

## ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК ГЛИОМ. ЭФФЕКТ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

© И. А. Чистякова,<sup>1</sup> Г. Г. Полянская

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;*

<sup>1</sup>электронный адрес: *ichi\_spb@yahoo.com*

Влияние мезенхимных стволовых клеток (МСК) на рост различных опухолей носит неоднозначный характер. МСК, полученные из разных тканевых источников, стимулируют рост одних опухолей и оказывают выраженное противоопухолевое действие на другие. В ряде исследований показано, что взаимодействия между опухолевыми клетками и МСК вносят вклад в эти эффекты. Целью данной работы было изучение влияний МСК, выделенных из тканей раннего эмбриона, на пролиферативную активность клеток глиом в условиях продолжительного сокультивирования. Анализировали влияние на пролиферацию глиомных клеток кондиционированной среды (КС), полученной от эмбриональных МСК костного мозга (FetMSC) и мышечной ткани (M-FetMSC), а также от сокультивирования этих клеток с клетками глиомы U251MG. Для сравнения в аналогичных экспериментах испытывали влияние КС, полученной от дермальных фибробластов (ДФ) взрослого донора. МТТ-анализ показал, что КС от МСК и ДФ без сокультивирования с глиомными клетками не влияла на пролиферацию клеток глиомных линий U251MG и A172. Однако КС, взятая на ранних сроках (3—9 сут) сокультивирования клеток U251MG с эмбриональными МСК, стимулировала пролиферацию клеток U251MG, тогда как КС, взятая на поздних сроках (15—21 сут) сокультивирования, подавляла ее. Аналогичные эксперименты, проведенные с ДФ взрослого донора, показали стабильное стимулирующее влияние КС на пролиферацию клеток U251MG. Иммунофлуоресцентный анализ выявил снижение экспрессии белка клеточного цикла циклина D1 в клетках U251MG после их обработки КС, взятой на 21-е сут сокультивирования клеток U251MG с эмбриональными МСК, тогда как КС, взятая на 21-е сут сокультивирования клеток U251MG с ДФ, подобного эффекта не имела. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о двойственном влиянии эмбриональных МСК на пролиферацию клеток глиом. Несмотря на первоначальную активацию пролиферативной активности глиомных клеток, через 3 нед сокультивирования наблюдается ее выраженное торможение. Впервые показано, что в процессе продолжительного сокультивирования характер влияния МСК, опосредованного КС, на пролиферативную активность опухолевых клеток может меняться на противоположный. Представленный способ тестирования КС от смешанных культур может быть использован для моделирования процессов долгосрочных взаимных влияний клеток двух типов.

**Ключевые слова:** эмбриональные мезенхимные стволовые клетки, клетки глиом, пролиферация, кондиционированная среда, межклеточные взаимодействия.

**Принятые сокращения:** ДФ — дермальные фибробласты человека, КС — кондиционированная среда, МСК — мезенхимные стволовые клетки.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) представляют собой гетерогенную популяцию самообновляющихся мультипотентных клеток. Они могут быть изолированы из разных тканей эмбриона или взрослого организма. Характерной особенностью МСК является их способность мигрировать в места воспаления, в поврежденные ткани и солидные опухоли (Chen et al., 2001; Barbash et al., 2003; Nakamizo et al., 2005; Ho et al., 2009). За счет синтеза ростовых факторов и цитокинов, а также способности к дифференцировке в разных направлениях МСК участвуют в регенерации поврежденных тканей и оказывают иммуномодулирующие влияния (Burdon et al., 2011; Joshi et al., 2012). Миграцию к местам опухолевого роста связывают с участием МСК в формировании того микроокружения, которое поддерживает опухоль (Djouad et al., 2003; Yu

et al., 2008; Kucerova et al., 2010; Zhang et al., 2013). При этом участие МСК в создании структурной ниши растущей опухоли, как полагают, не имеет такого значения, как секреция ими растворимых факторов, меняющих, в частности, пролиферацию опухолевых клеток. В ряде работ (Kucerova et al., 2010; Zhu et al., 2011; Ye et al., 2012; Zhang et al., 2013) обнаружено, что МСК секретируют молекулы, стимулирующие опухолевый рост. Однако в некоторых работах показано, что МСК, изолированные из тканей как взрослого организма, так и эмбриона, могут, наоборот, оказывать негативное влияние на опухолевый рост за счет торможения пролиферации и индукции апоптоза (Khakoo et al., 2006; Lu et al., 2008; Qiao et al., 2008a; Han et al., 2009; Bitsika et al., 2013; Hou et al., 2014; Takahara et al., 2014).

Единой концепции относительно причин таких различий пока нет. Однако очевидно участие в реализации этих эффектов адаптивных взаимных влияний опухолевых клеток и МСК, приводящих к изменению как самих клеток, так и их воздействий друг на друга. Так, Мишра с соавторами (Mishra et al., 2008) показали, что длительное (в течение 30 сут) культивирование МСК в среде, кондиционированной опухолевыми клетками, приводит к дифференцировке МСК в ассоциированные с опухолью фибробласты, которые начинают экспрессировать характерный для них белок — стромальный опухолевый фактор (SDF), поддерживающий пролиферацию опухолевых клеток. В других исследованиях обнаружено, что даже непродолжительное (в течение нескольких суток), сокультивирование опухолевых клеток и МСК приводит к изменению целого ряда ростовых факторов и цитокинов, секретируемых МСК, и как результат — к изменению ростовых характеристик и выживаемости опухолевых клеток (Kucserova et al., 2010; Zimmerlin et al., 2013; Eterno et al., 2014). В то же время МСК, активированные некоторыми цитокинами, могут тормозить опухолевый рост путем индукции апоптоза и усиления иммунного ответа (Kang et al., 2008). Таким образом, сложные взаимовлияния МСК и опухолевой среды модулируют эффекты МСК.

В настоящей работе на клеточной модели длительного сокультивирования мы рассмотрели долгосрочные влияния МСК на пролиферативную активность клеток глиомы — крайне агрессивного вида опухоли головного мозга. Глиома характеризуется неконтролируемой клеточной пролиферацией, диффузной инфильтрацией, высокой васкуляризацией, повышенной резистентностью к химиотерапевтическим препаратам. Несмотря на некоторые успехи в совершенствовании традиционной терапии, глиома остается неизлечимым заболеванием с коротким временем выживания больных после постановки диагноза (Surawicz et al., 1998; Van Meir et al., 2010). Плохой прогноз связан в первую очередь с высокой частотой рецидивов, обусловленной повышенной выживаемостью клеток глиом. Сочетание традиционных способов лечения с клеточной терапией представляется сегодня наиболее перспективным направлением в разработке эффективного лечения этих солидных опухолей.

