

КУРИНЫЙ ЭМБРИОН КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Лысов Е.Е., Минина Я.И., Певзнер Д.А., Лазарев В.В., Конев С.С., Погосян С.А, Трофименко А.И.

Кубанский государственный медицинский университет (350063, Краснодар, ул. Седина 4),
e-mail: leekk@mail.ru

Применение куриных эмбрионов в качестве моделей для изучения физиологических и патологических процессов в организме человека имеет давнюю историю важных открытий и разработок. Несмотря на широкое применение ряда позвоночных и беспозвоночных животных в качестве объектов для экспериментов в современной науке, куриные эмбрионы по-прежнему занимают важное место в научной практике. Благодаря новым молекулярным и генетическим инструментам, применяемым на куриных эмбрионах, совершенствуется процесс изучения нормальных и патологических процессов. Развитая сосудистая сеть хориоаллантоисной мембраны и ее поверхностное расположение делают куриные эмбрионы удобной платформой для изучения таких тканевых процессов, как морфогенез, ангиогенез и метастазирование опухолей. Современные технологии визуализации позволяют проводить оценку этих процессов в режиме реального времени, точно описывать стадии этих явлений. Существующие экспериментальные методики по работе на куриных эмбрионах открыли широкие возможности не только в изучении этиологии и патогенеза опухолевого роста, но и в разработке новых противоопухолевых препаратов. Таким образом, куриный эмбрион - уникальная модель, которая позволяет обойти многие ограничения при изучении канцерогенеза *in vivo*.

Ключевые слова: куриный эмбрион, ангиогенез, канцерогенез, неоплазия.

CHICKEN EMBRYO AS MODEL FOR STUDYING OF CANCEROGENESIS

Lysov E.E., Minina Ja.I., Pevzner D.A., Lazarev V.V., Konev S.C., Pogosjan S.A, Trofimenko A.I.

Kuban State Medical University (350063, Krasnodar, Sedina st. 4), e-mail: leekk@mail.ru

Chicken embryo use as a model for normal and pathological processes studying has a long and productive history. Despite the variety of laboratory animals used as experimental models in modern biological research, chick embryos still play an important role in scientific practice. Due to new molecular and genetic instruments, applied to chick embryos, the process of the discovery of normal and pathological processes is being refined. Rich vasculature together with the superficial location of chorioallantois membrane make a very useful platform for studying biological events, such as tissue morphogenesis, angiogenesis and cancer metastasis. Modern technologies provide real-time visualization of these processes and makes it the description each step of the processes more correct. Existing experimental methods give us an amount of capabilities not only in tumor etiology and pathogenesis studying, but also in new drugs development. In this way, chicken embryo is a universal model that can overcome a lot of restrictions in cancerogenesis studying.

Key words: chicken embryo, angiogenesis, cancerogenesis, neoplasia.

Механизмы, обеспечивающие выживаемость клеток и их подвижность в процессе эмбриогенеза, во многом совпадают с механизмами канцерогенеза и метастазирования. Определение генов и факторов транскрипции, регулирующих эпителиально-мезенхимальное перемещение, облегчило понимание механизмов гастрюляции, миграции клеток нервного гребня и, в итоге, метастазирования [5]. Это доказывает возможность применения куриных эмбрионов в качестве моделей для исследований: как в области эмбриологии, так и онкологии. Куриный эмбрион – уникальная модель, которая позволяет обойти многие ограничения при изучении канцерогенеза *in vivo*. Доступность хориоаллантоисной мембраны, хорошо васкуляризованной экстарэмбриональной ткани, расположенной под скорлупой и

толерантной к ксеротрансплантатам опухолевых клеток, делают ее удобным объектом для проведения экспериментальных исследований. Этим объясняется давняя история успешного применения хориоаллантаической мембраны в качестве биологической платформы для изучения молекулярных механизмов опухолевого роста, включая метаплазию, вирусный канцерогенез, реакции на ксенотрансплантацию опухолевых клеток, ангиогенез и метастазирование [10]. Поскольку куриный эмбрион является иммунодефицитным, на хориоаллантаической мембране хорошо приживаются как нормальные, так и опухолевые клетки [10]. Важно то, что на хориоаллантаической мембране опухолевые клетки сохраняют основные свойства, в том числе способность к росту, инвазии, ангиогенезу и перестройке соседних структур. В связи с этим, данный объект является исключительно удобной моделью для изучения молекулярных механизмов опухолевого роста [1, 10].

