

ХАРАКТЕРИСТИКА ОПУХОЛЕЙ, РАЗВИВШИХСЯ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ СИНГЕННЫХ ОБЛУЧЕННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

© *Е. Ю. Москалева*,^{1,*} *Е. С. Жорова*,² *Ю. П. Семочкина*,¹ *А. В. Родина*,¹
О. В. Высоцкая,¹ *А. И. Глухов*,¹ *А. А. Чукалова*,¹ *Г. А. Посыпанова*,¹ *В. П. Сапрыкин*²

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123182,*

и ² *Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна
Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 123098;*

** электронный адрес: moskalevaeu@mail.ru*

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) присутствуют практически во всех органах и тканях. Полагают, что под действием генотоксических факторов они могут трансформироваться в опухолевые стволовые клетки и инициировать рост опухолей. Цель работы — исследование возможности злокачественной трансформации культивируемых МСК из костного мозга (КМ) мышей после действия γ -излучения *in vitro* и характеристика биохимических и гистологических особенностей опухолей, развившихся после трансплантации МСК-КМ сингенным мышам. Спустя 3—4 мес после подкожного введения МСК-КМ, облученных в дозе 1 Гр, опухоли появились у 2 из 5 мышей, при введении МСК-КМ, облученных в дозе 6 Гр, — у 5 из 5 мышей, а при введении необлученных МСК-КМ опухоль обнаружена только у 1 из 5 мышей через 6 мес после трансплантации. В опухоли, развившейся из облученных в дозе 6 Гр МСК-КМ, активность теломеразы была в 2 раза выше, чем в опухоли, образовавшейся после облучения МСК-КМ в дозе 1 Гр. По гистологическому строению новообразования соответствовали злокачественным опухолям — многокомпонентным мезенхимомам («смесь сарком»). Они состояли из участков тканей различной гистогенетической принадлежности. Таким образом, МСК-КМ, облученные в дозе 1 или 6 Гр, и гораздо реже контрольные МСК-КМ могут трансформироваться в опухолевые клетки и вызвать развитие многокомпонентных мезенхимом.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, костный мозг, злокачественная трансформация, многокомпонентная мезенхимома, саркома, теломераза, гамма-излучение.

Принятые сокращения: АТ — активность теломеразы, МСК-КМ — мезенхимные стволовые клетки (МСК) из костного мозга (КМ), PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

В настоящее время накапливаются данные, свидетельствующие о том, что саркомы образуются из мезенхимных стволовых клеток (мультипотентных стромальных стволовых клеток, МСК) — долгоживущих клеток, присутствующих практически во всех органах и тканях организма, в результате накопления спонтанных и индуцированных мутаций (Lye et al., 2016). Спонтанная злокачественная трансформация МСК из костного мозга (МСК-КМ) мышей сопровождалась появлением хромосомных aberrаций, повышением экспрессии гена *c-myc* и увеличением активности теломеразы, которая коррелировала со степенью злокачественности клеток (Miura et al., 2006).

В отдаленном периоде после облучения в процессе лучевой терапии у человека возрастает риск развития сарком, который оценивается равным 0.06 %. Латентный период появления таких опухолей колеблется от 3 до 50 лет, составляя в среднем 15 лет (Nuvos et al., 1985; Mavrogenis et al., 2012). В последние годы отмечен рост числа радиогенных сарком (Kim et al., 2016). Доказательств связи между облучением МСК и развитием сарком в настоящее время нет.

Цель настоящей работы — исследование возможности злокачественной трансформации культивируемых МСК-КМ мышей при действии γ -излучения *in vitro* и характеристика биохимических и гистологических особенностей опухолей, развившихся после трансплантации контрольных и облученных МСК-КМ сингенным мышам.

Материал и методика

Выделение и культивирование МСК. Животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. МСК выделяли из костного мозга мышей линии C57BL/6 в возрасте 1—2 мес, как описано ранее (Посыпанова и др., 2016). Для выделения МСК из большеберцовых костей получали КМ путем промывания полости кости фосфатно-солевым буфером (PBS), содержащим 50 ед./мл гепарина и 25 мкг/мл гентамицина, с помощью иглы 18G. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 200 g. Супернатант удаляли, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM/F12, содержащей 10 %

фетальной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина, и переносили в культуральные флаконы 25 см² при плотности 40 тыс. кл./см² на 24 ч для прикрепления к пластиковой поверхности. Через 24 ч неприкрепившиеся клетки удаляли. Прикрепившиеся клетки, которые составляли популяцию МСК-КМ, промывали 2 раза PBS и культивировали до достижения субконфлюэнтного состояния в СО₂-инкубаторе, после чего пересеивали с применением раствора трипсин-ЭДТА.

Облучение. Клетки в культуральной среде подвергали действию γ -излучения от источника кобальт-60 на установке ГУТ-200М при комнатной температуре в дозах 1 и 6 Гр при мощности дозы 0.75 Гр/мин.

