

ХАРАКТЕРИСТИКА ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ЧЕЛОВЕКА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИНДУЦИРОВАННЫМИ ЦИТОХАЛАЗИНОМ В МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛАМИ

Алексей Пономарев

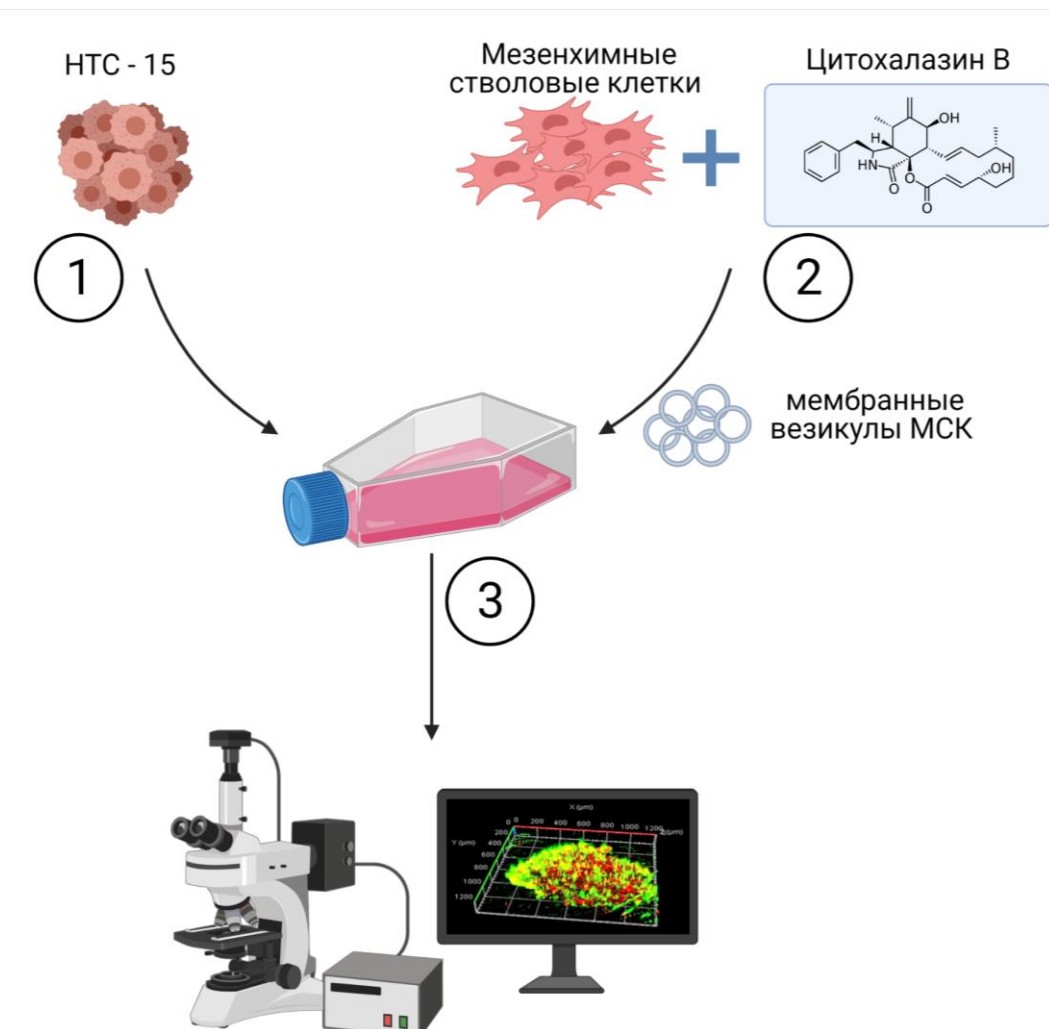
Казанский Федеральный Университет, Институт Фундаментальной Медицины и Биологии, Казань, Российская Федерация

1. Введение

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) привлекают все больший интерес, как метод доставки противоопухолевых препаратов благодаря их таргетности и низкой иммуногенности. Но существуют риск их использования, из-за свойств МСК онкотрансформироваться. Следовательно, одним из перспективных направлений в онкотерапии является использование внеклеточных везикул мезенхимных стволовых клеток.

Целью данной работы является исследование влияния мембранных везикул МСК на опухолевые сфероиды in vitro.

