

## ГЕТЕРОГЕННОСТЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*Гетерогенность МСК млекопитающих*

**В.И. Глазко, Г.Ю. Косовский\*, Т.Т. Глазко**

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева»*

*Россия, 140143, Московская обл., Раменский р-он, пос. Родники, ул. Трудовая, 6*

*\*e-mail: niipzk@mail.ru*

Выполнен сравнительный анализ фенотипических характеристик мезенхимных стволовых клеток (МСК), выделенных из костного мозга (КМ) ряда видов млекопитающих. Выявлены определенные видо-специфические отличия характеристик пролиферации МСК КМ, наиболее медленные темпы роста популяций наблюдали у МСК КМ крыс, у них же обнаружены единичные клетки со спонтанной остеогенной дифференциацией (окрашивались ализариновым красным мелкие кальцификаты). Предполагалось, что такие отличия обусловлены тем, что у мышевидных грызунов МСК КМ относительно более гетерогенны, поскольку их выделяют из целой берцовой кости, а у более крупных млекопитающих только из эпифизов. Но в литературе имеются данные о том, что такая спонтанная остеогенная дифференциация выявлена в одиночных клетках в популяциях МСК КМ человека, иммортализованных генами вируса обезьяны SV40LT и теломеразы (hTERT). Сделан вывод о том, индукция клеточной дифференцировки может способствовать селекции имеющихся до обработки одиночных клеток с повышенным дифференцировочным потенциалом. Отличаются МСК КМ разного происхождения и по чувствительности к регуляторам клеточной пролиферации, в частности, к лейкемия ингибирующему фактору (LIF), индуцирующему многослойный рост МСК КМ кролика и крупного рогатого скота, но с разными временными темпами. В целях выяснения возможных генетических основ реакции клеток на LIF рассмотрена кариотипическая изменчивость эмбриональной стволовой клеточной (ЭСК) линии R1, созданной Nagy A. и соавторами, сохранение плюрипотентности и темпов клеточного деления которой зависит от LIF (клеточные популяции R1 предоставлены для исследований д.б.н., профессором Межевикиной Л.М.). Обнаружено, что для сублиний R1 характерно увеличение копийности хромосом 8, 19 и наличие робертсоновской транслокации 8;15. Дополнительное введение экспрессирующей LIF конструкции в клетки приводило к увеличению копийностей перечисленных хромосом. В этих хромосомах локализованы ключевые гены метаболических путей, регулирующих темпы клеточного деления и прохождения митоза, такие как, в частности, *stat3*, *jak3*, *myc*. По литературным данным, повышенная экспрессия генов *stat3*, *myc* в МСК человека при индукции их пролиферации лизатом тромбоцитов свидетельствует о вхождении этих генов в универсальный блок ключевых регуляторов клеточной пролиферации в МСК, ЭСК различного происхождения. Можно ожидать, что разработка методов контроля и индукции экспрессии некоторых генов, таких как *stat-3*, *jak3*, *myc* может способствовать усовершенствованию и унификации условий культивирования МСК, выделенных из разных органов и тканей у видов млекопитающих.

**Ключевые слова:** мезенхимные стволовые клетки, костный мозг, культивирование, *stat-3*, *jak3*, *myc*.

Мезенхимные стромальные/стволовые клетки (МСК) являются перспективными кандидатами для разных вариантов клеточной терапии различных заболеваний человека и животных. В основной критерий МСК входит потенциал множественной дифференцировки, по крайней мере, в остеогенную, адипогенную и хондрогенную линии. Этим критериям соответствуют МСК различных млекопитающих, выделенные из разных тканей. Общие фенотипические прояв-

ления, такие как экспрессия маркеров и потенциал дифференцировки, схожи, хотя и не идентичны для МСК из разных тканей и видов. МСК могут иметь различные биологические характеристики в зависимости от источника ткани и процедур выделения и культивирования. Их универсальные биологические свойства включают иммуномодулирующие, противовоспалительные, и про-регенеративные способности и в значительной степени зависят от миграционных и секреторных

способностей МСК. Они мигрируют к участкам повреждения тканей и выделяют факторы, способствующие самовосстановлению.

Однако до сих пор, поскольку механизм действия МСК, в целом, неизвестен, актуальными являются исследования особенностей характеристик МСК из конкретных органов и тканей в определенных условиях культивирования клеток у разных видов животных. Это особенно важно, поскольку, в связи с высокой гетерогенностью МСК и отсутствием достаточной информации о ее источниках, методов управления ею, прикладное применение МСК для решения разных задач остается сложной проблемой с достаточно неопределенным прогнозом эффективности соответствующих процедур [1].

Особое значение разработки методов выделения, изучения и контроля МСК получили с развитием приемов по генному редактированию. Возможности применения МСК достаточно давно исследуются, в том числе и в ветеринарии для создания таких методов клеточной терапии, как тканевая инженерия [2, 3], адресная доставка лекарств к очагам повреждения тканей [4, 5] и, в конечном итоге, получения многоклеточных организмов с желательными свойствами.

Однако до сих пор сравнение характеристик МСК, полученных из разных видов, тканей и органов остается неполным, поскольку процедуры выделения и условия культивирования существенно отличаются в разных исследованиях, что, несомненно, приводит и к отличиям в биологических характеристиках МСК и препятствует разработкам универсальных методов их выделения и применения.

Накапливаются данные, свидетельствующие о том, что успешность выделения и культивирования МСК у млекопитающих, в том числе и в наших собственных исследованиях (крысы, кролики, крупный рогатый скот, норка, соболь), имеют некоторые видоспецифичные особенности [1, 6]. Отмечаются отличия характеристик пролиферативной активности МСК *in vitro* (в том числе и в наших исследованиях), а также в биологической эффективности в зависимости от органов и тканей выделения [7-13].

Сложности прогноза, контроля и получения желательных по численности, темпам пролиферации и функциям популяций МСК усложняются еще и тем, что они существенно зависят от условий культивирования (в частности, от особенно-

стей биоматериалов подложки, на которых высеваются и пассируются МСК [14] и состава среды культивирования, реакции МСК разного происхождения на факторы регуляции клеточного деления и пролиферации [15].

Для того чтобы оценить видоспецифичность и возможные генетические основы процедур выделения и пассирования МСК, в настоящем исследовании поставлены следующие основные цели:

- сравнить эффективность применения методов выделения МСК из костного мозга лабораторных мышевидных грызунов (крысы), а также домашнего кролика и крупного рогатого скота, их чувствительность к таким индукторам клеточной пролиферации, как фактор роста фибробластов (FGF – Fibroblast growing factor – ростовой фактор), интерлейкин 2 (IL-2 – Interleukin-2 – противовоспалительный цитокин), лейкемия ингибирующий фактор (LIF – Leukemia inhibitory factor);

- на модельном объекте, эмбриональной стволовой клеточной линии мыши, выделенной Nagu и соавт. в 1993 году [16] и ставшей распространенной моделью исследований ЭСК, путем анализа изменчивости кариотипа ее субклинаний оценить возможные гены и метаболические пути, потенциально вовлекаемые в их плюрипотентность.

### Материалы и методы исследований

**Объекты.** Исследования проводили на первичных культурах МСК крыс, МСК кролика и крупного рогатого скота (КРС). Клетки выделяли из костного мозга взрослых животных по общепринятым методикам.

