

Неопластическая трансформация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в культуре *in vitro**

Ржанинова А.А., Омельченко Д.О., Федюнина И.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1. Факс: +7 (499) 324 0702

Ключевую позицию в развитии клеточных технологий занимают исследования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), что обусловлено доступностью их получения, экспансией *in vitro* и возможностью приготовления трансплантатов из собственных клеток пациента. Внедрение клеточных технологий на основе ММСК в клиническую практику требует решения ряда вопросов, связанных с безопасностью применения клеточного материала в лечебных целях. В первую очередь, это касается риска развития новообразований, обусловленного возможностью спонтанной неопластической трансформации клеток в культуре. При этом помимо клеточного старения как основной причины злокачественной трансформации нельзя также исключить негативное влияние на клетки некоторых манипуляций *ex vivo*, таких, как генетическая модификация и индукция дифференцировки.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, иммортализация, неопластическая трансформация клеток *in vitro*

Введение

ММСК взрослого организма привлекают внимание исследователей и практических врачей по следующим причинам:

- 1) с помощью несложных манипуляций ММСК могут быть изолированы из разных тканей организма донора, включая, например, жировую ткань, и впоследствии использоваться для аутотрансплантации;
- 2) высокая скорость пролиферации позволяет нарастить достаточное количество клеток для трансплантации;
- 3) ММСК обладают способностью к дифференцировке в разные клеточные линии.

ММСК у взрослых доноров в разное время были обнаружены в соединительной ткани органов, имеющих различное происхождение в эмбриогенезе: костного мозга, скелетной мышцы [61], жировой ткани [63], пупочного канатика [18], синовиальной мембраны [12], периферической крови [31], пульпы зуба [23], амниотической жидкости [46, 59] и др. Также ММСК-подобные клетки выделены из эмбриональных и фетальных тканей: крови, печени, костного мозга [10], лёгкого [20], пуповинной крови [45] и тимуса [1].

Поскольку популяции стромальных клеток неоднородны и лишь небольшая их доля обладает свойствами стволовых или подобных стволовым клеткам, Международным обществом клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy (ISCT)) общими для ММСК были признаны следующие критерии [29]: адгезия к пластике в культуре *in vitro*; позитивная экспрессия 95% и более

клеток поверхностных антигенов CD 105, CD73, CD90 и негативная экспрессия (2% клеток и менее) в отношении CD45, CD34, CD14 или 11b, CD79 alpha или CD19 и HLA-DR, а также способность к дифференцировке *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондробласты.

Поскольку ММСК способны к размножению в культуре, возникает естественный вопрос, могут ли эти клетки трансформироваться в процессе стандартного культивирования или при изменении условий. На протяжении последнего 10-летия этот вопрос находится в области интереса многих исследователей.

Основные отличия непластической клетки

Неопластическая клетка в результате трансформации приобретает новые свойства, отличающие её от нормальной и которые обеспечивают злокачественный опухолевый рост. Выделяют следующие важнейшие свойства неопластической клетки, позволяющие охарактеризовать процесс неопластической трансформации [25]:

1. Изменение морфологии клеток. В основе морфологических нарушений лежат взаимосвязанные между собой изменения цитоскелета, адгезионных взаимодействий клеток между собой и с внеклеточным матриксом;
2. Пониженная потребность (самодостаточность) во внешних сигналах для инициации и поддержания точной пролиферации. Данное свойство клеток можно тестировать в культуре по:
 - способности опухолевых клеток к размножению в среде с 0,1–1% сыворотки, т.е. при отсутствии в среде

* Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 8807.

концентраций ростовых факторов, необходимых для стимуляции размножения нормальных клеток;

- независимости от субстрата (anchorage-independence). Большинство типов нормальных клеток способно размножаться лишь при условии их прикрепления к определённой внеклеточной матрице. Многие типы опухолевых клеток, в отличие от их нормальных предшественников, способны пролиферировать, не прикрепляясь к субстрату, например в полужидкой среде. Распространённым тестом служит наблюдение образования сферических колоний опухолевых клеток в жидком агаре;

3. Пониженная чувствительность к ростингибирующим сигналам. В отличие от нормальных трансформированные клетки не обладают свойством контактного ингибирования пролиферации при возникновении межклеточных контактов, а продолжают делиться и образовывать очаги многослойного роста. Тест на отсутствие контактного ингибирования также проводится в культуре клеток, подозрительных на неопластическую трансформацию;

4. Отсутствие репликативного старения, или приобретение бессмертия (иммортализация);

5. Для многих опухолевых клеток, в основном низкодифференцированных, характерны нарушения клеточной дифференцировки, т.е. образования специализированных типов клеток, синтезирующих специфические белки;

6. Наличие генетических аномалий. Неопластическая трансформация — многоступенчатый процесс накопления генетических и эпигенетических изменений клетки, обеспечивающих выживание, пролиферативное преимущество и распространение за пределы ткани;

7. Некоторые свойства неопластической клетки, необходимые для прогрессии опухолевого роста *in vivo*, не являются критическими для процесса неопластической трансформации в культуре. К таким свойствам можно отнести способность стимулировать неоангиогенез, т.е. формировать новые кровеносные и лимфатические сосуды из эндотелиальных клеток окружающих мелких сосудов, и способность к метастазированию — образованию вторичных очагов опухолевого роста.

