

УДК 616-006-02:616-003.6:576.385.5

НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ САРКОМ, ИНДУЦИРУЕМЫХ ИНОРОДНЫМ ТЕЛОМ

© 2015 г. О. В. Морозова, А. Ф. Карамышева, Т. Г. Мойжесс

НИИ канцерогенеза, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, РАМН

115478 Москва, Каширское шоссе, 24

E-mail: 7012002@inbox.ru

Поступила в редакцию 21.06.2013 г.

Окончательный вариант получен 13.03.2014 г.

Одним из вопросов, важных для понимания механизмов канцерогенеза, индуцируемого инородными телами, или “пластмассового” канцерогенеза, представляется вопрос о нормальных клетках-предшественниках сарком (ИТ-сарком), возникающих в непосредственной близости от имплантированной под кожу экспериментального животного пластмассовой пластинки. В литературе существует предположение о происхождении клеток-предшественников ИТ-сарком из клеток эндотелия сосудов, питающих соединительнотканную капсулу, образующуюся вокруг инородного тела. В нашей работе исследовалась экспрессия мРНК одного из маркеров клеток эндотелия – рецептора *VEGFR2/Flk1* и взаимодействующего с ним фактора роста *VEGF-A* в предопухолевых клетках ИТ-сарком мыши. В исследуемых клетках обнаружена экспрессия мРНК *VEGF-A*, тогда как экспрессия мРНК *VEGFR2/Flk1* в них отсутствовала. В свете этих и ранее установленных свойств клеток-предшественников ИТ-сарком обсуждаются возможности происхождения этих сарком из эндотелиальных клеток, перицитов и из полипотентных мезенхимальных стволовых клеток.

Ключевые слова: саркомы, индуцированные инородным телом; культуры предопухолевых клеток, экспрессия генов; *VEGF-A*; *VEGFR2/Flk1*

DOI: 10.7868/S0475145015020056

ВВЕДЕНИЕ

Одним из вопросов, важных для понимания механизмов канцерогенеза, индуцируемого инородными телами, или “пластмассового” канцерогенеза, является вопрос о нормальных клетках-предшественниках сарком, возникающих в непосредственной близости от имплантированной под кожу экспериментального животного (крысы, мыши) пластмассовой пластинки (ИТ-саркомы). Главными подозреваемыми на роль предшественников этих опухолей представлялись фибробласты, из которых в основном состоит соединительнотканная капсула, образующаяся вокруг имплантата в течение месяца после его введения и существующая вплоть до образования опухоли. Действительно, при изучении гистологического типа ИТ-сарком различными авторами наряду со значительной долей малодифференцированных опухолей чаще всего назывались фибросаркомы, хотя встречались остео-, липо-, мезенхимомы и, редко, другие типы (см. обзор Мойжесс, 1981).

Однако, Джонсон и др. (Johnson et al., 1973) при изучении с помощью электронной микроскопии морфологических характеристик клеток

ИТ-сарком обнаружили, с одной стороны, в нескольких из 20 исследованных сарком участки с признаками различной (миксо-, остео-, лейомио-, фибро-) дифференцировки и одну гемангиосаркому, а с другой – общие черты, характерные для эндотелия, перицитов и гладкомышечных клеток (аккумуляция в цитоплазме микрофиламентов диаметром 60 Å; наличие характерной агрегированной межклеточной структуры типа базальной мембраны; бедность коллагеновой продукции). На основании этих данных авторы пришли к заключению, что фибробласты не являются клетками-предшественниками этих опухолей и, учитывая гистологическое разнообразие возникающих ИТ-сарком, высказали предположение о существовании общих для них клеток-предшественников, обладающих “мезенхимальной плюрипотентностью” (полипотентностью по другой терминологии). На роль наиболее вероятных клеток-предшественников были предложены перициты.

В последующей работе (Johnson et al., 1980) авторы, изучая ультраструктуру клеточных типов культивируемых предопухолевых клеток с по-

верхности имплантированных пластинок и из окружающих их соединительнотканых капсул, также обнаружили их сходство с характеристиками эндотелиальных клеток и подтвердили свою гипотезу о происхождении ИТ-сарком из клеток, являющихся производными “примитивных клеток, ассоциированных с локальной микроваскулатурой”.

Сходный взгляд на возможность происхождения эндотелия из полипотентных мезенхимальных клеток был распространен достаточно широко (Пожарисский и др., 1990). Этот взгляд нашел подтверждение в ряде недавних работ, в которых были обнаружены субпопуляции полипотентных стволовых клеток различной локализации, в том числе из местной адипозной ткани, способные в зависимости от условий культивирования дифференцироваться в разные клеточные типы, включая эндотелиальные клетки (Fischer et al., 2009; Janeczek Portalska et al., 2012; Culmes et al., 2013; Mihaila et al., 2013).

Ранее было показано (Brand et al., 1971; Мойжесс, Пригожина, 1973), что среди клеток монослоя на поверхности имплантированной пластинки через 6 и более месяцев после имплантации присутствуют клетки-предшественники ИТ-сарком, поскольку при пересадке таких пластинок сингенному реципиенту еще через 1–9 мес. у них возникают опухоли из клеток донора.

