

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НЕ ПОДВЕРГАЮТСЯ СПОНТАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

© А. П. Домнина,¹ И. И. Фридлянская, В. И. Земелько, Н. А. Пуговкина,
З. В. Ковалева, В. В. Зенин, Т. М. Гринчук, Н. Н. Никольский

Институт цитологии РАН;

¹электронный адрес: aldomnina@mail.ru

Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека (эМСК) являются перспективным источником стволовых клеток для заместительной терапии. В большинстве случаев для лечения требуется значительная биомасса этих клеток, которая накапливается их культивированием. Несколько полученныхами линий эМСК культивировали *in vitro* в течение длительного времени для проверки возможной спонтанной злокачественной трансформации. Все линии имели ограниченный срок жизни и через определенное количество клеточных делений, разное у разных линий, вступали в фазу репликативного старения и погибали. Кариологический анализ клеток на разных пассажах показал, что большинство клеток в изученных линиях сохраняет нормальный диплоидный кариотип. Полученные результаты показывают, что культивирование не приводит эМСК к злокачественной трансформации и, следовательно, с этой точки зрения применение эМСК в клеточной терапии безопасно. Экспрессия поверхностных маркеров эМСК при длительном культивировании сохраняется.

Ключевые слова: мезенхимные клетки человека, стволовые клетки эндометрия человека, спонтанная трансформация *in vitro*, кариотип эМСК.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека являются терапевтическим средством для лечения многих заболеваний. Основными источниками МСК являются костный мозг, пуповинная кровь, жировая ткань. В последние годы описан новый источник таких клеток — менструальная кровь (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008; Земелько и др., 2011). Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека (эМСК) по своим свойствам оказались сходными со свойствами МСК, выделенных из других источников. Эти клетки являются мультипотентными, могут дифференцироваться в различные клеточные типы и, следовательно, перспективны для использования в заместительной терапии. Основным их преимуществом являются доступность и неинвазивный способ получения исходного материала.

Эффективное лечение с помощью клеточной терапии во многих случаях требует значительной биомассы стволовых клеток. В исходной ткани количество МСК, в том числе и эМСК, очень низкое, поэтому накопление требуемой биомассы клеток достигается их культивированием. Поскольку культивирование соматических клеток может сопровождаться существенными изменениями их свойств, в том числе появлением онкогенной трансформации, клетки, предназначенные для медицинских целей, должны строго оцениваться с точки зрения их биологической безопасности (Wang et al., 2012). Нами получены и охарактеризованы линии эМСК (Земелько и др., 2011). Пластиность эМСК, способность дифференцироваться в разные клеточные линии открыло широкие перспективы их терапевтического использования. В этой свя-

зи возникает вопрос об их биологической безопасности, в том числе возможной туморогенности. Задача данной работы состояла в выяснении, подвергаются ли эМСК спонтанной трансформации при длительном культивировании.

Материал и методика

Культивирование. Выделенную из фрагментов эндометрия, содержащихся в менструальной крови, адгезивную клеточную популяцию культивировали на среде DMEM/F12, содержащей 10 % коровьей эмбриональной сыворотки, 1 % глутамина и 1 % смеси антибиотиков (Земелько и др., 2011). Культуру пересевали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA (Invitrogen, США) в соотношении 1 : 3. Для культивирования использовали флаконы T25 и T75 (Fisher Scientific, США). Для определения эффективности клонирования клетки сеяли в чашки Петри (6 см) с плотностью посева 100 клеток на чашку. Эффективность клонирования определяли из соотношения числа клонов к числу посаженных клеток в %. Для визуализации клонов использовали краситель Гимза (BDH, Англия).