Определение туморогенной активности МСК-КМ. Клетки культивировали до 29-го пассажа, облучали в дозе 1 или 6 Гр и затем культивировали еще в течение 10 пассажей, для того чтобы в клеточной популяции могли накопиться мутации с онкогенным потенциалом. Контрольные и облученные клетки вводили сингенным мышам линии C57BL/6 массой 18—20 г подкожно в область правой лопатки в количестве 1 млн в 0.2 мл раствора PBS. В эксперименте было 3 группы мышей по 5 особей в каждой: контрольная, которой вводили необлученные клетки, и 2 группы мышей, которым вводили МСК-КМ, облученные в дозе 1 или 6 Гр соответственно. На протяжении 6 мес еженедельно контролировали состояние животных, оценивая их внешний вид и поведение. Для определения времени появления опухолей еженедельно пальпировали мышей в области инокуляции МСК-КМ и в симметричной области слева. На протяжении всего исследования мыши оставались активными, отклонений в поведении отмечено не было. После появления опухолей продолжали наблюдение за животными. Животных с опухолями умерщвляли путем цервикальной дислокации только после достижения крупного размера опухоли (не менее 1 см, обычно через 3—4 нед после обнаружения) для создания условий для развития метастазов. Через 6 мес после инокуляции МСК-КМ всех животных умерщвляли, вскрывали и осматривали область инокуляции клеток и внутренние органы мышей для выявления метастазов. Опухоли извлекали и их фрагменты использовали для гистологического исследования и определения активности теломеразы. Мыши находились в виварии Курчатовского комплекса НБИКС-технологий по 5 животных в клетке в обычных условиях на стандартном рационе (Ресурсный центр нейрокогнитивных исследований).

Определение активности теломеразы (АТ). Фрагменты опухолей замораживали и хранили до исследования при -70 °С. Для проведения исследования осадки клеток и кусочки опухоли гомогенизировали при охлаждении на ледяной бане в течение 30 мин в стеклянных гомогенизаторах в холодном лизирующем буфере (10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 1 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 0.1 мМ PMSF, 5 мМ β -меркаптоэтанол, 0.5 % CHAPS и 10 % глицерина), который добавляли из расчета 8 мкл на 1 мг ткани. Полученные лизаты центрифугировали при 12 000 g в течение 30 мин при 4 °С, далее супернатант тарировали, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -70 °С. Концентрацию белка в полученных экстрактах измеряли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976). Определение АТ в экстрактах проводили с помощью метода TRAP (telomerase repeat amplification protocol) (Kim et al., 1994) с некоторыми модификациями для неизотопной детекции АТ (Glukhov et al., 1998). Элонгацию олиго-

нуклеотидного субстрата и последующую амплификацию проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Трис-НСl (рН 8.8), 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01 % Tween-20, 1.5 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 0.15 мМ каждого дНТФ, 0.1 мкг TS-праймера (теломеримитирующий праймер, 5'-ATTCCGTCGAGCAGAGTT-3'), от 0.025 до 2 мкг белка исследуемых экстрактов ткани опухоли. На стадии ПЦР в реакционную смесь добавляли 0.1 мкг CX-праймера (обратный праймер, 5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3') и 2.5 ед. акт. SmarTaq ДНК-полимеразы (Диалат, Москва). Амплификацию проводили в течение 33 циклов ПЦР. Разделение амплифицированных TRAP-продуктов осуществляли методом электрофореза в 10%-ном неденатурирующем ПААГ, используя буфер Трис-борат-ЭДТА. Смесь после стадии ПЦР вносили в лунки геля в объеме 10 мкл. В качестве лидирующего красителя использовали Orange G (Sigma, США). Электрофорез проводили в течение 45 мин при напряженности электрического поля 20 В/см. Визуализацию разделенных TRAP-продуктов проводили на УФ-трансиллюминаторе (при длине волны 300 нм) после окрашивания геля в темноте в течение 30 мин в растворе красителя SYBR Gold (Molecular Probes, США). Для визуализации результатов использовали систему гель-документирования Syngene G:BOX Chemi XT4 (Великобритания) со встроенной программой обработки полученного изображения GeneTools, которая рассчитывает интенсивность свечения пиков (в усл. ед.), соответствующих дискретным фрагментам TRAP-продуктов. Суммарную площадь пиков принимали за величину АТ в конкретном образце. Далее рассчитывали относительную АТ, сравнивая АТ с положительным контрольным образцом, которым служил экстракт опухолевых клеток миелолейкоза человека линии K562, характеризующихся высокой АТ. В качестве отрицательного контроля использовали образец, в который вместо клеточного экстракта вносили лизирующий буфер.

Гистологическое исследование. После развития опухолей крупного размера (не менее 1 см в диаметре) животных умерщвляли с помощью цервикальной дислокации, вскрывали, извлекали опухоли и анализировали внутренние органы для выявления метастазов. Для гистологического исследования кусочки опухолей фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, затем подвергали обычной гистологической обработке с заливкой в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Микроскопию препаратов проводили на микроскопе Axio Imager D2 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты

Динамика развития опухолей из облученных МСК-КМ при их введении сингенным мышам линии C57BL/6. МСК-КМ мыши охарактеризованы нами ранее (Посыпанова и др., 2016). Было показано, что по морфологии и присутствию на поверхностной мембране антигенов Sca-1 и CD9 и отсутствию маркеров лейкоцитов CD45 и CD11b они полностью соответствуют МСК.

Динамика развития опухолей, образовавшихся после введения контрольных и облученных в дозе 1 или 6 Гр МСК-КМ, показана на рис. 1. При подкожном введении облученных в дозе 1 Гр МСК-КМ опухоли обнаружены только у 2 из 5 мышей соответственно через 16 и 20 нед

(рис. 1, кривая 2). При введении МСК-КМ, облученных в дозе 6 Гр, опухоли развились у всех 5 мышей (100 % случаев), опухоль у 1 мыши была обнаружена через 14, а у остальных — через 16 нед (рис. 1, кривая 3). Из 8 обнаруженных 3 опухоли (1 из необлученных МСК-КМ, 1 из облученных в дозе 1 Гр и 1 из облученных в дозе 6 Гр) оказались не в месте введения МСК-КМ, а в области шеи слева рядом с подкожной жировой тканью (рис. 2, а). Это наблюдение свидетельствует о миграционной активности трансплантированных МСК-КМ.

