

ДИНАМИКА СКОРОСТИ РОСТА, ИММУНОФЕНОТИПА И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА НА РАННИХ И ПОЗДНИХ ПАССАЖАХ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *EX VIVO*

Е.Ю. Осипова^{1,3}, В.А. Никитина², Т.А. Астрелина^{1,3}, А.Ю. Устюгов³, Е.В. Дмитриева¹,
Б.Б. Пурбуева^{1,3}, Е.В. Скоробогатова¹, Т.В. Шаманская^{1,3}, З.М. Дышлевая¹,
М.В. Яковлева³, О.А. Майорова^{1,3}, Л.Д. Катосова², С.А. Румянцев^{1,3}, Н.П. Бочков²

¹Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
Минздрава России, Москва; ²ГУ Медико-генетический научный центр РАМН;

³Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения Москвы

Проведено изучение динамики роста, изменения иммунофенотипических характеристик, генетической стабильности мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека на ранних (3–4-й) и поздних (10–12-й) пассажах при культивировании *in vitro*. Представлены результаты культивирования стромальных фибробластов костного мозга ($n=25$), забранного в целях аллогенной трансплантации пациентам с гематологическими заболеваниями. Было показано, что в популяции культивируемых *in vitro* МСК сохраняется линейная гомогенность клеток, наблюдаемая на 3–4-м пассаже, а также и при увеличении срока культивирования до 10–12-го пассажа. Результаты анализа анеуплоидии культивируемых клеток свидетельствуют о клональной гетерогенности популяции МСК и селективном преимуществе определенных клонов в процессе культивирования. Используемый в нашей работе протокол культивирования МСК позволяет получить достаточное для клинического применения число хорошо охарактеризованных клеток уже на 3–4-м пассаже. При использовании в терапевтических целях МСК более поздних сроков экспансии следует осуществлять строгий контроль поверхностного фенотипа и генетической стабильности клеточных трансплантатов, что позволит в будущем избежать нежелательных отдаленных последствий клинического использования культур МСК. Полученные данные обсуждены и сопоставлены с данными литературы.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, пассирование, иммунофенотип, пролиферативная активность, генетическая стабильность, экспансия *ex vivo*

HUMAN BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS GROWTH RATE DYNAMICS, IMMUNOPHENOTYPE AND GENETIC STABILITY ON EARLY AND LATE PASSAGES AT EX VIVO CULTURING

E. Yu. Osipova^{1,3}, V. A. Nikitina², T. A. Astrelina^{1,3}, A. Yu. Ustyugov³, E. V. Dmitrieva¹, B. B. Purbueva^{1,3}, E. V. Skorobogatova¹,
T. V. Schamanckaya^{1,3}, Z. M. Dischlevaya¹, M. V. Yakovleva³, O. A. Maiorova^{1,3}, L. D. Katosova², S. A. Roumiantsev^{1,3}, N. P. Bochkov²

¹Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology;

²Medical Genetic Scientific Centre RAMS; ³The Stem cell bank Moscow Department of Public health, Moscow

Human mesenchymal stem cells (MSC) growth dynamics, immunophenotype change, genetic stability on early (3–4) and late (10–12) passages at *in vitro* culturing was studied. Results of bone marrow stromal fibroblasts culturing ($n=25$) from allogeneic transplant recipients with hematological disorders are presented. It has been shown, that in MSC population cultivated *in vitro* linear homogeneity of cells is observed on 3–4 passage, and remains on 10–12 passage. Clonal heterogeneities of MSC population and selective advantage of certain clones during culturing was revealed as aneuploidy analysis results of cultivated cells. The MSC culturing protocol used in our work allows receiving well characterized MSC number sufficient for clinical application as early as 3–4 passage. While using in the therapeutic purposes MSC later terms of expansion it is necessary to have close control of cells immunophenotype and genetic stability, which will allow avoiding in the future the undesirable long-term consequences of MSC cultures clinical use. The obtained data are discussed and compared with literature data.