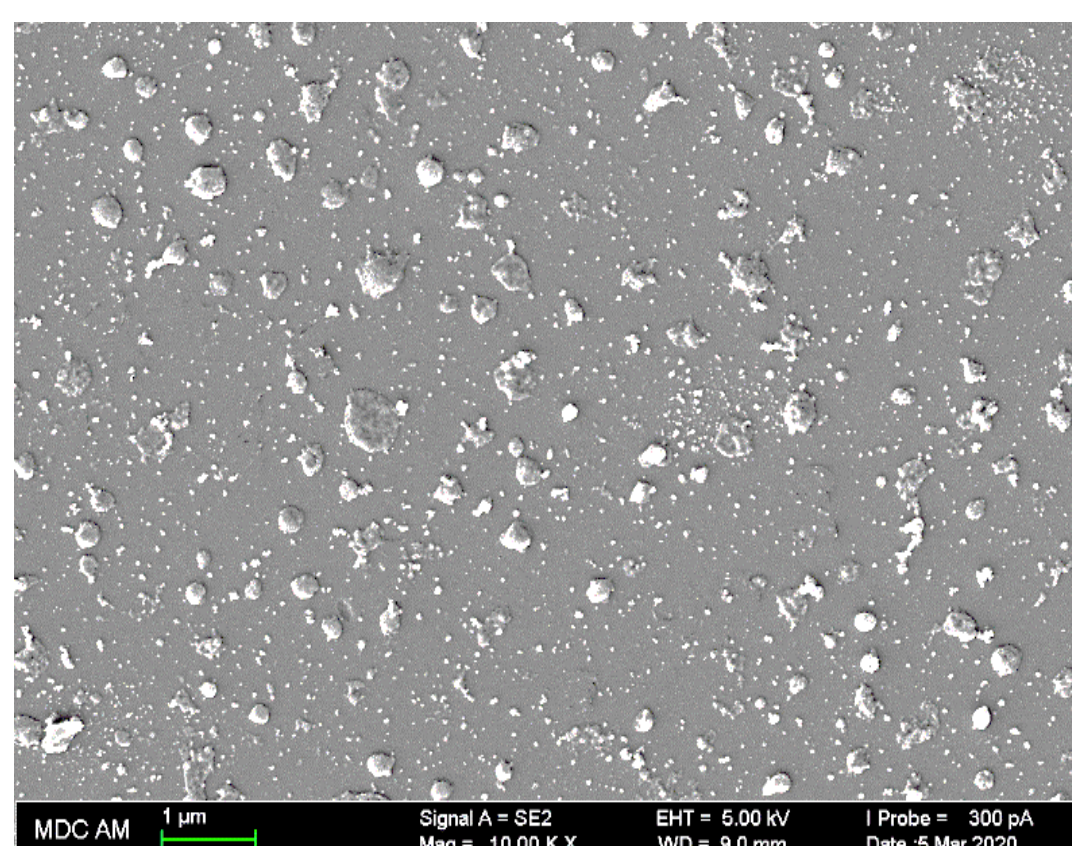
2. Схема эксперимента эксперимента



1. В этом исследовании клетки колоректальной карциномы (HCT-15) были использованы для создания опухолевых сфероидов. 2. Второй пассаж МСК, полученных из жировой ткани, и 10 мкг / мл цитохалазина В использовали для выделения мембранных везикул (МСК иМВ). Добавление иМВ к сфероидам проводили в концентрации 1 мкг (B1) и 2 мкг (B2). 3. Эффект иМВ МСК был проанализирован с помощью конфокальной микроскопии, проточной цитометрии и ПЦР в реальном времени. Влияние иМВ МСК на жизнеспособность клеток анализировали с помощью анализа аннексина V.

3. Результаты

3.1 Сканирующая электронная микроскопия везикул.



Выделение везикул проводили методом центрифугирования с последовательным увеличением скорости и фильтрацией супернатанта, что облегчало удаление клеточного дебриса. Метод выделения иМВ МСК позволил получить фракцию, состоящую из круглых клеточных компонентов и свободную от клеток, их фрагментов и ядер (рис. 1). Сканирующая электронная микроскопия показала, что везикулы имели округлую форму и различные размеры.

3.2 Фазово-контрастная микроскопия опухолевых сфероидов.

Были получены плотные сфероиды из клеток HCT-15 с преимущественно округлой формой с помощью метода «висящей капли», который способствует агрегации клеток (рис.2). Сфероиды были разделены на группы, которые включали контрольную (без добавления везикул), первую опытную с добавлением 1 мкг везикул. И вторую опытную с добавлением 2 мкг везикул.