В конце 6-го мес наблюдения (через 26 нед) была обнаружена опухоль у 1 мыши, которая развилась из контрольных МСК-КМ (рис. 1, кривая 1).

Опухоли, сформировавшиеся из МСК-КМ, облученных в дозе 1 Гр (рис. 2, а), были представлены одним узлом и характеризовались более быстрым ростом. Опухоли, развившиеся из МСК-КМ, облученных в дозе 6 Гр, до 4-го мес наблюдения выглядели как цепочка из 4—5 небольших образований (рис. 2, б). К 6-му мес они представляли собой узлы, достигавшие в продольных размерах более 3 см (рис. 2, в). В крупных опухолях при вскрытии часто обнаруживались твердые остеоподобные участки.

Спустя 6 мес после введения МСК при осмотре внутренних органов после вскрытия животных с опухолями метастазов не обнаружено.

АТ в экстрактах опухолей, образовавшихся у мышей после подкожного введения облученных МСК-КМ. Данные, полученные при исследовании АТ методом TRAP в экстрактах опухолей, образовавшихся у мышей после введения им облученных в дозе 1 или 6 Гр МСК-КМ, представлены на рис. 3. Как видно из полученных данных, интенсивные полосы TRAP-продуктов наблюдаются при использовании экстрактов опухолей, при содержании белка 4 и 1 мкг (рис. 3, дорожки 1, 2, 5 и 6). Но они слабо визуализируются при использовании экстрактов из опухоли, полученной из МСК-КМ, облученных в дозе 1 Гр при содержании белка 0.4 и 0.1 мкг (рис. 3, дорожки 3, 4), и из опухоли, полученной из МСК-КМ, облученных в дозе 6 Гр, при содержании белка 0.1 мкг (рис. 3, дорожка 8). Рассчитанная АТ в ткани опухоли, развившейся из облученных в дозе 6 Гр МСК-КМ, составила 0.11 отн. ед. при сравнении с клетками линии K562 и была в 2 раза выше, чем в опухоли, развившейся из облученных в дозе 1 Гр МСК-КМ (0.05 отн. ед.).

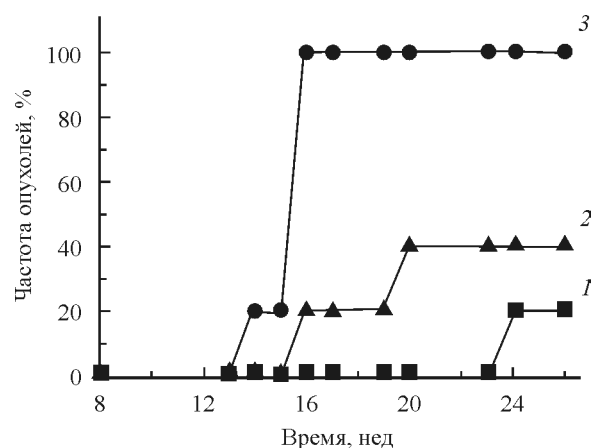


Рис. 1. Динамика развития опухолей у мышей линии C57BL/6 после введения сингенных контрольных МСК-КМ (кривая 1) и МСК-КМ, облученных в дозах 1 (кривая 2) и 6 (кривая 3) Гр.

Таким образом, в опухолях, развившихся из сингенных облученных МСК, выявлена зависимость уровня АТ от дозы облучения. При введении мышам МСК-КМ, облученных в более высокой дозе (6 Гр), в развившейся опухоли уровень АТ более высокий, чем в опухоли, возникшей после трансплантации мышам МСК-КМ, облученных в меньшей дозе (1 Гр).

Гистологическая характеристика опухолей. Во всех исследованных случаях новообразования, развившиеся из контрольных и облученных МСК-КМ, представляют собой опухолевые узлы, локализованные в подкожной клетчатке. Опухоли имеют сложное строение и состоят из производных нескольких тканей мезенхимного происхождения — фиброзной, жировой, рыхлой соединительной, сосудистой, нервных волокон, островков кровотока, участков оссификации, недифференцированной ткани типа мезенхимы. Микроструктура опухолевых узлов отличается пестротой с наличием беспорядочно перемешанных участков различной тканевой дифференцировки опухолевых клеток. В некоторых участках высокая степень атипизма и полиморфизма затрудняет определение гистогенетической принадлежности ткани.

Во всех опухолях присутствуют отчетливые признаки малигнизации. Клеточный атипизм выражается в полиморфизме или, наоборот, мономорфизме клеток, ядер и ядрышек, в гиперхромии ядер, в полиплоидии, в измене-



Рис. 2. Вид опухоли, развившейся из МСК-КМ, облученных в дозах 1 (а) и 6 (б, в) Гр.