Изучение кинетики роста. Ростовые характеристики культуры определяли методом построения кривых роста. Для этого культуру эМСК сеяли в чашки Петри (3.5 см) в количестве $1 \cdot 10^5$ клеток на чашку. Ежедневно в течение 5 сут выполняли подсчет клеток с помощью камеры Горяева. Для каждой группы измерений использо-

вали по 2 чашки, подсчет производили трижды и вычисляли среднее значение. Время удвоения популяции рассчитывали по формуле

$$td = \frac{2 \cdot \Delta t \cdot x_0}{x},$$

где td — время удвоения популяции, x_0 — количество клеток в начале интервала времени, x — количество клеток в конце интервала времени, Δt — интервал времени. По полученным данным строили график кривой роста.

Анализ активности SA- β -галактозидазы (SA- β -gal), которая является широко распространенным маркером клеточного старения. Определение активности этого фермента проводили с помощью Senescence SA- β -galactosidase staining kit (Cell Signaling, США). Для этого клетки высевали на 3.5-санитметровые чашки Петри. На 2—3-и сут культивирования ростовую среду удаляли, культуру отмывали раствором PBS. Далее клетки фиксировали смесью формальдегида и глутаральдегида при комнатной температуре в течение 10—15 мин. После фиксации культуру тщательно промывали раствором PBS. Затем добавляли окрашивающий раствор и инкубировали при 37 °C без CO₂ в течение 8 ч. При окрашивании величину pH поддерживали на уровне 6.0. Результаты оценивали с помощью светового микроскопа. Клетки, вступившие в стадию старения, обнаруживали по появлению активности SA- β -gal, что приводило к ярко-синему окрашиванию цитоплазмы

Кариотипический анализ. Препараты метафазных хромосом получали по схеме: накапливали клетки в стадии метафазы с использованием митостатика, обрабатывали их гипотоническим раствором, фиксировали и раскалывали суспензию на предметные стекла. В качестве митостатика использовали 0.05 мкг демиколцина (Sigma, США) на 1 мл среды. эМСК снимали 0.05%-ным раствором трипсина и EDTA. Гипотоническую обработку проводили 0.56%-ным раствором KCl. Клетки фиксировали стандартным способом в трех сменах свежеприготовленной смеси метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Фиксированный материал раскалывали на влажные охлажденные предметные стекла и высушивали при 37 °C. Хромосомы окрашивали на G-диски красителем Гимза в фосфатном буфере (pH 6.4) после предварительной обработки 0.25%-ным раствором трипсина по модифицированному методу Сибрайт (Seabright, 1977). Метафазные пластинки анализировали с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия) с использованием иммерсионного объектива 100×. Идентифицировали хромосомы в соответствии со стандартной номенклатурой (Yunis, 1980; Мамаева, 2002).

Проточная цитофотометрия. Иммунофенотипический анализ полученных эМСК на поверхностные CD-маркеры проводили с использованием проточного цитофлуориметра Epics XL (Beckman Coulter, США). Единичную клеточную суспензию получали при помощи 0.05%-ного трипсина и EDTA. Клетки (1 млн/мл) ре悬浮ировали в растворе PBS, содержащем 5 % эмбриональной коровьей сыворотки. Для анализа использовали антитела, конъюгированные с FITC или фикоэритрином: CD13, CD29, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-DR.

Время удвоения популяции и эффективность клонирования эМСК разных линий

Линия	Время удвоения, ч	Эффективность клонирования, %
2304	27.4	66
2804	27.2	62
2206	26.9	59
1410	26.7	60
0111	27.1	64
2810	28.6	60

Результаты и обсуждение

Исследованные нами линии эМСК морфологически и по экспрессии маркеров были схожи. Их пролиферативные характеристики оценивались по времени удвоения популяции, эффективности клонирования и по кривой роста. В таблице приведены данные по характеристике времени удвоения популяции и эффективности клонирования клеток разных линий. Видно, что время удвоения популяции в разных линиях варьировало в близких пределах от 26.7 до 28.6 ч, т. е. популяция удваивалась примерно через 1 сут культивирования. Эти данные свидетельствуют об активном делении клеток. Для сравнения время удвоения клеток костного мозга даже на ранних пассажах составляет около 60 ч (Røslund et al., 2009). Высокая эффективность клонирования эМСК (около 60 %) также свидетельствует о высоком пролиферативном потенциале данных клеток. Однако по мере культивирования пролиферативная активность клеток постепенно снижается. Анализ кривых роста эМСК на разных пассажах показал, что на 13-м пассаже клетки достигают стационарной фазы (остановки деления) позднее, чем на 5-м пассаже. Количество клеток на стадии плато (стационарной фазы) в культурах более поздних пассажей также уменьшается (рис. 1).