Основываясь на результатах предшествующих исследований, показавших цитотоксическое действие МСК, выделенных из эмбриональной ткани пуповинной крови, пупочного канатика и амниотической оболочки, на глиомные клетки (Kang et al., 2008; Dasari et al., 2010; Jiao et al., 2011, 2012; Velpula et al., 2011; Akimoto et al., 2013; Ma et al., 2014), мы предположили, что МСК, выделенные из тканей раннего эмбриона, будут тормозить рост глиомных клеток. Поэтому мы проанализировали влияние на пролиферацию клеток линий глиом U251MG и A172 кондиционированной среды (КС), полученной от эмбриональных МСК костного мозга (FetMSC) и мышечной ткани (M-FetMSC). Затем клетки глиомной линии U251MG совместно культивировали с FetMSC или с M-FetMSC в течение 21 сут и выясняли влияние КС, взятой на разных сроках сокультивирования, на их пролиферативную активность. Для сравнения в аналогичных экспериментах испытывали влияние КС от дермальных фибробластов (ДФ) взрослого донора. Кроме того, анализировали экспрессию белка клеточного цикла циклина D1 в клетках U251MG, обработанных КС от смешанных культур. Было

обнаружено, что в процессе продолжительного сокультивирования эмбриональные МСК неоднозначно влияют на пролиферацию глиомных клеток.

## Материал и методика

Клеточные линии глиом человека U251MG и A172, а также неиммортиализованные линии МСК, выделенные из костного мозга (FetMSC) и мышечной ткани (M-FetMSC) раннего эмбриона человека, получены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). ДФ, выделенные из кожи век взрослого донора, были любезно предоставлены Н. М. Юдинцевой (Институт цитологии РАН).

Культивирование клеток U251MG и A172, эмбриональных МСК (FetMSC и M-FetMSC) и ДФ проводили в ростовой среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США) и смесь антибиотиков — 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США). В эксперименте использовали клетки 6—8 пассажей.

При совместном культивировании эмбриональных МСК (FetMSC или M-FetMSC) или ДФ с клетками глиомы U251MG клетки смешивали в соотношении 1 : 2 и рассевали двумя способами. 1. Клетки глиомы U251MG высевали в количестве 20 тыс. в центре культуральной чашки диаметром 50 мм. Через 1 сут по периметру чашки высевали 40 тыс. эмбриональных МСК (FetMSC или M-FetMSC) или ДФ. 2. Клетки рассевали в культуральную чашку (50 мм) в уже смешанной суспензии в тех же количествах — 20 тыс. U251MG и 40 тыс. других. Сокультивирование проводили в течение 21 сут. Ростовую среду полностью заменяли на свежую каждые 3 сут.

Кондиционированная среда. Клетки U251MG, A172, FetMSC, M-FetMSC и ДФ культивировали до 80—100%-ной конфлюэнтности. Затем среду заменяли на свежую и через 2 сут собирали КС. От смешанных культур КС собирали каждые 3 сут совместного культивирования клеток. Для удаления клеточного дебриса КС центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин, затем замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  в аликвотах и хранили до использования.

Обработка клеток кондиционированной средой. Клетки глиом U251MG или A172 высевали в ростовую среду и оставляли на ночь для лучшего прикрепления. Затем среду заменяли на КС. Обработку КС, полученной от монокультур, проводили в течение 48 ч, а полученной от смешанных культур — в течение 72 ч. Смену КС проводили каждые 24 ч. От смешанных культур использовали также 50%-ную КС, которая представляла собой смесь одинаковых объемов полной ростовой среды и КС.

Количество жизнеспособных клеток оценивали с помощью колориметрического МТТ-теста. Клетки глиом рассевали в 96-луночную плату в концентрации  $1.5 \cdot 10^3$  на 1 лунку и обрабатывали КС. По окончании обработки КС заменяли на раствор МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолиумбромид) и инкубировали в течение 3 ч. Образовавшиеся в живых клетках кристаллы формазана растворяли ДМСО (50 мкл на 1 лунку). Оптическую плотность измеряли при длине волны 570 нм на иммунохимическом анализаторе Флюорофот (СКБ «Пробанаучприбор», Санкт-Петербург).

бург). Абсолютное количество клеток определяли с помощью предварительно построенных калибровочных кривых. В каждом варианте анализировали три повторности.

Для иммунофлуоресцентного анализа содержания циклина D1 использовали моноклональные антитела против него (Santa Cruz Biotechnology, США; разведение 1 : 100). Клетки U251MG, выращенные на покровных стеклах, обрабатывали КС в течение 72 ч, фиксировали 4%-ным формалином (Sigma, США), пермеабелизировали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 и затем инкубировали 30 мин в растворе 1%-ного бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma, США) и 2%-ной FBS для предотвращения неспецифического связывания антител. Затем препараты инкубировали сначала с первыми антителами в течение ночи при 4 °С, а далее с кроличьими антимышиными IgG, конъюгированными с FITS (Sigma, США), при 37 °С в течение 2 ч и заключали в среду Vectashield (Vector Laboratories, США). Препараты анализировали с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа (Leica TCS SL, Германия).

Результаты обрабатывали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы  $P < 0.01$  или  $P < 0.05$ .

## Результаты

Влияние кондиционированной среды от МСК на пролиферативную активность клеток глиом. На примере глиомных клеточных линий U251MG и A172 изучали, как меняется число клеток после 48-часовой обработки КС, полученной от культур FetMSC и M-FetMSC. Для сравнения выясняли действие КС от ДФ взрослых доноров. Оказалось, что культивирование клеток обеих линий глиом в КС от МСК не влияло на уровень их пролиферативной активности (рис. 1). Такую же картину наблюдали и при обработке глиомных клеток КС от ДФ. Эти данные свидетельствуют о том, что растворимые факторы, присутствующие в КС как от эмбриональных МСК, так и от ДФ, не являются достаточ-

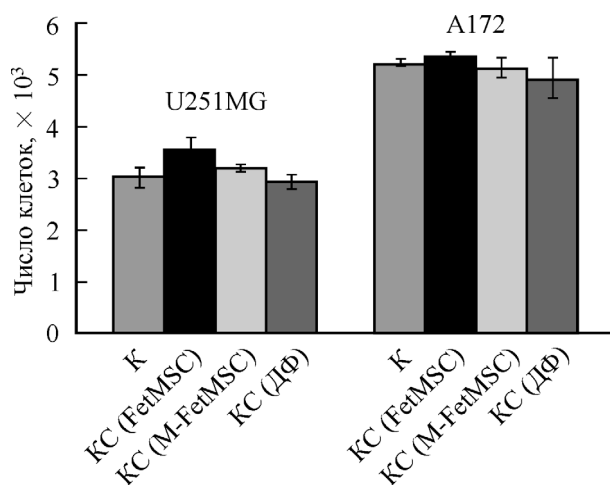


Рис. 1. Пролiferация глиомных клеток U251MG и A172 при культивировании в кондиционированной среде (КС), полученной от мезенхимных стволовых клеток (FetMSC и M-FetMSC) и от дермальных фибробластов (ДФ). МТТ-тест.