Репликативное и преждевременное старение ММСК в культуре *in vitro*

Трансформации нормальных клеток после повреждения ДНК, окислительного стресса, активации онкогенов или инактивации опухолевых супрессоров противостоит программа остановки клеток в клеточном цикле, в ходе которой может происходить исправление полученных повреждений [19, 25]. В отдельных случаях временный блок клеточного цикла становится необратимым, так как в клетке включается программа клеточного старения. В отличие от состояния покоя, когда блоки обратимы, старение связано с необратимым блоком клеточного цикла, который сопровождается специфическими

изменениями морфологии клетки, выражающимися в распластывании на субстрате, вакуолизации и грануляции цитоплазмы. Стареющие клетки могут активно секретируют молекулы клеточной адгезии и митогены [7]. Различают репликативное старение, которое связано с укорочением теломер, и ускоренное (преждевременное) старение, индукторами которого являются стимулы, вызывающие в высоких дозах апоптоз. Ими могут быть онкогены, ионизирующая радиация, окислительный стресс, гипоксия, ретиноиды, некоторые факторы роста (например, TGF- β). Преждевременное старение нельзя предотвратить восстановлением теломеразной активности и сохранением длины теломер хромосом. Как показали Naka с соавторами в 2004 г., фибробласты, выделенные от больных атаксией-телеангиоэктазией, экспрессирующие ген h-TERT (теломеразу), утрачивают способность к репликативному старению, характерному для этого синдрома, но преждевременно стареют после действия ионизирующей радиации или окислительного стресса [42]. Потенциально онкогенный стимул вызывает в нормальных клетках апоптоз или ускоренное старение в зависимости от их тканевой принадлежности или стадии дифференцировки. Показано, например, что повышенная экспрессия онкогенного белка Ras приводит к включению p53-зависимой программы старения [15, 21, 33, 53]. Вследствие мутаций или инактивации опухолевых супрессоров в ходе многоступенчатого канцерогенеза клетка утрачивает способность к запуску старения и апоптоза в ответ на включение онкогенов [15, 25].

При стандартных условиях культивирования в среде с эмбриональной телячьей сывороткой ММСК, полученные от молодых доноров, по разным данным, могут пройти от 24—40 (ММСК из костного мозга) до 70—80 (ММСК из жировой ткани) удвоений *in vitro*. После этого нормальные ММСК вступают в стадию репликативного старения, когда происходит остановка клеточных делений. Период репликативной жизни — одна из основных характеристик любой диплоидной клетки в культуре и определяет предел числа возможных генераций при наращивании клеток, к примеру для трансплантации.

Прогрессивное укорочение теломер в процессе клеточного репликативного старения продемонстрировано и в культивированных ММСК [21]. S. Redaelli с соавторами подтверждают эти выводы [47]. Исследование длины теломер в культурах ММСК из костного мозга разных доноров не выявило различий на ранних пассажах (P3—P6). Напротив, в более поздних пассажах (P9—P12) теломеры были значительно короче; клеточные культуры характеризовались снижением пролиферативной способности и позитивно окрашивались на маркер клеточного старения — β -галактозидазу.

Однако непосредственная связь между укорочением теломер и инициацией репликативного старения остаётся в области дискуссий. В том же исследовании наглядно показаны индивидуальные различия в проли-

феративной способности ММСК от разных доноров на пассажах, которые принято считать «поздними» (P9 и более). Например, в P9 период удвоения для одной культуры может составлять всего 24 ч, а для другой — 97. Таким образом, для ММСК одного донора P9 и более будет «ранним», а для другой культуры и P4-6 будут «поздними». В нашей работе также неоднократно приходилось наблюдать культуры ММСК из разных источников, которые делились не более 4–5 пассажа. Значительные различия между культурами ММСК от разных доноров отмечены и в отношении концентрации старых клеток, по окрашиванию на β-галактозидазу [47].

Трансформация ММСК, индуцированная генетическими манипуляциями

Современный уровень развития клеточных технологий предполагает разработку более сложных препаратов для клиники на основе стволовых клеток. Примерами таких препаратов являются клетки, чаще всего ММСК, трансфицированные генами различной терапевтической направленности, или проведение предифференцировки стволовых клеток в заданном направлении. Подобные генетические манипуляции имеют в своей основе торможение или остановку пролиферации, клеточный стресс и как следствие преждевременное клеточное старение — платформу для развития посткризисных неопластических популяций клеток.

Способность МСК мигрировать в сторону опухоли вызвало к жизни новый подход к лечению рака, в котором генетически модифицированные ММСК используются в качестве транспортного средства для селективной доставки генов. Хотя эти подходы к лечению большого спектра заболеваний, и в том числе рака, имеют огромные перспективы, генетические модификации ММСК или клеток любого другого типа, которые планируются вводить пациентам, также могут быть опасными [40]. Возможная опасность трансгенной терапии стволовыми клетками возникает при двух ситуациях: либо онкогенным является сам трансген, либо его вставка нарушает структуру геномного локуса, критичного для супрессии опухолевого роста. Наиболее популярным примером потенциально опасного трансгена может послужить ген теломеразы hTERT, введение которого в ММСК приводит к значительному продлению периода репликативной жизни клеток и позволяет получить большую клеточную массу от одного донора. Клетки, экспрессирующие теломеразу, в основном сохраняют диплоидный кариотип [9, 55] и потенциал к дифференцировке, однако после определённого числа удвоений *in vitro* приобретают способность образовывать опухоли у животных иммунодефицитных линий [9]. Длительное культивирование ММСК с активной теломеразой также сопровождается изменением морфологии клеток от фибробластоподобных до эпителиоидных [2]. Таким образом, «теломеризованные» ММСК в процессе длительного культивирования рано или поздно приобретают некоторые свойства неопластических клеток, что, по-видимому, делает их небезопасными для медицинского применения. Кроме гена hTERT с целью иммортализации ММСК были использованы гены, кодирующие белки E6/E7 вируса папилломы типа 16 и Vmi-1 [55]. Онкогенный потенциал клеточных продуктов на основе ММСК, иммортализованных данными генами, изучен еще недостаточно, однако отмечены значительные нарушения кариотипа.

