ефект МСК на рак може бути пов’язаним із використанням**

**різних підходів моделювання канцерогенезу, а саме індукування раку**

**хімічними речовинами [8], трансплантації трансформованих ліній клітин,**

**6**

**ксеногенних по відношенню до тварини реципієнта [9]. Крім того, вплив**

**МСК in vivo в значній мірі була оцінена на основі змін у розмірі або масі**

**ксенотрансплантованих пухлин в імунодефіцитних реципієнтах, які**

**відрізняються від людей або тварин зі спонтанним раком. Однак вплив**

**системного введення МСК на ініціацію та розвиток раку є не достатньо**

**вивченим.**

**Колоректальний рак залишається другим за поширеністю раком у**

**Європі та третім у світі [10]. Симптоми захворювання з’являються вже тоді,**

**коли пухлина набула великих розмірів, тому лише у 39 % випадках**

**колоректальний рак діагностується на ранніх стадіях. В інших випадках**

**прогноз перебігу захворювання залишається несприятливим, 5-річне**

**виживання досягає лише 11-69 % [11]. Диметилгідразин (ДМГ)-індукована**

**модель канцерогенезу товстої кишки (КТК) повторює морфологічні та**

**молекулярні етапи раку товстої кишки у людини на кожному етапі розвитку**

**пухлини. Під впливом метаболіту ДМГ метилдіазоніуму у колоноцитах**

**щурів виникають мутації, в проонкогенах, які також спричинюють КТК у**

**людини: APC, KRAS, TP53, а також мікросателітну нестабільність та**

**хромосомну нестабільність [12].**

**Дослідження результатів як ксеногенної, так і алогенної**

**внутрішньовенної трансплантації мезенхімальних стромальних клітин**

**плаценти на розвиток спонтанних пухлини товстої кишки стало головною**

**ідеєю у виконанні дисертаційної роботи.**

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

**Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології»**

**Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках**

**бюджетної теми «Механізми реалізації адаптаційно – компенсаторних**

**реакцій організму за умови розвитку різних патологій» ( № д/р 0111U004648,**

**2011 – 2015 роки), а також бюджетної теми «Альтернативні моделі для**

**тестування клітинних препаратів на онкогенність» Відділення цільової**

**7**

**підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка**

**при НАН України (РК № 0114U003877).**

**Мета дослідження – виділити і охарактеризувати мезенхімальні**

**стромальні клітини з плаценти людини та щура та оцінити вплив їх**

**внутрішньовенної трансплантації на розвиток пухлин товстої кишки при**

**диметилгідразин-індукованому канцерогенезі товстої кишки у щурів.**

**Завдання:**

** Виділити мезенхімальні стромальні клітини плаценти щура та встановити**

**їх походження;**

** Провести порівняльний аналіз характеристик мезенхімальних**

**стромальних клітини плаценти людини та щура;**

** Встановити та порівняти особливості розселення та приживлення**

**трансплантованих мезенхімальних стромальних клітин плаценти щура та**

**людини;**

** Визначити влив внутрішньовенної трансплантації мезенхімальних**

**стромальних клітин плаценти людини на індукований канцерогенез**

**товстої кишки щура;**

** Дослідити влив внутрішньовенної алогенної трансплантації**

**мезенхімальних стромальних клітин плаценти на індукований**

**канцерогенез товстої кишки щура та зміни деяких показників імунної**

**системи;**

** Вивчити вплив співкультивування мезенхімальних стромальних клітин**

**плаценти щура на рівень апоптозу та проліферації клітин пухлин товстої**

**кишки за умов їх органної культури**

**Об’єкт дослідження – мезенхімальні стромальні клітини плаценти,**

**диметилгідразин-індукована модель канцерогенезу товстої кишки.**

**Предмет дослідження – характеристики мезенхімальних стромальних**

**клітин плаценти, внутрішньовенне введення мезенхімальних стромальних**

**клітин плаценти щурам з диметилгідразин-індукованим канцерогенезом**

**товстої кишки.**

**8**

**Методи дослідження: метод виділення первинних культур,**

**полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР),**

**цитофлуориметричні, флуоресцентна in situ гібридизація, гістологічні,**

**імуноцитохімічні, імуногістохімічні, трансдукція клітин еукаріот, світлова та**

**конфокальна мікроскопія, моделювання ДМГ-індукованого канцерогенезу**

**товстої кишки щурів, статистична обробка результатів.**

**Наукова новизна отриманих результатів.**

**1. Вперше встановлено, що мезенхімальні стромальні клітини**

**плаценти щура фетального походження характеризуються імунофенотипом**

**та потенціалом до диференціювання властивим мезенхімальним стромальним**

**клітинам, однак у порівнянні з мезенхімальними стромальними клітинами**

**плаценти людини малють низький рівень експресії CD44 та не експресують**

**трофобласт-асоційовані гени.**

**2. Показана здатність мезенхімальних стромальних клітин плаценти**

**людини та щура приживлюватися в тканинах товстої кишки, легень, печінки**

**та селезінки щурів протягом одного тижня після внутрішньовенної**

**трансплантації інтактним щурам, а також в тканині пухлин товстої кишки**

**при трансплантації щурам з диметилгідразин-індукованим канцерогенезом**

**товстої кишки.**

**3. Вперше виявлено, що ксеногенна та алогенна трансплантація**

**мезенхімальних стромальних клітин плаценти щурам з диметилгідразиніндукованим канцерогенезом товстої кишки на середніх стадіях розвитку**

