

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО  
„АКАД. КИРИЛ БРАТАНОВ“

**Милена Стефанова Костадинова**

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕТО МЕЖДУ  
МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ  
И ТУМОРНИ ЛИНИИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

Към дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“,

направление „Биологически науки“ 4.3.,

научна специалност „Имунология“ 01.06.23.

**Научен ръководител:**

**доц. Милена Сергеева Мурджева-Андонова, д-р**

**Рецензенти:**

**София, 2021**

Дисертационният труд е написан на 160 страници, илюстриран е с 33 фигури и 8 таблици.  
В библиографския списък са цитирани 379 източника.

Всички изследвания, включени в дисертационния труд са проведени в лабораториите на  
Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“, БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на .....  
пред научно жури в състав:

Проф. Румен Панков, дбн

Проф. Доброслав Кюркчиев, дмн

Доц. Анастас Пашов, доктор

Проф. Стефан Лолов, дмн

Доц. Милена Мурджева, доктор

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на ИБИР-БАН.

*Забележка: Номерата на фигурите в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.*

## Използвани съкращения

AnnV	Анексин V
AT-MSC	Мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан
AT-MSC-CM	Кондиционирана среда от AT-MSC
BM-MSC	Мезенхимни стволови клетки от костен мозък
BM-MSC-CM	Кондиционирана среда от BM-MSC
CD	Клъстер на диференциация
CFSE	5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Проточната цитометрия)
ISCT	Международната асоциация за клетъчни терапии
MFI	Среден интензитет на флуоресценция
MSC	Мезенхимни стволови клетки
MSC-CM	Кондиционирана среда от MSC
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-тиазолил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид
OD	Оптична плътност
PI	Пропидиев йодид
TME	Туморна микросреда
TRAIL	TNF- $\alpha$ -свързан апоптоза-индуциращ лиганд

## Резюме

По данни на The International Agency for Research on Cancer (IARC) към Световната здравна организация от 2018 г., честотата на възникване и смъртността от рак бързо нарастват в целия свят. Причините са комплексни и отразяват както непрекъснатото нарастване и застаряването на населението, така и промените в разпространението и разпределението на основните рискови фактори за рак, някои от които са свързани със социално-икономическия прогрес. Основните процеси, благоприятстващи развитието на рак, включително ускорената пролиферация на туморните клетки, инвазията, метастазите, ангиогенезата и лекарствената резистентност, са пряко свързани с хетерогенността на туморната микросреда (TME). Важен представител на клетъчните компоненти на TME са мезенхимните стволови клетки (MSC).

MSC притежават комплекс от уникални свойства, комбинацията от които ги правят изключително подходящи за клетъчна имунотерапия, както и за преносители на гени и лекарствени агенти за широк диапазон от заболявания. Ключови сред тях са: (1) относително неинвазивната процедура на изолация от различни тъкани; (2) способността да се размножават в култура без загуба на функционалност; (3) относителната им имунопривилегираност; (4) мощни имуномодулиращи функции; (5) висока ефективност на процедури за модификация с вирусни вектори и (6) способност за селективна миграция към увредени тъкани, тумори и метастази след системно приложение. Все още остава неизяснен въпросът дали наличието на MSC в микросредата на тумора и молекулярната връзка с резидентните клетки на TME може да доведе до туморно-супресивни ефекти или, алтернативно, да благоприятства растежа на тумора.

Целта на настоящия дисертационен труд е изследване на взаимодействието на човешки мезенхимни стволови клетки, изолирани от костен мозък и от мастна тъкан с туморни клетки от линиите PC-3, MCF-7 и SCC-9 в условия на дългосрочно *in vitro* култивиране. Резултатите показаха естествена антитуморна активност на MSC върху туморните линии PC-3 и SCC-9, както и протуморен ефект върху линията MCF-7. В допълнение на това MSC показаха вариабилност по отношение на ефекта върху изследваните туморни линии в зависимост както от тъканния си произход, така и от индивидуалните специфики на съответния донор.

## Цел и задачи

### Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е проследяване на взаимодействието на човешки мезенхимни стволови клетки, изолирани от костен мозък и от мастна тъкан с туморни клетки от линиите PC-3, MCF-7 и SCC-9 в условия на дългосрочно *in vitro* култивиране.

### Задачи

За постигане на целта бяха изпълнени следните задачи:

1. Изолиране, размножаване и характеризиране на човешки мезенхимни стволови клетки от костен мозък (BM-MSC) и от мастна тъкан (AT-MSC);
2. Изследване на пролиферацията на туморни клетки от линиите PC-3, MCF-7 и SCC-9, култивирани в условия на директен контакт с BM-MSC и AT-MSC или третирани с кондиционирана среда от BM-MSC и AT-MSC в продължение на 9 дни.
3. Изследване на виталността на туморни клетки от трите линии при еквивалентни експериментални условия.
4. Изследване на апоптозата на туморни клетки от трите линии при еквивалентни експериментални условия.

## Материали и методи

### Материали

Клетъчни култури - първични клетъчни култури от човешки костен мозък (BM-MSC) и мастна тъкан (AT-MSC); туморни клетъчни линии - PC-3 (ATCC), MCF-7 (ATCC), SCC-9 (ATCC)

Консумативи за клетъчно изолиране и култивиране, FACS, колориметрични изследвания, микроскопия.

### Методи

- Изолиране на човешки BM-MSC и AT-MSC
- Култивиране на адхерентни клетъчни култури
- Получаване на кондиционирана среда от MSC
- Остеогенна диференциация на MSC
- Адипогенна диференциация на MSC
- Оцветяване на клетки по метода *Von Kossa*
- Оцветяване на клетки с Oil Red O
- Оцветяване на клетки със CFSE
- Проточната цитометрия
- Ко-култивиране на туморни клетки с MSC за изследване на пролиферацията, виталността и апоптозата на туморните клетки.
- Изследване на клетъчната виталност с MTT тест
- Статистически анализ

## Резултати

### 1. Изолиране и култивиране на човешки BM-MSC и AT-MSC

Класическият подход за изолиране на MSC се основава на способността им спонтанно да адхерират към полистиреновата повърхност на лабораторните пластмасови съдове за клетъчно култивиране. За пробите от костен мозък, както и за тези от мастна тъкан бяха използвани методики с минимална обработка на тъканта, така че да получим *in vitro* първични култури от клетки в състояние възможно по-близко до естественото им. Костномозъчните аспирати бяха подложени на няколко последователни центрофугирания и промиване със среда DMEM с цел отстраняване на костните фрагменти и измиване на антикоагулиращия агент, така че в края на процедурата да бъде запазена само клетъчната фракция. Мастнотъканните проби бяха подложени на последователни механично и ензимно фрагментиране с последващо промиване с блокираща среда DMEM и филтриране с цел отстраняване на тъканните остатъци и селектиране на клетъчната фракция. В зависимост от изходния обем на пробата и обемът на получената клетъчна фракция, изолираните BM-MSC и AT-MSC бяха посявани в 3 до 6 ямки от 6-ямкова плака и култивирани при стандартни условия.

За целта на експериментите изолирахме BM-MSC от 14 донора на възраст от 39 до 73 години (4 жени, 10 мъже) и AT-MSC от 22 донора на възраст от 24 до 69 години (9 жени и 13 мъже).

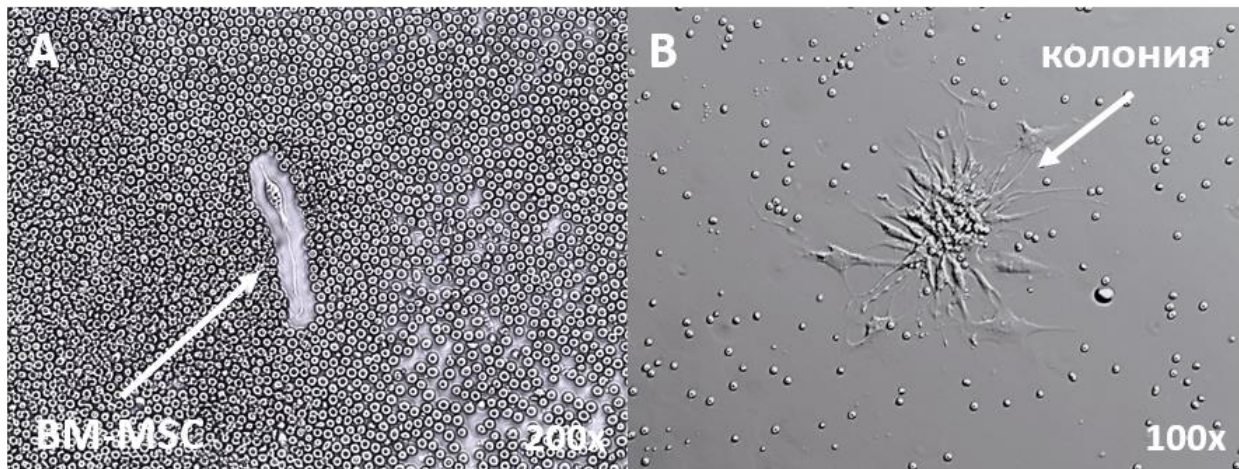
Таблица 1. Списък на донорите на MSC, използвани в експериментите.

	ПОЛ	ВЪЗРАСТ	AT-MSC	BM-MSC
Донор 1	м	24	+	-
Донор 2	м	26	+	-
Донор 3	ж	41	+	-
Донор 4	ж	28	+	-
Донор 5	м	51	+	-
Донор 6	м	35	+	-

Донор 7	м	39	+	+
Донор 8	м	52	+	-
Донор 9	ж	52	+	-
Донор 10	м	47	+	+
Донор 11	м	56	-	+
Донор 12	ж	63	+	+
Донор 13	ж	62	+	+
Донор 14	ж	69	+	-
Донор 15	м	?	+	+
Донор 16	м	34	+	-
Донор 17	ж	?	+	-
Донор 18	м	65	+	+
Донор 19	ж	58	+	-
Донор 20	ж	73	+	-
Донор 21	м	50	+	+
Донор 22	м	48	+	+
Донор 23	м	?	+	+
Донор 24	м	73	-	+
Донор 25	м	?	-	-
Донор 26	м	57	-	+
Донор 27	ж	63	-	+
Донор 28	ж	?	-	+
<b>Общо</b>			22	14



48 h след изолирането на клетките културалната им среда беше сменяна и на дъното на ямките можеха да се наблюдават светли зони, без еритроцити, с единични дребни фибробластоподобни клетки с фина, прозрачна цитоплазма (Фигура 1, А). След още 3-5 дни беше наблюдавано увеличаване на броя вретеновидни клетки и постепенно формиране на колонии от такива (Фигура 1, В), до достигане на субконфлуентност около 21-ви ден за BM-MSC и около 14-ти ден за AT-MSC.



Фигура 1. Светлинно-микроскопски снимки на единична BM-MSC, заобиколена от еритроцити, 48 h след изолирането (А) и колония от BM-MSC, заобиколена от единични еритроцити, 7 дни след изолирането (В).

Клетките бяха пасажирани с разреждане в съотношение 1:3 и при достигане на 3-ти/4-ти пасаж бяха характеризирани по минималните критерии на ISCT<sup>1</sup>, които изискват клетките да бъдат (1) адхезивни към пластмасова повърхност, (2) да притежават остеогенен, адипогенен и хондрогенен трилинеен потенциал за диференциация, (3) да са положителни (> 95%) и отрицателни (<2%) за панел от мембранны антигени. Положителните маркери за човешки MSC включват CD73 (присъства също в лимфоцитите, ендотелните клетки, гладките мускулни клетки и фибробластите), CD90 (присъства и в хематопоетични стволови клетки, ендотелни клетки, неврони и фибробласти) и CD105 (открива се също и върху ендотелни клетки, моноцити, хематопоетични прогенитори и фибробласти), HLA-ABC (експресира се върху повърхността на всички ядрени клетки)<sup>2</sup>. Отрицателните маркери включват CD34 (присъстващ върху хематопоетични прогенитори и ендотелни клетки), CD45 (панлевкоцитен маркер), CD14 или CD11b (открива се върху моноцити и

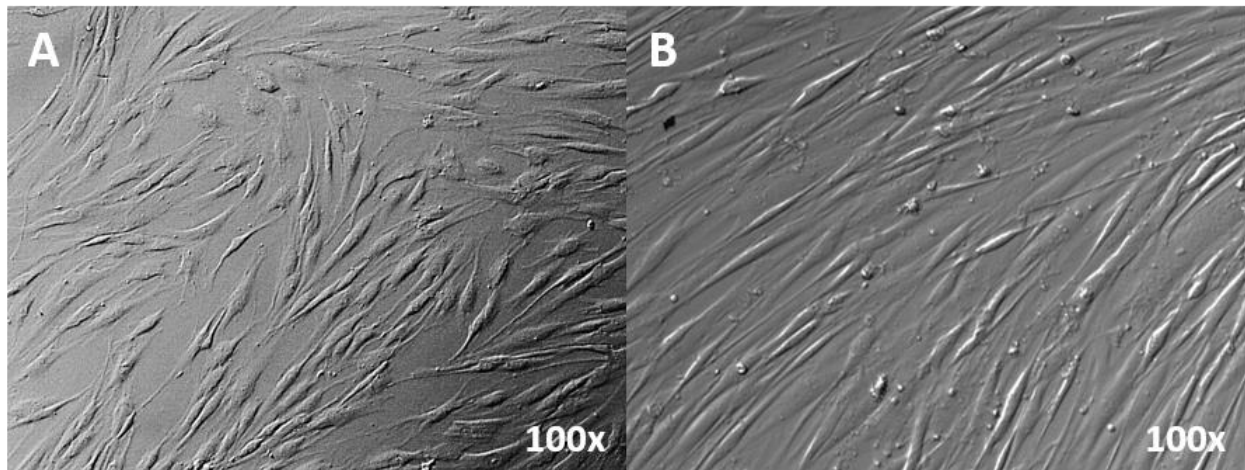
макрофаги), CD79- $\alpha$  или CD19 (B клетки) и HLA-DR (присъства в макрофаги, B клетки и дендритни клетки)<sup>1-3</sup>.

## 2. Фенотипна характеристика на получените първични култури BM-MSC и AT-MSC

Липсата на специфични маркери за селекция на изолираните от тъканни проби MSC е причина получените първични култури да са с хетерогенен клетъчен състав. С увеличаване на времето за култивиране и пасажирането, неприлепналите клетки и адхериралите, но непролифериращи клетки отпадат като се счита, че на трети пасаж културите придобиват сравнително хомогенен състав с преобладаващи MSC. Поради тези причини изолираните от нас BM-MSC и AT-MSC бяха характеризирани след достигането на трети пасаж (времето прекарано в култура е между 1 и 3 месеца).

### 2.1. Морфология

При достигане на конфлуентност клетките от получените първични култури BM-MSC (Фигура 2, А) и AT-MSC (Фигура 2, В) придобиваха характерната удължена вретеновидна, фибробластоподобна форма с фина, слабо гранулирана цитоплазма.



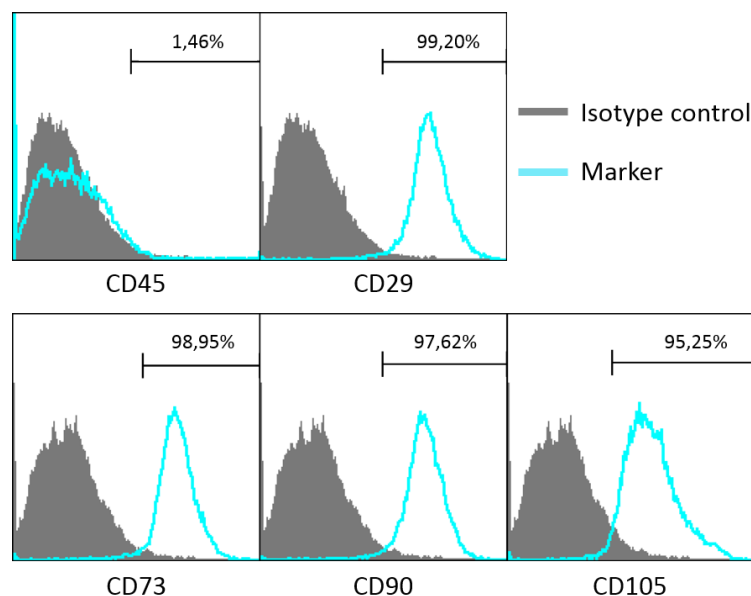
Фигура 2. Светлинно-микроскопска снимка на (А) първична субконфлуентна BM-MSC култура и (В) конфлуентна първична AT-MSC култура.