**Выделение МСК.** Выделение МСК из костного мозга (КМ) проводили по методу, разработанному Г.Ю. Косовским [17]. Для выделения МСК использовали технику разделения мононуклеарных клеток костного мозга в градиенте плотности фикола без применения гепарина в качестве основного компонента среды для промывания костной ткани (ДМЕМ, ПанЭко, Россия). Для устранения контаминации первичных культур в среду ДМЕМ добавляли 10-кратное избыточное количество антибиотиков-антимикотиков (Sigma, США). Клеточную суспензию предварительно фильтровали через стерильные нейлоновые фильтры с диаметром пор 100 мкм, наслаивали на фикола (1.077) в соотношении 1:1, центрифугировали при 1500 об./мин в течение 20 мин до образования на границе раздела фаз белесоватого кольца, представленного мононуклеарными

клетками костного мозга (МККМ) – лейкоцитами и МСК. Суспензию МККМ промывали дважды от фиколла путем кратковременного (5 мин) центрифугирования при 1500 об./мин в растворе Версен-ЭДТА (ПанЭко, Россия). К осадку добавляли ростовую среду ДМЕМ с глутамином, 10% фетальной сыворотки КРС (HyClone, США) и 100-кратно разбавленным раствором антибиотиков-антимикотиков (Sigma, США).

*Культивирование МСК.* Культивирование МСК проводили во флаконах, чашках Петри и 4-луночных эмбриологических планшетах в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С по стандартной методике. Длительность культивирования первичных МСК составляла от 1-2 до 5-6 недель. По достижении монослоя культуры пассировали и/или замораживали для хранения при низких температурах –70 °С и –196 °С. В качестве протектора использовали 10% раствор диметилсульфоксида (ДМСО, Sigma, США). Смену среды производили по мере закисления, как правило, на 2-3-и сутки культивирования.

*Оценка МСК в системе in vitro.* Для оценки характера изменения морфофункционального состояния первичных культур МСК использовали: инвертированные микроскопы (Nikon, Япония), автоматического прибора с программным обеспечением (SH800 Sony Biotechnology, Япония) для сортировки соматических и стволовых клеток на разных стадиях дифференцировки, выявления жизнеспособных клеток и их гибели в результате некроза и апоптоза. Обращали внимание на скорость и характер роста МСК в виде монослоя и/или отдельных колоний. Скорость роста и пролиферативную активность МСК определяли путем прямого подсчета дифференцированных соматических и плюрипотентных стволовых клеток в камере Горяева. В экспериментах по выявлению биологических эффектов ростовых факторов и цитокинов использовали первичные культуры МСК КМ крыс, КРС и кролика на 10-15 пассажах. Клеточные суспензии анализировали на сортере типа SH800 (Sony Biotechnology, Япония).

*Регуляторные факторы.* Использовали коммерческие регуляторные факторы пролиферации и дифференцировки клеток: фактор роста фибробластов (FGF – fibroblast growing factor, Sigma, США), LIF – Leukemia Inhibitory Factor (PeproTech.inc., Канада), IL-2 (Interleukin-2, Sigma, США). Регуляторные факторы добавляли ежедневно в культуральную среду  $\alpha$ -MEM с 10%

фетальной сыворотки (FBS) в концентрации 10 нг/мл. Поскольку клетки росли на 4-х луночных эмбриологических планшетах в небольшом объеме среды (500 мкл, 100 тыс. клеток на одну лунку), то через каждые сутки культивирования проводили полную смену среды как в опытных образцах, так в контроле. Длительность культивирования МСК с регуляторными факторами зависела от состояния клеток и их способности к митотическим делениям и дифференцировке.

*Эмбриональная стволовая клеточная линия мыши R1* [16]. Выполнен цитогенетический анализ трех субпопуляций ЭСК мыши линии R1, обозначенных по мере удаленности от исходной популяции как R1.5, R1.7 и R1.10 [18], и пяти популяций этих же клеток после трансфекции плазмидным вектором pcDNA3 со встроенным геном *lif*. Клеточные популяции, трансфицированные *lif* и свободные от трансфекции для кариотипических исследований были предоставлены д.б.н., профессором, Л.М. Межевикиной (ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН). Две популяции трансфицированных клеток (R1.2.1. и R1.2.2.) являются клональными потомками одной колонии (R1.2), три остальных – R1.3.6, R1.3.8. и R1.3.9. – другой трансфицированной колонии (R1.3). Кариотип исходной ЭСК линии R1 соответствует нормальному диплоидному кариотипу мыши 2n=40 [16].

Препараты ЭСК готовили по стандартной методике: клетки суспендировали и инкубировали 40 мин в гипотоническом растворе KCl (0,54%) при 37°C, затем фиксировали смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1), трижды меняя фиксирующий раствор. Препараты раскпывали на холодные мокрые стекла, высушивали и окрашивали Гимза (Merck). Окрашенные препараты анализировали и фотографировали под микроскопом (Karl Zeiss, увеличение 1000 раз). Оценивали следующие цитогенетические характеристики: наличие анеуплоидии (А) и полиплоидии (П), частоту встречаемости метафаз с хромосомными aberrациями (хромосомные, хроматидные разрывы, фрагменты, кольцевые хромосомы – ХА), межхромосомные ассоциации по типу Робертсоновских транслокаций (РБ) и с асинхронностью расщепления центромерных районов хроматид (АРЦР). Частоты встречаемости метафаз с хроматидными и хромосомными разрывами, а также с нарушенной синхронностью расщепления центромерных районов хроматид рассчитывали

относительно всей выборки просмотренных метафаз. Количество двуядерных клеток (ДЯ), а также клеток с микроядрами (МЯ) и апоптотозных ядер (А) подсчитывали на тех же препаратах в клетках с сохраненной цитоплазмой. Митотический индекс (МИ), частоты встречаемости перечисленных аномалий рассчитывали на 1000 клеток. Процент анеуплоидных клеток рассчитывался в двух вариантах: клетки с утратой или приобретением хромосом, больше чем одна (общая анеуплоидия, А1) и клетки с числом хромосом по типу  $2n\pm 1$  (А2). Статистическую обработку результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

#### Результаты исследований и обсуждение

**МСК КМ крысы.** Морфофункциональное состояние первичных МСК крысы оценивали с помощью инвертированного микроскопа (Nikon, Япония). Спонтанную остеогенную дифференцировку выявляли по окрашиванию МСК КМ крысы ализариновым красным, прочно связывающим цитоплазматический свободный кальций в нерастворимые комплексы – кальцификаты.

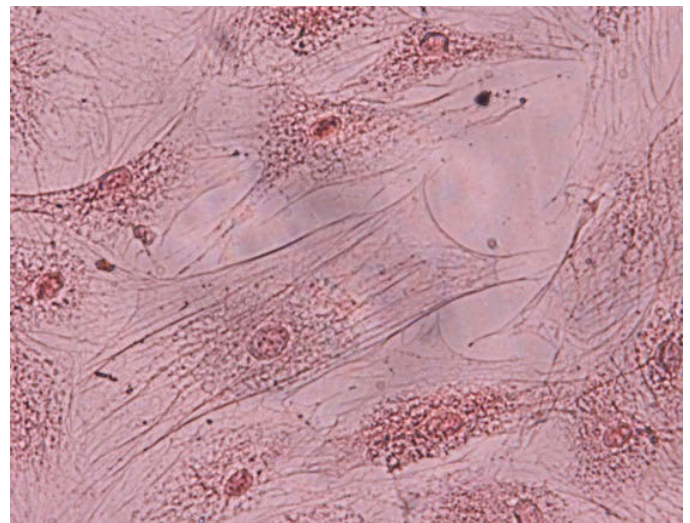
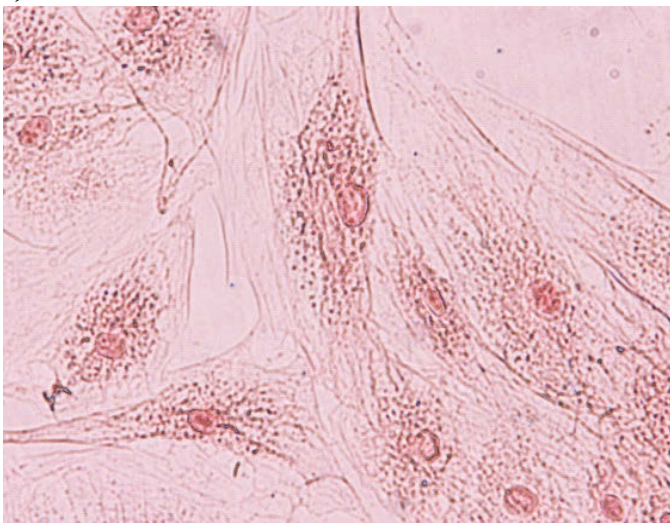
Результаты, полученные после выделения МСК КМ взрослой крысы (самец), свидетельствуют о том, что в первичной популяции обнаруживаются довольно крупные клетки округлой формы с большим ядром и прозрачной цитоплазмой. Доля недифференцированных МСК в первичных популяциях не превышает  $17,7 \pm 2,5\%$  от общей клеточной массы. После адгезии на 3-4-е сутки культивирования МСК КМ наблюдается

