

СПОНТАННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И ИММОРТАЛИЗАЦИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

© Б. В. Попов,¹ Н. С. Петров,¹ В. М. Михайлов,¹ А. Н. Томилин,¹ Л. Л. Алексеенко,¹
Т. М. Гринчук,¹ А. М. Зайчик²

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и

² С.-Петербургская государственная медицинская академия последипломного образования Росздрава;
электронный адрес: popov478@hotmail.com

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) обладают пластичностью и неограниченной пролиферативной активностью *in vitro*, что делает их привлекательным объектом исследований, направленных на поиск новых ресурсов для восстановительной терапии. Использование МСК эффективно при лечении дегенеративных и воспалительных заболеваний различных органов, однако биологические основы терапевтической эффективности МСК остаются не совсем понятными. Мы установили, что при длительном пассировании *in vitro* МСК, экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок (GFP), происходило прогрессивное увеличение их пролиферативной активности, снижение адгезивности, потеря дифференцированного потенциала и экспрессии маркерного белка GFP. МСК уже на первых пассажах характеризовались кариотипическими признаками трансформации, что на поздних пассажах сочеталось с возникновением опухолевых свойств. Клетки опухоли, полученной из МСК, при эксплантации в культуру *in vitro*, подобно родительским клеткам, не экспрессировали GFP и не индуцировались к дифференцировке, но в отличие от исходных клеток проявляли сниженную клоногенную и пролиферативную активность. Мы предполагаем, что даже краткосрочное культивирование МСК *in vitro* сопряжено с их спонтанной трансформацией, а иммортальность, лежащая в основе неограниченно долгого размножения МСК вне организма, может быть следствием их трансформации, а не исходным свойством стволовых клеток.

Ключевые слова: мультипотентные стромальные клетки, культура *in vitro*, кариотипирование, спонтанная трансформация.

Принятые сокращения: КОЭ — эксплантаты клеток опухоли, МСК — мезенхимные стволовые клетки, СК — стволовые клетки, РС — ростовая среда, ЭБС — эмбриональная бычья сыворотка, Cdk — циклинзависимые киназы.

Стволовые клетки (СК) обладают способностью к неограниченно долгому самоподдержанию собственной популяции и дифференцировке в клетки различной тканевой специфичности (Reya et al., 2003). В костном мозге содержатся два различных типа соматических СК — кроветворные СК и мезенхимные стволовые клетки (МСК). МСК, поддерживающие рост кроветворных СК в костном мозге, в опытах *in vitro* показывают определенный потенциал к дифференцировке в клетки всех трех зародышевых ростков, а *in vitro* дифференцируются в клетки различных мезодермальных линий (Friedenstein, 1976; Pittenger et al., 1999; Herzog et al., 2003). Благодаря своим регенеративным свойствам, простоте получения и доступности для биоинженерных манипуляций МСК становятся все более привлекательным объектом медико-биологических исследований, направленных на реконструкцию различных тканей и органов. Регенеративный потенциал МСК позволяет рассматривать их в качестве терапевтического эквивалента эмбриональных СК, клиническое применение которых ограничено законодательствами некоторых стран (Serakinci, Keith, 2006). МСК характеризуются следующими основными свойствами: 1) способностью поддержи-

вать в культуре *in vitro* пролиферативный потенциал, значительно превышающий 50 удвоений; 2) способностью дифференцироваться в клетки мезодермального происхождения (костей, хрящей, сухожилий, связок, жировой ткани, мышц и т. д.); 3) пластичностью, т. е. способностью при определенных условиях принимать необычный функциональный фенотип (например, эпителиальный, присущий клеткам различных тканей энтодермального и эктодермального происхождения); 4) способностью прикрепляться и делиться на твердой поверхности, что лежит в основе метода выделения МСК (Heyflick, 1965; Pereira et al., 1998; Herzog et al., 2003).

Изучение МСК было начато А. Фриденштейном, который показал, что МСК костного мозга клонируются *in vitro*, а в организме донора образуют костную ткань, во внутренней полости которой поддерживается кроветворение клеток хозяйского организма (Friedenstein, 1976). В последующих работах было найдено, что МСК животных различных видов обладают способностью дифференцироваться в клетки многих тканей, имеющих мезодермальное происхождение, исключая кроветворные клетки (Prockop, 1997; Phinney et al., 1999; Pittenger et al., 1999), а также в

нервные клетки (Woodbury et al., 2000). Современные исследования показывают, что МСК, выделенные из различных источников — плаценты, пуповинной крови, жировой ткани, костного мозга, головного мозга, поперечно-полосатых мышц, — обладают *in vivo* и *in vitro* способностью дифференцироваться в клетки всех зародышевых ростков подобно эмбриональным СК (Jiang et al., 2002; De Coppi et al., 2007).

В настоящее время проводятся широкие исследования экспрессии эффекторных и регуляторных генов МСК и эмбриональных СК с целью сравнить их пролиферативный и дифференцировочный потенциал, изучить общие механизмы эпигенетической регуляции самоподдержания и дифференцировки (Wagner et al., 2005; Phinney et al., 2006). Как в нашей стране, так и за рубежом проводятся преclinical и клинические испытания МСК, направленные на лечение таких распространенных заболеваний, как болезнь Паркинсона, инфаркт миокарда, сахарный диабет, цирроз печени, травматические повреждения опорного аппарата и мн. др. (Шумаков и др., 2003а, 2003б; Shu et al., 2004; Street et al., 2004; Кругляков и др., 2005; Пальцев и др., 2006). По данным американского правительственного сайта в Интернете (<http://www.clinicaltrials.gov/ct/search?term=stem+cell&submit=Search>) за 2008 г., из 1276 описанных случаев применения СК в 42 случаях были использованы МСК. Хотя МСК оказывают положительное влияние при лечении различных заболеваний, современные исследования показывают, что терапевтический эффект МСК зависит не столько от прямой интеграции МСК в ткань реципиента, сколько от секреции этими клетками растворимых белков, усиливающих репаративную активность тканей различной специфичности путем ингибции апоптоза, воспаления, реакции трансплантат против хозяина и хозяин против трансплантата, стимуляции пролиферации эндогенных СК (Phinney, 2007).

Идентификация МСК как СК, обладающих способностью к неограниченно долгому самоподдержанию, в текущих исследованиях основана на оценке их пролиферативной и клоногенной активности, которая является свойством временно амплифицирующихся клеток. Более объективной характеристикой СК является их способность к асимметричному делению, при котором одна дочерняя клетка сохраняет стволовые свойства, а другая теряет их и коммитируется к дифференцировке в тканеспецифические клетки. В этой связи до сих пор не существует доказательств того, что МСК являются истинными СК. Можно предположить, что пролиферативная и клоногенная активность МСК в культуре *in vitro* является вторичной, связанной со спонтанной трансформацией этих клеток, вызванной стрессовыми факторами в процессе культивирования. Роль стрессовых воздействий в механизме трансформации клеток различной тканевой специфичности в культуре *in vitro* хорошо документирована в современных публикациях (Campisi, Fagagna, 2007).

Цель настоящей работы заключалась в оценке карิโอтипических и фенотипических свойств МСК в ходе пассирования *in vitro*. Полученные результаты могли быть использованы для формирования представлений о возможности терапевтического использования МСК, культивируемых вне организма в стандартных условиях. Мы установили, что в процессе длительного пассирования МСК, экспрессирующие зеленый флуоресцирующий белок (GFP), обладали прогрессирующей увеличенной пролиферативной активностью, которая сочеталась со

снижением их адгезивности, потерей дифференцировочного потенциала и экспрессии маркерного белка GFP. Карิโอтипические признаки трансформации, характерные для МСК на самых ранних пассажах, не приобретали специфического рисунка в процессе культивирования, однако на поздних пассажах сочетались с появлением туморогенности. Клетки опухоли, полученной из МСК, эксплантационные в культуру *in vitro*, подобно родительским клеткам не экспрессировали GFP и не индуцировались жировой дифференцировке, но в отличие от них проявляли сниженную клоногенную и пролиферативную активность. Мы предполагаем, что краткосрочное культивирование МСК *in vitro* сопряжено с их спонтанной трансформацией. Имортальность, лежащая в основе неограниченно долгого размножения МСК вне организма, может быть следствием их трансформации, а не исходным свойством стволовых клеток.

