

УДК 616–006.484–089.843:612.112.9

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO**И.С. Брюховецкий^{1,2,3}, П.В. Мищенко^{1,2}, Е.В. Толоч^{1,2}, Р.Ю. Хотимченко^{1,2}, А.С. Брюховецкий^{1,3}*¹ Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8),² Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17),³ Клиника восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита» (115478, г. Москва, Каширское шоссе, 23)**Ключевые слова:** глиома линии C6, стволовые клетки, фибробласты, сочетанные культуры.**COOPERATION OF HEMOPOIETIC STEM CELLS AND TUMOR CELLS *IN VITRO***I.S. Bryhovetskiy^{1,2,3}, P.V. Mischenko^{1,2}, E.V. Tolok^{1,2}, R.Y. Hotimchenko^{1,2}, A.S. Bryhovetskiy^{1,3}¹ School of Biomedicine of Far East Federal University

(8 Suhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation),

² Institute of Biology of sea of Zhirmundskogo A.V. FEB RAS (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russian Federation),³ Clinic of Rehabilitation and Interventional Neurology and Therapy "Neurovita" (23 Kashirskiy shosse Moscow 115478 Russian Federation)**Background.** Proteomic differences hemopoietic stem cells from neural stem cell and tumor stem cells of glioblastoma imply that hemopoietic stem cells mainly hold over its regulatory property and could be used for treatment of glioma. Purpose of this research was the analyses of cell cooperation and influence of human hemopoietic stem cells on activity and proliferation of tumor cells of glioma *in vitro*.**Methods.** Was used mutual cultivation of glioma cells, fibroblast and hemopoietic stem cells stained with different fluorochroms. Cells was visualized with help of laser scan confocal microscopy. Calculation of number of fluoresce objects been carried out in automatically.**Results.** Was shown statistically proved slowdown of proliferation of neuroglioma cells cultivated with hemopoietic stem cells. In process of cultivation tumor cells amass fluorescers that was in cytoplasm of hemopoietic stem cells, furthermore the number of hemopoietic stem cells in culture decreased up to total vanishing to the end of experiment**Conclusions.** Hemopoietic stem cells cooperate actively and with glioma cells and exchanged with regulatory proteins, that slowdown neoplastic proliferation and move in time phase of logarithmic growth of tumors.**Keywords:** glioma C6 line, stem cells, fibroblasts, combination of culture.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 4, p. 31–37.

Лечение глиальных опухолей головного мозга представляет одну из самых сложных задач современной медицины вообще и нейроонкологии, в частности. Сегодня, несмотря на все достижения медицинской науки, в России и за рубежом медиана выживаемости больных с наиболее распространенными первичными опухолями головного мозга – анапластической астроцитомой и мультиформной глиобластомой – составляет 12–14 месяцев даже при условии выполнения всех конвенционных терапевтических протоколов [14]. Крайне низкую эффективность лечения глиом принято объяснять запоздалой верификацией, большим числом

диагностических ошибок, высокой степенью инфильтрации паренхимы мозга опухолевыми клетками, специфическими особенностями, связанными с локализацией новообразования в замкнутой полости черепа и в непосредственной близости от жизненно важных центров мозга, что исключает саму возможность хирургического вмешательства. Признавая сложность проблемы лечения опухолей мозга, группа экспертов ВОЗ в резолюции Гарлемского консенсуса «Всемирного общества невропатологии» 2014 г. основную причину неудовлетворительных результатов лечения глиальных опухолей видит в недостатке наших знаний о молекулярных и клеточных механизмах канцерогенеза в мозге [11].

В последние годы высокую резистентность глиальных опухолей к облучению и химиотерапии связывают с особыми свойствами опухолевых стволовых клеток (ОСК), в числе которых способностью восстанавливать поврежденную ДНК, гипоксический тип метаболизма, возможность беспрепятственно мигрировать в пределах мозга и порождать бесчисленное количество клеточных клонов [2]. Ряд фактов свидетельствует о происхождении ОСК глиальных опухолей из нейральных стволовых клеток (НСК), продуцируемых в онтогенезе в герминативных зонах головного мозга [2, 7]. Головной мозг человека имеет два герминативных центра – это субвентрикулярная зона и зубчатая извилина. Герминативная зона зрелого мозга содержит также нейральные прогениторные клетки, или клетки-предшественники (прекурсоры), являющиеся прямыми потомками НСК и обладающие очень высокой пролиферативной активностью [8]. Непрерывно мигрируя по ростральному тракту в обонятельную луковицу, эти клетки взаимодействуют с нейронами и глиоцитами и инициируют запуск программ репарации, адаптации, пролиферации и апоптоза [4]. Ряд авторов полагает, что эти процессы являются звеньями целостного механизма поддержания локального гомеостаза, который резко нарушается при возникновении опухоли [2, 4, 12].

Двигаясь по градиенту концентрации высвобождаемых новообразованием цитокинов, НСК и их потомки достигают опухоли и активно взаимодействуют с ее клетками. Многочисленные теории происхождения ОСК утверждают, что переход, или трансдифференциация, из здоровых стволовых клеток в ОСК происходит благодаря клеточной фузии между здоровыми стволовыми

и неопластическими клетками в процессе их взаимодействия [4]. Возможно, узловым моментом трансформации НСК в ОСК является обмен цитоплазматическими белками – продуктами экспрессии онкогенов, или микроРНК (miR), способными инактивировать гены-онкосупрессоры [13, 15]. Результатом взаимодействия НСК и ОСК может быть торможение неопластической пролиферации, либо вовлечение НСК в онкологический процесс как модулятора пролиферации, инвазии, ангиогенеза и источника клеточных клонов, резистентных к облучению и химиотерапии [2, 6, 9].