## 2.2. Характеристика на BM-MSC и AT-MSC чрез флоуцитометричен анализ на повърхностни маркери

След достигане на трети пасаж получените първични клетъчни култури MSC бяха фенотипизирани по минималния панел от маркери на ISCT, приет през 2006 година<sup>1</sup>, който изисква над 95% от клетките да бъдат позитивни за CD73, CD90 и CD105 като същевременно са негативни (<2%) за CD45<sup>4</sup>. В допълнение клетките бяха изследвани и за присъствие на маркера CD29. Ензимът Ecto-5-nucleotidase (CD73)<sup>5</sup>, гликопротеинът THY-1 (CD90)<sup>6</sup>, интегрин  $\beta$ 1(CD29)<sup>7</sup> и ендоглинът (CD105)<sup>8</sup> се експресират в множество типове клетки в организма, но комбинираното им наличие едновременно с отсъствието на панлевкоцитния маркер CD45<sup>9</sup> се приема за сигурен критерий за това, дадена популация от човешки клетки да бъде дефинирана като MSC<sup>10</sup>. Една от получените първични клетъчни култури AT-MSC беше изследвана по разширен панел от повърхностни маркери включващ CD29(+), CD34(-), CD45(-), CD73(+), CD90(+), CD105(+), HLA-ABC(+) и HLA-DR(-). Анализираните 6 проби BM-MSC и 8 проби AT-MSC показаха съответствие с минималните критерии на ISCT и данните от изследването са представени на Фигури 3 и 4 и Таблици 2 и 3.

Таблица 2. Фенотипна характеристика на BM-MSC, позитивни по маркери от минималния панел за характеристика на MSC.

ПОВЪРХНОСТНИ МАРКЕРИ НА BM-MSC					
	CD45	CD29	CD73	CD90	CD105
AVERAGE	1,46%	99,2%	98,95%	97,62%	95,25%
$\pm$ SD	0,64	0,32	0,55	2,21	8,21
N	4	6	6	6	5

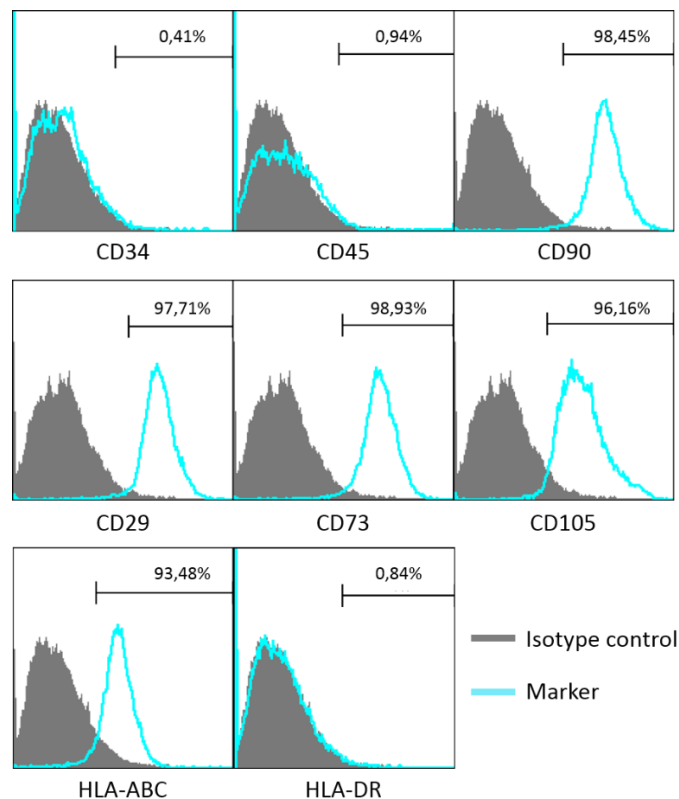


Фигура 3. Репрезентативни еднопараметрични хистограми на изследваните маркери върху BM-MSC, демонстриращи липса на експресия на CD45 (<2%) и висока експресия (>95%) на CD29, CD73, CD90 и CD105. Изотипна контрола – плътно сиво, изследван маркер – светлосиня линия.

Таблица 3. Фенотипна характеристика на AT-MSC, позитивни по маркери от панела за характеристика на MSC.

#### ПОВЪРХНОСТНИ МАРКЕРИ НА AT-MSC

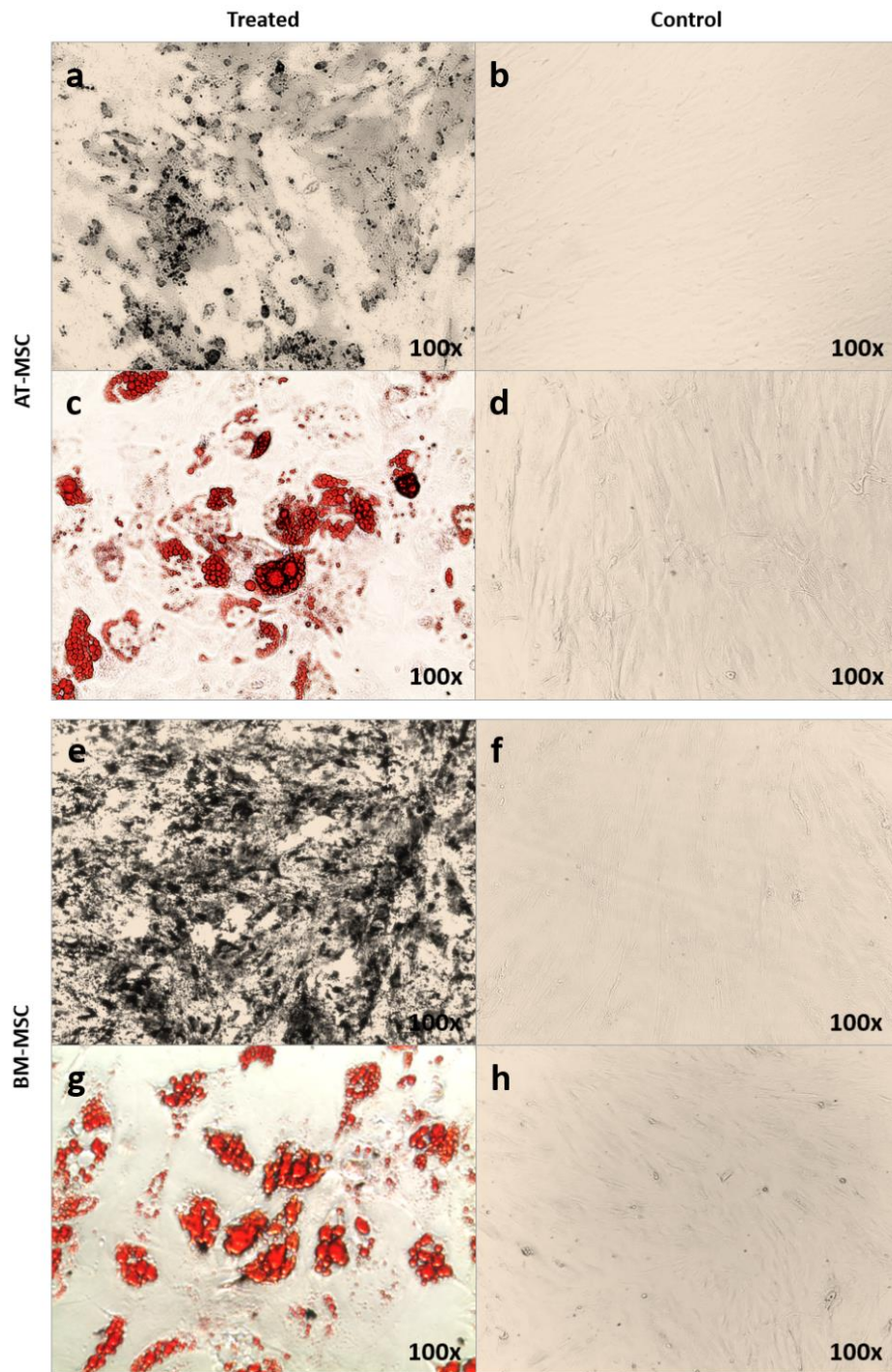
	CD45	CD29	CD73	CD90	CD105	CD34	HLA-ABC	HLA-DR
AVERAGE	0,94%	97,71%	98,93%	98,45%	96,16%	0,41%	93,48%	0,84%
±SD	0,17	0,93	0,96	1,99	6,05	-	-	-
N	3	3	7	8	8	1	1	1



Фигура 4. Репрезентативни еднопараметрични хистограми на изследваните маркери върху AT-MSC, демонстриращи липса на експресия (<2%) на CD34, CD45 и HLA-DR и висока експресия (>95%) на CD29, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC. Изотипна контрола – плътно сиво, изследван маркер – светлосиня линия.

### 2.3. Диференциация на MSC

Третата стъпка от характеризирането на получените от нас първични клетъчни култури MSC беше доказването на способността им за насочено диференциране в остеобласти и адипоцити. След 21-дневно культивиране в среди, съдържащи специфични фактори за двата типа диференциация, клетките бяха оцветени по метода на Von Kossa за доказване на остеогенна диференциация и с Oil Red O за адипогенна диференциация. Изследваните линии BM-MSC и AT-MSC показаха успешно диференциране на третираните клетки, изразяващо се както в съществена промяна в морфологията на клетките, така и в черно-кафявото оцветяване на натрупаните калциеви отлагания в междуклетъчните пространства на диференцираните остеобласти (Фигура 5 а, е) и в наситено червеното оцветяване на мастните вакуоли в диференцираните адипоцити (Фигура 5 с, г).

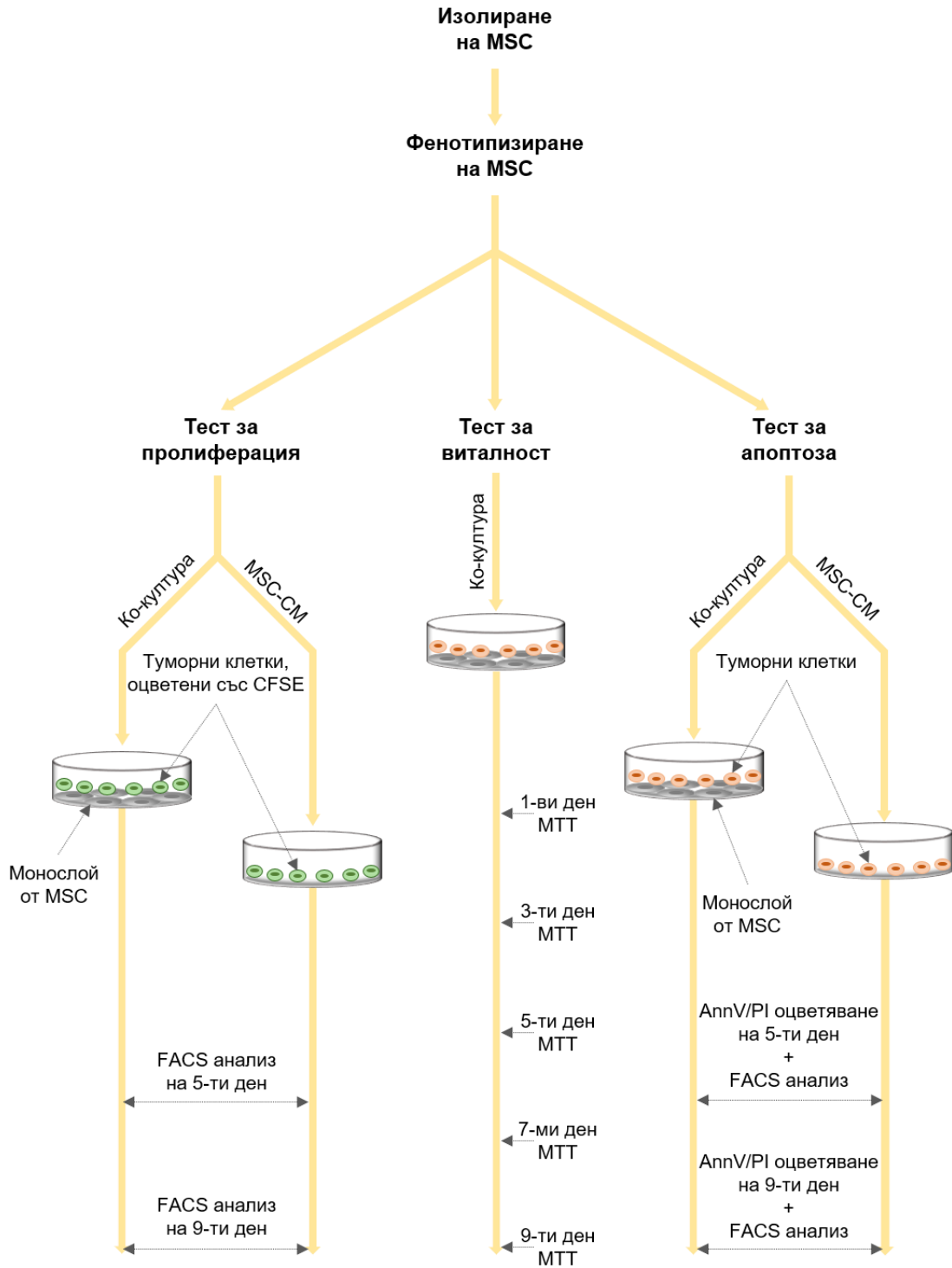


Фигура 5. Светлинно-микроскопски снимки на насочено-диференцирани AT-MSC и BM-MSC. (a), (e) – оцветени в кафяво-черно калциеви натрупвания (Von Kossa) в интрацелуларните пространства; (c), (g) – оцветени в червено мастни вакуоли (Oil Red O); (b), (d), (f), (h) – контролни нетретиранни клетки със съответните оцветявания.

### 3. Изследване на основни жизнени параметри на туморни клетки от линията PC-3 след продължително взаимодействие с MSC

MSC са ключови участници в тъканната хомеостаза, които се активират при възникване на тъканна увреда, възпаление и злокачествена трансформация на клетки. В резултат на това MSC секретират множество растежни фактори, цитокини и други биоактивни молекули, които допринасят за техните противовъзпалителни и имуномодулиращи свойства. През последните години се наблюдава значителен интерес към използването на MSC като носители за транспорт на лекарства, протеини и други терапевтични агенти с антитуморна активност, поради имунологичната им привилегированост и естествената им способност за миграция към тумори и интеграция в ТМЕ.

Тъй като основните характеристики на малигнените клетки са ускорената пролиферация, повишена метаболитна активност и избягване от апоптоза, в настоящата работа бяха избрани за проследяване именно тези жизнени параметри. Туморни клетки от три клетъчни линии с различен произход и цитологична характеристика бяха поставени в условия на взаимодействие с MSC от различни източници. Натрупаните данни от подобен тип *in vitro* изследвания показват резултати за взаимодействие от вида MSC-туморни клетки с продължителност не повече от 72 часа. За безопасното прилагане на клетъчно-базирани терапии безспорно е необходимо изследване на този тип междуклетъчни взаимодействия за по-продължителен период от време. За целта бяха изолирани MSC от костен мозък и от мастна тъкан, след което клетките бяха характеризирани и намножени, така че да бъдат посяти в концентрация, необходима за формиране на монослой. Успоредно с това бяха намножавани клетки от трите туморни линии, така че да бъдат в необходимото количество и в експоненциална фаза на растеж в момента на готовност на монослоя от MSC. При наличие на гореописаните условия туморните клетки бяха посявани върху подготовения монослой MSC с цел да бъде осигурен директен контакт на всяка туморна клетка с MSC. За изследване на паракринните взаимодействия еквивалентен брой туморни клетки бяха третираны със свежа кондиционирана среда, събирана от монослой MSC (Фигура 6).



Фигура 6. Схематично представяне на проведените експерименти за проследяване на основни жизнени параметри на туморните клетки. Зелено – туморни клетки, предварително оцветени със CFSE; оранжево - нативни туморни клетки; сиво – монослой от MSC.