Спонтанная неопластическая трансформация ММСК

Спонтанная неопластическая трансформация ММСК

Вопрос о спонтанной трансформации ММСК является предметом дискуссий. Rubio с соавторами впервые показали, что ММСК, изолированные из жировой ткани человека, подвергаются спонтанной трансформации после длительного размножения в культуре (4–5 мес.) [52]. Эта трансформация происходила в два последовательных этапа, включающих повышение экспрессии гена c-myc и снижение экспрессии p16. Затем в клетках регистрировали повышение активности теломеразы, на фоне делеции локуса Ink4a/Arf и гиперфосфорилирования белка Rb [52]. В исследовании делается вывод о том, что одной мутации недостаточно, чтобы вызвать злокачественную трансформацию, и такое превращение стало бы результатом нескольких генетических изменений. Другие преобразования, связанные с приобретением клетками опухолевого фенотипа, включают модуля-

Накопление старых клеток (позитивных на β-галактозидазу) в культурах ММСК из костного мозга восьми доноров на разных пассажах. По данным [47]

Таблица

Донор, №	Пассаж	% старых клеток (позитивных на β-галактозидазу)
1	11	35
2	10	51,25
3	4	77,5
4	10	50
5	13	17,5
6	16	82,2
7	12	85
8	14	35

цию митохондриального метаболизма, нарушение репарации ДНК и повреждение белков-регуляторов клеточного цикла. В этой работе предложена модель, отражающая стадии опухолевого превращения ММСК в культуре. Тем же коллективом авторов проведены серии экспериментов по изучению роли белков p53 и p21, ключевых регуляторов прогрессии клеточного цикла и апоптоза в защите ММСК от трансформации на мышиной модели [49].

Известно, что клетки грызунов, в том числе фибробласты и ММСК, по ряду причин значительно менее устойчивы к неопластической трансформации в культуре, чем клетки человека, и, следовательно, моделирование процесса спонтанного опухолеобразования на мышьях не совсем адекватно. Однако исследование отдельных сигнальных путей, вовлечённых в данный процесс у человека и грызунов, позволяет оценить генетические изменения клеток при состоянии клеточного стресса или репликативного старения *in vitro*.

Мышиные ММСК дикого типа, p21-/-p53 +/+, и p21-/-p53 +/- выращивали *in vitro* и анализировали появление признаков трансформации на разных сроках культивирования как *in vitro*, так и *in vivo*. ММСК дикого типа или p21-/-p53 +/+ не показали никаких признаков опухолевой трансформации. Действительно, после кратковременного культивирования ММСК дикого типа p21-/-p53 +/+ ММСК начинали стареть и показали повышенный уровень спонтанного апоптоза. С другой

стороны, ММСК, несущие мутацию в одной аллели гена p53 (p21-/-p53 +/-), полностью потеряли экспрессию p53 после долгосрочного культивирования. Потеря p53 сопровождалась значительным увеличением темпов клеточного роста, усилением нестабильности кариотипа, негативной экспрессией p16 и отсутствием признаков старения. На конечном этапе эти клетки приобретали способность образовывать фибросаркомы, частично дифференцированные в различные мезенхимальные линии при введении мышам с иммунодефицитом. На основании полученных результатов авторы делают вывод о высокой чувствительности ММСК к мутациям в генах, участвующих в контроле клеточного цикла.

Также роли белка p53 в трансформации ММСК костного мозга на мышиной модели посвящено исследование А. Armesilla-Diaz с соавторами [4]. Показано, что мутации p53 приводят к морфологическим и фенотипическим изменениям, возрастанию скорости пролиферации популяций ММСК по сравнению с клетками животных с p53 дикого типа. У мышей с делецией гена p53 увеличено число колониеобразующих клеток, наблюдались нестабильность генома, изменения в экспрессии *c-myc* и независимый от подложки рост (в полужидких средах). Авторы делают вывод о ключевой роли p53 в биологии и трансформации ММСК.

Высокий уровень генетической нестабильности мышиных ММСК и склонность к неопластической трансформации в культуре подтверждается значительным