Материал и методика

Культура клеток. Клетки линий А-549 (немелкоклеточной карциномы легких человека, NSCLC), Calu-3 (чешуйчатой клеточной карциномы легких), С3Н10Т1/2 (полипотентных эмбриональных фибробластов мыши) и С2С12 (мышинных миобластов) были получены из Американской коллекции клеточных культур (АТСС) и культивировались в ростовой среде (РС) Дульбекко (DMEM/F12), содержащей 25 мМ Нерес и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС). Трансгенные мыши-самцы С57ВL/6-Tg(ActbEGF)10sb/J, экспрессирующие GFP, были приобретены в коммерческой лаборатории (Jackson Laboratories, США). Для получения МСК двух самцов GFP умерщвляли путем смещения шейных позвонков. Костный мозг большеберцовых и бедренных костей получали от каждой мыши путем вымывания его из кости РС. Костномозговые клетки отмывали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин, подсчитывали в камере Горяева в присутствии трипанового синего для оценки жизнеспособности, ресуспендировали в РС с плотностью $5 \cdot 10^6$ /мл и культивировали в концентрации $2 \cdot 10^6$ /мл в 4—6-луночных культуральных пластинах в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С, пассаж 0 (П0). Через 72 ч культивирования не прикрепившиеся к пластику клетки удаляли путем смены среды и пипетированием. Через 18 сут культуры клеток с плотностью роста 90 % отмывали дважды фосфатным буфером (PBS) и в каждую ячейку 6-луночной пластины добавляли по 0.5 мл смеси 0.25%-ного трипсина и 0.01%-ного ЭДТА на 10 мин при 37 °С. Затем клетки отделяли от пластика с помощью стерильного пластикового скребка и интенсивного пипетирования, ресуспендировали в 40 мл РС и культивировали в 4 культуральных чашках диаметром 100 мм, пассаж 1 (П1). Клетки пересевали в последующих пассажах при достижении ими плотности роста 90 % путем посева чашки в 2 или 3—10 таких же чашек в следующей последовательности: 1/2 (П1—2), 1/3 (П3—5), 1/4 (П6), 1/5 (П7—9), 1/7 (П10) и 1/10 (П11—14).

Оценку пролиферативной активности МСК проводили с помощью двух различных подходов. В первом пролиферативную активность определяли в усл. ед. как произведение кратности деления клеток при данном пассаже, умноженное на его продолжительность в сутках, выраженных в процентах. Продолжительность отдельных пассажей составляла (в сут): П1 — 10, П2—3 — 5, П4 —

8, П5 — 4, П6 — 3, П7—10 — 5, П11 — 6, П12 — 4, П13—14 — 5. Во втором подходе определяли время удвоения МСК путем многократного пересева и подсчета экспоненциально растущих клеток. Клетки ($2 \cdot 10^4$) помещали в одну ячейку 24-луночного планшета. Число клеток подсчитывали 6 раз через 48 ч одновременно в трех различных ячейках. Время удвоения (D) определяли по следующей формуле: $D = t \log_{Xo/Xf} 2$, где $t = 48$ ч, Xo/Xf — число клеток соответственно в начале и конце эксперимента.

Насыщающую плотность роста определяли при помещении $2 \cdot 10^4$ экспоненциально растущих клеток в ячейку 24-луночного планшета. Число клеток подсчитывали в трех различных ячейках каждый день до прекращения их пролиферативной активности. Среднюю величину плотности насыщения определяли, суммируя 6 индивидуальных значений, найденных в день максимального увеличения числа клеток и на следующий день после него.

Индукция дифференцировки МСК. Жировую дифференцировку МСК вызывали, культивируя клетки в течение 3 нед в ростовой среде, содержащей 1 мМ дексаметазона и 5 мкг/мл инсулина. Клетки, содержащие капли жира, выявляли при фиксации культур в 4%-ном параформальдегиде в PBS 1 ч при комнатной температуре с последующей окраской 3.75%-ным красителем масляным красным в изопропанол, разведенном дистиллированной водой в соотношении 1 : 3 (Meirelles, Nardi, 2003). Костную дифференцировку вызывали при культивировании клеток в РС, содержащей 10 мМ β -глицеролфосфата, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 0.1 мМ дексаметазона в течение 3 нед. Клетки, содержащие кальциевый преципитат, визуализировали после 2-кратной отмывки PBS с последующей окраской в течение 5 мин 2%-ным ализариновым красным, pH которого доводили до 4.2 с помощью гидроксида аммония (Phinney et al., 1999). Для индукции мышечной дифференцировки клетки культивировали в РС, содержащей 1.5 мкг/мл амфотерицина В, в течение 2 нед, затем еще 1 нед в среде без амфотерицина. Маркер мышечной дифференцировки — десмин — выявляли в клетках путем иммунофлуоресцентной окраски со специфическими антителами. Иммунофлуоресцентные препараты анализировали на сканирующем конфокальном микроскопе LSM 5 Pascal, используя лазеры с длинами волн 488 и 543 нм, а окрашенные красителями ализариновым красным и масляным красным — в проходящем свете на микроскопе Zeiss Axiovert 40.

Эксплантаты клеток опухоли (КОЭ) получали в стерильных условиях путем измельчения кусочка ткани опухоли, полученной при подкожном введении МСК самке мыши линии C57BL. Ткань опухоли помещали в РС на 100-миллиметровую культуральную чашку на 72 ч, мигрировавшие из ткани и распластанные на пластике клетки отделяли раствором трипсина и в последующем культивировали в тех же условиях, что и МСК, полученные из костного мозга.

Оценка клоногенной активности. МСК различных пассажей и клетки эксплантантов опухоли (КОЭ) культивировали по 400 и 1000 клеток на 60-миллиметровых пластиковых чашках в стандартной РС в течение 3 нед. Выросшие колонии окрашивали в течение 2 мин спиртовым раствором генциан-виолетового, промывали несколько раз дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре; опыты повторяли дважды.

Оценку туморогенности проводили при трансплантации МСК 12—15-го и 43—47-го пассажей, которые находились в логарифмической фазе роста (70%-ная

плотность насыщения), нормальным сингенным реципиентам или мышам с экспериментальной дистрофией Дюшена (mdx). Мыши mdx были щедрым подарком д-ра Т. Партриджа (Hammersmiten Hospital, London), предоставленным нам для содержания и проведения опытов д-ром В. С. Барановым (НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, Санкт-Петербург). Перед введением мышам-реципиентам клетки на чашках дважды отмывали PBS, отделяли от пластиковой поверхности раствором трипсина, дважды отмывали центрифугированием в PBS в течение 5 мин при 1000 об/мин и ресуспендировали в концентрации $5 \cdot 10^6$ /мл в РС без ЭБС, содержащей 50 ед./мл гепарина. МСК вводили подкожно, внутримышечно или внутривенно в ретроорбитальный синус 8—12-недельным нормальным мышам-самкам линии C57BL массой 18—22 г, полученным из питомника лабораторных животных Рапполово (Россия). За 30 мин до внутривенного переноса клеток мышам вводили внутривенно 30 ед. гепарина в 0.5 мл РС. Ретроорбитальное введение клеток проводили под ингаляционным наркозом, который вызывали у мышей с помощью этилового эфира. Мышам mdx МСК вводили внутримышечно.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Электрофорез белков проводили в 8%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Для приготовления проб клетки, растущие в культуральных чашках, промывали дважды PBS, удаляли с чашек пластиковым скребком, осаждали центрифугированием и лизировали в течение 30 мин на льду в трех объемах буферного раствора (относительно объема плотного осадка клеток), содержащего 25 мМ Трис-НСl (pH 7.4), 250 мМ NaCl, 0.25%-ный детергент NP-40, 1 мМ PMSF и коктейль ингибиторов протеолиза в соотношении 1 : 100. Экстракты клеток центрифугировали 15 мин при 13 000 g и 4 °C. Пробы уравнивали по количеству общего белка, определяемого с помощью реактива Брэдфорд, переносили в микропробирки, содержащие равный объем буфера, для нанесения проб на гель (4 % додецилсульфата натрия, 30 % глицерина, 200 мМ дитиотреита, 120 мМ Трис-НСl, pH 6.8, 0.002 % бромфенолового синего), кипятили 5 мин на водяной бане и наносили в объеме 25 мкл, содержащем 30 мкг общего белка, на одну дорожку полиакриламидного геля. Электрофоретически разделенные белки переносили с геля на мембрану PVDF с помощью полусухого электропереноса. Белки на мембране выявляли специфическими антителами и визуализировали реактивом ECL.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. МСК окрашивали на внутриклеточные белки (гладкомышечный актин, виментин, десмин, GFP) по следующему протоколу: покровные стекла с клетками, распластанными при росте в культуре, переносили в 35-миллиметровые культуральные чашки, клетки однократно отмывали PBS 5 мин, фиксировали 4%-ным параформальдегидом 15 мин, затем 70%-ным этиловым спиртом в течение ночи при 4 °C; обрабатывали 0.2%-ным детергентом Тритоном X-100 10 мин, промывали PBS 2 раза по 5 мин, сайты неспецифического связывания антител блокировали 1 ч раствором, содержащим 3 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0.1 % Твина 20; затем на клетки наносили специфические антитела в разведении 1 : 50—1 : 200 в блокирующем растворе на 1 ч при комнатной температуре, промывали 3 раза по 5 мин PBS, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре видоспецифическими антителами, распознающими аллотипы иммуноглобулинов специфических антител, конъюгированными с флуоресцентной