высокая частота встречаемости клеток с фибробластоподобной морфологией ( $45,1 \pm 2,9\%$ ). При увеличении сроков культивирования до 2 недель и более увеличивается частота встречаемости клеток с множеством древовидных ветвистых отростков.

Не удалось обнаружить влияния LIF на МСК КМ крысы, в отличие от результатов исследований МСК КМ кролика и КРС. В первичных посевах МСК КМ крысы наблюдали отдельные клетки со спонтанной остеогенной дифференцировкой.

Можно было ожидать, что некоторые отличия МСК КМ крыс и мышей от крупных млекопитающих могут быть связаны с тем, что КМ, вымываемый из эпифизов берцовых костей у крупных млекопитающих, по клеточному составу и гетерогенности может отличаться от КМ мышевидных грызунов, вымываемого полностью из всей кости [1]. Однако к настоящему времени получены данные, свидетельствующие о том, что в некоторых популяциях МСК КМ клеток человека, иммортализованных путем трансдукции генов большого Т-антигена обезьяньего вируса 40 (SV40LT) и обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT), тоже могут наблюдаться одиночные клетки со спонтанной остеогенной дифференцировкой [19]. Можно ожидать, что введение в культуральную среду индукторов определенного направления дифференцировки МСК приводит не только собственно к активации определенной генной программы, но и селекции клеточных клонов с повышенной чувствительностью к такой индукции.

а)



**Рисунок 1.** Внешний вид МСК КМ а) кролика, б) крысы на 9-е сутки культивирования в среде DMEM/F-12 с 10% ФСК (контроль)

**Figure 1.** BM MSCs from a) rabbit, б) rat on the 9th day of cultivation in DMEM/F-12 with 10% FCS (control)

В течение проведения экспериментов по культивированию МСК КМ крысы и кролика не было выявлено различий как по морфологии этих клеток, так и по морфологии колоний (рис. 1). Тем не менее, эти клеточные популяции различались по своим ростовым характеристикам (скорость роста, время удвоения популяции, скорость образования колоний). МСК КМ кролика на 9-е сутки достигали монослоя, в то же время клетки крысы покрывали только 40% поверхности. Причины выявленных различий по скорости роста МСК разных видов пока еще не выявлены. Возможно, для успешного культивирования МСК крыс необходимы специфические митогенные активаторы.

*Культивирование МСК КМ КРС в присутствии экзогенного рекомбинантного белка со свойствами цитокина LIF.* Клетки первичного посева МСК КМ КРС имеют вытянутую форму в виде треугольников с большим количеством отростков. В источниках литературы такие клетки называют арборизованными клетками, что характерно для первичных клонов МСК с высоким потенциалом к дифференцировкам *in vitro*. Нами было установлено, что после добавления в культуральную среду альфа-МЕМ рекомбинантного белка со свойствами цитокина LIF (leukemia inhibitory factor, 10 нг/мл) МСК КМ КРС приобретают в течение первых 24-48 ч культивирования более распластанную квадратно-ромбовидную форму. К этому времени в культуре в основном присутствуют клетки двух типов по характеру их морфологии: клетки по форме близкой к квадратной и/или ромбовидной и достаточно узким и относительно длинным отростком и аналогичные им клетки, но без отростков.

Установлено, что под влиянием цитокина LIF повышаются темпы клеточного деления и, возможно, происходит неопластическая трансформация первичных клонов МСК КРС, о чем свидетельствует изменение характера их монослойного роста. В присутствии LIF МСК теряют способность к контактному торможению, наплазают друг на друга в результате чего к третьему дню культивирования (72 ч) формируется сверхплотный монослой из квадратных/ромбовидных клеток. В контрольной группе (культивирование МСК без добавления цитокина в качестве экзогенного регулятора процессов клеточной пролиферации) стволовые клетки КМ достигли сетчатого монослоя. По нашим наблюдениям время

культивирования МСК КМ КРС до состояния сплошного монослоя в стандартной среде альфа-МЕМ с 10% фетальной сыворотки составляет 5-7 суток, а в некоторых редких случаях может доходить до 2 недель.

МСК КМ КРС в контроле (стандартные условия культивирования без добавления LIF), клетки, как правило, имеют веретенообразную и треугольную форму. Они соприкасаются друг с другом отростками или даже телами, формируя при этом ажурную сеть (сетчатый монослой). К 7-м суткам культивирования они достигают сплошного и достаточно плотного монослоя, в котором при увеличении длительности культивирования обнаруживаются признаки начала деградации, старения и изменения морфологии стволовых клеток.

На фоне LIF плотный монослой на 100% покрывает дно чашки или планшета. Стволовые клетки выстраиваются вплотную, перекрывая друг на друга в несколько слоев. Такое плотное образование из клеток кубовидной и ромбовидной морфологии свидетельствует о эпителизации монослоя, его повышенной адгезии и прочности межклеточных взаимодействий. Мы не исключаем, что под влиянием цитокина LIF в первичных культурах МСК КМ КРС возможны мезенхимно-эпителиальные переходы. В норме такие процессы характерны для клеток в период раннего эмбриогенеза, а также при развитии клеточной патологии, связанной со спонтанной или же индуцируемой неопластической трансформации.

Следует отметить, что цитокин LIF является фактором, влияющим на многие процессы, в том числе, процессы клеточной пролиферации, апоптоза и дифференцировки. Его мишенями являются как соматические, так и стволовые клетки. Ответные реакции на действие этого цитокина будут зависеть от морфофункционального состояния клеток на момент воздействия, наличия или отсутствия соответствующих рецепторов на плазматических мембранах. Наблюдаемые в наших экспериментах изменения морфологии и пролиферативной активности МСК КМ КРС под влиянием 10 нг/мл LIF указывают на то, что первичные клетки из костного мозга несут на своей поверхности соответствующие рецепторные белки, через которые сигналы LIF могут передаваться в цитоплазму и ядро, активировать гены, ответственные за морфологию, кле-

точные деления и, возможно, неопластическую трансформацию клеток. Для прояснения вопросов LIF-регуляции первичных культур МСК КМ КРС в направлении мезенхимно-эпителиальных переходов требуются дополнительные исследования с применением методов молекулярной биологии, клеточных и генетических маркеров.