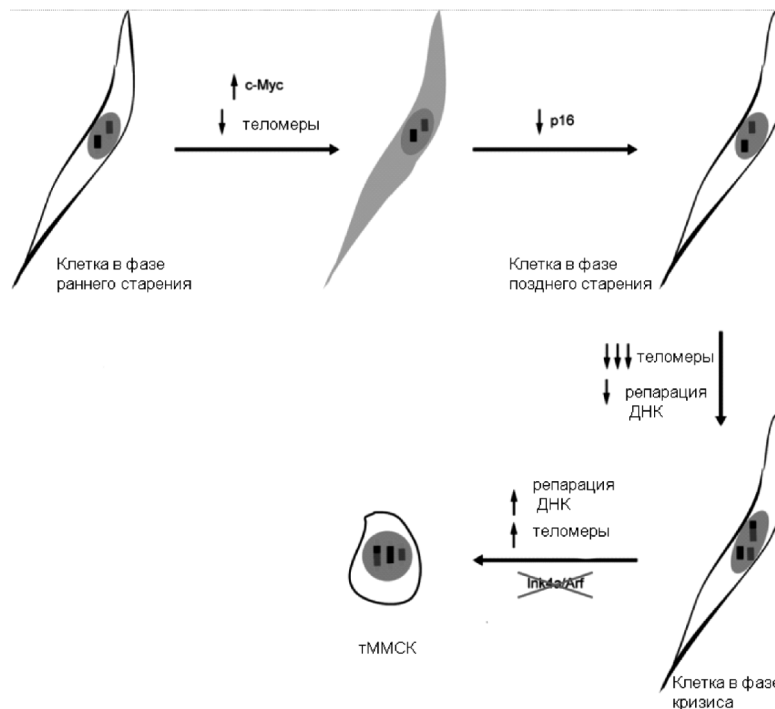


Рис. 1. Модель спонтанной трансформации ММСК. На рисунке показана последовательность этапов, приводящих к появлению трансформированных («туморогенных») клонов ММСК. Чёрные и голубые боксы схематично обозначают хромосомы, оранжевые — теломеры [51], модификация.

объёмом публикаций [3, 4, 14, 32, 39, 58]. Однако проблема неопластической трансформации клеток человека остаётся в области дискуссий.

Y. Wang с соавторами выделили трансформированные популяции клеток с высокой экспрессией теломеразы из культуры ММСК костного мозга, которые были способны образовывать солидные опухоли в различных органах у мышей [60]. Н. Ning с соавторами выделили спонтанно трансформированную линию клеток из культуры СВФ ЖТ здорового донора [43]. Наличие таких характеристик культуры, как приобретение эпителиального (кубовидного) фенотипа, возрастание скорости роста, не зависимый от подложки рост в полужидких средах и гипертриплоидный кариотип, позволили авторам сделать вывод о спонтанной трансформации. Эта работа представляет особый интерес, поскольку здесь впервые был рассмотрен вопрос о том, какая клеточная популяция в составе высоко гетерогенной СВФ ЖТ подвергается неопластической трансформации. Авторы высказали предположение, что трансформации подверглись эндотелиоциты и, таким образом, неопластическая популяция клеток представляет собой ангиосаркому. Эта гипотеза не основывается на экспериментальных данных, приведённых в публикации: иммуноцитохимический анализ не выявил экспрессии эндотелиальных маркеров CD31 и фактора vW, характерных для ангиосаркомы. Однако возможность трансформации других присутствующих в СВФ ЖТ типов клеток (преадипоцитов, фибробластов, перитцитов, гладкомышечных, адвентициальных клеток, макрофагов) авторами не рассматривается.

Тем не менее, вопрос о спонтанной трансформации ММСК в стандартной культуре остаётся спорным, так как другие исследования отрицают такую возможность. По данным Z. Zhang с соавторами, 20-дневное культивирование МСК из костного мозга не вызывает генетических изменений в этих клетках [62]. Длительное ведение культуры МСК человека *in vitro* без признаков имортализации или развития хромосомных нарушений продемонстрировано в статье М.Е. Bernardo с соавторами [5]. Авторы показали, что длительное культивирование ММСК из костного мозга здоровых доноров (до 25-го пассажа) не повлияло на генетическую стабильность этих клеток.

L.A. Meza-Zepeda с соавторами исследовали кариотип ММСК из жировой ткани в поликлональных и клонированных культурах при долгосрочном культивировании до 6 мес. [38]. В одной из культур были обнаружены незначительные делеции в субтеломерных регионах на трёх хромосомах. При последующем культивировании клетки с выявленными aberrациями не размножались и спонтанно элиминировались.

Случаи транзientной анеуплоидии также описаны для культур ММСК из костного мозга. В работе Tarte с соавторами были культивированы ММСК КМ по двум различным протоколам с добавлением ЭТС и ФРФ-2 или в присутствии тромбоцитарного лизата [56]. В обоих случаях в части культур были обнаружены анеуплоидные клетки, имеющие трисомии по хромосомам 5, 8 и 20. В отдельных случаях анеуплоидия была транзientной и не определялась на следующих пассажах. Авторы показали, что культивированные ими ММСК как с на-