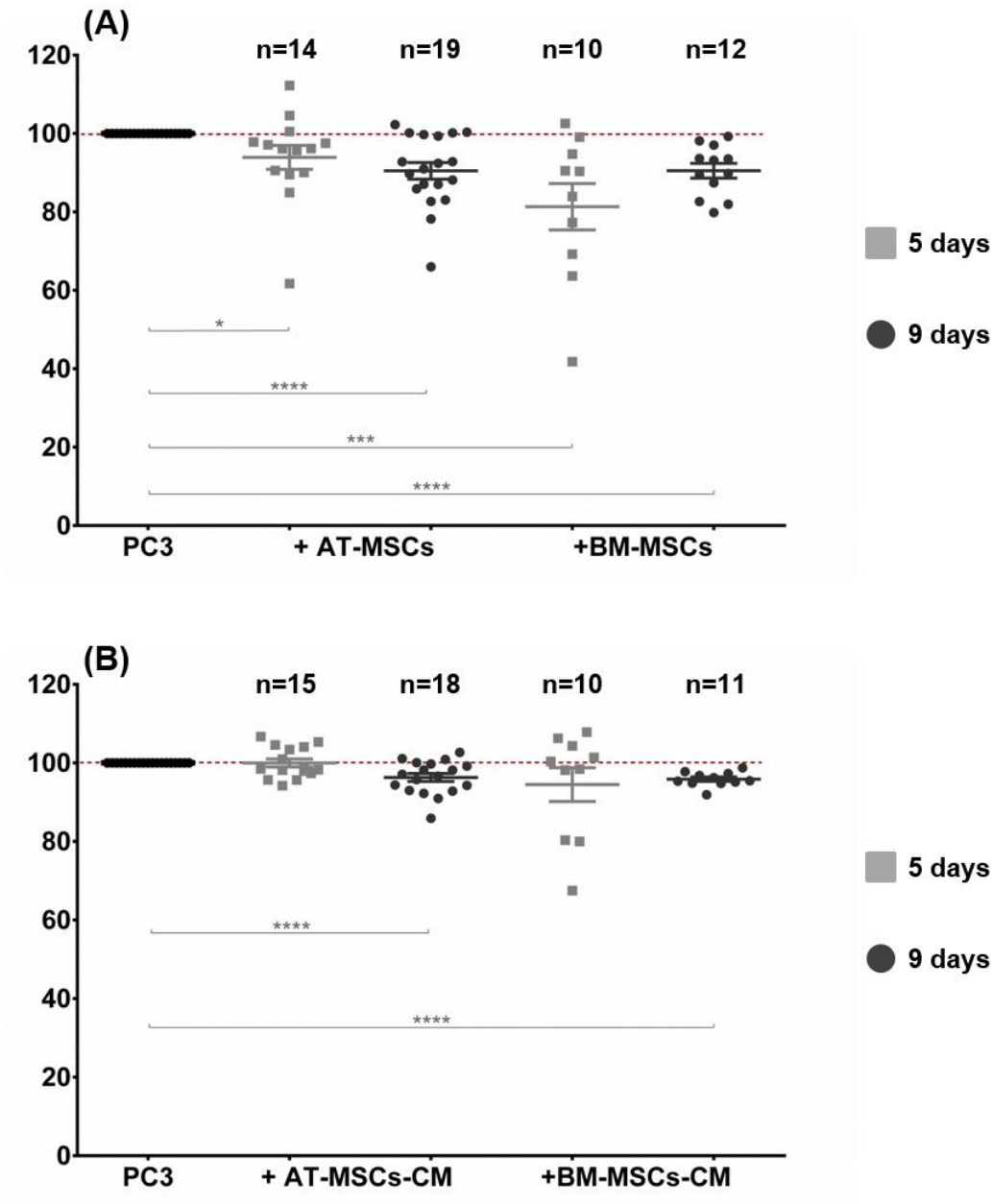
В експериментите за изследване на пролиферацията на туморните клетки, те биваха предварително оцветявани със CFSE. В останалите експерименти, включващи изследване на виталност и апоптоза, туморните клетки бяха оцветявани със съответните бои и флуорохром-конюгирани антитела непосредствено преди отчитане на резултатите от проведеното ко-култивиране или третиране с кондиционирана среда. Спецификата на този тип модел на комуникация туморна клетка – MSC, бързият растеж на туморните клетки и ограниченията, свързани с площта на съдовете за клетъчно култивиране детерминираха максимална продължителност на експериментите от 9 дни.

### **3.1. Изследване на пролиферацията на туморни клетки от линията PC-3 при дълготрайно контакт-опосредствано и паракринно взаимодействие с MSC *in vitro***

Епидемиологичните данни по отношение на злокачествените заболявания в световен мащаб показват, че ракът на простатата е приблизително 50% от всички новодиагностицирани ракови заболявания при мъжете и на пето място по смъртност<sup>11</sup>. PC-3 е една от най-често използваните простатно-карциномни клетъчни линии, представител на силно агресивна форма на заболяването, характеризирани като дребноклетъчен невроендокринен карцином (SCNC)<sup>12</sup>. За разлика от по-голямата част от аденокарциномите на простатата, които проявяват индолентен ход на клиничната картина, SCNC се проявява с локално напреднала неоплазия или отдалечени метастази, а пациентите умират в рамките на месеци от поставянето на диагнозата<sup>12,13</sup>. PC-3 клетките не експресират простатно-специфичния антиген PSA, както и андрогенен рецептор и съответно са андроген-независими<sup>14</sup>, а също така не експресират *p53* (*p53 null*)<sup>15</sup>.

За да се установи дали MSC влияят на пролиферацията на туморните клетки от линията PC-3 в *in vitro* условия, беше проведен CFSE тест. CFSE е витално багрило, което се свързва ковалентно с вътреклетъчните протеини и се разпределя по равно между дъщерните клетки при всяка митоза, генерирайки прогресивно намаляващ флуоресцентен сигнал. PC-3 клетки, предварително оцветени със CFSE, бяха култивирани върху монослой от AT-MSC, BM-MSC или с добавяне на MSC-CM и анализирани след 5 или 9 дни. FACS анализът показва достоверно намаляване на пролиферацията на PC-3 клетките, култивирани

в условия на директен контакт с MSC, в сравнение с контролните PC-3 клетки, култивирани самостоятелно (Фигура 7А).



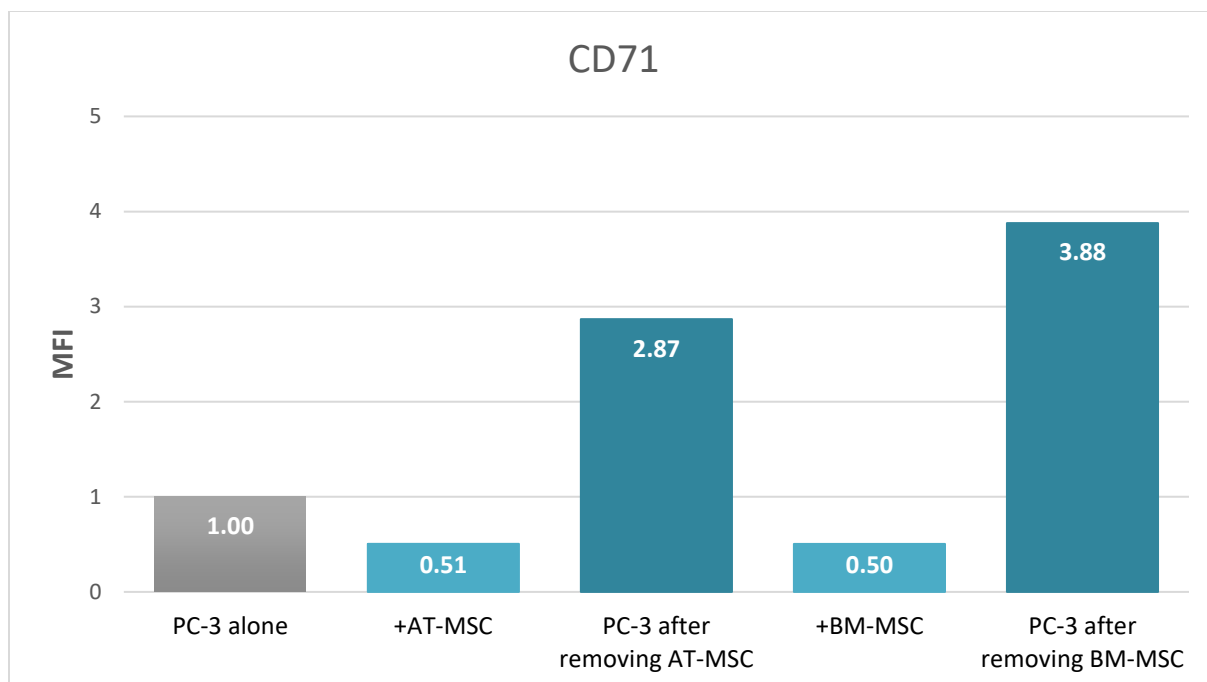
Фигура 7. Графично представяне на пролиферацията на PC-3 клетки, култивирани в контакт с MSC (A) и с добавяне на MSC-CM (B). Пролиферацията е измерена чрез CFSE-оцветяване и FACS-анализ и е изчислена като процент от пролиферацията на контролни клетки, култивирани самостоятелно (100%). Продължителност на култивиране: 5 дни (■); 9 дни (●). Статистически значими разлики, unpaired t-тест (\* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001).

Най-изразеното понижаване на пролиферацията беше наблюдавано при туморните клетки, ко-култивирани с VM-MSC за 5 дни (18.67%). PC-3 клетките, култивирани с AT-MSC, показаха 6.08% понижаване на пролиферацията на 5-ия ден. На 9-и ден беше наблюдавано приблизително еднакво забавяне на пролиферацията на PC-3 и в двете ко-култури, съответно с 9.52% в AT-MSC ко-културата и с 9.48% в VM-MSC ко-културата. За разлика от това, туморните клетки, култивирани с добавяне на MSC-СМ, не показаха достоверна промяна в пролиферацията на 5-ия ден (Фигура 7В). На 9-ти ден AT-MSC-СМ провокира понижаване на пролиферацията на PC-3 с 3.7%, а VM-MSC-СМ с 4.15%.

### **3.2. Изследване на пролиферативната активност на туморни клетки от линията PC-3, при дълготрайно контакт-опосредствано взаимодействие с MSC *in vitro***

Рецепторът за трансферин TfR1, известен също като CD71, участва в транспорта на желязо и съответно в поддържането на клетъчната хомеостаза, поради което е повсеместно експресиран с ниски нива в повечето нормални човешки тъкани<sup>16</sup>. Поради повишената пролиферативна активност на малигнените клетки, CD71 се експресираща върху мембраните им на нива няколко пъти по-високи от тези на нормалните клетки и неговата експресия може да бъде свързана с туморния стадий или прогресията на рака<sup>17</sup>.

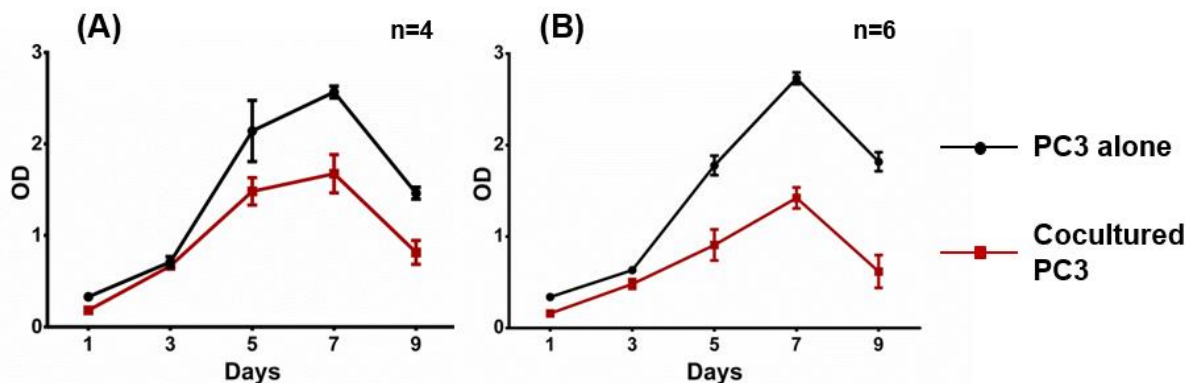
В допълнение на гореописаното изследване на пролиферацията на туморни клетки от линията PC-3 при продължително ко-култивиране с MSC, бяха изследвани нивата на експресия на CD71 в туморни клетки култивирани при еквивалентни условия посредством флуоцитометричен анализ. На 7-мия ден от началото на ко-култивирането, клетките бяха оцветени с анти тяло срещу CD71 и нивата на експресия бяха сравнявани с тези на контролни PC-3 клетки, култивирани сами. След това туморните клетки бяха прехвърляни в нови ямки, така че да бъдат освободени от въздействието на MSC и след 48 часа отново беше изследвана експресията на CD71. Резултатите показаха намаляване на експресията на CD71 при туморните клетки ко-култивирани с AT-MSC 0.51 пъти, а при ко-култивираните с VM-MSC 0.5 пъти (Фигура 8). За разлика от това, 2 дни след отстраняване на контакта с MSC беше наблюдавано неколкократно повишаване на експресията на CD71 в туморните клетки в сравнение с контролните клетки (2.87 пъти след премахване на AT-MSC и 3.88 пъти след премахване на VM-MSC).



Фигура 8. Графично представяне на средния интензитет на флуоресценция на CD71. Експресия на CD71 при контролни туморни клетки (сиво); туморните клетки, ко-култивирани с AT-MSC и с BM-MSC (светлосиньо); и експресия на CD71 при PC-3 клетките след отстраняване на контакта с MSC (тъмносиньо). Стойностите са нормализирани към експресията на туморни клетки, култивирани самостоятелно ( $n=1$ ).

### 3.3. Изследване на виталността на туморни клетки от линията PC-3, при дълготрайно контакт-опосредствано взаимодействие с MSC *in vitro*

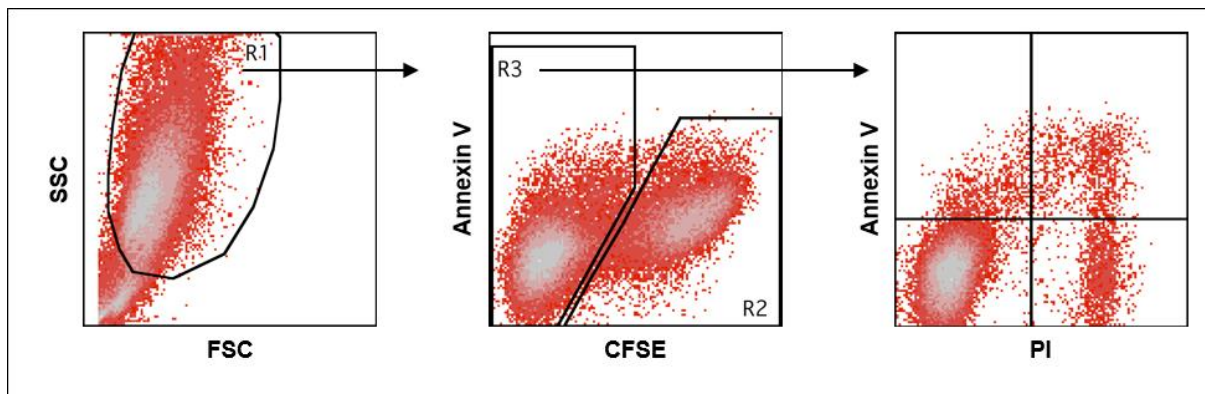
Туморните клетки от линията PC-3 бяха култивирани в условия на директен контакт с AT-MSC и с BM-MSC в продължение на 9 дни. Виталността на клетките беше отчитана с MTT тест на всеки 2 дни чрез измерване на абсорбцията на FLUOstar Optima microplate reader при 544 nm дължина на вълната. Значимо понижаване на виталността на PC-3 клетките беше наблюдавано след третия ден на ко-култивирането като на петия ден отчетената стойност (OD) на ко-култивираните с AT-MSC туморни клетки достигна 70% от стойността на абсорбцията на туморните клетки култивирани сами и тази тенденция се запази до приключване на експеримента (Фигура 9А,  $p<0.0001$ ). При туморните клетки ко-култивирани с BM-MSC, OD стойността достигна 51% от тази на контролните клетки и се запази така до 9-тия ден (Фигура 9В,  $p<0.0001$ ). Представените данни са от два независими експеримента с AT-MSC от 4 донора и BM-MSC от 6 донора.



Фигура 9. MSC индуцират значително потискане на виталността на PC-3. PC-3 клетки култивирани върху монослой от AT-MSC (A) и BM-MSC (B) в продължение на 9 дни. Клетъчната виталност е измервана чрез MTT тест на всеки 2 дни от ден 1 до ден 9. Статистически значими разлики, two-way ANOVA тест ( $p < 0.0001$ ).