К — контрольные клетки.

ными для изменения пролиферативной программы глиомных клеток.

Влияние кондиционированной среды, полученной от смешанных культур МСК и клеток глиомы U251MG, на пролиферативную активность клеток U251MG. В дальнейших экспериментах были использованы только клетки глиомы U251MG. Для этих клеток характерна сниженная пролиферативная активность по сравнению с клетками A172, что делает возможным их использование в экспериментальной модели длительного сокультивирования с МСК. При 1-м способе посева в центр культуральной чашки высевали клетки глиомы U251MG, а по периферии — эмбриональные МСК или ДФ (рис. 2, а). Контролем служили клетки U251MG, выращенные таким же способом и рассеянные в такой же концентрации, что и клетки смешанных культур. КС от контрольных клеток собирали в те же сроки, что и от смешанных культур. МТТ-анализ показал, что пролиферация клеток U251MG, обработанных в течение 72 ч контрольными супернатантами, практически сохранялась на одном уровне (рис. 3, а, б). При культивировании в КС, взятой от 3-суточных смешанных культур, число клеток U251MG увеличивалось в 1.5 раза по сравнению с контролем ( $P < 0.01$ ). Максимальное увеличение числа клеток (в среднем в 2.3 раза) было в средах от сокультивирования в течение 6—9 сут. Так, в контрольном варианте (КС от U251MG) число клеток составляло  $(3.8 \pm 0.1) \cdot 10^3$  (рис. 3, а, б, кривая 1), тогда как в опытных вариантах —  $(7.3 \pm 0.1) \cdot 10^3$  клеток в случае КС от U251MG + FetMSC (рис. 3, а, кривая 2),  $(7.0 \pm 0.3) \cdot 10^3$  клеток в случае КС от U251MG + ДФ (рис. 3, а, кривая 3) и  $(6.5 \pm 0.1) \cdot 10^3$  клеток в случае КС от U251MG + M-FetMSC (рис. 3, б, кривая 2);  $P < 0.01$ .

Однако при обработке клеток U251MG КС, полученной на более длительных сроках сокультивирования опухолевых клеток с эмбриональными МСК, пролиферативная активность глиомных клеток снижалась. Причем КС уже от 12-суточной смешанной культуры клеток U251MG и M-FetMSC в отличие от FetMSC не оказывала стимулирующего влияния на пролиферацию глиомных клеток. КС, взятая на 21-е сут сокультивирования клеток U251MG с FetMSC или M-FetMSC, оказывала антипролиферативный эффект. Число глиомных клеток при обработке такими средами оказалось меньше числа клеток, обработанных КС от контрольной 21-суточной культуры клеток U251MG ( $P < 0.01$ ). Так, в контрольном варианте (КС от U251MG) число клеток составило  $(4.0 \pm 0.2) \cdot 10^3$  (рис. 3, а, б, кривая 1), тогда как в опытных вариантах —  $(2.2 \pm 0.2) \cdot 10^3$  и  $(2.2 \pm 0.0) \cdot 10^3$  соответственно для КС от U251MG + FetMSC (рис. 3, а, кривая 2) и КС от U251MG + M-FetMSC (рис. 3, б, кривая 2). Отметим, что супернатанты от смешанных культур клеток U251MG и ДФ, взятые на всех сроках совместного культивирования, поддерживали пролиферацию глиомных клеток на повышенном уровне по сравнению с контролем, их число на 21-е сут составляло  $(6.0 \pm 0.3) \cdot 10^3$  ( $P < 0.01$ ) (рис. 3, а, кривая 3).

Мы также протестировали влияние на пролиферацию клеток глиомы U251MG КС, полученной от смешанных культур M-FetMSC и U251MG, выращенных 2-м способом — при посеве уже смешанной суспензии клеток (рис. 2, б). Неожиданно оказалось, что уже 9-суточная КС от таких культур тормозит пролиферацию глиомных клеток по сравнению с контролем: для контрольного варианта (КС от U251MG) число клеток составляло

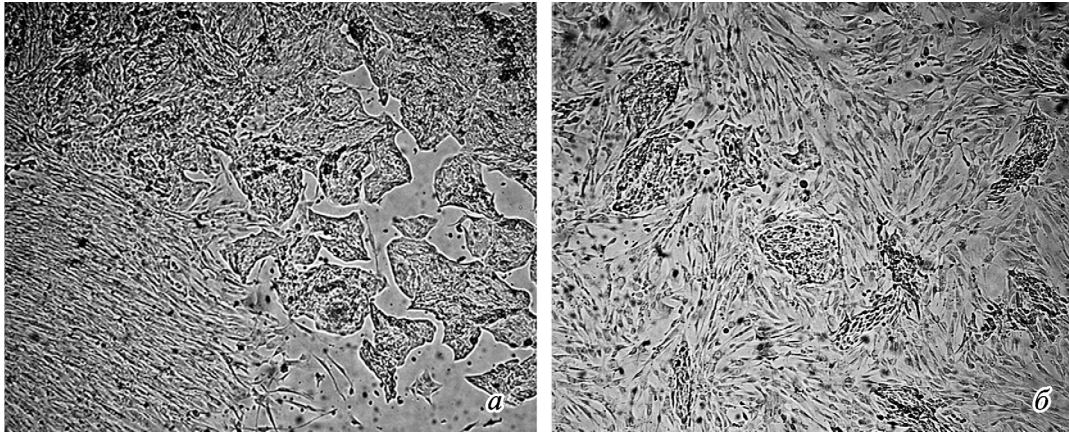


Рис. 2. Клетки полигональной формы U251MG и клетки веретеновидной формы M-FetMSC в смешанной культуре при посеве разными способами.

*а* — клетки рассеяны в разных частях культуральной чашки (1-й способ); показан участок, где фронт параллельно ориентированных M-FetMSC близко подошел к клеткам U251MG, расположенным в центре культуральной чашки. *б* — клетки рассеяны в смешанной суспензии (2-й способ); глиомные клетки растут островками. 7 сут сокультивирования. Фазовый контраст. Об. 10×.

$(3.7 \pm 0.2) \cdot 10^3$  (рис. 3, *б*, кривая 1), а для опытного (КС от U251MG + M-FetMSC) —  $(2.3 \pm 0.1) \cdot 10^3$  (рис. 3, *б*, кривая 3) ( $P < 0.01$ ). КС от 21-суточных культур фактически блокировала пролиферацию клеток U251MG, число которых оказалось даже чуть ниже числа посеянных клеток —  $(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^3$ .

