

SECURITATEA ONCOGENĂ ÎN CULTIVAREA CELULELOR STEM MESENCHIMALE

Elena Mocan, Olga Tagadiuc, Pavel Ciobanu, Boris Topor, Viorel Nacu
Laborator Inginerie tisulară și culturi celulare, USMF “Nicolae Testemițanu”

Summary

The oncogenetic security in mesenchymal stem cells cultivation

The article summarizes recent data concerning developing of the new strategy – genetic instability monitoring techniques in the cultures of human mesenchymal stem cells. Stem cells are characterized by their self-renewal ability and high differentiation potential. Described methods detect cell senescence in culture and evaluate changes associated with moderate telomere shortening and characterized by cell cycle arrest, mutations in genes responsible to apoptosis, and cancer-associated genes p53, p15, Rb, NF-κB, Myc and repair machinery.

Key words: stem cells, cells cultures, genetic instability

Actualitatea

Termenul de celule stem (CS) definește o populație de celule-precursori tisulare sau celule puțin diferențiate ce circulă în sânge, ce posedă capacitatea de autoregenerare și diferențiere în componenții celulari ai diferitor țesuturi. În ultimul timp apare tot mai multă informație despre utilizarea cu succes a transplantării CS în cazul tratamentului maladiilor maligne ale sîngelui, maladiilor neurodegenerative, autoimune [1, 14].

Celulele stem mezenchimale (CSM) (stem stromale) se consideră unul din cele mai de perspectivă tipuri de material autolog pentru terapia celulară și ingineria tisulară. Începutul extins al experimentelor clinice a metodelor terapeutice cu CSM se explică printr-un șir de caracteristici (Tab. 1).

Proprietățile generale ale CS mezenchimale mature
Capacitatea înaltă de proliferare
Abilitatea deosebită de adeziune
Structură similară cu a fibroblastelor
Formarea coloniilor în culturi
Polipotența genomului
Compatibilitatea imunologică completă
Posibilitatea de stocare a celulelor proprii până la îmbolnăvire.
Constituirea unei banci familiare de celule stem

O părere unică în privința expresiei markerilor nu există, nu sînt descriși și markerii unici ai CSM. Totuși majoritatea cercetătorilor descriu aceste celule ca SH-2, SH-3, SH-4, STRO-1, Sca-1, Thy-1, CD44, CD29, CD71, CD106, CD120a, CD124 – positive și CD34, CD45 – negative.

Posibilitățile aplicării metodelor terapeutice cu CS în scopurile medicinei regenerative pun probleme serioase ce țin de controlul calității și siguranței, în

primul rînd – oncogenice, obținute pe baza lor a culturilor celulare. Întrebarea ce ține de securitate oncogenă a celulelor stem mature, în general, și mezenchimale, în particular, rămîne nestudiată, dar foarte actuală, importantă și determinînd viitorul medicinei regenerative. Asupra potențialului risc cancerogen ale CS umane mature după transplantarea lor indică faptul, că ele expresează markerii comuni cu CS embrionale și multiple linii maligne.

Descoperirile revoluționare ale biologiei moleculare și celulare în genomică și proteomică permite de a aborda sistematic examinarea problemei ce ține de asigurarea calității culturilor celulare, obținute *in vitro*. La aceste descoperiri se poate atribui fenomenul apoptozei ca moartea genetic programată a celulelor, dependența potențialului proliferativ al celulelor de vîrsta lor (efectul lui Heiflic), lungimea telomerelor și activitatea telomerasei, stresul oxidativ cu acțiune deterioratoare a formelor active ale oxigenului asupra membranelor și moleculelor de ADN, genele șocului termic și controlul de către ele a sintezei proteinelor antistresoare, anticorpilor monoclonali utilizați la fenotiparea subpopulațiilor de limfocite distincte funcțional, pluripotența

CS, instabilitatea genomului cu mutații ale ADN-ului mitochondrial, metilarea ADN-ului și acetilarea histonilor [22].

