

УДК 576.3:602.9

**ТОПОГРАФИЯ ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КЛЕТОК В ЭМБРИОИДНЫХ ТЕЛЬЦАХ И ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ ЭМБРИОИДНЫХ ТЕЛЕЦ ТЕРАТОКАРЦИНОМЫ СВА9Н6**

**Дыбан П.А., Нониашвили Е.М.**

*ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, e-mail: pavandy@mail.ru*

Изучены количественные показатели размножения эмбрионидных телец малодифференцированной тератокарциномы СВА9Н6 в брюшной полости мышей линии СВА (прирост в % за 1 сутки, время удвоения количества телец) в различные сроки после трансплантации (от 5 до 20 суток). Установлено, что прирост числа эмбрионидных телец и время их удвоения по мере длительности нахождения в брюшной полости уменьшается. В статье обсуждаются причины замедления темпов образования телец, в частности, является ли это явление истинным или ложным, т.е. обусловленным за счет феномена трансформации асцитной формы (эмбрионидных телец) тератокарциномы в солидную. Установлена статистически достоверная разница в распределении клеток тератокарциномы СВА9Н6 внутреннего слоя эмбрионидного тела: 66% ± 13,2 от общего числа митотически делящихся и 63% ± 11,4 синтезирующих ДНК клеток находятся в наружной трети и лишь 8,0% ± 2,0 и 11% ± 2,5 во внутренней трети соответственно.

**Ключевые слова:** тератокарцинома, эмбрионидные тела, стволовые клетки, пролиферация, размножение

**TOPOGRAPHY OF PROLIFERATING CELLS IN EMBRYOID BODIES AND FEATURE OF REPRODUCTION OF EMBRYOID BODIES OF TERATOKARCINOMA OF CBA9H6**

**Dyban P.A., Noniashvili E.M.**

*Institute of Experimental Medicine of the North-West Branch of the RAMS, Sankt-Petersburg, e-mail: pavandy@mail.ru*

Quantitative indices of reproduction of embryoid bodies of teratocarcinoma CBA9H6 in an abdominal cavity of mice of the CBA line (a gain in % in 1 days, time of doubling of quantity of bodies) in various terms (from 5 to 20 days) after transplantation are studied. It is established that the number gain of the embryoid bodies and time of their doubling in the process of stay duration in an abdominal cavity decreases. In article the reasons of delay of rates of embryoid bodies formation are discussed, in particular, is this phenomenon true or false, i.e. caused by the phenomenon of transformation of an ascitic form of embryoid bodies of a teratocarcinoma to solid. Statistically the following reliable difference in distribution of cells of a teratocarcinoma of CBA9H6 of an inside layer of an embryoid bodies is established: 66% ± 13,2 from total number mitosis and 63% ± 11,4 synthesizing DNA cells which are in an external third, and only 8,0% ± 2,0 and 11% ± 2,5 – in an internal third, respectively.

**Keywords:** teratocarcinoma, embryoid bodies, reproduction, stem cells, proliferation

Как известно, эмбрионидные тельца были вначале описаны в тератомах семенника и яичника человека [3]. В дальнейшем, путем трансплантации зародышей в эктопические места и последующих перевивок были получены различные перевивные линии тератокарцином, одни из которых являлись полипотентными, а другие обладали ограниченным модусом дифференцировки [4], но все из них, как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* формировали эмбрионидные тельца, наружный слой которых был представлен одним слоем энтодермальных клеток, а внутренний – стволовыми тератокарциномными клетками и их потомками, находящимися на разной стадии дифференцировки. При трансплантации в брюшную полость эмбрионидные тельца начинают интенсивно размножаться, а некоторые из них, адгезируя с клетками брюшины, начинают трансформироваться в солидные опухоли.

За эти годы были получены многочисленные данные о биологии тератокарцином, в том числе характеризующие процессы дифференцировки стволовых клеток различных линий [1]. Однако малоизученными остаются аспекты, связанные с кинетикой пролиферации стволовых клеток тератокарциномы [2, 5, 6], в частности отсутствуют данные об особенностях их топографии в пределах эмбрионидного тельца и темпах размножения последнего.