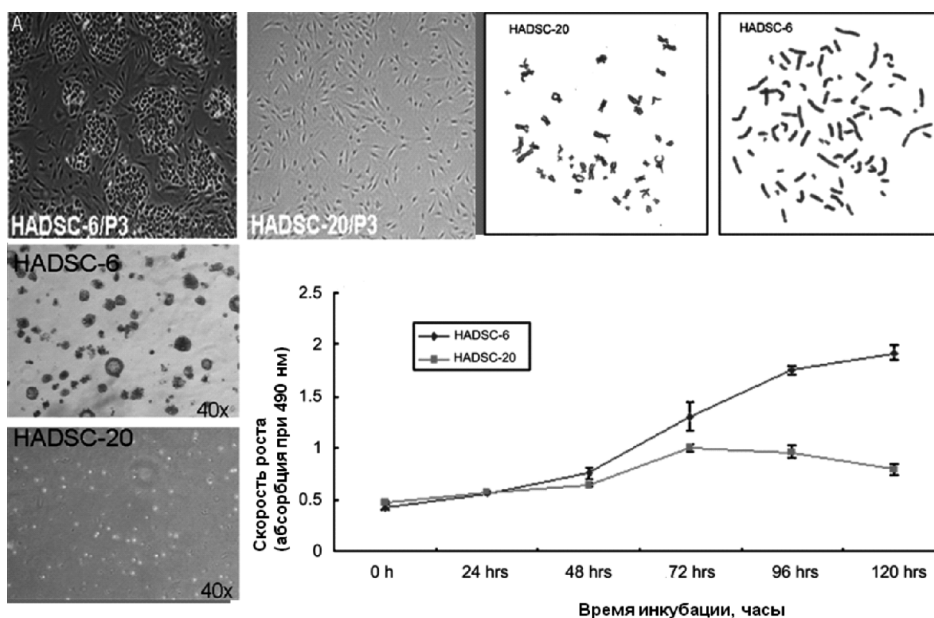


Рис. 2. Изменения в культуре ММСК из жировой ткани в процессе неопластической трансформации *in vitro*. Показаны изменения морфологии клеток, хромосомного набора, ростовых характеристик, рост колоний в жидком агаре. HADSC-20 — нормальная культура ММСК, HADSC-6 — трансформированная культура. [43], модификация.

рушениями хромосомного набора так и с нормальным кариотипом вступали в фазу клеточного старения без признаков последующей иммортализации и трансформации. Экспрессия теломеразы не была зарегистрирована ни в одном случае.

В работе [5] показано, что культивирование ММСК до 6 пассажа не влияет на генетические характеристики культур клеток. Авторы рекомендуют при потребности в трансплантации культивированных ММСК применять их не позднее 6 пассажа, при этом время культивирования не должно превышать 12 нед. Подобные результаты были получены Mareschi с соавторами [35]. Десять культур ММСК из костного мозга поддерживали до 10 пассажа (77 дней). Кариотип пяти образцов был определён на 2-, 5-м, а семь культур — на 10-м пассаже. Ни в одном случае хромосомные аномалии не обнаружены.

В отдельных работах показано, что ММСК из костного мозга остаются генетически стабильными на протяжении длительного культивирования, даже после достижения и преодоления лимита Хейфлика. T. Soukup с соавторами исследовали 7 культур мезодермальных клеток-предшественников, выделенных из костного мозга [54]. Стандартное кариотипирование проводили при дифференциальной окраске. Нормальный кариотип выявлен во всех семи экспериментах, культуры оставались генетически стабильными после 63 удвоений, т.е. после преодоления лимита Хейфлика. L. Liu с соавторами [34] изучали кариотипы ММСК (Flk-1⁺.CD31⁻, CD34⁺) от 12 индивидов, выделенных из костного мозга человека на протяжении шести пассажей. После культивирования проведено стандартное кариотипирование. Изменений кариотипа не было выявлено. Авторы полагают, что генетическая трансформация ММСК в работах других исследователей является результатом различных подходов к культивированию клеток. По мнению авторов, более длительное культивирование и трансфекция клеток может привести к негативным последствиям, в основе которых лежит генетическая нестабильность.

Описаны случаи контаминации культур ММСК клетками постоянных опухолевых линий в результате внутрилабораторного переноса, приведшие к появлению публикации о неопластической трансформации ММСК в культуре. G.V. Rosland с соавторами в 2009 г. опубликовали экспериментальные данные о крайне высоком уровне спонтанной трансформации в культурах ММСК человека — 45,8% (11 из 24 культур) [50]. Однако впоследствии авторы в комментарии к данной статье опровергли полученные результаты, доказав наличие перекрёстной контаминации культур ММСК клеточными линиями сарком [57].

Из-за противоречивости накопленных результатов, полученных рядом авторов, единого мнения по вопросу сохранения стволовыми клетками нормального хромосомного набора при пассировании до сих пор не существует. Также существуют различные взгляды относительно опасности клинического использования ММСК

с изменённым кариотипом. В научных трудах высказываются прямо противоположные точки зрения на вероятность существования угрозы от изменений кариотипа в культурах, применяемых для клеточной терапии. Большая часть авторов считает, что возникающие хромосомные аномалии характеризуют генетическую нестабильность культуры, которая связана с потерей теломерной ДНК и может вести к злокачественной трансформации [5, 52, 60]. Вместе с тем, существует мнение, что клетки с кариотипическими изменениями не опасны для трансплантации, потому что их доля незначительна и носит транзитный характер [38, 56].

Существует точка зрения, что на возникновение аномалий кариотипа ММСК могут также влиять индивидуальные проблемы здоровья донора клеток, а также употребление донорами ряда сильнодействующих лекарственных средств, что в значительной мере повышает вероятность появления клеток с aberrантными кариотипами. O. Blau с соавторами исследовали цитогенетические aberrации в гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) и ММСК, выделенных от больных острой миелодной лейкемией (AML) и миелодиспластическим синдромом (MDS). Хромосомные aberrации в ММСК были определены у 15 из 94 MDS/AML пациентов (16%). В ГСК уровень хромосомных аномалий был еще более высоким — 49% у больных AML и 37% у пациентов с MDS [6]. У детей с гематологическими патологиями аутоиммунного характера (тромбоцитопенической пурпурой, аутоиммунной нейтропенией) никаких нарушений кариотипа ММСК КМ не выявлено [11].

По-видимому, использование стволовых клеток, в частности мезенхимальных стволовых клеток, в клеточной терапии всегда сопровождается определённым риском спонтанной или индуцированной условиями культивирования трансформации.