Установлено, что, несмотря на то что пролиферативная активность эМСК снижается по мере культивирования, клетки сохраняли экспрессию характерных для эМСК поверхностных маркеров (рис. 2). Профиль экспрессии маркеров не менялся даже на очень поздних пассажах. Они по-прежнему были позитивны по маркерам MCK CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и негатив-

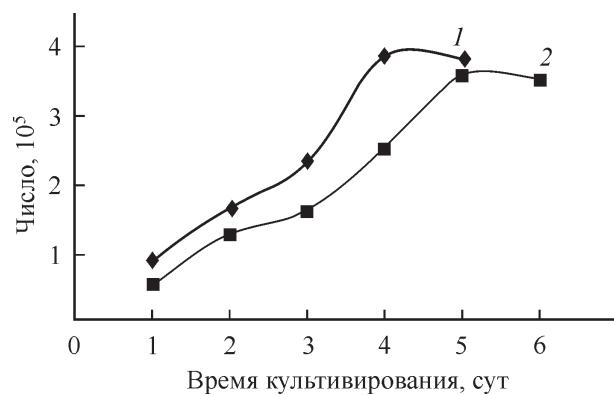


Рис. 1. Кривые роста мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека (эмсц) на разных пассажах.

Кривые 1 и 2 — пассажи 4 и 13 соответственно.

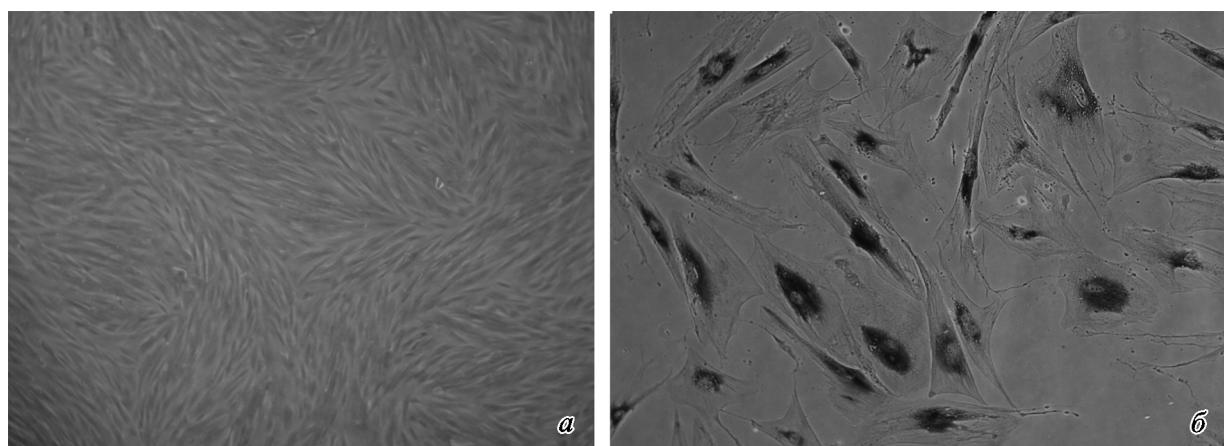


Рис. 2. Окраска эМСК на активность β -галактозидазы на 8-м (а) и 26-м (б) пассажах.
Видно, что активность проявляется только на 26-м пассаже (б).