Key words: mesenchymal stem cells, passage, immunophenotype, proliferating activity, genetic stability, expansion *ex vivo*

Существование в костном мозге стволовых клеток стромы, образующих в культуре колонии фибробластоподобных клеток, было впервые доказано А.А. Фриденштейном и соавт. [1–3]. Эти клетки получили название колониеобразующих предшественников фибробластов (КОЕ-ф). Стволовая природа этих клеток (способность к самообновлению и дифференцировке в различные мезен-

химальные элементы) была подтверждена в многочисленных исследованиях [1–10]. Учитывая способность этих клеток трансформироваться в мезенхимальные элементы различных линий дифференцировки (остеоидные, хондрогенные, адипогенные и другие клетки-предшественники), позднее они получили название мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [11, 12]. В последние годы МСК все

шире применяются в клинике для клеточной терапии [8, 13—15]. Однако отсутствие стандартизованных методик выделения, культивирования и определения поверхностного фенотипа МСК требует выработки определенных критериев оценки клеток, выращенных *in vitro* для клинических целей. Необходимо быть уверенными в безопасности применения МСК у человека, прежде всего — в онкогенной безопасности. На риск канцерогенеза из «взрослых» стволовых клеток человека после их трансплантации указывает тот факт, что они экспрессируют общие маркеры с эмбриональными клеточными линиями [16, 17]. МСК человека, выделенные из подкожной жировой клетчатки, после длительного культивирования *in vitro* (>20 делений) приобрели способность формировать опухоли при введении SCID-мышам [18].

В культурах МСК костного мозга человека после 5-го пассажа выявляли колонии активно делящихся клеток с множественными хромосомными аномалиями, характерными для злокачественных клеток. По сравнению с МСК от 3—4-го пассажа эти клетки экспрессировали CD133⁺, легко клонировались и характеризовались высоким уровнем теломеразной активности. После трансплантации NOD/SCID-мышам эти клетки вызывали канцерогенез, преимущественно в легких, печени и брюшине через 4—6 нед [14, 18]. Другие авторы при длительном культивировании МСК (>20 пассажей) признаков злокачественной трансформации не выявили [15].

В связи с противоречивыми результатами исследований способности МСК к канцерогенезу после длительного культивирования *in vitro* проблема генетической безопасности при применении МСК для терапии человека является актуальной и требует дальнейшего изучения.

Задачей настоящего исследования явилось определение динамики роста, изменения иммунофенотипических характеристик, генетической стабильности МСК человека на ранних (3—4-й) и поздних (10—12-й) пассажах при культивировании *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для исследования служил костный мозг здоровых доноров ($n=25$), забранный в целях аллогенной трансплантации пациентам с гематологическими заболеваниями, находившимся на лечении в Федеральном научно-клиническом центре детской гематологии, онкологии и иммунологии.

Культивирование стромальных фибробластов костного мозга проводили по методу, предложенному А.Я. Фриденштейном и соавт. [19]. Мононуклеарные клетки, выделенные из 20—40 мл костного мозга, высаживались в культуральные вентилируемые флаконы с площадью дна 75 см² в концентрации 30—40×10⁶/флакон в среде ДМЕМ с низким со-

держанием глюкозы с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки. Через 1—3 сут неприлипшие клетки удалялись со сменой среды, через 14 дней клетки снимали с пластика с помощью раствора трипсин-этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) и пассировали каждые 7 дней в концентрации 0,5×10⁶/флакон до окончания культивирования. Культивирование проводили при температуре 37°C в условиях абсолютной влажности и 5% CO₂ в воздухе. Начиная с 3-го пассажа культуры МСК имели мономорфный вид и состояли из клеток веретенообразной формы (рис. 1).

Динамику роста клеточной популяции определяли по кратности прироста клеток: отношение количества клеток, полученного с данного пассажа, к числу клеток, посаженному на предыдущем пассаже.

Определение поверхностных маркеров клеток проводили с использованием следующей панели антител: CD3, CD13, CD14, CD19, CD25, CD29, CD31, CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 и HLA-DR. Определяли как относительное число клеток в культуре МСК (в процентах), экспрессирующих тот или иной антиген, так и относительную интенсивность флюоресценции изучаемых антигенов (в гMFI).