Imunofenotiparea celulelor. Celulele CD133⁺ au fost descrise ca CS ale organismului matur în anul 1997. Ele se expresează pe celulele hematopoietice imature și celulele progenitoare și nu există pe celulele mature, diferențiate ale sîngelui. Ultimile date literare științifice descriu potențialul oncogen al celulelor CD133⁺. S-a constatat, că aceste celule au o capacitate înaltă de dividere și expansiune *in vitro*, ce a permis de a fi considerate drept una din cele mai timpurii populații stem în organismul matur al omului. Există o serie de lucrări, ce descriu fenomenul apariției din CD133⁺ a celulelor umane, ce confirmă teoria participării acestor celule în cancerogenează și relevă, că aceste celule sînt cele mai “tinere” în organismul uman și posedă caracter stem deosebit de exprimat [12].

În afară de CD133⁺, la rolul marker a fost propus antigenul de suprafață CD30⁺, care se referă la familia de receptori ai factorului necrozei tumorale și asigură protecția celulelor de declanșarea căilor apoptotice (deci, este responsabil de supraviețuirea lor). S-a demonstrat, că expresia acestui receptor este caracteristică numai celulelor transformate. Modificările în celulele cultivate prezentau în sine duplicarea părții brațului lung al cromozomului 1, trisomia cromozomului 12 etc. Expresia markerului CD30⁺ este posibil legată de procesele adaptive și constituie o reacție rapidă de răspuns la stres în defectele genetice [10].

Este cunoscut, că la cultivarea îndelungată celulele pot suferi modificări fenotipice și genotipice considerabile. Cauzele acestei instabilități rămîn pînă acum neclare. Astfel, evidențierea biomarkerilor (sau grupelor de markeri), ce caracterizează instabilitatea genetică a liniilor celulare ar simplifica considerabil analiza lor și ar permite de a modifica metodele de cultivare pentru o mai bună susținere a stabilității genomului celular.

Experimentele clinice cu aplicarea terapiei celulare se efectuează în diferite țări, și în prezent cea mai răspîndită metodă pentru depistarea instabilității genetice a celulelor rămîne cariotiparea.

Cariotiparea. Se disting modificări numerice și structurale ale cariotipului. La cele numerice se referă mărirea numărului de cromozomi sau pierderea cromozomilor. Celulele cu numărul modificat de cromozomi se numesc celule aneuploidie. Modificările de structură sînt prezentate de translocații (t) – translocarea unei secțiuni a cromozomului; deleții (del) – pierderea materialului cromozomial sau inversii (i) – răsucirea segmentului în limitele unei cromozom la 180° [18].

Analiza cariotipului CSM la studierea transformării spontane a celulelor stem umane mature în cazul cultivării îndelungate, prezentată de Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M. și coaut., a arătat trisomii, tetraploidii și/sau reconstrucții cromozomiale. Aceste modificări, inclusiv translocațiile între cromozomii 3 și 11, reconstrucțiile în interiorul cromozomului 5, trisomia cromozomului 8 și apariția izocromozomului 8, nu au fost întîmplătoare și succesive [23].

Tabelul 2

Principalele anomalii cromozomiale caracteristice celulelor cu potențial malign [18]

Anomaliile cariotipului	Frecvența (%)	Anomaliile cariotipului	Frecvența (%)
t (9; 22) (q34; q11)	18	del/t (11q23)	4
t (15; 17) (q22; q21)	12	del (7q)	4
t (4; 11) (q21; q23)	10	t (8; 14) (q24; q11)	2
del (6q)	9	i (7q)	2
i (16)	8	t (1; 3) (p36; q21)	1
t (1; 19) (q23; p13)	6	+20	1
t (8; 14) (q24; q32)	6	-20	1
+8	5	del (9) (p21-22)	1

O importanță deosebită are valoarea prognostică a analizei cromozomale în transplantarea culturii celulare pacienților. Este bine cunoscut faptul că, și populațiile de celule foarte maligne posedă cariotip normal sau fără modificări evidente, și ades celulele tumorale posedă modificări genetice ascunse, de regulă clonale [13, 18]. Cauza poate fi activitatea mitotică joasă, inserțiile mici (submicroscopice), ce determină vizualizarea la analiza microscopică doar a metafazelor normale. Astfel, concluzia despre calitatea culturii celulare cu cariotip normal poate fi făcută numai după analiza molecular-genetică.