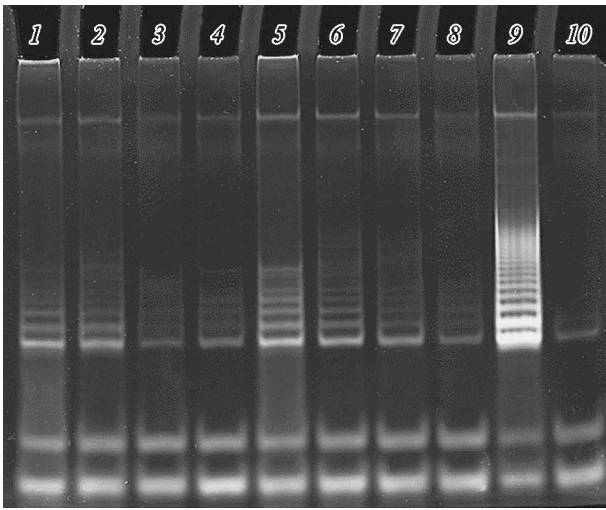


Рис. 3. Активность теломеразы в экстракте опухолей, образовавшихся у мышей после введения им МСК-КМ, облученных в дозах 1 (дорожки 1—4) и 6 (дорожки 5—8) Гр в сравнении с клетками миелолейкоза человека линии K562 (дорожка 9). Метод TRAP.

При электрофорезе содержание белка экстракта клеток составляло (в мкг): 4 (дорожки 1, 5), 1 (дорожки 2, 6), 0,4 (дорожки 3, 7) и 0,1 (дорожки 4, 8, 9). Дорожка 10 — отрицательный контроль без белкового экстракта.

ниях ядерно-цитоплазматического индекса в пользу ядер в связи с их укрупнением, в появлении множества митозов. Встречаются участки с крупными (иногда гигантскими) клетками неправильных очертаний, в которых содержатся гигантские гиперхромные ядра разнообразной причудливой формы и размеров с четкой ядерной мембраной (рис. 4, а). В них, как правило, содержатся четко структурированный хроматин и оформленные четкие 1—2 ядрышка. Иногда ядро плотно заполнено базофильными гранулами. Количество митозов варьирует в разных участках опухолей с преобладанием в мономорфных участках (рис. 4, б). Встречаются патологические митозы. Цитоплазма клеток бледная, пеннистая или вакуолизированная.

Большую часть во всех исследованных опухолях занимают участки переплетающихся клеточно-волокнистых тяжей с признаками низкодифференцированной

фибросаркомы, которые состоят из незрелых фибробластоподобных клеток и коллагеновых волокон (рис. 5, а). В этих участках клетки преимущественно веретеновидные с узкой цитоплазмой. Соотношение клеточных и волокнистых структур варьирует с преобладанием клеточного компонента.

Жировой компонент опухолей представлен вкраплениями жировых клеток или их скоплениями (рис. 5, б). Отмечены дольки из крупных вытянутых клеток с небольшим круглым ядром и цитоплазмой, заполненной мелкими, правильной формы круглыми вакуолями по мультилокулярному типу. К периферии долек вакуоли увеличиваются, превращая клетки в жировые. Имеются дольки из крупных круглых клеток, построенные по типу бурого жира. Среди них преобладают мультилокулярные клетки, цитоплазма которых выполнена мелкими жировыми вакуолями, имеет пеннистый вид, ядро расположено центрально. Встречаются участки липосаркомы со зрелыми липоцитами различных размеров и пластов недифференцированных клеток с атипизмом и полиморфизмом ядер и значительным количеством митозов.

Мелкие участки недифференцированной мезенхимоподобной ткани встречаются редко и локализованы преимущественно в периферических участках опухолей (рис. 5, в). Они представлены полиморфными клетками — звездчатыми, веретенообразными, овальными, заключенными в аморфную миксоматозную основную субстанцию с небольшим количеством коллагеновых волокон, сосудов капиллярного или синусоидного типа. Клетки образуют синцитий, реже лежат изолированно. Местами в них намечается липобластическая дифференцировка. В наименее дифференцированных участках встречаются гигантские клетки — многоядерные или с гигантскими ядрами уродливой формы.

В структуру опухоли вкраплены элементы мышечной ткани с клеточным и тканевым атипизмом. Это одиночные мышечные клетки, тяжи, пронизывающие опухоль или пучки волокон. Также встречаются вытянутые клетки с эозинофильной цитоплазмой, имеющие лентообразный или полоскообразный вид и иногда поперечную исчерченность в цитоплазме (рис. 5, г).

Центральная часть опухолевых узлов, как правило, слабо васкуляризована. Сосуды синусного типа немногочисленны. В других участках опухолей, преимущественно периферийных, видны мелкие полости типа синусоидов или широких капилляров, заполненных кровью или

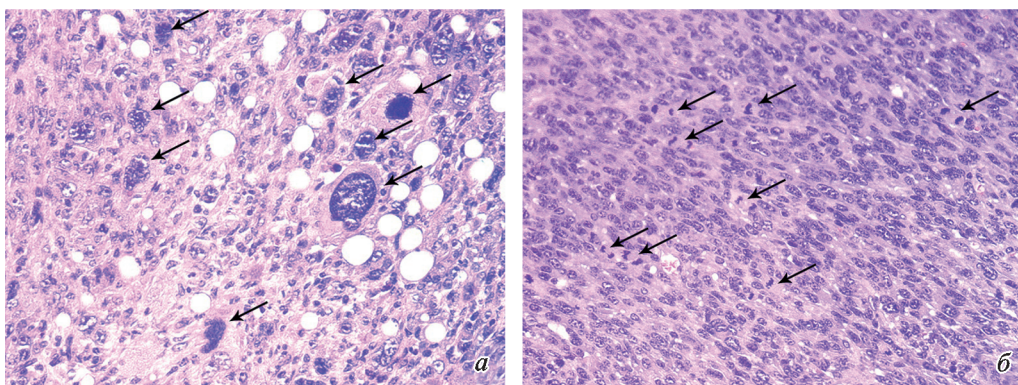


Рис. 4. Признаки малигнизации опухоли: атипизм и полиморфизм клеток, гигантские ядра (а, стрелки) и множество митозов (б, стрелки).