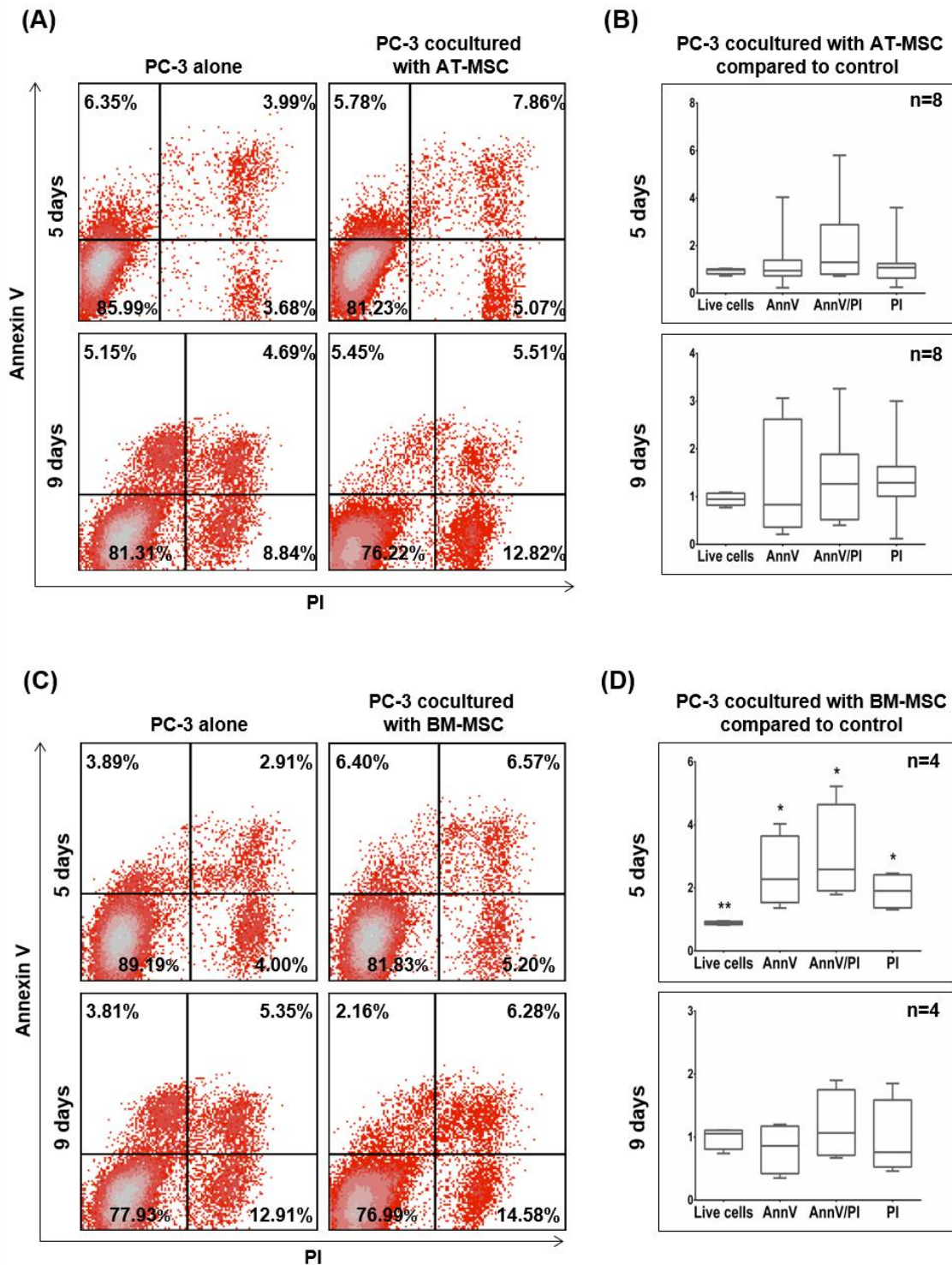
### 3.4. Изследване на апоптозата на туморни клетки от линията PC-3 при дълготрайно контакт-опосредствано и паракринно взаимодействие с MSC *in vitro*

Третият основен жизнен параметър, по който изследвахме туморните клетки от линията PC-3, поставени в условия на контакт-опосредствани или паракринни взаимодействия с MSC е апоптозата. Избягването от апоптоза е основен механизъм за оцеляване на туморните клетки при много ракови заболявания<sup>18</sup>. Нивата на апоптоза на PC-3 клетките бяха оценявани чрез комбинирано оцветяване с AnnexinV (AnnV) и пропидиев йодид (PI) и с последващ флоуцитометричен анализ като туморните клетки бяха култивирани в условия еквивалентни на тези от анализа на пролиферацията им (3.1). MSC бяха изключени от FACS-анализа, чрез предварително оцветяване със CFSE (Фигура 10).



Фигура 10. Представителни двупараметрови диаграми, демонстриращи дефинирането на PC-3 и MSC субпопулациите в ко-културите при анализа на апоптоза. R1 – клетки от ко-културата, R2 - CFSE позитивни клетки съответстващи на MSC субпопулацията, които се изключват от анализа; R3 – CFSE негативни клетки съответстващи на PC-3 субпопулацията, анализирани за апоптоза.

На 5-ия ден PC-3 клетките ко-култивирани с AT-MSC показаха тенденция за увеличаване на броя късно-апоптотични клетки (AnnV+/PI+), (Фигура 11B), в сравнение с туморните клетки, култивирани самостоятелно. На 9-ти ден беше наблюдавана подобна тенденция както с късно-апоптотичните (AnnV+/PI+), така и с некротичните (AnnV-/PI+) клетки, но не беше установена статистическа значимост. Фигура 11D представя апоптотичните нива на PC-3 клетки ко-култивирани с BM-MSC сравнени с контролните клетки. На 5-ия ден броят на ранно-апоптотичните (AnnV+/PI-) туморни клетки беше 1.64 пъти по-висок, късните апоптотични клетки бяха 2.26 пъти повече, а некротичните клетки бяха 1.3 пъти увеличени в сравнение с контролните PC-3 клетки. На 9-ти ден този ефект не беше запазен, въпреки че продължаваше да се наблюдава тенденцията за увеличаване на късно-апоптотичните и некротичните клетки.

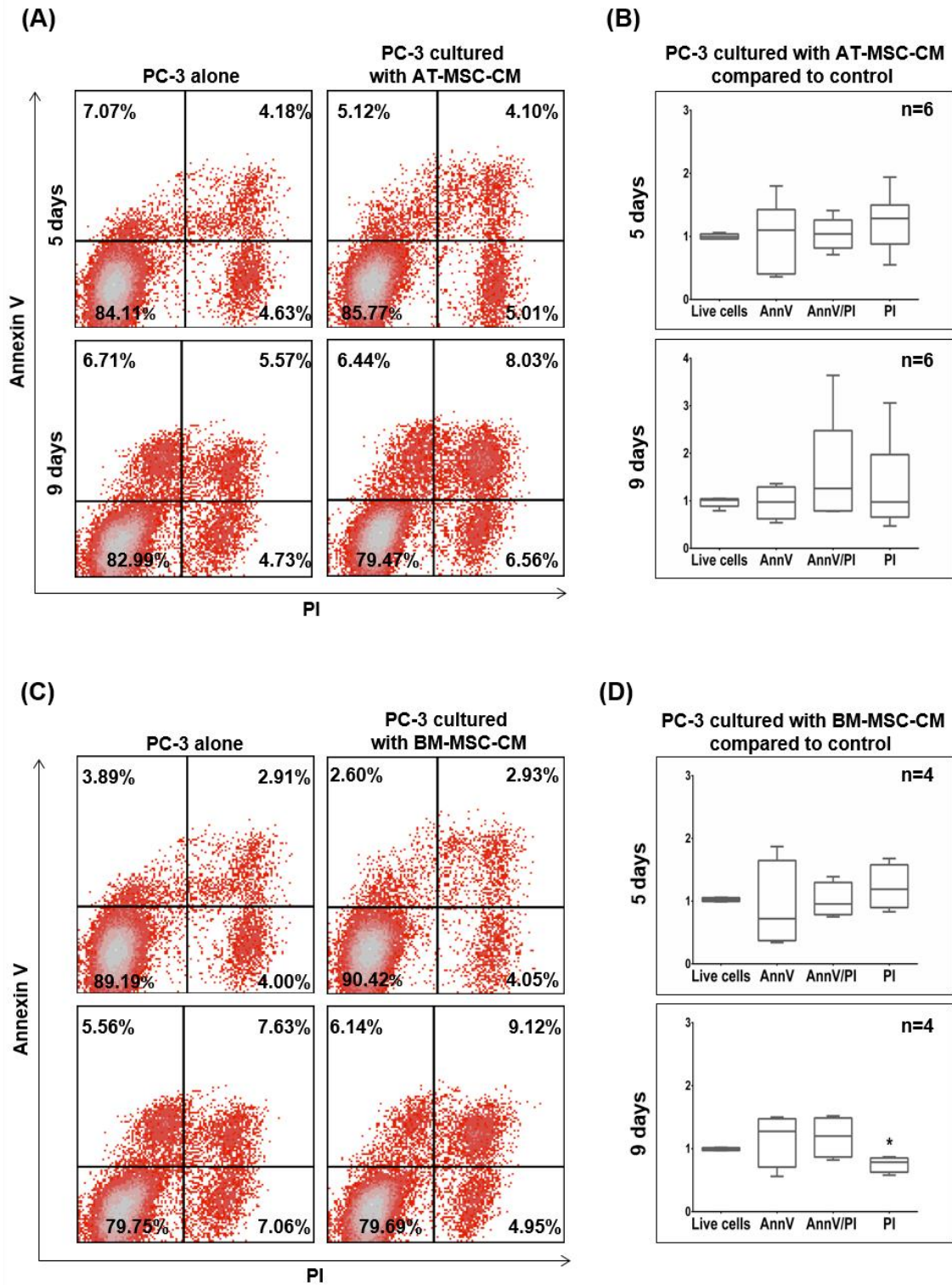


Фигура 11. Представителни двупараметрови диаграми на PC-3 клетки, ко-култивирани с AT-MSC (A) и BM-MSC (C), оцветени с AnnV и PI. Процентите отразяват броя клетки попадащи в съответния квадрант. Живи (AnnV-/PI-), ранно-апоптотични (AnnV+/PI-), късно-апоптотични

*(AnnV+/PI+) и некротични (AnnV-/PI+) ко-култивирани РС-3 клетки, представени в пъти разлика спрямо контролните клетки (B), (D). Статистически значими разлики, unpaired t-тест (медиана със стандартна грешка, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).*

На Фигура 12 са представени резултатите за нивата на апоптоза на РС-3 клетки култивирани с добавяне на MSC-СМ в продължение на 5 и 9 дни. При 5 дни продължителност на третирането не бяха отчетени статистически значими разлики в нивата на ранно-, късно-апоптотичните и некротичните клетки в сравнение с контролните клетки, култивирани с пълна среда DMEM. На 9-ти ден беше наблюдавана тенденция за увеличаване на броя късно-апоптотични туморни клетки третирани с AT-MSC-СМ както и за увеличаване на ранно- и късно-апоптотичните туморни клетки, третирани с BM-MSC-СМ.





Фигура 12. Представителни двупараметрови диаграми на PC-3 клетки, третирани с AT-MSC-CM (A) и BM-MSC-CM (C), оцветени с AnnV и PI. Процентите отразяват броя клетки попадащи в съответния квадрант. Живи (AnnV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), ранно-апоптотични (AnnV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), късно-

апоптотични ( $AnnV^+/PI^+$ ) и некротични ( $AnnV^-/PI^+$ ) ко-култивирани РС-3 клетки, представени в пъти разлика спрямо контролните клетки (B), (D). Статистически значими разлики, unpaired t-тест (медиана със стандартна грешка,  $* p < 0.05$ ).

### 3.5. Обобщение на взаимодействието на MSC с РС-3

Съвкупността от всички данни от изследването на основните жизнени параметри на клетки от простатно-карциномната линия РС-3 (пролиферация, виталност и апоптоза), култивирани в условия на директен контакт с MSC, показаха съществена антитуморна активност на MSC при 5-дневна продължителност на взаимодействието. При по-продължителен контакт антитуморния ефект постепенно отслабваше. За разлика от това, при изследването на паракринните взаимодействия беше установен по-слаб антитуморен ефект на MSC, но плавно повишаващ се с увеличаване на времето на третирането. Също така бяха установени разлики в активността на MSC в зависимост от техния източник като по-силно изразен антитуморен ефект по отношение на линията РС-3 беше проявен от VM-MSC. Данните от изследването на взаимодействието на MSC с клетки от линията РС-3 са публикувани през 2020 г.<sup>19</sup>.

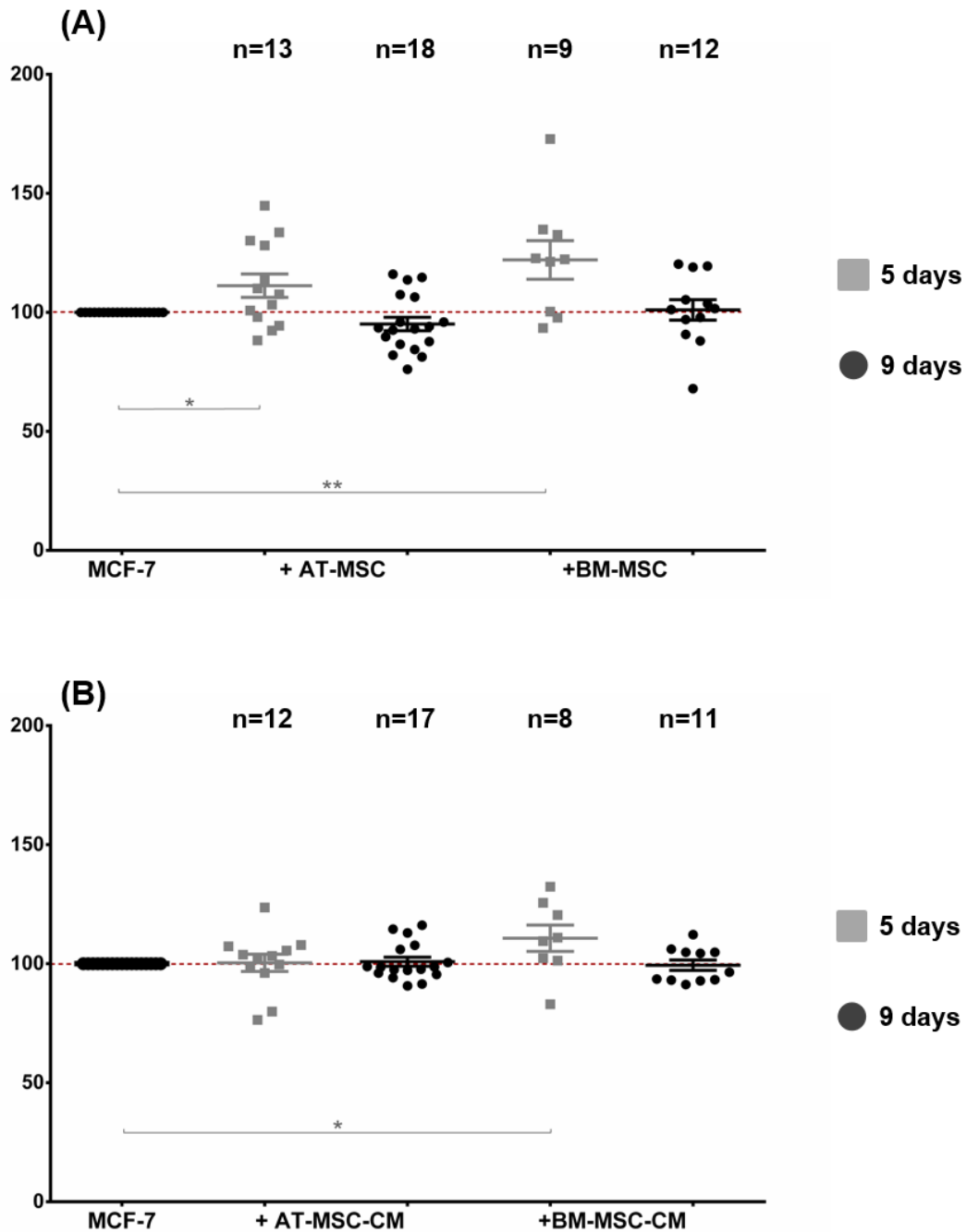
## 4. Изследване на основни жизнени параметри на туморни клетки от линията MCF-7 при продължително взаимодействие с MSC

MCF-7 е човешка аденокарциномна клетъчна линия, изолирана от рак на гърдата. MCF-7 клетките са много подходящи за *in vitro* изследвания, тъй като проявяват няколко характеристики, специфични за жлезистия епител на млечната жлеза като акумулирането на естроген, под формата на естрадиол в клетъчната цитоплазма посредством естрогеновия рецептор (ER). Всъщност това е първата изолирана хормон-зависима клетъчна линия от рак на гърдата и поради тази причина е широко използвана като модел за изследване на този тип злокачествено заболяване, включително взаимодействията MSC – туморни клетки<sup>20</sup>. В литературата са натрупани голямо количество данни, показващи повишаване на растежа, пролиферацията и миграцията на клетки от тази линия при взаимодействието им с MSC, както и трансформация на MCF-7 клетки от естроген-зависими в естроген-независими под въздействието на MSC<sup>21–25</sup>.