Analiza molecular-genetică. Statistica epidemiologică a permis de a determina, că în medie pentru transformarea celulei normale în una tumorală sînt necesare de la 3 pînă la 7 evenimente spontane independente. Ca și toate celulele ce se divid intens în organism, celulele stem suferă 10^9 mutații spontane pe nucleotid, ce constituie aproximativ 10^{-5} greșeli pe genă în fiecare generație [15]. Timp de 24 ore în celula umană au loc de la 5000 pînă la 10000 depurinizări. În același timp, resturile citozinei și adeninei pot fi supuse dezaminării spontane, cu o frecvență de aproximativ 100 cazuri pe genom timp de 24 ore [20]. Se consideră, că sistemul de reparare completamente face față problemei de acumulare a greșelilor în regiunile codificatoare ale genelor. Dar în cazul leziunilor anumitor verigi sistemele de reparare a celulei devin vulnerabile la acțiunea unor agenți fizici și chimici. Dividerile limitate a așa celule-mutante și activitatea sistemului enzimelor de reparație permit susținerea practic nemodificată a particularităților culturii în general, cu excepția mutațiilor, ce contribuie la o supraviețuire mai bună și influențează dividerea celulară. Este necesar de evidențiat următorul aspect deosebit de important – în organism celulele mutante sînt eliminate de sistemul imun, pe cînd în culturile celulare acest mecanism este prezent.

Creșterea clonelor CS în cultură și apariția mutațiilor depinde de mulți factori, în primul rînd de condițiile de cultivare, componența mediului, alegerea factorilor de proliferare, care sunt și principalele cauze ale instabilității genetice a culturii celulare [16, 18].

Pentru analiza genomului celulelor, crescute în cultură, propunem utilizarea următoarelor modalități de abordare, fiecare din ele independent evidențiază modificările în ADN-ul celular, starea celulei și parțial poate servi ca marker al instabilității genetice a culturii.

O proprietate importantă a celulei neoplazice o constituie expresia oncogenelor și inactivarea supresorilor tumorali, ce duc la diminuarea abilității de a induce apoptoza, instabilitate genetică, blocarea diferențierii celulare, stimularea angiogenezei, dispariția îmbătrînirii replicative sau imortalitatea celulei.

Un anumit interes îl prezintă telomeraza – enzimă, care reconstruiește telomerul scurtat. Este demonstrat, că telomerii celulelor somatice se scurtează atît în procesul ontogenezei *in vivo*, atît și în timpul cultivării *in vitro*. Gena telomazei este situată pe brațul scurt al cromozomului 5, și modificarea expresiei acestei gene este legată de reconstrucțiile în interiorul cromozomului, ce au loc în timpul cultivării. Totodată, scurtarea telomerului constituie nu numai un indiciu al dividerilor celulare, dar și al proceselor mutaționale, deoarece telomerii scurți declanșează îmbătrînirea ca răspuns la stresul oxidativ și mutațiile nereparate. Deoarece reactivarea telomazei constituie caracteristica universală a celulelor tumorale (85%), **măsurarea nivelului activității telomazei** este important în determinarea apariției crizei, ce se caracterizează prin creșterea instabilității genetice a celulelor [23].

La momentul actual sînt identificate cîteva zeci de gene, inactivarea căror duce la apariția celulei cancerogene. Majoritatea din ele, reglînd ciclul celular, apoptoza sau reparația ADN-ului, previn acumularea mutațiilor în celule. La markerii molecular-genetici ai creșterii tumorale și progresiei urmează de atribuit mutațiile punctiforme în regiunile codificatoare și reglatoare ale genelor, amplificarea oncogenelor, pierderea anumitor alele și locusurilor genelor în urma deleției și reconstrucțiilor cromozomiale, modularea expresiei genelor la nivelul transcripției și translației.

Unele din cele mai interesante exemple de dereglare genetică servesc mutațiile punctiforme a următoarelor familii de gene:

- **Ras** – protooncogene – mutațiile se depistează în codonii 12, 13, 61 a genelor **K-ras**, **N-ras**, **H-ras**, corespunzător.

- **p53** – supresorul tumoral multifuncțional – mutațiile sînt prezentate în esență de misens-mutații, cu o frecvență mai mare în codonii 175, 245, 248, 249, 273, 282 (așa numitele *puncte fierbinți*). Încă o particularitate a mutațiilor p53 în celulele tumorale o constituie faptul, că ele spre deosebire de mutațiile altor supresori tumorali frecvent sînt heterozigote.