Об.: 20×.

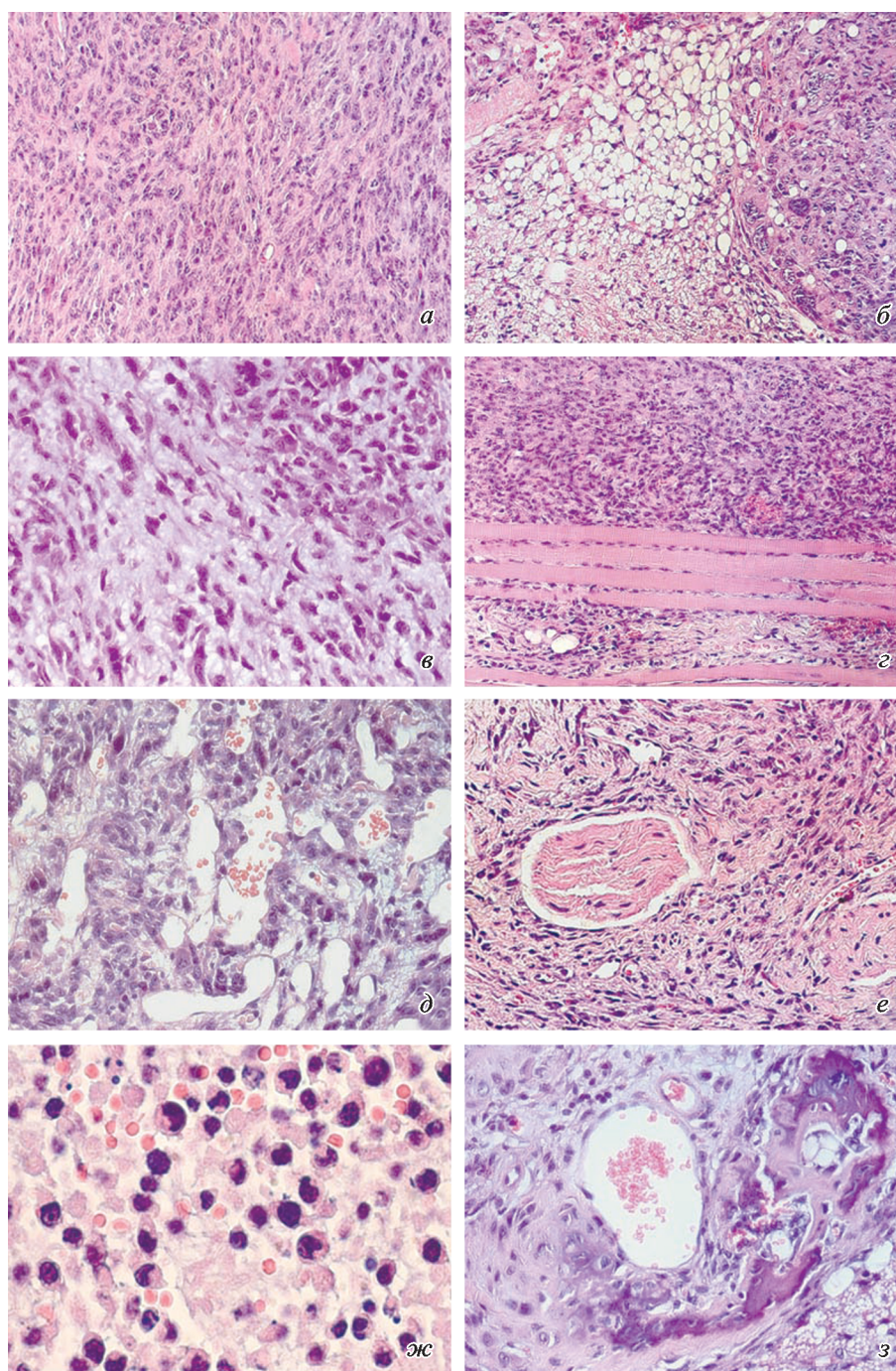


Рис. 5. Элементы фиброзной (а), жировой (б), мезенхимной (в), мышечной (г), сосудистой (д), нервной (е), кровяной (ж) и костно-хрящевой (з) тканей в опухолях, развившихся из облученных МСК-КМ мыши после их трансплантации сингенным мышам линии С57В1/6.

Дозы облучения: 6 (а–е) и 1 (ж, з) Гр. Объяснения см. в тексте. Увел.: 20× (а, б, г, е), 40× (в, д, з) и 100× (ж, масляная иммерсия).

плазмой (рис. 5, д). Они окружены веретенообразными, полигональными или округлыми клетками, образующими синцитий и складывающимися в беспорядочно расположенные тяжи. Можно увидеть спектр изменений от дифференцированных участков с наличием хорошо сформированных капилляроподобных щелей до солидных низкодифференцированных областей по типу ангиосаркомы.

Во всех опухолях встречаются узловатые образования, заполненные рыхло и волнообразно расположенными

волокнами, иногда вихревые, «клубочковые» структуры. Между волокнами содержится вытянутые клетки с овальными ядрами, которые, возможно, являются производными нервной ткани (невромы) (рис. 5, е).

Описанное строение опухолей в той или иной степени присуще всем исследованным образцам. Однако соотношение тканевых компонентов может различаться. Кроме того, имеются индивидуальные особенности и особенности, связанные с дозой облучения МСК-КМ, из которых развивались опухоли.