*Влияние цитокина LIF на развитие МСК КМ кролика.* В ходе культивирования первичных популяций МСК КМ кролика в среде с рекомбинантным цитокином LIF (10 нг/мл) были выявлены схожие, но не аналогичные эффекты действия этого фактора на МСК КМ КРС. Обращает на себя внимание тот факт, что LIF в концентрации 10 нг/мл слабо влияет на морфологию МСК кролика. В то же время под его влиянием, как и в случае с МСК КМ КРС, существенно возрастает пролиферативная активность МСК КМ кролика, в результате чего на 3-и сутки культивирования формируется плотный сплошной монослой эпителиеподобной морфологии. По своим внешним характеристикам эпителиеподобный монослой МСК кролика практически не отличается от монослоя МСК КМ КРС, что указывает на общие механизмы действия цитокина LIF на ростовые характеристики стволовых клеток разных видов животных. Установлено, что при увеличении количества посевного материала (100 тыс. клеток на лунку) МСК КМ КРС и кролика достигли 75-90% монослоя в течение первых суток культивирования во всех лунках. Эмпирическим путем было установлено оптимальное количество клеток в качестве посевного материала – 30 тыс. на 500 мкл культуральной среды. При таких условиях культивирования на 4-луночных планшетах выявлялся неравномерный рост монослоя от центра к периферии. При этом центральные области каждой лунки занимали достаточно плотные клеточные слои, а по направлению к периферии выявлялись единичные клетки слабо связанные между собой отростками.

Оценка пролиферативной активности МСК КМ КРС и кролика позволила выявить некоторые отличия по этому показателю в зависимости от присутствия регуляторных факторов в среде культивирования. Наибольшее количество пролиферирующих клеток было при действии IL-2 на МСК КМ кролика. В то же время IL-2 не оказывал заметного действия на МСК КМ КРС, цитокин LIF подавлял жизнеспособность клеток КРС, а FGF, напротив, стимулировал.

Полученные данные свидетельствуют о высокой гетерогенности МСК КМ, выделенных у разных видов млекопитающих, и наличии определенных видоспецифичных особенностей по характеристикам пролиферации, межклеточным взаимодействиям, реакции на действие таких регуляторных факторов пролиферации, как IL-2, LIF и FGF.

Особый интерес представляет ответ МСК исследованных видов на обработку клеточных популяций LIF, поскольку этот фактор широко используется при инкубации и МСК, и эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) различного происхождения в целях поддержания клеточного деления и недифференцированного состояния клеток. Для того, чтобы оценить возможные метаболические пути и генные системы, участвующие в формировании ответа стволовых клеток на воздействия LIF, выполнен анализ кариотипической изменчивости сублиний ЭСК линии R1, полученной из примордиальных эмбриональных клеток мышей потомства скрещивания 129/Sv x 129/Sv-CP [16] для использования в различных экспериментальных моделях. С самого начала их изучения было установлено, что эти клетки плюрипотентны и после введения в бластоцисту реципиента формируют химеры с высокой эффективностью.

*Кариотипическую изменчивость исследовали у сублиний ЭСК R1 (обозначенных по мере удаленности от исходной популяции как R1.5, R1.7 и R1.10 [3] и пяти популяций этих же клеток после трансфекции плазмидным вектором pсDNA3 со встроенным геном *lif* (см. Материалы и методы)).* Две популяции трансфицированных клеток (R1.2.1. и R1.2.2.) являются клоональными потомками одной колонии (R1.2), три остальных – R1.3.6, R1.3.8. и R1.3.9. – другой трансфицированной колонии (R1.3). В результате выполненных исследований получены следующие данные (табл.1).

Судя по полученным данным (табл. 1), и сублинии R1, и трансфицированные популяции характеризуются широким диапазоном цитогенетических аномалий. К наиболее неблагоприятным популяциям по частоте встречаемости таких аномалий, как робертсоновские слияния, хромосомные абберации, асинхронность расщепления центромер хромосом относятся трансфицированные *lif* R1.2.1 и R1.2.2. У них также относительно понижен митотический индекс и частота встречаемости спонтанного G-бендинга.

Наличие спонтанного G-бендинга позволяет построить кариограммы клеток и оценить представленность в них индивидуальных хромосом у исходных сублиний R1 – R1№№ 5, 7, 10 (табл.2).

У клеток всех трех сублиний наблюдается избыток хромосом 8, 19 и иногда хромосомы 15, чаще всего в составе Робертсоновских транслокаций 8;15 (табл.2).

Кариограммы клеток трансфицированных популяций отличаются от сублиний увеличением избыточности этих же хромосом, особенно хромосомы 8 (табл.3).

Трисомия по хромосоме 8 является нередким событием в ЭСК клетках, происходящих от лабораторной линии мышей 129/Sv или ее сублиний [20, 21]. Другая распространенная хромосомная аномалия в этих клетках – трисомия по хромосоме 11 [22]. Наличие трисомии по хромосоме 11 ранее было описано в полученных от мышей линии СЗН перевиваемых тератомах и в производных от них эмбрионидных телах [23]. Следует отметить, что одной из характеристик лабораторной линии мышей 129/Sv является высокая предрасположенность самцов этой линии к формированию спонтанных тератокарцином (Каталог линий мышей, <http://www.jax.org>).

В общем, складывается впечатление, что трисомия по этим двум хромосомам – 8 и 11 – достаточно распространенное явление в стволовых эмбриональных клеточных линиях мышей, причем, как правило, в каждом из рассмотренных случаев обнаруживается трисомия либо хромосомы 8, либо хромосомы 11, но не обеих вместе.

К настоящему времени становятся очевидными причины, приводящие к трисомии хромосомы 11 в ЭСК, сохранение плюрипотентности которых облигатно зависит от присутствия цитокинов, в частности, фактора ингибирования лейкемии (LIF). Так, в исследованиях [24] представлены убедительные данные о том, что трисомия по хромосоме 11 наблюдается как результат селекции клеточных клонов на сохранение плюрипотентности и пролиферации, поскольку в этой хромосоме локализован ген *stat3* – главный ген, продукт которого ответственен за передачу сигнала и активацию транскрипции в результате действия ряда цитокинов, в том числе и LIF. То есть, увеличение частот встречаемости клеток с трисомией по хромосоме 11 является результатом селекции, которую проводят с ЭСК в культуральных условиях с LIF в целях сохранения ими плюрипотентности.

Известно, что LIF реализует свое действие на сохранение плюрипотентности ЭСК через индукцию димеризации gp130, что включает его фосфорилирование и дальнейшую передачу сигнала через, в основном, два основных пути – активацию Ras-зависимых протеинкиназ (MAPK путь) и JAK-STAT активацию [25]. Имеется три гена *jak*, локализованные в хромосомах 4, 8 и 19, и 7 генов STAT, локализованных в хромосомах 1 (два гена), 10 (два гена) и 11 (три гена). В то же время, обнаружено, что эффекты именно цитокина LIF реализуются через активацию гена *jak3*, локализованного в хромосоме 8, и *stat-3*, локализованного в хромосоме 11 [26,27].

Таким образом, можно ожидать, что в результате селекции на сохранение плюрипотентности и пролиферативной активности в условиях инкубации ЭСК клеток с LIF сходные эффекты могут достигаться как при увеличении копийности хромосомы 11 (несущей *stat-3* ген), так и хромосомы 8 (несущей *jak3*), поскольку эти два гена принадлежат к одному и тому же каскаду событий, индуцируемому цитокином LIF. Интересно отметить, что в хромосоме 19, копийность которой также увеличена в клетках R.1.5. и R.1.10 (табл.2), находится ген *jak2*, участвующий в активации генов *stat3* и *stat5*, локализованных в хромосоме 11 [27].

То есть, повышение «чувствительности» этого каскада, опосредующего действие на ядро цитокина LIF, может достигаться как увеличением количества копий одного гена (*stat-3*), так и другого (*jak3*). В хромосоме 8 локализована одна из протеинкиназ MAPK пути, MKK7. Из этого следует, что при увеличении копийности хромосомы 8 может увеличиваться активность и каскада событий, связанных с путем MAPK.