**пухлин не впливає на кількість новоутворень та показники загальної**

**середньої площі поперечного перерізу пухлин.**

**3. Вперше з’ясовано, що алогенна внутрішньовенна трансплантація**

**мезенхімальних стромальних клітин плаценти щурам з диметилгідразиніндукованим канцерогенезом товстої кишки призводить до зростання**

**розмірів пухлин з 4 ступенем інвазії.**

**4. Вперше показано, що внутрішньовенна алогенна трансплантація**

**мезенхімальних стромальних клітин плаценти призводить до скорочення**

**9**

**тривалості виживання щурів із диметилгідразин-індукованим**

**канцерогенезом товстої кишки на 17 днів.**

**6. Функціональна та фагоцитарна активність перитонеальних**

**макрофагів та показники клітинного циклу спленоцитів не змінюються на 5**

**тиждень після внутрішньовенної алогенної трансплантації мезенхімальних**

**стромальних клітин плаценти щура на середніх стадіях диметилгідразиніндукованого канцерогенезу товстої кишки.**

**7. Показано, що при органному контактному і безконтактному**

**співкультивуванні мезенхімальних стромальних клітин плаценти щура з**

**слайсами пухлин товстої кишки щура не змінювалася проліферативна**

**активність і рівень апоптозу у тканинах пухлин.**

**Практичне значення одержаних результатів.**

**1. Дані про особливості культур мезенхімальних стромальних**

**клітин плаценти щура можуть бути використані для подальших їх**

**доклінічних досліджень за різного типу патологій.**

**2. Дані про розподіл та здатність до приживлення мезенхімальних**

**стромальних клітин плаценти щурячого та людського походження в**

**організмі щура можуть бути використані в дизайні подальших доклінічних та**

**клінічних випробувань.**

**3. Виявлені ефекти трансплантації мезенхімальних стромальних**

**клітин плаценти можуть бути використані для розробки рекомендацій щодо**

**використання клітинної терапії для пацієнтів з онкологічними**

**захворюваннями.**

**4. Результати доповнюють існуючі дані про системну імунну**

**реакцію перитонеальних макрофагів та лімфоцитів селезінки на середніх**

**стадіях типового перебігу диметилгідразин-індукованого канцерогенезу**

**товстої кишки щура, а також при алогенній трансплантації мезенхімальних**

**стромальних клітин плаценти.**

**Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним**

**науковим дослідженням. Планування та обговорення усіх етапів дослідження**

**10**

**здійснено спільно з науковим керівником, директором та заступником**

**директора Банку пуповинної крові та інших клітин і тканин людини к.б.н.**

**Лобинцевою Г.С. та к.б.н. Шаблієм В.А. Особисто здобувачем було**

**проведено виділення МСКП щура, визначено їх здатність до**

**диференціювання у адипогенному та остеогенному напрямках, проведено**

**імуноцитохімічні дослідження та FISH-аналіз отриманих культур.**

**Здобувачем було проведення моделювання ДМГ-індукованого канцерогенезу**

**товстої кишки щура, проведено внутрішньовенну трансплантацію МСКП**

**щура та МСКП людини, макроскопічний і гістологічний аналіз утворених**

**пухлин, імуногістохімічні дослідження пухлин, проведено всі статистичні**

**розрахунки. Отримання МСКП людини проводили спільно зі**

**співробітниками Банку пуповинної крові та інших клітин і тканин людини.**

**Проточну цитометрію проводили спільно з завідуючим лабораторією**

**клітинних та тканинних культур Державної установи «Інститут генетичної та**

**регенеративної медицини» Національної академії медичних наук України"**

**(м. Київ) к.м.н. Кириком В.М. Виділення РНК та ДНК з культур клітин та**

**органів щурів, ЗТ-ПЦР проводили спільно зі співробітниками відділу**

**біосинтезу нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології і генетики**

**НАН України (м. Київ) к.б.н. Скрипкіною І.Я. та к.б.н. Арешковим**

**П.О.Дослідження параметрів клітинного циклу та рівня апоптозу проводили**

**спільно з завідуючою НДЛ експериментальної онкології Національного**

**інституту раку (м. Київ) к.б.н. Храновською Н.М. та к.б.н. Скачковою О.В.**

**Одержані результати обговорено і опубліковано в спільних статях.