В опухолях, развившихся из МСК-КМ, облученных в дозе 1 Гр, и в опухоли из необлученных МСК-КМ наблюдается, скорее, клеточный мономорфизм, чем полиморфизм. При отсутствии гигантских полиплоидных клеток встречаются двухъядерные и крупноядерные полиплоидные клетки, обнаруживается большое количество митозов (до 20 и более в поле зрения микроскопа при увеличении объектива 40×). В опухолях, развившихся из МСК-КМ, облученных в дозе 1 Гр, имеются сосредоточения незрелых кроветворных клеток (рис. 5, ж). Большая их часть представлена бластными клетками без признаков дифференцировки. Они занимают значительное пространство, не отграниченное от ткани опухоли. Клетки преимущественно круглые с круглым плотным гиперхромным ядром и узким ободком цитоплазмы. Ядерная оболочка гладкая или грубо шероховатая. Цитоплазма в значительной степени базофильна. Иногда вокруг ядра имеется более светлая зона с эозинофильным оттенком. Встречаются переходные стадии к миелоцитам, о чем свидетельствуют изменение формы ядра и уменьшение степени базофилии цитоплазмы. Возможно, эти участки можно рассматривать как первичную миелоидную саркому.

Опухолям, развившимся из МСК-КМ, облученных в дозе 6 Гр, в большей степени свойственны полиморфизм клеток и полиплоидия и в меньшей степени — пролиферация (до 12 митозов в поле зрения микроскопа при увеличении объектива 40×), чем опухолям, развившимся из МСК-КМ, облученных в дозе 1 Гр. Одна опухоль была спаяна с кожей, в которой видны волосные фолликулы и сальные железы, опухолевые клетки инфильтрируют дерму. В другом случае имело место прорастание опухоли в окружающие ткани (мышечную, жировую и рыхлую соединительную ткань) с образованием фиброзно-хрящевых очагов с фрагментом остеогенной ткани (рис. 5, з). Очаги незрелых кроветворных клеток в этих опухолях отсутствовали, но отмечена инфильтрация подобными клетками стромы периферических зон опухолевых узлов. В участках кровенаполнения встречаются незрелые кроветворные клетки, иногда с митозами.

Существенных морфологических отличий опухоли, развившейся из необлученных МСК-КМ, от опухолей из облученных МСК-КМ не обнаружено. Однако эта опухоль возникла значительно позже, чем опухоли из облученных МСК-КМ.

Таким образом, совокупность морфологических признаков различных по гистогенетической принадлежности взаимосвязанных участков опухолей позволяет классифицировать их как многокомпонентные мезенхимомы — опухоли сложного строения из производных мезенхимы, состоящие из различных тканей, так называемая смесь сарком (Краевский и др., 1993). При этом просматривается некоторая связь строения опухолей с дозой облучения МСК-КМ. При трансплантации клеток, облученных в дозе 6 Гр, в развившихся опухолях больше выражен полиморфизм и меньше пролиферативная активность клеток по сравнению с опухолями, появившимися после введения МСК-КМ, облученных в дозе 1 Гр. Комплексы незрелых кроветворных клеток встречались только в опухолях, развившихся из МСК-КМ, облученных в дозе 1 Гр.

Обсуждение

Развитие опухоли у 1 из 5 мышей через полгода после подкожного введения контрольных (необлученных)

МСК-КМ мыши после их продолжительного культивирования *in vitro* (39 пассажей) подтверждает возможность спонтанной трансформации МСК-КМ при длительном культивировании и коррелирует с данными, полученными ранее (Miura et al., 2006). Поповым и сотрудниками (Попов и др., 2009; Михайлов и др., 2010) было обнаружено развитие опухолей у 40 % мышей из МСК-КМ, трансфицированных геном зеленого белка, после их внутримышечной и подкожной трансплантации сингенным мышам-самкам C57BL/6. Однако опухоли образовывались только при использовании МСК-КМ на поздних (43—47-м), но не на ранних (12—15-м) пассажах уже через 1—2 нед после введения клеток. При этом увеличение продолжительности наблюдения этими авторами не дало увеличения числа обнаруженных опухолей. Мы увеличили время наблюдения до 6 мес (26 нед после введения клеток), и это позволило выявить появление опухоли у 1 из 5 мышей, которым вводили контрольные МСК-КМ на 39-м пассаже.

В тех случаях, когда МСК-КМ подвергали действию γ -излучения, опухоли после их трансплантации сингенным мышам развивались значительно раньше, через 14—16 нед, чем при введении необлученных МСК-КМ. При трансплантации сингенным мышам клеток, облученных в дозе 1 Гр, опухоли развивались у 40 % мышей, а после введения МСК-КМ, облученных в дозе 6 Гр, опухоли наблюдались у всех животных. При этом в опухолях, развившихся из сингенных МСК-КМ, облученных в дозе 6 Гр, обнаружен более высокий уровень АТ. Следует отметить, что высокая АТ обнаруживается только в эмбриональных тканях, где она обеспечивает поддержание длины теломера, и в клетках злокачественных опухолей. В МСК-КМ мыши в норме обнаружена невысокая АТ.

Помимо сохранения длины теломер, теломераза оказывает защитное действие на клетки на уровне митохондрий при окислительном стрессе и способствует повышению выживаемости клеток, обеспечивая антиапоптотическое действие (Егоров, 2009).