Миграция опухолевых клеток и метастазирование

За последние годы особое внимание уделялось механизмам миграции опухолевых клеток и ее роли в метастазировании [9]. Хориоаллантаическая мембрана успешно адаптирована в качестве модели для количественного анализа ключевых этапов метастатического процесса с использованием видоспецифичных и количественных Alu-ПЦР для обнаружения диссеминированных опухолевых клеток человека во вторичных тканях [10]. Выявление диссеминированных клеток с помощью Alu-ПЦР делает возможным количественную оценку метастазирования в органы, колонизированные не менее, чем 25 клетками [9, 10, 12]. Такой подход был использован для демонстрации роли матриксных металлопротеиназ в ходе метастазирования и позволил количественно выявить среди опухолевых клеток их типы с различной способностью к метастазированию. Среди матриксных металлопротеиназ, идентифицированных в хориоаллантаической мембране с культивируемой на ней тканью, куриная ММП-13 (кММП-13) была единственным ферментом, индукция и экспрессия которого коррелировала с началом ангиогенеза и формированием кровеносных сосудов. кДНК кММП-13 была клонирована и рекомбинантно экспрессирована. Белок кММП-13 был очищен, изучен *in vitro*, и испытан *in situ* на коллагене выращиваемой ткани. ММП-13-позитивные клетки появляются в хориоаллантаической мембране вскоре после стимуляции ангиогенами культивируемой ткани. Морфологически, клетки содержащие кММП-13, представляют из себя гемопоэтические клетки моноцитарного/макрофагального ряда. *In vitro*, кММП-13-проэнзим быстро и эффективно активировался каскадом урокиназный активатор плазминогена – плазминоген – плазмин с образованием коллагеназы, способной расщеплять нормальный, но не мутантный коллагеназо-резистентный коллаген. Наногаммы очищенного кММП-13 вызывали в клеточных культурах на хориоаллантаической мембране ангиогенез сопоставимый с вызванным сосудистыми факторами роста. Это свойство кММП-13

эффективно блокируется селективными ингибиторами протеаз, что говорит о том, что кММП-13 *in vivo* играет определенную роль в качестве фактора ангиогенеза.

Zijlstra и соавт. разработали высокочувствительный метод мониторинга метастатической диссеминации опухолевых клеток в курином эмбрионе, который далее был использован для сравнительной оценки этапов метастатического каскада двух злокачественных клеточных линий, HEr3 и HT1080. При помощи *alu*-ПЦР было выявлено, что спонтанное метастазирование линии HEr3 происходит с высокой скоростью и эффективностью. За 7 дней число злокачественных клеток в опухоли составляет $1-2 \times 10^4$ /легкое. Напротив, скорость метастазирования линии HT1080 в 50-100 раз ниже, и через неделю количество клеток находится в диапазоне 200-400/легкое. При этом, сравнение процесса образования метастазов этими клеточными линиями позволяет объяснить более медленное метастазирование HT1080 двумя отчетливыми факторами: в 8-10 более низкий уровень интравазации в этой линии и более позднее начало роста во вторичном органе [10].

Также эта стратегия использовалась для определения роли в метастазировании скаффолд-белка CD151, регулирующего подвижность опухолевых клеток [12]. Для изучения последствий нарушения подвижности опухолевых клеток разработан ряд новых методик с использованием эмбрионов птиц [4, 6, 12]. Микроскопическая оценка опухолевых клеток в хориоаллантаоисной мембране показала наличие чрезвычайно динамичной клеточной среды, в которой опухолевые клетки активно продвигались через опухолевую ткань и прилегающую строму [12]. При изучении картины иммобилизации, вызванной ингибитором метастазирования – антителами к CD151 – было выявлено, что клетки стали неспособны к отсоединению от первичной опухоли, что лишало их способности к передвижению, интравазации и метастазированию [12]. Визуализация *in vivo* также выявила значительное влияние внеопухолевых сосудистых и стромальных клеток куриных эмбрионов на миграцию клеток опухоли [7].

