

# МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

## ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕРАТОМНОГО ТЕСТА

Е.А. Кизилова

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»,  
Новосибирск, Россия

### Optimization of teratoma formation assay

E.A. Kizilova

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Novosibirsk, Russia

Сообщение посвящено критическому обзору и анализу тератомного теста, применяемого для оценки плюрипотентности стволовых клеток млекопитающих в условиях *in vivo*. Особое значение он имеет для анализа стволовых клеток человека. Сегодня клеточные биологи работают над стандартизацией и оптимизацией тератомного теста. Предлагается схема оптимизации, которая учитывает специфику морфологии и гистологии опухолей, происходящих из введенных стволовых клеток. Особое внимание уделено мониторингу роста опухоли, отбору проб, прочтению препаратов и формализации процедуры их описания. Выбраны 17 основных и 12 добавочных клеточных морфотипов, которые надежно распознаются на гистологических препаратах опухоли. Выделены и описаны 7 основных типов клеточных ансамблей, образующихся в опухолях *in situ*. Предложены критерии для оценки сложности организации опухоли и критерии малигнизации. Схема прошла успешную проверку более чем в 30 долговременных экспериментах. Проведен анализ 326 опухолей, полученных из суспензий 52 линий различных типов стволовых клеток 4 биологических видов (человек, лабораторная мышь, крыса, американская норка). Предложенный алгоритм позволяет полнее и точнее проводить диагностику экспериментальных тератом и, следовательно, увеличивает валидность экспертного заключения о плюрипотентности стволовых клеток в условиях *in vivo*.

**Ключевые слова:** тератома, тератомный тест, зародышевые листки, плюрипотентность стволовых клеток *in vivo*.

### Введение

Оптимальным условием для проверки плюрипотентности стволовых клеток (СК) в условиях *in vivo* является возвращение культивированных клеток в наиболее естественную временную, тканевую, гуморальную и пространственную нишу. Тератомный тест (ТТ) — один из необходимых этапов такой проверки [1–4]. Как правило, ТТ применяется перед или одновременно с химерным тестом. Однако далеко не всегда такое сочетание является выполнимым или приемлемым [5].

ТТ исторически развился из метода перевивания опухолей: первоначально он использовался для работы с культурами клеток эмбриональной карциномы [6]. Далее он был применён для доказательства плюрипотентности эмбриональных СК лабораторных мышей [7] и многих других видов млекопитающих, включая человека [8]. Возможно, из-за этого в специальной литературе об *in vitro* линиях СК понятия «тератома», «тератобластома», «тератоканцинома», «эмбриональная карцинома» и т.п. не получили конечного семантического разделения. Это затруднение касается не только самого процесса называния, т.е. терминологии [9], оно отражает имеющуюся пока неточность в разделении смыслов и призна-

Тератома formation assay is necessary to estimate *in vivo* pluripotency of stem cells especially stem cell lines of human origin. Nevertheless convenient, valid and universal “standards” to analyze stem cell derived tumors have not been developed yet. New protocol for monitoring teratoma growth, morphological and histological analyzes of tumor samples is proposed in this paper. This protocol is oriented on review of tumors morphology and histology per se. The list-describer includes 17 obligate and 12 facultative diagnostic cell types and 7 diagnostic cell complexes. The protocol takes into account complicity and heterogeneity of teratoma structure and allows detect different morphological features of malignization process inside stem cell derived tumors *in situ*. The protocol was successfully applied for teratoma formation test which has been performed for 52 stem cell lines of different species origin (mouse, rat, american mink and human). 326 stem cell derived tumors were completely described, reviewed and analyzed.

**Keywords:** teratoma, teratoma formation test, germ lines, stem cells, *in vivo* pluripotency.

ков. Это затруднение напрямую связано с ошибками морфологической диагностики опухолей, и, в свою очередь, приводит к последующим ошибкам [4]. Хотя предложены разные системы дифференциации этих типов опухолей [10–17], экспериментальные тератомы, получаемые в результате введения различных СК в гетеротопические сайты, пока так и не обрели своего законного места в современной морфологической систематике опухолей. Парадокс заключается в том, что ТТ давно и успешно используется для проверки плюрипотентности различных СК, и одновременно с этим, до сих пор не вполне ясно, на чем тест морфологически основан и, соответственно, как он может быть стандартизован [4].

Следует особо подчеркнуть, что ТТ пока единственный способ проверки плюрипотентности СК человека в условиях *in vivo* [18], поскольку конструирование внутривидовых химер в этом случае этически невозможно. Конструирование первичных эмбриональных межвидовых химер [19, 20] далеко не всегда успешно [21, 22] и само по себе также представляет пограничную этическую проблему [23]. ТТ — это своего рода «золотой стандарт» [4] для подтверждения плюрипотентности СК человека. Он широко востребован и сегодня, например, при

получении индуцированных плюрипотентных СК (ИПСК) людей, имеющих наследственные заболевания [24], а также в репрограммировании опухолевых клеток [25].

Сам по себе ТТ относительно прост и заключается в следующем: недифференцированным СК, взятым непосредственно из растущей *in vitro* культуры, предоставляется возможность сформировать какую-либо структуру в живом организме. Поскольку в качестве организма-реципиента всегда используется взрослое экспериментальное животное, а «подсадка» СК происходит всегда в гетеротопические и гетерохронные сайты, сформированная структура ожидаемо не будет интегрирована в общий план строения. Иными словами, это всегда будет индуцированная опухоль, происходящая из потомков введенных СК. Таким образом, главное морфогенетическое ограничение данного метода состоит в том, что индуцированная *in vivo* дифференцировка СК происходит в окружении дифференцированных тканей, что практически полностью отменяет возможность нормального осевого морфогенеза. Тканевые дериваты, получаемые при такой эктопической дифференцировке, в лучшем случае не выходят за пределы разнообразия клеточных форм зрелой тератомы, а в худшем — образуют обширные быстрорастущие злокачественные опухоли.