меткой, отмывали 3 раза по 5 мин PBS. Ядра клеток красили 30 мин при комнатной температуре красителем DAPI в концентрации 1 нг/мл в блокирующем растворе, затем препараты промывали 2 раза PBS и заключали в среду Anti-Fade, уменьшающую неспецифическую флуоресценцию.

Приготовление метафазных хромосом проводили тем же способом, который описан ранее (Гринчук и др., 2008). Для кариологического анализа использовали клетки в логарифмической фазе роста. Накопление митотирующих клеток достигалось введением в активно пролиферирующую культуру 0.04 % колхицина на 1.0—1.5 ч. При гипотонической обработке клеток использовали 0.56%-ный KCl. Клетки фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. Клеточную суспензию раскапывали на влажные охлажденные предметные стекла и высушивали при комнатной температуре. Окрашивание хромосом проводили по модифицированному методу (Seabright, 1971) красителем Гимза в PBS, pH 6.2, после их предварительной обработки 0.25%-ным трипсином.

Анализ кариотипа осуществляли с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия), используя объективы 100×, и по микрофотографиям. Идентификацию нормальных хромосом мыши проводили в соответствии со стандартной номенклатурой (Committee on Standardized Genetic Nomenclature for mice, 1972; Cowell, 1984).

Антитела. Использовали следующие антитела: мышинные моноклональные антитела против гладкомышечного актина (NeoMarkers, США); мышинные моноклональные антитела против виментина (NeoMarkers, США); мышинные моноклональные антитела, распознающие белки с мол. массами 59, 58, 56, 52.5, 56.5, 54, и 45 кДа и соответствующие цитокератинам 4, 5, 6, 8, 10, 13 и 18 (Calbiochem, США); поликлональные антитела против GFP (Sigma, США); мышинные моноклональные антитела против десмина — супернатант гибридомы, продуцирующей антитела к десмину, полученной из Банка клеточных культур Университета штата Айова, США; кроличьи поликлональные антитела против β -катенина (Abcam, Великобритания); видоспецифичные антитела Alexa Fluor®568, Fab-фрагмент кроличьих антимышечных антител (Invitrogen, США); Alexa Fluor®633, Fab-фрагмент козлиных антител против легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов кролика (Invitrogen, США).

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: Anti-Fade, PVDF, полиакриламид для электрофореза и реактив Брэдфорд (BioRad, США); аскорбиновая кислота, ализариновый красный, БСА, β -глицеролфосфат, гидроксид аммония, додецилсульфат натрия, изопропанол, инсулин, коктейль ингибиторов протеолиза, колхицин, масляный красный, NP-40, DAPI, PMSF, параформальдегид, Тритон X-100 и Трис (Sigma, США); трипсин, содержащий 1 мМ ЭДТА, среда DMEM/F12 и ЭБС (Invitrogen, США); ECL (Millipore, США); культуральные пластиковые чашки (Sarstedt, Германия); Twin 20 (Bio Chemica, Германия); этиловый эфир (Вектон, Россия); KCl, метиловый спирт и уксусная кислота (Реахим, Россия); гепарин (Белмедпрепараты, Белоруссия); нефлуоресцирующее иммерсионное масло (Carl Zeiss, Швейцария); краситель Гимза и таблетки для приготовления буфера PBS (BDH, Великобритания); дексаметазон (KRKA, Словения).

Мышей облучали дозой 5 Гр (мощность дозы 0.451 Гр/мин, напряжение 200 кВ, сила тока 13 мА, филь-

тры 0.5 мм Cu и 1.0 мм Al, фокусное расстояние 50 см), МСК вводили через 24 ч после их облучения в 0.5 мл РС без ЭБС.

Результаты

Характеристика маркерной и дифференцировочной активности МСК. МСК, полученные нами из костного мозга трансгенных мышей GFP, в культуре на первых пассажах представляли собой большие распластаные клетки, растущие с низкой плотностью насыщения и монослойным ростом. Используя метод иммуноблоттинга, мы обнаружили, что в отличие от клеток стабильных линий различной тканевой специфичности МСК продуцировали маркерный белок GFP, но не панцитокератин, экспрессия которого была характерна для клеток эпителиального происхождения (рис. 1, а). При использовании лазерной иммунофлуоресцентной микроскопии мы выяснили, что МСК экспрессировали GFP, гладкомышечный актин и виментин — маркерный белок клеток фибробластного происхождения (рис. 1, б). МСК ранних пассажей были чувствительны к жировой, костной и мышечной дифференцировке, что проявлялось соответственно в накоплении жировых включений, кальциевых преципитатов (рис. 1, в) или в продукции десмина, белка промежуточных филаментов, что показано ранее (Porov et al., 2007).

Пролиферативная и туморогенная активность МСК. Пролиферативная активность МСК при оценке времени насыщения на первых 4 пассажах была низкой. В течение следующих 5 пассажей скорость клеточного деления МСК возрастала и к 14-му достигала плато, увеличиваясь по сравнению с таковой на первых пассажах в 3 раза (рис. 2, а). Аналогичные данные были получены нами при оценке пролиферативной активности МСК с помощью определения времени удвоения, которое на 9-м пассаже составляло 54.4 ч и сокращалось до 19.8 ч к 52-му (рис. 2, б).

В процессе длительного пассирования МСК изменяли свою форму, превращаясь из больших распластаных на пластике клеток в вытянутые веретенообразные клетки, растущие с большей плотностью насыщения. До 25-го пассажа МСК сохраняли параллельную осевую ориентацию и монослойный характер роста даже при предельном насыщении. МСК 43—47-го пассажей демонстрировали значительно более высокую плотность насыщения, в условиях которой соседние клетки показывали хаотическую осевую ориентацию по отношению друг к другу, что часто проявлялось в перекрестном расположении и частичном наложении соседних клеток. Однако даже при высокой насыщающей плотности рост МСК не был многослойным. Насыщающая плотность роста МСК от 9-го к 16-му пассажу увеличивалась в 2 раза, а к 52-му — в 10 раз (рис. 2, в).

Кариологический анализ МСК. Как было показано нами ранее, МСК уже на 6-м пассаже (7 нед культивирования) характеризовались генетически нестабильным, анеуплоидным кариотипом. Число хромосом в клетках варьировало в широких пределах — от околодиплоидного до околооктаплоидного, модальный класс не был выражен. Помимо перестроенных хромосом, представленных разным числом копий, в хромосомном наборе присутствовали различные типы перестроенных хромосом. Одна из них была отнесена к разряду маркерных, так