Това е и причината, поради която решихме да съпоставим данните от ефекта на нашите първични култури MSC върху линията MCF-7 със съществуващите до момента литературните данни. За целта използвахме модела на взаимодействия, използван и за линията PC-3, описан в предишния раздел.

#### **4.1. Изследване на пролиферацията на туморни клетки от линията MCF-7 при дълготрайно контакт-опосредствано и паракринно взаимодействие с MSC *in vitro***

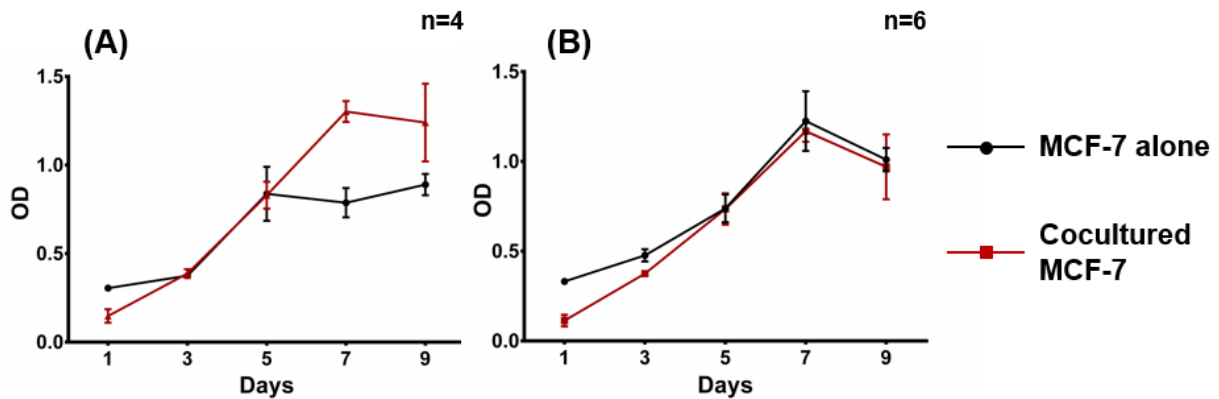
Резултатите от изследването на пролиферацията на туморни клетки от линията MCF-7 при 5-дневно контакт-опосредстваното взаимодействие с MSC показаха повишаване на пролиферацията на туморните клетки ко-култивирани с AT-MSC с 11.2%, а при ко-култивираните с BM-MSC – 22.1% (Фигура 13А). При 9 дни продължителност на ко-култивирането не беше отчетена статистически значима промяна в пролиферацията на клетките от линията MCF-7. Изследването на пролиферацията на MCF-7 клетки култивирани с добавяне на MSC-СМ показва повишаване на пролиферацията на туморните клетки с 10.7% при 5-дневно култивиране с BM-MSC-СМ (Фигура 13В). В останалите варианти на изследването не бяха установени статистически значими разлики в пролиферацията на третираните туморни клетки в сравнение с контролните нетретираните MCF-7 клетки.



Фигура 13. Графично представяне на пролиферацията на MCF-7 клетки, култивирани в контакт с MSC (A) и с добавяне на MSC-CM (B). Пролиферацията е измерена чрез CFSE-оцветяване и флуцитометричен анализ и е изчислена като процент от пролиферацията на контролни клетки, култивирани самостоятелно (100%). Продължителност на култивиране: 5 дни (■); 9 дни (●). Статистически значими разлики, unpaired t-тест (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

#### 4.2. Изследване на виталността на туморни клетки от линията MCF-7 при дълготрайно контакт-опосредствано взаимодействие с MSC *in vitro*

Виталността на туморните клетки от линията MCF-7, култивирани върху монослой от AT-MSC и BM-MSC в продължение на 9 дни беше изследвана посредством MTT тест провеждан на всеки 2 дни. Отчетените OD-стойности бяха сравнявани с тези на контролни туморни клетки, култивирани самостоятелно. При MCF-7 клетките култивирани върху AT-MSC първоначално (между 1-ви и 3-ти ден) беше установено понижаване на виталността, след което настъпваше изравняване в стойностите на третираните и нетретираните клетки (Фигура 14A). След 5-ти ден беше наблюдавано повишаване на виталността на кокултивираните туморни клетки като на 7-ми ден тя беше повишена с 39%, а на 9-ти ден с 28% (\*\*\*\* $p < 0,0001$ , Two-way ANOVA тест). При туморните клетки култивирани върху монослой от BM-MSC също беше наблюдавано първоначално понижаване на виталността, но след 3-ти ден стойностите постепенно се изравняваха и тенденцията се запазваше до приключване на експеримента (Фигура 14B).

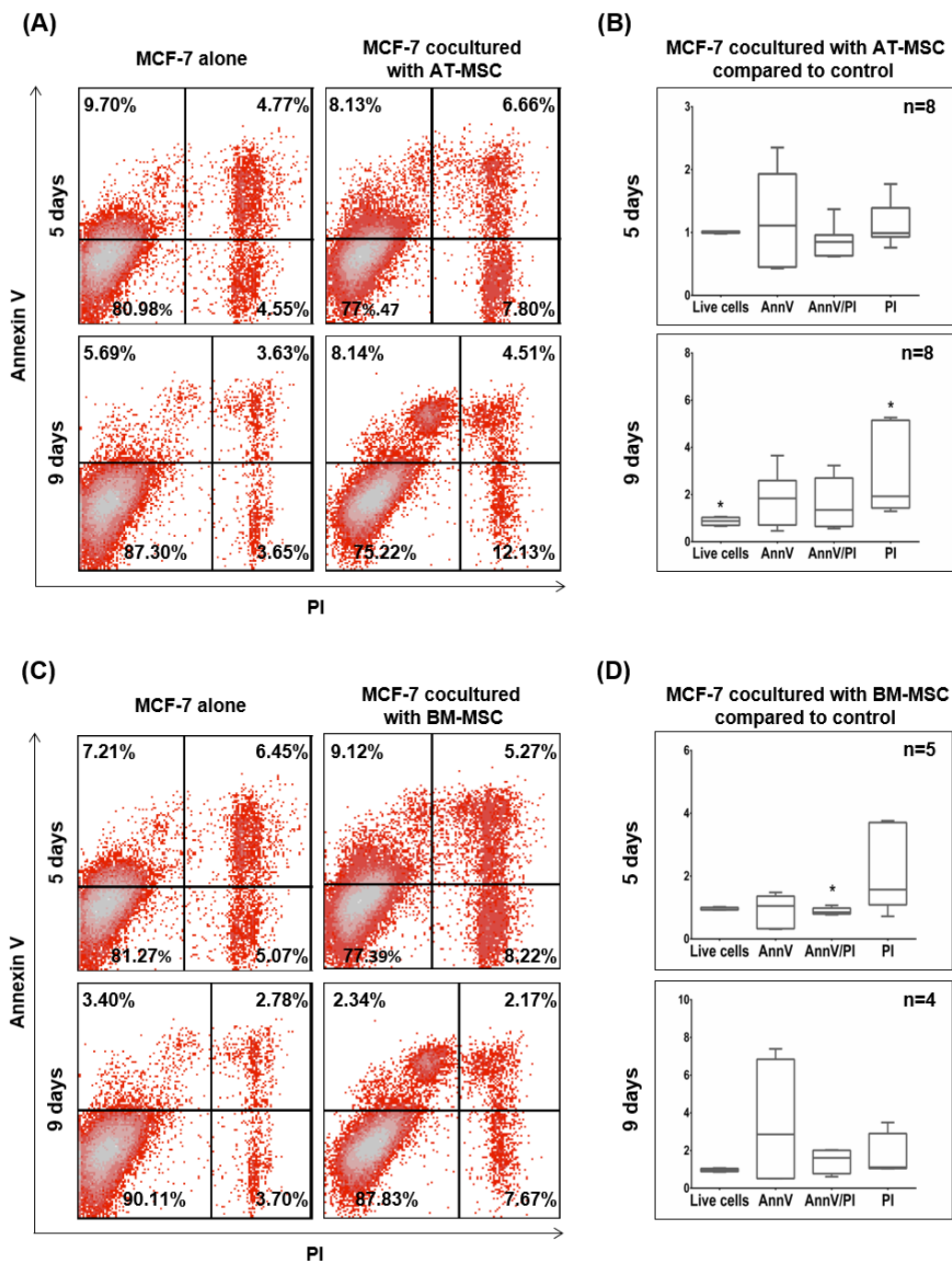


Фигура 14. AT-MSC индуцират значително повишаване на виталността на MCF-7 при продължително контакт-опосредствано взаимодействие (A). BM-MSC не променят виталността на MCF-7 при същите условия (B). Клетъчната виталност е измервана чрез MTT тест на всеки 2 дни от ден 1 до ден 9. Статистически значими разлики, Two-way ANOVA тест ( $p < 0.0001$ ).

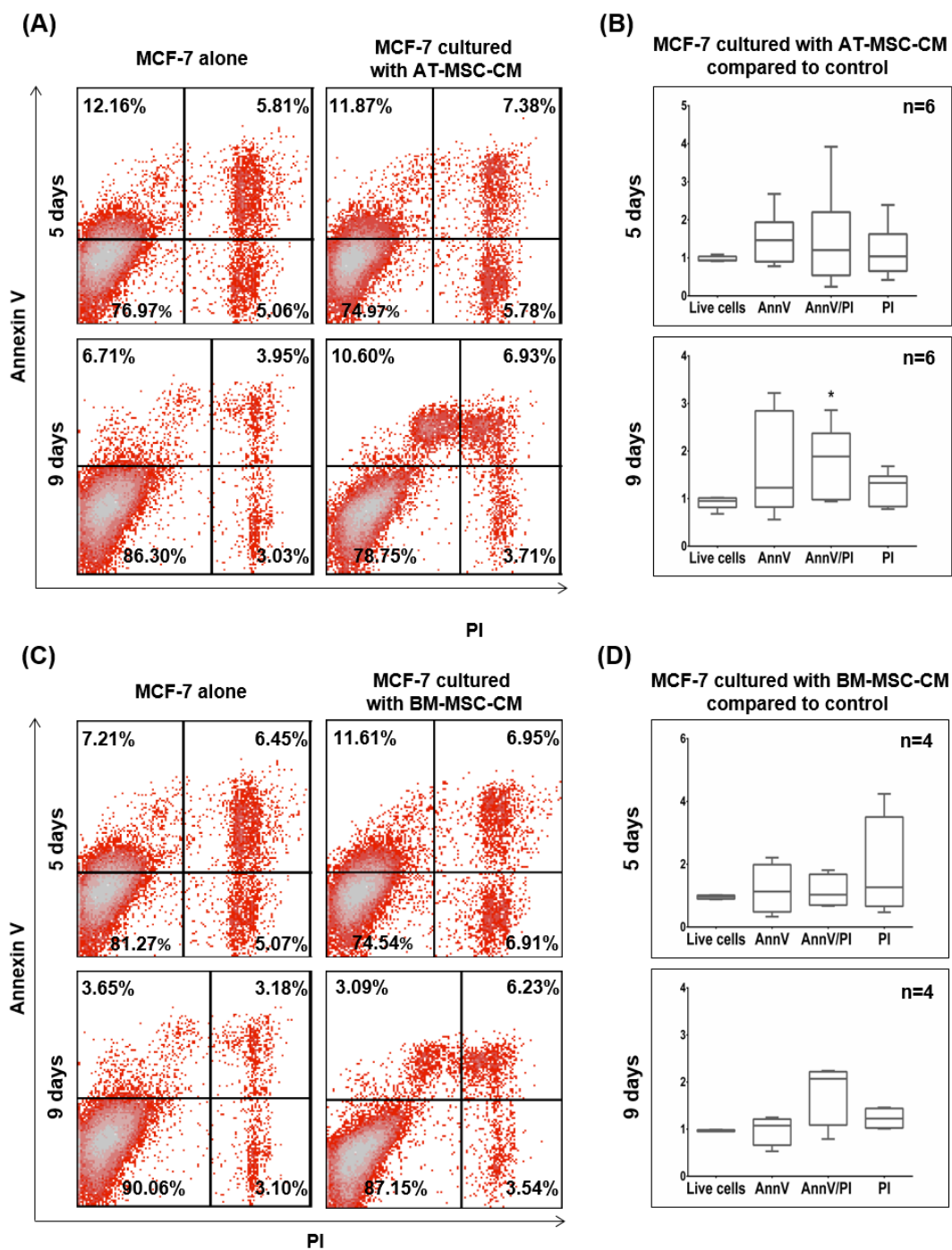
#### **4.3. Изследване на апоптозата на туморни клетки от линията MCF-7 при дълготрайно контакт-опосредствано и паракринно взаимодействие с MSC *in vitro***

Отчитането на промени в апоптотичните нива на туморни клетки от линията MCF-7 беше проведено при експериментални условия, еквивалентни на тези при отчитането на пролиферацията им. Получените резултати не показаха статистически значими разлики в броя на ранно-, късно-апоптотичните и некротичните MCF-7 клетки ко-култивирани с АТ-МSC за 5 дни. При 9-дневното култивиране беше установено 2.93 пъти повишаване на некротичните ко-култивирани туморни клетки ( $p < 0.05$ , unpaired t тест), без промяна на ранно- и късно-апоптотичните (Фигура 15B). При MCF-7 клетките ко-култивирани с ВМ-МSC за 5 дни се наблюдаваше 0.88 пъти понижаване на късно-апоптотичните клетки ( $p < 0.05$ , unpaired t тест), както и тенденция за повишаване на некротичните клетки. За 9-дни контакт ВМ-МSC не индуцираха статистически значими промени в апоптотичните нива на туморни клетки от линията MCF-7 (Фигура 15D).

Изследването на паракринния ефект на MSC-СМ върху апоптозата на MCF-7 клетки не показва статистически значими промени в броя на ранно-, късно-апоптотичните и некротичните туморни клетки в сравнение с контролните клетки нито за 5-, нито за 9-дневна продължителност на третирането (Фигура 16B, D).



Фигура 15. Представителни двупараметрови диаграми на MCF-7 клетки, ко-култивирани с AT-MSC (A) и BM-MSC (C), оцветени с AnnV и PI. Процентите отразяват броя клетки, попадащи в съответния квадрант. Живи (AnnV-/PI-), рано-апоптотични (AnnV+/PI-), късно-апоптотични (AnnV+/PI+) и некротични (AnnV-/PI+) ко-култивирани MCF-7 клетки, представени в пъти разлика спрямо контролните клетки (B), (D). Статистически значими разлики, unpaired t-тест (медиана със стандартна грешка, \*  $p < 0.05$ ).



Фигура 16. Представителни двупараметрови диаграми на MCF-7 клетки третирани с AT-MSC-CM (A) и BM-MSC-CM (B), оцветени с AnnV и PI. Процентите отразяват броя клетки, попадащи в съответния квадрант. Живи (AnnV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), ранно-апоптотични (AnnV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), късно-апоптотични (AnnV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) и некротични (AnnV<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>) ко-култивирани MCF-7 клетки, представени в пъти разлика спрямо контролните клетки (C), (D).



