

Для цитирования: Лыков А.П., Кабаков А.В., Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., Райтер Т.В., Казаков О.В., Стрункин Д.Н., Суровцева М.А., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. Опухоль-ассоциированные мезенхимные стволовые клетки при химически индуцированном раке молочной железы у крыс Wistar. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 56–64. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-56-64.

For citation: Lykov A.P., Kabakov A.V., Bondarenko N.A., Poveshchenko O.V., Rayter T.V., Kazakov O.V., Strunkin D.N., Surovtseva M.A., Poveshchenko A.F., Konenkov V.I. Tumor-associated mesenchymal stem cells in chemically-induced breast cancer in Wistar rats. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 56–64. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-56-64.

ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ПРИ ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС WISTAR

А.П. Лыков^{1,2}, А.В. Кабаков¹, Н.А. Бондаренко^{1,2}, О.В. Повещенко^{1,2},
Т.В. Райтер¹, О.В. Казаков¹, Д.Н. Стрункин³, М.А. Суровцева^{1,2},
А.Ф. Повещенко^{1,2,3,4,5}, В.И. Коненков¹

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал
Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия¹
Россия, г. Новосибирск, 630060, ул. Тимакова, 2. E-mail: aplykov2@mail.ru¹

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина
Министерства здравоохранения Российской Федерации», г. Новосибирск, Россия²
Россия, г. Новосибирск, 630055, ул. Речкуновская, 15²

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия³

Россия, г. Новосибирск, 630099, ул. Ядринцевская, 14³

ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет»,
г. Новосибирск, Россия⁴

Россия, г. Новосибирск, 630091, Красный Проспект, 52⁴

ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет»,
г. Новосибирск, Россия⁵

Россия, г. Новосибирск, 630126, ул. Вилюйская, 28⁵

Аннотация

Цель исследования – сравнить морфофункциональные свойства мезенхимных стволовых клеток из тканей молочной железы и ткани химически-индуцированной опухоли молочной железы. **Материал и методы.** У 20 крыс-самок Wistar после синхронизации эструса хорионическим гонадотропином, интрамаммарным введением N-метил-N-нитрозомочевины индуцирована аденокарцинома молочной железы, контрольную группу составили 5 крыс. Верификацию опухоли проводили гистологически и иммуногистохимически. Принадлежность выделенных клеток из ткани молочной железы и опухоли молочной железы к мезенхимным стволовым клеткам верифицировали на основании морфологии и фенотипирования на проточном цитофлуориметре FACS Canto II. Функциональные свойства мезенхимных стволовых клеток оценивали в МТТ-тесте и по уровню продукции оксида азота в норме и при индукции перекисью водорода окислительного стресса. Уровни пролактина, лютеинизирующего гормона и эстрадиола E₂ в моче исследовали твердофазным иммуноферментным анализом. **Результаты.** Химически индуцированная опухоль молочной железы по данным гистологического и иммуногистохимического исследования соответствовала люминальному В1 типу рака молочной железы у человека. Уровни пролактина в моче после синхронизации эструса у животных с развившейся опухолью были повышены, а у животных с неразвившейся опухолью молочной железы снижены уровни пролактина и лютеинизирующего гормона, но повышены уровни эстрадиола E₂. Из ткани опухоли молочной железы получено большее количество мезенхимных стволовых клеток с фенотипом CD45-/CD90+. Мезенхимные стволовые клетки из ткани опухоли проявляли повышенный пролиферативный потенциал и были более устойчивы к окислительному стрессу. **Заключение.** Из ткани химически индуцированной опухоли молочной железы получены опухоль-ассоциированные мезенхимные стволовые клетки, которые имеют высокий пролиферативный потенциал и устойчивы к окислительному стрессу. Выявленные

морфофункциональные различия мезенхимных стволовых клеток из тканей молочных желез и ткани опухоли молочной железы требуют дальнейшего исследования.

Ключевые слова: опухоль молочной железы, мезенхимные стволовые клетки, пролиферация, оксид азота, половые гормоны, моча.

TUMOR-ASSOCIATED MESENCHYMAL STEM CELLS IN CHEMICALLY-INDUCED BREAST CANCER IN WISTAR RATS

A.P. Lykov^{1,2}, A.V. Kabakov¹, N.A. Bondarenko^{1,2}, O.V. Poveshchenko^{1,2},
T.V. Rayter¹, O.V. Kazakov¹, D.N. Strunkin², M.A. Surovtseva^{1,2},
A.F. Poveshchenko^{1,2,3,4,5}, V.I. Konenkov¹

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics. Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia¹

2, Timakova Street, 630060-Novosibirsk, Russia. E-mail: aplykov2@mail.ru¹

Research Institute of Circulation Pathology, Ministry of Health Care of Russian Federation, Novosibirsk, Russia²