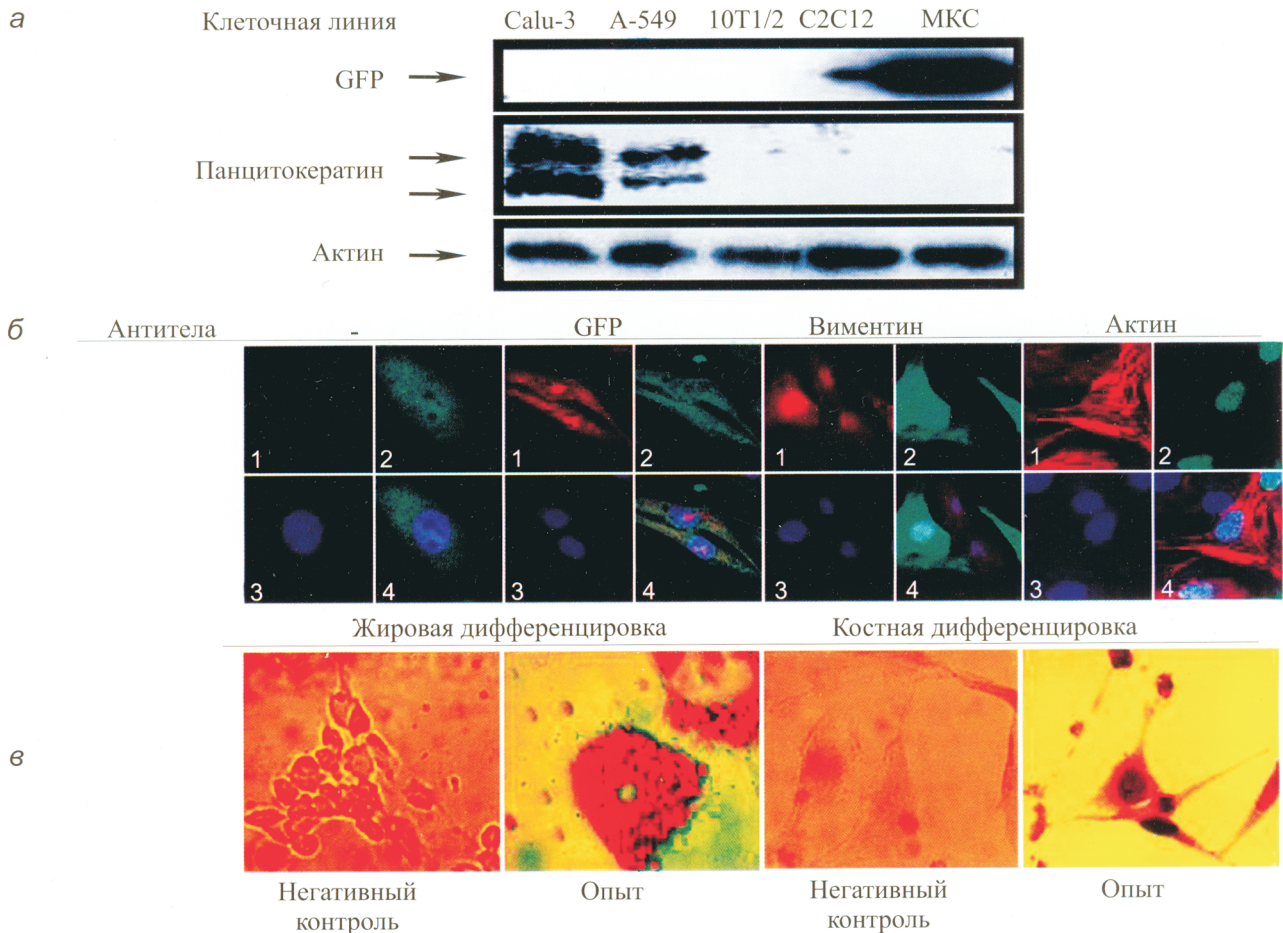


Рис. 1. Экспрессия маркерных белков и дифференцировочная активность МСК.

а — иммуноблоттинговая оценка экспрессии GFP в МСК в клетках стабильных линий различного тканевого происхождения. GFP и панцитокератин в экстрактах клеток стабильных линий, происходящих из эпителия (А-549 и Calu-3), миобластов (С2С12), фибробластов (10Т1/2) и МСК, экспрессирующих GFP, электрофоретически разделяли в 8%-ном полиакриламидном геле, переносили на мембрану PVDF и визуализировали специфическими антителами и реактивом ECL, как это описано в разделе «Материал и методика». *б* — иммунофлуоресцентная характеристика экспрессии виментина, гладкомышечного актина и GFP в культуре МСК: 1 — специфические антитела, 2 — естественная флуоресценция, 3 — окраска DAPI, 4 — совмещение всех изображений. Изображения получены на электронном сканирующем микроскопе Pascal, лазеры с длинами волн 488 и 543 нм, об. 100×. *в* — индуцированная дифференцировка МСК в клетки жирового и костного происхождения в культуре. В качестве негативного контроля использовали МСК тех же пассажей, не индуцированные к дифференцировке. Изображения получены на микроскопе Zeiss Axiovert 40, об. 10×.

как была выявлена во всех проанализированных клетках. В некоторых метафазных пластинках наблюдали наличие сверхмелких микрохромосом, рассматриваемых как один из морфологических вариантов амплификации генов (Гринчук и др., 2008).

Кариологический анализ МСК на 46-м пассаже (30 нед культивирования) не выявил выраженных изменений кариотипа по сравнению с таковым на 6-м. Как и на первых этапах культивирования, МСК характеризовались существенной кариотипической гетерогенностью, сопряженной прежде всего с нестабильностью копийности негомологичных хромосом. Тем не менее, если на 6-м пассаже число копий той или иной хромосомы варьировало от 0 до 5 при преимущественном экстракопировании отдельных хромосом в интервале 3—5 копий, то на 46-м число копий хромосом набора варьировало от 0 до 6 с преимущественным экстракопированием негомологичных хромосом от 3 до 6 копий (рис. 3, *а*). Типичная для МСК на ранних этапах культивирования маркерная хромосома в клетках на 46-м пассаже отсутствовала, однако наряду с двулучными хромосомами, образованными по типу Робертсоновских транслокаций, выявлялись изохро-

мосомы — двулучные метацентрические хромосомы, возникновение которых связывают с нерасхождением гомологичных хромосом в митозе (рис. 3, *б*). Вариации других хромосомных нарушений, как и на ранних пассажах, были незначительными.

Туморогенная активность. При подкожном, внутримышечном или внутривенном введении МСК 12—15-го пассажей нормальным сингенным мышам-самкам линии С57ВL мы не наблюдали у реципиентов возникновения опухолей *in situ*. В тех же условиях у 40 % нормальных сингенных мышей, которым подкожно или внутримышечно вводили МСК 43—47-го пассажей, опухоли в месте введения клеток возникали уже в течение 1—2 нед после инъекции клеток (рис. 4, *а*). При внутривенном введении МСК любых использованных нами пассажей макроскопически видимые опухоли не возникали даже при наблюдении в течение 3 мес после введения клеток. Увеличение срока наблюдения от 2 нед до 3 мес не сопровождалось увеличением числа опухолей и при подкожном или внутримышечном введении клеток, все зарегистрированные опухоли появлялись только на ранних сроках — в пределах 2 нед от момента введения кле-

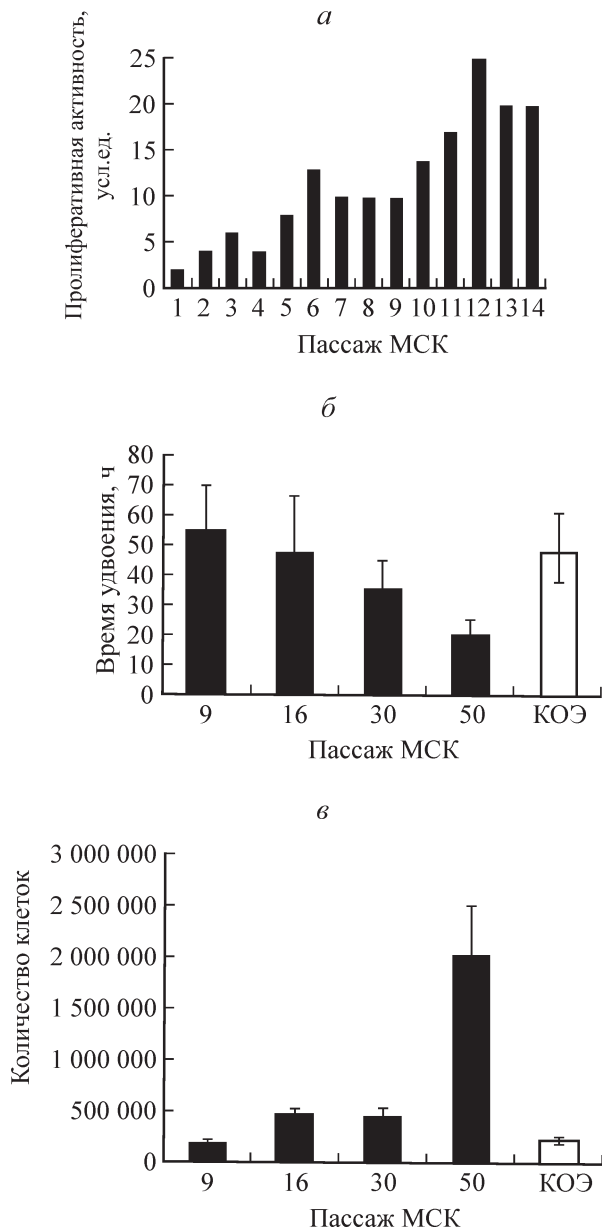


Рис. 2. Характеристика пролиферативной активности МСК и клеток мезенхимомы в процессе пассирования в культуре.