Чтобы исключить влияние истощения КС, а также накапливающихся метаболитов на пролиферативную активность клеток U251MG, мы развели КС после 21-суточного сокультивирования свежей средой в соотношении 1 : 1. Такое разведение КС от сокультивирования взрослых ДФ с клетками U251MG, а также контрольной 21-суточной культуры клеток U251MG не изменяло пролиферацию клеток U251MG (рис. 4). При разведении 21-суточной КС от сокультивирования клеток U251MG с МСК антипролиферативный эффект снижался, но разница с контролем оставалась достоверной ( $P < 0.05$ ): число клеток в контрольном варианте (КС от U251MG) составляло  $(4.3 \pm 0.2) \cdot 10^3$ , тогда как в опытных вариантах —  $(3.4 \pm 0.3) \cdot 10^3$  и  $(3.2 \pm 0.5) \cdot 10^3$  для случая КС от

U251MG + FetMSC и КС от U251MG + M-FetMSC соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что взаимное влияние клеток U251MG и эмбриональных МСК при совместном культивировании изменяет пролиферативную активность глиомных клеток. На ранних сроках сокультивирования эмбриональных МСК и клеток U251MG в культуральной среде появляются растворимые факторы, стимулирующие пролиферацию клеток U251MG, а через 3 нед совместного культивирования в КС присутствуют факторы, подавляющие пролиферацию клеток глиомы. Усиление антипролиферативного эффекта при посевах смешанной суспензии двух типов клеток (2-й способ) позволяет предполагать участие межклеточных контактов в стимуляции секреции эмбриональными МСК цитостатических растворимых факторов.

Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии циклина D1. Белок клеточного цикла циклин D1 экспрессируется на высоком уровне в злокачественных глиомах (Sallinen et al., 1999). Чтобы подтвердить ан-

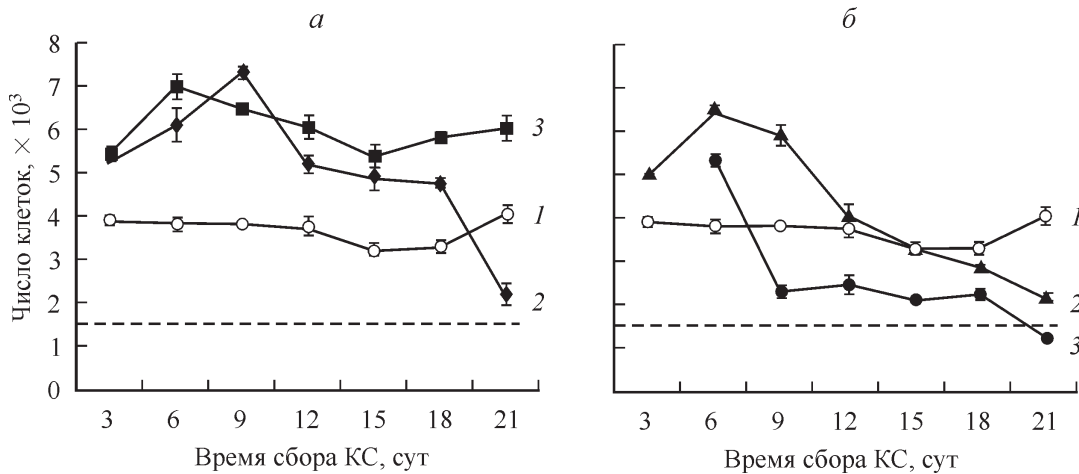


Рис. 3. Пролiferация клеток глиомы U251MG при культивировании в течение 72 ч в КС, полученной от смешанных культур.

*а*: кривая 1 — культивирование в КС, полученной от контрольных клеток U251MG (контроль); кривые 2, 3 — культивирование в КС, полученной от смешанной культуры клеток U251MG с FetMSC или с ДФ соответственно. *б*: кривая 1 — контроль; кривая 2, 3 — культивирование в КС, полученной от смешанных культур клеток U251MG с M-FetMSC. Кривая 3 (*б*) — посев 2-м способом, в остальных случаях клетки рассеивали 1-м способом. Штриховая линия — число клеток U251MG при посеве. МТТ-тест.

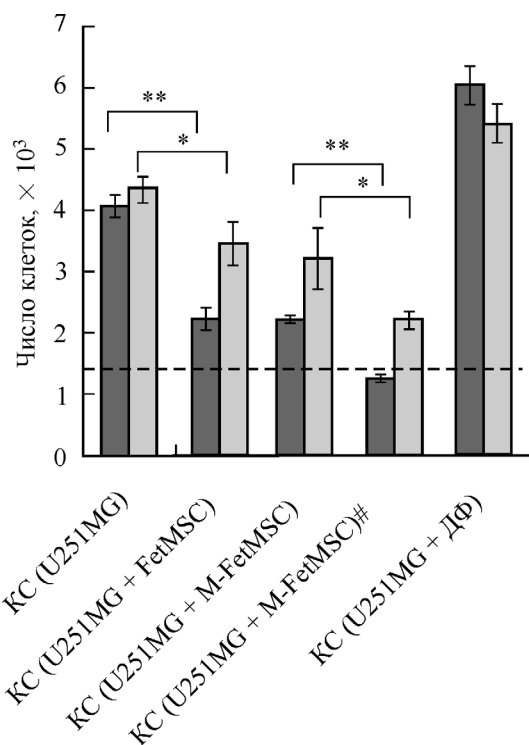


Рис. 4. Проплиферация клеток U251MG при культивировании в КС, полученной от 21-суточных смешанных культур клеток U251MG с FetMSC, M-FetMSC или ДФ. МТТ-тест.

КС (U251MG) — контроль, КС (U251MG + M-FetMSC)# — клетки рассеяны 2-м способом. Во всех остальных случаях клетки рассеивали 1-м способом. Темные столбики — 100 % КС, светлые столбики — 50 % КС. Штриховая линия — число клеток U251MG при рассеиве. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

типипролиферативный эффект эмбриональных МСК на клетки U251MG, было проведено флуоресцентное мечение моноклональными антителами против циклина D1 глиомных клеток, обработанных в течение 72 ч КС от 6- и 21-суточной смешанной культуры клеток U251MG с FetMSC или M-FetMSC. Было обнаружено, что культивирование U251MG в 21-суточной КС приводило к снижению экспрессии циклина D1 по сравнению с 6-суточной (рис. 5). При обработке клеток U251MG контрольными 6- и 21-суточными супернатантами разницы в экспрессии циклина D1 не было. Глиомные клетки, обработанные КС тех же сроков от смешанной культуры клеток U251MG и ДФ, имели высокий уровень экспрессии циклина D1. Данные иммунофлуоресцентного анализа согласуются с результатами, полученными с помощью МТТ-теста, и свидетельствуют об антипролиферативном влиянии эмбриональных МСК на клетки глиомы U251MG на поздних сроках их сокультивирования.