Присутствие АТ в опухоли является одним из лучших маркеров для диагностики злокачественного роста (Глухов и др., 2010). Поэтому АТ, обнаруженная в опухолях, развившихся из МСК-КМ, также может свидетельствовать об их злокачественности. С другой стороны, теломераза активна в МСК-КМ, поэтому присутствие АТ в этих опухолях может быть связано и с этой особенностью МСК-КМ мыши.

По морфологическому строению опухоли, развившейся и из контрольных, и из облученных клеток, практически не различались и соответствовали многокомпонентным мезенхимомам, как и опухоли, развившиеся при внутримышечном введении мышам МСК-КМ, трансфицированных геном зеленого белка (Михайлов и др., 2010).

В отсутствие проонкогенных событий нормальные МСК дифференцируются в соответствии с мезенхимной иерархией, приводя к увеличению зрелых, функционально активных мезенхимных производных, включая адипоциты, хондроциты, остециты и другие типы клеток, включая нервные (Liu et al., 2009).

Анализируя механизмы происхождения сарком из МСК Родригез с коллегами (Rodriguez et al., 2012) рассматривают две существующие модели саркомогенеза. В соответствии с одной из них, саркомы различных типов образуются из МСК на разных стадиях дифференцировки

в результате накопления мутаций, приводящих к блокированию завершения дифференцировки, что в свою очередь определяет степень дифференцировки опухоли. Согласно второй модели, саркомы образуются в результате появления мутаций в примитивных МСК. Затем эти МСК накапливают новые мутации, которые и определяют направление развития опухоли.

Поскольку обе эти модели не являются взаимоисключающими, авторы (Rodriguez et al., 2012) предложили новую общую модель саркомогенеза, в соответствии с которой МСК претерпевают несколько последовательных мутаций. Сначала появляются мутации, которые вызывают трансформацию МСК. Последующие мутации приводят к изменению способности МСК к дифференцировке и регуляции пролиферации этих клеток. Совокупность указанных типов мутаций приводит к развитию сарком с различной степенью дифференцировки, которая определяется той стадией продвижения МСК по пути дифференцировки, на которой произошли мутации, вызвавшие образование опухоли. При этом чем более дифференцированной будет МСК в момент появления второй онкогенной мутации, тем более дифференцированной будет образующаяся саркома. Эта модель подчеркивает как важную роль специфических мутаций, инициирующих трансформацию, так и необходимость учитывать ту стадию дифференцировки МСК, на которой происходит трансформация.

Анализируя полученные результаты с позиций этой модели, можно заключить, что онкогенные мутации происходят в наиболее примитивных, собственно стволовых МСК-КМ, а не на стадии прогениторных или более дифференцированных клеток, так как во всех опухолях (и в опухоли из спонтанно трансформированных, и из облученных МСК-КМ) имелись как очаги недифференцированных клеток с признаками атипизма и активной пролиферации, так и клетки всех возможных направлений мезенхимной дифференцировки. Отсутствие существенных морфологических отличий опухоли, развившейся из облученных МСК-КМ, от опухолей из облученных МСК-КМ позволяет полагать, что злокачественная трансформация этих клеток произошла еще до облучения на этапе длительного культивирования МСК-КМ. Значительно более раннее появление опухолей из облученных МСК-КМ позволяет допустить, что при действии γ -излучения возникают мутации, которые приводят к нарушению регуляции пролиферации трансформированных клеток, что и определяет их более раннее развитие.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что длительное культивирование и облучение МСК-КМ в дозе 1 или 6 Гр может приводить к их злокачественной трансформации и развитию из этих клеток многокомпонентных мезенхимом. Выявлена зависимость частоты и динамики развития опухолей, а также АТ в опухолях, развившихся из облученных МСК-КМ, от дозы облучения этих клеток.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-29-01234).