а — индекс пролиферативной активности МСК различных пассажей; пролиферативная активность МСК выражена в усл. ед. *б* — время удвоения МСК различных пассажей и клеток эксплантатов опухоли, полученной из МСК. *в* — характеристика насыщающей плотности роста МСК и клеток эксплантатов опухоли (КОЭ), полученной из МСК. Вертикальные линии представляют стандартное отклонение от средней величины.

ток. В отдельных опытах МСК 43—47-го пассажей вводили внутривенно через ретроорбитальный синус сингенным мышам-самкам линии C57BL, облученным сублетальной дозой 5 Гр. У 50 % таких животных (результаты не показаны) отмечали рост опухоли в области орбитального синуса, однако мы никогда не находили опухолей во внутренних органах этих мышей при макроскопическом наблюдении. Внутримышечное введение МСК 43—47-го пассажей инбредным мышам с мышечной дистрофией Дюшена сопровождалось увеличением эффективности роста опухолей в месте введения от 40 у нормальных реципиентов до 100 % (результаты не показаны).

Изменения маркерной и дифференцировочной активности МСК в ходе пассирования. Увеличение пролиферативной активности и появление туморогенности в ходе пассирования сочетались с потерей МСК начиная с 43-го пассажа экспрессии маркерного белка GFP, но не приводили к стабильному изменению уровня экспрессии β -катенина (рис. 5, *а*). Приобретение туморогенности у МСК в процессе пассирования также сочеталось со снижением адгезивной активности и с потерей способности к индуцированной жировой дифференцировке. Уменьшение способности прикрепляться к пластиковой поверхности было очевидным у МСК 52-го пассажа, индуцированных к жировой дифференцировке (рис. 5, *б*). Клоногенная активность МСК различных пассажей составляла 5—7 % и в ходе пассирования существенно не изменялась (рис. 5, *в*).

Характеристика клеток эксплантатов опухоли (КОЭ), полученной из МСК. Клетки эксплантатов опухоли, полученной из МСК, по своим свойствам значительно отличались от МСК. Время удвоения КОЭ значительно увеличивалось, а насыщающая плотность роста уменьшалась (рис. 2, *б*, *в*). КОЭ, подобно МСК поздних пассажей, не экспрессировали GFP, показывали сниженную адгезивную активность при индукции жировой дифференцировки и теряли чувствительность к стимулам, вызывающим жировую дифференцировку (рис. 4, *б*). Клоногенная активность КОЭ снижалась по сравнению с таковой МСК в 4—5 раз (рис. 5, *в*).

Обсуждение

Полученные нами данные о том, что в культуре *in vitro* МСК первых пассажей характеризуются низкой пролиферативной активностью (рис. 2, *а*, *б*), соответствуют опубликованным данным, в которых торможение клеточного деления, возникающее в 1-е нед культивирования клеток млекопитающих вне организма, рассматривается как проявление внешнего клеточного старения (Parrinello et al., 2003). Внешнее или преждевременное клеточное старение в культуре *in vitro* основано на механизме, который активируется при повышенном содержании кислорода в газовой среде, и отличается от такового при внутреннем или репликативном старении. В механизме внешнего клеточного старения ключевую роль играет активация контрольной точки повреждения ДНК и ее молекулярных посредников — ингибиторов циклинзависимых киназ (Cdk) — белков семейств Ink4 и Cip/Kip, например $p16^{Ink4a}$, $p21^{Cip1}$ и $p27^{Kip1}$. Эти белки модулируют активность фосфатаз семейства Cdc25, комплексов циклин—Cdk, белков семейства гена ретинобластомы и транскрипционных факторов семейства E2F (Parrinello et al., 2003; Campisi, Fagagna, 2007). Активация ингибиторов Cdk приводит к необратимой остановке клеточного цикла и преждевременному старению клетки (Di Leonardo et al., 1994; Venable et al., 1995; Serrano et al., 1997; McConnel et al., 1998). Феномен внешнего клеточного старения в большей степени свойствен клеткам мыши, которые обладают длинными теломерами и часто снабжены системой воспроизведения концов хромосом — теломеразным комплексом, что предохраняет их от репликационного клеточного старения, опосредованного укорочением теломеров. Напротив, клетки человека в большинстве лишены теломеразной активности, обладают короткими теломерами и склонны к репликативному клеточному старению. Напри-

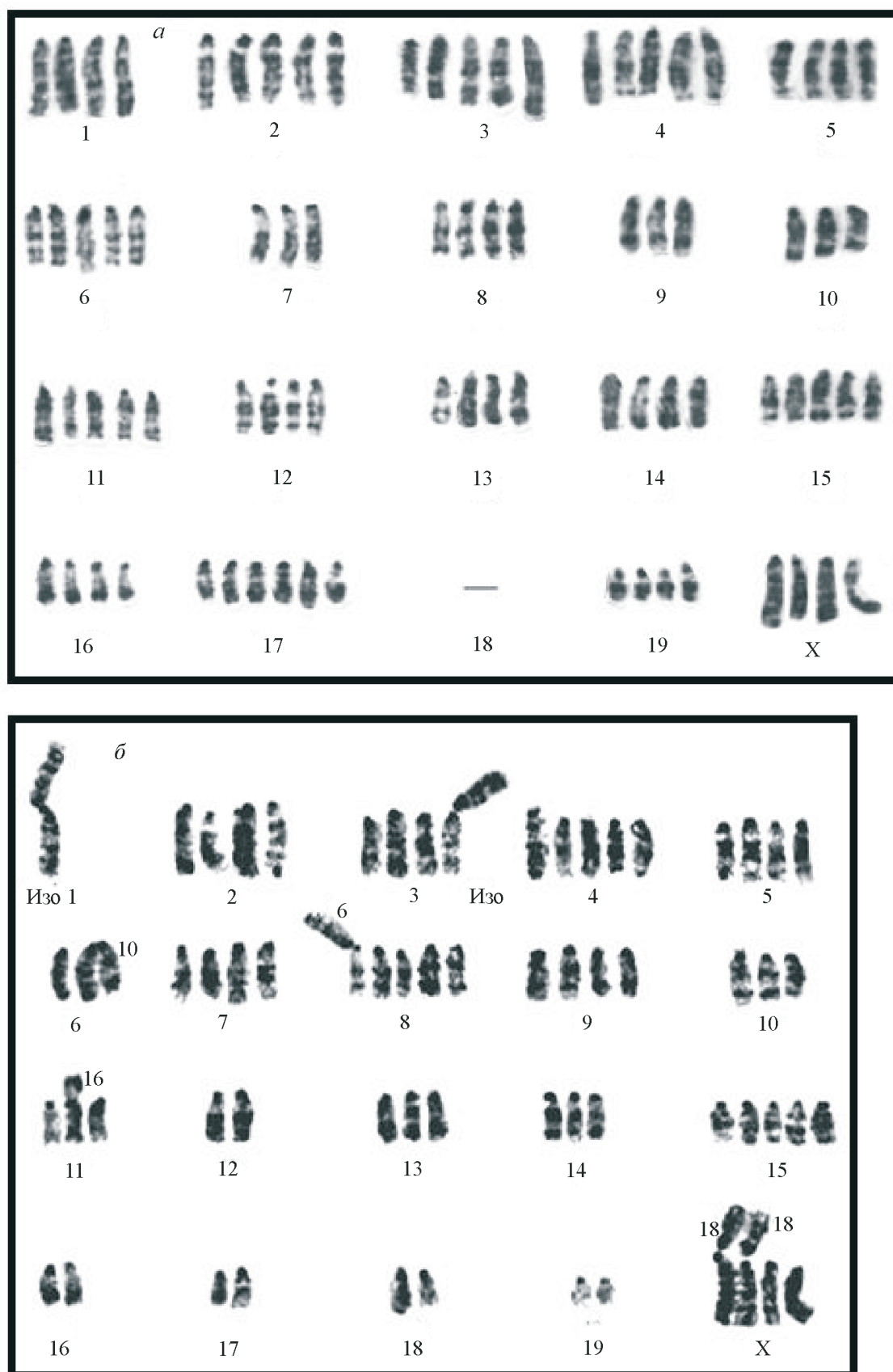


Рис. 3. Варибельность кариотипа МСК, полученных из костного мозга трансгенных мышей GFP, пассаж 46, G-бандирование. *a* — метафазная пластинка содержит 81 хромосому; все хромосомы телоцентрические, представлены разным числом копий, *б* — метафазная пластинка содержит 64 хромосомы, 2 из которых являются изохромосомами, 4 — дуплечими хромосомами, возникшими в результате Робертсоновских транслокаций; общее число хромосом, в том числе входящих в состав дуплечих хромосом, равно 81. Изо — изохромосома.