**

**Апробація результатів дисертації. Результати досліджень,отримані в**

**рамках виконання дисертаційної роботи, представлені у вигляді тез, усних і**

**стендових доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях,**

**зокрема World Cord Blood Congress III (Рим, Італія, 2011); IV Young**

**Scientists’ Conference of Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of**

**Ukraine in honor of the 155-year anniversary of Sergei G. Navashin (Київ,**

**Україна, 2012); International Symposium on Cell Biology jointly with 3rd**

**11**

**Ukrainian Congress for Cell Biology (Ялта, Україна, 2012); International Society**

**for Stem Cell Research 10th Annual Meeting (Йокогама, Японія, 2012);**

**науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні**

**проблеми регенеративної медицини» (Київ, Україна, 2012); International**

**Conference “Cell technologies in obstetrics, gynecology, neonatology and**

**pediatric neurology” (Київ, Україна, 2012); міжнародної конференції Cell**

**technology Week (Київ, Україна, 2013); International Society for Stem Cell**

**Recearch 12th Annual Meeting (Ванкувер, Канада, 2014); 3rd IPLASS Meeting**

**(Гранада, Іспанія, 2014); VII Міжнародної наукової конференції**

**«Психофізіологічні і вісцеральні функції і нормі і патології» (Київ, Україна,**

**2014); науково-практичної конференції з міжнародною участю**

**«Трансплантація – сьогодення, минуле та майбутнє» (Київ, Україна, 2014);**

**всесвітнього дня науки «Об’єднані наукою: перспективи міждисциплінарних**

**досліджень» (Київ, Україна, 2014); ХІІI міжнародної конференції молодих**

**вчених «Шевченківська весна: біологія» (Київ, Україна, 2015); науковопрактичної конференції з міжнародною участю «Сучасна онкологія:**

**діагностика та лікування» (для молодих вчених) (Київ, Україна, 2015);**

**“Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015” (Київ, Україна, 2015);**

**міжнародної конференції ISSCR 2015 Annual Meeting (Стокгольм, Швеція,**

**2015); міжнародної конференції Advances in Cell Biology and Biotechnology**

**(Львів, Україна, 2015), 4rd IPLASS Meeting (Ер-Ріяд, Саудівська Аравія,**

**2016).**

**Публікації. За результатами досліджень опубліковано 15 наукових**

**праць, з яких 6 наукових статей у фахових виданнях, що відповідають**

**вимогам МОН України, з яких 3 в журналах, що індексуються міжнародною**

**наукометричною базою даних Scopus, а також 9 матеріалів і тез доповідей на**

**всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях.**

**Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена**

**українською мовою на 130 сторінках і складається із вступу, огляду**

**літератури, матеріалів і методів досліджень, 4 розділів результатів власних**

**12**

**досліджень із обговоренням, аналізу та узагальнення результатів досліджень,**

**висновків, списку використаної літератури (222 посилань, з яких 220 –**

**латиницею, 2 – кирилицею). Дисертація викладена і проілюстрована 34**

**рисунками та 7 таблицями.**

ВИСНОВКИ

Удисертаційнійроботіпроведенодетальнийпорівняльнийаналізморфо

функціональниххарактеристикмезенхімальнихстромальнихклітин

плацентилюдинитащураВстановленоздатністьїхдоприживленняу

різнихтканинахорганівщуразаумоввведенняінтактнимтваринамта

тваринамзіндукованимканцерогенезомДоведенонедоцільність

використанняМСКПзаканцерогенезутовстоїкишкитакяквідмічено

підсиленняінвазивногороступухлинтаскороченнятермінувиживаності

Мезенхімальністромальніклітиниплацентищурафетальногопоходження

таксамоякімезенхімальністромальніклітиниплацентилюдинимають

імунофенотиптаздатністьдодиференціюванняу

адипогенномутаостеогенномунапрямках

УмезенхімальнихстромальнихклітинахплацентищурапорівнянозМСКП

людинивідсутняекспресіяпанцитокератинутатрофобластасоційованих

геніватакожнизькийрівеньекспресії

МСКПлюдиниякМСКПщураприживлюютьсявтканинахкишечника

легеньпечінкитаселезінкиінтактнихщурівувіддаленітермінипісля

внутрішньовенноїтрансплантації

КсеногеннавнутрішньовеннатрансплантаціяМСКПщурамзДМГіндукованимканцерогенезомтовстоїкишкинасередніхстадіях

канцерогенезуневпливаєнакількістьтаплощупухлин

АлогеннавнутрішньовеннатрансплантаціяМСКПщурамзДМГіндукованимканцерогенезомтовстоїкишкизумовлюєзбільшеннярозмірів

пухлинзступенемінвазіїнезмінюючиприцьомуфагоцитарну

активністьперитонеальнихмакрофагівтапоказниківклітинногоциклу

спленоцитівтапризводитьдоскороченнявиживаностіщурівнадіб

ПриконтактномуібезконтактномуспівкультивуванніМСКПщурівз

слайсамипухлинтовстогокишечникащурівневпливаютьна

проліферативнуактивністьірівеньапоптозуупухлинах