15, Rechkunovskaya Street, 630055-Novosibirsk, Russia²

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia³

14, Yadrintsevskaya Street, 630099-Novosibirsk, Russia³

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia⁴

52, Krasny prospect, 630091-Novosibirsk, Russia⁴

Novosibirsk State Pedagogic University, Novosibirsk, Russia⁵

28, Vilyuiskaya Street, 630126-Novosibirsk, Russia⁵

Abstract

Objective: to compare the morphological and functional properties of mesenchymal stem cells from mammary tissues and chemically-induced mammary tumor tissues. **Material and Methods.** The study included 25 female Wistar rats. In 20 rats, mammary carcinoma was induced by intramammary injection of N-methyl-N-nitrosourea after estrus synchronization with chorionic gonadotropin. The control group consisted of 5 rats. Mammary carcinoma was verified histologically and immunohistochemically. To examine, whether the cells isolated from normal tissue and tumor tissue belonged to mesenchymal stem cells, FACS Canto II flow cytometer was used. The functional properties of mesenchymal stem cells were evaluated in MTT assay by the level of nitric oxide production in normal and by hydrogen peroxide-induced hypoxia. The levels of prolactin, luteinizing hormone and estradiol E₂ in urine were studied using solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. **Results.** Chemically-induced mammary tumor according to histological and immunohistochemical studies corresponded to luminal B type breast cancer in humans. In rats that developed mammary tumors, the urine prolactin levels after synchronization of estrus were increased. In rats that did not develop tumors, the levels of prolactin and luteinizing hormone were decreased, but the levels of estradiol E₂ were increased. More mesenchymal stem cells with CD45-/CD90+ phenotype were obtained from the breast tumor tissue. Mesenchymal stem cells from tumor tissue showed increased proliferative potential and were more resistant to hypoxia. **Conclusion.** Tumor-associated mesenchymal stem cells having high proliferative potential and resistance to hypoxia were obtained from chemically-induced mammary tumor tissue. Morphologic and functional differences in mesenchymal stem cells obtained from mammary breast tissue and tumor tissue require further studies.

Key words: breast tumor, mesenchymal stem cells, proliferation, nitric oxide, sex hormones, urine.

Химически индуцированный N-метил-N-нитрозомочевинной рак молочной железы у лабораторных животных является аналогом рака молочной железы у человека [1]. При интрамаммарном введении N-метил-N-нитрозомочевины развитие опухоли молочной железы индуцируется в 92 %, механизмы резистентности в индукции опухолевой трансформации при таком способе инициации опухоли молочной железы мало исследованы. В патогенезе рака молочной железы существенная роль отводится гормонам, в том числе и половым [2], в частности образованию эстрогенов из андрогенов in situ

как следствие повышенной экспрессии ароматазы в тканях молочных желез [3]. Не менее важная роль в патогенезе рака молочной железы отводится и клеточному составу опухолевого микроокружения, включая и клетки стромы опухоли. Показано, что нормальные фибробласты стромы молочных желез подавляют рост опухоли, в то же время опухоль-ассоциированные фибробласты усиливают канцерогенез [4]. О наличии проонкогенного действия мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК) при раке молочной железы сообщается в литературе [5–6].

Цель исследования – изучение морфофункциональных свойств МСК крыс-самок Wistar, выделенных из ткани химически индуцированной опухоли молочной железы, контралатеральной молочной железы и ткани молочной железы интактных животных.

Материал и методы

Эксперименты на лабораторных животных проведены с соблюдением принципов гуманного обращения с животными, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕСС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Эксперимент выполнен на 25 крысах-самках Wistar массой 300–350 г. Опухоль молочной железы у 20 крыс-самок Wistar после синхронизации эструса (3 МЕ/крысу хорионического гонадотропина внутривбрюшинно, Гонадотропин хорионический, Московский эндокринный завод, Россия) индуцировали введением N-метил-N-нитрозомочевина (30 мг/кг, Sigma-Aldrich, США) 5 раз с интервалом в 7 дней подкожно в область одной и той же молочной железы (2-я молочная железа справа).

Спустя 6 мес выделяли ткань опухоли молочной железы, ткань из контралатеральной молочной железы и ткань молочной железы от интактных животных, измельчали ножницами и подвергали ферментативной диссоциации инкубацией при 37 °С с 0,05 % раствором коллагеназы I типа (Sigma-Aldrich, США) в течение 4 ч. После отмывки диссоциированных клеток из тканей молочной железы и тканей опухоли молочной железы клетки рассеивали в пластиковые флаконы (TPP, Швейцария) в питательной среде DMEM, дополненной 80 мкг/мл гентамицина сульфата, 2 мМ L-глутамина (ICN, США) и 15 % фетальной телячьей сыворотки, и растили при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Через 48 ч не прикрепленные к пластику клетки удаляли, а прилипающую фракцию клеток культивировали до получения конфлюэнтного слоя. Снятие МСК осуществляли с использованием 0,25 % раствора трипсина и 0,02 % раствора ЭДТА (ICN, США). Пролиферацию МСК в присутствии и в отсутствие 100 мМ H₂O₂ оценивали через 72 ч спектрофотометрически (длина волны 492 нм) по включению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ-тест). В кондиционных средах от МСК, росших в присутствии и в отсутствие 100 мМ H₂O₂ в течение 72 ч, спектрофотометрически определяли уровни оксида азота (NO) с использованием реактива Грисса. Фенотип МСК от 3-го пассажа исследовали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II с использованием FITC-конъюгированных моноклональных антител к CD45 и PE-конъюгированных моноклональных антител к CD90 (Sony, Япония). Гистологическое исследование опухолевой ткани