#### **4.4. Обобщение**

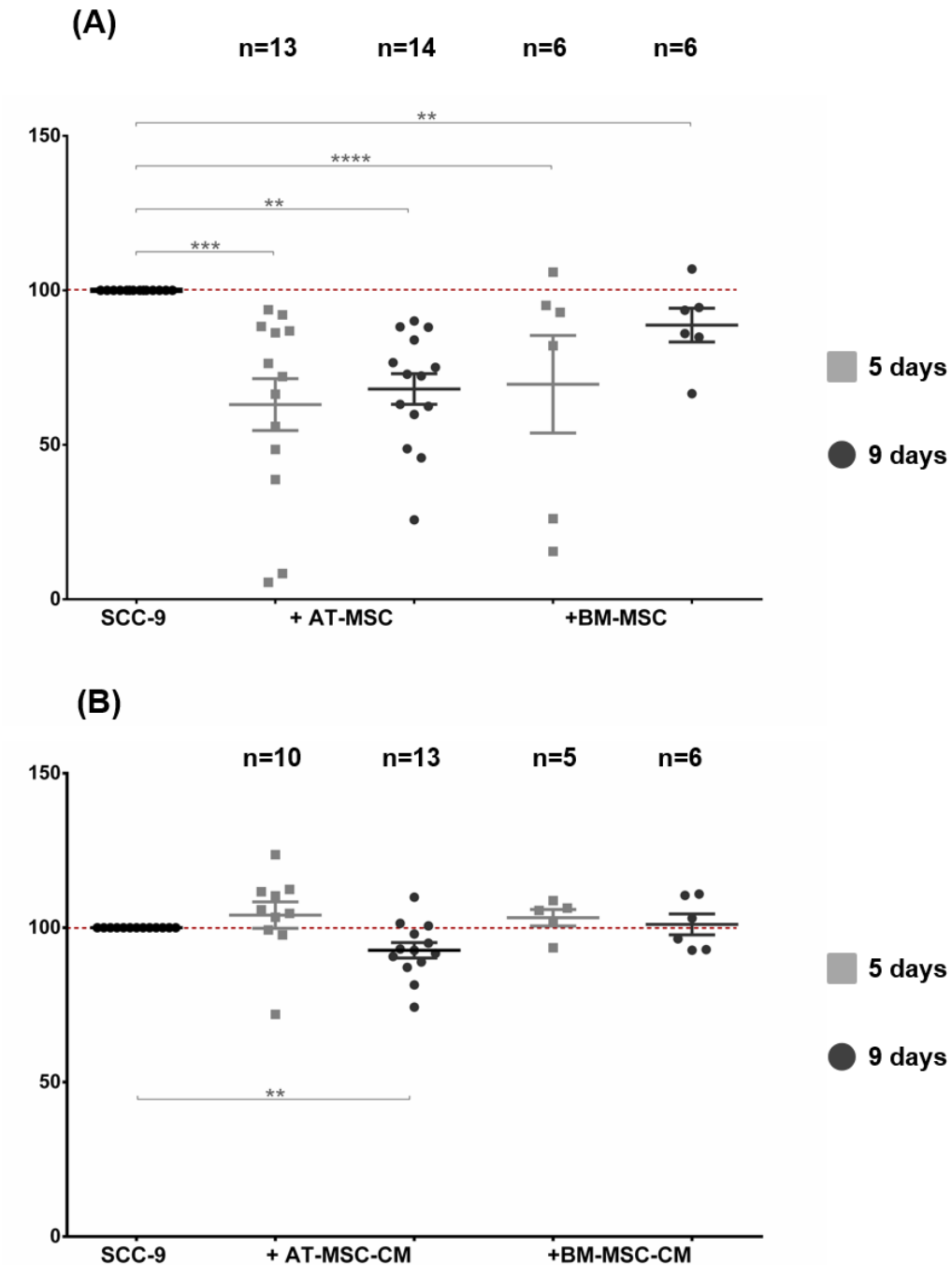
Обобщените данни от анализите на промените в пролиферацията, виталността и апоптозата на клетки от аденокарциномната линия MCF-7 при дългосрочно взаимодействие с MSC показаха протуморна активност на MSC по отношение на съответните туморни клетки. Повишената пролиферация в комбинация с понижени нива на апоптоза бяха най-изразени при 5-дневен контакт с BM-MSC, след което ефектът постепенно отслабваше. Същевременно бяха установени разлики в степента на оказаната протуморна активност, в зависимост от източника на MSC, а именно по-висока степен на протуморна активност проявяваха BM-MSC.

#### **5. Изследване на основни жизнени параметри на туморни клетки от линията SCC-9 при продължително взаимодействие с MSC**

Ракът на устната кухина е най-често срещания тип рак на главата и шията и високият процент на заболяемост и смъртност е тясно свързан с процесите на ангиогенеза и туморни метастази<sup>11,26</sup>. SCC-9 е епителна туморна линия с адхерентен растеж, с произход плоскоклетъчен карцином на езика на 25 годишен мъж. Клетките от тази линия са отрицателни за WT *p53*<sup>27</sup> и експресират епидермални кератини.

##### **5.1. Изследване на пролиферацията на туморни клетки от линията SCC-9 при дълготрайно контакт-опосредствано и паракринно взаимодействие с MSC *in vitro***

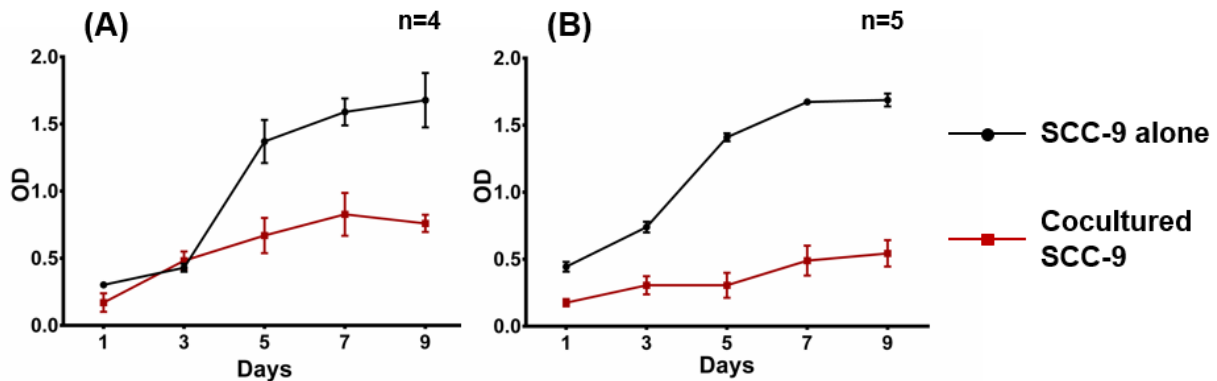
Анализът на данните от изследването на пролиферацията на туморни клетки от линията SCC-9 култивирани в условия на директен контакт с MSC показаха значително понижаване на пролиферацията на SCC-9 във всички варианти на експерименталната постановка (Фигура 17А). Най-изразен ефект на забавяне на пролиферацията беше установен при ко-култивиране с AT-MSC за 5 дни (36.97%). При 9-дневно ко-култивиране с AT-MSC се наблюдаваше 31.93% понижаване, а при ко-култивиране с BM-MSC беше отчетено понижаване с 30.38% за 5 дни и 11.24% за 9 дни. При изследване на паракринния ефект на MSC върху пролиферацията на SCC-9 клетки чрез третиране с MSC-СМ беше установено статистически значимо, макар и по-слабо, забавяне на пролиферацията единствено при клетки култивирани с AT-MSC-СМ за 9 дни (7.31%), (Фигура 17В).



Фигура 17. Графично представяне на пролиферацията на SCC-9 клетки, култивирани в контакт с MSC (A) и с добавяне на MSC-CM (B). Пролиферацията е измерена чрез CFSE-оцветяване и флуцитометричен анализ и е изчислена като процент от пролиферацията на контролни клетки, култивирани самостоятелно (100%). Продължителност на култивиране: 5 дни (■); 9 дни (●). Статистически значими разлики, unpaired t-тест (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

## 5.2. Изследване на виталността на туморни клетки от линията SCC-9, при дълготрайно контакт-опосредствано взаимодействие с MSC *in vitro*

Виталността на SCC-9 клетки, култивирани в условия на директен контакт с MSC беше изследвана паралелно с виталността на клетки от останалите две туморни линии посредством МТТ тест. Отчитането на абсорбцията беше осъществявано на всеки 2 дни и стойностите бяха сравнявани с тези на контролни SCC-9 клетки, култивирани самостоятелно. Анализът на резултатите показва значително понижаване на клетъчната виталност на туморните клетки като при тези ко-култивирани с АТ-МСС (Фигура 18А) понижаването беше установено след 3-ти ден и на 9-ти ден достигна 45% от виталността на контролните клетки (\*\*\*\* $p < 0.0001$ , Two-way ANOVA тест). На Фигура 18В са представени OD-стойностите на SCC-9 клетки култивирани върху монослой от ВМ-МСС. При тях беше наблюдавано изразено понижаване на виталността още от ден 1 като на ден 9 понижаването достигна 32% от виталността на контролните клетки (\*\*\*\* $p < 0.0001$ , Two-way ANOVA тест).

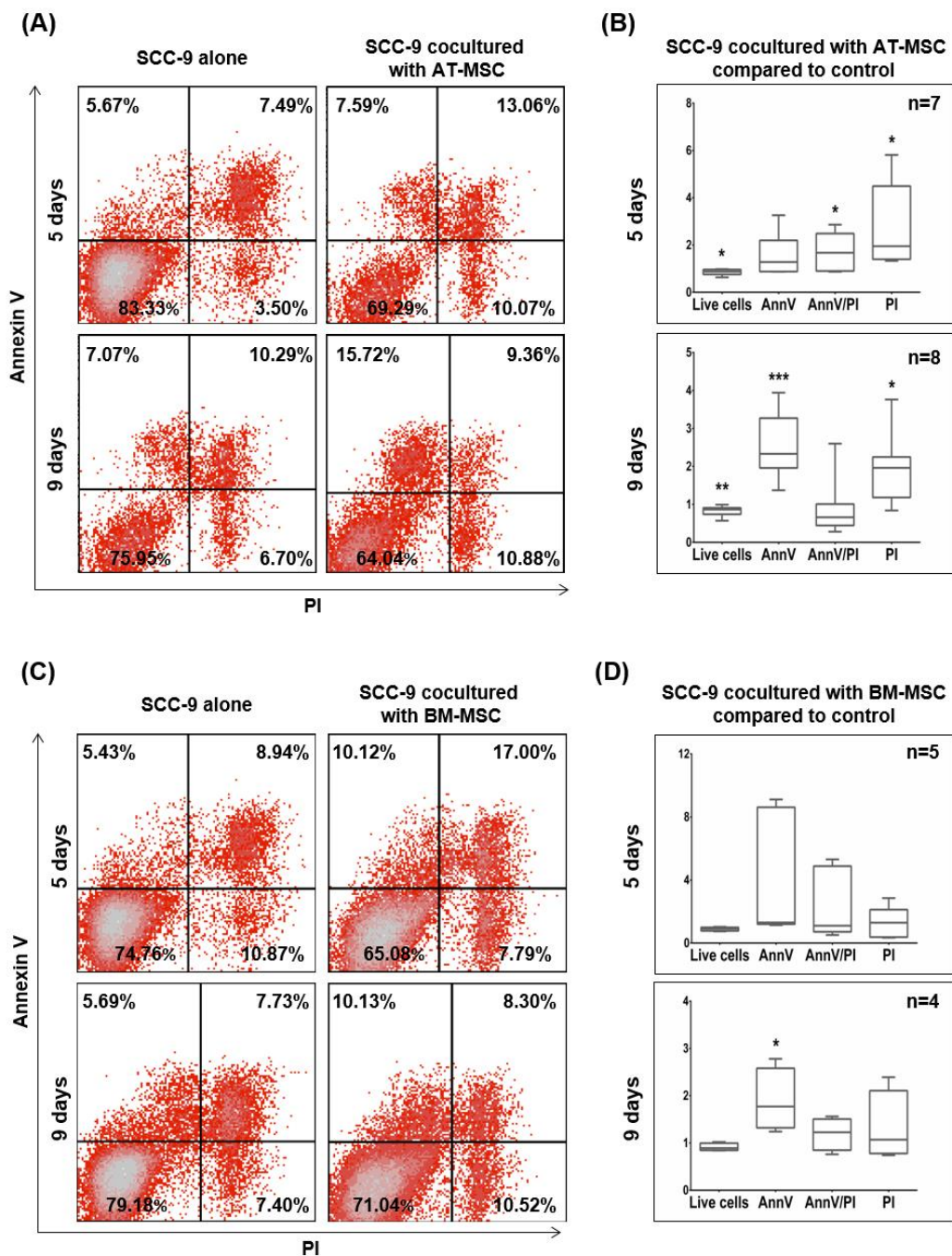


Фигура 18. MSC индуцират значително понижаване на виталността на SCC-9. Туморни клетки от линията SCC-9 култивирани върху монослой от АТ-МСС (А) и ВМ-МСС (В) в продължение на 9 дни. Клетъчната виталност е измервана чрез МТТ тест на всеки 2 дни от ден 1 до ден 9. Статистически значими разлики, two-way ANOVA тест ( $p < 0.0001$ ).

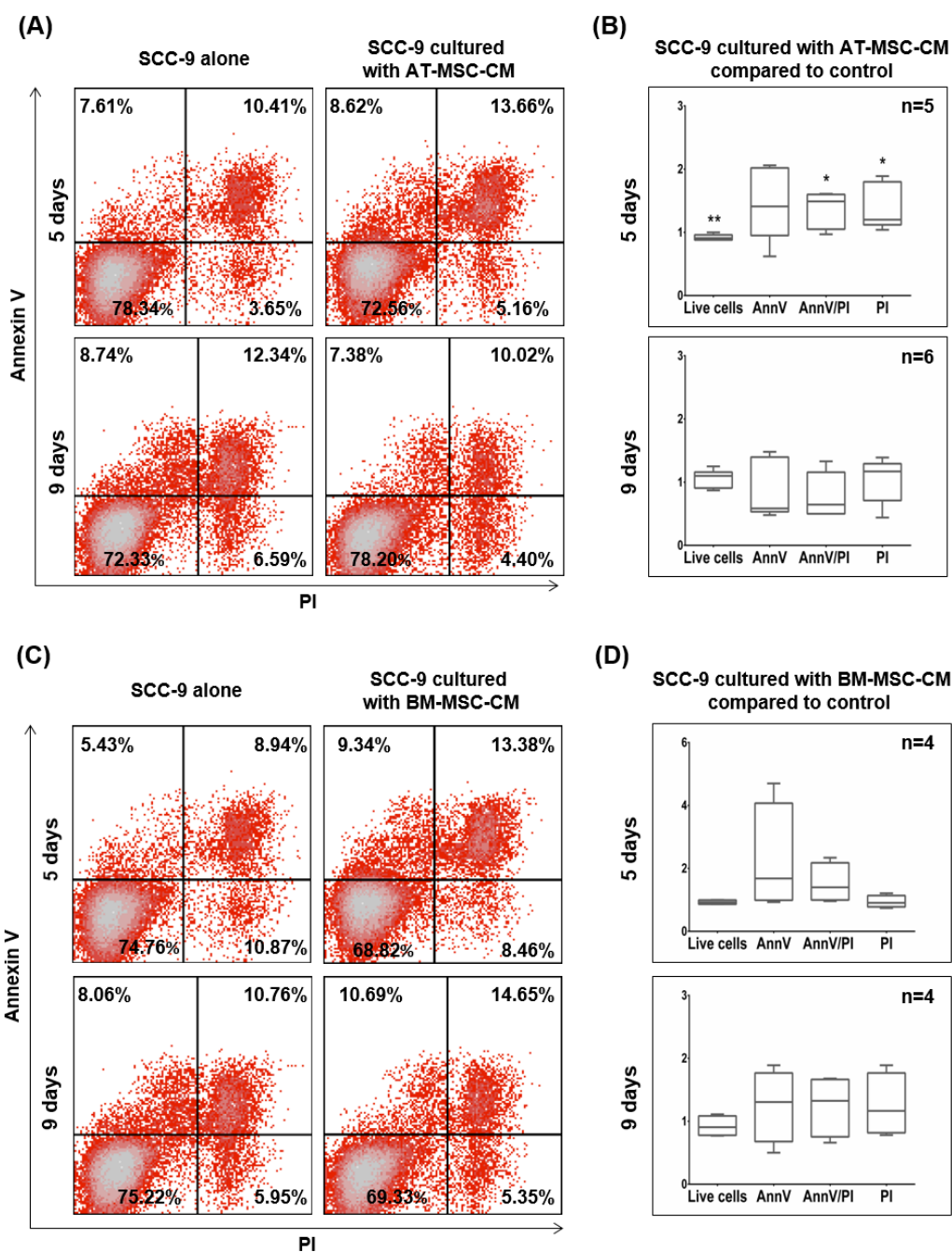
### 5.3. Изследване на апоптозата на туморни клетки от линията SCC-9 при дълготрайно контакт-опосредствано и паракринно взаимодействие с MSC *in vitro*

Резултатите от изследването на апоптозата на SCC-9 клетки ко-култивирани с АТ-МСС показваха значими промени в броя на апоптотични клетки. При 5 дни продължителност на култивирането ранно-апоптотичните клетки показваха тенденция за повишаване, късно-апоптотичните клетки бяха 1.72 пъти повече, а некротичните клетки – 2.75 пъти повече спрямо нивата на апоптоза на контролните туморни клетки, култивирани самостоятелно (Фигура 19В). В допълнение живите клетки (двойно негативни) бяха 0.85 пъти по-малко в сравнение с контролните клетки. При 9-дневно ко-култивиране броят на ранно-апоптотичните клетки беше 2.54 пъти по-голям, некротичните клетки бяха 1.91 пъти повече, живите клетки 0.83 пъти по-малко в сравнение с контролните клетки. При SCC-9 ко-култивирани с ВМ-МСС (Фигура 19D) за 5 дни беше наблюдавана тенденция за повишаване на ранно- и късно-апоптотичните клетки, но без статистическа значимост. На 9-ти ден беше установено 1.89 пъти повишаване на броя ранно-апоптотични клетки както и тенденция за повишаване на късно-апоптотичните и некротичните клетки.

