лабораториях в разное время; этот феномен универсален для разных линий ММСК, выделенных из разных линий мышей, а также для клеток ММСК подкожного жира [5] и костного мозга [7] человека;

– скорость такой трасформации в культуре, по–видимому, гораздо выше, чем ожидалось, поскольку уже на 3–м пассаже (3 недели) ММСК мыши и человека [7] начинают приобретать хромосомные мутации и теряют контактное ингибирование роста;

– мутантные ММСК почти в 100% дают опухоли у иммунодефицитных мышей при их пересадке на 6–м пассаже (5–7 недель культивирования); для человеческих ММСК самое раннее формирование опухолей было показано на 5–м пассаже [7];

– в клинических испытаниях, использующих ММСК человека, размноженных в культуре, по–видимому, необходимо ввести обязательный анализ кариотипа для контроля хромосомных аномалий перед введением клеток; однако следует отметить, что все исследования по онкогенности ММСК до этого были проведены на иммунодефицитных аллогенных или сингенных моделях, что не соответствует клинической ситуации.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Caplan A.I., Dennis J.E.Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J. Cell Biochem. 2006; 98(5): 1076–84.
2. Caplan A.I., Bruder S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends Mol. Med. 2001; 7(6): 259–64.
3. http://www.osiristx.com/clinical_trials.php.
4. Riggi N., Cironi L., Provero P. et al. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow–derived mesenchymal progenitor cells. Cancer Res. 2006; 65: 11459–68.
5. Rubio D., Garcia–Castro J., Martin MC, de la Fuente R. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res. 2005; 65(8): 3035–9.
6. Miura M., Miura Y., Padilla–Nash H.M. et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stemcells leads to malignant transformation. Stem Cells 2006; 24(4): 1095–103.
7. Wang Y., Huso D.L., Harrington J. et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. Cytotherapy 2005; 7(6): 509–19.
8. Tolar J., Nauta A.J., Osborn M.J. et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. Stem Cells 2007; 25(2): 371–9.
9. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8(4): 315–7.

Подготовили О. Дорошенко и А.В. Берсенёв
По материалам: Cancer Res. 2006; 66(22): 10849–54

Спонтанный мутагенез и образование сарком из мезенхимальных стромальных клеток костного мозга

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) являются одним из самым привлекательных кандидатов для клеточной терапии различных заболеваний. Однако серия недавних экспериментальных работ свидельствует о потенциальном риске канцерогенеза при трансплантации этого вида взрослых стволовых клеток [1–3].

В недавней работе, опубликованной в онлайн–версии журнала Stem Cells, описывается образование сарком у мышей после введения культивированных ММСК. Аллогенные ММСК на 9–м пассаже трансфецировали генетической конструкцией и сортировали по яркости метки. Меченые клетки пересаживали вместе с костным мозгом летально облучённым мышам. В качестве генетической конструкции для идентификации клеток использовали невирусные транспозоны (мобильных элементов генома).

Неожиданно мыши, у которых была выявлена наибольшая активность метки, погибли. Основной причиной смерти служила дыхательная недостаточность, которая развилась у животных в связи с образованием в лёгких оссификатов (2–8 очагов у каждого животного) и опухолей. У двух из них, кроме того, были обнаружены такие же опухоли в конечностях. После гистологического анализа новообразования были классифицированы как саркомы (опухоли мезенхимального происхождения).

Клетки из опухолей были выделены и проанализированы на наличие генетических аберраций. Авторы проверили как нетрансфецированные пассированные ММСК, так и трансфецированные клетки. Во всех типах клеток были выявлены спонтанные необратимые хромосомные мутации. Кроме того, исследователи показали, что спонтанный мутагенез первичных ММСК в культуре не зависит от линии мышей.

Генетическое картирование того сайта, куда был встроен транспозон, свидетельствовало о независимости проявления активации онкогенов и экспрессии трансгена. Не было зафиксировано и экспрессии p53 – одного из наиболее изученных опухолевых супрессоров клетки. Нетрансформированные пассированные ММСК, использованные в аналогичных экспериментах *in vivo*, дали сходные результаты. Это свидетельствует о том, что опухолевая трансформация не была сопряжена с действием транспозонов.

При серийных трансплантациях эти клетки также давали злокачественные опухоли. Авторы выделили отдельную линию переродившихся клеток (S1), способных к самообновлению. Цитогенетический профиль линии S1 напоминает клетки человеческой саркомы и может использоваться в модельных экспериментах по противоопухолевому иммунному ответу. Возможно, образование опухолей *in vivo* связано с иммуномодулирующими свойствами ММСК, которые, по мнению авторов, вызывая иммуносупрессию, создают благоприятные условия для развития опухоли. Однако, основные события, связанные с мутагенезом происходят в процессе культивирования и исследователи пока не могут объяснить образование генетических аномалий при пассировании ММСК.

В связи с началом клинических испытаний ММСК сегодня возникает острая необходимость в разработке требований и протоколов (в том числе с использованием генетического и хромосомного анализа) по тестированию клеток на предмет онкогенетической безопасности перед их введением.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Rubio D., Garcia–Castro J., Martin M.C. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res. 2005; 65(8): 3035–9.
2. Miura M., Miura Y., Padilla–Nash H.M. et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stemcells leads to malignant transformation. Stem Cells 2006; 24(4): 1095–103.
3. Wang Y., Huso D.L., Harrington J. et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. Cytotherapy 2005; 7(6): 509–19.