проводили по общепринятой методике с окраской гематоксилином и эозином и последующим анализом на микроскопе Olympus BX41. Иммуногистохимически (ИГХ) определяли экспрессию эстрогеновых рецепторов α , прогестероновых рецепторов, Her2/neu рецепторов и интенсивность пролиферации по Ki67. ИГХ проводили на автоматической платформе для окрашивания Autostainer Link48 (Dako, Дания): образцы помещали Target Retrieval Solution buffer (Dako, Дания) с использованием PreTreatment Link Platform (Dako, Дания). Далее срезы отмывали смесью TBS/0,05 % Tween buffer в течение 5 мин с EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent для блокирования эндогенной пероксидазной активности. Далее срезы отмывали смесью TBS/0,05 % Tween buffer и инкубировали с первичными антителами: к α -рецептору эстрогена (кроличьи антитела, клон E115, pH 9,0 и рабочее разведение 1:100, Novus Biologicals, Германия); к рецептору прогестерона (кроличьи антитела, Polyclonal, pH 9,0 и рабочее разведение 1:100, Novus Biologicals, Германия); к Her2/neu рецептору (кроличьи антитела, клон SP3, pH 6,0 и рабочее разведение 1:300, Labvision, Швеция); к Ki67 (мышинные антитела, клон MIB-5, pH 6,0 и рабочее разведение 1:25, Dako, Дания). Далее срезы отмывали смесью TBS/0,05 % Tween buffer в течение 20 мин при комнатной температуре с EnVision FLEX/horseradish peroxidase (HRP)-conjugated (вторичные меченные пероксидазой хрена антитела, Dako, Дания). После этого субстрат пероксидаза диаминобензидина (Dako, Дания) наносился на срезы, инкубация 10 мин при комнатной температуре. Далее срезы прокрашивали гематоксилином Майера, дегидратировали в спиртах (70 %; 96 %; 99,8 %) и ксилоле, после чего оценивали реакцию иммуногистохимии под микроскопом (Leica DM 750, Германия). Уровни гормонов в моче определяли иммуноферментным анализом с использованием коммерческих наборов: «ГонадотропинИФА-ЛГ», «ИФА-Пролактин-01» производства ООО «Компания Алкор Био» (СПб., Россия) и «Estradiol ELISA» (DRG Diagnostics, Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (LQ) и верхним (UQ) квартилями; достоверность различия рассчитывалась по U-критерию Манна – Уитни и принималась при значениях $p \leq 0,05$.

Результаты

Химически индуцированная опухоль молочной железы у крыс-самок Wistar развивалась в 90 %, макроскопически характеризовалась очаговыми образованиями с фиброзной оболочкой, нечеткими контурами, а у части животных с изъязвлениями и обызвествлением кожи над очагом опухолевого роста. В случаях несформировавшейся химически