Теоретически трансплантация стволовых клеток с модифицированными регуляторными и противоопухолевыми свойствами может сдвинуть вектор неопластического процесса в сторону апоптоза, дестабилизировать иерархию опухолевых клеток или запустить другие регуляторные механизмы, что позволит преодолеть проблему терапевтической резистентности [5]. Однако применение таких клеточных систем, созданных с использованием вирусов и генно-инженерных технологий, на сегодняшний день несет большой риск для здоровья больного.

Альтернативой новой стратегии лечения глиальных опухолей может стать применение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Данные сравнительного картирования НСК, ГСК и ОСК глиобластомы человека свидетельствуют о значительных протеомных отличиях, свойственных ГСК [3]. Эти клетки находятся в непрерывном взаимодействии с органами тканей неспецифическими стволовыми клетками, очевидно, дополняя их регуляторные функции, и менее подвержены мутационным процессам [14]. Это позволяет предположить, что ГСК в значительной мере сохранили свой регуляторный потенциал и могут запустить нарушенные опухолью физиологические механизмы противоопухолевого саногенеза организма.

Цель настоящей работы состояла в анализе межклеточного взаимодействия и механизмов взаимовлияния ГСК человека на жизнедеятельность, выживаемость и пролиферативную активность клеток глиомы *in vitro*.

Материал и методы. Культура клеток глиомы линии С6 была предоставлена лабораторией фундаментальной и прикладной нейробиологии Государственного научного центра социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского Минздрава России. По спектру экспрессируемых белков и палитре генетических нарушений глиома С6 наиболее близка к глиобластоме человека и характеризуется самым большим количеством ОСК среди других экспериментальных моделей [12]. Замороженные клетки размораживали при 37°C в течение 10 мин, отмывали от DMSO средой DMEM (производства компании Gibco), содержащей 10 % телячьей сыворотки, эпидермальный и фибробластический факторы роста и антибиотик-антимикотик 100X. Клетки осаждали центрифугированием, добавляли свежую среду, ресуспендировали и высаживали в культуральные флаконы. Клетки культивировали до образования монослоя, затем снимали с помощью ферментативной диссоциации (0,05 % trypsin-EDTA, 1:4, при 37°C, 10 мин), центрифугировали

(120g, 3 мин), добавляли свежую среду и ресуспендировали. С целью визуализации клетки обрабатывали флуоресцентным маркером Vybrant CFDA SE Cell Tracer в соответствии с рекомендациями производителя – компании Molecular Probes (V12883).

Культура ГСК человека была предоставлена клиникой восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита» (Москва). Согласно сопроводительной документации с целью увеличения количества стволовых клеток в периферической крови донор получал 8 инъекций гранулоцитарного колониестимулирующего фактора с интервалом 12 часов в течение 4 дней. В первые три дня доза гранулоцитарного колониестимулирующего фактора составляла 2,5 мкг/кг массы тела, а в последний день была удвоена. ГСК извлекали из периферической крови с помощью аппарата COBE Spectra Apheresis System. Сортировка клеток фенотипа CD34⁺ осуществлялась методом иммуномагнитной сепарации на разделительной колонке AutoMACS Pro с использованием набора реагентов (№ 130-100-453) производства компании Miltenyi Biotec. Использование материала в экспериментальных целях проводилось с согласия пациента. После размораживания ГСК культивировали в среде DMEM (производства компании Gibco). Перед внесением в смешанную культуру клетки были обработаны флуоресцирующим красителем CellTracker Red CMTPX по методике производителя – компании Molecular Probes (C34552).

В работе также использовали первичную культуру фибробластов человека производства Life Technology (№ C-004-5C). Клетки размораживали согласно стандартному протоколу и культивировали в полной среде DMEM/F12, HEPES, содержащей 10 % телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 0,8 % глюкозы, 0,2 ЕД/мл инсулина и антибиотик-антимикотик (производитель – компания Gibco). Перед внесением в культуру опухолевых клеток фибробласты были обработаны красителем CellTracker Red CMTPX в соответствии с рекомендациями производителя – компании Molecular Probes (C34552).

Эксперимент выполнен в три этапа. На первом 24-луночные планшеты (Greiner Bio-One) заполняли средой DMEM, содержащей 10 % телячьей сыворотки, фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста и антибиотик-антимикотик 100X производства Gibco (содержащий 10000 ед./мл пенициллина, 10000 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл фунгизона). ГСК и фибробласты вносили в культуру глиомы С6 в соотношении 3:1, 1:1 и 1:3. Клетки инкубировали при температуре 37°C в 5 % CO₂ в течение 120 часов.

На втором этапе ГСК и фибробласты окрашивали флуоресцентным маркером Vybrant CFDA SE Cell Tracer и вносили их в культуру с неокрашенными опухолевыми клетками в соотношении 3:1, 1:1 и 1:3 и культивировали в течение 120 часов.