Исследование роли гемодинамики и ангиогенеза при опухолевом росте

Сосудистое снабжение нормальных тканей или новообразований необходимо для их выживания, и потому куриные эмбрионы сыграли немалую роль в ранних описаниях кровеносной системы позвоночных сделанным Уильямом Гарвеем и Марчелло Мальпиги. Сосуды развивающегося цыпленка и экстраэмбриональные оболочки легко определяемы, а поверхностное расположение делает их удобными для наблюдения и проведения манипуляций. Изучение *in ovo* ангиогенеза, вызванного опухолевым ростом, началось в 20 веке на хориоаллантаоисной мембране, и на ранних этапах визуализация продолжала осуществляться в яйце. С современными неинвазивными, *in vivo* моделями [12] на куриных эмбрионах возможен мониторинг процессов неоваскуляризации *in vivo*. Особый класс

вирусных наночастиц позволяет визуализировать образовавшиеся сосуды в растущей опухоли и проводить мониторинг целенаправленной доставки веществ в опухоль на хориоаллантаоисной мембране [4]. Этот подход к всесторонней оценке неоплазии становится стандартом для изучения как молекулярных процессов, лежащих в основе опухолей, так и возможных методов лечения [2].

Когда развивающийся эмбрион извлекается из яйца и выращивается *ex ovo*, хориоаллантаоисная мембрана оказывается растянутой на поверхности белка и желтка, открывая доступ к своей сосудистой сети, благодаря чему она становится удобной платформой для проведения длительных экспериментов [7]. Чрезвычайно удобный доступ к сосудам был оценен многими экспериментаторами. Работы, проведенные на хориоаллантаоисной мембране, выявили потребность опухоли в неоваскуляризации и продемонстрировали, что ингибиторы ангиогенеза способны блокировать ее рост. На данной модели были открыты ингибиторы ангиогенеза грибкового происхождения, а также показано, что эндостатин, выделяемый во время протеолитической реорганизации внеклеточного матрикса, является фактором, угнетающим сосудистый рост [8]. Известно, что для стимуляции ангиогенеза опухоли активируют продукцию ряда ангиогенных факторов, включая факторы роста фибробластов (aFGF and bFGF), а также сосудистого эндотелального фактора роста (VEGF). Однако, многие злокачественные опухоли также выделяют ингибиторы ангиогенеза, в том числе ангиостатин и тромбоспондин. Отсюда понятно, что ангиогенный фенотип – это результат дисбаланса между положительными и отрицательными регуляторами ангиогенеза [8].

Были выявлены гемопоэтические клетки, выделяющие матриксные металлопротеиназы MMP9 и MMP13, необходимые для реорганизации матрикса во время ангиогенеза [11].

Современные технологические достижения в области систем визуализации позволили наблюдать за ходом васкуляризации хориоаллантаоисной мембраны и четко выделить стадии ангиогенеза [6, 7]. Новые контрастные препараты являются селективными в отношении развивающихся сосудов, что позволяет увидеть специфические структуры на микроскопическом уровне [6, 7]. Поскольку опухоли хорошо растут на поверхности хориоаллантаоисной мембраны и индуцируют рост ее сосудов, это удобная модель для визуализации кровотока *in vivo* в режиме реального времени. Высокое разрешение при этом позволяет выявить ток жидкости и динамику распространения молекул в новообразовании [4]. Lewis и др. разработали методику, суть которой заключается в использовании вирусных наночастиц в качестве платформы для наблюдения ангиогенеза в хориоаллантаоисной мембране. Биодоступный вирус мозаики коровьего гороха, меченый флуоресцентным

красителем, позволяет получить яркие наночастицы со способностью дисперсии *in vivo*, благодаря чему возможна визуализация эндотелия в период не ранее 72 часов. При этом глубина расположения сосудов, доступных исследователю при использовании данного метода, составляет до 500 мкм [7]. Наблюдение за тем, как наночастицы проходят через сосуды, питающие опухоль, позволяет прогнозировать, каким образом вводимые в сосудистое русло препараты будут распределяться в опухоли и окружающих тканях. Технология создания микроскопических слепков также позволяет осуществлять контроль за неоваскуляризацией. Визуализация динамики образования сосудов опухоли на хориоаллантаоисной мембране – более быстрый, простой и дешевый способ в сравнении с использованием в качестве объекта исследования млекопитающих, что оправдывает возможность их использования для скрининга лекарств и разработки средств их селективной доставки. Последние, будучи связанными с терапевтическими препаратами, делают их более специфичными в отношении опухолевых клеток [1, 2, 12]. Vobek и др. было изучено влияние комбинации стрептокиназы и гемцитабина на метастазирование карциномы Льюиса. Клетки опухоли, стабильно экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (GFP), были добавлены в куриные эмбрионы на 12 сутки периода инкубации. Через 7 дней с помощью флуоресценции метастазы карциномы Льюиса были обнаружены в головном мозге развивающегося эмбриона, сердце и грудине, с наибольшим их количеством в мозге. Аналогичный опыт провели с одновременным добавлением стрептокиназы и гемцитабина по отдельности и в комбинации. Комбинация гемцитабин-стрептокиназа угнетала метастазирование во все указанные органы [1].