Следует заметить, что в международном научном сообществе существует давняя полемика о принципиальной приемлемости, достаточности, адекватности и валидности ТТ. Научная значимость метода подвергается сомнению из-за того, что введенные СК неизбежно попадают в «нефизиологическое» микроокружение [26]. Вторым весомым резонансом являются этические и биоэтические аргументы. В качестве альтернативы тератомному тесту предлагаются традиционные методы клеточного культивирования, как то направленная *in vitro* дифференцировка СК; дифференцировка СК в составе эмбрионидных теллец; анализ молекулярных маркеров плюрипотентности и анализ эпигенетических меток. Большое внимание уделяется сегодня разработке и совершенствованию предсказательных моделей *in silicio*, построенных по данным полногеномного чипирования и секвенирования СК (PlanTest) [4]. Названные подходы остаются в рамках уже хорошо известных клеточных *in vitro* систем. На наш взгляд, они ещё менее «физиологичны», чем введение суспензии СК в эктопические и гетерохронные сайты.

Есть ли другие варианты получить необходимую информацию о плюрипотентности СК, при этом минув ТТ, но, по возможности, оставаясь в формате *in vivo*? Такими альтернативными вариантами являются органотипические модели, например, тканевая культура кожи, сердца и трахеи, а также *in vivo* система, основанная на ре-агрегации диссоциированной эмбриональной почки [26]. Логика проверки плюрипотентности в этом случае достаточно простая: введенным в тестовую систему СК предоставляется возможность участвовать в заживлении раны или в восстановлении тканевых элементов почки. Такие системы, безусловно, ближе к естественным *in vivo* системам. Однако их возможности ограничены спектром клеточной дифференцировки, гистогенеза и тканевого морфогенеза соответствующего выбранного модельного органа.

На наш взгляд, наиболее интересен новый класс моделей *in vivo*, построенных на эмбриогенезе

цыпленка. Например, САМ-модель или формирование СК-происходящих опухолей на хорио-аллантоисной мембране куриного яйца [28, 29]. При этом создается иммунодефицитное окружение, т.е. получается *in vivo* система, аналогичная организму иммунодефицитной мыши. Несмотря на видимую простоту, САМ-модель пока практически не используется для тестирования СК. Однако, этический и биоэтический аспекты таких работ несомненно более выгодны. Кроме того, поиск альтернативных *in vivo* моделей проверки плюрипотентности СК представляет большой методический и даже технологический интерес.

В соответствии с Классическим форматом ТТ суспензия СК вводится в организм животных, имеющих сниженный иммунный статус (чаще всего это мыши, несущие *nu/nu* или мыши SCID). Клетки вводят подкожно в область загривка, реже — в переднюю камеру глаза, под капсулу почки или семенника. Иногда суспензия вводится глубоко внутримышечно. Клетки могут вводиться с матригелем и без него [3]. Через несколько недель в месте введения образуется опухоль. Результаты гистологического анализа этой опухоли суммируются в виде типового заключения: «в опухоли представлены (или не представлены) производные всех трех зародышевых листков, следовательно, тестируемая линия СК плюрипотентна (или данная линия СК не обладает этим качеством)». Однако такая постановка проблемы практически исключает исследование экспериментальных тератом *per se*, т.е. мимо внимания исследователей проходят и вариации спектра дифференцировки СК, и морфологическое разнообразие опухолей, и элементы их тканевой организации, и малигнизация опухолей, и появление неожиданных тканевых дериватов. Так, на настоящий момент до конца не объяснено появление экстраэмбриональных производных в гетеротопических сайтах [30].

Возвращаясь к идее «золотого стандарта» [14], следует признать, что универсальных и конвенциональных «стандартов» ТТ не существует: ни в получении опухолей, ни в алгоритмах их анализа. Возникает вопрос: эти «стандарты» пока не существуют, или же ТТ не может быть стандартизован в принципе? У нас нет окончательного ответа. Однако, на наш взгляд, ТТ имеет несколько «точек роста», сформулированных в аналитической работе группы Ф. Мюллера [4]. Автор считает, что изучение клеточной организации тератом способно не только пролить свет на понимание закономерностей дифференцировки СК в условиях *in vivo*, но и поможет прояснить многие проблемы развития эмбриональных тканей *in situ*. В дальнейших исследованиях тератом Ф. Мюллер предлагает актуализировать следующие вопросы.

1. Влияют ли место инъекции и введенное число СК на структуру опухоли?

2. Влияют ли они на время (timing) организации опухолевых структур?

3. Что мы видим в тератомах: эмбриональные ткани, ткани плода или ткани взрослого организма?

4. Влияет ли исходная ткань (источник клеток для репрограммирования) на структуру экспериментальных тератом?

5. Можем ли мы применять тератомный тест для оценки туморогенной активности клеточных препаратов для клиники?

6. Как оценивать именно злокачественную активность линий СК?

Исследователи стали лучше понимать, как стандартизировать процедуру получения экспериментальных опухолей [3]. Однако задача достижения консенсуса о возможных стандартах интерпретации ТТ (описание опухолей, идентификация видов клеток, оценка малигнизации и т.п.) все так же далека от реализации. Эксперты связывают это замедление в том числе и с нехваткой морфологов, патоморфологов и гистологов, т.е. с отсутствием специалистов, способных качественно «прочитать» гистологический препарат, написать заключение о структуре опухоли и провести сравнительный анализ опухолей [4, 14].

Суммируя сказанное выше, обозначим основные черты, характеризующие состояние ТТ на сегодняшний день. Он является необходимым этапом для проверки СК, особенно в случае, когда получение первичных (эмбриональных) химер маловероятно из-за биологических особенностей объекта или же совсем невозможно по причинам этического порядка.

ТТ сам по себе может быть существенно оптимизирован и, возможно, стандартизован.

В настоящем сообщении мы представляем результаты реализации нескольких методических подходов. В частности:

1) учет особенностей роста опухолей и их локализации;

2) учет особенностей морфологии и клеточной структуры спонтанных тератом (тератомо-подобных опухолей) при анализе опухолей, происходящих из суспензии СК;

3) расширение списка диагностических клеточных морфотипов и последовательная детализация этих морфотипов;

4) разработка списка диагностических клеточных ансамблей и ассоциаций;

5) разработка количественных методов анализа разнообразия организации опухолей, верификация параметров сравнения на базе измеряемых или учитываемых (считаемых) первичных показателей.