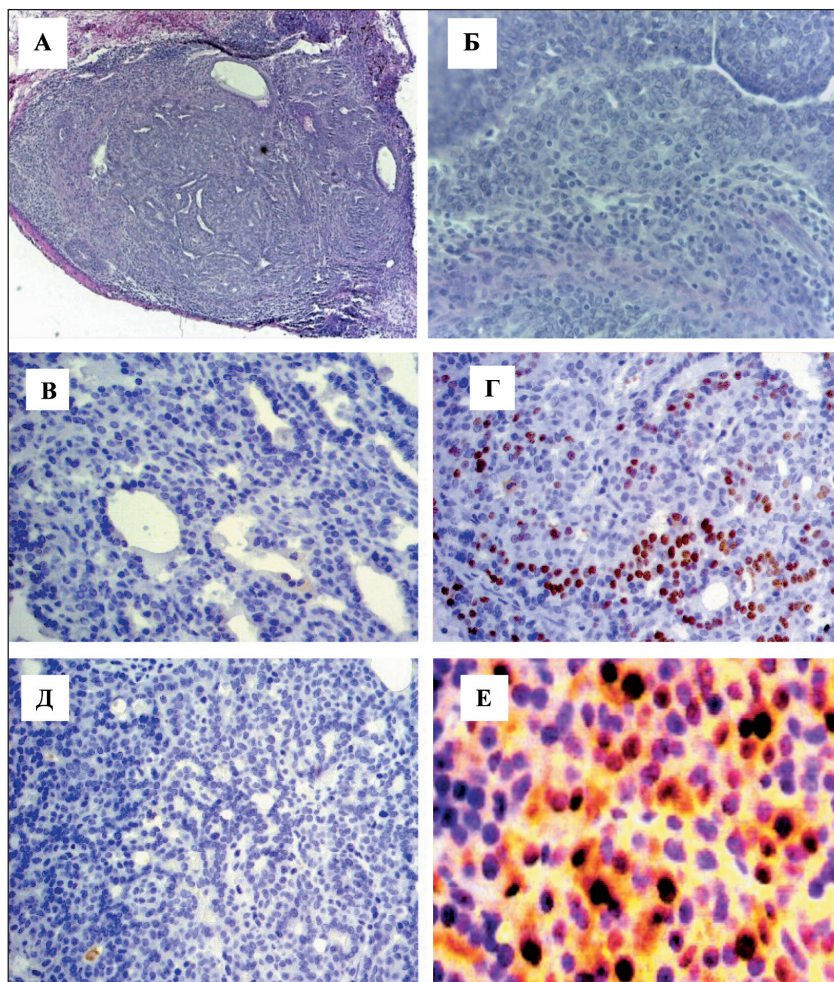


Рис. 1. Микрофото. Умереннодифференцированная аденокарцинома с инфильтрирующим характером роста: А – окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$; Б – окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$; В – негативная по экспрессии α -рецепторов к эстрогену кроличьи антитела, клон E115, Novus Biologicals, Германия, $\times 400$; Г – позитивная по экспрессии рецепторов к прогестерону, кроличьи антитела, Polyclonal, Novus Biologicals, Германия, $\times 400$; Д – негативная по экспрессии рецептора Her-2/neu кроличьи антитела, клон SP3, Labvision, Швеция, $\times 400$; Е – позитивная по Ki67 мышьиные антитела, клон MIB-5, Dako, Дания, $\times 1000$

индуцированной опухоли молочной железы макроскопически ткань молочной железы состояла из фиброзных тяжей с небольшими включениями жировой ткани. Гистологическая и гистохимическая характеристика химически индуцированной опухоли молочной железы у крыс-самок Wistar представлена на рис. 1.

Микроскопически опухоль молочной железы характеризовалась наличием протоковых, железистых, кривозных структур, выстланных умеренно полиморфным эпителием с вариабельной митотической активностью; тубулярные структуры преобладали, отдельные участки ткани опухоли представлены перемешанными гнездами, цугами и группами отдельных клеток с менее оформленными протоками вплоть до их полного исчезновения, что соответствует умереннодифференцированной аденокарциноме молочной железы (рис. 1А, Б). Более того, клетки умереннодифференцированной карциномы молочной железы не несли рецепторы к эстрогену (рис. 1В) и к эпидермальному фактору человека Her-2/neu (рис. 1Д), но были позитивны по наличию рецепторов к прогестерону (рис. 1Г) и обладали высоким пролиферативным потенциалом по данным исследования Ki67 (рис.

1Е). Все это в совокупности позволяет нам рассматривать данную аденокарциному как аналог люминального В1 типа рака молочной железы человека, что согласуется с данными других исследователей [7].

С учетом вовлеченности половых гормонов в патогенез опухолей молочных желез нами исследованы уровни гормонов в моче крыс-самок Wistar после синхронизации эструса и спустя 6 мес после индукции опухоли молочной железы (табл. 1). Показано, что уровни пролактина в моче животных с развившейся опухолью молочной железы сразу после синхронизации эструса были выше, чем в контроле ($p \leq 0,05$). Уровни пролактина и лютеинизирующего гормона в моче мышей с неразвившейся опухолью были ниже, чем в контроле и у животных с развившейся опухолью молочной железы, а уровни в моче эстрадиола E_2 были выше по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Спустя 6 мес после синхронизации эструса и индукции N-метил-N-нитрозомочевинной опухоли молочной железы только у животных с неразвившейся опухолью молочной железы выявлены повышенные уровни в моче пролактина по сравнению с контролем и повышенные уровни

Уровни гормонов в моче исследуемых групп крыс-самок Wistar (Me; LQ-UQ)

Параметры	Группы животных			
	Контрольная	С опухолью	Без опухоли	
После синхронизации эструса	Прولاктин (мМЕ/мл)	37,9 37,5–39,2	275,36 253,36–282,7*	26,5 25,75–27,25***
	Лютеинизирующий гормон (мМЕ/мл)	2,32 2,23–2,35	2,88 2,09–4,74	0,92; 0,71–1,13***
	Эстрадиол E ₂ (пг/мл)	139,4 127,5–143,4	220,83 179,77–254,8	202,8 198,32–207,38*
Через 6 мес после синхронизации эструса	Прولاктин (мМЕ/мл)	120,91 116,7–133,7	204,35 156,5–252,2	273,3 224,1–322,5*
	Лютеинизирующий гормон (мМЕ/мл)	2,27 2,15–2,66	2,62 2,48–2,8	2,34 1,32–3,36
	Эстрадиол E ₂ (пг/мл)	215,6 206,23–218,66	142,28 134,39–150,2*	220,83 209,47–232,2**

Примечания: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с группой животных с опухолью молочной железы ($p \leq 0,05$).

эстрадиола E₂ по сравнению с животными с развившейся опухолью молочной железы ($p \leq 0,05$). Кроме этого, уровни в моче эстрадиола E₂ у крыс-самок с опухолью молочной железы были ниже, чем в контроле ($p \leq 0,05$).

