

Модельная система изучения рака *in situ* на основе децеллюляризованных матриц органов при онкологических заболеваниях

Н.В. Данилова^{1,2}, И.А. Корниенко^{1,3}, Е.В. Петерсен^{1,3}

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук

³Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова, Институт Регенеративной Медицины

В настоящее время по данным ВОЗ онкологические заболевания являются одной из основных причин заболеваемости и смертности во всем мире — в 2012 году произошло около 14 миллионов новых случаев заболевания и 8,2 миллиона случаев смерти, связанных с раком [1]. Ожидается, что за ближайшие 20 лет число новых случаев заболевания возрастет примерно на 70% [2]. Данное обстоятельство делает борьбу с онкологическими заболеваниями приоритетной задачей в рамках организации медицинской помощи в мегаполисе. При разработке противоопухолевых препаратов, не смотря на большой объем накопленных экспериментальных данных, до сих пор остается не решенным вопрос эффективной доставки терапевтических агентов непосредственно в область опухоли, преимущественно в ее центральную зону. Основная проблема доставки лекарственных агентов в область опухоли связана с тем, что система капиллярного русла, окружающего опухоль, несовершенна, и имеет прерывистый характер от периферии к центру. Существующие в настоящий момент тестовые системы – 2D клеточные культуры, либо животные модели не отражают в полной мере физиологические особенности человеческого организма, что приводит к значительной потере достоверности получаемых результатов доклинических стадий.

Децеллюляризация — процесс получения внеклеточного матрикса ткани (органа) путем детергентного или иного удаления клеток. На данный момент регенеративная медицина, основанная на методе децеллюляризации тканей, является быстро развивающейся и перспективной отраслью. Использование естественного внеклеточного матрикса в качестве каркаса для будущей ткани (органа) обосновано наличием в матриксе биологически активных ниш, управляющих процессами регенерации и гомеостаза. При децеллюляризации крайне желательно сохранить сложную трехмерную структуру и состава матрикса, однако существующие методы децеллюляризации неизбежно приводят к потере некоторых структурных элементов.

Мы разрабатываем систему, которая могла бы сочетать в себе децеллюляризованный внеклеточный матрикс паренхиматозных органов и помещенные в него клетки опухоли конкретного пациента, так мы сможем моделировать условия естественного роста опухоли в матриксе и изучать условия, при которых проникновение веществ в опухоль было бы максимальным. Необходимо создать методику для каждого конкретного типа органов, в которой будет учитываться размер органа, чувствительность его тканей к различным типам детергентов и многие другие параметры. Таким образом, у нас появится возможность на новой модельной системе разработать подходы улучшенной доставки лекарств и в дальнейшем может стать основой для персонализированной терапии и поиска индивидуальных препаратов для данного конкретного пациента.

В рамках разработки комплексной модельной системы злокачественных опухолей на основе децеллюляризованных матриц паренхиматозных и стромальных органов были выполнены работы по разработке оптимального протокола децеллюляризации паренхиматозных органов (печени и почки), а также участков кишечника и молочной железы, подобраны наиболее подходящие детергенты и условия проведения децеллюляризации, наиболее оптимальным протоколом выбран протокол с использованием растворов: промывка органа от крови раствором PBS при комнатной температуре, далее использование детергентов (SDS и Triton X-100) при скорости потока постоянно повышающейся с 10 мл/мин до состояния напряжения ткани до 24 часов, отмывка ткани от детергентов раствором PBS при комнатной температуре.

Нами были подобраны и протестированы наиболее подходящие условия создания 3D клеточных агрегатов различных размеров и плотности с использованием мезенхимальных клеток, произведена оценка их жизнеспособности. Клеточные сфероиды были получены с использованием нескольких методов - метода висячей капли, культивирования в 3D планшетах, культивирования на неадгезивных чашках Петри. Для получения клеточных сфероидов методом «висячей капли» прикрепленные культуры клеток отмывались от среды раствором Версена, обрабатывались 0,25% раствором трипсина. Инактивировалось действие трипсина посредством добавления полной ростовой среды. Количество клеток в суспензии подсчитывалось в камере Горяева или с использованием автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen). Полученная суспензия затем центрифугировалась (7 мин, 1000 об/мин, $g=100\text{см}^2/\text{с}$), осадок ресуспендировался в полной ростовой среде до необходимой конечной концентрации клеток. Для получения «висячих капель» из полученной суспензии на крышку 90-мм чашки Петри (Corning) наносились капли объемом 25мкл, для предотвращения испарения в чашку будет добавлено 5-6 мл смеси DMEM/F12 с гентамицином. Культивация клеток в «висячих каплях» проходила в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂, влажные условия) в течение разных сроков. Для культивирования клеток в специализированных планшетах и чашках Петри будут использоваться рекомендованные производителями протоколы. Для оценки динамики формирования сфероидов проведена прижизненная фоторегистрация сфероидов непосредственно в «висячих каплях» с использованием микроскопа Carl Zeiss Axio Observer A1.

После получения различного диаметра сфероидов, была произведена оценка по соотношению диаметра получаемых сфероидов, количеству жизнеспособных клеток, экспрессии ими специфических маркеров. С помощью метода иммуноцитохимии был проведен анализ экспрессии виментина, нестина, цитокератина 18, ламинина, фибронектина, коллагена IV, Е-кадгерина и β-актина. Преобладание экспрессии нестина, коллагена IV, ламинина, β-актина и цитокератина 18 в эпителизованной поверхностной зоне и экспрессия во всех клетках сфероидов виментина дополнительно свидетельствуют о разделении фибробластов в сфероидах на поверхностную и внутреннюю зоны.

Работа выполнена при поддержке программой фундаментальных исследований Президиума РАН.

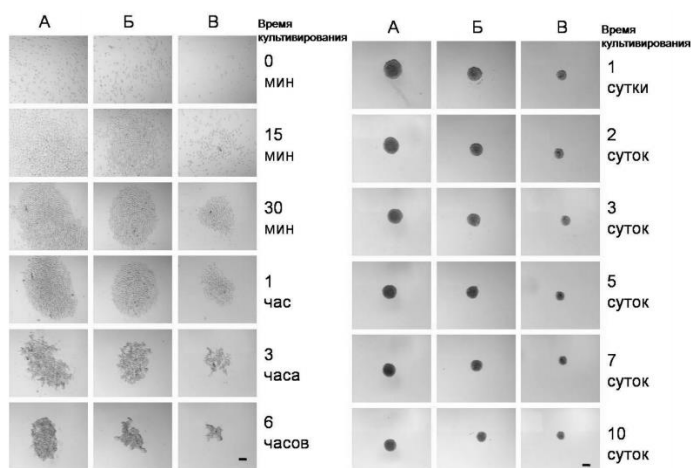


Рис. 1. Динамика формирования сфероидов из дермальных фибробластов четвертого пассажа при различных начальных плотностях клеток в «висячих каплях»: А – 80 тыс.кл/мл; Б – 40 тыс.кл/мл; В – 20 тыс.кл/мл. Измерительный отрезок 100 мкм

Литература

1. Stewart, B. W., Wild, C. P. World Cancer Report 2014 IARC Nonserial Publication 2014 630 pages
2. Социально значимые заболевания населения России в 2012 году (Статистические материалы). – ЦНИИОЗ. – Москва, 2013. – 67 с.