Общим для всех проанализированных популяций ЭСК мыши было наличие РБ 8;15 (табл. 2, 3). Трисомия по хромосомам 8 и 15 может лежать в основе отбора стволовых клеток на увеличение количества копий локализованных в них генов MAPK- и JAK/STAT путей, через которые реализуется действие цитокина LIF. В хромосоме 15, кроме протеинкиназ MAPK-пути (MAPK11 и MAPK12), локализован ген сепаразы *espl* [28] – ключевой протеазы, определяющей разделение хроматид в конце метафазы [29]. Поэтому трисомия по хромосомам 8 и 15 может ускорять кариотипическую эволюцию ЭСК за счет формирования в отдельных клогах уникальных сочетаний

**Таблица 1. Цитогенетические аномалии в популяциях эмбриональных стволовых клеток линии R1 (R1.5, R1.7 и R1.10) и в потомстве двух *lif*-трансфицированных колоний (R1.2.1, R1.2.2 и R1.3.6, R1.3.8, R1.3.9).**

**Table 1. Cytogenetic abnormalities in populations of R1(R1.5, R1.7 и R1.10) embryonic stem cell lines and in the offspring of two *lif*-transfected colonies (R1.2.1, R1.2.2 and R1.3.6, R1.3.8, R1.3.9).**

Популяции клеток линии R1/ R1 cell line population	Кол-во метафаз/ No. of metaphases	A1 %	A2 %	РБ %	ХА %	АРЦХ %	П, %	G-band %	На 1000 клеток/ Per 1000 cells			
									МИ	ДЯ	МЯ	А
R1.2.1	60	71,7	35,7	23,3	15,0	18,3	11,7	11,7	7,0	3,3	1,3	1,0
R1.2.2	45	66,7	31,3	26,7	35,6	15,6	6,7	22,2	3,7	2,7	1,3	0,7
среднее/ average:		69,2±2,5	33,5±2,2	25,0±1,7	25,3± 0,3	16,9±1,4	9,2 ±2,5	17,0 ±5,0*	5,4 ± 1,7	3,0 ± 0,3	1,3 ±0	0,9 ± 0,2
R1.3.6	100	77,0	46,7	6,0	4,0	2,0	6,0	23,0	20,0	2,0	1,7	0,3
R1.3.8	100	77,0	32,0	17,0	3,0	6,0	6,0	28,0	5,3	1,0	1,3	0,7
R1.3.9	25	76,0	28,6	4,0	0	8,0	4,0	24,0	3,0	3,0	2,0	1,0
среднее/ average:		76,7±0,3	35,8±5,6	9,0 ±4,0	2,3 ±1,2***	5,3 ± 1,8**	5,3 ±0,7	25,0 ±2,0*	9,4 ± 5,3	2,0 ± 0,6	1,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2
R1.5	100	90,0	14,3	11,0	17,0	2,0	4,0	51,0	6,3	2,3	1,0	0
R1.7	100	67,0	35,9	11,0	3,0	2,0	8,0	55,0	16,0	2,0	1,3	0,7
R1.10	60	76,7	47,8	8,3	10,0	5,0	5,0	41,7	11,5	2,5	1,5	0,5
среднее/ average:		77,9±6,7	32,6±9,8	10,1± 0,9***	10,0±4,0	3,0± 1,0***	5,6 ± 1,2	49,3±4,0	11,3 ± 2,8	2,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2

(\* ) – P<0,05; (\*\* ) – P<0,01; (\*\*\*) – P<0,001.

**Примечание:** A1 и A2 – анеуплоидные клетки 2n±6 и 2n±1 хромосомы /aneuploidy cells with 2n±6 и 2n±1 chromosomes; РБ – робертсоновские слияния /Robertsonian translocations; ХА – хромосомные aberrации /chromosomal aberrations; АРЦХ – асинхронность расщепления центромер хромосом / asynchrony of chromosome centromere splitting; П – полиплоиды /polyploids; G-band – метафазы со спонтанным G-бендингом /metaphase with spontaneous G-banding; МИ – митотический индекс /mitotic index; ДЯ – двуядерные клетки /binucleated cells; МЯ – одноядерные клетки с микроядрами /mononuclear cells with micronucleus; А – апоптозные клетки /apoptotic cells

**Таблица 2. Карิโอотипы метафаз со спонтанно дифференциально окрашенными хромосомами (G-бендинг) у клеточных сублиний ES R.1. №№ 5, 7 и 10**

**Table 2. Karyotypes of metaphases with spontaneously differentially stained chromosomes (G-banding) in ES R.1. cell sublines #5, #7, and #10**

Клеточная популяция/ Метафазы/ Cell population/ Metaphases	Количество / Number of		Робертсоновские транслокации/ Robertsonian translocations	Избыток хромосомного материала с учетом РБ/ Chromosomal material excess including ROBs	Дефицит хромосом/ Chromosome deficiency
	хромосом/ chromosomes	плеч/ arms			
R.1.5.					
1	40	41	8;19	8, 19	Y
2	41	42	11;18	8, 18	-
3	40	41	8;15	8	-
4	42	47	8;19, 17;19, 19;X, 19;19	8, 19,19, 19, 19, 19	-
5	40	41	8;8	8, 8	Y
R.1.7.					
1	38	39	8;19	8	13, 18
2	40	41	8;8	8, 8	13
3	38	39	8;19	-	13
4	40	41	8;17	8	-
5	40	41	13;14	8	-
R.1.10.					
1	39	44	2;X, 4;10, 8;17, 14;16, 19;19,	8, 14, 16, 19, 19	13
2	40	48	4;6, 5;19, 8;16, 8;17, 8;15, 9;13, 11;16, 17;19	4, 6, 8, 8, 15, 16, 17, 19, 19	5
3	38	40	8;8, 19;X	8, 8, 19	13, 17, 18
4	37	40	8;8, 18;19, 19;19	8, 8, 19, 19	10, 16, 17, 18
5	40	44	8;8, 8;16, 8;19, 16;17	8, 8, 8, 16, 19, 19	14, 15

Таблица 3. Кариотипы метафаз со спонтанно дифференциально окрашенными хромосомами (G-бендинг) у клеточных популяций ЭСК R.1.2.2. и R.1.3.6, R.1.3.8.

Table 3. Karyotypes of metaphases with spontaneously differentially stained chromosomes (G-banding) in ESC cell populations R.1.2.2. and R.1.3.6, R.1.3.8.

Клеточная популяция/ Метафазы/ Cell population/ Metaphases	Количество / Number of		Робертсоновские транслокации/ Robertsonian translocations	Избыток хромосомного материала с учетом РБ/ Chromosomal material excess including ROBs	Дефицит хромосом/ Chromosome deficiency
	хромосом/ chromosomes	плеч/ arms			
R.1.2.2.					
1	42	46	8;8, 8;11, 12;16, 18;19	8, 8, 8, 11, 13, 15, 16	17
2	41	42	8;8, 10;18	8, 8	-
3	41	43	6;8, 8;8	8,8,8	-
4	42	43	8;8	8, 8, 16	-
5	36	37	8;8	8	7, 11, 12, 15
6	39	40	8;18, 8;19	8, 8	13
R.1.3.6.					
1	40	42	8;17, 19;X	8, 19	-
2	43	47	4;17, 8;19, 8;17, 18;19	8, 8, 17,17, 18, 19, 19	-
3	40	43	4;8, 4;11, 19;X	8, 8, 11, 19	9
4	41	45	3;8, 8;15, 10;17, 19;X	8, 8, 15, 17, 19	-
5	41	42	8;19	8, 19	-
R.1.3.8.					
1	39	43	8;8, 8;17, 16;17, 19;X	8, 8, 8	-
2	39	42	8;8, 6;8, 9;19	8, 8, 8	18
3	40	47	4;9, 4;9, 8;15, 8;16; 17;19, 19;19, 19;X	8, 9, 9, 15, 19, 19, 19	-
4	39	40	8;8	8, 8	19, Y
5	27	30	4;8, 8;8, 19;X	8, 8, 8, 19	6, 9, 10, 11, 11, 13, 13, 14, 15, 16, 16, 17, 18, Y
6	36	39	1;8, 9;19, 19;X	8, 19	3, 13, 14

ний копий генетических материалов хромосом (генных балансов).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что экспрессирующийся ген *lif* способствует селекции клеточных клонов с увеличенной копийностью материала хромосом 8, 19, последующему образованию новых робертсоновских транслокаций и, соответственно, изменениям генного баланса локализованных в них генов.