Наш алгоритм основан на более чем 20-летнем опыте проведения тератомного теста для линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и ИПСК разного происхождения и плоидности, интактных и генетически трансформированных. Схема прошла успешную проверку при анализе 356 опухолей, полученных из суспензий 52 линий различных типов стволовых клеток четырех биологических видов (человек, лабораторная мышь, крыса, американская норка) [31–34].

### **Получение и обработка опухолевого материала**

Для проведения ТТ мы используем иммунодефицитных мышей линий BALB/c-nu и NOD.SCID CB17Prkdcscid/NcrCrl (далее по тексту – Scid/Scid). Вторая линия является конвенциональной для тератомного теста [3]. Животные предоставляются РНЦ ГРЛЖ на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН (<http://spf.bionet.nsc.ru>) и ЦКП «Генофонды лабораторных животных» на базе конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=132>). Эксперименты разработаны и проводятся в полном соответствии с международными биоэтическими принципами и нормативами.

Опухоли успешно вырастают у мышей обеих линий. Мы также не заметили существенных различий

в морфологии, локализации, макроструктуре и клеточной организации опухолей, полученных на разных линиях иммунодефицитных мышей. В среднем, у Scid/Scid закладка и рост опухоли происходит несколько чаще, чем у BALB/c-nu, однако этот эффект объясняется, скорее, большей продолжительностью жизни мышей Scid/Scid, их большей физической выносливостью и особыми условиями содержания. Важным межлинейным различием в результатах тератомного теста при ведении его у разных линий мышей мы считаем малопонятный пока феномен появления дополнительных опухолей у NOD.SCID CB17Prkdcscid/NcrCrl. Названный эффект ни разу не наблюдался у BALB/c-nu. Однако в целом, по балансу вложенных усилий и полученных результатов SPF-формат эксперимента и генотип Scid/Scid более предпочтительны для проведения ТТ.

Для всех линий СК мы выполняем тест в нескольких независимых повторях (минимум – 2, максимум – 4). Повторами являются, например, дни введения клеточных суспензий, или несколько разных пассажей клеточной культуры, или разные культуры (криоампулы), поднятые из клеточного криобанка. Суспензии клеток берутся в количестве от 1,5 (min) до 5,1 (max) миллиона клеток.

Для гистологического анализа из каждой опухоли отбирается по 3–4 образца. Отбор материала строго стандартизован. Образцы фиксируются в растворе Буэна и заключаются в парафин стандартным способом. Срезы (7–10 мкм) обрабатываются по стандартной методике и окрашиваются гематоксилином и эозином, а также готовыми наборами гистологических красителей производства компании Bio-Optica Milano S.P.A. (Italy): «Picro-Mallory trichromica» (04-021822), «Masson trichromica» (04-011802), «P.T.A.H.-hematoxyline» (04-060802), «Luxol fast blue Kreyer-Barrera» (04-200812), «Azan trichromica» (04-001802), «Picrofucsin Van Gizon» (04-030802), «Mucicarmine» (04-190812), «WVG long method» (04-051802). Изображения получаем и анализируем на микроскопе «Axioscop2+», оснащённом ССД-камерой «AxioCam HRC» и программным пакетом «AxioVision», на базе ЦКП МАБО СО РАН ([www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=113](http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=113)). Иммуногистохимический анализ в этом алгоритме не исключен, хотя для зрелых тератом, на наш взгляд, он часто избыточен. Для диагностики морфотипов используются конвенциональные печатные и электронные (on line) атласы по эмбриологии, гистологии, патогистологии и онкологии.

### **Мониторинг роста опухоли и ее локализация**

Диссекцию опухоли проводим на разных сроках, ориентируясь собственно на рост и развитие самой опухоли. В среднем, иссечение опухолевого материала проводится не позднее чем через 3–4 нед. после появления первого узелка в месте инъекции СК. Период, который проходит с момента инъекции до появления первого хорошо видимого узелка, широко варьирует (от двух недель до полугода). Для роста опухолей характерна видоспецифичность. Опухоли, происходящие из ЭСК мыши, появляются рано, растут быстро и более склонны к стремительному (1–2 сут.) некротическому распаду.

Главной особенностью проведения тератомного теста на иммунодефицитных мышях Scid/Scid мы считаем появление добавочных, т.е. неожиданных



и непредусмотренных дизайном эксперимента, опухолей. Так случается далеко не со всеми линиями и не во всех экспериментах. Однако этот феномен регистрируется постоянно, и его необходимо учитывать при анализе результатов опыта. В связи с указанным разнообразием, мы разделяем все полученные опухоли на две главные группы (*in situ* и *ex situ*) и учитываем различные варианты их сочетаний:

1) *in situ*+/*ex situ*- — в экспериментальном животном обнаружены только потенциальная тератома (одна или несколько) в ожидаемом месте (загривок или лапа);

2) *in situ*+/*ex situ*+ — обнаружены разные опухоли разной локализации, в том числе и потенциальные тератомы в ожидаемых сайтах.

3) *in situ*-/*ex situ*+ — обнаружены только добавочные опухоли разной локализации, потенциальных тератом в ожидаемых сайтах нет.

Описание морфологии добавочных опухолей в данном обзоре не приводится.

### Морфология и локализация опухолей *in situ*

В группу *in situ* отнесены опухоли, которые предсказуемо образовались в местах инъекции СК. Эти опухоли и есть потенциальные тератомы. Мы используем два сайта инъекции СК: подкожно (в область загривка, между лопатками) и глубоко внутримышечно (в левую или правую голень). Чаще всего однократная инъекция приводит к появлению единственной опухоли *in situ*. У некоторых опытных животных в результате подкожной (реже — глубокой внутримышечной) инъекции образуются 2 или 3 независимые опухоли, также локализованные *in situ* (рис. 1). В случае множественного роста (2, 3 и

более очагов) каждая из опухолей рассматривается как автономная. Критерии автономности следующие: общая капсула отсутствует; общая граница отсутствует, т.е. опухоли не просто не соприкасаются друг с другом, но и разделены слоями тканей реципиента. Определение автономности опухолей проводится по объединению критериев. Часто автономные опухоли различаются не только по локализации, но и по морфологии, и по клеточной организации (рис. 2Е).