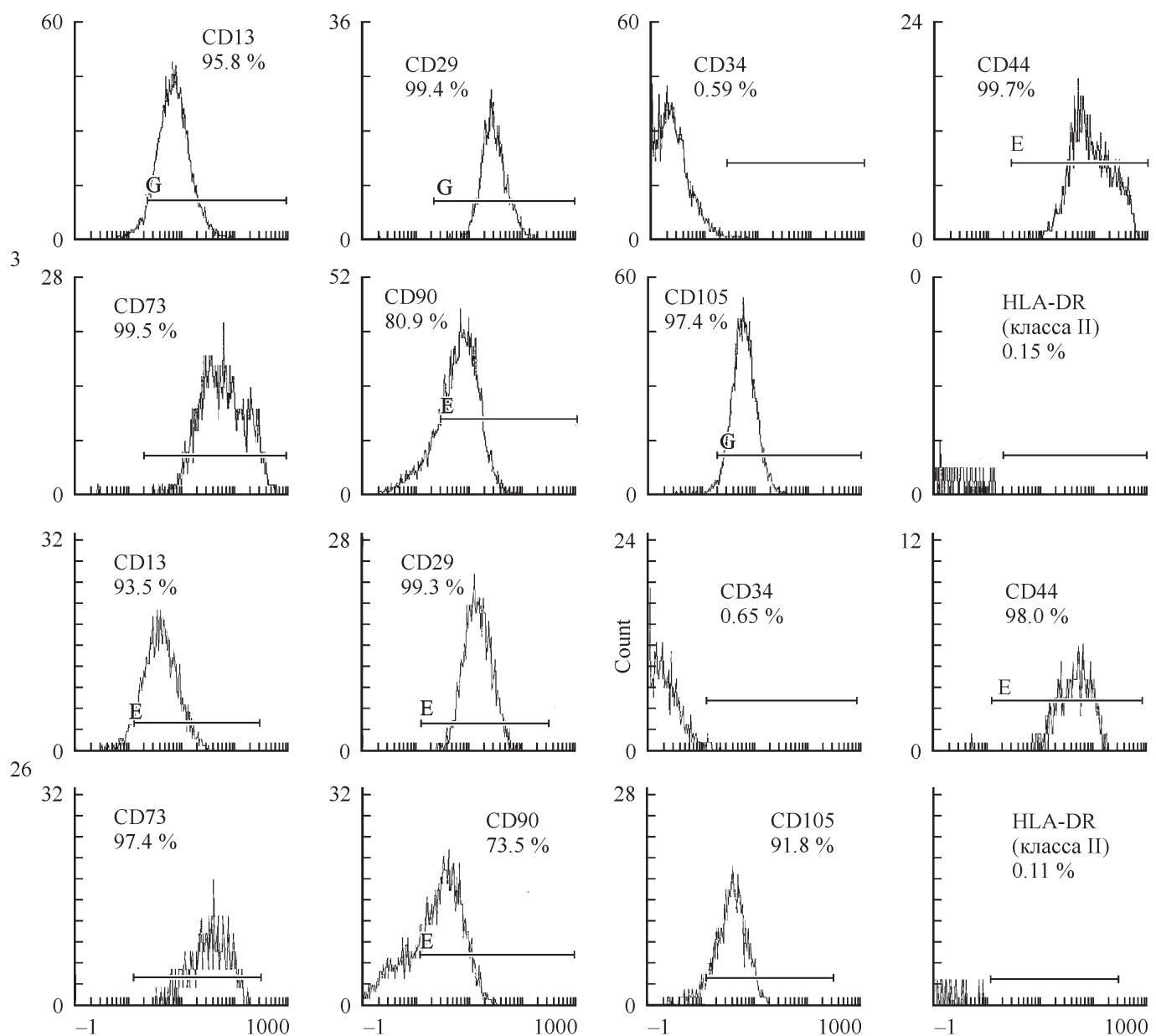


Рис. 3. Экспрессия маркеров эМСК на ранних и поздних пассажах. Данные проточной цитометрии.
Слева указан номер пассажа; на каждой гистограмме указаны маркер и его доля (%).