На третьем этапе ГСК и фибробласты, окрашенные флуоресцентным маркером Vybrant CFDA SE Cell Tracer, вносили в культуру опухолевых клеток окрашенных CellTracker Red CMTPX в соотношении 3:1,

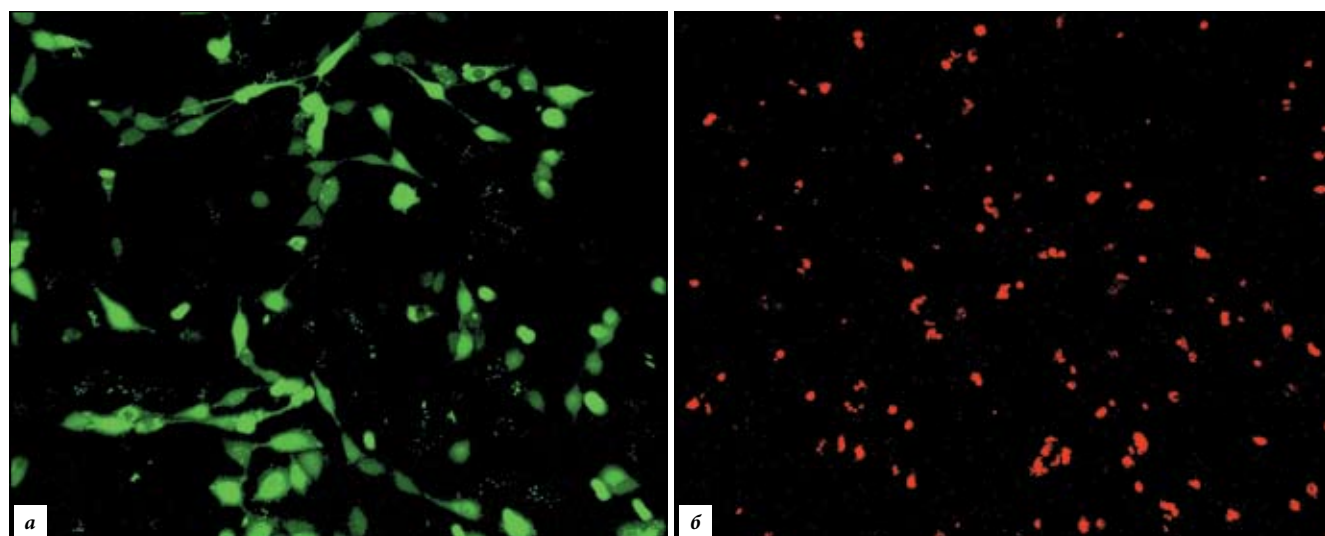


Рис. 1. ГСК при совместном культивировании с глиомой С6 (а) и клетки глиомы С6 (б) на первом этапе эксперимента: а – флуоресценция при воздействии лазера λ 546 нм; б – флуоресценция при воздействии лазера λ 488 нм (визуализируются опухолевые клетки округлой, веретеновидной и полигональной формы, формирующие монослой). Конфокальная сканирующая микроскопия, ув.: об. $10\times$; окр.: а – CellTracker Red CMTPX, б – Vybrant CFDA SE Cell Tracer.