Необходимо отметить тот факт, что между уровнями лютеинизирующего гормона и эстрадиола E₂ в моче животных сразу после синхронизации эструса, у которых развивается опухоль молочной железы, была выявлена обратная и сильная сопряженность ($r = -0,89$, $p \leq 0,05$). В то же время в группе животных, у которых не развилась опухоль молочной железы, сразу после синхронизации эструса уровни пролактина в моче находились в прямой и сильной сопряженности с лютеинизирующим гормоном ($r = 0,92$, $p \leq 0,05$) и сильной и обратной взаимосвязи с эстрадиолом E₂ через 6 мес ($r = -0,92$, $p \leq 0,05$). Кроме этого, в этой группе выявлена прямая и сильная связь уровней лютеинизирующего гормона в моче сразу после синхронизации эструса с эстрадиолом E₂ ($r = 0,92$, $p \leq 0,05$) в эти же временные рамки наблюдалась обратная и сильная сопряженность с пролактином и лютеинизирующим гормоном спустя 6 мес ($r = -0,92$, $p \leq 0,05$). Исходные уровни в моче

эстрадиола E₂ находились в обратной и сильной взаимосвязи с уровнями эстрадиола E₂ в моче этих животных спустя 6 мес ($r = -0,92$, $p \leq 0,05$). Установлено, что уровни эстрадиола E₂ в моче животных без опухоли спустя 6 мес после синхронизации эструса и индукции опухоли молочной железы N-метил-N-нитрозомочевинной находились в прямой и сильной связи с пролактином и лютеинизирующим гормоном ($r = 0,92$, $p \leq 0,05$).

Культуры клеток МСК, выделенных из тканей молочной железы и тканей опухоли молочной железы, были фибробластоподобной морфологии (рис. 2). В группе животных с опухолью молочной железы из ткани опухоли выделено большее количество МСК по сравнению с остальными источниками получения МСК ($p \leq 0,05$). Более того, именно в этой группе в ткани опухоли молочной железы большее количество МСК с фенотипом CD45-/CD90+, чем в остальных образцах тканей молочных желез ($p \leq 0,05$). Кроме этого, МСК, выделенные из ткани опухоли, имели повышенный пролиферативный потенциал и были более устойчивы к окислительному стрессу *in vitro*, чем МСК, полученные из других источников ($p \leq 0,05$). МСК,

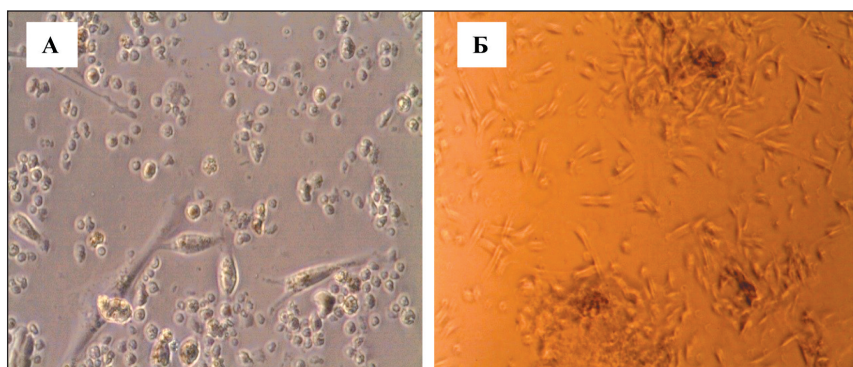


Рис. 2. Фибробластоподобная морфология опухоль-ассоциированных мезенхимных стромальных клеток (нативный препарат): А – единичные опухоль-ассоциированные МСК (вытянутые клетки) среди клеток опухоли молочной железы (округлые клетки), $\times 200$; Б – формирование колоний опухоль-ассоциированными МСК, $\times 40$

Таблица 2

Морфофункциональная характеристика мезенхимных стволовых клеток ткани молочной железы и химически индуцированной N-метил-N-нитрозомочевинной опухоли молочной железы у крыс-самок Wistar (Me; LQ-UQ)