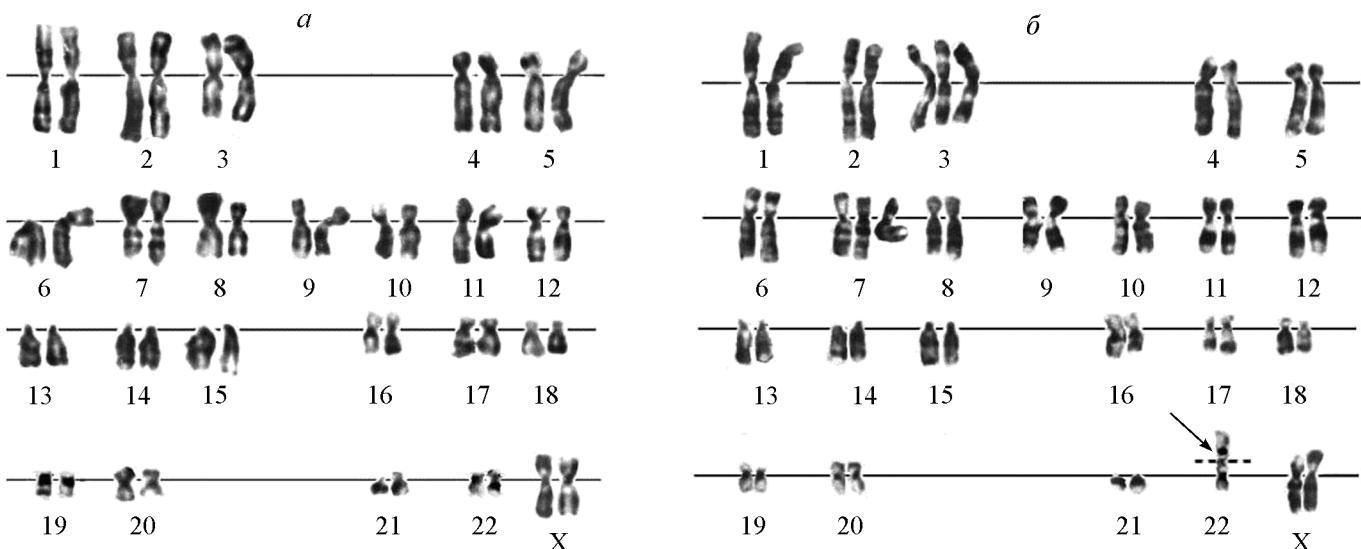


Рис. 4. Кариотип эМСК.

а — кариотип клетки эМСК с нормальным набором хромосом, $2n = 46$, XX; *б* — кариотип эМСК с трисомией хромосом 3 и 7 и эктопической коньюгацией гомологов хромосомы 22. Стрелкой указана изохромосома 22.

ны по гематopoэтическим маркерам CD34 и HLA-DR (класс II).

По мере культивирования морфология клеток изменяется. Исходные клетки имеют фибробластоподобную форму и образуют после пересева и культивирования монослои. На поздних пассажах клетки увеличиваются в размере, уплощаются и не образуют плотного монослоя. Эти признаки характерны для клеточного старения. Для идентификации клеточного старения широко используется окраска на ассоциированную со старением SA- β -gal. Этот фермент является лизосомальной гидролазой и активен в норме при pH 4.0. Идентификация стареющих клеток основана на том, что в них этот фермент проявляет свою активность при pH 6.0. По мере культивирования число SA- β -gal-позитивных клеток увеличивается (рис. 3) и в конце концов достигает практически 100 %. В общей сложности все полученные нами линии прошли около 40—45 удвоений клеточной популяции, после чего клетки необратимо утратили способность делиться и постепенно погибли. Ни в одной линии не отмечено пере-рождения эМСК в трансформированные иммортализованные клетки.