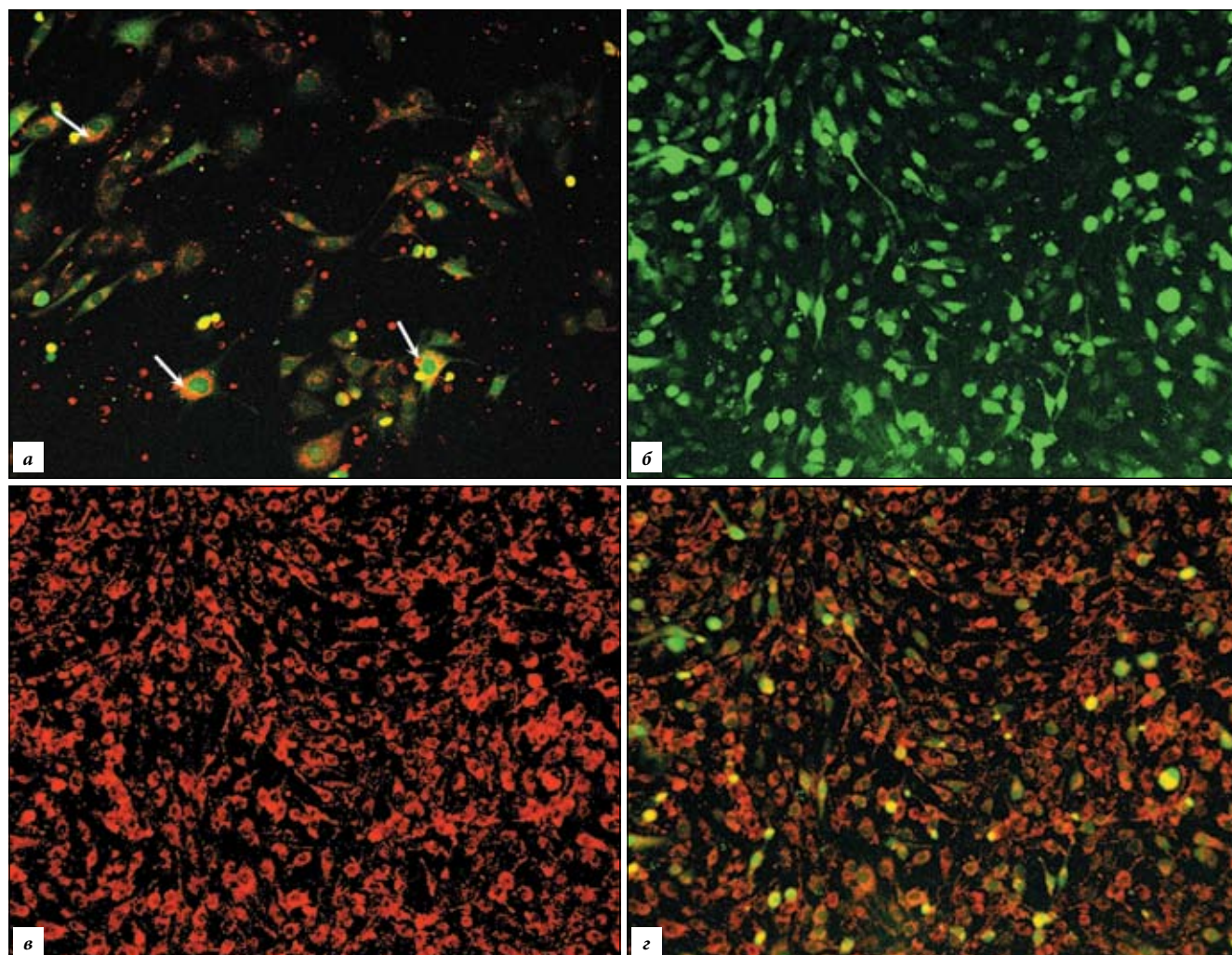


Рис. 2. Клетки глиомы С6 при совместном культивировании с ГСК на первом этапе эксперимента: а – опухолевые клетки окрашены CFDA (лазерная флуоресценция, λ 488 нм – зеленый цвет) и содержат включения флюорохрома CMTPX (лазерная флуоресценция, λ 546 нм – красный цвет, стрелки), изначально содержащегося в цитоплазме ГСК; б – клетки глиомы С6 через 120 часов (лазерная флуоресценция, λ 488 нм – зеленый цвет); в – клетки глиомы С6 через 120 часов отвечают флуоресценцией при воздействии лазера λ 546 нм, собственной красителю CMTPX, изначально содержащемуся в цитоплазме ГСК; г – наложение изображений клеток глиомы С6 при воздействии лазеров обоих типов (λ 546 нм – красный, λ 488 нм – зеленый). Конфокальная сканирующая микроскопия, ув.: об. $10\times$.

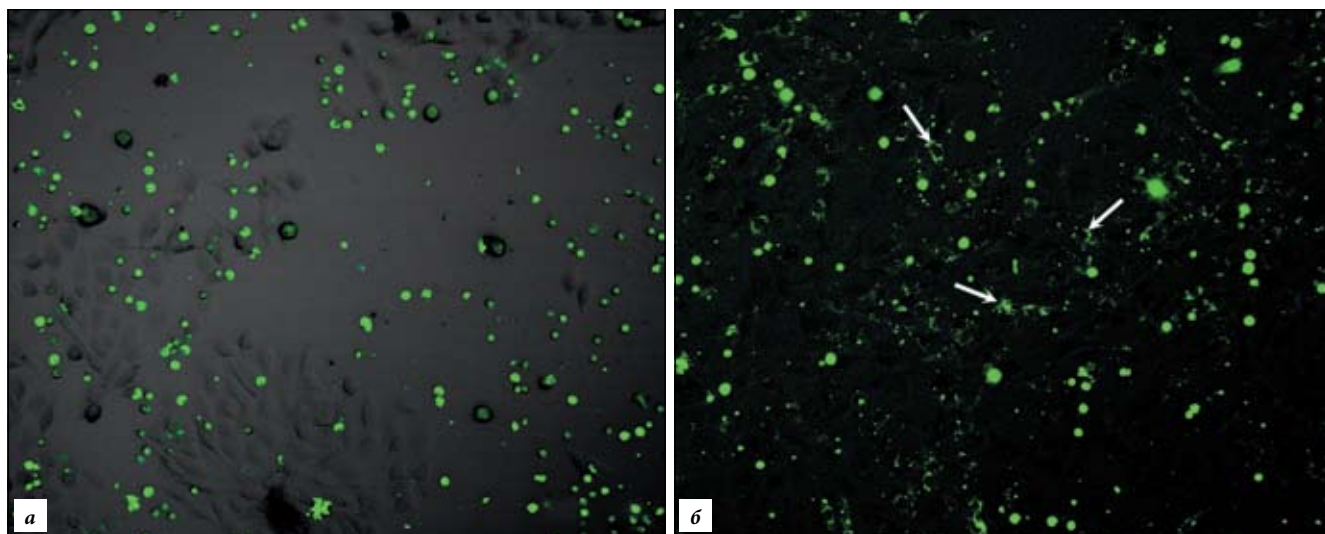


Рис. 3. Флуоресценция ГСК и клеток глиомы С6 на втором этапе эксперимента:

а – ГСК, окрашенные Vybrant CFDA SE Cell Tracer, под воздействием лазера λ 488 нм визуализируются в виде объектов круглой формы (клетки глиомы культивированы без предварительной окраски); *б* – накопление красителя CFDA, который содержался в цитоплазме ГСК (зеленый цвет) и в цитоплазме неокрашенных ранее клеток глиомы (стрелки). Конфокальная сканирующая микроскопия, ув.: об. $10\times$.