Механизмы иммортализации неопластических клеток мезенхимального происхождения

Приобретение клетками бессмертия (иммортализация) является важным шагом в процессе опухолеобразования, который требует стабилизации теломер. Теломеры представляют собой комплекс, состоящий из ДНК и белков, находящийся на концах хромосом. Теломерная ДНК состоит из tandemно повторяющихся коротких последовательностей (длиной в 6 нуклеотидов) [7] и одинакова для всех позвоночных. Теломерная ДНК защищает хромосомы от слипания, разрушения и рекомбинации [7]. Повреждение в структуре теломер приводит к активации путей репарации и рекомбинации, инициирующих остановку клеточного цикла или апоптоз [16].

Хотя большинство опухолей человека стабилизирует теломеры посредством активации теломеразы (hTERT), небольшая часть (10—15%) использует альтернативный механизм, называемый ALT (alternative lengthening of telomeres) [37]. У клеток, использующих механизм ALT, имеются хромосомы с разной длиной теломер. В нор-



Рис. 3. Виды опухолей с высокой частотой встречаемости механизма ALT (более 20%). По данным [17].

мальных соматических клетках длина теломер составляет приблизительно 15 kb [26] и за один клеточный цикл *in vitro* прогрессивно уменьшается на 40—200 пар оснований [13, 36]. В большинстве иммортализованных клеточных линий человека, где теломераза активна, длина теломер гомогенна и обычно не более 10 kb [41]. Все клеточные линии, использующие механизм ALT имеют гетерогенные по длине теломеры, от 3 до 40 kb [41], при этом в пределах одной клетки часть хромосом могут иметь очень длинные теломеры, а другие их не иметь [48].

Доказано, что механизм ALT более распространён в опухолях, возникающих из тканей мезенхимного происхождения, чем в эпителиальных, а в иммортализованных клеточных линиях, происходящих из мезенхимальных клеток, реализуется еще более часто [48]. Н. Fujiwaga-Akita с соавторами изучали активность hTERT в клеточных линиях остеосаркомы. Оказалось, что только 50% исследованных образцов (8 из 16) имели теломеразную активность, причем в пяти случаях (31%) экспрессировались на уровне мРНК и белка как полноразмерный так и сплайсированные варианты гена hTERT и в трёх случаях (19%) только полноразмерные. Было показано, что, вопреки существующему мнению, гиперметилирование промотера гена hTERT не вносит значимого вклада в инактивацию ALT: в данном исследовании только в одной линии клеток остеосаркомы обработка деметилирующим агентом индуцировала экспрессию hTERT на уровне мРНК и белка [22].

Из 210 исследованных биопсий сарком 56% не обладали теломеразной активностью [26]. Однако даже среди сарком распространённость механизма ALT значительно различается: по данным J.D. Henson с соавторами, 77% образцов из злокачественной фиброзной гистиоцитомы, 62% лейомиосарком, 33% липосарком, только 9% синовиальных сарком и 6% рабдомиосарком использовали механизм ALT [27].

S.T. Durant в обзоре, опубликованном в 2012 г., представил данные последних лет о частоте встречаемости ALT в различных видах опухолей [17].

J.E. Johnson с соавторами определили, что около половины исследованных ими липосарком не использовали для удлинения теломер ALT и не активировали теломеразу, при этом длины теломер в клетках отличались высокой гетерогенностью [30]. Для некоторых типов мезенхимных опухолей, в том числе для недифференцированных форм, показана корреляция между ALT и прогнозом заболевания. Например, существенное увеличение выживаемости больших мультиформной глиобластомой показано для ALT+ опухолей по сравнению с ALT-негативными [24].

Необходимо отметить, что присутствие альтернативного механизма сохранения теломер ставит под сомнение успех антителомеразной терапии опухолей. В связи с этим, разграничение механизмов иммортализации клеток критично для понимания процесса туморогенеза и развития методов специфичной терапии [44].

Список литературы

1. Ржанинова А.А., Горностаева С.Н., Гольдштейн Д.В. Получение и фенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток из тимусов плодов человека. // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2005. — №1. — С. 34—41.
2. Abdallaha B.M., Haack-Sirensena M., Burnsa J.S. et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene in despite of extensive proliferation // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2005. — Vol. 326. — P. 527—538.
3. Aguilar S., Nye E., Chan J. et al. Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung // Stem Cells. — 2007. — Vol. 25, №6. — P. 1586—1594.
4. Armesilla-Diaz A., Elvira G., Silva A. p53 regulates the proliferation, differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells // Exp. Cell Res. — 2009. — Vol. 315, №20. — P. 3598—3610.
5. Bernard M.E., Zaffaroni N., Novara F. et al. 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. — 2007. — Vol. 67. — P. 9142—9149.
6. Blau O., Baldus C.D., Hofmann W.K., Thiel G., Nolte F., Burmeister T. et al. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. // Blood. — 2011. — Vol. 118, №20. — P. 5583—5592.
7. Blackburn E.H. Switching and signaling at the telomere // Cell. — 2001. — Vol. 106, №6. — P. 661—673.
8. Blagosklonny M.V. Cell senescence and hypermitogenic arrest // EMBO Rep. — 2003. — Vol. 4. — P. 358—362.
9. Burns J.S., Abdallah B.M., Guldborg P., Rygaard J., Schroder H.D., Kassem M. Tumorigenic Heterogeneity in Cancer Stem Cells Evolved from Long-term Cultures of Telomerase-Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells // Cancer Res. — 2005. — Vol. 65, №8. — P. 3126—3135.
10. Campagnoli C., Roberts I.A., Kumar S. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal

blood, liver, and bone marrow // *Blood*. — 2001. — Vol. 98. — P. 2396–3402.