Кариотипирование клеток двух линий эМСК с применением дифференциальной окраски хромосом на G-ди- скы на ранних этапах культивирования (пассажи 3 и 6) и более поздних (пассажи 15 и 22) показало, что большинство проанализированных клеток имели структуру кариотипа, типичную для клеток человека в норме. На этом фоне с низкой частотой встречались клетки с отклонениями как в числе хромосом, так и в структуре кариотипа (появлялись анеуплоидные, околосоматраплоидные клеточные варианты). Цитогенетические изменения были нескольких типов — эктопическая коньюгация между хромосомами, появление изохромосом, лишних хромосомных копий, поломок хромосомного материала (рис. 4). Выявленные в пределах каждой проанализированной клеточной популяции кариотипические изменения не были закономерными, не получали пролиферативного преимущества в процессе культивирования клеток и не препятствовали развитию их репликативного старения.

В литературе также имеются сообщения о том, что в процессе длительного культивирования МСК из костного мозга и жировой ткани иногда наблюдаются численные хромосомные изменения (анеуплоидия) (Buyanovskaya et al., 2008; Tarte et al., 2010). Ни в одном случае наблюдавшиеся хромосомные нарушения не приводили к трансформации МСК. Более того, описан случай трансплантации культуры МСК костного мозга с некоторыми цитогенетическими изменениями в структуре кариотипа пациенту. При наблюдении за пациентом в течение 2 лет опухолей или других побочных эффектов у него не отмечали (Tarte et al., 2010).

Хорошо известно, что культивируемые фибробlastы имеют ограниченный срок жизни *in vitro*. При длительном культивировании они постепенно исчерпывают пролиферативный потенциал и входят в фазу кризиса. Дальнейшая судьба клеток определяется их видовым происхождением. В культурах клеток грызунов большинство клеток в фазе кризиса погибает, но некоторые из них преодолевают ее, возобновляют деление и приобретают способность к неограниченному размножению, т. е. трансформируются (Rossi et al., 2003). В отличие от клеток грызунов культивируемые нормальные фибробlastы человека имеют ограниченный срок жизни *in vitro* и не трансформируются (Hayflick, 1965). Их длительное культивирование сопровождается репликативным старением, в результате чего в конце концов клетки погибают.

Эмбриональные стволовые клетки человека (ЭСК) в отличие от нормальных фибробластов имеют неограниченный срок жизни в культуре. Это свойство делает их схожими с раковыми клетками. В первых исследованиях предполагали, что хромосомных нарушений в ЭСК человека при культивировании не происходит. Однако позднее было показано, что, так же как и опухолевые клетки, ЭСК генетически не стабильны и при длительном культивировании могут подвергаться заметным цитогенетическим изменениям (Hanson, Caisander, 2005; Maitra et al., 2005). Плюрипотентность ЭСК, способность их дифференцироваться практически во все ткани организма открыли широкую перспективу их использования для клеточной терапии. Однако генетическая нестабильность,

образование тератом у реципиентов при их трансплантации (Anisimov et al., 2010) значительно ограничивают широкое применение этих клеток в медицинских целях. В настоящее время большее значение для клеточной терапии придают взрослым стволовым клеткам.

Взрослые стволовые клетки являются мультипотентными и могут дифференцироваться в разные клеточные типы. У них разное происхождение, но наибольшую перспективу для медицинских технологий имеют МСК человека, которые получают из костного мозга, жировой ткани, пуповинной и менструальной крови и др. Как правило, количества МСК в исходном материале недостаточно для трансплантации. Необходимое количество достигается последующим культивированием клеток. Поскольку длительное пассирование клеток может сопровождаться их генетическими изменениями, а следовательно, может быть небезопасным для пациентов при трансплантации, возник вопрос о возможной трансформации МСК человека при длительном культивировании.