В хромосоме 15 домашней мыши локализован также ген *тус* – классический индуктор клеточной пролиферации. Обнаружено, что увеличение экспрессии генов *stat3* и *тус* является универсальным ответом на разные варианты индукции пролиферации клеток, в том числе и лизатом тромбоцитов [30]. То есть, выявленное нами увеличение копийности в клетках ЭСК R1 хромосом 8, робертсоновская транслокация

8;15 могут быть ассоциированы с универсальным ускорением пролиферации клеток в ответ на введение в культуральную среду широкого спектра регуляторов клеточного деления, в том числе LIF.

По-видимому, кариотипическая нестабильность линии R1 в условиях культуры *in vitro* является результатом отбора клеток с избыточным количеством копий хромосом с локализованными в них генами – посредниками действия цитокина LIF, основного регулятора плюрипотентного состояния R1. Клетки с трисомией по хромосомам, в которых локализованы такие гены, так же как и соответствующие робертсоновские транслокации, будут в первую очередь подхватываться отбором, поскольку повышается их «чувствительность» к цитокину LIF. В тех же хромосомах локализованы гены, контролирующие расхождение хромосом по дочерним клеткам. Соответственно, их копияность будет тоже увеличиваться, что приведет к дальнейшему нарушению нормального прохождения митоза и накоплению в популяции клеток с широким спектром сочетаний «трисомий» по генетическому содержанию разных хромосом.

В популяционной генетике такая схема пассивного вовлечения в отбор генов, сцепленных с локусами, которые являются мишенями селекции, достаточно давно известна как «путешествие автостопом» (*hitch-hike*). Судя по данным цитогенетического анализа, такие же механизмы реализуется и в кариотипической эволюции ЭСК мыши. Одним из ее признаков служит появление в ЭСК робертсоновских транслокаций, что сразу же может ускорить хромосомную изменчивость внутри клеточных клонов, если партнером по такой транслокации является хромосома 15, ген сепаразы которой прямо участвует в контроле расхождения хроматид в конце метафазы.

### Заключение

Полилокусность контроля клеточной пролиферации, вовлеченность в него различных генных сетей может объяснить определенную видо- и органоспецифичность успешности выделения и пассирования МСК разного происхождения, наблюдаемые во многих исследованиях, в том числе и в наших собственных. Можно ожидать, что разработка методов контроля и индукции экспрессии некоторых генов, таких как *stat-3*, *jak3*, *mus* может способствовать усовершенствованию

и унификации условий культивирования МСК, выделенных из разных органов и тканей у видов млекопитающих.

### Список литературы

1. Uder C, Brückner S, Winkler S, Tautenhahn HM, Christ B. Mammalian MSC from selected species: Features and applications. *Cytometry A*. 2018 Jan;93(1):32-49. doi: 10.1002/cyto.a.23239
2. Kim YS, Mikos AG. Emerging strategies in reprogramming and enhancing the fate of mesenchymal stem cells for bone and cartilage tissue engineering. *J Control Release*. 2021, 330:565-574. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.12.055
3. Mastrolia I, Giorgini A, Murgia A, Loschi P, Petrachi T, Rasini V, Pinelli M, Pinto V, Lolli F, Chiavelli C, Grisendi G, Baschieri MC, Santis G, Catani F, Dominici M, Veronesi E. Autologous Marrow Mesenchymal Stem Cell Driving Bone Regeneration in a Rabbit Model of Femoral Head Osteonecrosis. *Pharmaceutics*. 2022 Oct 6;14(10):2127. doi: 10.3390/pharmaceutics14102127
4. Gilger BC. Developing advanced therapeutics through the study of naturally occurring immune-mediated ocular disease in domestic animals. *Am J Vet Res*. 2022, 83(11):ajvr.22.08.0145. doi: 10.2460/ajvr.22.08.0145
5. Han MM, He XY, Tang L, Qi L, Yang MY, Wang Y, Xing L, Jeong JH, Jiang HL. Nanoengineered mesenchymal stem cell therapy for pulmonary fibrosis in young and aged mice. *Sci Adv*. 2023, 9(29):eadg5358. doi: 10.1126/sciadv.adg5358
6. Глазко В.И., Таргош П.Г., Ермакова Е.А., Глазко Т.Т., Косовский Г.Ю. Адгезивность мезенхимных стволовых клеток норки и соболя к белкам экстрацеллюлярного матрикса. *Кролиководство и звероводство*, 2022, 6, С.40-8. DOI: 10.52178/00234885\_2022\_6\_28
7. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*. 2006 Dec 1;99(5):1285-97. doi: 10.1002/jcb.20904
8. Jiang X, Yang J, Liu F, Tao J, Xu J, Zhang M. Embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells alleviate skeletal muscle injury induced by acute compartment syndrome. *Stem Cell Res Ther*. 2022 Jul 15;13(1):313. doi: 10.1186/s13287-022-03000-0.
9. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1294-301. doi: 10.1634/stemcells.2005-0342
10. Lin Y, Liu L, Li Z, Qiao J, Wu L, Tang W, Zheng X, Chen X, Yan Z, Tian W. Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green