В результате подкожного введения образуются подкожные опухоли, чаще всего расположенные в области загривка, симметричные относительно срединной линии спины (рис. 1В, Г). Иногда опухоли смещены от средней линии влево или вправо, в область нижнечелюстного и(или) подушного скопления лимфатических узлов. Чаще (73% случаев) смещение происходило влево. Опухоли автономны и подвижны относительно скелетных мышц, костей, суставов и кожи. При иссечении сохраняют форму, размер и структуру. При разрезании сохраняют фактуру и консистенцию, но могут и «оплывать». Имеют хорошо заметную глянцевую, светло-розовую с легким сероватым отливом, капсулу, образованную тонким слоем соединительной ткани. Капсула плотно обрастает опухоль и образует с ней неразрывное единое целое. Соединительно-тканная капсула может быть образована как клетками хозяина, так и потомками введенных СК. Кожа всегда остается интактной. Захвата лимфатических узлов опухолями и/или прорастания опухолевой ткани в лимфатические узлы также не наблюдалось. Средний размер опухоли составил около 10 мм в диаметре (минимум — 4 мм, максимум — 24 мм). Рост опухолей наблюдается от 3 нед. до полугода.

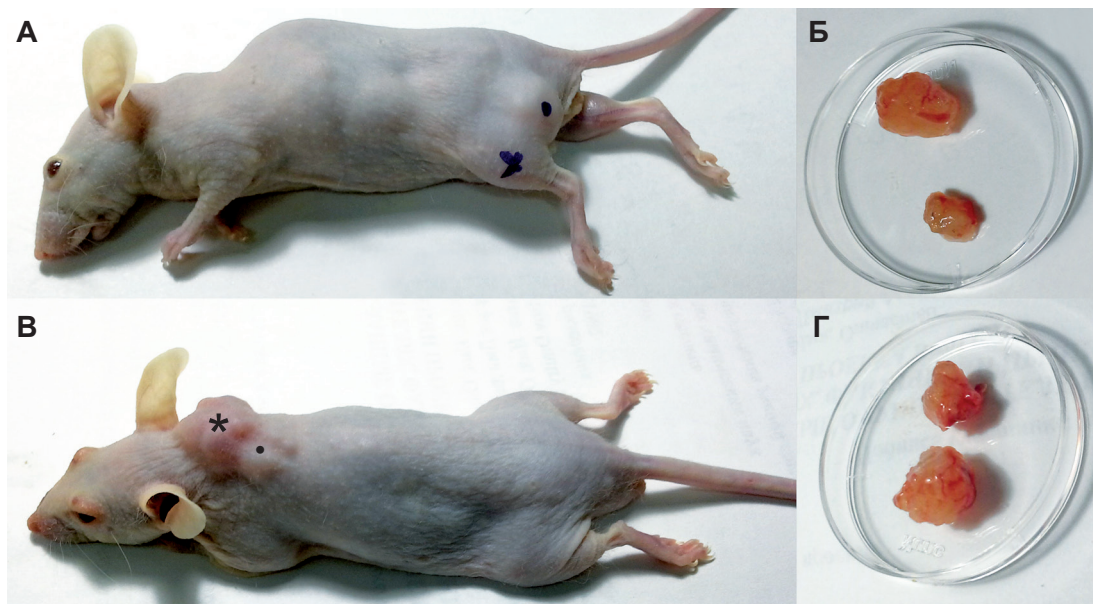


Рис. 1. Автономные опухоли, образовавшиеся после глубокой внутримышечной (А, Б) и подкожной (В, Г) инъекции ИПСК человека. Диаметр чашки — 35 мм