Рис. 4. Оценка туморогенности МСК в ходе их культивирования путем введения клеток различных пассажей сингенным животным.

a — внешний вид опухоли, возникшей при внутримышечном введении МСК 44-го пассажа сингенной мыши линии С57ВL. $5 \cdot 10^5$ МСК 44-го пассажа, отмытых от ростовой среды и ресуспендированных в среде DMEM без сыворотки, были инъецированы в мышцу бедра сингенной самке линии С57ВL. Опухоль была обнаружена через 1 нед после введения клеток и через 8 нед имела в диаметре 2 см, весила более 2 г. *б* — частота возникновения опухолей при введении МСК ранних (12—15-й) и поздних (43—47-й) пассажей нормальным сингенным реципиентам. При подкожном и внутримышечном введении использовали $5 \cdot 10^5$ клеток в 50—100 мкл среды, при внутривенном введении — $5 \cdot 10^6$ клеток в 0.5 мл среды. МСК вводили 5 мышам каждой группы с последующим наблюдением до 3 мес, как это описано в разделе «Материал и методика».

мер, фибробласты человека проявляют признаки старения уже после 50 делений *in vitro* (Heuflck, 1965; McEachern, Blackburn, 1996). Феномен внешнего старения регулирует продолжительность жизни не только клеток мышей, но и некоторых типов клеток человека, например кератиноцитов и эпителия молочной железы (Kiyono et al., 1998).

Преодоление старения клетками различных типов, включая, вероятно, и МСК, происходит вследствие активации механизмов иммортализации, проявляется в увеличении скорости клеточного деления и сочетается с быстро наступающими изменениями кариотипа (Todaro, Green, 1963; Romanov et al., 2001; Rubio et al., 2005; Miura et al., 2006). Механизмы клеточной иммортализации во многом не изучены, однако многие их компоненты являются типовыми и включают сверхпродукцию белков, активирующих деление клетки, например протоонкогенов Мус,

Ras, транскрипционных факторов семейства E2F и др. В наших опытах активация деления МСК от 9-го к 50-му пассажу проявлялась в 3-кратном уменьшении продолжительности их клеточного цикла и сочеталась со значительным увеличением насыщающей плотности роста, которая от 9-го до 16-го пассажа увеличивалась в 2 раза, а от 9-го к 50-му — в 9 раз (рис. 2, в).

Увеличение насыщающей плотности роста в культуре МСК, как и в клетках других типов, вероятно, является следствием потери феномена контактной ингибиции пролиферации, механизм которой основан на активации белка p27^{Kip1}, ингибиции им киназных комплексов циклин E/A—Cdk2 и активации белков семейства pRb, образующих ингибиторные комплексы с транскрипционными факторами семейства E2F (Di Leonardo et al., 1994).

Опубликованные данные свидетельствуют о том, что изменения кариотипа в культивируемых *in vitro* клетках появляются уже в начале периода клеточного старения. Так, в эмбриональных фибробластах мышей уже на 2-м пассаже отмечалось появление полиплоидных клеток, а на стадии ускорения пролиферации полиплоидные клетки составляли подавляющее большинство клеток в популяции (Todaro, Green, 1963). Последующие закономерности изменения кариотипа включали в себя стабилизацию гипотетраплоидного состояния с появлением на поздних пассажах абнормальных метацентрических и мини-хромосом и переходом в гипертетраплоидное состояние. Существенно, что сами по себе кариотипические изменения не являются причиной активации деления клеток. Наоборот, изменения кариотипа следуют за изменением пролиферативной активности и, вероятно, происходят вследствие нарушения баланса ростовых факторов, регулирующих клеточный цикл (Hsu et al., 1961; Todaro, Green, 1963).

Иммортализация и изменение кариотипа МСК, происходящие в единичных клонах в начале стадии клеточного старения, вероятно, не сказываются на пролиферативной активности всей популяции клеток, которая на ранних пассажах ингибирована. В наших опытах продолжительность 0-го и 1-го пассажей в МСК составляла соответственно 21 и 10 сут и, вероятно, включала в себя множество циклов деления единичных клонов, преодолевающих стадию клеточного старения, селективное размножение которых постепенно формировало активно делящуюся популяцию клеток, несущую разнообразные изменения кариотипа (рис. 3). Изменения кариотипа, регистрируемые в наших опытах на самых ранних пассажах (Гринчук и др., 2008), в процессе культивирования постепенно нарастали, хотя динамика этих изменений была не столь выражена, как на ранних этапах культивирования.

Наши данные позволяют предполагать, что на 12—15-м пассажах МСК характеризуются высокой пролиферативной активностью и многими кариотипическими признаками трансформированного кариотипа, но не обладают туморогенными свойствами и, по-видимому, находятся в стадии иммортализации. Отсутствие туморогенной активности свидетельствует о том, что в МСК 12—15-го пассажей еще не произошли функциональные и кариотипические изменения, специфические для опухолевой трансформации. Туморогенность возникает при продолжении их культивирования на 43—47-м пассажах, когда МСК приобретают способность вызывать рост опухолей *in situ* при подкожном или внутримышечном введении нормальным сингенным реципиентам (рис. 4, а, б). Вероятно, при подкожном или внутримышечном введе-