### Обсуждение

Интерес к применению МСК в противоопухолевой клеточной терапии связан в первую очередь с их способностью мигрировать к растущим опухолям и даже находить единичные диссеминированные раковые клетки (Brower, 2005; Xu et al., 2010; Doucette et al., 2011). Это свойство МСК имеет особую значимость для наиболее инвазивных и инфильтративных форм рака, таких, например, как глиобластома. МСК могут быть использованы в

клеточной терапии в качестве переносчиков цитотоксических молекул для поиска и уничтожения глиомных клеток (Nakamizo et al., 2005; Hong et al., 2009; Menon et al., 2009; Sasportas et al., 2009; Ciavarella et al., 2011). Однако необходимо учитывать, что сами МСК секретируют молекулы, изменяющие пролиферацию опухолевых клеток (Zhu et al., 2011; Akimoto et al., 2013). Экспрессия паракринных факторов имеет, вероятно, пространственно-временную зависимость. Факторы, секретируемые опухолевыми клетками, могут менять продукцию цитокинов МСК, мигрировавших к опухоли, в результате чего меняется действие МСК на опухолевые клетки (так называемый cellular cross-talk) (Phinney et al., 2013).

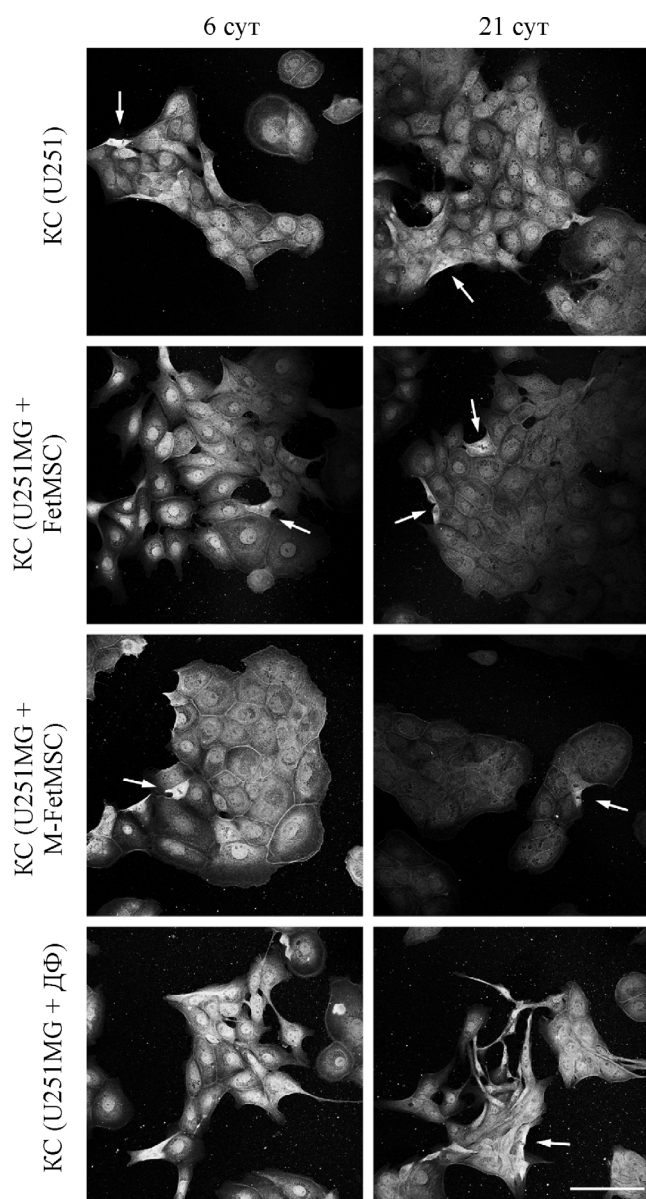


Рис. 5. Экспрессия циклина D1 в клетках U251MG через 72 ч культивирования в КС, полученной от 6- и 21-суточных смешанных культур клеток U251MG с FetMSC, M-FetMSC или с ДФ. Иммунофлуоресцентное мечение моноклональными антителами против циклина D1.

КС (U251MG) — контроль; стрелками обозначены делящиеся клетки. Масштабный отрезок — 100 мкм.

Конечный результат обоюдного взаимодействия опухолевых клеток и МСК определяется разнообразием паракринных факторов, продуцируемых обоими типами клеток. Так, цитотоксическое влияние на глиомные клетки оказывают МСК пуповинной крови, пупочного канатика, амниотической оболочки, костного мозга и эндометрия, а МСК жировой ткани значительно стимулируют глиомный рост (Kang et al., 2008; Dasari et al., 2010; Velpula et al., 2011; Jiao et al., 2011, 2012; Akimoto et al., 2013; Ma et al., 2014). В настоящей работе рассмотрен потенциал эмбриональных МСК из двух источников (костного мозга и мышечной ткани) в регуляции пролиферативной активности глиомных клеток в условиях продолжительного сокультивирования.

С помощью МТТ-анализа мы исследовали действие на глиомные клетки КС, полученной от линий эмбриональных МСК. Никакого значимого влияния супернатантов эмбриональных МСК на пролиферацию клеток двух глиомных линий человека — U251MG и A172 — нами обнаружено не было. Изменение пролиферативной активности глиомных клеток происходило, когда мы использовали КС от смешанных культур эмбриональных МСК и клеток глиомы U251MG. Причем КС, взятая на ранних сроках сокультивирования, стимулировала пролиферацию клеток U251MG, а КС поздних сроков — подавляла ее. Такие различия в действии КС свидетельствуют об изменении спектра растворимых факторов, секретируемых МСК, что является следствием взаимных влияний МСК и клеток глиомы в процессе сокультивирования.

Известно, что МСК секретируют большое разнообразие ростовых факторов и цитокинов, таких как EGF, FGF, HGF, BMP2, IL6, IL8, IL10, CXCL5, CXCL6, CXCL7 и CXCL1, стимулирующих пролиферацию опухолевых клеток (Zimmerlin et al., 2013). Секреция этих факторов может усиливаться при взаимодействии МСК с опухолевыми клетками, что оказывает выраженный проопухольный эффект (Rhodes et al., 2010; Eterno et al., 2014). Возможно, этим объясняется наблюдаемый в нашей работе рост пролиферации клеток U251MG в течение 1-й нед сокультивирования с эмбриональными МСК. Однако в дальнейшем пролиферативная активность клеток U251MG постепенно снижалась и к 21-м сут была ниже контрольной. Это свидетельствует о появлении цитостатических факторов в КС. При расщеплении смешанной суспензии клеток U251MG и МСК антипролиферативное действие усиливалось: КС уже от 9-суточной смешанной культуры тормозила пролиферацию глиомных клеток. Это позволяет предполагать участие не только паракринных факторов, но и контактных взаимодействий двух типов клеток в изменении секреции антипролиферативных факторов. Влияние прямых контактов между МСК и опухолевыми клетками на синтез растворимых факторов, как стимулирующих пролиферацию, так и оказывающих цитотоксическое действие на опухолевые клетки, было отмечено ранее в нескольких работах (Khakoo et al., 2006; Rhodes et al., 2010).