Подготовила В.С. Мелихова
По материалам: Stem Cells online Oct. 12, 2006

Клетки костного мозга могут являться источником разнообразных типов новообразований

Внедрение в клиническую практику методов трансплантации клеток для лечения негематологических заболеваний наряду с удивительными возможностями таит в себе и ряд потенциальных угроз. Дефицит клеточного материала приводит к попыткам экспансии необходимых популяций клеток *in vitro*. В процессе культивирования клетки находятся вне физиологического окружения. Использование факторов роста, отсутствие контроля со стороны иммунной системы и, возможно, факторов, контролирующих клеточную пролиферацию и апоптоз, могут являться причиной повышенного риска злокачественной трансформации. Подобные рассуждения подкреплены экспериментальными исследованиями, в которых наблюдалась спонтанная злокачественная трансформация различных популяций стволовых и прогениторных клеток костного мозга в культуре [1–3]. В настоящий момент уже получены первые данные, что культивируемые клетки могут являться источником опухолей при трансплантации экспериментальным животным [4]. Таким образом, риск возникновения новообразований у человека при трансплантации клеток представляет собой реальную угрозу. Соответственно, все аспекты процессов злокачественной трансформации исследуемых популяций клеток должны подвергнуться тщательному изучению.

В журнале «Neoplasia» исследовательской группой Liu опубликована работа, посвященная изучению опухолевого потенциала способных к адгезии клеток костного мозга мыши.

Изучаемую популяцию клеток в течение 7 дней подвергали обработке канцерогеном – 3–метилхолантреном. По истечении 8 недель после обработки наблюдались все признаки злокачественной трансформации клеток: характерные морфологические изменения, быстрый рост, утрата адгезии к пластику и контактного торможения. При культивировании в полутвердой среде около 18 из 4000 трансформированных клеток в течение 8 недель образовали колонии.

Исследование *in vitro* на наличие тканеспецифичных маркеров показало, что в стандартных условиях культивирования (DMEM и 10% FBS) трансформированные клетки костного мозга характеризуются высокой степенью экспрессии маркеров клеток эпителия, эндотелия, глии, нейронов и мышечных тканей.

Трансплантация трансформированных клеток мужских особей под кожу самок иммунодефицитных мышей приводила к появлению опухолей в месте инъекции у всех животных. При исследовании тканевых срезов наблюдались признаки злокачественных новообразований: атипия клеток, патологический митоз, гигантские опухолевые клетки, а в некоторых случаях – и инвазивный рост в окружающие ткани. Трансплантация клеток опухолей вторичным животным приводила к появлению аналогичных новообразований.

Гистологический и иммуноцитохимический анализ выявил следующие типы опухолей: опухоли из мышечных тканей, опухоли из эндотелия кровеносных сосудов, фибробластоподобные опухоли, эпителиальные опухоли, нейральные и малодифференцированные опухоли. Кроме того, встречались опухоли, в которых обнаружены дериваты разных зародышевых листков. Клетки всех новообразований содержали Y–хромосому и, следовательно, имели донорское происхождение.

Могут ли разные типы опухолей являться производными одной мультипотентной опухоль–инициирующей клетки? Для ответа на этот вопрос с помощью метода серийных разведений авторы клонировали трансформированные клетки. Отдельные клетки могли пассироваться не менее 10 раз без какой–либо потери способности к формированию колоний. Анализ наличия критических факторов транскрипции, необходимых для поддержания самообновления и плюрипотентности у эмбриональных стволовых клеток [5, 6], показал, что клонированные клетки характеризуются высокой степенью экспрессии OCT4, SOX2 и NANOG.

В свою очередь, трансплантация клонированных клеток иммунодефицитным мышам приводила к формированию опухолей у всех животных. В одной из опухолей обнаружены дериваты трех зародышевых слоев, включая мышцы, хрящи, кератиноциты, плоский эпителий, однослойный эпителий, элементы глии и сходные с нейронами клетки. Следовательно, данное новообразование по всем формальным признакам являлось тератомой. В других новообразованиях обнаружены дериваты 1–2 зародышевых листков.

Таким образом, в данном исследовании показано, что отдельные трансформированные клетки были способны к самообновлению и формированию колоний (клонов). Клетки подобных колоний характеризовались высокой степенью экспрессии ключевых эмбриональных транскрипционных факторов OCT4, SOX2 и NANOG, а также многих тканеспецифичных маркеров. Кроме того, клонированные клетки могут являться источником разных типов новообразований и даже тератом при трансплантации иммунодефицитным мышам. По всем формальным признакам описанные выше трансформированные клетки костного мозга соответствуют определению мультипотентных опухоль–инициирующих клеток.

Остается неясным, какая популяция клеток костного мозга может являться источником мультипотентных опухоль–инициирующих клеток. Ранее разные исследовательские группы описали среди клеток костного мозга клетки с широкой потенцией к дифференцировке. В частности, группа M. Kucia описала популяцию клеток VSEL (very small embryonic–like) [7], группа C. Verfaillie описала MAPC (multipotent adult progenitor cells) [8]. Тем не менее, не исключено, что способность опухоль–инициирующих клеток к