Rolul deosebit al modificărilor genetice, adică modificări în structura genelor, este indubitabil. În ultimii ani s-a acumulat material, ce ne vorbește despre aceea, că un rol nu mai puțin important în fenomenul instabilității genomului îl joacă modificările epigenetice, deci, modificări ce nu ating structura internă a genelor, dar determină dereglarea activității lor, care de asemenea induc modificări genetice. O trăsătură caracteristică a celulelor transformate *in vitro* o constituie dereglarea echilibrului metilării ADN-ului. Disechilibrul se manifestă prin hipermetilarea aberantă a zonelor promotore a genelor, implicate în procesul de oncogeneză și micșorarea nivelului metilării celeilalte părți a genomului. Metilarea ADN-ului reprezintă un biomarker prețios pentru diagnosticarea precoce a cancerogenezei. Un șir întreg de gene, implicate în cancerogeneză, se inactivează prin metilare – **p14**, **p15**, **p16**, **p53**, **p56**, **NF-kB**, **Rb**, **c-myc**, **Arf**, **Wnt7** etc. Determinarea nivelului expresiei menționate anterior constituie un marker suplimentar al aprecierii stării celulei. Astfel, este evidentă importanța corelațiilor dintre modificările genetice și epigenetice în celule, transformate în timpul cultivării.

Îmbătrînirea celulei este legată de scurtarea telomerului, datorită pierderii activității telomerasei, și stoparea ciclului celular. Pe parcursul cultivării celulelor, într-un moment anumit inevitabil apare „criza” (stoparea) ciclului celular (faza M1). Recent în celulele umane a fost depistat fenomenul ocolirii spontane a „crizei” stopării ciclului celular și scurtarea cromozomului. Mecanismele „ocolirii” acestui proces inevitabil determină dobîndirea imortalității (pe fondalul telomerilor scurtați), apariția aberațiilor cromozomiale și cancerogenezei. În final, acumularea mutațiilor cromozomiale inevitabil induce apoptoza (faza M2). Logic ar fi fost de presupus existența unui atare fenomen și în CS mature, capabile să se dividă de cca 20-30 ori și să existe în cultură pînă la un an. Particularitatea imortalității direct este legată de lungimea telomerului și caracteristică pentru CS embrionare și cancerogene. Activitatea telomerasei în CSM umane, în opinia unui șir de autori, este nedectabilă [10]. A fost arătat, că în timpul expansiei CSM umane *in vitro*, se observă scurtarea telomerului, ce posibil este legat de ocolirea fazei M1.

Figura 2 reflectă comportarea celulelor și relația reciprocă între îmbătrînirea celulară, apoptoză și cancer.

Este necesar de menționat, că există dovezi, că CS, obținute de la donatorii maturi sunt cu mult mai sensibile față de transformările genetice, legate de vîrsta donatorului. Sunt demonstrate corelații directe între vîrsta donatorului și calitatea culturii celulare obținute. Astfel, este necesar de a efectua evaluarea nu numai a celulelor cultivate ale donatorului, dar și a ADN-lui din sîngele lui, pentru a stabili prezența mutațiilor în celulele organismului. Lipsa modificărilor în sîngele periferic va releva caracterul *de novo* al mutației.

O direcție de perspectivă este stabilirea markerilor specifici a CSM, care va permite separarea populației curate de celule fără cultivarea prealabilă. Astfel, se vor crea premisele evitării riscului oncotransformării celulelor datorită eliminării etapei de cultiver.

Actualmente are loc acumularea intensă a cunoștințelor teoretice și practice pentru utilizarea CS în diferite domenii ale medicinei. În centrele medicale mari ale universităților de prestigiu din lume s-au început aplicarea clinică a CS pentru tratarea diferitor maladii (infarctului miocardic, bolii Parkinson), care conform aprecierii specialiștilor FDA, va fi deosebit de intensă în medicina regenerativă nu mai devreme de anul 2010.

Relația reciprocă între îmbătrânirea celulară, apoptoză și cancer în stresul oxidativ [16].