Чтобы убедиться в том, что снижение пролиферативной активности клеток U251MG не было вызвано истощением КС на поздних сроках сокультивирования, мы проверили влияние КС, разбавленной в 2 раза свежей средой. Такое разведение 21-суточной КС от смешанных культур U251MG и эмбриональных МСК приводило к некоторой стимуляции пролиферации в отличие от 21-суточной КС от контрольных клеток U251MG и от смешанной культуры клеток U251MG с ДФ. Это также свидете-

льствует о том, что в среде от смешанных культур глиомных и эмбриональных МСК присутствуют антипролиферативные факторы, и небольшое усиление пролиферации при разведении может быть связано со снижением их концентрации.

Несмотря на разные источники получения и некоторые различия между линиями, в частности по ростовым характеристикам (Крылова и др., 2014), влияние FetMSC и M-FetMSC на пролиферативную активность клеток глиом оказалось сходным. Более раннее проявление антипролиферативного эффекта M-FetMSC по сравнению с FetMSC может быть связано с более высокой пролиферативной активностью M-FetMSC. Известно, что выраженность цитостатического и цитотоксического воздействия МСК на опухолевые клетки *in vitro* зависит от соотношения клеток в культуре — чем больше доля мезенхимных клеток при сокультивировании, тем сильнее их влияние на опухолевые клетки (Kang et al., 2008; Lu et al., 2008). Таким образом, в отличие от взрослых ДФ взаимные влияния эмбриональных МСК и клеток U251MG приводят в процессе сокультивирования к реверсии пролиферативной программы опухолевых клеток.

Снижение экспрессии белка клеточного цикла циклина D1 на поздних сроках сокультивирования подтверждает, что наблюдаемые эффекты вызваны снижением пролиферативной активности клеток глиомы. Циклин D1 является ключевым регулятором клеточной пролиферации и функционирует как онкоген (Baldin et al., 1993; Hinds et al., 1994). Повышенная экспрессия циклина D1 ведет к неконтролируемому клеточному росту в опухолях различного происхождения и коррелирует со степенью злокачественности глиом головного мозга (Sallinen et al., 1999). И наоборот, редукция циклина D1 в клетках связана с остановкой клеточного цикла на границе фаз G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> и дифференцировкой (Guo et al., 2005; Li et al., 2011; Wang et al., 2013). В работе Вельпула с соавторами (Velpula et al., 2011) показано, что клетки пуповинной крови тормозят пролиферацию клеток глиомы U251 посредством регуляции экспрессии циклина D1. Так как одновременно наблюдалось снижение экспрессии белка β-катенина, предполагалась регуляция пролиферации через Wnt/β-катениновый сигнальный путь. Wnt/β-катениновый сигнальный путь участвует и в антипролиферативном действии эмбриональных МСК кожи на клетки гепатомы (Qiao et al., 2008b).

Обнаруженная нами редукция циклина D1 в клетках глиомы U251MG при сокультивировании с эмбриональными МСК дает основание предполагать, что в антипролиферативное действие вовлечен Wnt-сигнальный путь. Абберантная активация Wnt-сигнального пути имеет место в опухолях, в том числе и в злокачественных глиомах (Reya, Clevers, 2005; Götze et al., 2010). Возможно, как ответ на Wnt-активацию в большинстве глиом повышена экспрессия белка Dkk-1 (Dkk-1), растворимого ингибитора Wnt-пути. Сравнение разных клеточных линий глиом показало, что самый высокий уровень экспрессии Dkk-1 имеют клетки U251 (Zhou et al., 2010). В то же время МСК из разных источников также экспрессируют Dkk-1. Однако в этих клетках Wnt/β-катениновый сигнальный путь инвертирован. Высокий уровень Dkk-1 в культуральной среде обнаружен, когда МСК покидают лаг-фазу и входят в фазу быстрого экспоненциального роста (Gregory et al., 2003). Dkk-1 позволяет МСК заново входить в клеточный цикл путем торможения канонического Wnt/β-катенинового сигнального пути. Глиомные

клетки и МСК могут, таким образом, оказывать взаимные влияния друг на друга через секретируемый ими белок Dkk-1. Наблюдаемое нами видимое усиление пролиферации МСК на ранних сроках сокультивирования может быть связано с секрецией Dkk-1 клетками U251MG. С другой стороны, дополнительная секреция Dkk-1 МСК могла бы объяснить торможение пролиферации клеток U251MG на поздних сроках сокультивирования. Антипролиферативная роль Dkk-1, секретируемого эмбриональными МСК кожи, обнаружена в клетках рака молочной железы MCF-7 (Qiao et al., 2008a). Недавно было показано, что МСК пупочного канатика тормозят пролиферацию клеток глиомы C6 через секрецию Dkk-1, причем эксперименты с КС обнаружили концентрационную зависимость ингибирующего действия (Ma et al., 2014).

В литературе воздействия МСК на опухолевые клетки рассматриваются обычно на коротких сроках совместного культивирования — от нескольких часов до нескольких суток. Возможно, это является одной из причин того, что эффекты, наблюдаемые *in vitro*, не всегда повторяются в экспериментах *in vivo*. В нашей работе впервые показано, что при более длительном сокультивировании взаимные влияния клеток друг на друга могут приводить даже к реверсии первоначального эффекта. Представленный здесь способ тестирования КС, взятых на разных сроках совместного культивирования опухолевых клеток и МСК, может быть использован для моделирования процессов долгосрочных взаимных влияний клеток двух типов.

В заключение отметим, что влияния различных типов МСК на пролиферацию клеток глиом следует изучать до использования МСК в противоопухолевой лечебной терапии. При этом необходимо учитывать отсроченные эффекты, к которым могут привести взаимные влияния МСК и опухолевых клеток.

Авторы выражают признательность Н. М. Юдинцевой за предоставленные дермальные фибробласты.