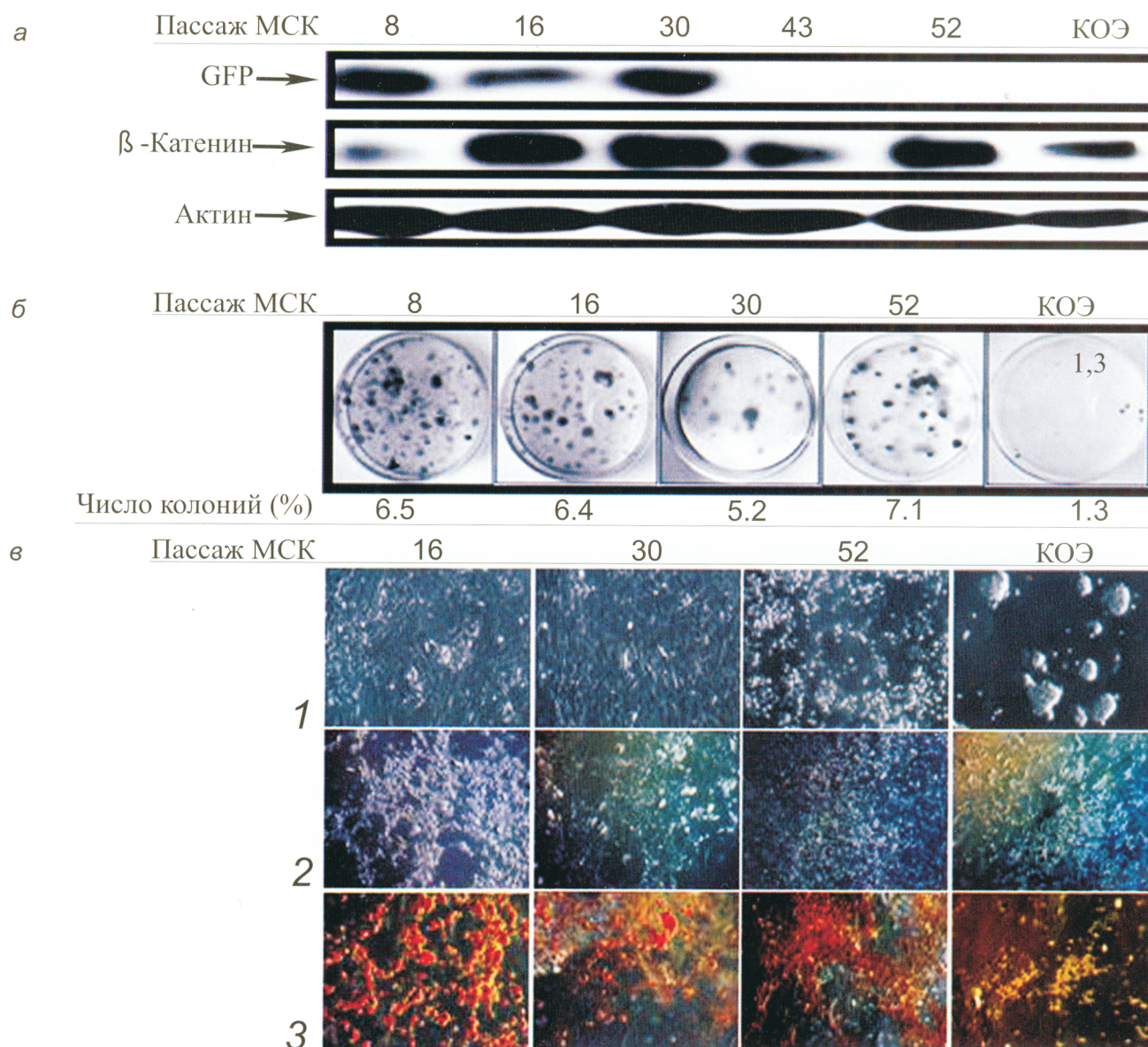


Рис. 5. Экспрессия GFP, клоногенная, адгезионная и дифференцировочная активность МСК в ходе их пассирования в культуре.

а — иммуноблотинговая оценка экспрессии GFP и β -катенина в МСК в ходе их пассирования *in vitro*. Содержание белков в различных клеточных линиях определяли после их электрофоретического разделения и иммуноблотинга. Каждая проба на одной дорожке геля для электрофореза содержала 30 мкг общего белка. Актин использован для уравнивания различных проб по количеству белка. *б* — клоногенная активность МСК различных пассажей; оценку клоногенной активности клеток проводили через 3 нед после высева на 60-миллиметровые чашки 400 и 1000 клеток каждого пассажа в стандартной ростовой среде и их окраски кристалл-виолетом. *в* — адгезионная и дифференцировочная активность МСК в ходе их культивирования. 1 — адгезионную активность МСК, индуцированных к дифференцировке в жировые клетки, оценивали как их способность распластываться на пластике на следующий день после добавления в культуру клеток дифференцировочной РС; 2—3 — МСК, индуцированные к дифференцировке в жировые клетки через 3 нед после начала опыта; 2 — фазово-контрастное изображение получено при суправитальной съемке клеток на микроскопе Zeiss Axiovert 40; 3 — изображение получено после фиксации и окраски клеток масляным красным, как это описано в разделе «Материал и методика».

Об. 10 \times ; КОЭ — клетки эксплантатов опухоли, полученной при подкожном введении МСК 44-го пассажа сингенным мышам линии C57BL.

нии клетки попадают в эктопическое окружение, в котором отсутствует нормальный баланс внеклеточных сигналов, регулирующих поведение МСК. Рост опухоли из МСК в таких случаях напоминает формирование тератом при эктопическом росте эмбриональных СК или клеток эмбриональной аденокарциномы, например под капсулой почки (Andrews, 2002). Это предположение подтверждается результатами наших опытов с внутривенным введением МСК 44-го пассажа сублетально облученным мышам через ретроорбитальный синус, при котором у 50 % реципиентов регистрировали опухоли в области орби-

тального синуса. Подобно этому в наших опытах с внутримышечным введением МСК мышам mdx опухоли *in situ* возникали у 100 % реципиентов, но никогда не наблюдались во внутренних органах этих животных (результаты не показаны). Вероятно, при сублетальном облучении и мышечной дистрофии типа Дюшена в месте введения МСК наблюдается дисбаланс ростовых факторов, которые в нормальных условиях облегчают дифференцировку тканеспецифических клеток. Такой дисбаланс может усиливать пролиферативную активность МСК и способствовать возникновению опухолей.

Существенную роль в активации пролиферации МСК, вероятно, играют аутокринные механизмы, преодолевающие негативное влияние микроокружения на деление экзогенно введенных клеток. При внутривенном введении МСК 43—47-го пассажей происходит значительное уменьшение их локальной тканевой концентрации, аутокринные механизмы перестают играть роль в активации деления клеток, которые элиминируются защитной системой организма реципиентов, предотвращая возникновение опухолей (рис. 4, б). Последнее предположение подтверждается данными из литературы, показывающими, что использование иммунодефицитных мышей линии SCID/NOD в качестве реципиентов трансформированных МСК сопровождалось появлением опухолей во всех исследованных органах реципиентов (Miura et al., 2006).

Укорочение времени удвоения МСК в процессе пассирования происходит сочетанно с потерей их маркеров и уменьшением адгезивного и дифференцировочного потенциала. Если МСК 16-го пассажа еще активно экспрессируют GFP, демонстрируют высокую адгезивность и чувствительность к индукции жировой дифференцировки, то клетки 43-го пассажа теряют продукцию GFP, обладают сниженной способностью распластываться на пластиковой поверхности при внесении в культуру факторов, индуцирующих дифференцировку, и не индуцируются в жировой дифференцировке (рис. 5, а, б). Наши результаты соответствуют опубликованным данным, которые свидетельствуют о том, что МСК первых пассажей при введении иммунодефицитным мышам способны формировать костные компоненты, но не образуют опухолей при введении реципиентам (Miura et al., 2006). В последующих пассажах МСК теряют остеогенный потенциал *in vitro*, однако даже иммортализованные МСК не формируют опухоли в организме иммунодефицитных мышей (Lloyd, 2002; Rubio et al., 2005). При продолжении пассирования МСК имеют хромосомную нестабильность, теряют экспрессию мембранных маркеров и свойство контактной ингибиции, пролиферации, но приобретают способность расти в полуплотном агаре. Кариотипически такие клетки характеризуются трисомией, тетраплоидией и повторяющимися хромосомными перестройками. При введении иммунодефицитным мышам трансформированные клетки в отличие от нормальных или иммортализованных МСК способны к росту опухолей, регистрируемых почти во всех органах (Rubio et al., 2005; Miura et al., 2006).

Клетки эксплантатов опухоли, полученной из МСК (КОЭ), подобно родительским клеткам утрачивали экспрессию GFP, способность к жировой дифференцировке и показывали снижение адгезивной активности. В отличие от родительских клеток КОЭ проявляли снижение пролиферативной активности и способности к активному делению в условиях высокой насыщающей плотности роста (рис. 2, б, в), а также снижение клоногенной активности (рис. 5, в). Эти данные свидетельствуют о приобретении КОЭ в результате опухолевой прогрессии новых свойств, например снижение клоногенной активности может быть результатом потери продукции факторов роста, поддерживающих деление клеток в низкой плотности.

В целом результаты настоящей работы показали, что в культуре *in vitro* МСК подобно другим первичным диплоидным клеткам склонны к спонтанной трансформации, что соответствует результатам современных публикаций (Serakinci et al., 2004; Rubio et al., 2005; Miura et al., 2006). Хотя значимость изучения МСК как потенциального ис-

точника для восстановительной терапии несомненна, нам представляется, что смещение фокуса исследований на поиск подходов для практического применения МСК является преждевременным без предварительного накопления знаний об их основополагающих «стволовых» свойствах, в частности о механизмах самоподдержания в культуре.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-48439 и 07-04-92281), программы «Молекулярная и клеточная биология» президиума РАН и Государственного контракта 02.512.11.2253.