**Материалы и методы исследования**

В работе была использована асцитная форма тератокарциномы (эмбрионидные тельца линии СВА9Н6), ранее полученная проф. Грехемом из зародышей мышей линии СВА. В брюшную полость 64 мышей-реципиентов (самцов линии СВА, весом 18–20 г) трансплантировали по 5000 эмбрионидных телец. Через 5, 8, 13 и 20 суток после трансплантации в брюшную полость мышей-реципиентов вводили 5 мл среды 129, а затем извлекали 1 мл ранее

введенной жидкости и подсчитывали в ней количество телец. Мышам внутрибрюшинно вводили Н-3Тимидин (удельная активность 17 Кю/ммоль) из расчета 40 мкКю на животное. Подсчет количества ДНК синтезирующих клеток производили через 1 и 30 часов после внутрибрюшинного введения изотопа. Препараты с экспонированной эмульсией типа «М» экспонировали в течение 30 суток. Асцитные и солидные формы тератокарциномы подвергали гистологической обработке, а серийные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и азаном по Генденгайну. Полученные данные подвергались статистической обработке по методу Фишер – Стьюдента.

### Результаты исследования и их обсуждение

Данные о темпах размножения эмбрионидных телец тератокарциномы СВА9Н6 с суженным модусом цитодифференцировки приведены в табл. 1. Эти данные свидетельствуют о том, что по мере удлинения срока нахождения эмбрионидных телец в брюшной полости темпы прироста клеток асцитной формы опухоли СВА9Н6 уменьшаются, а время ее удвоения соответственно возрастает. Так, например, в ранние сроки после трансплантации (5–8 суток) прирост за 1 сутки эмбрионидных телец возрастает на 198%, в то время как при более длительном сроке (13–20 суток) лишь на

17,4%. В свое время нами было установлено, что по мере перехода стволовых клеток тератокарциномы ОС15S1 на путь цитодифференцировки, происходит увеличение продолжительности митотического цикла [2]. Не исключено, что замедление темпов образования дочерних эмбрионидных телец может быть объяснено тем, что по мере пребывания в брюшной полости асцитной формы тератокарциномы СВА9Н6 впоследствии возрастания дифференцировки стволовых клеток и соответственно уменьшения темпов пролиферации увеличивается и период формирования критической массы клеток, столь необходимой для разделения материнского эмбрионидного тельца. Однако нельзя не обратить внимание на тот факт, что примерно через 8–9 суток после трансплантации можно обнаружить и переход части асцитной формы тератокарциномы в солидную из-за прикрепления эмбрионидных телец, имеющую более высокую степень дифференцировки, к внутренним органам. Поэтому замедление прироста и времени удвоения эмбрионидных телец, скорее всего не истинное, а ложное (или, по крайней мере, не столь выраженное) за счет феномена трансформации асцитной формы опухоли в солидную.

Таблица 1

Темпы размножения эмбрионидных телец СВА9Н6 в различные сроки после интраперитонеальной трансплантации мышам линии СВА

Время после перевивки (в сутках)	Количество телец в 1 мл жидкости	Абсолютный прирост за исследуемый период	Прирост телец за 1 сутки	Прирост телец за 1 сутки (в %)	Время удвоения количества телец (в часах)
5	1265 ± 390	–	–	–	–
8	8780 ± 2400*	7515 (6,9 раза)	2505	198	12,1
13	43900 ± 9523*	35120 (4 раза)	7024	80	30,0
20	97500 ± 10655*	53600 (1,5 раза)	7653	17,4	138,0

Примечание. \*P < 0,05.

Ранее нами были получены данные о топографии пролиферирующих клеток (синтезирующих ДНК и митозов), которые не были опубликованы в научной статье (табл. 2). Обнаружено, что подавляющее большинство синтезирующих ДНК и митотически делящихся клеток находится в наружной трети внутреннего слоя эмбрионидного тельца. Статистический анализ выявил достоверную разницу в локализации пролиферирующих элементов (как митозов, так и ДНК синтезирующих клеток), находящихся в наружной трети, по сравнению с внутренней третью вну-

треннего слоя. Таким образом, в результате данного исследования в эмбрионидных тельцах тератокарциномы СВА9Н были выявлены зоны, имеющие камбиальное значение. В этой же работе была предпринята попытка определить миграцию эмбриокарциномных клеток внутри самого эмбрионидного тельца, используя в качестве маркера Н-3 тимидиновую метку с отставлением, т.е. при сопоставлении локализации меченных тимидином клеток через 1 и 30 часов после введения изотопа. Однако возрастание количества меченных клеток во внутренней трети внутрен-

него слоя с параллельным уменьшением числа аналогичных клеток в наружной трети оказалось статистически недостоверным, т.е. эта тенденция не может служить доказательством миграции эмбрио-

карциномных клеток из периферического слоя во внутренний. Для окончательного ответа на данный вопрос необходимы дополнительные эксперименты с более длительным по времени отставлением метки.