Параметры	Источник выделения мезенхимных стромальных клеток				
	Молочные железы контрольной группы	Опухоль молочной железы группы с опухолью	Контралатеральная молочная железа группы с опухолью	Молочные железы группы без опухоли	Контралатеральная молочная железа группы без опухоли
Выход клеток (10 ⁶)	1,75; 1,75–1,87	6,0; 5,5–6,5*	2,75; 2,62–2,87**	2,37; 2,31–2,43****	1,75; 1,37–2,12****
CD45+/CD90-	0,1; 0,1–0,1	4,26; 3,53–4,99*	0,005; 0,0025–0,008***	0,96; 0,49–1,42* ****	0,04; 0,03–0,05* ****
CD45+/CD90+	0,05; 0,05–0,05	3,88; 3,84–3,92*	0,015; 0,00750,022*	0,085; 0,047–0,122**	0,0; 0,0–0,0***#
CD45-/CD90+	10,24; 10,24–10,243	25,99; 25,28–26,69*	15,23; 14,08–16,38* **	5,84; 5,75–5,92* ****	10,89; 9,9–11,85* ***#
Пролиферация	0,374; 0,373–0,374	0,69; 0,61–0,77*	0,47; 0,42–0,53**	0,32; 0,3–0,34***	0,424; 0,379–0,469* **
Пролиферация + H ₂ O ₂	0,386; 0,367–0,393	0,56; 0,54–0,58*	0,43; 0,4–0,47*	0,41; 0,35–0,46**	0,4; 0,38–0,43**
Продукция NO	19,58; 18,9–21,65	18,1; 18,05–18,15*	38,55; 32,25–44,87* **	15,5; 13,9–17,1****	21,95; 21,53–22,4* ***#
Продукция NO + H ₂ O ₂	25,42; 24,6–27,9	26,2; 26,2–26,2	31,45; 30,87–32,02* **	18,9; 17,75–20,05**	28,0; 27,0–29,1#

Примечания: CD – кластер дифференцировки; H₂O₂ – наличие в питательной среде 100 мМ H₂O₂; NO – оксид азота; * – различия статистически значимы по сравнению с контролем (p≤0,05); ** – различия статистически значимы по сравнению с группой с опухолью молочной железы (p≤0,05); *** – различия статистически значимы по сравнению с контралатеральной молочной железой в группе с опухолью молочной железы (p≤0,05); # – различия статистически значимы по сравнению с группой без опухоли молочной железы (p≤0,05).

выделенные из ткани опухоли молочной железы и из ткани неразвившейся опухоли молочной железы, в меньшей степени продуцировали NO (p≤0,05).

У крыс-самок с опухолью молочной железы показано наличие сильной и обратной связи количества клеток с фенотипом CD45+/CD90+ с пролиферативной активностью МСК в условиях окислительного стресса и уровнями продукции NO, а также с исходными уровнями пролактина в моче после синхронизации эструса (r=-0,92; r=-0,91 и r=-0,97, p≤0,05 соответственно). В группе животных с неразвившейся опухолью молочной железы количество клеток с фенотипом CD45+/CD90+ и количество клеток с фенотипом CD45-/CD90+ находились в обратной и сильной связи с уровнями в моче сразу после синхронизации эструса лютеинизирующего гормона (r=-0,917, p≤0,05) и в прямой и сильной связи с уровнями в моче спустя 6 мес эстрадиола E₂ (r=0,92, p≤0,05). Пролиферативный потенциал МСК в присутствии и в отсутствие перекиси водорода находился в обратной и сильной связи с уровнями в моче спустя 6 мес эстрадиола E₂ (r=-0,917, p≤0,05). Уровни продукции МСК оксида азота в отсутствие перекиси водорода находились в обратной и сильной связи с уровнями эстрадиола E₂ спустя 6 мес после синхронизации эструса (r=-0,917, p≤0,05), а в присутствии перекиси водорода – в прямой и сильной связи (r=0,917, p≤0,05).

Обсуждение

Известно, что опухоль-ассоциированное микроокружение, в том числе и МСК, играет существенную роль в канцерогенезе [5]. Показано, что опухоль-ассоциируемые фибробласты и МСК инициируют провоспалительное микроокружение в области роста опухолевых клеток и тем самым по типу хронического воспаления инициируют условия для злокачественной трансформации клеток молочных желез [8]. Известно также, что МСК обладают тропизмом к опухолям, способствуют их росту и метастазированию [9]. В основе данного эффекта МСК лежит паракринное влияние секретуемых МСК факторов, приводящее к снижению экспрессии E-кадгерина и повышению экспрессии протеинов, необходимых для эпителиально-мезенхимного перехода (N-кадгерин, виментин, фибронектин) [9]. О роли секретуемых МСК, выделенных из опухолей молочных желез, свидетельствуют данные L. Usha et al. [10], которые показали, что кондиционная среда от МСК активирует пролиферативный и миграционный потенциал МСК. *In vitro* авторы обнаружили антипролиферативное влияние кондиционных сред на опухолевые клеточные линии как следствие задержки в G₀/G₁ фазе клеточного цикла, но данный эффект не установлен *in vivo*. Также показано, что МСК из тканей молочных желез способствуют пенетрации компонентов внеклеточного матрикса опосредованно через экспрессию ММП-1 и ММП-3, тем самым способствуя инвазии опухолевых клеток [11].

Полученные нами результаты исследования фенотипа МСК, выделенных из тканей молочных желез и тканей опухоли молочных желез, согласуются с результатами исследований других авторов, которые также отметили экспрессию МСК из тканей опухоли человека поверхностных маркеров, характерных для мезенхимных стволовых клеток, и были способны к цитодифференцировке в остеогенном и адипогенном направлении [6].