Список литературы

- Гринчук Т. М., Иванцов К. М., Алексеенко Л. Л., Кожухарова И. В., Зайчик А. М., Петров Н. С., Михайлов В. М., Понов Б. В. 2008. Характеристика культуры мезенхимных стволовых клеток, экспрессирующих GFP. *Цитология*. 50 (12) : 1029—1034.
- Кругляков П. В., Соколова И. Б., Аминева Х. К., Некрасова Н. Н., Вийде С. В., Чередниченко Н. В., Зарицкий А. Ю., Семернин Е. Н., Кислякова Т. В., Польшцев Д. Г. 2005. Влияние трансплантации мезенхимных стволовых клеток на репарацию миокарда при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс. *Цитология*. 47 (5) : 400—412.
- Пальцев М. А., Смирнов В. Н., Романов Ю. А., Иванов А. А. 2006. Перспективы использования стволовых клеток в медицине. *Вестн. РАН*. 76 (2) : 99—103.
- Поюшина О. Д., Домарацкая Е. И., Старостин В. И. 2006. Мезенхимальные стволовые клетки: источники, фенотип и дифференцировочный потенциал. *Изв. РАН. Сер. биол.* 1 : 6—25.
- Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Крашенников М. Е., Зайденов В. А., Потапов И. В., Башкина Л. В., Берсенева А. В. 2003а. Дифференцировка стромальных стволовых клеток костного мозга в кардиомиоцитоподобные клетки у различных видов млекопитающих. *Бюл. эксперим. биол. мед.* 135 (4) : 461—465.
- Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Расулов М. Ф., Крашенников М. Е., Зайденов В. А. 2003б. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга эффективнее эмбриональных фибробластов стимулируют регенерацию глубоких ожоговых ран. *Бюл. эксперим. биол. мед.* 136 (8) : 220—223.
- Andrews P. W. 2002. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357 : 405—417.
- Campisi J., d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 : 729—740.
- Committee on Standardized Genetic Nomenclature for mice. 1972. Standard karyotype of the mouse, *Mus musculus*. *Heredity*. 63 : 69—72.
- Cowell J. K. 1984. A Photographic representation of the G-banded structure of the chromosomes in the mouse karyotype. *Chromosoma*. 89 : 298—320.
- De Coppi P., Bartsch G., Jr., Siddiqui M. M., Xu T., Santos C. C., Perin L., Mostoslavsky G., Serre A. C., Snyder E. Y., Yoo J. J., Furth M. E., Soker S., Atala A. 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat. Biotechnol.* 25 : 100—106.
- Di Leonardo A., Linke S. P., Clarkin K., Wahl G. M. 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Develop.* 8 : 2540—2551.
- Friedenstein A. J. 1976. Precursor cells of mechanocytes. *Int. Rev. Cytol.* 47 : 327—359.
- Herzog E. L., Chai L., Krause D. S. 2003. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 102 : 3483—3493.

- Heyflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37 : 614—636.
- Hsu T. C., Billen D., Levan A. 1961. Mammalian chromosomes *in vitro*. XV. Patterns of transformation. *J. Nat. Cancer Inst.* 27 : 515—541.
- Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., Largaespada D. A., Verfaillie C. M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 418 : 41—49.
- Kiyono T., Foster S. A., Koop J. I., McDougall J. K., Gallo-way D. A., Klingelhut A. J. 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature.* 396 : 84—88.
- Lloyd C. 2002. Limits to lifespan. *Nat. Cell Biol.* 4 : E25—E27.
- McConnell B. B., Starborg M., Brookes S., Peters G. 1998. Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr. Biol.* 8 : 351—354.
- McEachern M. J., Blackburn E. H. 1996. Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase. *Genes Develop.* 10 : 1822—1834.
- Meirelles Lda. S., Nardi N. B. 2003. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br. J. Haematol.* 123 : 702—711.
- Miura M., Miura Y., Padilla-Nash H. M., Molinolo A. A., Fu B., Patel V., Seo B. M., Sonoyama W., Zheng J. J., Baker C. C., Chen W., Ried T., Shi S. 2006. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells.* 24 : 1095—1103.
- Parrinello S., Samper E., Krtolica A., Goldstein J., Melov S., Campisi J. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 5 : 741—747.
- Pereira R. F., O'Hara M. D., Laptsev A. V., Halford K. W., Pollard M. D., Class R., Simon., Livezey K., Prockop D. J. 1998. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 : 1142—1147.
- Phinney D. G. 2007. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle.* 6 : 2884—2889.
- Phinney D. G., Hill K., Michelson C., DuTrel M., Hughes C., Humphries S., Wilkinson R., Baddoo M., Bayly E. 2006. Biological activities encoded by the murine mesenchymal stem cell transcriptome provide a basis for their developmental potential and broad therapeutic efficacy. *Stem Cells.* 24 : 186—198.
- Phinney D. G., Kopen G., Isaacson R. L., Prockop D. J. 1999. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J. Cell. Biochem.* 72 : 580—585.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284 : 143—147.
- Popov B. V., Serikov V. B., Petrov N. S., Izusova T. V., Gupma N., Matthay A. 2007. Lung epithelial cells A549 induce epithelial differentiation in mouse mesenchymal BM stem cells by paracrine mechanism. *Tissue Eng.* 13 : 2441—2450.
- Prockop D. J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 276 : 71—74.
- Reya T., Duncan A. W., Ailles L., Domen J., Scherer D. C., Willert K., Hintz L., Nusse R., Weissman I. L. 2003. A role for Wnt signaling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature.* 423 : 409—414.
- Riggi N., Cironi L., Provero P., Suva M. L., Kaloulis K., Garcia-Echeverria C., Hoffmann E., Trumpp A., Stamenkovic I. 2005. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res.* 65 : 11 459—11 468.
- Romanov S. R., Kozakiewicz B. K., Holst C. R., Stampfer M. R., Haupt L. M., Tlsty T. D. 2001. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature.* 409 : 633—637.
- Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M. C., de la Fuente R., Cigudosa J. C., Lloyd A. C., Bernad A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 65 : 3035—3039.
- Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 2 : 971—972.
- Serakinci N., Guldborg P., Burns J. S., Abdallah B., Schrodter H., Jensen T., Kassem M. 2004. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene.* 23 : 5095—5098.
- Serakinci N., Keith W. N. 2006. Therapeutic potential of adult stem cells. *Eur. J. Cancer.* 42 : 1243—1246.
- Serrano M., Lin A. W., McCurrach M. E., Beach D., Lowe S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 88 : 593—602.
- Shu S. N., Wei L., Wang J. H., Zhan Y. T., Chen H. S., Wang Y. 2004. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J. Gastroenterol.* 10 : 2818—2822.
- Street C. N., Sipione S., Helms L., Binette T., Rajotte R. V., Bleackley R. C., Korbitt G. S. 2004. Stem cell-based approaches to solving the problem of tissue supply for islet transplantation in type 1 diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 : 667—683.
- Todar G. J., Green H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 17 : 299—313.
- Venable M. E., Lee J. Y., Smyth M. J., Bielawska A., Obaid L. M. 1995. Role of ceramide in cellular senescence. *J. Biol. Chem.* 270 : 30 701—30 708.
- Wagner W., Wein F., Seckinger A., Frankhauser M., Wirkner U., Krause U., Blake J., Schwager C., Eckstein V., Ansorge W., Ho A. D. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 33 : 1402—1416.
- Woodbury D., Schwarz E. J., Prockop D. J., Black I. B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61 : 364—370.

Поступила 25 IX 2008

SPONTANEOUS TRANSFORMATION AND IMMORTALIZATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS *IN VITRO*B. V. Popov,¹ N. S. Petrov,¹ V. M. Michailov,¹ A. N. Tomilin,¹ L. L. Alexeenko,¹ T. M. Grinchuk,¹ A. M. Zaichik²¹ Institute of Cytology RAS and ² GOU DPO SPbMAPO Roszdrava, St. Petersburg; e-mail: popov_478@hotmail.com

Mesenchymal stem cells (MSC) possess plasticity and unlimited proliferative activity *in vitro* that makes them an attractive subject of the studies focused on searching new resources for regenerative medicine. The usage of MSC is effective for treatment of patients with degenerative and traumatic diseases of different tissues, ho-

wever, biological basis of therapeutic efficacy of MSC are still obscure. We found that long term culture of MSC expressing transgenic green fluorescence protein (GFP) led to increase in their proliferative activity, decrease in adhesion, and loss of differentiation potential and production of the GFP. MSC at the first passages showed karyotypic features of transformation, that at the later passages were complicated with developing of tumorigenic abilities detected after transplantation into normal syngenic recipients. When explanted into cell culture conditions the cells of the tumor tissue originated from the MSC did not express GFP and were not inducible to differentiation, but in contrast to the parent cells showed decreased clonogenic and proliferative activities. We suggest that growth of MSC *in vitro* results in their spontaneous transformation at early passages. Immortalization making physiological basis for the unlimited proliferation of MSC *in vitro* may be a feature of MSC transformation but not an initial characteristic of the stem cells.

Key words: multipotent stromal cells, culture *in vitro*, caryotyping, spontaneous transformation.