### Список литературы

- Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2014. Сравнительные характеристики линий мезенхимных стволовых клеток, полученных из костного мозга и мышцы конечности раннего эмбриона человека. Цитология. 56 (8) : 562—573. (Krylova T. A., Musorina A. S., Zenin V. V., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2014. Comparative characteristics of mesenchymal stem cell lines derived from bone marrow and muscle of limb of early human embryo. Tsitologiya. 56 (8) : 562—573.)
- Akimoto K., Kimur K., Nagano M., Takano S., To'a Salazar G., Yamashita T., Ohneda O. 2013. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote, glioblastoma multiforme proliferation. Stem Cells Develop. 22 : 1370—1386.
- Baldin V., Lukas J., Marcote M. J., Pagano M., Draetta G. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G<sub>1</sub>. Genes Develop. 7 : 812—821.
- Barbash I. M., Chouraqui P., Baron J., Feinberg M. S., Etzioni S., Tessone A., Miller L., Guetta E., Zipori D., Kedes L. H., Klowner R. A., Leor J. 2003. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. Circulation. 108 : 863—868.
- Bitsika V., Vlahou A., Roubelakis M. G. 2013. Fetal mesenchymal stem cells in cancer therapy. Curr. Stem Cell Res. Ther. 8 : 133—143.
- Brower V. 2005. Search and destroy: recent research exploits adult stem cells' attraction to cancer. J. Nat. Cancer Inst. 97 : 414—416.
- Burdon T. J., Paul A., Noiseux N., Prakash S., Shum-Tim D. 2011. Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. Bone Marrow Res. 201326. doi: 10.1155/2011/207326.
- Chen J., Li Y., Wang L., Zhang Z., Lu D., Lu M., Chopp M. 2001. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. Stroke. 32 : 1005—1011.
- Ciavarella S., Dominici M., Dammacco F., Silvestris F. 2011. Mesenchymal stem cells: new promise in anticancer therapy. Stem Cells Develop. 20 : 1—10.
- Dasari V. R., Velpula K. K., Kaur K., Fassett D., Klopfenstein J. D., Dinh D. H., Gujrati M., Rao J. S. 2010. Cord blood stem cell-mediated induction of apoptosis in glioma downregulates X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). PLoS ONE. 5 : e11813.
- Djouad F., Plence P., Bony C., Tropel P., Apparailly F., Sany J., Noel D., Jorgensen C. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. Blood. 102 : 3837—3844.
- Doucette T., Rao G., Yang Y., Gumin J., Shinjima N., Bekele B. N., Qiao W., Zhang W., Lang F. F. 2011. Mesenchymal stem cells display tumor-specific tropism in an RCAS/Ntv-a glioma model. Neoplasia. 13 : 716—725.
- Eterno V., Zambelli A., Pavesi L., Villani L., Zanini V., Petrolo G., Manera S., Tuscano A., Amato A. 2014. Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling. Oncotarget. 5 : 613—633.
- Götze S., Wolter M., Reifemberger G., Müller O., Sievers S. 2010. Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas. Int. J. Cancer. 126 : 2584—2593.
- Gregory C. A., Singh H., Perry A. S., Prockop D. J. 2003. The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. J. Biol. Chem. 278 : 28 067—28 078.
- Guo Y., Harwalkar J., Stacey D. W., Hitomi M. 2005. Destabilization of cyclin D1 message plays a critical role in cell cycle exit upon mitogen withdrawal. Oncogene. 24 : 1032—1042.
- Han X., Meng X., Yin Z., Rogers A., Zhong J., Rillema P., Jackson J. A., Ichim T. E., Minev B., Carrier E., Patel A. N., Murphy M. P., Min W. P., Riordan N. H. 2009. Inhibition of intracranial glioma growth by endometrial regenerative cells. Cell Cycle. 8 : 606—610.
- Hinds P. W., Dowdy S. F., Eaton E. N., Arnold A., Weinberg R. A. 1994. Function of a human cyclin gene as an oncogene. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 91 : 709—713.
- Ho I. A., Chan K. Y., Ng W. H., Guo C. M., Hui K. M., Cheang P., Lam P. Y. 2009. Matrix metalloproteinase 1 is necessary for the migration of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward human glioma. Stem Cells. 27 : 1366—1375.
- Hong X., Miller C., Savant-Bhonsale S., Kalkanis S. N. 2009. Antitumor treatment using interleukin-12-secreting marrow stromal cells in an invasive glioma model. Neurosurgery. 64 : 1139—1147.
- Hou L., Wang X., Zhou Y., Ma H., Wang Z., He J., Hu H., Guan W., Ma Y. 2014. Inhibitory effect and mechanism of mesenchymal stem cells on liver cancer cells. Tumour Biol. 35 : 1239—1250.
- Jiao H., Guan F., Yang B., Li J., Shan H., Song L., Hu X., Du Y. 2011. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit C6 glioma via downregulation of cyclin D1. Neurol. India. 59 : 241—247.
- Jiao H., Guan F., Yang B., Li J., Song L., Hu X., Du Y. 2012. Human amniotic membrane derived-mesenchymal stem cells induce C6 glioma apoptosis *in vivo* through the Bcl-2/caspase pathways. Mol. Biol. Rep. 39 : 467—473.
- Joshi M., Patil P., He Z., Holgersson J., Olausson M., Sumitran-Holgersson S. 2012. Fetal liver-derived mesenchymal stromal

cells augment engraftment of transplanted hepatocytes. *Cytherapy*. 14 : 657—669.

Kang S. G., Jeun S. S., Lim J. Y., Kim S. M., Yang Y. S., Oh W. I., Huh P. W., Park C. K. 2008. Cytotoxicity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against human malignant glioma cells. *Childs Nerv. Syst.* 24 : 293—302.

Khakoo A. Y., Pati S., Anderson S. A., Reid W., Elshal M. F., Rovira I. I., Nguyen A. T., Malide D., Combs C. A., Hall G., Zhang J., Raffeld M., Rogers T. B., Stetler-Stevenson W., Frank J. A., Reitz M., Finkel T. 2006. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J. Exp. Med.* 203 : 1235—1247.

Kucerova L., Matuskova M., Hlubinova K., Altanerova V., Altaner C. 2010. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. *Mol. Cancer*. 9 : 129. doi: 10.1186/1476-4598-9-129.

Li G., Wang R., Gao J., Deng K., Wei J., Wei Y. 2011. RNA interference-mediated silencing of iASPP induces cell proliferation inhibition and G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest in U251 human glioblastoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* 350 : 193—200.

Lu Y. R., Yuan Y., Wang X. J., Wei L. L., Chen Y. N., Cong C., Li S. F., Long D., Tan W. D., Mao Y. Q., Zhang J., Li Y. P., Cheng J. Q. 2008. The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol. Ther.* 7 : 245—251.

Ma S., Liang S., Jiao H., Chi L., Shi X., Tian Y., Yang B., Guan F. 2014. Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit C6 glioma growth via secretion of dickkopf-1 (DKK1). *Mol. Cell. Biochem.* 385 : 277—286.

Menon L. G., Kelly K., Yang H. W., Kim S. K., Black P. M., Carroll R. S. 2009. Human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expressing S-TRAIL as a cellular delivery vehicle for human glioma therapy. *Stem Cells*. 27 : 2320—2330.

Mishra P. J., Mishra P. J., Humeniuk R., Medina D. J., Alexe G., Mesirov J. P., Ganesan S., Glod J. W., Banerjee D. 2008. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 68 : 4331—4339.

Nakamizo A., Marini F., Amano T., Khan A., Studeny M., Gumin J., Chen J., Hentschel S., Vecil G., Dembinski J., Andreeff M., Lang F. F. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 65 : 3307—3318.