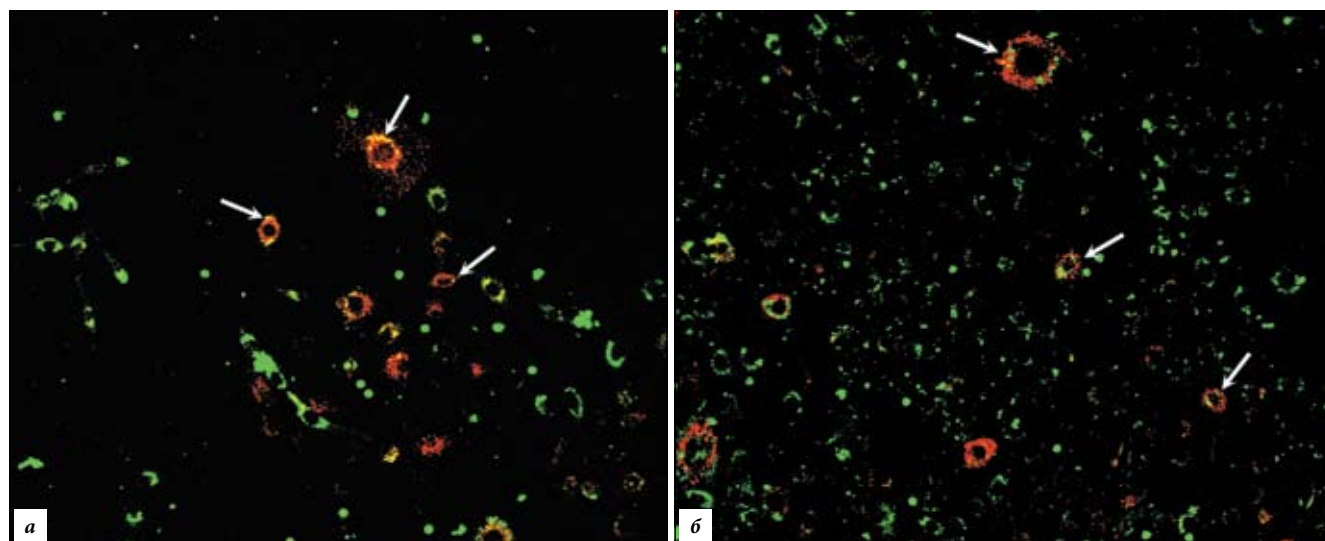


Рис. 4. Накопление зеленого флуоресцентного красителя клетками глиомы С6, культивируемыми совместно с ГСК на третьем этапе эксперимента:

а – клетки глиомы изначально окрашены CMTPX (красный), ГСК – CFDA (зеленый), стрелками указаны накопления CFDA в цитоплазме опухолевых клеток; *б* – все клетки глиомы С6 отвечают интенсивной флуоресценцией на воздействие лазера λ 488 нм, что вызвано накоплением красителя CMTPX (стрелки), изначально содержавшегося в ГСК. Конфокальная сканирующая микроскопия, ув.: об. $10\times$.

1:1 и 1:3. Количество опухолевых клеток определяли по числу флуоресцирующих объектов с помощью системы Cell-IQ (CM Technologies) в полностью автоматизированном режиме, полученные данные подвергали статистической обработке методом вариационной статистики с помощью программы MS Excel (2010).

В работе использованы система визуализации живых клеток LSM 5 Karl Zeiss Pascal, конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Carl Zeiss LSM 710, уникальная система мультифотонной лазерной микроскопии производства компании Olympus. Для работы с изображением применялись программы 3D for LSM Version 1.4.2 и ImageJ (США).

Результаты исследования. На первом этапе эксперимента, где ГСК и фибробласты были внесены в культуру опухолевых клеток, через 24 часа воздействия

лазера с длиной волны 546 нм, обе клеточные линии визуализировались в виде флуоресцирующих объектов округлой формы (рис. 1, а). В свою очередь, в полосе аргонного лазера с длиной волны 488 нм хорошо выделялись клетки глиомы в виде округлых, веретеновидных и полигональных образований (рис.1, б).

Через 48 часов от начала эксперимента в цитоплазме опухолевых клеток, культивируемых совместно с ГСК, стали определяться включения красного флуорохрома, а спустя 72 часа все клетки глиомы содержали в цитоплазме включения этого красителя (рис. 2, а). Через 96 часов клетки глиомы в кокультуре С6/ГСК отвечали активной флуоресценцией на стимуляцию лазерами с длиной волны 488 и 546 нм. Спустя 120 часов наблюдения мы не могли идентифицировать ГСК в смешанной культуре, что могло быть вызвано

их гибелью, дифференцировкой или слиянием с опухолевыми клетками. При этом, все клетки глиомы С6 отвечали флуоресценцией на воздействие лазеров двух типов (рис 2, б–г). Этот феномен не наблюдался в культуре с фибробластами.

На втором этапе эксперимента через 24 часа наблюдения мы не заметили существенной разницы в окраске культур ГСК и фибробластов. Опухолевые клетки активно пролиферировали и формировали монослой. Однако спустя 72 часа в их цитоплазме в сочетанной с ГСК культуре стали появляться флуоресцентные включения зеленого флуорорхрома (рис. 3, а, б) Данное явление было максимально выражено спустя 120 часов эксперимента и отсутствовало в сочетанной культуре с фибробластами.

На третьем этапе эксперимента через 24 часа опухолевые клетки в виде образований округлой, и веретеновидной формы активно флуоресцировали в полосе аргонного лазера с длиной волны 546 нм. Через 72 часа в цитоплазме клеток глиомы, которые культивировались совместно с ГСК, стали появляться включения зеленого красителя, а через 96 часов эти включения содержали все опухолевые клетки. Спустя 120 часов наблюдения мы не могли идентифицировать ГСК в кокультуре с опухолевыми клетками, поскольку все клетки отвечали активной флуоресценцией на воздействие лазеров двух типов (рис. 4, а, б). Данное явление отсутствовало в сочетанной культуре опухолевых клеток с фибробластами.

Автоматизированный подсчет количества опухолевых клеток в сочетанных культурах с помощью системы Cell-IQ выявил ряд важных закономерностей (рис. 5). Кривая нарастания числа опухолевых клеток в сочетанной культуре ГСК/С6 при изначальном

соотношении 1:3 к концу эксперимента имела экспоненциальный вид, но обнаруживала выраженные количественные отличия от кокультуры, содержащей фибробласты и клетки глиомы С6. Эти различия были более очевидны при культивировании ГСК с клетками нейроглиомы в соотношениях 1:1 и 3:1. Кривая нарастания числа опухолевых клеток в этих кокультурах была линейной. Кроме того, увеличение количества ГСК отодвигало фазу логарифмического роста опухолевой культуры во времени.