Приготовление цитогенетических препаратов. Колхицин в стандартной конечной концентрации (0,5 мкг/мл) вводили в культуральные флаконы за 1,5 ч до начала фиксации. После окончания колхицинизации клетки снимали со стенки флакона с помощью раствора трипсин-ЭДТА. Гипотонизацию проводили 0,55% раствором KCl (8 мин при 37°C), перед центрифугированием добавляли 3—5 капель фиксатора для остановки гипотонизации. Фиксация проводилась смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (в соотношении 3:1) стандартным способом с использованием 3 смен фиксатора. Клеточные суспензии раскапывали на охлажденные влажные стекла.

Кариотипирование. Цитогенетические дифференциально окрашенные препараты для кариотипирования готовили методом G-окраски. Для каж-

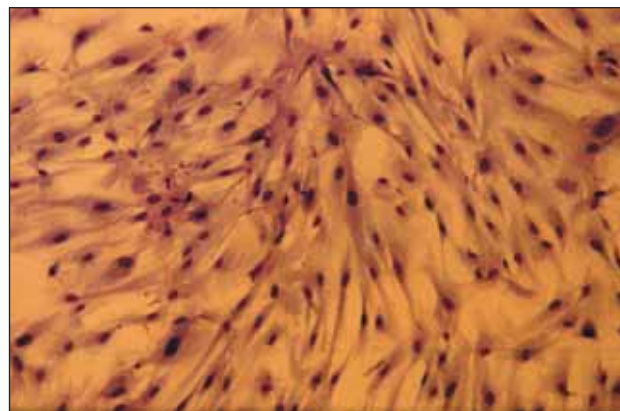


Рис. 1. Морфология МСК в культуре

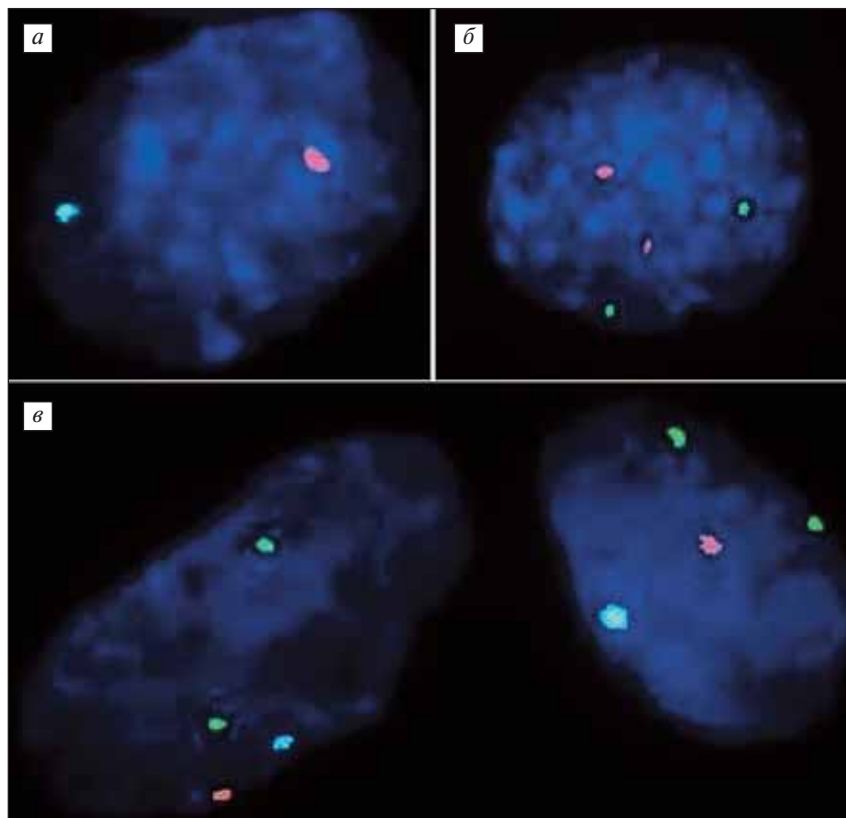


Рис. 2. Примеры интерфазных ядер из культур МСК. Одновременная гибридизация с 2 или 3 центромерными зондами: а — хромосомы X и Y (голубой и оранжевый сигналы); б — хромосомы 6 и 8 (оранжевый и зеленый сигналы); в — хромосомы X, Y, 11 (голубой, оранжевый и зеленые сигналы)

дой культуры МСК анализировали не менее 15 метафаз. Анализ препаратов проводили согласно L.G. Shaffer и N. Tommerup [20].