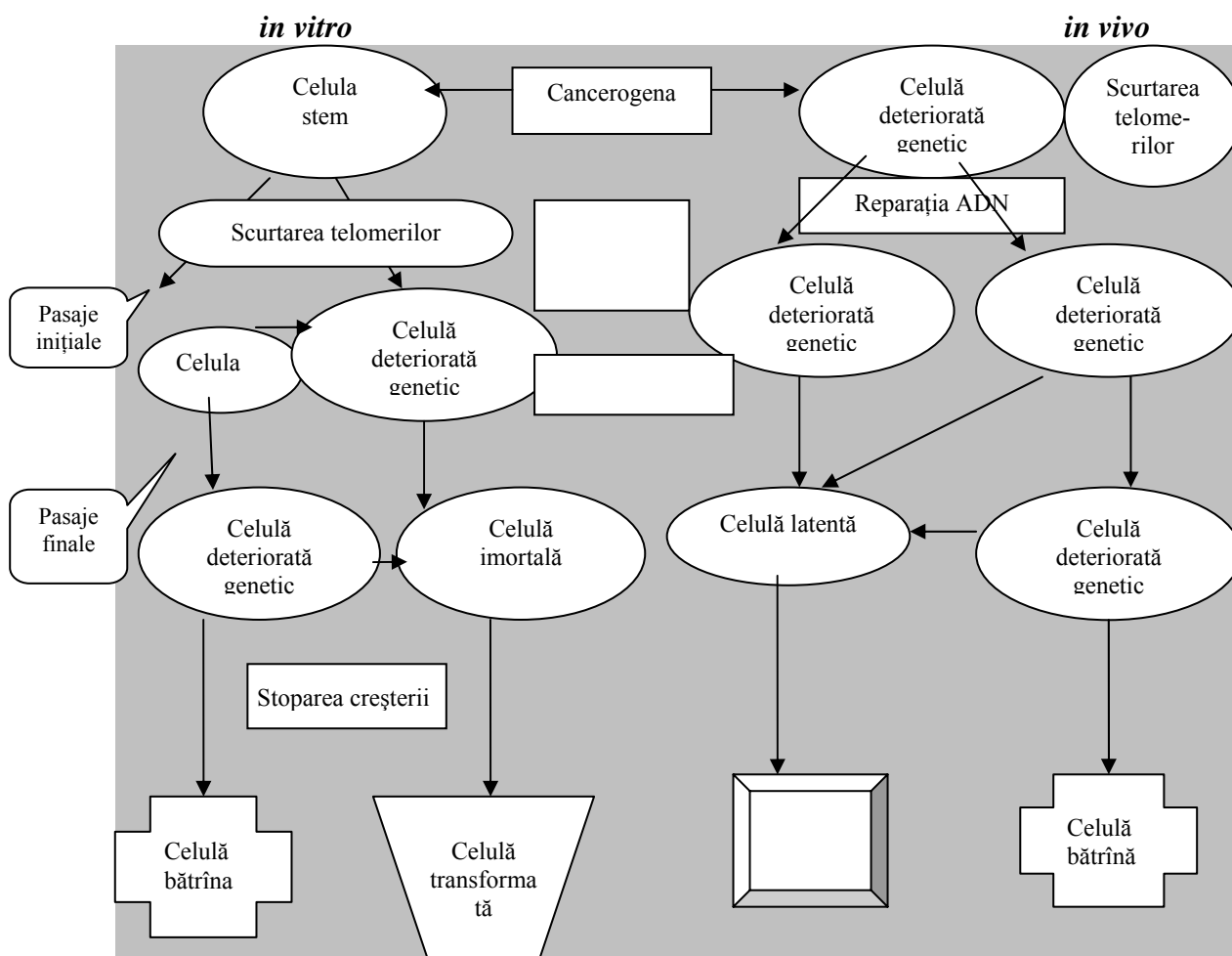


Figura 2

Concluzii

Problema corespunderii îmbătrânirii celulare *in vitro* este principial importantă, întrucât se presupune, că îmbătrânirea replicativă (celulară) însăși duce la sporirea sensibilității față de cancerogeneză. Liniile CS, susținute *in vitro*, sînt expuse modificărilor genetice și epigenetice și, în consecință, trebuie atît monitorizate minuțioase în timpul cultivării, cît și supuse unei analize detaliate în timpul utilizării *in vivo* în scopuri terapeutice.