Накопленные к настоящему времени данные противоречивы. Поскольку МСК, так же как и фибробласти, происходят из мезодермы и морфологически с ними сходны, можно было бы предполагать, что их поведение в культуре будет сходным. Действительно, МСК мышей, как и их фибробласти, при длительном культивировании трансформируются и иммортализуются (Гринчук и др., 2008; Попов и др., 2009), а длительное культивирование МСК из костного мозга человека, так же как диплоидных фибробластов человека, не сопровождалось их спонтанной трансформацией (Bernardo et al., 2007). Тем не менее появились публикации о спонтанной трансформации стволовых клеток жировой ткани человека (Rubio et al., 2005), клеток костного мозга (Røsland et al., 2009), нейрональных стволовых клеток (Wu et al., 2011). Однако первые две публикации недавно были отозваны авторами в связи с тем, что в обоих случаях, как оказалось, имела место кросс-контаминация культур клетками постоянных опухолевых линий человека (Torsvik et al., 2012), т. е. факт спонтанной трансформации МСК не подтвердился.

При использовании метода ДНК фингерпринтинга с короткими tandemными повторами было установлено, что в первом случае контамиантами оказались клетки фибросаркомы человека HT1080, а культура клеток костного мозга была контаминирована клетками HeLa. Тем не менее исходные данные этих авторов продолжают цитировать (Wang et al., 2012). Оказалось также, что кросс-контаминация опухолевыми клетками человека HeLa имела место и в работе со стволовыми нейрональными клетками человека (Shen, 2012). Таким образом, достоверные сведения о возможной спонтанной трансформации стволовых клеток костного мозга и жировой ткани человека при длительном культивировании отсутствуют.

Хотя мы не нашли в литературе сообщений об исследованиях спонтанной трансформации эМСК, косвенно можно судить о ее отсутствии, поскольку в ряде работ указывают на ограниченный пролиферативный потенциал этих клеток. Наши данные по длительному культивированию нескольких линий эМСК показали, что, как и диплоидные фибробласти человека, все исследованные нами линии имели ограниченный срок жизни *in vitro*. По мере культивирования пролиферативный потенциал клеток всех линий исчерпывался, клетки вступали в фазу репликативного старения и в конце концов погибали. Ни одна линия не подверглась спонтанной трансформации.

На основании наших и последних литературных данных можно утверждать, что МСК человека не могут подвергаться спонтанной трансформации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Государственный контракт № 16.512.11.2191) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-12077-офи-м).

Список литературы

Гринчук Т. М., Иванцов К. М., Алексеенко Л. Л., Кожухарова И. В., Зайчик А. М., Петров Н. С., Михайлова В. М., Попов Б. В. 2008. Характеристика культуры мезенхимных стволовых клеток мыши, экспрессирующих GPF. Цитология. 50 (12) : 1030—1035.

Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнинова А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Кирсанов А. А., Бичевая Н. К., Корсак В. С., Никольский Н. Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамиированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. 53 (12) : 919—929.

Мамаева С. Е. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Наука. 231 с.

Попов Б. В., Петров Н. С., Михайлова В. М., Томилин А. Н., Алексеенко Л. Л., Гринчук Т. М., Зайчик А. М. 2009. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимных стволовых клеток *in vitro*. Цитология. 51 (2) : 91—102.

Anisimov S. V., Morizane A., Correia A. S. 2010. Risks and mechanisms of oncological disease following stem cell transplantation. Stem Cell Rev. and Rep. 6 : 411—424.

Bernardo M. E., Zaffaroni N., Novara F., Cometa A. M., Avanzini M. A., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone M. G., Zuffardi O., Locatelli F. 2007. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term *in vitro* culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. Cancer Res. 67 : 9142—9149.

Buyanovskaya O. A., Kuleshov N. P., Nikitina V. A., Voronina E. S., Katosova L. D., Bochkov N. P. 2008. Spontaneous aneuploidy and clone formation in adipose tissue stem cells during different periods of culturing. Bull. Exp. Biol. Med. 146 : 344—347.

Hanson C., Caisander G. 2005. Human embryonic stem cells and chromosome stability. APMIS. 113 : 751—755.

Hayflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 37: 614—636.

Li H., Fan X., Kovi R. C., Jo Y., Moquin B., Konz R., Stoicev C., Kurt-Jones E., Grossman S. R., Lyle S., Rogers A. B., Montrose M., Houghton J. 2007. Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice. Cancer Res. 67 : 10 889—10 898.

Maitra A., Arking D. E., Shivapurkar N., Ikeda M., Stastny V., Kassaei K. et al. 2005. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. Nature Genetics. 37 : 1099—1103.

Meng X., Ichim T. E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K. W., Thébaud B., Riordan N. H. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. J. Transl. Med. 5: 57—66.

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.

Patel A. N., Park E., Kuzman M., Benetti F., Silva F. J., Allickson J. G. 2008. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. Cell Transplant. 17 : 303—311.

Røsland G. V., Svendsen A., Torsvik A., Sobala E., McCormack E., Immervoll H., Mysliwietz J., Tonn J. C., Goldbrunner R.,

- Lonning P. E., Bjerkvig R., Schichor C. 2009. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. Cancer Res. 69 : 5331—5339.*
- Rossi O., Barbieri O., Frosina G. 2003. Time-course of spontaneous transformation of CD-1 mouse embryonic fibroblasts. Anticancer Res. 23 : 1373—1377.*
- Rubio D., Garcia-Castro J., Martín M. C., Fuente R., Cigudosa J. C., Lloyd A. C., Bernadet A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res. 65 : 3035—3039.*
- Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet. 11: 971—972.*
- Shen L. 2012. In reply to Torsvik et al. Spontaneous transformation of stem cells in vitro and the issue of cross-contamination. Int. J. Biol. Sci. 8 : 1053—1054.*
- Tarte K., Gaillard J., Lataillade J.-J. 2010. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. Blood. 115 : 1549—1553.*
- Torsvik A., Røslund G. V., Bjerkvig R. 2012. Spontaneous transformation of stem cells in vitro and the issue of cross-contamination. Int. J. Biol. Sci. 8 : 1051—1052.*
- Wang S., Qu X., Zhao R. C. 2012. Clinical applications of mesenchymal stem cells. J. Hematol. Oncol. 5 : 19—20.*
- Wu W., He Q., Li X., Zhang X., Lu A., Ge R., Zhen H., Chang A. E., Li Q., Shen L. 2011. Long-term cultured human neural stem cells undergo spontaneous transformation to tumor-initiating cells. Int. J. Biol. Sci. 7 : 892—901.*
- Yunis J. J. 1980. Nomenclature for high resolution human chromosomes. Cancer Genet. Cyogenet. 2 : 221—229.*

Поступила 7 VIII 2012

MESENCHYMAL STEM CELLS OF HUMAN ENDOMETRIUM DO NOT UNDERGO SPONTANEOUS TRANSFORMATION DURING LONG-TERM CULTIVATION

A. P. Domnina,¹ I. I. Fridlianskaia, V. I. Zemelko, N. A. Pugovkina, Z. V. Kovaleva, V. V. Zenin, T. M. Grinchuk, N. N. Nikolsky

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: aldomnina@yandex.ru

Mesenchymal stem cells isolated from human endometrium (eMSC) are perspective source of stem cells for regenerative medicine. Large amount of these cells accumulated by *in vitro* cultivation is usually required for transplantation into patients. We established several cell eMSC lines and cultivated them during long period of time to examine the possibility of their spontaneous transformation. All cell lines demonstrate limited lifespan, undergo replicative senescence and die. Karyotypic analysis on different passages reveals that most cells display karyotypic stability. Thus, extended *in vitro* cultivation of eMSCs does not lead to spontaneous transformation that makes therapeutic application of these cells safety for patients. During long-term cultivation eMSCs sustain the expression of surface markers.

К e y w o r d s: human mesenchymal stem cells, endometrial stem cells, spontaneous transformation, karyotype of eMSCs.