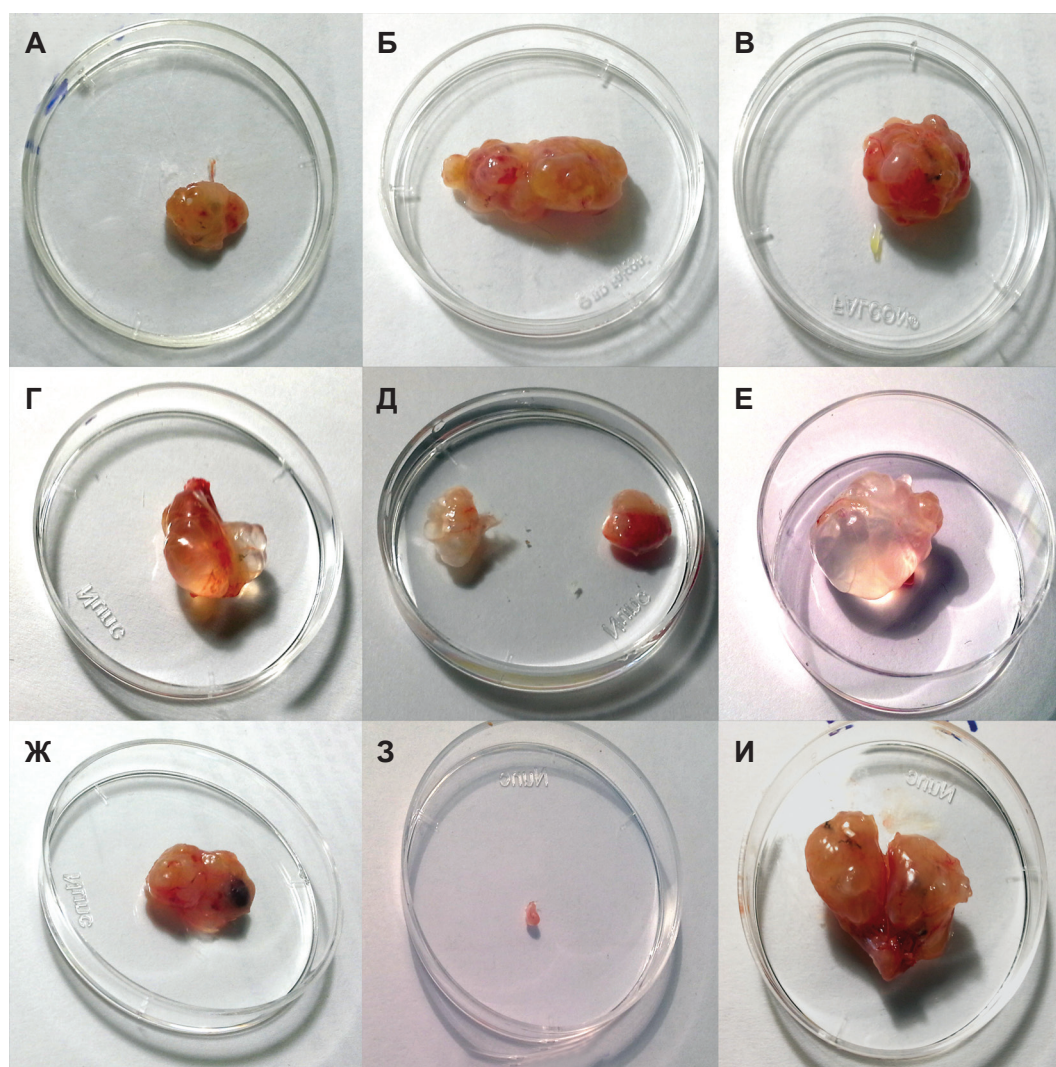


Рис. 2. Внешний вид опухолей *in situ*, полученных из ИПСК человека подкожной (А, Д–З) и внутримышечной (Б–Г, И) инъекцией. Диаметр чашки – 35 мм

В результате глубокой внутримышечной инъекции образуются опухоли, чаще всего расположенные в области голени, иногда – с переходом на бедро (рис. 1А, Б). В ряде случаев опухоль захватывала коленный сустав. Ни у одного из опытных животных опухоль не вовлекала голеностопный сустав и стопу. Опухоли неподвижные, глубоко вросшие в мышечную ткань и не разделенные фасциями отдельных мышц. Иногда – приросшие к надкостнице и(или) хрящу, иногда – проросшие плотными тяжами в суставную сумку коленного сустава. Очень редко (1 животное) опухоль была локализована на внутренней стороне бедра с выходом в область паховых и параартикулярных лимфатических узлов. Захвата лимфатических узлов опухолями *in situ* и(или) прорастания опухолевой ткани в лимфатические узлы не наблюдалось. Примерно в четверти случаев опухоль прорастала в подкожную клетчатку, однако сама кожа (дерма) всегда оставалась интактной. Опухоли неподвижные при пальпации, глубоко и плотно проросшие в мышечную ткань и приросшие к ней. Специфическая капсула (собственная капсула опухоли) отсутствует. Средний размер опухоли составил около 10 мм в диаметре (минимум –

2 мм, максимум – 20 мм). Рост опухолей наблюдали от двух месяцев до полугода.

Внешний вид экспериментальной тератомы очень разнообразен, и она далеко не всегда представляет собой солидную опухоль (рис. 2). Типичная опухоль *in situ* включает в себя разные участки (табл. 1).

Вне зависимости от сайта роста, опухоли *in situ* по преимуществу сложные и многокомпонентные. Их макроструктура может быть описана в целом как совокупность участков разной плотности, цвета, консистенции и фактуры. Поверхностная васкуляризация умеренная, сосуды мелкие, сеть редкая. Зияющих некротических полостей чаще всего нет. В ряде случаев при росте опухоли глубоко внутримышечно наблюдались небольшие подкожные гематомы, вызванные скорее механическим повреждением подкожных кровеносных сосудов. Причина повреждений – механическая травма (натяжение, скрутка) задней конечности вследствие быстрого роста массивной внутримышечной опухоли. Подобные гематомы не приводили к образованию абсцессов, трофических язв, некротизированных поверхностей, некротических полостей или свищей.

**Таблица 1.** Макроскопическая организация опухолей *in situ*

Тип (№)	Плотность участков	Морфология	Часто ассоциирован с типом (№)
1	Солидные	Плотные скопления серовато-белых и серовато-желтых узлов разного размера, собранных в компактную группу. Опухоль напоминает тутовую ягоду	4, 5
2	Желеподобные (слизистые)	Относительно бесструктурные участки неправильной формы телесно-розового цвета	3, 10
3	Мягкие	Компактные с четкими границами очаги ярко-красного или темно-красного цвета	2, 11
4	Солидные	Равномерные кремово-розовые участки со множественными округлыми плотными вкраплениями молочно-белого цвета.	1, 5
5	Солидные	Серовато-белые узлы, с темно-коричневыми и черными компактными вкраплениями, иногда имеющими вид ветвистого побега	4, 1
6	Цисты	Отдельные крупные цисты, ограниченные достаточно плотной и упругой стенкой, имеющие разное содержимое: прозрачная бесструктурная водянистая субстанция (а) или прозрачная вязкая субстанция, напоминающая белок куриного яйца (b)	7, 9
7	Цисты	Грозди мелких цист, ограниченных друг от друга тонкой стенкой	6
8	Цисты	Мелкие уплощенные пузырьки	1, 2, 4
9	Солидные	Плотные участки, расслаивающиеся при диссекции без потери внутренней структуры	1, 5
10	Мягкие	Белые, кремово-белые или сероватые, нежные, имеющие небольшую плотность участки; как правило, при фиксации всплывают	2
11	Цисты?	Обширные бесструктурные лакуны, заполненные темной кровью, иногда со сгустками	3, 12
12	Желеобразные (слизистые)	Сравнительно небольшие (для СК человека) либо обширные (для мыши) участки распавшейся опухолевой массы	11

**Гистологический анализ опухолей *in situ***

Стандарта гистологического анализа экспериментальных тератом пока не существует [4]. Нет даже универсальных морфологических критериев для оценки этого класса опухолей, кроме редуцированной формулы «в опухоли присутствуют/отсутствуют производные всех трех зародышевых листков». При разработке нашего алгоритма, мы взяли

за основу список морфотипов, представленный в типовой экспериментальной работе, посвященной молекулярному анализу экспериментальных тератом [35], расширили список диагностических морфотипов до 17 основных (облигатных) и 12 дополнительных (факультативных) единиц (табл. 2, рис. 3).