Анализ частоты анеуплоидии. Для выполнения интерфазного FISH-анализа (FISH — метод флюоресцентной гибридизации *in situ*) использовали центромерспецифичные ДНК-зонды на хромосомы X, Y, 6, 8, 11 («Vysis, Inc.»). Денатурацию, гибридизацию и отмыв проводили по стандартному протоколу. Для контрастной окраски ядер использовали 4'-6-диамино-2-фенилидол (DAPI). FISH-препараты анализировали под микроскопом AxioImager с комплектом интерференционных фильтров с помощью программного обеспечения FISH-анализа (Fish View System, Applied Spectral Imaging, GmbH). В каждой культуре анализировали не менее 1000 интерфазных ядер. Применение ме-

тода многоцветного интерфазного FISH-анализа позволило исключить из анализа ядра с нерезультативной гибридизацией (рис. 2).

Статистическая обработка полученных данных проводилась в программах Biostat и Microsoft Excel, STATISTICA 6.0. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Мы обнаружили, что при длительном культивировании *in vitro* МСК костного мозга человека наблюдается постепенное снижение пролиферативной активности клеток. Данные представлены в табл. 1. Так, МСК 3—4-го пассажа обладают значительно более высокой пролиферативной активностью по сравнению с культурами 10—12-го пассажа. Кратность прироста клеток составила 5,88 и 2,03 раза соответственно.

Таким образом, при экспансии МСК *in vitro* скорость увеличения клеточной популяции максимальна на 3—4-м пассаже,

несколько снижается к 5—6-му пассажу и достоверно уменьшается на поздних (10—12-й) пассажах.

По данным литературы, имеются значительные разногласия между исследователями относительно экспрессии поверхностных маркеров на МСК. По-видимому, это связано с использованием различных сред для культивирования МСК, ферментативных растворов для снятия клеток с пластика, с различными временными интервалами между обработкой клеток и анализом на проточном цитофлюориметре, с различиями в возрасте (число пассажей) культур МСК. Тем не менее в последнее время выработана «минимальная» панель для оценки иммунофенотипа МСК, выращенных *in vitro* (3—4-й пассаж) для клинического применения [13, 21].

Полученные нами результаты согласуются с этими сведениями. После культивирования в течение 3—4-го пассажа на МСК костного мозга наблюдалась высокая экспрессия (>60%) следующих маркеров: CD90, CD105, CD166, CD44, CD73, промежуточная (30—60%): CD13 и CD29. Стромальные клетки

Таблица 1. Динамика прироста МСК при длительном культивировании *in vitro*

Показатель	Пассаж			
	3—4-й (n=32)	5—6-й (n=32)	7—9-й (n=32)	10—12-й (n=25)
Кратность прироста, медиана	5,88	4,81	2,63	2,03
Достоверность различий, p	0,012			

костного мозга не несли маркеры CD45, CD34, CD133, CD3, CD19, CD25, CD38, CD45, CD106, CD31 (доля положительных клеток <5%). Данные представлены в табл. 2.

При увеличении срока культивирования МСК до 10–12-го пассажа достоверно снижается лишь число клеток, экспрессирующих CD90 и CD166. В отличие от данных М. Kassem и соавт. [18], нами не отмечено увеличения количества CD133⁺ клеток при пассировании МСК до 10–12-го пассажа. С увеличением числа пассажей мезенхимальных клеток из культур исчезают примеси гемопоэтических (CD45⁺) и эндотелиальных (CD31⁺) клеток, наблюдается тенденция к снижению количества моноцитов (CD14⁺).

Результаты, полученные при оценке интенсивности экспрессии характерных для МСК антигенов при длительном культивировании *in vitro*, представлены в табл. 3. При увеличении срока культивирования МСК до 10–12-го пассажа, несмотря на снижение числа CD90⁺- и CD31⁺-клеток, интенсивность экспрессии этих антигенов повышается. В наших экспериментах не выявлено достоверных изменений интенсивности экспрессии других исследованных антигенов на поверхности МСК при экспансии *in vitro*.

