

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ЦИТОХАЛАЗИНОМ В МЕМБРАННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ TRAIL АКТИВИРУЮТ КЛЮЧЕВЫЕ КОМПОНЕНТЫ ВНЕШНЕГО СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА АПОПТОЗА CAS3 И CAS8 В МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У МЫШЕЙ IN VIVO

Пухальская Т. В, Чулпанова Д. С, Гилазиева З. Е.
(Казанский (Приволжский) федеральный университет)

Научный руководитель – доцент кафедры генетики Соловьева В. В.
(Казанский (Приволжский) федеральный университет)

Аннотация

Индукцированные мембранные везикулы, полученные из мезенхимных стволовых клеток Вартонова студия со сверхэкспрессией TRAIL (WJ-MSCs-TRAIL) индуцируют увеличение экспрессии ключевых генов, участвующих в каскаде естественной клеточной гибели в модели рака молочной железы у мыши *in vivo*.

Лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с фактором некроза опухоли (англ. tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) является одним из наиболее перспективных среди терапевтических цитокинов, которые избирательно индуцирует апоптоз в опухолевых клетках. TRAIL, как цитокин, экспрессируется иммунными клетками и играет важную роль в гомеостазе Т-клеток и натуральных киллеров (англ. natural killer, NK), а также в опосредованном Т-клетками противоопухолевом ответе. Мезенхимные стволовые клетки (англ. mesenchymal stem cells, MSCs) способны мигрировать в области воспаления, в том числе в опухолевые ниши. Мембранные везикулы (англ. membrane vesicles, MVs) несут важную роль в межклеточной коммуникации, благодаря своей способности передавать биоактивные молекулы родительских клеток, в том числе растворимые факторы и поверхностные рецепторы. В то же время использование цитохалазина В для индукции биогенеза мембранных везикул (англ. cytochalasin B-induced membrane vesicles, CIMVs) позволяет значительно увеличить выход везикул по сравнению с другими методами получения MVs.

Целью данного исследования было получение индуцированных везикул из MSCs с сверхэкспрессией TRAIL и анализ их противоопухолевых свойств в модели рака молочной железы у мыши *in vivo*. Для этого оценивали уровень мРНК и белка основных участников каскада индукции апоптоза TRAIL. Индуцированные мембранные везикулы получали путем обработки цитохалазин В (Sigma-Aldrich, США) полученной ранее культуры генетически модифицированных WJ-MSCs-TRAIL со сверхэкспрессией TRAIL (CIMVs-TRAIL), а также нативных WJ-MSCs. Индуцированные мембранные везикулы были охарактеризованы по маркерам, типичным для MSCs, размеру, а также наличию экспрессии белка интереса TRAIL на поверхности везикул.

Для исследования противоопухолевого эффекта CIMVs-TRAIL *in vivo* была создана модель рака молочной железы у мыши. Иммунодефицитных мышей линии BALB/c nude содержали в прозрачных пластиковых клетках при температуре 21-25 °С, при относительной влажности от 40 % до 70 % с неограниченным доступом к пище и воде. Все эксперименты проводились в соответствии с протоколами, утвержденными локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (протокол № 3, дата 23.03.2017).

Для создания опухолей мышам подкожно вводили клетки рака молочной железы человека MCF7. При достижении опухоли размера 100 мм³ животным вводили 50 µg нативных CIMVs или 50 µg CIMVs-TRAIL в 20 µl PBS, либо 20 µl PBS в качестве контроля. Инъекции CIMVs

осуществлялись местно в область опухоли в течение 12 дней с интервалом в два дня (в общей сложности 5 инъекций). Через два дня после последней инъекции эвтаназию мышей осуществляли с помощью CO₂. Из полученных гомогенатов опухолевой ткани были выделены общая РНК и белок для последующего анализа экспрессии апоптотических генов *CAS8*, *BCL-2* и *BAX* с помощью ПЦР в реальном времени (qPCR), и уровня белка *CAS3* методом вестерн блоттинга.

По результатам qPCR было показано увеличение уровня мРНК гена *CAS8* в 1,8 раз в группе мышей, получавших инъекции *SIMVs-TRAIL*, по сравнению с контрольной группой, получавших инъекции *PBS*. Экспрессия антиапоптотического гена *BCL-2* в этой же группе животных не изменилась, в то время как уровень мРНК проапоптотического гена *BAX* был увеличен в 1,4 раза, что указывает на активацию апоптотического каскада и индукцию гибели опухолевых клеток. Вестерн блот анализ также выявил увеличение экспрессии ключевого белка, участвующего в процессе апоптоза *CAS3*. Белок *CAS3* был детектирован в своей активированной изоформе, и его относительный уровень у животных, получавших инъекции *SIMVs-TRAIL*, был увеличен в 1,7 по сравнению с контрольными животными.

Также, чтобы подтвердить противоопухолевую эффективность, вызванную терапией *SIMVs-TRAIL*, был проведен анализ морфологии сформировавшихся опухолей с помощью окрашивания гематоксилин-эозином. Мы обнаружили, что опухоли из группы, получавших инъекции *SIMVs-TRAIL*, имели увеличенные площади с эозинофильным цитозолем (розовый) в сочетании с отсутствием ядер, окрашенных гематоксилином (синий), по сравнению с группой, не получавшей лечения, что указывает на индукцию некроза под действием *SIMVs-TRAIL*.

Таким образом, данные, представленные в нашем исследовании, показывают, что *SIMVs-TRAIL* способны активировать внешний сигнальный путь апоптоза и индуцировать апоптоз опухолевых клеток в мышинной модели рака молочной железы и вызывать незначительный некроз опухолевой ткани *in vivo*. Таким образом, использование *SIMVs-TRAIL* может рассматриваться как перспективная стратегия для бесклеточной терапии рака молочной железы. Работа выполнена за счет средств программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и при поддержке гранта Российского научного фонда № 18-74-10044.

Пухальская Т.В. (автор)	Подпись
Чулпанова Д.С. (автор)	Подпись
Гилязиева З.Е. (автор)	Подпись
Соловьева В.В. (научный руководитель)	Подпись