- fluorescent protein. *Mol Cell Biochem.* 2006 Oct;291(1-2):1-10. doi: 10.1007/s11010-006-9188-5
11. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy.* 2006;8(2):166-77. doi: 10.1080/14653240600621125
  12. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Mar 4;328(1):258-64. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.158
  13. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005 Nov;33(11):1402-16. doi: 10.1016/j.exphem.2005.07.003
  14. Su T, Xu M, Lu F, Chang Q. Adipogenesis or osteogenesis: destiny decision made by mechanical properties of biomaterials. *RSC Adv.* 2022 Aug 30;12(38):24501-24510. doi: 10.1039/d2ra02841g
  15. Yang G, Fan X, Liu Y, Jie P, Mazhar M, Liu Y, Dechsupa N, Wang L. Immunomodulatory Mechanisms and Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2023 Apr 14:1–18. doi: 10.1007/s12015-023-10539-9
  16. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 15;90(18):8424-8. doi: 10.1073/pnas.90.18.8424
  17. Косовский Г.Ю. Методические рекомендации по выделению и культивированию мезенхимных стволовых клеток (МСК) из костного мозга животных. Российская академия сельскохозяйственных наук, отделение ветеринарной медицины, Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Москва, 2009, 20 С.
  18. Миталипов Ш.М., Миталипова М.М., Иванов В.И. 1994. Влияние длительности культивирования на плюрипотентность эмбриональных стволовых (ES) клеток мыши in vitro и in vivo. *Онтогенез.* 25 (6): 19-27
  19. Piñeiro-Ramil M, Sanjurjo-Rodríguez C, Rodríguez-Fernández S, Castro-Viñuelas R, Hermida-Gómez T, Blanco-García FJ, Fuentes-Boquete I, Díaz-Prado S. Generation of Mesenchymal Cell Lines Derived from Aged Donors. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 1;22(19):10667. doi: 10.3390/ijms221910667
  20. Liu X, Wu H, Loring J, Hormuzdi S, Disteche CM, Bornstein P, Jaenisch R. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev Dyn.* 1997 May;209(1):85-91. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199705)209:1<85::AID-AJA8>3.0.CO;2-T.
  21. Park JI, Yoshida I, Tada T, Takagi N, Takahashi Y, Kanagawa H. Trisomy 8 does not affect differentiative potential in a murine parthenogenetic embryonic stem cell line. *Jpn J Vet Res.* 1998 May;46(1):29-35. PMID: 9642878
  22. Crolla JA, Brown D, Whittingham DG. Spontaneous induction of an homologous robertsonian translocation, Rb(11.11) in a murine embryonic stem cell line. *Genet Res.* 1990 Apr;55(2):107-10. doi: 10.1017/s0016672300025349
  23. Iles SA, Evans EP. Karyotype analysis of teratocarcinomas and embryoid bodies of C3H mice. *J Embryol Exp Morphol.* 1977 Apr;38:77-91. PMID: 886250
  24. Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, d'Eustachio P, Levy DE. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 16;96(6):2846-51. doi: 10.1073/pnas.96.6.2846
  25. Hirano T, Nakajima K, Hibi M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997 Dec;8(4):241-52. doi: 10.1016/s1359-6101(98)80005-1
  26. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiyama S, Yoshimura A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature.* 1997 Jun 26;387(6636):921-4. doi: 10.1038/43213
  27. Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. Regulation of IGF-I mRNA and signal transducers and activators of transcription-3 and -5 (Stat-3 and -5) by GH in C2C12 myoblasts. *Endocrinology.* 2002 Feb;143(2):492-503. doi: 10.1210/endo.143.2.8641
  28. Ko MS, Kitchen JR, Wang X, Threat TA, Wang X, Hasegawa A, Sun T, Grahovac MJ, Kargul GJ, Lim MK, Cui Y, Sano Y, Tanaka T, Liang Y, Mason S, Paonessa PD, Sauls AD, DePalma GE, Sharara R, Rowe LB, Eppig J, Morrell C, Doi H. Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development. *Development.* 2000 Apr;127(8):1737-49. doi: 10.1242/dev.127.8.1737
  29. Uhlmann F. Secured cutting: controlling separase at the metaphase to anaphase transition. *EMBO Rep.* 2001 Jun;2(6):487-92. doi: 10.1093/embo-reports/kve113
  30. Oeller, M.; Jaksch-Bogensperger, H.; Templin, M.; Gehwolf, R.; Rohde, E.; Schallmoser, K.; Laner-Plamberger, S. Transcription Factors STAT3 and MYC Are Key Players of Human Platelet Lysate-Induced Cell Proliferation. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 15782. <https://doi.org/10.3390/ijms232415782>

### **Информация об авторах:**

**Глазко Валерий Иванович** – доктор сельскохозяйственных наук, академик РАН (иностраный член), главный научный сотрудник ФГБНУ НИИПЗК, SPIN-код: 1556-3661, AuthorID: 297850, ORCID: 0000-0002-8566-8717, ResearcherID: Q-3017-2019, L-3116-2017; ScopusID: 7003981461, e-mail: vigvalery@gmail.com

**Косовский Глеб Юрьевич** – директор ФГБНУ НИИПЗК, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, SPIN-код: 3736-3480; AuthorID: 353097; ORCID: 0000-0003-3808-3086; ResearcherID: ABG-7304-2020; ScopusID: 57196461206, e-mail: niipzk@mail.ru

**Глазко Татьяна Теодоровна** – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ НИИПЗК, ORCID – 0000-0002-3879-6935, Author ID – 186988, e-mail: tglazko@rambler.ru

## **HETEROGENEITY OF MAMMALIAN MESENCHYMAL STEM CELLS**

*Heterogeneity of mammalian MSCs*

**V.I. Glazko, G.Yu. Kosovsky\*, T.T. Glazko**

*Federal State Budget Scientific Institute «Scientific Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding named after V.A. Afanas`ev»*

*Russia, 140143, 6, ul. Trudovaya, pos. Rodniki, Ramenskii r-n, Moskovskaya oblast*

*\*e-mail: niipzk@mail.ru*

A comparative analysis of the mesenchymal stem cell (MSCs) phenotypic characteristics isolated from the bone marrow (BM) of a number of mammalian species was carried out. Certain species-specific differences in the characteristics of the proliferation of BM MSCs were revealed; the slowest rates of population growth were observed in MSCs of BM rats, and single cells with spontaneous osteogenic differentiation were found between them (small calcifications were stained with alizarin red) without induction. It was assumed that such differences are due to the fact that in mouse-like rodents, MSCs are relatively more heterogeneous since they are isolated from the entire tibia and in larger mammals only from the epiphyses. However, there is evidence in the literature that such spontaneous osteogenic differentiation was detected in single cells in human MSCM populations immortalized by the genes of the monkey virus SV40LT and telomerase (hTERT). It is concluded that the induction of cellular differentiation can contribute to the selection of single cells available before treatment with increased differentiation potential. MSCs of BM differ in different origins and in sensitivity to regulators of cell proliferation, in particular to leukemia inhibitory factor (LIF), which induces multilayered growth of MSCs of BM in rabbits and cattle, but with different time rates. In order to clarify the possible genetic basis of the cell response to LIF, the karyotypic

variability of the embryonic stem cell (ESC) line R1, created by Nagy A., the preservation of pluripotency and the rate of cell division of which depend on LIF (R1 cell populations were provided for research by Doctor of Biological Sciences, Professor Mezhevnikina L.M.) were carried out. It was found that the sublines of R1 are characterized by an increase in the copyicity of chromosomes 8, 19, and the presence of Roberson translocations 8;15. The additional introduction of the LIF-expressing construct into the cells led to an increase in the copies of the listed chromosomes. These chromosomes contain key genes of metabolic pathways regulating the rate of cell division and mitosis, such as, in particular, *stat3*, *jak3*, and *myc*. According to literature data, the increased expression of *stat3*, *myc* genes in human MSCs during induction of their proliferation by platelet lysate indicates the entry of these genes into the universal block of key regulators of cell proliferation in MSCs, ESCs of various origins. It can be expected that the development of methods for controlling and inducing the expression of certain genes, such as *stat-3*, *jak3*, and *myc*, can contribute to the improvement and unification of the conditions for the cultivation of MSCs isolated from different organs and tissues in mammalian species.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, bone marrow, culturing, *stat-3*, *jak3*, *myc*.