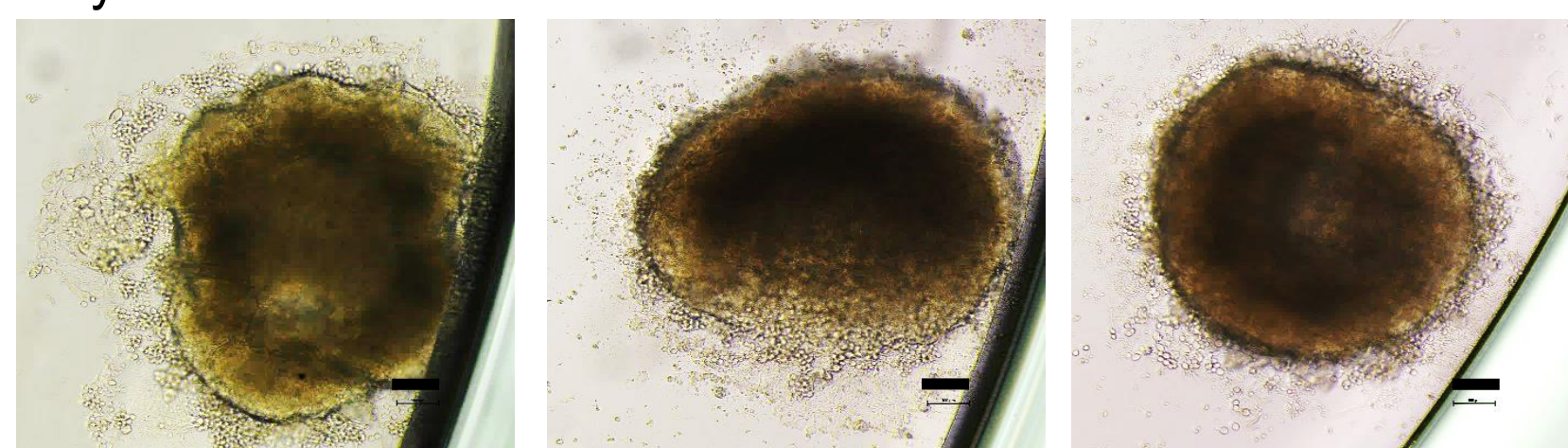


Рис 2. Фазово-контрастная микроскопия сфероидов. Масштаб 100мкм

3.3 Конфокальная микроскопия опухолевых сфероидов.

Слияние клеток и везикул исследовали с помощью мембранных красителей DiD (зеленый) и DiO (красный). Везикулы в определенной концентрации, окрашенные DiD, добавляли к культуральной среде сфероидов опухоли, окрашенной DiO (рис. 3). Через 24 часа культивирования с помощью конфокальной микроскопии было обнаружено, что индуцированные мембранные везикулы МСК были слиты со сфероидными клетками.