11. Choumerianou D.M., Dimitriou H., Perdikiogianni C., Martimianaki G., Riminucci M., Kalmanti M. Study of oncogenic transformation in ex vivo expanded mesenchymal cells, from paediatric bone marrow // *Cell Prolif.* — 2008. — Vol. 41, №6. — P. 909–922.

12. De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane // *Arthritis Rheum.* — 2001. — Vol. 44. — P. 1928–1942.

13. de Lange T., Shiue L., Myers R.M., Cox D.R., Naylor S.L. et al. Structure and variability of human chromosome ends // *Mol. Cell. Biol.* — 1990. — Vol. 10. — P. 518–527.

14. Deng C., Zhang P., Harper J.W., Elledge S.J., Leder. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control // *Cell*. — 1995. Vol.82. — P. 675–684.

15. Deng Q., Liao R., Wu B.-L., Sun P. High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 1050–1059.

16. Deng Y., Chan S.S., Chang S. Telomere dysfunction and tumor suppression: the senescence connection // *Nat. Rev. Cancer*. — 2008. — Vol. 8, №6. — P. 450–458.

17. Durant S.T. Telomerase-Independent Paths to Immortality in Predictable Cancer Sub-types // *Journal of Cancer*. — 2012. — Vol. 3. — P. 67–82.

18. Ericas A., Conget P., Minguell J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood // *Br. J. Haematol.* — 2000. — Vol. 109. — P. 235–242.

19. Evan G.I., Vousden K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer // *Nature*. — 2001. — Vol. 411. — P. 342–348.

20. Fan C.G., Tang F.W., Zhang Q.J. et al. Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells // *Cell Transplant.* — 2005. — Vol. 14. — P. 311–321.

21. Ferbeyre G., de Stanchina E., Lin A.W., Querido E., McCurrach M.E., Hannon G.J., Lowe S.W. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence // *Mol. Cell. Biol.* — 2002. — Vol. 22. — P. 3497–3508.

22. Fujiwara-Akita H., Maesawa C., Honda T., Kobayashi S., Masuda T. Expression of human telomerase reverse transcriptase splice variants is well correlated with low telomerase activity in osteosarcoma cell lines // *Int. J. Oncol.* — 2005. — Vol. 26, №4. — P. 1009–10016.

23. Gronthos S., Mankani M., Brahimi J. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2000. — Vol. 97. — P. 13625–13630.

24. Hakin-Smith V., Jellinek D.A., Levy D., Carroll T., Teo M. et al. Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme // *Lancet*. — 2003. — Vol. 361, №9360. — P. 836–838.

25. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // *Cell*. — 2000. — Vol. 100. — P.57–70.

26. Henderson S., Allsopp R., Spector D., Wang S.-S., Harley C. In situ analysis of changes in telomere size during replicative aging and cell transformation // *J. Cell. Biol.* — 1996. — Vol. 134. — P. 1–12.

27. Henson J.D., Neumann A.A., Yeager T.R., Reddel R.R. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells // *Oncogene*. — 2002. — Vol. 21. — P. 598–610.

28. Henson J.D., Hannay J.A., McCarthy S.W., Royds J.A., Yeager T.R. et al. A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas // *Clin. Cancer Res.* — 2005. — Vol. 11, №1. — P. 217–225.

29. Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. — 2005. — Vol. 7, №5. — P. 393–395.

30. Johnson J.E., Varkonyi R.J., Schwalm J., Cragle R., Klein-Szanto A. et al. Multiple mechanisms of telomere maintenance exist in liposarcomas // *Clin. Cancer Res.* — 2005. — Vol. 11, №15. — P. 5347 – 5355.

31. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S. et al. Circulating skeletal stem cells // *J. Cell. Biol.* — 2001. — Vol. 153. — P. 1133–1140.

32. Li H., Fan X., Kovi R.C. et al. Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67. — P. 10889–10898.

33. Lin A.W., Barradas M., Stone J.C., van Aelst L., Serrano M., Lowe S.W. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling // *Genes Develop.* — 1998. — Vol. 12. — P. 3008–3019.

34. Liu L., Sun Z., Chen B., Han Q., Liao L. et al. Ex vivo expansion and in vivo infusion of bone marrow-derived Flk-1+CD31-CD34- mesenchymal stem cells: feasibility and safety from monkey to human // *Stem Cells Dev.* — 2006. — Vol. 15, №3. — P. 349–357.

35. Mareschi K., Ferrero I., Rustichelli D., Aschero S., Gammaitoni L. et al. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow // *J. Cell. Biochem.* — 2006. — Vol. 97, №4. — P. 744–754.

36. Martens U.M., Chavez E.A., Poon S.S., Schmoor C., Lansdorp P.M. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence // *Exp. Cell Res.* — 2000. — Vol. 256. — P. 291–299.

37. Matsuo T., Shimose S., Kubo T., Fujimori J., Yasunaga Y., Ochi M. Telomeres and telomerase in sarcomas // *Anticancer Res.* — 2009. — Vol. 29. — P. 3833–3836.

38. Meza-Zepeda L.A., Noer A., Dahl J.A., Micci F., Myklebost O., Collas P. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence // *J. Cell. Mol. Med.* — 2008. — Vol. 12, №2. — P. 553–563.

39. Miura M., Miura Y., Padilla-Nash H.M., Molinolo A.A., Fu B. et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation // *Stem Cells*. — 2006. — Vol. 24. — P. 1095–1103.