По светооптическим характеристикам МСК как на ранних, так и на поздних пассажах представляют собой гомогенную популяцию крупных по размеру клеток, отличающихся от гемопоэтических. Наблюдаемые изменения экспрессии поверхностных антигенов на МСК в процессе пассирования, по-видимому, связаны с клональной гетерогенностью в популяции культивируемых клеток.

Кариотипирование МСК проведено в 9 культурах. Во всех случаях хромосомный набор культур МСК соответствовал нормальному — 46XY или 46XX и не менялся в процессе культивирования.

При анализе частоты анеуплоидии в культурах МСК было проанализировано около 25 тыс. ядер. В табл. 4 представлены результаты исследования частоты анеуплоидии по хромосоме X в культурах мужчин — доноров костного мозга на ранних и поздних пассажах.

В среднем число нормальных клеток с одной хромосомой X составило 99,40±0,12% на ранних и 99,54±0,14% на поздних пассажах. Частота ядер с двумя хромосомами X варьировала от 0,1 до 1,07% в разных культурах, а в среднем составила 0,52±0,10% — ранние и 0,46±0,14% — поздние пассажи. Нулисомия по хромосоме X зафиксирована как крайне редкое явление (0,08±0,04%), что может быть

Таблица 2. Изменение поверхностного фенотипа МСК костного мозга при длительном культивировании *in vitro*

Показатель	Антитело	Процент клеток, несущих данный маркер, медиана, МСК 3–4-го пассажа (n=12)	10–12-го пассажа (n=10)	Достоверность различий, p
Маркер Т-лимфоцитов	CD3	0,48	0,26	0,22
Маркер миелоидных клеток	CD13	24,54	13,19	0,48
Маркер моноцитов	CD14	0,58	0,155	↓ 0,07
Маркер В-лимфоцитов	CD19	0,29	0,3	0,90
Рецептор ИЛ-2	CD25	0,23	0,29	0,63
β1-Интегрин	CD29	53,82	35,59	0,59
PECAM	CD31	2,22	1,1	↓ 0,06
Маркер стволовых клеток	CD34	0,46	0,64	0,67
Маркер активации лимфоцитов	CD38	0,55	0,33	0,16
NCAM-1	CD44	81,94	82,14	0,34
Общий лейкоцитарный АГ	CD45	2,75	1,3	↓ 0,049
SH3	CD73	97,5	98,5	0,34
Thy-1	CD90	67,29	45,27	↓ 0,05
Эндоглин, SH2	CD105	69,6	57,71	0,44
VCAM-1	CD106	0,3	0,7	0,27
Маркер стволовых клеток	CD133	0,74	1,09	0,14
SB 10/ALKAM	CD166	67,24	36,96	↓ 0,05
HLA-DR	Анти-HLA-DR	1,24	0,36	↓ 0,07

Таблица 3. *Изменение интенсивности экспрессии характерных для МСК антигенов при длительном культивировании in vitro*

Показатель	Антитело	Интенсивность экспрессии (в гMFI), медиана, МСК		Достоверность различий, <i>p</i>
		3—4-го пассажа (<i>n</i> =12)	10—12-го пассажа (<i>n</i> =10)	
Маркер миелоидных клеток	CD13	422	647	1,0
β-Интегрин	CD29	400	727	0,89
PECAM	CD31	13	34	0,045
HCAM-1	CD44	5309	4725	0,34
SH3	CD73	2577	1538	0,74
Thy-1	CD90	496	703	0,047
Эндоглин, SH2	CD105	1507	2060	0,54
Маркер стволовых клеток	CD133	13	20	0,64
SB 10/ALKAM	CD166	354	374	0,26

связано с выявлением разовых событий потери единственной X-хромосомы вследствие нерасхождения или отставания в процессе клеточного деления или может рассматриваться как гибридизационный артефакт. По данным литературы, нулисомия по хромосоме X не совместима с выживанием клетки. Такие

клетки могут быть выявлены благодаря чувствительности метода FISH на интерфазных ядрах, и скорее всего для них уже запущен механизм апоптоза.

На ранних и поздних пассажах были зафиксированы ядра, нулисомные по хромосоме Y. Данные представлены в табл. 5.