Заключение

Из ткани опухоли молочной железы, химически индуцированной интрамаммарным введением N-метил-N-нитрозомочевины, получены опухоль-

ассоциированные мезенхимные стволовые клетки, которые имеют высокий пролиферативный потенциал и устойчивы к окислительному стрессу. В основе резистентности к действию N-метил-N-нитрозомочевины у крыс-самок Wistar могут лежать генетическая неоднородность данных животных и, как следствие, различные уровни половых гормонов, вовлеченных в канцерогенез при опухолях молочных желез, а также количество МСК в ткани молочной железы и их морфофункциональные свойства. Выявленные морфофункциональные различия мезенхимных стволовых клеток из тканей молочных желез и ткани опухоли молочной железы требуют дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Чочиева А.Р. Исследование влияния летрозола на некоторые показатели гормонально-метаболического статуса при экспериментальном раке молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2008; 1: 100–102. [Chochieva A.R. The study of the influence of letrozole on some factors of hormonal and metabolic status under experimental carcinogenesis of the mammary gland. Siberian Journal of Oncology. 2008; 1: 100–102. (in Russian)].
2. Лыков А.П., Кабаков А.В., Казаков О.В., Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., Райтер Т.В., Повещенко А.Ф., Стрункин Д.Н., Коненков В.И. Уровни микроРНК и гормонов в лимфе грудного протока крыс на модели рака молочной железы, индуцированной N-метил-N-нитрозомочевинной. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016; 162 (9): 374–377. [Lykov A.P., Kabakov A.V., Kazakov O.V., Bondarenko N.A., Poveshchenko O.V., Raiter T.V., Poveshchenko A.F., Strunkin D.N., Konenkov V.I. Levels of miRNAs and hormones in the lymph of the thoracic duct of rats on a model of breast cancer induced by N-methyl-N-nitrosourea. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2016; 162 (9): 374–377. (in Russian)].
3. Farhat G.N., Cummings S.R., Chlebowski R.T., Parimi N., Cauley J.A., Rohan T.E., Huang A.J., Vitolins M., Hubbell F.A., Manson J.E., Cochrane B.B., Lane D.S., Lee J.S. Sex hormone levels and risks of estrogen receptor-negative and estrogen receptor-positive breast cancers. J Natl Cancer Inst. 2011 Apr 6; 103 (7): 562–70. doi: 10.1093/jnci/djr031.
4. Al-Rakan M.A., Colak D., Hendrayani S.F., Al-Bakheet A., Al-Mohanna F.H., Kaya N., Al-Malik O., Aboussekhra A. Breast stromal fibroblasts from histologically normal surgical margins are pro-carcinogenic. J Pathol. 2013 Dec; 231 (4): 457–65. doi: 10.1002/path.4256.
5. Cuiffio B.G., Campagne A., Bell G.W., Lembo A., Orso F., Lien E.C., Bhasin M.K., Raimo M., Hanson S.E., Marusyk A., El-Ashry D., Hematti P., Polyak K., Mechta-Grigoriou F., Mariani O., Volinia S., Vincent-Salomon A., Taverna D., Karnoub A.E. MSC-regulated microRNAs converge on the transcription factor FOXP2 and promote breast cancer

metastasis. Cell Stem Cell. 2014 Dec 4; 15 (6): 762–74. doi: 10.1016/j.stem.2014.10.001.

6. Zhang C., Zhai W., Xie Y., Chen Q., Zhu W., Sun X. Mesenchymal stem cells derived from breast cancer tissue promote the proliferation and migration of the MCF-7 cell line in vitro. Oncol Lett. 2013 Dec; 6 (6): 1577–1582.

7. El-Abd E., Matta C.A., Sheta M., El-Kerm Y., Sakr S. Histopathological characteristics of breast cancer and evaluation of ER alpha and Her-2neu using immunohistochemical and RT-PCR techniques. Alexandria J Medicine. 2014; 50: 275–282.

8. Katanov C., Lerrer S., Liubomirski Y., Leider-Trejo L., Meshel T., Bar J., Feniger-Barish R., Kamer I., Soria-Artzi G., Kahani H., Banerjee D., Ben-Baruch A. Regulation of the inflammatory profile of stromal cells in human breast cancer: prominent roles for TNF- α and the NF- κ B pathway. Stem Cell Res Ther. 2015 May 1; 6: 87. doi: 10.1186/s13287-015-0080-7.

9. Lacerda L., Debeb B.G., Smith D., Larson R., Solley T., Xu W., Krishnamurthy S., Gong Y., Levy L.B., Buchholz T., Ueno N.T., Klopp A., Woodward W.A. Mesenchymal stem cells mediate the clinical phenotype of inflammatory breast cancer in a preclinical model. Breast Cancer Res. 2015; 17: 42. doi: 10.1186/s13058-015-0549-4.

10. Usha L., Rao G., Christopherson Ii K., Xu X. Mesenchymal stem cells develop tumor tropism but do not accelerate breast cancer tumorigenesis in a somatic mouse breast cancer model. PLoS One. 2013 Sep 12; 8 (9): e67895. doi: 10.1371/journal.pone.0067895.