**Таблица 2.** Диагностические морфотипы, используемые при описании и анализе опухолей *in situ*

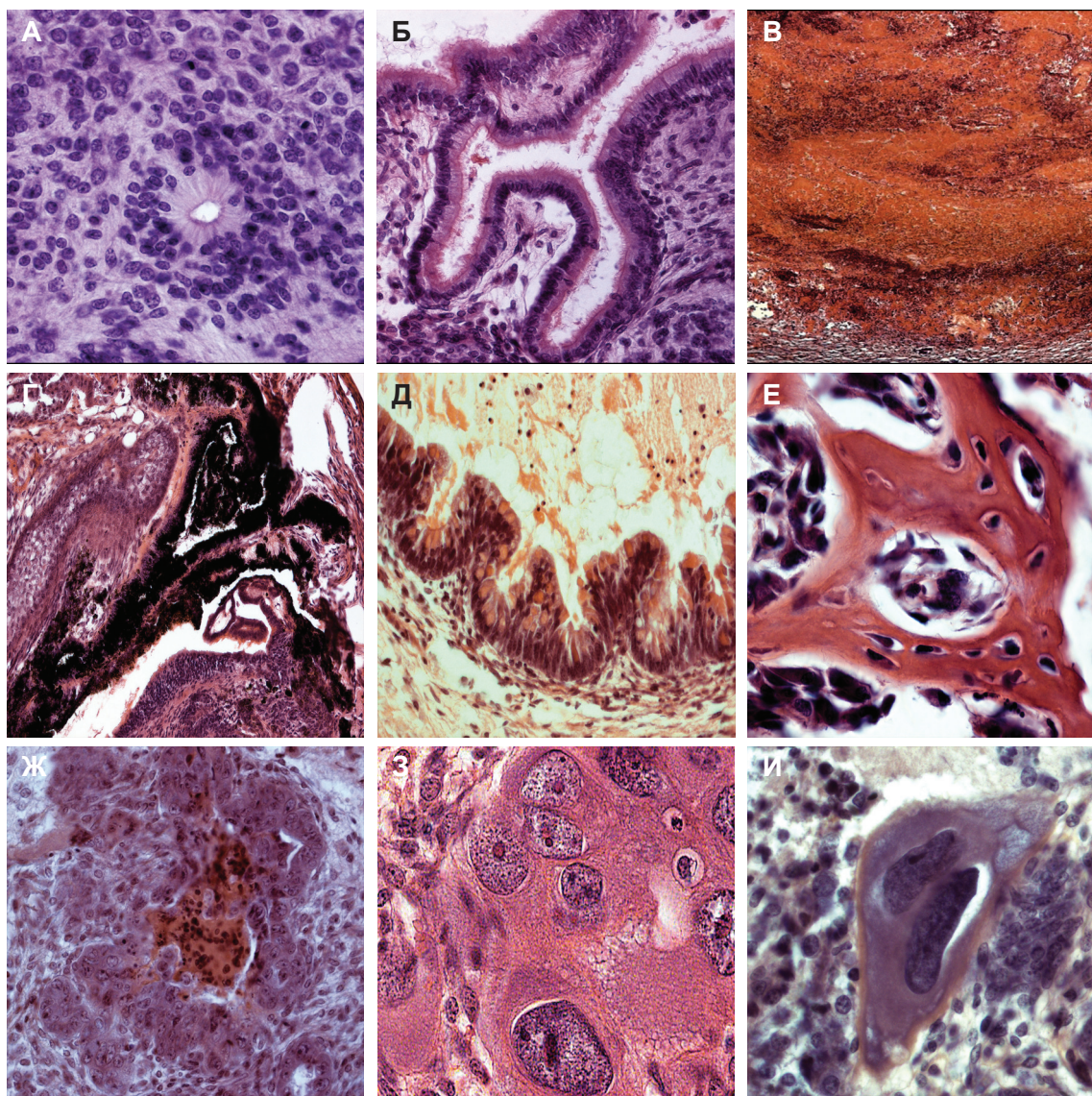
№	Листок	Групповое обозначение	Описание группы морфотипов
<b>Основные (облигатные) морфотипы</b>			
1	ECT	primitive neuroepithelium	эмбриональный нейроэпителий «эпителий» нервной трубки эмбриональная нейроэктодерма
2	ECT	premature neural (glial) tissue	ранние производные нейроэпителия нейробласты и спонгиобласты
3	ECT	keratinized epithelium	многослойный ороговевающий эпителий, «кератиновые линзы» многослойный неороговевающий эпителий слизистых оболочек
4	ECT	melanocytes	меланоциты, пигментированные эпителии
5	ECT	pigmented epithelia	разные виды пигментного эпителия



## Окончание таблицы 2

№	Листок	Групповое обозначение	Описание группы морфотипов
6	MES	connective tissue	плотная соединительная ткань рыхлая соединительная ткань мезенхима
7	MES	cartilage	различные виды хрящевых тканей, чаще – гиалиновая, реже – волокнистая
8	MES	bone	различные типы костной ткани (по гистогенезу), образующиеся как прямым (перепончатым) так и непрямым (энхондральным) остеогенезом
9	MES	muscle	гладкомышечные клетки изредка – миотубы поперечнополосатой мускулатуры
10	MES	adipose tissue	жировая ткань, преимущественно – белый жир
11	MES	erythropoietic tissue	участки эритроцитопоэза участки гранулоцитопоэза возможно – участки мегакарицитопоэза
12	MES	lymphoid tissue	морфотипы лимфоидного ряда участки лимфоцитопоэза
13	END	ciliated epithelium	реснитчатый эпителий эпителиальные морфотипы бронхиального древа
14	END	gut-like epithelium	эпителиальные морфотипы разных отделов (средняя кишка) пищеварительной трубки, включая эпителий кишечных ворсинок
15	END	glandular epithelium	железистые эпителии мерокринового типа секреции, сопутствующие кишечным эпителиям
16	END	hepatocytes	гепатоциты
17	END	pancreocytes	панкреациты
<b>Добавочные (факультативные) морфотипы</b>			
18	ExtEmbr	parietal endoderm	вариации морфотипов первичной экстраэмбриональной энтодермы (висцеральной и париетальной)
19	ExtEmbr	cytotrophoblast	цитотрофобласт
20	ExtEmbr	sincytiotrophoblast	синцитиальный трофобласт
21	ExtEmbr	yolk sac epithelium	производные желточного мешка
22	–	undifferentiated (ES cells, EC cells)	очаги недифференцированных клеток, возможно – клетки эмбриональной карциномы
23	ECT	skin glands	простые кожные железы
24	ECT	organum enamelium	эпителиальные скопления зубных зачатков, «эмалевые линзы»
25	ECT	hair follicles	закладки волосяных фолликулов
26	MES	tendon-like structures	участки сухожилий
27	MES	sinovial-like structures	участки синовиальных щелей, локализуются только рядом с участками гиалинового хряща
28	MES	capillary fields (capillaries)	участки обильного разрастания эндотелиальных трубок, заполненных кровью или тканевой жидкостью
29	MES	renal epithelia	эпителиальные трубки, образованные разными почечными эпителиями

ECT – эктодерма; MES – мезодерма; ENT – энтодерма; ExtEmbr – экстраэмбриональные производные.