Куриный эмбрион как модель для исследования меланомы

Первичная кожная меланома непосредственно не является причиной летального исхода, поскольку основные поражения внутренних органов и смерть, обусловлены ее метастазами. Поскольку изучение клеток меланомы *in vitro* в двухмерных (плоских) культурах зачастую недостаточно точно воспроизводит реальную картину опухолевого процесса, более информативны трехмерные модели, точнее моделирующие изменения в организме, происходящие во время запуска и прогрессирования неопластической трансформации [3]. Для создания трехмерной модели изучения механизмов миграции и инвазии клеток меланомы *in vitro* возможно использование куриных эмбрионов. После трансплантации клеток меланомы, происходящих из нервного гребня, в нервную трубку, клетки продолжают миграцию в медиальном и латеральном направлениях и, в итоге, подвергаются апоптозу в определенных зонах. При встраивании в эктопические зоны, такие, как область ромбовидного мозга или ямки диска зрительного нерва, происходит злокачественная инвазия опухолевых клеток и тканевая деструкция. В противоположность данному явлению, меланоциты не способны к спонтанному продолжению миграции клеток нервного гребня. Злокачественная инвазия меланоцитов

может быть индуцирована предварительной обработкой трансформирующим ростовым фактором бета из семейства bmp-2 [3]. Трансплантация клеток рака молочной железы MCF7 имеет иной образец роста в ромбовидном мозге, нежели клетки меланомы. Модель культивирования клеток меланомы на курином эмбрионе является легко осуществимой, бюджетной платформой для изучения особенностей инвазии опухолевых клеток в эмбриональных тканях. Это может быть полезно для исследования инвазивных свойств клеток, индуцированных эмбриональными онкогенами, а также для разработки методик воздействия на опухолевые клетки с целью устранения их инвазивных свойств.

Список литературы

1. Bobek V. Development of a green fluorescent protein metastatic-cancer chick-embryo drug-screen model // *Clinical & experimental metastasis*. – 2004. – V. 21. – №. 4. – P. 347-352.
2. Botkjaer K. A. Targeting tumor cell invasion and dissemination in vivo by an aptamer that inhibits urokinase-type plasminogen activator through a novel multifunctional mechanism // *Molecular Cancer Research*. – 2012. – V. 10. – №. 12. – P. 1532-1543.
3. Busch C. The chick embryo as an experimental system for melanoma cell invasion // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – №. 1. – P. e53970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053970>
4. Cho C. F. Evaluation of nanoparticle uptake in tumors in real time using intravital imaging // *Journal of visualized experiments: JoVE*. – 2011. – №. 52. doi:10.3791/2808
5. Delile J. A cell-based computational model of early embryogenesis coupling mechanical behaviour and gene regulation // *Nature communications*. – 2017. – V. 8. – P. 13929. doi:10.1038/ncomms13929
6. Leong H. S. Intravital imaging of embryonic and tumor neovasculature using viral nanoparticles // *Nature protocols*. – 2010. – V. 5. – №. 8. – P. 1406. doi:10.1038/nprot.2010.103
7. Lewis J. D. Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging // *Nature medicine*. – 2006. – V. 12. – №. 3. – P. 354. doi:10.1038/nm1368
8. O'Reilly M. S. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth // *Cell*. – 1997. – V. 88. – №. 2. – P. 277-285.
9. Palmer T. D. Quantitative analysis of cancer metastasis using an avian embryo model // *Journal of visualized experiments: JoVE*. – 2011. – №. 51. doi:10.3791/2815
10. Zijlstra A. A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction // *Cancer research*. – 2002. – V. 62. – №. 23. – P. 7083-7092.

11. Zijlstra A. Collagenolysis-dependent angiogenesis mediated by matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3) // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V. 279. – №. 26. – P. 27633-27645.
12. Zijlstra A. The inhibition of tumor cell intravasation and subsequent metastasis via regulation of in vivo tumor cell motility by the tetraspanin CD151 // Cancer cell. – 2008. – V. 13. – №. 3. – P. 221-234.