**Таблица 2**

Топография синтезирующих ДНК и митотически делящихся клеток тератокарциномы СВА9Н6 во внутреннем слое эмбрионидного тельца

Части внутреннего слоя эмбрионидного тельца	В % от общего числа			На единицу площади		
	Митозы	Клетки, синтезирующие ДНК (1 час после введения изотопа)	Клетки с отставленной меткой (30 часов после введения изотопа)	Митозы	Клетки, синтезирующие ДНК (1 час после введения изотопа)	Клетки с отставленной меткой (30 часов после введения изотопа)
Наружная треть, граничащая с эндодермальным слоем	66 ± 13,2	63 ± 11,4	44 ± 10,0	0,26 ± 0,05	0,83 ± 0,16	0,61 ± 0,1
Средняя треть	26 ± 5,2	26 ± 6,0	34 ± 7,1	0,15 ± 0,02	0,48 ± 0,06	0,66 ± 0,03
Внутренняя треть	8,0 ± 2,0*	11 ± 2,5*	22 ± 3,0	0,06 ± 0,01*	0,24 ± 0,05*	0,58 ± 0,1

Примечание. \*P < 0,05.

**Заключение**

Полученные нами данные о топографии синтезирующих ДНК и митотически делящихся клеток свидетельствуют о том, что в эмбрионидных тельцах тератокарциномы СВА9Н6, внутренний слой которых представлен компактно сгруппированными клетками, имеются четко выраженные зоны пролиферирующих клеток, находящиеся преимущественно в наружной трети внутреннего слоя. Особенности динамики размножения внутри брюшной полости эмбрионидных телец обусловлены не только темпами деления эмбрионидных телец, но и, вероятно, и параллельным процессом – переходом асцитной формы тератокарциномы в солидную.

**Список литературы**

1. Дыбан А.П., Дыбан П.А. Стволовые клетки в экспериментальной и клинической медицине // Медицинский академический журнал. – 2002. – Т. 2. – № 3. – С. 3–24.
2. Дыбан П.А. Особенности роста и дифференцировки тератокарциномы OC15S1 в сингенных и аллогенных мышцах // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 1986. – № 1. – С. 71–72.
3. Peyron A., Limousin H. Sur la polyembryonie intravasculaire et les metastases a tissus multiples dans les embryomes du testicule // C.r. Acad. Sci. – 1936. – Vol. 203. – P. 894–896.
4. Stevens L.C. Studies on transplantable testicular teratomas of strain 129 mice // J. Natl. Cancer Inst. – 1958. – Vol 20. – P. 1258–1276.
5. Rosenstraus M.J. Sundell C.L., Liskay R.V. Cell cycle characteristics of undifferentiated and differentiating embryonal carcinoma cells // Developmental Biology. – 1982. – Vol. 89. – № 2. – P. 516–520.

6. Sennerstan R., Stromberg J.O. Dissociation of cell Gtowth and DNA Synthesis and alteration of the Nucleo-Cytoplasmic Ratio in Growing Embryonal Carcinoma Cells // Development, Growth and Differentiation. – 1991. – Vol. 33. – № 4. – P. 353–363.

**References**

1. Dyban A.P., Dyban P.A. Stem cells in experimental and clinical medicine // Medical academic Journal. 2002. Vol. 2. no. 3. pp. 3–24.
2. Dyban P.A. Character of growth and differentiation of teratocarcinoma OC15S1 in syngenic and allogenic mice // Bull. Exp. Biol. and Med. 1984. no. 1. pp. 71–72.
3. Peyron A., Limousin H. Sur la polyembryonie intravasculaire et les metastases a tissus multiples dans les embryomes du testicule // C.r. Acad. Sci. 1936. Vol. 203 pp. 894–896.
4. Stevens L.C. Studies on transplantable testicular teratomas of strain 129 mice. // J. Natl. Cancer Inst. 1958, Vol. 20. pp. 1258–1276
5. Rosenstraus M.J. Sundell C.L., Liskay R.V. Cell cycle characteristics of undifferentiated and differentiating embryonal carcinoma cells // Developmental Biology 1982 Vol. 89. no. 2. pp. 516–520.
6. Sennerstan R., Stromberg J.O. Dissociation of cell Gtowth and DNA Synthesis and alteration of the Nucleo Cytoplasmic Ratio in Growing Embryonal Carcinoma Cells // Development, Growth and Differentiation. 1991. Vol. 33. no. 4. pp. 353–363.

**Рецензенты:**

Пигаревский П.В., д.б.н., доцент, руководитель отдела морфологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург;  
 Паткин Е.Л., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории эпигенетики, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 10.12.2014.