**Рис. 3.** Основные морфотипы, происходящие из эктодермы (А, Г), энтодермы (Б, Д) и мезодермы (В, Е) вместе с морфотипами экстраэмбриональных производных (Ж–И). А – розетки эмбрионального нейроэпителия; Б – меланоциты и пигментные эпителии; В, Д – различные эпителии кишечной трубки; В – обширные очаги эритропоэза; Е – костные элементы, сформированные путем первичного (мембранозного) остеогенеза. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: А, Е, Ж, И  $\times 100$ ; Б, Д, Ж  $\times 40$ ; Г  $\times 20$ ; В  $\times 5$

Далее были выделены основные клеточные ансамбли, которые встречаются в экспериментальных СК-происходящих опухолях *in situ*. Это самые разнообразные эпителиальные трубки: простые (a) и сложные (b); комплексы трубок с рыхлой соединительной тканью (c); комплексы трубок с железистой (d) и гладкомышечной (e) тканью; комплексы хрящевой и костной тканей (f); хрящевой и мышечной ткани (g); костной ткани и плотной соединительной ткани (h); костной и гемопоэтической тканей (i). Нередко в опухолях *in situ* формируются клубочки мезонефроса (j); закладки зубов (k) и глазного бокала (l); обширные капиллярные поля с анастомозами (m). Времена от времени образуются отдельные кластеры волосяных фолликулов (n) и закладок простых кожных желез (o). Довольно часто встречаются комплексы экстраэмбриональных морфотипов, например, цитотрофобласт соседствует с участками синцитиального трофобласта (p) в окружении

обширных лакун излитой из капилляров и поглощаемой экстраэмбриональными клетками крови (q).

Для оценки доброкачественности и злокачественности опухоли предложены следующие морфологические критерии: однородность и сложность строения опухоли (A); наличие специфических хорошо узнаваемых опухолевых морфотипов (B); наличие плотной соединительнотканной капсулы (C) и полей инвазии опухоли в соседние ткани (D); наличие капиллярных полей (E), участков высокой пролиферативной активности (F), обширных зон некроза (G) и лакун, заполненных гемолизованной кровью, клеточным дебрисом или экссудатом (H). В опухолях *in situ* обнаружены малигнизированные участки, имеющие карциномную, адено-карциномную, нейробластомную, базалиомную, эпителиомную, скirro-подобную, саркомную и т.п. структуру. Малигнизированные участки присутствуют хотя и довольно часто, но далеко не во всех опухолях *in situ*.



Для оценки пространственной организации опухоли *in situ* предложен критерий «однородность строения». Он может быть выражен качественно — оператор визуально оценивает опухоль по серии препаратов как однородную или неоднородную. Критерий может быть выражен также и количественно — через подсчет диагностических морфотипов (табл. 2) и/или клеточных ансамблей (карта a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m-n-o-p-q, см. описание выше в тексте), которые пересекают учетный отрезок, либо находятся внутри учетного квадрата.

Стандартизация отбора проб опухолевого материала и формализация морфологических описаний — вот, на наш взгляд, два важных требования к проведению ТТ. Именно они создают возможность перевода, по сути, качественного морфологического теста (*qualitative morphological assay*) в желаемый формат количественной оценки потенциала СК. Из-за того,

что опухоли *in situ* очень разнообразны по своей макроскопической и микроскопической организации (рис. 1, 2; табл. 1, 2), сокращение числа образцов из соображений «быстрее получить результаты» необратимо приводит к потере важной информации о структуре опухоли и — соответственно — о потенциале тестируемых СК. Учитывая обстоятельство, что производные эктодермы в целом весьма необильны в СК-происходящих опухолях, при сокращении числа образцов исследователь рискует потерять принципиально важную информацию и потенциале линий СК в условиях *in vivo* (табл. 3). Оптимальное число независимых образцов для каждого нового эксперимента необходимо подбирать эмпирически. Так из табл. 3 следует, что для двух тестируемых нами линий СК крысы [32] оптимум составил на 3–4 независимых (т.е. несоседних, не имеющих общих границ) образца.

**Таблица 3.** Зависимость результатов гистологического анализа одной и той же опухоли от числа взятых из нее образцов. N — число независимых (несоседних) образцов материала, использованных в гистологическом анализе одной и той же опухоли *in situ*

Линия	N	Диагностическое заключение о структуре опухоли		
		Всего морфотипов <sup>1</sup>	Всего клеточных ассоциаций и ансамблей <sup>2</sup>	Представленные листки
dB50	1	4	0	MES
ЭСК	2	11	0	MES, ExtEmbr
	3	11	1	ECT, MES, ExtEmbr
NF7 ИПСК	1	6	0	ECT, MES, ExtEmbr
	2	8	0	ECT, MES, ExtEmbr
	3	11	2	ECT, MES, ExtEmbr
	4	15	2	ECT, MES, ENT, ExtEmbr
	5	19	2	ECT, MES, ENT, ExtEmbr

<sup>1</sup> Списки диагностических морфотипов (см. таблицу 2);

<sup>2</sup> описанная выше в тексте карта a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m-n-o-p-q;

ECT — эктодерма; MES — мезодерма; ENT — эндодерма; ExtEmbr — экстраэмбриональные производные; ЭСК — эмбриональные стволовые клетки; ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

## Заключение

Таким образом, мы предлагаем схему оптимизации ТТ, основанную на учете особенностей структурной организации опухолей, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, введенных в гетеротопические сайты. Получаемая при анализе гистологических препаратов информация оказывается полнее и достовернее, поскольку приведенный список диагностических параме-

тров значительно шире, подробнее и удобнее всех опубликованных ранее. Первичный морфологический очерк и гистологическая информация далее могут быть формализованы и проведены через многофакторный анализ, например методом главных компонент или методом многомерного шкалирования. Следовательно, данный алгоритм способствует более полной и объективной оценке плюрипотентности исследуемых линий СК в условиях *in vivo*.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Hogan B., Beddington R., Constantini F. et al., editors. *Manipulating the Mouse Embryo*. 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994.

2. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten C., et al., editors. *Manipulating the Mouse Embryo*. 3d Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2003.

3. Hentze H., Soong P.L., Wang S.T. et al. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res.* 2009; 2: 198-210.

4. Muller F.J., Goldman J., Loser P. et al. A call to standardize teratoma assays used to define human pluripotent cell lines. *Cell Stem Cell.* 2010; 7: 412-14.

5. Кизилова Е.А. «Тест на химеризм»: возможности и превратности метода. В: Закиян С.М., Власова В.В., Дементьева Е.В., редакторы. Эпигенетика. Новосибирск: Издательство СО РАН; 2012. С. 343-57.

6. Rousset J., Bucchini D., Jami J. Hybrids between F9 nullipotent teratocarcinoma and thymus cells produce multi-differentiated tumors in mice. *Dev. Biol.* 1983; 96: 331-6.

7. Robertson E. J. Pluripotential stem cell lines as a route into the mouse germ line. *Trends Genet.* 1986; 2: 9-13.
8. Thomson J.A., Itskovich-Elder J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-47.
9. Damjanov I., Anrews P.W. The terminology of teratocarcinomas and teratomas. *Nat. Biotech.* 2007; 25: 1212.
10. Damjanov I. Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 1993; 37: 39-46.
11. Andrews P.W. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 2002. 357: 405-17.
12. Przyborski S.A., Christie V.B., Hayman R. et al. Human embryonal carcinoma stem cells: models of embryonic development in humans. *Stem Cells Dev.* 2004; 13(4): 1-9.
13. Przyborski S.A. Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune deficient mice. *Stem Cells.* 2005; 23: 1242-50.
14. Damjanov I. The road from teratocarcinoma to human embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 2005; 5: 273-76.
15. Bulic-Jakus F., Ulamec M., Vlabovich M. et al. Of mice and Men: teratomas and teratocarcinomas. *Call. Anthropol.* 2006; 4: 921-24.
16. Blum B., Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. In: *Advances in Cancer Research.* NY: Elsevier Inc; 2008. p. 133-58.
17. Ben-David U., Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 11: 268-77.
18. Lensch W., Schlaeger T.M., Zon L.I. et al. Teratoma formation assays with human embryonic stem cells: a rationale for one type of human-animal chimera. *Cell Stem Cell.* 2007; 1(3):253-8.
19. Behringer R.R. Human-animal chimeras in biomedical research. *Cell Stem Cell.* 2007; 1: 259-62.
20. Siqueira da Fonseca S.A., Abdelmassih S., de Mello Cintra Lavagnoli T., et al. Human immature dental pulp stem cells' contribution to developing mouse embryos: production of human/mouse preterm chimaeras. *Cell Prolif.* 2009; 42(2): 132-40.
21. Simerly C., McFarland D., Castro C. et al. Interspecies chimera between primate embryonic stem cells and mouse embryos: monkey ESCs engraft into mouse embryos, but not post-implantation fetuses. *Stem Cell Res.* 2011; 7(1): 28-40.
22. Du L., Xu X., Duan X. et al. Developmental incompatibility of human parthenogenetic embryonic stem cells in mouse blastocysts. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2012; 48(3): 156-64.
23. Karpowicz P., Cohen C.B., Derek van der Kooy. Developing human-nonhuman chimeras in human stem cell research: ethical issues and boundaries. *Ken. Inst.of Eth. J.* 2005; 15(2): 107-34.
24. Chen I-P., Fukuda K., Fusaki N. et al. Induced pluripotent stemm cells Reprogramming by integration-free sendai virus vectors from peripheral blood of patients with craniometaphyseal dysplasia. *Cell. Reprogram.* 2013; 15(6): 503-13.
25. Zhao H., Davies T.J., Ning J. et al. A highly optimized protocol for reprogramming cancer cells to pluripotency using nonviral plasmid vectors. *Cell. Reprogram.* 2015; 17(1): 7-18.
26. Buta C., David R., Dressel R. et al. Reconsidering pluripotency tests: Do we still need teratoma assay? *Stem Cell Res.* 2013; 11: 552-62.
27. Muller F.J., Schuldt B.M., Williams R. et al. A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nat. Methods.* 2011; 8: 315-17.
28. Hagedorn M., Javerzat S., Gilger D. et al. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *PNAS* 2005; 102: 1643-48.
29. Durupt F., Koppers-Lalic D., Balme B. et al. The chicken chorioallantoic membrane tumor assay as model of qualitative of oncolytic adenoviruses. *Cancer. Gen. Ther.* 2012; 19: 58-68.
30. Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Zhelezova A.I. et al. Stem cells giving rise to extraembryonic tissues. *Cell Technol. Biol. Med.* 2011; 4: 504-14.
31. Vasilkova A.A., Kizilova E.A., Puzakov M.V. et al. Dominant manifestation of pluripotency in embryonic stem cell hybrids having various numbers of somatic chromosomes. *Mol. Reprod. Dev.* 2007; 74: 941-51.
32. Menzorov A.G., Matveeva N.M., Markalis M.N. et al. Comparison of American mink embryonic stem and induced pluripotent stem cell transcriptomes. *BMC GENOMICS.* 2015; 16(13):S6.
32. Vaskova E.A., Medvedev S.P., Sorokina A.E. et al. Transcriptome characteristics and X-chromosome inactivation status in cultured rat pluripotent stem cells. *Stem Cell Dev.* 2015; 24(24): 2912-24.
34. Menzorov A, Pristiyazhnyuk I, Kizilova H. et al. Cytogenetic analysis and Dlk1-Dio3 locus epigenetic status of mouse embryonic stem cells during early passages. *Cytotechnology* 2016; 68(1): 67-71.
35. James R.M, Arends M.J., Plowman S.J. et al. K-ras Proto-oncogene exhibits tumor suppressor activity as its absence promotes tumorigenesis in murine teratomas. *Mol. Cancer Res.* 2003; 1: 820-5.

*Поступила: 01.04.2016*