Обсуждение полученных данных. Существенные различия в числе опухолевых клеток в сочетанных культурах ГСК/С6 и ГСК/фибробласты к концу эксперимента позволяют сделать вывод о выраженном противоопухолевом действии ГСК. Уменьшение числа флуоресцирующих объектов может объясняться спецификой процесса межклеточных коммуникаций, в ходе которого происходит обмен цитоплазматическими белками, с которыми связан краситель, что уменьшает интенсивность флуоресценции. Однако анализ динамики нарастания числа опухолевых клеток при совместном культивировании с ГСК позволяет сделать вывод об усилении их антагонистического действия на рост глиомы по мере увеличения числа стволовых клеток.

Как правило, глиальные опухоли возникают в возрасте 45–65 лет, когда количество стволовых клеток в зрелом мозге существенно уменьшается. Кроме того, они накапливают мутации, снижающие их регуляторный потенциал.

Мутационный процесс – движущая сила канцерогенеза, а НСК, активно пролиферирующие на протяжении всей жизни индивида, характеризуются наибольшей нестабильностью среди всех клеток нервной

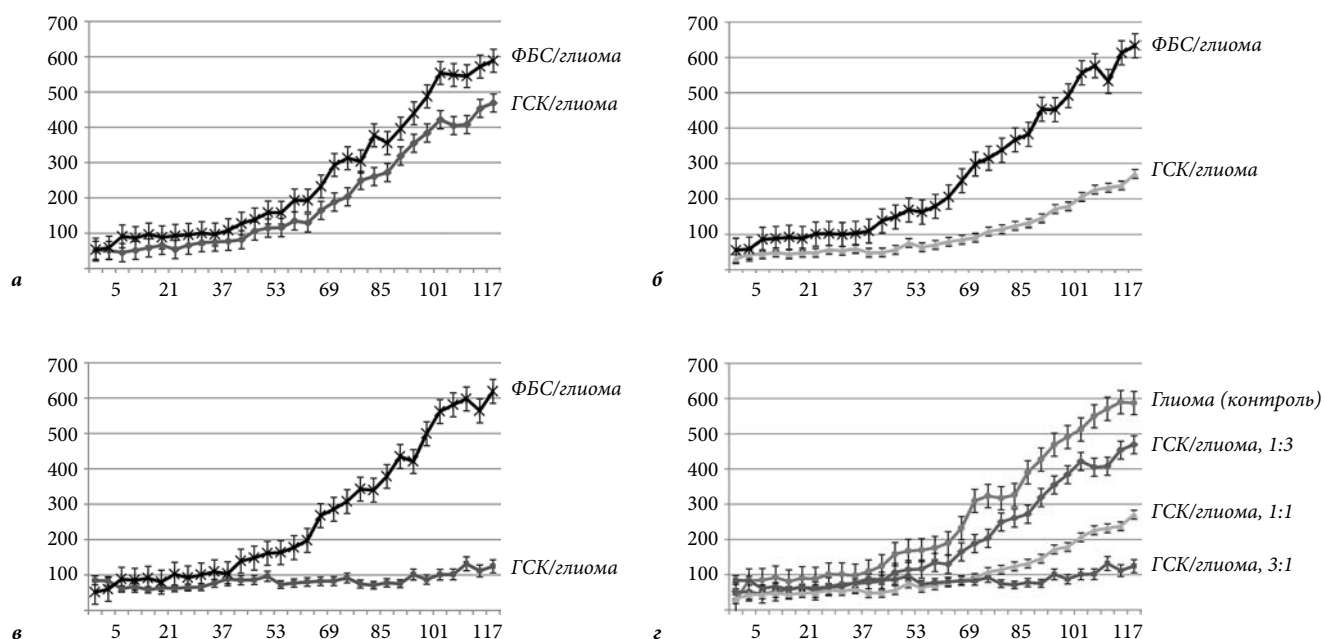


Рис. 5. Динамика роста опухолевых клеток:

а – нейроглиома С6 с ГСК и фибробластами (ФБС) в соотношении 1:3; б – нейроглиома С6 с ГСК и фибробластами (ФБС) в соотношении 1:1; в – нейроглиома С6 с ГСК и фибробластами (ФБС) в соотношении 3:1; г – опухолевые клетки в кокультурах. По данным системы автоматического наблюдения Cell-IQ. Ось абсцисс – часы эксперимента, ось ординат – число клеток в поле зрения системы в контрольную точку эксперимента. Указаны планки погрешностей со стандартными ошибками.

системы, и представляют собой идеальный объект для воздействия канцерогенов [4]. На сегодняшний день идентифицированы основные гены – *P53*, *PTEN*, *VHL*, *NF1*, *NF2*, *ID1*, *CTNNB1*, – изменения которых ведет к запуску неопластических процессов, первым этапом здесь становится модификация претемного профиля HSK [2, 3, 5]. В этой связи особенно опасны мутации в генах, кодирующих синтез ДНК, метилтрансфераз DNMT1, DNMT3a и DNMT3b, гистоновых трансфераз HDAC2 и HDAC9, деметилаз JMJD1A и JMJD1B, а также метилтрансфераз SET7, SETD7, MILL, MILL3, и MILL4 [10].