Данните от изследването на апоптотичните нива на SCC-9 клетки третираны с АТ-МСС-СМ за 5 дни показваха понижаване на броя живи клетки 0.92 пъти, 1.36 пъти повишаване на късно-апоптотичните клетки и 1.41 пъти повишаване на некротичните клетки (Фигура 20В). На 9-ти ден подобен ефект не беше установен и не беше наблюдавана статистически значима промяна в нивата на апоптоза при туморните клетки третираны с АТ-МСС-СМ. SCC-9 клетките третираны с ВМ-МСС-СМ за 5 и за 9 дни показваха тенденция за повишаване на ранно- и в по-малка степен на късно-апоптотичните клетки, но без статистическа значимост (Фигура 20D).



Фигура 19. Представителни двупараметрови диаграми на SCC-9 клетки, ко-култивирани с AT-MSC (A) и BM-MSC (C), оцветени с AnnV и PI. Процентите отразяват броя клетки попадащи в съответния квадрант. Живи (AnnV-/PI-), ранно-апоптотични (AnnV+/PI-), късно-апоптотични (AnnV+/PI+) и некротични (AnnV-/PI+) ко-култивирани SCC-9 клетки, представени в пъти разлика спрямо контролните клетки (B), (D). Статистически значими разлики, unpaired t-тест (медиана със стандартна грешка, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).



Фигура 20. Представителни двупараметрови диаграми на SCC-9 клетки третирани с AT-MSC-CM (A) и BM-MSC-CM (B), оцветени с AnnV и PI. Процентите отразяват броя клетки попадащи в съответния квадрант. Живи (AnnV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), рано-апоптотични (AnnV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), късно-апоптотични (AnnV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) и некротични (AnnV<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>) ко-култивирани SCC-9 клетки, представени в пъти разлика спрямо контролните клетки (C), (D). Статистически значими разлики, unpaired t-тест (медиана със стандартна грешка, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

#### 5.4. Обобщение

Проведените експерименти за изследване на пролиферацията, виталността и апоптозата на плоскоклетъчни карциномни клетки от линията SCC-9 при контакт-опосредствани и паракринни взаимодействия с MSC показаха съществена и трайна антитуморна активност на MSC върху туморните клетки. С увеличаване на продължителността на контакта между клетките се наблюдаваше константно понижаване на пролиферацията и виталността, както и повишаване на апоптотичните нива в SCC-9 клетките. Паракринният антитуморен ефект на MSC беше по-слабо проявен. За разлика от останалите две туморни линии, при SCC-9 по-изразено влияние върху пролиферацията и апоптозата на клетките оказваха AT-MSC.

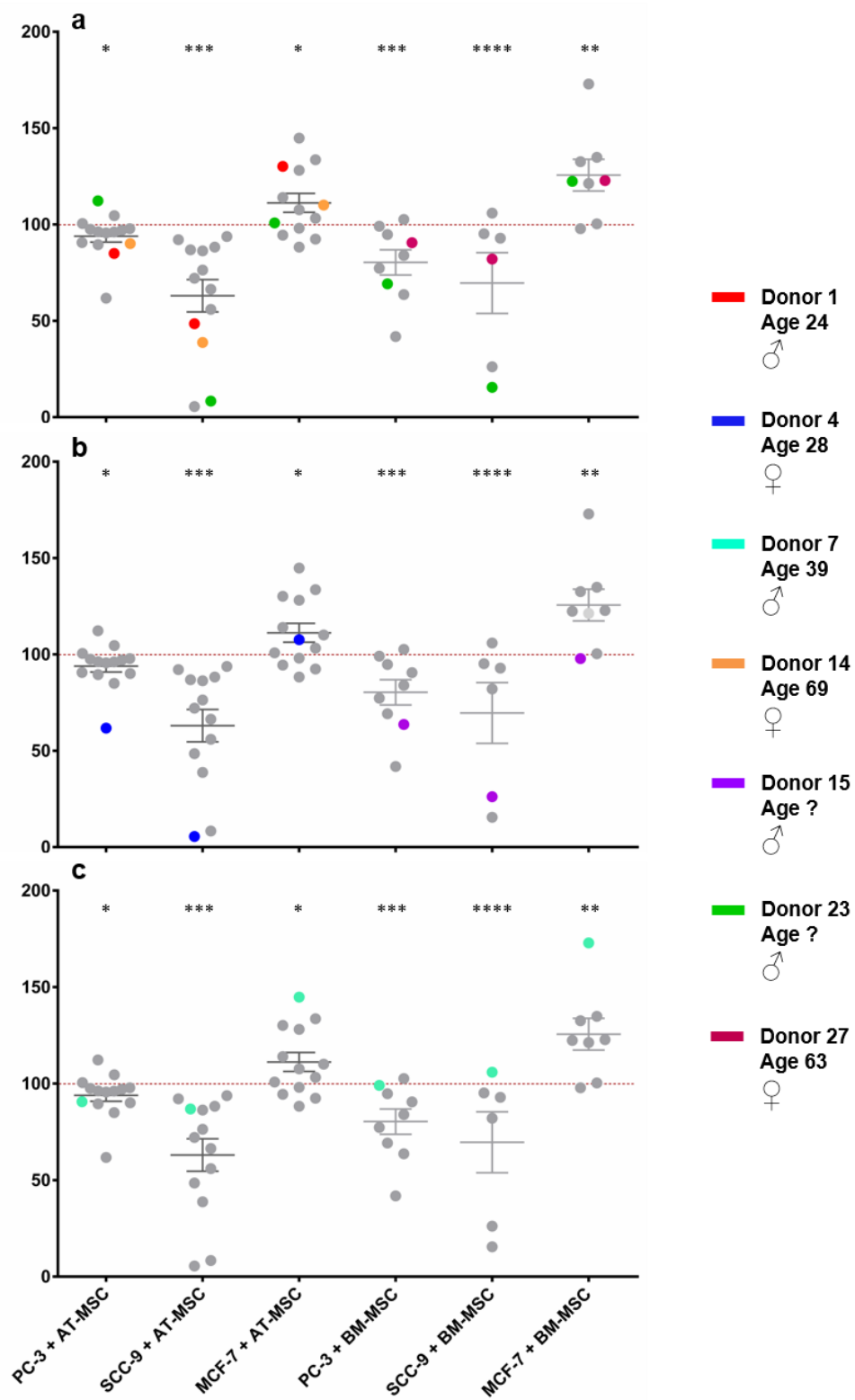
## 6. Донор-специфични особености на MSC

MSC от различни източници са сходни по отношение на редица фенотипни и функционални характеристики. Въпреки това измежду тях съществуват фини разлики, които могат да се дължат на микросредата в нишата им, локалната им функция или онтогенетичната възраст (MSC от неонатални тъкани или от възрастни индивиди) или такива, предизвикани от процедурите за изолиране и култивиране<sup>28</sup>.

Въпреки периодичното актуализиране на [съвкупността от критерии](#) на ISCT за характеризиране на MSC, тази дефиниция продължава да описва хетерогенна група от клетки, които показват вариабилност в зависимост от тъканния си произход<sup>29</sup>, между отделните донори, между различните клонални популации и на ниво единична клетка<sup>30</sup>. Дори когато са изолирани от една и съща тъкан, MSC демонстрират значителна вариабилност между клетките на различни донори. Има данни, показващи недвусмислено, че здравословното състояние на донорите също може да повлияе на наличието и функционалния потенциал на MSC<sup>31</sup>.

Обстойният анализ на данните от всички проведени експерименти в настоящата работа показва големи разлики в ефекта на MSC от различните донори върху основните жизнени параметри на изследваните туморни линии. Хетерогенността на получените резултати от изследването на изолираните от нас MSC обособи три функционални подгрупи. Първата подгрупа са MSC, които проявяват значителен ефект на промяна на пролиферацията и на трите туморни линии, а именно потискане на пролиферацията на PC-3 и SCC-9 и повишаване на пролиферацията на MCF-7 (Фигура 21 - донор 1, донор 14, донор 23, донор 27). Втората подгрупа обхваща MSC, които силно инхибират пролиферацията на клетки от линиите PC-3 и SCC-9, но имат слаб или нулев ефект върху MCF-7 клетките (Фигура 21 – донор 4, донор 15). Третата подгрупа включва MSC, които не оказват влияние върху туморни клетки от линиите PC-3 и SCC-9, но силно повишават пролиферацията на MCF-7 (Фигура 21 – донор 7). Важно е да се отбележи, че чифтните образци AT-MSC и BM-MSC от донорите 7 и 23 проявяват сходни ефекти във всяка от съответните подгрупи.





Фигура 21. Донор-зависими специфики на MSC опосредстват различен ефект върху пролиферацията на туморни клетки от линиите PC-3, SCC-9 и MCF-7. Графично представяне на

пролиферацията на туморни клетки, култивирани в контакт с АТ-МСС и ВМ-МСС за 5 дни. Пролиферацията е изчислена като процент от пролиферацията на контролни клетки, култивирани самостоятелно (100%). В различен цвят е представена пролиферацията на туморни клетки, ко-култивирани с МСС от съответния донор. (а) – МСС оказващи значителен ефект на промяна на пролиферацията на трите туморни линии; (б) – МСС с ефект върху РС-3 и SCC-9, но не и върху MCF-7; (с) – МСС с ефект само върху линията MCF-7.

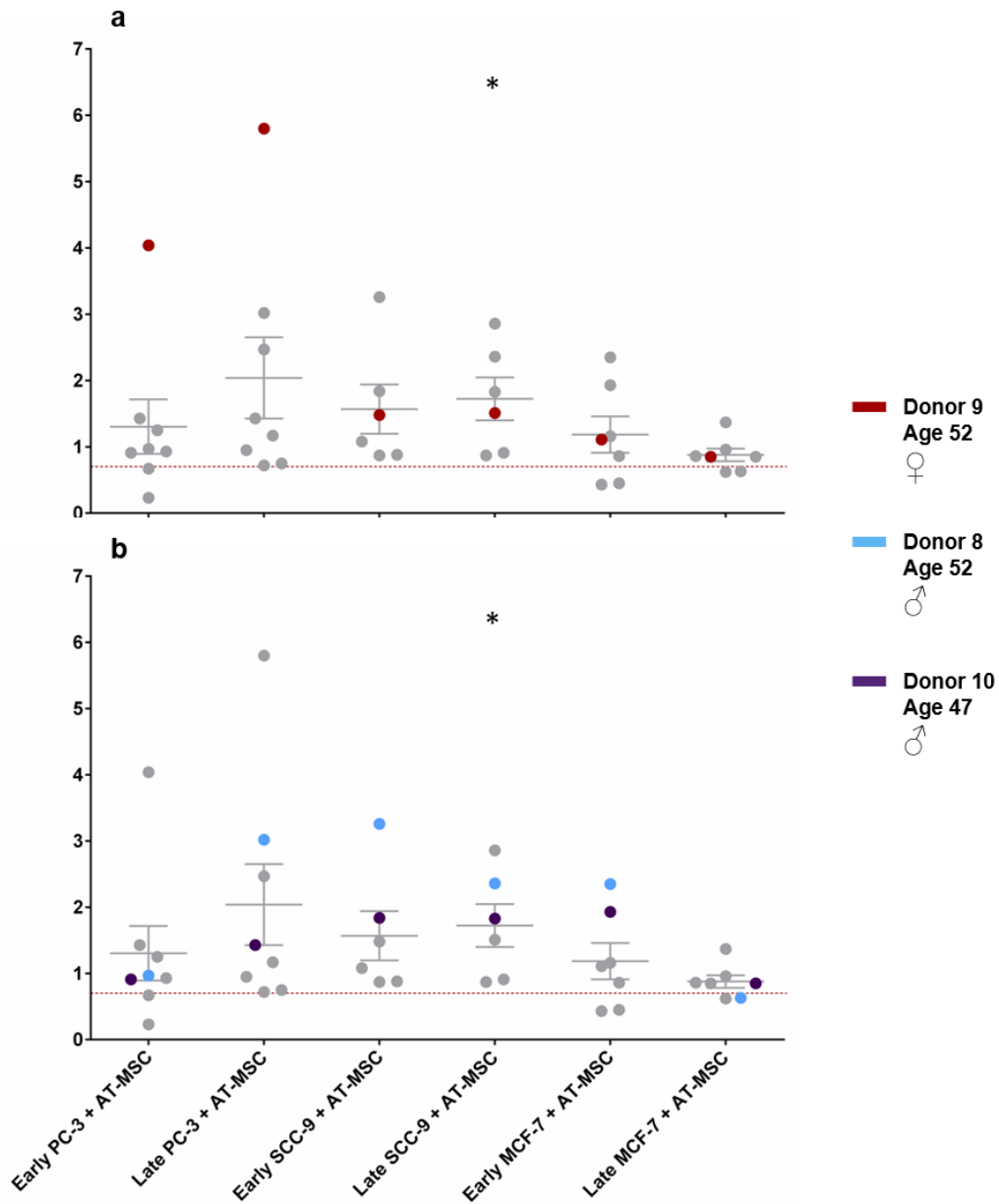
Друг интересен феномен, видим на Фигура 21 е, че установените донор-специфични различия не са свързани с пола или възрастта на донорите, попадащи в различните подгрупи.

Анализът на данните от изследването на апоптозата на туморни клетки от трите линии показва подобна донор-свързана хетерогенност на МСС като по същия начин можеха да се обособят подгрупи според наличието или липсата на ефект върху клетките на дадена туморна линия. В групата на туморните клетки, ко-култивирани с АТ-МСС (Фигура 22), бяха наблюдавани две подгрупи:

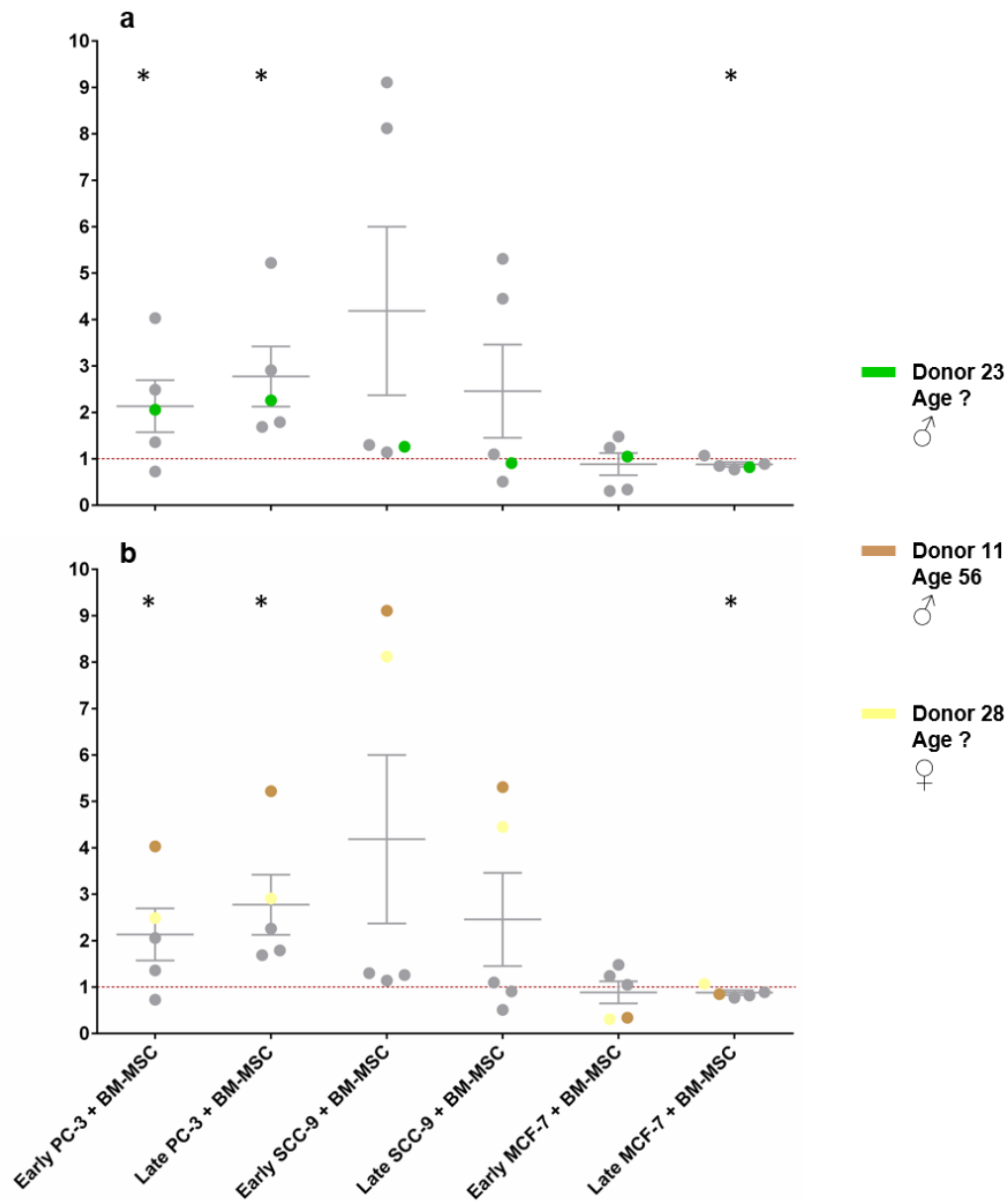
- МСС оказващи силен ефект на повишаване на нивата на ранно- и късно-апоптотични клетки от линиите РС-3 и SCC-9, но с много слаб ефект върху MCF-7 (Фигура 22а – донор 9);
- МСС, повлияващи апоптозата и на трите туморни линии, изразяващо се в повишаване на нивата на ранно- и късно-апоптотични клетки при РС-3, SCC-9 и на ранно-апоптотичните при MCF-7 (Фигура 22б - донор 8, донор 10).