## References

1. Uder C, Brückner S, Winkler S, Tautenhahn HM, Christ B. Mammalian MSC from selected species: Features and applications. *Cytometry A*. 2018 Jan;93(1):32-49. doi: 10.1002/cyto.a.23239
2. Kim YS, Mikos AG. Emerging strategies in reprogramming and enhancing the fate of mesenchymal stem cells for bone and cartilage tissue engineering. *J Control Release*. 2021, 330:565-574. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.12.055
3. Mastroia I, Giorgini A, Murgia A, Loschi P, Petrachi T, Rasini V, Pinelli M, Pinto V, Lolli F, Chiavelli C, Grisendi G, Baschieri MC, Santis G, Catani F, Dominici M, Veronesi E. Autologous Marrow Mesenchymal Stem Cell Driving Bone Regeneration in a Rabbit Model of Femoral Head Osteonecrosis. *Pharmaceutics*. 2022 Oct 6;14(10):2127. doi: 10.3390/pharmaceutics14102127
4. Gilger BC. Developing advanced therapeutics through the study of naturally occurring immune-mediated ocular disease in domestic animals. *Am J Vet Res*. 2022, 83(11):ajvr.22.08.0145. doi: 10.2460/ajvr.22.08.0145
5. Han MM, He XY, Tang L, Qi L, Yang MY, Wang Y, Xing L, Jeong JH, Jiang HL. Nanoengineered mesenchymal stem cell therapy for pulmonary fibrosis in young and aged mice. *Sci Adv*. 2023, 9(29):eadg5358. doi: 10.1126/sciadv.adg5358
6. Glazko V.I., Targosh P.G., Ermakova E.A., Glazko T.T., Kosovskiy G.Yu. Adgezivnost mezenkhimnykh stvolovykh kletok norki i sobolya k belkam ekstratsellyulyarnogo matriksa [Adhesiveness of mink and sable mesenchymal stem cells to extracellular matrix proteins]. *Krolikovodstvo i zverovodstvo*. 2022, 6: P.40-8.. DOI: 10.52178/00234885\_2022\_6\_28
7. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*. 2006 Dec 1;99(5):1285-97. doi: 10.1002/jcb.20904
8. Jiang X, Yang J, Liu F, Tao J, Xu J, Zhang M. Embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells alleviate skeletal muscle injury induced by acute compartment syndrome. *Stem Cell Res Ther*. 2022 Jul 15;13(1):313. doi: 10.1186/s13287-022-03000-0.
9. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1294-301. doi: 10.1634/stemcells.2005-0342
10. Lin Y, Liu L, Li Z, Qiao J, Wu L, Tang W, Zheng X, Chen X, Yan Z, Tian W. Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green fluorescent protein. *Mol Cell Biochem*. 2006 Oct;291(1-2):1-10. doi: 10.1007/s11010-006-9188-5
11. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8(2):166-77. doi: 10.1080/14653240600621125
12. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Mar 4;328(1):258-64. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.158
13. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansgor W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005 Nov;33(11):1402-16. doi: 10.1016/j.exphem.2005.07.003
14. Su T, Xu M, Lu F, Chang Q. Adipogenesis or osteogenesis: destiny decision made by mechanical properties of biomaterials. *RSC Adv*. 2022 Aug 30;12(38):24501-24510. doi: 10.1039/d2ra02841g
15. Yang G, Fan X, Liu Y, Jie P, Mazhar M, Liu Y, Dechsupa N, Wang L. Immunomodulatory Mechanisms and Therapeutic

- Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2023 Apr 14;1–18. doi: 10.1007/s12015-023-10539-9
16. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 15;90(18):8424-8. doi: 10.1073/pnas.90.18.8424
  17. Kosovsky G.Yu. Guidelines for the isolation and cultivation of mesenchymal stem cells (MSCs) from the bone marrow of animals // Rossiiskaya akademiya sel'skokhozyaistvennykh nauk, otdelenie veterinarnoi meditsiny, Vserossiiskii nauchno-issledovatel'skii i tekhnologicheskii institut biologicheskoi promyshlennosti, Moskva, 2009, 20 P. (In Russ.)
  18. Mitalipov Sh.M., Mitalipova M.M., Ivanov V.I. 1994. Vliyaniye dlitelnosti kultivirovaniya na plyuripotentnost embrionalnykh stvolovykh (ES) kletok myshi in vitro i in vivo [Effect of cultivation duration on pluripotency of mouse embryonic stem (ES) cells in vitro and in vivo.]. *Ontogenez*. 25 (6): 19-27
  19. Piñeiro-Ramil M, Sanjurjo-Rodríguez C, Rodríguez-Fernández S, Castro-Viñuelas R, Hermida-Gómez T, Blanco-García FJ, Fuentes-Boquete I, Díaz-Prado S. Generation of Mesenchymal Cell Lines Derived from Aged Donors. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 1;22(19):10667. doi: 10.3390/ijms221910667
  20. Liu X, Wu H, Loring J, Hormuzdi S, Disteché CM, Bornstein P, Jaenisch R. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev Dyn*. 1997 May;209(1):85-91. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199705)209:1<85::AID-AJA8>3.0.CO;2-T.
  21. Park JI, Yoshida I, Tada T, Takagi N, Takahashi Y, Kanagawa H. Trisomy 8 does not affect differentiative potential in a murine parthenogenetic embryonic stem cell line. *Jpn J Vet Res*. 1998 May;46(1):29-35. PMID: 9642878
  22. Crolla JA, Brown D, Whittingham DG. Spontaneous induction of an homologous robertsonian translocation, Rb(11.11) in a murine embryonic stem cell line. *Genet Res*. 1990 Apr;55(2):107-10. doi: 10.1017/s0016672300025349
  23. Iles SA, Evans EP. Karyotype analysis of teratocarcinomas and embryoid bodies of C3H mice. *J Embryol Exp Morphol*. 1977 Apr;38:77-91. PMID: 886250
  24. Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, d'Eustachio P, Levy DE. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 16;96(6):2846-51. doi: 10.1073/pnas.96.6.2846
  25. Hirano T, Nakajima K, Hibi M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997 Dec;8(4):241-52. doi: 10.1016/s1359-6101(98)80005-1
  26. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiyama S, Yoshimura A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*. 1997 Jun 26;387(6636):921-4. doi: 10.1038/43213
  27. Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. Regulation of IGF-I mRNA and signal transducers and activators of transcription-3 and -5 (Stat-3 and -5) by GH in C2C12 myoblasts. *Endocrinology*. 2002 Feb;143(2):492-503. doi: 10.1210/endo.143.2.8641
  28. Ko MS, Kitchen JR, Wang X, Threat TA, Wang X, Hasegawa A, Sun T, Grahovac MJ, Kargul GJ, Lim MK, Cui Y, Sano Y, Tanaka T, Liang Y, Mason S, Paonessa PD, Sauls AD, DePalma GE, Sharara R, Rowe LB, Eppig J, Morrell C, Doi H. Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development. *Development*. 2000 Apr;127(8):1737-49. doi: 10.1242/dev.127.8.1737
  29. Uhlmann F. Secured cutting: controlling separase at the metaphase to anaphase transition. *EMBO Rep*. 2001 Jun;2(6):487-92. doi: 10.1093/embo-reports/kve113
  30. Oeller, M.; Jaksch-Bogensperger, H.; Templin, M.; Gehwolf, R.; Rohde, E.; Schallmoser, K.; Laner-Plamberger, S. Transcription Factors STAT3 and MYC Are Key Players of Human Platelet Lysate-Induced Cell Proliferation. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 15782. <https://doi.org/10.3390/ijms232415782>

### Information about the authors:

**Glazko Valeriy Ivanovich** – Doctor of Agricultural Sciences, professor, RAS academician (foreign member), Chief Researcher of Afanas'ev Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, ORCID – 0000-0002-8566-8717, Author ID – 297850, e-mail: [vigvalery@gmail.com](mailto:vigvalery@gmail.com)

**Kosovsky Gleb Yurievich** – Head of Afanas'ev Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, Doctor of Biological Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, SPIN-код: 3736-3480; AuthorID: 353097; ORCID: 0000-0003-3808-3086; ResearcherID: ABG-7304-2020; ScopusID: 57196461206, e-mail: [niipzk@mail.ru](mailto:niipzk@mail.ru)

**Glazko Tatiana Theodorovna** – Doctor of Agricultural Sciences, professor, chief researcher of Afanas'ev Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, ORCID – 0000-0002-3879-6935, Author ID – 186988, e-mail: [tglazko@rambler.ru](mailto:tglazko@rambler.ru)