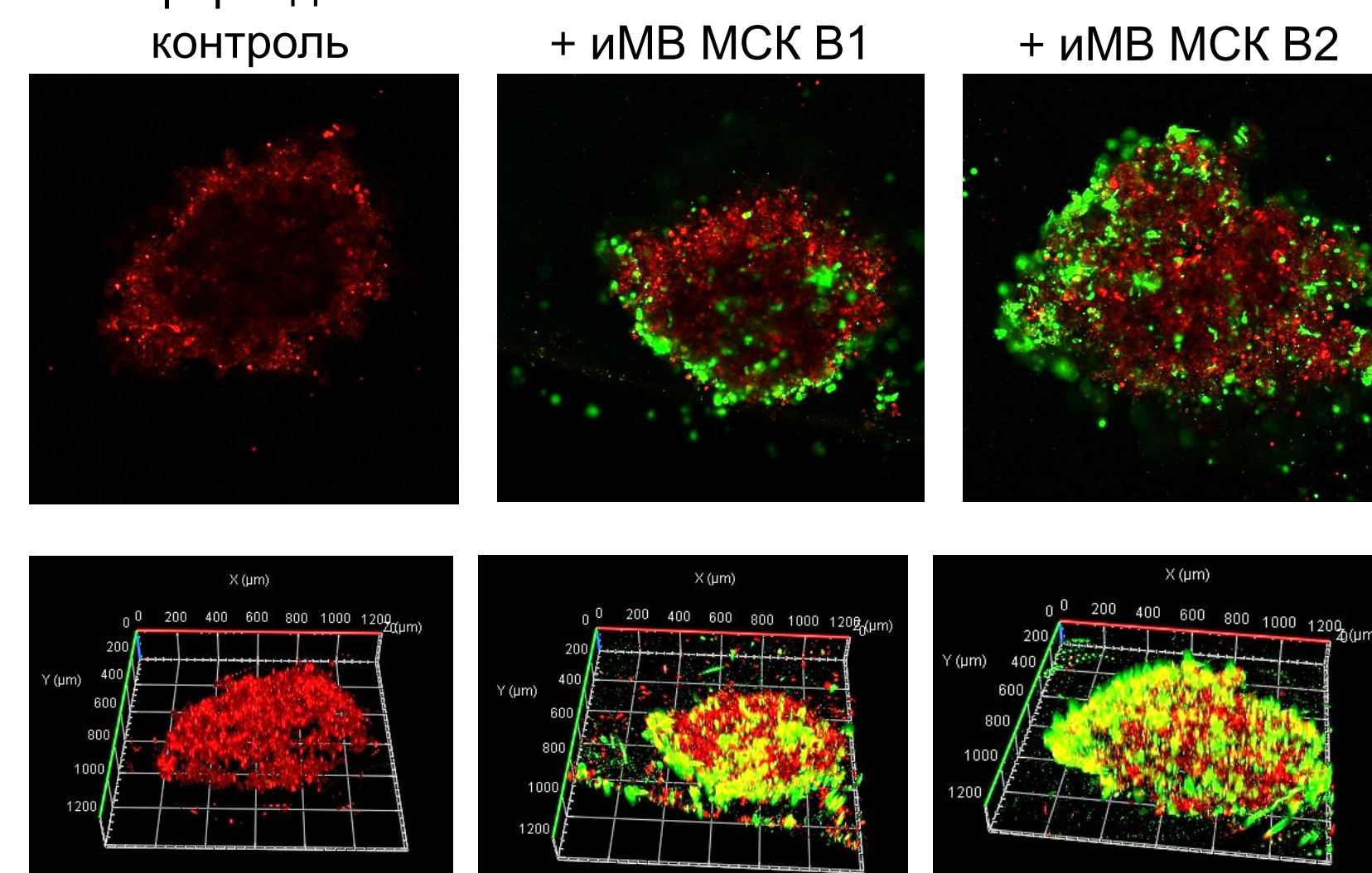


Рис. 3. Конфокальная микроскопия сфероидов с добавлением иМВ МСК и без добавления. Масштаб: 100 мкм

3.4 Анализ аннексина V.

Проточная цитофлуориметрия показала, что добавление иМВ МСК снизило жизнеспособность клеток уже на третий день культивирования сфероидов (рис. 4).