При культивировании клеток такого монослоя без признаков роста опухоли через 9 и 14 мес. с момента имплантации среди подавляющего большинства клеток макрофагального типа было выявлено присутствие клеток с мезенхимальной морфологией. Такие клетки обладали как рядом свойств, характерных для эндотелиальных клеток (способность к образованию монослоя типа *cobblestone* (булыжная мостовая) и капиллярноподобных структур при посеве на матригель) (Мойжесс, 2010; Мойжесс, Васильев, 2013), так и свойствами, отличающими их от клеток нормального эндотелия (экспрессия α -SMA, характерная для гладкомышечных клеток и перицитов) (Мойжесс, Александра, 2000).

Поскольку обитающие на поверхности пластинок клетки-предшественники ИТ-сарком проявляли некоторые признаки, характерные для культивируемого эндотелия, представляло интерес дальнейшее изучение в этих клетках экспрессии маркерных генов клеток эндотелия.

Известно, что для клеток эндотелия характерна экспрессия рецепторов факторов роста эндотелия сосудов – VEGFR. Рецепторы VEGFR локализованы преимущественно на клетках эндотелия сосудов, и их экспрессия высоко специфична для этого типа клеток. Основным рецептором, через который передаются сигналы, регулирующие размножение и миграцию клеток эндотелия, считается VEGFR2 (гомолог рецептора VEGFR2 у

мышы – Flk1) (Ferrara et al., 2003; Matthews et al., 1991). В эмбриогенезе экспрессия этого рецептора является одним из наиболее ранних дифференцировочных признаков клеток эндотелия: VEGFR2 экспрессируется в гемангиобластах – клетках-предшественниках, являющихся общими для клеток эндотелия и стволовых клеток гемопоэза (Yamaguchi et al., 1993). В результате дальнейшей дифференцировки гемангиобластов в присутствии фактора роста VEGF-A образуются клетки эндотелия, в которых сохраняется экспрессия VEGFR2, а при отсутствии VEGF-A – стволовые клетки гемопоэза, в которых экспрессия рецептора VEGFR2 подавляется (Shalaby et al., 1995). В настоящее время экспрессия VEGFR2/Flk1 признана в качестве одного из основных маркеров клеток эндотелия (Smadja et al., 2007; Feng et al., 2011; Azhdari et al., 2013; Shojaei et al., 2013; Zhang et al., 2013).

Основной сигнальной молекулой, взаимодействующей с VEGFR2, является фактор роста эндотелия сосудов VEGF-A. Этот фактор экспрессируется клетками эпителия и мезенхимы, в том числе перицитами и гладкомышечными клетками. Эндотелиальные клетки также секретируют VEGF-A, хотя и в незначительных количествах (Maharaj et al., 2006; Moonen et al. 2010; Talavera-Adame et al., 2011). Предполагается, что невысокий уровень экспрессии этого фактора роста клетками эндотелия необходим для поддержания их выживаемости.

Целью данной работы было выяснить, экспрессируют ли клетки-предшественники ИТ-сарком мРНК рецептора *VEGFR2/Flk1* и взаимодействующего с ним фактора роста *VEGF-A*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Пластины из поливинилхлорида (пвх) размером 22 × 15 мм имплантировали под эфирным наркозом трехмесячным мышам СВА, самцам, по 1 пластинке под кожу каждого бока. Через 9 и 14 мес. пластины извлекали; с каждой пластинки отдельно производили смыв клеток монослоя, покрывающего пластинку, в среду RPMI-1640 (ПанЭко, Москва) с 10% FCS (Standart Quality, PAA, Austria); (с гентамицином). Клетки выращивали на чашках Петри диаметром 10 см фирмы Corning Inc. USA. Спустя 10 суток клетки пассировали. Было получено несколько культур клеток с разных пластинок; 2 культуры- Ipl (после 9 мес. *in vivo*) и 1542 (14 мес. *in vivo*) – были клонированы. Полученные клетки выращивали в 2D (на пластике) и 3D (на матригеле) культуральных системах. Матригель (BD Biosciences) после разморозки разливали по 250 мкл в лунки 24-луночного планшета. Клетки рассеивали по 1×10^5 на лунку.

Иммуногистохимическая окраска клеток. Для окрашивания клеток на α -SMA использовали

anti- α -SMA моноклональные антитела IgG2a мыши (Skalli et al., 1986). Клетки фиксировали метанолом 10 мин при -20°C , затем постепенно меняли метанол на фосфатный буфер. **1-е антитела:** моноклональные мышечные антитела против α -SMA в разведении 1 : 100 наносили на препарат на 45 мин при комнатной температуре или на ночь при $+4$ – 6°C во влажной камере. Промывали фосфатным буфером 4 раза по 5 мин **2-е антитела:** кроличьи анти-мышь конъюгированные с Alexa 647 (Jadson Immuno Research) наносили на 1 час при комнатной температуре во влажной камере. Промывали фосфатным буфером. Закрывали в эльванол. После полимеризации последнего (ночь в 4 – 6°C) просматривали и фотографировали на микроскопе Axioplan (“Zeiss”, Germany) с камерой Olympus DP70, с объективами $\times 20$, $\times 40$.