В групата на туморните клетки, ко-култивирани с ВМ-МСС (Фигура 23), обособените подгрупи имаха малко по-различен характер:

- МСС, силно повишаващи ранно- и късно-апоптотичните клетки от линията РС-3, но без ефект върху останалите две туморни линии (Фигура 23а донор 23);
- МСС, повлияващи значително апоптозата и на трите изследвани туморни линии, изразяващо се в повишаване на ранно- и късно-апоптотичните клетки от линиите РС-3 и SCC-9 и понижаване на ранно-апоптотичните MCF-7 клетки (Фигура 23б донор 11, донор 28).



Фигура 22. Донор-зависими специфики на MSC опосредстват различен ефект върху апоптозата на туморни клетки от линиите PC-3, SCC-9 и MCF-7. Графично представяне на броя ранно-апоптотични (**Early**) и късно-апоптотични (**Late**) туморни клетки, ко-култивирани с AT-MSC за 5 дни. Броят апоптотични туморни клетки в ко-културите е представен в пъти разлика спрямо броя апоптотични клетки в контролните групи туморни клетки, култивирани самостоятелно. В различен цвят е представена апоптозата на туморни клетки, ко-култивирани с MSC от съответния донор.; (a) – MSC с ефект върху апоптотичните нива на PC-3, но не и върху SCC-9 и MCF-7; (b) – MSC оказващи значителен ефект на промяна на броя апоптотични клетки и при трите туморни линии.



Фигура 23. Донор-зависими специфики на MSC опосредстват различен ефект върху апоптозата на туморни клетки от линиите PC-3, SCC-9 и MCF-7. Графично представяне на броя ранно-апоптотични (*Early*) и късно-апоптотични (*Late*) туморни клетки, ко-култивирани с BM-MSC за 5 дни. Броят апоптотични туморни клетки в ко-културите е представен в пъти разлика спрямо броя апоптотични клетки в контролните групи туморни клетки, култивирани самостоятелно. В различен цвят е представена апоптозата на туморни клетки, ко-култивирани с MSC от съответния донор.; (a) – MSC с ефект върху апоптотичните нива на PC-3, но не и върху SCC-9 и MCF-7; (b) – MSC оказващи значителен ефект на промяна на броя апоптотични клетки и при трите туморни линии.

## Заклучение

Резултатите от настоящия дисертационен труд показват естествена антитуморна активност на MSC върху хормон-независимите туморни линии PC-3 и SCC-9 *in vitro*. Проявената антитуморна активност е значително по-силно изразена при наличие на контакт между взаимодействащите си клетъчни популации, но този фактор не е лимитиращ и може да бъде преодолян чрез секретата на MSC като най-вероятно това се осъществява посредством секреция на EV. Въпреки, че описания тумор-супресорен ефект показва зависимост от съотношението на взаимодействащите си туморни и стволови клетки, дългосрочното ко-култивиране и промяната на изходната пропорция на клетките не водят до стимулиране на туморните клетки PC-3 и SCC-9, което е от съществено значение за безопасното приложение на MSC в бъдещи антитуморни терапии насочени към съответните тумори. Установеното от нас повишаване на апоптозата на туморните клетки от линиите PC-3 и SCC-9 в резултат на контакта им с MSC вероятно се осъществява по TRAIL-зависим механизъм през DR4 и DR5 рецепторите, експресирани върху PC-3 и SCC-9 клетките, но липсващи при MCF-7, при които не установихме потискане на апоптозата. В допълнение на това MSC показват вариабилност по отношение на ефекта върху изследваните туморни линии в зависимост както от тъканния си произход, така и от индивидуалните специфики на съответния донор. Този феномен налага провеждането на задълбочени изследвания за установяване на причините за съществените различия в MSC на различни донори, независещи от пола и възрастта на конкретния донор. Друга важна посока за бъдещите изследвания по тази толкова обширна и комплицирана тематика са възможностите за усилване на естествената антитуморна активност на MSC, така че да бъдат прилагани ефективно и безопасно в борбата срещу раковите заболявания.

## Изводи

- Беше установен **различен ефект на MSC** върху трите изследвани туморни линии:
  - **антитуморен ефект**, изразяващ се в значително понижаване на пролиферацията и виталността успоредно с повишаване на апоптозата на линиите PC-3 и SCC-9;
  - **протуморен ефект**, изразяващ се в повишаване на пролиферацията и виталността, придружено с понижаване на апоптозата на линията MCF-7.
- **Контакт-опосредстваните взаимодействия** между туморните клетки и MSC предизвикват по-силно изразен отговор в туморните клетки в сравнение с ефекта на секреторните фактори от кондиционираната среда във всички експериментални постановки.
- **С удължаване на времето на взаимодействие ефектът на MSC върху туморните клетки заглъхва** – почти във всички случаи беше наблюдаван по-силен ефект на пети ден и по-слаб на девети. Причини за това могат да са: (1) промененото съотношение на клетките във времето или (2) превалирането на туморни стволови клетки след отмирането на туморни клетки в началото, които имат по-голяма възможност да се адаптират към спецификите на средата и вероятно по-слабо се повлияват от MSC.
- Разлики в ефекта на MSC върху туморните линии **в зависимост от източника на изолиране**:
  - VM-MSC повлияват по-силно пролиферацията и апоптозата на аденокарциномните линии PC-3 и MCF-7;
  - AT-MSC предизвикват по-силно изразена промяна на пролиферацията и апоптозата при плоскоклетъчни карцином SCC-9.
- Бяха установени разлики в ефекта, предизвикан в туморните клетки при ко-култивиране с MSC от различни донори, дори когато те произхождат от една и съща тъкан. Възможно е това да се дължи на разлики в здравословното състояние, възрастта и метаболизма на донорите. Наблюдаваните от нас **донор-специфични вариации на MSC не показват връзка с възрастта и пола на донорите.**

## Приноси

- За първи път е проведено изследване на взаимодействието на MSC с туморни клетъчни линии в условията на дългосрочно (9 дни) *in vitro* култивиране, в резултат на което беше установен различен ефект на MSC върху пролиферацията, виталността и апоптозата на клетки от линиите PC-3, MCF-7 и SCC-9.
- За първи път са проведени детайлни изследвания на основни жизнени параметри на клетки от линията SCC-9, култивирани в условия на контакт-опосредствани и паракринни взаимодействия с MSC от различни източници, в резултат на което беше установен значителен антитуморен ефект на MSC върху туморните клетки, изразяващ се в понижената им пролиферация и виталност, и повишена апоптоза.

## Хипотези, основаващи се на получените резултати с потенциал за бъдещи изследвания

- Клетките от линиите PC-3 и SCC-9, при които установихме повишаване на апоптозата в резултат на контакт с MSC, са отрицателни за WT p53. В същото време MCF-7 клетките, при които не беше установено повишаване на апоптозата, експресират WT p53. Въз основа на тези наблюдения може да се предположи, че **апоптозата на туморните клетки, предизвикана от ко-култивиране с MSC се индуцира по p53-независим път.**
- Клетките от линиите PC-3 и SCC-9, при които установихме повишаване на апоптозата в резултат на контакт с MSC, експресират рецепторите за TRAIL – DR4 (TRAILR1) и DR5 (TRAILR2). В същото време, линията MCF-7, при която отчетохме слабо понижаване или липса на промяна на апоптотичните нива не експресира функционален рецептор за TRAIL. Това предполага **индуциране на апоптоза по TRAIL-зависим механизъм** при ко-култивиране на туморни клетки с MSC.

## Научни публикации, свързани с дисертационния труд

- Kostadinova, M., & Mourdjeva, M. (2020). Potential of Mesenchymal Stem Cells in Anti-Cancer Therapies. *Current stem cell research & therapy*, 15(6), 482–491. <https://doi.org/10.2174/1574888X15666200310171547>; 2 цитирания ([www.scopus.com](http://www.scopus.com))
- Milena Kostadinova, Boris Antonov, Plamen Kinov, Tsvetelina Oreshkova & Milena Mourdjeva (2020) Mesenchymal stem cells inhibit the growth of prostate carcinoma cells in a long-term cultivation, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34:1, 354-360, [DOI: 10.1080/13102818.2020.1751710](https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1751710)

## Участия в научни форуми

### Доклад:

- Radko Sotirov, **Milena Kostadinova**, Shina Pashova, Snejana Kestendjieva, Kameliya Vinketova, Desislava Abadjieva, Elena Stoyanova, Tsvetelina Oreshkova, Elena Kistanova, Milena Mourdjeva. Morphology of mesenchymal stem cells in 3D spheroids, VII National Conference with International Participation "Morphological Days", 08-10.06.2018, Bulgaria, Sofia
- Radko Sotirov, **Milena Kostadinova**, Shina Pashova, Snejana Kestendjieva, Kameliya Vinketova, Desislava Abadjieva, Elena Stoyanova, Tsvetelina Oreshkova, Elena Kistanova, Milena Mourdjeva. Dynamics of nuclear volume of spheroid cultured adipose tissue derived mesenchymal stroma cells. Second CellFit Workshop "Cells Communicate!", Belgrade, Serbia 13-14 March, 2019
- Radko Sotirov, **Milena Kostadinova**, Shina Pashova, Snejana Kestendjieva, Kameliya Vinketova, Desislava Abadjieva, Elena Stoyanova, Tsvetelina Oreshkova, Elena Kistanova, Milena Mourdjeva. Spheroids as an in vitro model. The eighth workshop "Experimental models and methods in biomedical research", Sofia, Bulgaria, 16-18.07.2018



## Пострепи:

- R. Sotirov, **M. Kostadinova**, S. Pashova, S. Kestendjieva, K. Vinketova, D. Abadjieva, E. Stoyanova, T. Oreshkova, E. Kistanova, M. Mourdjeva. 2D VS 3D CULTURING: CHANGES OF MSC CHARACTERISTICS. The 11th National Congress with international participation of the Romanian Society Of Cell Biology and The 37th Annual scientific session of the Romanian Society Of Cell Biology, Constanta, Romania, 20-23 June, 2019
- **Milena Kostadinova**, Radko Sotirov, Snejana Kestendjieva, Shina Pashova, Elena Stoyanova, Kamelya Vinketova, Ivan Bochev, Tsvetelina Oreshkova, Milena Mourdjeva. A comparison of the cytokine profiles between 2D and 3D cultured mesenchymal stromal cells. Second CellFit Workshop “Cells Communicate!”, Belgrade, Serbia 13-14 March, 2019
- **Milena Kostadinova**, Radko Sotirov, Snejana Kestendjieva, Shina Pashova, Elena Stoyanova, Kamelya Vinketova, Ivan Bochev, Tsvetelina Oreshkova, Milena Mourdjeva. Variations in cytokines profiles of mesenchymal stem cells cultured in 2D and in 3D conditions. 5th NATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY, 25-28.10.2018, Bulgaria, Plovdiv
- S. Kestendjieva, **M. Kostadinova**, L. Dzerov, A. Nikolov, T. Oreshkova, M. Mourdjeva, E. Stoyanova. Expression of pluripotency associated genes in human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and adipose tissue, 15th Edition of EuroSciCon Conference on Advanced Stem Cell & Regenerative Medicine, 3-4.12.2018, Spain, Valencia
- **Kostadinova M.**, Antonov B., Kinov P., Tsvetanov L., Oreshkova Ts., Mourdjeva M. Proliferation and apoptosis of prostate cancer cells are affected by adipose tissue mesenchymal stem cells, 15th International Symposium for Immunology of Reproduction, 25-28.10.2018, Bulgaria, Varna
- Shina Pashova, **Milena Kostadinova**, Kameliya Vinketova, Snejana Kestendjieva, Desislava Abadjieva, Elena Stoyanova, Tsvetelina Oreshkova, Elena Kistanova, Milena Mourdjeva. Confocal imaging of 3D spheroids from mesenchymal stem cells, COST Action CellFit seminar, 09-12.04.2018, Estonia, Tartu
- **Milena Kostadinova**, Boris Antonov, Plamen Kinov, Lyubomir Tsvetanov, Tsvetelina Oreshkova, Milena Mourdjeva. Proliferation and apoptosis of tumor cells are affected by mesenchymal stem cells, Technology Platforms for 3D Cell Culture, 12-14.09.2017, Bulgaria, Albena

- Kestendjieva S., **Kostadinova M.**, Dzerov L., Nikolov A., Oreshkova T., Mourdjeva M., Stoyanova E. Expression of OCT4 and NANOG in human mesenchymal stem cells from adult and extra-embryonic tissues, Technology Platforms for 3D Cell Culture, 12-14.09.2017, Bulgaria, Albena
- **Milena Stefanova Kostadinova**, Snejana Sabinova Kestendjieva, Elena Nikolaeva Stoyanova, Boris Ivanov Antonov, Plamen Slavov Kinov, Tsvetelina Pavlova Oreshkova, Milena Sergeeva Mourdjeva. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells increase the apoptosis of tumor cells, Jubilee scientific conference "10 years Bulgarian Association of Clinical Immunology", 28-29.10.2016, Bulgaria, Sofia
- **Milena Kostadinova**, Boris Antonov, Tsvetelina Oreshkova, Milena Mourdjeva. Diverse effects of MSC on tumour cell lines proliferation, 14th International Symposium for Immunology of Reproduction, 22-24.05.2015, Bulgaria, Varna
- Kestendjieva S., Stoyanova E., **Kostadinova M.**, Petkova K., Dzerov L., Nikolov A., Oreshkova T., Mourdjeva M. Expression of immunoregulatory proteins by mesenchymal stem cells - does the source matter?, 4th National Congress of Immunology, 22-24.10.2014, Bulgaria, Varna
- **Milena Kostadinova**, Tsvetelina Oreshkova, Milena Mourdjeva. Human mesenchymal stem cells affect the proliferation of tumor cell lines. 2012, 4th EFIS-EJI South East European Immunology School

Изследванията в настоящия дисертационен труд са осъществени с финансовата подкрепа на следните проекти:

- Фонд Научни изследвания, МОН, Договор ДДВУ02/31. „Молекулни взаимодействия между човешки мезенхимни стволови клетки и тумори – модел за търсене на нови антитуморни средства“
- Национална Програма "Млади учени и постдокторанти", договор ПМС 203/19.09.18 г.; „Изследване на растежа на туморни клетки от комерсиални линии при дългосрочно ко-култивиране с мезенхимни стволови клетки“
- BG051PO001-3.3.06-059 „Фундаментално и приложно обучение на докторанти, постдокторанти, специализанти и млади учени в интердисциплинарни биологични направления и иновационни биотехнологии“.