Datele obținute impun necesitatea studierii potențialului cancerigen al culturilor celulare înaintea aplicării clinice a protocoalelor terapiei celulare. Următoarele metode sunt imperative:

1. **Cariotiparea citogenetică** a celulelor pentru studierea ploidiei, prezența aberațiilor cromozomiale.
2. **Analiza-molecular genetică.**
 - Determinarea lungimii telomerului și a activității telomerazei.
 - Determinarea nivelului de metilare a oncogenelor *c-myc*, genei *wnt-7*, *p16*, *p56*, genelor factorului de creștere *IGF2*.
 - Determinarea polimorfizmului și mutațiilor la oncogenele enumerate mai sus, supresori și protooncogene.
3. **Descrierea imunofenotipică a celulelor** – determinarea CD133⁺⁺, CD30⁺ a celulelor.

Bibliografie

1. Ababii I., Ciobanu P., Eșanu N., Topor B., Nacu V. Actualități și perspective în transplantarea celulară. Curierul Medical, nr.3 (285), 2005, p.42 – 47.

2. **Alvarez_Dolado, M., Pardal, R., Garcia Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J., and Alvarez_Buylla, A.** *Nature*, 2003, 425(6961): 968–973.
3. **Hauss R., Lange C., Weissinger E. M., Kolb H.J. et al.** Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34 (-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells*, 2000; 18: 252-260
4. **Nacu V., Topor B., Borovic E. și al.** Referitor la celulele mezenchimale stem., *Analele Științifice USMF “Nicolae Testemițanu”*, 2003, v. I: 74-79.
5. **Nygren, J.M., Jovinge, S., Breitbach, M., Sawen, P., Roll, W., Hescheler, J., Taneera, J., Fleischmann, B.K., and Jacobsen, S.E.W.** *Nat. Med.*, 2004, **10(5)**: 494–501.
6. **Patel A., Groopman J.D., Umar A.** DNA methylation as a Cancer-Specific Biomarker. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2003, 983: 286-297.
7. **Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., et. al.** Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 1999, 284: 143-147.
8. **Prockop D. J.** Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue. *Science*, 1997, 276 (4): 71.
9. **Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M., etc.** Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Res* 2005; 65:(8): 3035 – 3039.
10. **Анисимов В.Н.** Молекулярные и физиологические механизмы старения. „Наука”, 2003, стр.468.
11. **Геномные изменения эмбриональных стволовых клеток человека при длительном культивировании.** *Клеточная трансплантология и инженерия*, 2005; 2: 16-17.
12. **Заридзе Д.Г.** (ред.) *Канцерогенез. „Медицина”*, 2003, стр.575 .
13. **Макеев О.Г., Буханцев В.А. и другие.** Исследование генетической нестабильности в краткосрочных культурах аутологичных фибробластов. *Материалы „Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантации”*. 2007, стр. 81-82
14. **Онищенко Н.А.** Патологическая физиология и эксперим терапия. 2004, 4, 2–11.
15. Онкогенный потенциал CD 133⁺. *Клеточная трансплантология и инженерия*. 2005, 1, стр. 9-11.
16. **Романов Ю.А.,** Стволовые клетки в современной медицине: настоящее и будущее. *Материалы Конференции „Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и технологии”*. 2006, стр. 89 – 92.
17. **Семенков В. Ф., Ковальчук Л. В.** Биологические механизмы старения иммунной системы и современные подходы к их коррекции. *Успехи современной биологии*, 2005, том 125, 5, стр. 446 – 465.
18. **Сингер М., Берг П.** Гены и геномы. „Мир”, 1998, т. 1, стр. 370.
19. **Ткемаладзе Дж. В., Чичинадзе К. Н.** *Биохимия*, 2005, том 70, вып. 11, стр. 1566 – 1584.
20. **Тодоров И., Тодоров Г.** Стресс и старение и их биохимическая коррекция. „Наука”, 2003, стр. 480.
21. **Хейфлик Л.** *Биохимия*, 1997, 62(11), стр. 1380–1393.
22. **Чертков И.Л., Дризе Н.И.** *Терапевтический архив*, 2004, 7, 5–11.
23. **Эллиот В., Эллиот Д.** *Биохимия и молекулярная биология*. „Наука”, 2002, стр. 444.