40. Momin E.N., Vela G., Zaidi H.A., Quinones-Hinojosa A. The Oncogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Cancer: Directions for Future Research // *Curr. Immunol. Rev.* — 2010. — Vol. 6, №2. — P. 137–148.

41. Murnane J.P., Sabatier L., Marder B.A., Morgan W.F. Telomere dynamics in an immortal human cell line // *EMBO J.* — 1994. — Vol. 13. — P. 4953–4962.

42. Naka K., Tachibana A., Ikeda K., Motoyama N. Stress-induced premature senescence in hTERT-expressing ataxia telangiectasia fibroblasts // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 2030–2037.

43. Ning H., Liu G., Lin G., Garcia M., Li L., Lue T.F., Lin C.-S. Identification of an aberrant cell line among human adipose tissue-derived stem cell isolates // *Differentiation*. — 2009. — Vol. 77, №2. — P. 172–180.

44. Nittit L., Guittat L., Stewart S.A. Alternative lengthening of telomeres (ALT) and chromatin: is there a connection? // *Biochimie*. — 2008. — Vol. 90, №1. — P. 5–12.

45. Noort W.A., Kruisselbrink A.B., in't Anker P.S. et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(-) cells in NOD/SCID mice // *Exp Hematol.* — 2002. — Vol. 30. — P. 870–878.

46. Prusa A.R., Marton E., Rosner M., Bernaschek G., Hengstchlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? // *Hum Reprod.* — 2003. — Vol. 18, №7. — P. 1489—1493.
47. Redaelli S., Bentivegna A., Foudah D., Miloso M., Redondo J. et al. // *Stem Cell Res Ther.* — 2012. — Vol. 3, №6. — P. 47.
48. Reddel R.R., Bryan T.M., Colgin L.M., Perrem K.T., Yeager T.R. Alternative lengthening of telomeres in human cells // *Radiat. Res.* — 2001. — Vol. 155. — P. 194—200.
49. Rodriguez R., Rubio R., Masip M., Catalina P., Nieto A. et al. Loss of p53 Induces Tumorigenesis in p21-Deficient Mesenchymal Stem Cells // *Neoplasia.* — 2009. — Vol. 11, №4. — P. 397—407.
50. Rosland G.V., Svendsen A., Torsvik A., Sobala E., McCormack E. et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. // *Cancer Res.* — 2009. — Vol. 69, №13. — P. 5331—5339.
51. Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M.C. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65. — P. 3035—3039.
52. Rubio D., Garcia S., Paz M.F. et al. Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation // *PLoS ONE.* — 2008. — Vol. 3, №1. — P. e1398.
53. Serrano M., Lin A.W., McCurach M.E., Beach D., Lowe S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16/INK4a // *Cell.* — 1997. — Vol. 88. — P. 593—602.
54. Soukup T., Mokry J., Karbanova J., Pytlík R., Suchomel P., Kucerova L. Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow: cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics // *Acta Medica (Hradec Kralove).* — 2006. — Vol. 49, №1. — P. 27—33.
55. Takeuchi M., Takeuchi K., Kohara A. et al. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* — 2007. — Vol. 43, №3—4. — P. 129—138.
56. Tarte K., Gaillard J., de Lataillaet J., Fouillard L., Becker M. et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation // *Blood.* — 2010. — Vol. 115, №8. — P. 1549—1553.
57. Torsvik A., Rosland G.V., Svendsen A., Molven A., Immervoll H., McCormack E. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track — letter // *Cancer Res.* — 2010. — Vol. 70, №15. — P. 6393—6396.
58. Tolar J., Nauta A.J., Osborn M.J., Panoskaltis Mortari A., McElmurry R.T., Bell S. et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells // *Stem Cells.* — 2007. — Vol. 25. — P. 371—379.
59. Tsai M.S., Lee J.L., Chang Y.J., Hwang S.M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol // *Hum. Reprod.* — 2004. — Vol. 19, №(6). — P. 1450—1456.
60. Wang Y., Huso D.L., Harrington J. et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture // *Cytherapy.* — 2005. — Vol. 7. — P. 509—519.
61. Williams J.T., Southerland S.S., Souza J. et al. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes // *Am. Surg.* — 1999. — Vol. 65. — P. 22—26.
62. Zhang Z.X., Guan L.X., Zhang K., Wang S., Cao P.C. et al. Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro // *Cell. Biol. Int.* — 2007. — Vol. 31, №6. — P. 645—648.
63. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol. Biol. Cell.* — 2002. — Vol. 13, №12. — P. 4279—4295.

Neoplastic transformation of multipotent mesenchymal stromal cells *in vitro*

Rzhaninova A.A., Omelchenko D.O., Fedunina I.A.

Federal State Budgetary Institution «Research centre for medical genetics» of the Russian Academy of Medical Sciences (FSBI «RCMG» RAMS), 115478 Moscow, Moskvorechie st.1. Fax: 7(495)3240702, e-mail: <http://www.med-gen.ru>

Study of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) hold key position in the development of cell-based technologies due to the availability of their production, expansion *in vitro* and the possibility of preparation of autogenic graft of patient's cells. The introduction of cell-based technologies into clinical practice requires solving a number of issues relating to the safety of cellular material. First it is needed to consider the risk of tumors caused by spontaneous neoplastic transformation of cells in culture. In this case similarly to cellular senescence as the main cause of malignant transformation, it is also impossible to exclude a negative effect of some *ex vivo* manipulations with cells including genetic modification and induction of differentiation.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, immortalization, neoplastic transformation of cells *in vitro*