Таблица 4. *Частота анеуплоидии по хромосоме X в МСК из костного мозга (донор XY)*

№	Номер культуры по протоколу	Число клеток	Нулисомия, %	Моносомия, %	Дисомия, %
3—4-й пассаж					
1	2*	1002	0	99,20	0,80
2	4	1009	0	99,31	0,69
3	5	1278	0	99,84	0,16
4	6	1007	0	99,90	0,10
5	8	1083	0	98,98	1,02
6	10	1005	0	99,70	0,30
7	12	1033	0,29	98,94	0,77
8	13	1018	0,1	99,51	0,39
9	15	1046	0,29	99,24	0,48
Среднее		9481	0,08±0,04	99,40±0,12	0,52±0,10
10—12-й пассаж					
1	2	1006	0	99,90	0,10
2	4	730	0	99,59	0,41
3	5	542	0	99,82	0,18
4	8	1004	0	99,60	0,40
5	12	1030	0	98,93	1,07
6	13	1016	0	99,41	0,59
Среднее		5328	0	99,54±0,14	0,46±0,14

* 5-й пассаж.

Спонтанная частота потери хромосомы Y в культурах МСК варьировала от 0 до 0,87% на разных пассажах. Частота гиперпloidии (дисомия) составила $0,19 \pm 0,10\%$ как на ранних, так и на поздних пассажах. Не выявлено статистически достоверных различий в частотах разных типов анеупloidий по хромосоме Y.

Частота анеупloidии по половым хромосомам не менялась в процессе культивирования и соответствует данным, полученным на культурах лимфоцитов человека [22].

Продолжается работа по оценке уровня анеупloidии по хромосомам 6, 8 и 11 в культурах МСК. Исследование анеупloidии по аутосомам (хромосомы 6, 8, 11) показало, что частота моносомии при длительном культивировании МСК костного мозга превышает частоту трисомии. Это соответствует результатам, полученным ранее при исследовании анеупloidии в культурах МСК из жировой ткани [23].

В одной культуре МСК (№2) обнаружен клеточный клон с трисомией по хромосоме 8. Частота анеупloidии по этой хромосоме была оценена на 4, 6 и 12-м пассажах. Клон выявляется уже на 4-м пассаже и составляет примерно 24% от общего числа проанализированных клеток, на 6-м пассаже зафи-

ксировано уже 34% ядер с трисомией по хромосоме 8. Однако к 12-му пассажу наблюдали только 16% трисомных клеток в этой культуре. Условия культивирования и пересевов клеточных культур были сходными, поэтому появление аномальных клонов клеток можно объяснить их селективным преимуществом в размножении. Изменение размера клона свидетельствует о разной скорости его деления в процессе культивирования. Можно предположить, что процессы пролиферации и старения в анеупloidных клетках протекают быстрее, чем в нормальных.

Для применения МСК в клеточной терапии важно трансплантировать хорошо охарактеризованную гомогенную популяцию клеток [8, 13, 14, 21]. На основании полученных нами результатов можно сделать вывод о том, что в популяции культивируемых *in vitro* МСК линейная гомогенность клеток, наблюдаемая на 3—4-м пассаже, сохраняется и при увеличении срока культивирования до 10—12-го пассажа. Однако наблюдаемые при этом изменения поверхностного фенотипа, скорости роста и результаты анализа анеупloidии культивируемых клеток свидетельствуют о клональной гетерогенности популяции МСК и селективном преимуществе определенных клонов в процессе культиви-

Таблица 5. Частота анеупloidии по хромосоме Y в МСК из костного мозга (донор XY)

№	Номер культуры по протоколу	Число клеток	Нулисомия, %	Моносомия, %	Дисомия, %
3—4-й пассаж					
1	2*	1002	0,50	99,40	0,10
2	4	1009	0,20	99,80	0
3	5	1278	0,39	99,61	0
4	6	1007	0,50	99,40	0,10
5	8	1083	0,55	99,26	0,18
6	10	1005	0,20	99,80	0
7	12	1033	0,87	98,26	0,87
8	13	1018	0	99,71	0,29
Среднее		8435	$0,40 \pm 0,09$	$99,41 \pm 0,18$	$0,19 \pm 0,10$
10—12-й пассаж					
1	2	1006	0,40	99,50	0,10
2	4	730	0	100	0
3	5	542	0	99,82	0,18
4	8	1004	0,40	99,60	0
5	12	1030	0,19	99,13	0,68
6	13	1016	0	99,80	0,20
Среднее		5328	$0,17 \pm 0,08$	$99,64 \pm 0,13$	$0,19 \pm 0,10$

* 5-й пассаж.