Активный обмен дефектными белками в результате процесса клеточной фузии и слияния клеток ведет к грубым нарушениям метилирования ДНК и другим эпигенетическим расстройствам, резко дестабилизирующим геном и стимулирующим экспрессию онкогенов. В свою очередь, межклеточный обмен микроРНК (miR) подавляет экспрессию генов-супрессоров опухолевого роста: miR-34 инактивирует ген *c-Met*, miR-146a – ген *Notch*, miR-7 – ген *EGFR*, miR-128 – ген *Bmi1*, miR-195 – гены *E2F3* и *CCND3*. С другой стороны микроРНК стимулируют активность онкогенов: miR-21 – гена *RECK*, miR-26a – генов *PTEN* и *RB1*, miR-221 и miR-222 – генов *p27Kip1*, *PTPμ* и *PUMA* [1, 2, 10].

Таким образом, обмен клеточными белками в результате взаимодействия между опухолевыми клетками и ГСК следует считать крайне значимым молекулярным механизмом канцерогенеза. Немаловажным аргументом в пользу первичного начала процессов канцерогенеза HSK является именно трансформация их протеома, которая обуславливает его существенное сходство с протеомным профилем ОСК глиобластомы [3]. Далее следует активный обмен белками, микроРНК и регуляторными генами в пределах ниши стволовой клетки, основу которого составляет эффект клеточной фузии, или слияния.

ГСК используются для лечения злокачественных опухолей уже более 50 лет. Первоначально они применялись для снижения депрессии костного мозга и подавления инфекционных и геморрагических осложнений высокодозной химиотерапии [14]. Трансплантация ГСК носила вспомогательный характер: они использовались с целью восстановления иммунного противоопухолевого ответа, запуска реакции «трансплантат против опухоли», в комбинации с противоопухолевыми препаратами, что увеличивало эффективность химиотерапии. На сегодняшний день трансплантация этого типа клеток является единственным методом излечения ряда онкогематологических заболеваний [13].

Открытие феномена направленной миграции позволило использовать ГСК в качестве транспортного челнока. Одновременно, был обнаружен их противоопухолевый эффект [5]. Способность нормальных ГСК подавлять рост злокачественных опухолей отчасти можно объяснить активизацией в опухолевых клетках рецепторов семейства фактора некроза опухоли, рецептора фактора роста нервов, CAR1, TRAIL, CD95,

рецепторов смерти DR3, DR4, DR5. Активизация рецепторов к α - и β -интегринам, эпидермальному фактору роста, инсулиноподобному фактору роста-1 в процессе взаимодействия опухолевой клетки с ГСК ведет к запуску апоптоза, кроме того, сигнал клеточной гибели может быть передан в опухолевую клетку через щелевые межклеточные контакты посредством костного морфогенетического белка-7 и интерлейкина-18 [2].

В нашем исследовании к 5-му дню эксперимента клетки глиомы С6 содержали включения трейсера CMTPX, который прочно связан с клеточными белками [15]. Переход красителя можно объяснить формированием структурного и функционального синцития между взаимодействующими клетками, либо эффектом клеточной фузии, что делает возможным обмен протеинами (интерлейкины 3, 4, 10 и 12, α -интерферон), циклинами (E, D₂), ингибитором циклинзависимых киназ p27KIP1 и костным морфогенетическим белком-4 [1, 2]. Кроме того, возможно слияние стволовых и неопластических клеток [15]. Очевидно, описанный феномен представляет собой один из важных механизмов саногенетического взаимодействия ГСК и опухолевых клеток.

Таким образом, ГСК практически не вовлечены в нейроонкологический процесс, они активно взаимодействуют с опухолевыми клетками при совместном культивировании, что тормозит репликацию последних и отодвигает фазу логарифмического роста. Модификация протеомного профиля ГСК позволит создать биомедицинский клеточный препарат, способный улучшить выживаемость нейроонкологических больных. Направление модификации протеомного и транскриптомного профилей ГСК следует искать в области постгеномных технологий многомерной биологии.

Авторы выражают благодарность специалистам Государственного научного центра им В.П. Сербского за методологическую помощь и плодотворное научное сотрудничество.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-15-00084).

Литература

1. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Мищенко П.В., Хотимченко Ю.С. Роль системных механизмов миграции и хоуминга стволовых клеток в развитии злокачественных опухолей центральной нервной системы и разработке новых методов противоопухолевой терапии // Российский биотерапевтический журнал. 2013. Т. 12, № 4. С.3–12.
2. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Кумейко В.В. [и др.] Стволовые клетки в канцерогенезе мультиформной глиобластомы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 2. С. 13–19.
3. Брюховецкий А.С., Шевченко В.Е., Чехонин В.П. [и др.] Сравнительное протеомное картирование опухолевых стволовых клеток, выделенных из глиобластомы линии U87, нейрональных стволовых и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека: от каталогизации клеточных белков к инновационной парадигме протеом-основанной клеточной терапии опухолей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 2. С.85–92.
4. Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия. М.: Медицина, 2003. 288 с.
5. Aboody K., Capela A., Niaz N. [at al.] Translating stem cell studies to the clinic for CNS repair: current state of the art and the need for a Rosetta stone // Neuron. 2011. Vol. 70, No. 4. P. 597–613.