Phinney D. G., Sensebe L. 2013. Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. *Cytherapy*. 15 : 140—145.

Qiao L., Xu Z. L., Zhao T. J., Ye L. H., Zhang X. D. 2008a. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett.* 269 : 67—77.

Qiao L., Xu Z., Zhao T., Zhao Z., Shi M., Zhao R. C., Ye L., Zhang X. 2008b. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res.* 18 : 500—507.

Reya T., Clevers H. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 434 : 843—850.

Rhodes L. V., Antoon J. W., Muir S. E., Elliott S., Beckman B. S., Burow M. E. 2010. Effects of human mesenchymal stem cells on ER-positive human breast carcinoma cells mediated through ER-SDF-1/CXCR4 crosstalk. *Mol. Cancer*. 9 : 295. doi: 10.1186/1476-4598-9-295.

Sallinen S. L., Sallinen P. K., Kononen J. T., Syrjakoski K. M., Nupponen N. N., Rantala I. S., Helen P. T., Helin H. J., Haapasalo H. K. 1999. Cyclin D1 expression in astrocytomas is associated with cell proliferation activity and patient prognosis. *J. Pathol.* 188 : 289—293.

Sasportas L. S., Kasmieh R., Wakimoto H., Hingtgen S., van de Water J. A., Mohapatra G., Figueiredo J. L., Martuza R. L., Weisleder R., Shah K. 2009. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 106 : 4822—4827.

Surawicz T. S., Davis F., Freels S., Laws E. R., Jr., Menck H. R. 1998. Brain tumor survival: results from the National Cancer Data Base. *J. Neurooncol.* 40 : 151—160.

Takahara K., Ii M., Inamoto T., Komura K., Ibuki N., Minami K., Uehara H., Hirano H., Nomi H., Kiyama S., Asahi M., Azuma H. 2014. Adipose-derived stromal cells inhibit prostate cancer cell proliferation inducing apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446 : 1102—1107.

Van Meir E. G., Hadjipanayis C. G., Norden A. D., Shu H. K., Wen P. Y., Olson J. J. 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J. Clin.* 60 : 166—193.

Velpula K. K., Dasari V. R., Tsung A. J., Gondi C. S., Klopffstein J. D., Mohanam S., Rao J. S. 2011. Regulation of glioblastoma progression by cord blood stem cells is mediated by downregulation of cyclin D1. *PLoS ONE*. 6 : e18017. doi: 10.1371/journal.pone.0018017.

Wang Y., Zhang Y., Qian C., Cai M., Li Y., Li Z., You Q., Wang Q., Hu R., Guo Q. 2013. GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling is correlated with the differentiation of glioma cells induced by wogonin. *Toxicol. Lett.* 222 : 212—223.

Xu F., Shi J., Yu B., Ni W., Wu X., Gu Z. 2010. Chemokines mediate mesenchymal stem cell migration toward gliomas *in vitro*. *Oncol. Rep.* 23 : 1561—1567.

Ye H., Cheng J., Tang Y., Liu Z., Xu C., Liu Y., Sun Y. 2012. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced TGF $\beta$  contributes to progression and metastasis of prostate cancer. *Cancer Invest.* 30 : 513—518.

Yu J. M., Jun E. S., Bae Y. C., Jung J. S. 2008. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth *in vivo*. *Stem Cells Develop.* 17 : 463—473.

Zhang T., Lee Y. W., Rui Y. F., Cheng T. Y., Jiang X. H., Li G. 2013. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Res. Ther.* 4 : 70.

Zhou Y., Liu F., Xu Q., Wang X. 2010. Analysis of the expression profile of Dickkopf-1 gene in human glioma and the association with tumor malignancy. *Exp. Clin. Cancer Res.* 29 : 138. doi: 10.1186/1756-9966-29-138.

Zhu W., Huang L., Li Y., Qian H., Shan X., Yan Y., Mao F., Wu X., Xu W. R. 2011. Mesenchymal stem cell-secreted soluble signaling molecules potentiate tumor growth. *Cell Cycle*. 10 : 3198—3207.

Zimmerlin L., Park T. S., Zambidis E. T., Donnenberg V. S., Donnenberg A. D. 2013. Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. *Biochimie*. 95 : 2235—2245.

Поступила 21 VII 2014

## INFLUENCE OF HUMAN FETAL MESENCHYMAL STEM CELLS ON GLIOMA CELL PROLIFERATION. A CONSEQUENCE OF CELLULAR CROSSTALK

I. A. Chistyakova,<sup>1</sup> G. G. Poljanskaya

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; <sup>1</sup> e-mail: ichi\_spb@yahoo.com

The effect of mesenchymal stem cells (MSCs) on the growth of various tumors is ambiguous. MSCs derived from different tissues stimulate growth of some tumor types and exert antitumor effects on the other. Several recent reports have shown that crosstalk between tumor cells and MSCs contribute to these effects. The aim



of this work was to study the effects of MSCs derived from fetal tissues on the proliferative activity of glioma cells in conditions of prolonged co-cultivation. We have analyzed the proliferative activity of glioma cells exposed to conditioned medium (CM) from MSCs derived from fetal bone marrow (FetMSC) and fetal muscle (M-FetMSC) as well as to CM from co-cultivation of the fetal MSCs with U251MG glioma cells. As a comparison, the influence of CM from adult dermal fibroblasts (DFs) was examined in identical experiments. Using MTT assay, we have found that CM from both the fetal MSCs and adult DFs (without their co-culturing with glioma cells) had no effect on U251MG and A172 glioma cell proliferation. However, CM from early co-cultures (3—9 days) of U251MG cells with FetMSC or M-FetMSC exerted stimulatory effect on U251MG cell proliferation up to 2.3-fold increase, while CM obtained later from the same co-cultures (15—21 days) had inhibitory effect on the proliferation up to arrest of cell division. Analogous experiments with adult DFs have revealed a persistent stimulation of U251MG cell proliferative activity for all 21 days of co-culturing. Immunofluorescence analysis revealed a reduction in the expression of cell cycle protein cyclin D1 in U251MG cells after their treatment with CM taken from 21-days co-cultures of U251MG cells with FetMSC or M-FetMSC. In contrast, CM from 21-days co-cultures of U251MG cells with DFs did not decrease the expression of cyclin D1. These results show that fetal MSCs have dual effect on glioma cell proliferation. In spite of the earlier stimulatory effect on the proliferative activity, prominent inhibition of glioma cell proliferation was observed after three week co-culturing of glioma cells with fetal MSCs. This is the first report demonstrating reversion of tumor cell proliferative program during co-culturing with MSCs for a long time. These data suggest that CM obtained at different time points of cell co-culturing can be used in the modeling of prolonged cellular crosstalk.

**Key words:** fetal mesenchymal stem cells, glioma cells, proliferation, conditioned medium, cellular crosstalk.

---