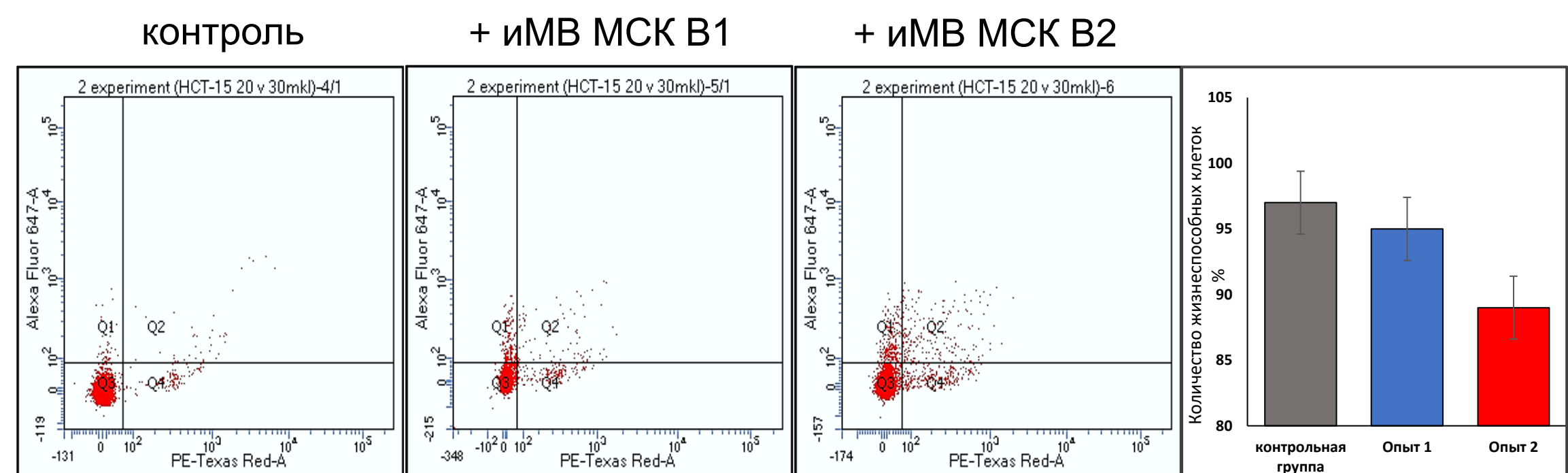


Рис. 4. Результаты окрашивания опухолевых сфероидов красителем Аннексин V.

3.5 Трансмиссионная электронная микроскопия

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии было показано, что добавление везикул не влияет на ультраструктурные особенности сфероидов. В группе с двукратным добавлением везикул были обнаружены включения, (предположительно мультивезикулярные тельца) выделенные красным (рис. 5). Межклеточные контакты щелевого типа. Цитоплазма клеток богата митохондриями, в опытных образцах более выявлена шероховатая ЭПС. В контрольных образцах количество мембранных везикул ниже, чем в опытных.

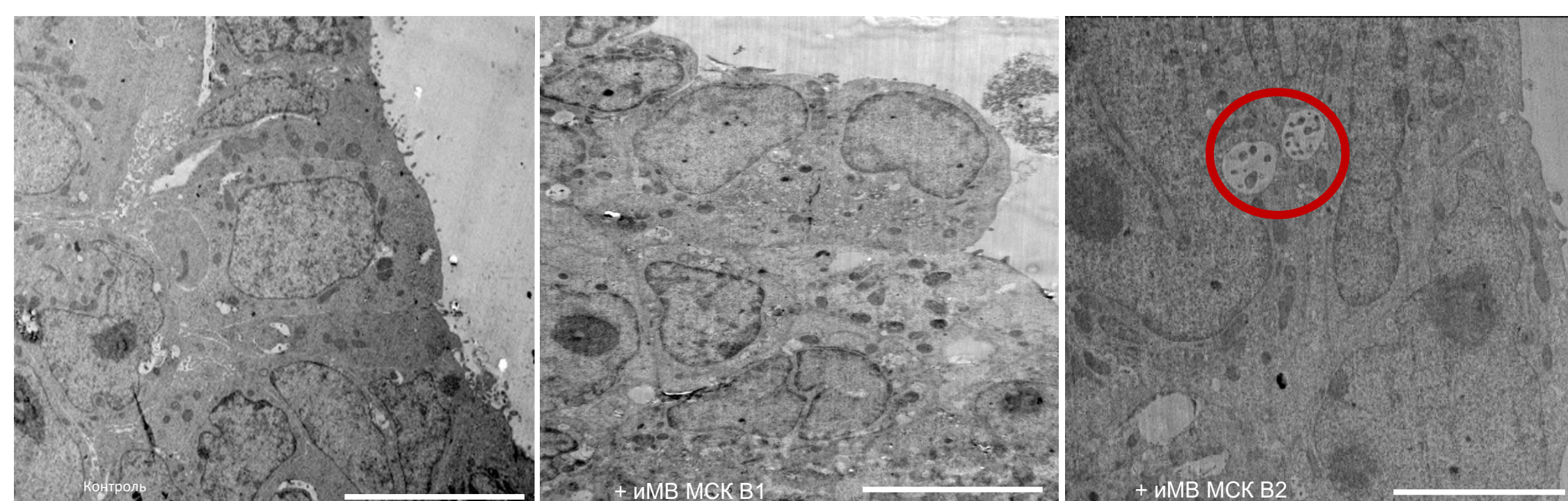


Рис. 5. Трансмиссионная электронная микроскопия опухолевых сфероидов с добавлением и без добавления везикул разной концентрации. Масштаб 5 мкм.

4. Заключение

Таким образом, по результатам данного исследования, мы предполагаем влияние везикул МСК на опухолевые сфероиды. Для обнаружения детальных механизмов данного влияния необходимы дальнейшие исследования.

Автор для корреспонденции: I.ponomarev2013@gmail.com

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10044)