рования. Используемый в нашей работе протокол культивирования МСК позволяет получить достаточное для клинического применения число хорошо охарактеризованных клеток уже на 3—4-м пассаже. При необходимости использования в терапевтических целях МСК более поздних сроков экс-

пансии следует осуществлять строгий контроль поверхностного фенотипа и генетической стабильности клеточных трансплантатов, что позволит в будущем избежать нежелательных отдаленных последствий клинического использования культур МСК.

Л и т е р а т у р а

1. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Лалыкина К.С. О фибробластоподобных клетках в культурах кроветворных тканей морских свинок. Цитология 1970;12:1147—55.
2. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. Тер арх 1980;9:67—71.
3. Владимирская Е.Б., Кошель И.В. Стромальные фибробласты нормального костного мозга у детей. Гематол трансфузиол 1990;1:3—5.
4. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К. Стромальные клетки костного мозга и кроветворное микроокружение. Арх патол 1982;10:3—11.
5. Owen M., Fridenstein A. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic progenitors. Ciba Found Symp 1988;136:42—60.
6. Owen M. Marrow stromal stem cells. J Cell Sci 1995;10:63—76.
7. Minguell J.J. Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med 2001;226(6):507—20.
8. Minguell J.J., Conget P. Mesenchymal progenitor cell: Biology and clinical utilization. Br J Med Biol Res 2000;33: 881—7.
9. Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 1997;276:71—4.
10. Castro-Malaspina H., Gay R., Resnick G. et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. Blood 1980;56:289—301.
11. Caplan A.I. The mesengenic process. Clin Plast Surg 1994;21:429—35.
12. Pittenger M., Mackay A., Beck S. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999;284:143—7.
13. Le Blanc K., Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. J Intern Med 2007;262:509—25.
14. Miura M., Miura Y., Hesed M. et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells to malignant transformation. Stem Cells 2005;65:1961—4.
15. Stenderup K., Justesen J., Clausen C. et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. Bone 2003;33:919—26.
16. Tai M.-H., Chang C.-C., Olson L.K. et al. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. Carcinogenesis 2004;10:1093.
17. Rubio D., Garcia-Castro L., Martin M.C. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res 2005;65:3035—9.
18. Kassem M., Burn J.S. Carcia-Castro J. et al. Adult stem cells and cancer. Cancer Res 2005;65:9601—7.
19. Фриденштейн А.Я., Дериглазова Ю.Ф., Кулагина Н.Н. Клонирование клеток-предшественников для фибробластов в монослойных культурах клеток. Бюлл экспер биол 1973;76:90—4.
20. Shaffer L.G., Tommerup N. International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Published in collaboration with Cytogenetics and Genome Research under the title ISCN. Karger 2005:130.
21. Delorme B., Ringe J., Gallay N. et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. Blood 2008;111:2631—5.
22. Назаренко С.А., Тимошевский В.А. Анализ частоты спонтанной анеуплоидии в соматических клетках человека с помощью технологии интерфазной цитогенетики. Генетика 2004;40(2):195—204.
23. Бочков Н.П., Никитина В.А. Цитогенетика стволовых клеток человека. Молекуляр мед 2008;3:40—7.

ВНИМАНИЕ: ПОДПИСКА!

Журнал «ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ»
рассылается читателям бесплатно.

Анкета для подписки представлена на сайте:
www.netoncology.ru

Чтобы получать журнал «ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ»,
нужно либо заполнить анкету на сайте,
либо передать ее в издательство
по факсу: 8 (499) 929 96 19,
e-mail: abv@abvpress.ru
или по почте: 109443, Москва, а/я 35.

Можно также оформить платную подписку через каталоги:
«Почта России», подписной индекс — 12313,
«Пресса России», подписной индекс — 42167.