6. Bjerkvig R., Tysnes B.B., Aboody K.S. [et al.] Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights // Nat. Rev. Cancer. 2005. No.11. P. 899–904.
7. Doetsch F., Caillé I., Lim D.A. [et al.] Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain // Cell. 1999. Vol. 97, No. 6. P. 703–716.
8. Gage F.H., Temple S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain // Neuron. 2013 Vol. 80, No. 3. P. 588–601.
9. Havrda M.C., Paoletta B.R., Ran C. [et al.] d2 mediates oligodendrocyte precursor cell maturation arrest and is tumorigenic in a PDGF-rich microenvironment // Cancer Res. 2014. Vol. 74, No. 6. P. 1822–1832.
10. Kim Y.Z. Altered histone modifications in gliomas // Brain Tumor Res. Treat. 2014. Vol. 2, No. 1. P. 7–21
11. Louis D.N., Perry A., Burger P. [et al.] International Society of Neuropathology-Haarlem Consensus Guidelines, for Nervous System Tumor Classification and Grading // Brain Pathol. 2014. DOI: 10.1111/bpa.12171.
12. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cell, cancer and cancer stem cell // Nature. 2001. Vol. 414, No. 6859. P. 105–111.
13. Schichor C., Aibrecht V., Korte B. [et al.] Mesenchymal stem cells and glioma cells form a structural as well as a functional syncytium in vitro // Exp. Neurol. 2012. Vol. 234, No. 1. P. 208–219.
14. Stupp R., Hegi M.E. Brain cancer in 2012: Molecular characterization leads the way // National Review. Clin. Oncology. 2013. Vol. 10, No. 2. P. 69–70.
15. Wurmser A.E., Gage F.H. Cell fusion causes confusion // Nature. 2002. Vol. 6880, No. 416. P. 485–487.

Поступила в редакцию 08.09.2014.

Взаимодействие гемопоэтических стволовых и опухолевых клеток *in vitro*

И.С. Брюховецкий^{1–3}, П.В. Мищенко^{1,2}, Е.В. Толоч^{1,2}, Р.Ю. Хотимченко^{1,2}, А.С. Брюховецкий^{1,3}

1 Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), 2 Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчиковского, 17), 3 Клиника восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита» (115478, г. Москва, Каширское шоссе, 23)

Резюме. Анализировали межклеточное взаимодействие и влияние гемопоэтических стволовых клеток человека на жизнедеятельность и пролиферацию опухолевых клеток глиомы *in vitro*. При совместном культивировании клеток глиомы, фибробластов и гемопоэтических стволовых клеток показано статистически достоверное замедление скорости пролиферации клеток опухоли. Делается вывод, что гемопоэтические стволовые клетки активно взаимодействуют с клетками глиомы и обмениваются регуляторными белками, что замедляет скорость неопластической пролиферации и сдвигает во времени фазу логарифмического роста опухоли.

Ключевые слова: глиома линии Сб, стволовые клетки, фибробласты, сочетанные культуры.

УДК 617.7–007.691–089.819.1–085.214.2

ЛЕЧЕНИЕ ГЛАУКОМНОЙ ОПТИКОНЕЙРОПАТИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА РЕТРОБУЛЬБАРНОЙ КАТЕТЕРИЗАЦИИ

В.В. Лузянина

Приморский центр микрохирургии глаза (690088, г. Владивосток, ул. Борисенко, 100е)

Ключевые слова: открытоугольная глаукома, нейропротекторное лечение, внутриглазное давление.

TREATMENT OF GLAUCOMA ASSOCIATED OPTIC NEUROPATHY USING METHOD OF RETROBULBAR CATHETERIZATION

V.V. Luzyanina

Primorsky Center of Eye Microsurgery (100e Borisenko St. Vladivostok 690088 Russian Federation)

Background. The purpose of this research is to find out the efficiency of pharmaceutical treatment of progressive glaucoma associated optic neuropathy with using retrobulbar catheterization

Methods. Was observed 54 patients from 52 to 84 years old (59 eyes) with nonstabilized primary open-angle glaucoma. Treatment was began with insertion under local anesthesia of retrobulbar catheter, with help of which for 10 days long was injected retinalamin. At the same time under the skin of temple was injected histochrom, was provided intravenous infusions mexidol and choline alfosceras, intramuscular was injected milgamma. After the end of course of therapy catheter was extracted and was appointed per os systemics the same groups for 2 months.

Results. In all cases of examinations tolerant intraocular pressure staying on a mean value. Visual field expanded, generally because of reduction or total elimination of relative scotomas. In observation with developed stage of fast progressive and slow progressive glaucoma associated optic neuropathy decreasing of index of progression was registered and after 6 and 12 months. With advanced stage of glaucoma associated optic neuropathy decreasing of index of progression was verifiable only with fast progressive disease state.

Conclusions. Efficiency of retrobulbar catheterization was demonstrated by the results of functional and morphometric research of optic nerve with course of neuroprotective treatment under conditions of normalized intraocular pressure with intention to slow down development of glaucoma associated optic neuropathy.

Keywords: open-angle glaucoma, neuroprotective treatment, intraocular pressure.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 4, p. 37–40.

Глаукомная оптиконеуропатия (ГОН) – нейродегенеративное заболевание с распадом зрительных функций (нередко при нормализованном внутриглазном давлении – ВГД), характеризующееся прогрессивным течением с инвалидизацией 28–41 % пациентов с первичной открытоугольной глаукомой [12].

Прогрессирование глаукомы отмечено при снижении офтальмотонуса ниже 18 мм рт. ст. в 14,4 % случаев [2]. Общепризнано, что ведущим фактором ГОН является ишемия с последующей реперфузией сетчатки и головки зрительного нерва [1, 2, 5, 11, 14]. Под реперфузией понимают восстановление кровообращения после предшествующей ишемии. Это приводит к активации глутаматкальциевого каскада в сетчатке и зрительном нерве, выбросу провоспалительных цитокинов и образованию свободных радикалов, повреждающих