11. Zhao M., Sachs P.C., Wang X., Dumur C.I., Idowu M.O., Robila V., Francis M.P., Ware J., Beckman M., Rizki A., Holt S.E., Elmore L.W. Mesenchymal stem cells in mammary adipose tissue stimulate progression of breast cancer resembling the basal-type. Cancer Biol Ther. 2012 Jul; 13 (9): 782–92.

Поступила/Received 14.05.18
Принята в печать/Accepted 22.10.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Лыков Александр Петрович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия); старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Центр новых технологий, ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ (г. Новосибирск, Россия). E-mail: aplykov2@mail.ru. SPIN-код: 4883-0887. Author ID (Scopus): 7005078323. Researcher ID (WOS): I-1999-2018. ORCID: 0000-0003-4897-8676.

Кабаков Алексей Васильевич, младший научный сотрудник лаборатории физиологии протективной системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 8615-2370. Author ID (Scopus): 57190570129. Researcher ID (WOS): J-3271-2018. ORCID: 0000-0002-4741-6674.

Бондаренко Наталья Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия); старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Центр новых технологий, ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 5722-7157. Author ID (Scopus): 16424587900. Researcher ID (WOS): I-2000-2018. ORCID: 0000-0002-8443-656X.

Повещенко Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия); старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Центра новых технологий

ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 1451-4467. Author ID (Scopus): 6505824790. Researcher ID (WOS): J-3328-2018. ORCID: 0000-0001-9956-0056.

Райтер Татьяна Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории физиологии протективной системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 6424-1517. Author ID (Scopus): 57190571932. ORCID: 0000-0003-0883-9516.

Казаков Олег Васильевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии протективной системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 4565-7180. Author ID (Scopus): 57192956902. Researcher ID (WOS): J-3282-2018. ORCID: 0000-0003-3947-4038

Стрункин Дмитрий Николаевич, врач-онколог, НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 1983-9314. Author ID (Scopus): 12800338500. ORCID: 0000-0003-4357-7443.

Суровцева Мария Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия); старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Центр новых технологий, ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 5597-4170. Author ID (Scopus): 35075192200. Researcher ID (WOS): J-3408-2018. ORCID: 0000-0002-4752-988X.

Повещенко Александр Федорович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией физиологии протективной системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН; ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Центр новых технологий, ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» (г. Новосибирск, Россия); преподаватель, Новосибирский государственный медицинский университет (г. Новосибирск, Россия); преподаватель, Новосибирский государственный педагогический университет (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 6495-7412. Author ID (Scopus): 6603573909. Researcher ID (WOS): J-3424-2018. ORCID: 0000-0002-4433-7110.

Коненков Владимир Иосифович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 7822-9674. Author ID (Scopus): 7005910476. Researcher ID (WOS): J-6329-2018. ORCID: 0000-0001-7385-6270.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Alexander P. Lykov, MD, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia); Staff Researcher, Cellular Technologies Laboratory, Institute of Circulation Pathology (Novosibirsk, Russia). E-mail: aplykov2@mail.ru. Author ID (Scopus): 7005078323. Researcher ID (WOS): I-1999-2018. ORCID: 0000-0003-4897-8676.

Alexei V. Kabakov, MD, Researcher, Laboratory of Protective System Physiology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 57190570129. Researcher ID (WOS): J-3271-2018. ORCID: 0000-0002-4741-6674.

Nataliya A. Bondarenko, PhD, Researcher, Laboratory of Cellular Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia); Staff Researcher, Cellular Technologies Laboratory, Institute of Circulation Pathology (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 16424587900. Researcher ID (WOS): I-2000-2018. ORCID: 0000-0002-8443-656X.

Olga V. Poveshchenko, MD, DSc, Head of Laboratory of Cellular Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia); Head of Laboratory, Cellular Technologies Laboratory, Institute of Circulation Pathology (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 6505824790. Researcher ID (WOS): J-3328-2018. ORCID: 0000-0001-9956-0056.

Tatjana V. Raiter, Researcher, Laboratory of Protective System Physiology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 57190571932. ORCID: 0000-0003-0883-9516.

Oleg V. Kazakov, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Protective System Physiology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 57192956902. Researcher ID (WOS): J-3282-2018. ORCID: 0000-0003-3947-4038.

Dimitri N. Strunkin, MD, Oncologist, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 12800338500. ORCID: 0000-0003-4357-7443.

Maria A. Surovtseva, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia); Staff Researcher, Cellular Technologies Laboratory, Institute of Circulation Pathology (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 35075192200. Researcher ID (WOS): J-3408-2018. ORCID: 0000-0002-4752-988X.

Alexander F. Poveshchenko, MD, DSc, Head of Laboratory of Protective System Physiology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia); Senior Researcher, Cellular Technologies

Laboratory, Institute of Circulation Pathology (Novosibirsk, Russia); Teacher, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk, Russia); Teacher, Novosibirsk State Pedagogic University (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 6603573909. Researcher ID (WOS): J-3424-2018.

Vladimir I. Konenkov, MD, DSc, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 7005910476. Researcher ID (WOS): J-6329-2018. ORCID: 0000-0001-7385-6270.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.