Список литературы

- Глухов А. И., Высоцкая О. В., Гордеев С. А., Марченко И. А., Северин С. Е. 2010. Теломераза, сервинин и циклооксигеназа 2-го типа как мишени для диагностики опухолевых заболеваний человека. В кн.: Введение в молекулярную диагностику. М.: Медицина. 1 : 255—262. (Glukhov A. I., Vysotskaya O. V., Gordeev S. A., Marchenko I. A., Severin S. E. 2010. Telomerase, survivin and cyclooxygenase type-2 as a target for the diagnosis of human tumor diseases. In: Introduction to molecular diagnostics. Moscow: Medicine. 1 : 255—262.)
- Егоров Е. Е. 2009. Теломеры, теломераза и стволовые клетки в механизмах патологии человека. В кн.: Биология стволовых клеток и клеточные технологии. М.: Медицина, Шико. 1 : 233—272. (Egorov E. E. 2009. Telomeres, telomerase and stem cells in the mechanisms of human disease. In: Stem cell biology and cellular technologies. Moscow: Medicine, Shico. 1 : 233—272.)
- Краевский Н. А., Смольяников А. В., Саркисов Д. С. (Под ред). 1993. Патологоанатомическая диагностика опухолей человека. М.: Медицина. 1 : 688. (Krajewski N. A., Smolyannikov A. V., Sarkisov D. S. (Eds). 1993. Pathoanatomical diagnosis of human tumors. Moscow. Medicine. 1 : 688.)
- Михайлов В. М., Каминская Е. В., Попов Б. В., Кузоватов С. Н., Скрипкина Н. С., Косыкова Г. Н., Зайчик А. М., Гринчук Т. М., Никольский Н. Н. 2010. Характеристика опухолей, развившихся после введения мышам MDX культивируемых мезенхимных стволовых клеток костного мозга мышей C57BL/6, экспрессирующих белок GFP. Цитология. 52 (10) : 853—857. (Mikhailov V. M., Kaminska E. V., Popov B. V., Kuzovatov S. N., Skripkina N. S., Kosyakova G. N., Zaichik A. M., Grinchuk T. M., Nikolsky N. N. 2010. Characteristic of tumors developed after transplantation of transgenic GFP-positive C57BL/6 mice bone-marrow mesenchymal stem cells to mdx mice muscle. Tsitologiya. 52 (10) : 853—857.)
- Попов Б. В., Петров Н. С., Михайлов В. М., Томилин А. Н., Алексеенко Л. Л., Зайчик А. М. 2009. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимных стволовых клеток в культуре *in vitro*. Цитология. 51 (2) : 91—102. (Popov B. V., Petrov N. S., Michailov V. M., Tomilin A. N., Alexeenko L. L., Grinchuk T. M., Zaichik A. M. 2009. Spontaneous transformation and immortalization of mesenchymal stem cells *in vitro*. Tsitologiya. 51 (2) : 91—102.)
- Посыпанова Г. А., Москалева Е. Ю., Родина А. В., Семочкина Ю. П., Ратушняк М. Г., Перевозчикова В. Г. 2016. Действие малых и сублетальных доз γ -излучения на мезенхимальные и нейральные стволовые клетки из головного мозга мыши. Радиационная биология. Радиоэкология. 56 (1) : 35—43. (Posypanova G. A., Moskaleva E. Yu., Rodina A. V., Semochkina Yu. P., Ratushnyak M. G., Perevozchikova V. G. 2016. Effects of low and sublethal doses of γ -radiation on mesenchymal and neural stem cells from mouse brain. Rad. Biol. Radioecol. 56 (1) : 35—43.)
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Glukhov A. I., Zimnik O. V., Gordeev S. A., Severin S. E. 1998. Inhibition of telomerase activity of melanoma cells *in vitro* by antisense oligonucleotides. Biochem. Biophys. Res. Commun. 248 : 368—371.
- Huvos A. G., Woodard H. Q., Caham W. G., Higinbotham N. L., Stewart F. W., Butler A., Bretsky S. S. 1985. Postirradiation osteogenic sarcoma of bone and soft tissues. A clinicopathologic study of 66 patients. Cancer. 55(6) : 1244—1255.
- Kim K. S., Chang J. H., Choi N., Kim H. S., Han I., Moon K. C., Kim I. H., Kim H. J. 2016. Radiation-induced sarcoma: a 15-year experience in a single large tertiary referral center. Cancer Res. Treat. 48 : 650—657.
- Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L. C., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., Shay J. W. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science. 266 : 2011—2015.
- Liu Z. J., Zhuge Y., Velazquez O. C. 2009. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. J. Cell. Biochem. 106 : 984—991.

Lye K. L., Nordin N., Vidyadaran S., Thilakavathy K. 2016. Mesenchymal stem cells: from stem cells to sarcomas. *Cell Biol. Int.* 40 : 610—618.

Mavrogenis A. F., Pala E., Guerra G., Ruggieri P. 2012. Post-radiation sarcomas. Clinical outcome of 52 patients. *J. Surg. Oncol.* 105 : 570—576.

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.

Rodriguez R., Rubio R., Menendez P. 2012. Modeling sarcomagenesis using multipotent mesenchymal stem cells. *Cell Res.* 22 : 62—77.

Поступила 12 XII 2016

CHARACTERISTICS OF TUMORS THAT DEVELOPED IN MICE AFTER TREATMENT WITH IRRADIATED SYNGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS OF BONE MARROW

E. Yu. Moskaleva,^{1,*} E. S. Zhorova,² Yu. P. Semochkina,¹ A. V. Rodina,¹ O. V. Vysotskaya,¹
A. I. Glukhov,¹ A. A. Chukalova,¹ G. A. Posypanova,¹ V. P. Saprykin²

¹NRC «Kurchatov Institute», Moscow, 123182,
and ²A. I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, Moscow, 123098;
* e-mail: moskalevaey@mail.ru

Mesenchymal stem cells (MSCs) are present in almost all organs and tissues of the organism. It is believed, that MSCs could be transformed into cancer stem cells spontaneously or under influence of genotoxic factors and trigger the growth of tumors. The aim of this work was to study the possibility of malignant transformation of cultured MSCs from murine bone marrow (MSCs-BM) after γ -irradiation *in vitro* and characterize of biochemical and histological features of the tumors that developed after transplantation of MSCs-BM into syngeneic mice. Tumors were observed in 3—4 months after MSCs-BM transplantation. After administration of MSCs-BM irradiated at a dose of 1 Gy, tumors were seen in 2 of 5 mice. After transplantation of MSCs-BM irradiated at a dose of 6 Gy, tumors were found in all 5 of 5 mice. In the case of control MSCs-BM, only one tumor appeared in 6 months after transplantation. The telomerase activity was two times higher in the tumor developed from 6 Gy irradiated MSCs-BM than from 1 Gy irradiated MSCs-BM. The tumors developed from control and irradiated MSCs-BM were classified as multicomponent mesenchymomas («mixture of sarcomas»). Histological examination showed that tumors contained tissue areas of different histogenesis. Thus, MSCs-BM γ -irradiated at doses of 1 and 6 Gy and, much less frequently, control MSCs-BM can transform into tumor cells and induce development of multicomponent mesenchymomas.

Key words: mesenchymal stem cells, bone marrow, malignant transformation, multicomponent mesenchymoma, sarcoma, telomerase, gamma radiation.