Выделение РНК. Для выделения тотальной РНК из клеток и из ткани почек мышей-самцов линии СВА, использовавшихся в качестве положительного контроля, использовали реагент Trizol (“Sigma”, USA), выделение РНК проводили в соответствии со стандартным протоколом фирмы “Sigma”. Суспензию клеток гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с добавлением реагента Trizol из расчета 1 мл приблизительно на 1 – 1.5×10^6 клеток. Кусочки ткани замораживали при температуре жидкого азота, растирали в ступке и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с добавлением реагента Trizol из расчета 1 мл на 100–150 мкг ткани. К полученному лизату добавляли 200 мкл хлороформа на 1 мл Trizol, тщательно перемешивали, оставляли при комнатной температуре на 5 минут и центрифугировали (15 мин при 12000 g, 4°C). После центрифугирования отбирали супернатант и добавляли к нему 500 мкл изопропанола (“Sigma”, USA). Пробирки несколько раз аккуратно переворачивали и оставляли при комнатной температуре на 15 мин, после этого центрифугировали (10 мин при 12000 g, 4°C). Осадок промывали 75% этанолом и растворяли в стерильной воде (“Микроген”, Россия). Качество полученной РНК определяли по характеру полос рибосомальной РНК путем электрофореза в 1% агарозном геле. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 260 нм (Spectrophotometer ND 1000 “Thermo-Fisher Scientific, Inc.”). Образцы РНК хранили при -20°C .

Реакция обратной транскрипции. Реакционная смесь для синтеза кДНК содержала 4 мкг тотальной клеточной РНК, 4 мкл “случайных” праймеров (гексануклеотидов) (фирма “Литех”, Россия), 2 мМ смесь dNTP (“МБИ Fermentas”, Литва), 2–4 ед. ингибитора РНКаз (“МБИ Fermentas”, Литва), 100 ед. обратной транскриптазы M-MuLV (“МБИ Fermentas”, Литва). Объем смеси составлял 25 мкл. Синтез кДНК с матрицы РНК проводили на амплификаторе “Терцик” (“ДНК-технология”, Рос-

сия) при 42°C , 50 мин. Реакцию останавливали при помощи нагревания до 70°C в течение 10 мин.

Полимеразная цепная реакция. Реакционная смесь для наработки продуктов ПЦР содержала 1 мкл раствора кДНК; 20 пкмоль каждого из праймеров; 2 мМ смеси dNTP (“МБИ Fermentas”, Литва); 2.5 мкл 10-кратного буфера с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (“МБИ Fermentas”, Литва), 25 мМ MgCl_2 ; 1 ед. Taq-ДНК полимеразы (“МБИ Fermentas”, Литва) и H_2O до конечного объема 25 мкл; минерального масла – 30 мкл. Для амплификации кДНК отдельных генов были использованы следующие праймеры: VEGF-A forward TGCCGATCAAACCTCACAA, VEGF-A reverse CCTCCGGACCCAAAGTGCT; $T_m = 64^{\circ}\text{C}$; 28 циклов; Flk1 forward GTCCGA ATCCCTGTGAAGTATCTC, Flk1 reverse CTCTTCTAGCTGCCAGTACCACT; $T_m = 55^{\circ}\text{C}$; 27 циклов. В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию GAPDH: GAPDH forward GCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTGG, GAPDH reverse GCCTGCTTACCACCTTCTTGATGTC; $T_m = 63^{\circ}\text{C}$; 22 цикла. Реакцию амплификации проводили на амплификаторе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия) по следующей схеме: денатурация – 95°C , 50 с; отжиг праймеров – T_m , 50 с; синтез – 72°C , 50 с.

Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением 0.5 мкг/мл бромистого этидия. Размеры фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК. Гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры “Samsung CCTV LENZ”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все использованные в настоящей работе клетки (см. Материалы и методы) обладали опухолевым потенциалом, но в разной степени. Культуры 1542 и 1014 (14 мес. *in vivo*) при прививке мышам в виде суспензии 600 тыс. клеток спустя 1 мес. привели к образованию сарком. В случае культур Ipl и СВАII (9 мес. *in vivo*) прививка суспензией клеток под кожу мышам за время наблюдения до 15 мес. опухолей не дала; эти же клетки, привитые под кожу мышам в виде монослоя на имплантированной пластинке, через 3–8 мес. развивали опухоли. Таким образом, исследуемые нами клетки являлись предшественниками ИТ-сарком.

Мы исследовали экспрессию мРНК VEGF-A и VEGFR2/Flk1 методом полуколичественного ОТ-ПЦР в 4 видах клеток с поверхности разных пластинок: клетки 2n (клон культуры 1542), 1014, F10 (клон культуры Ipl) и СВАII. Все эти клетки были способны к образованию капилляроподобных структур на матригеле (рис. 1a–1г) и монослоя типа cobblestone (рис. 2a–2г) на пластике, т.е.

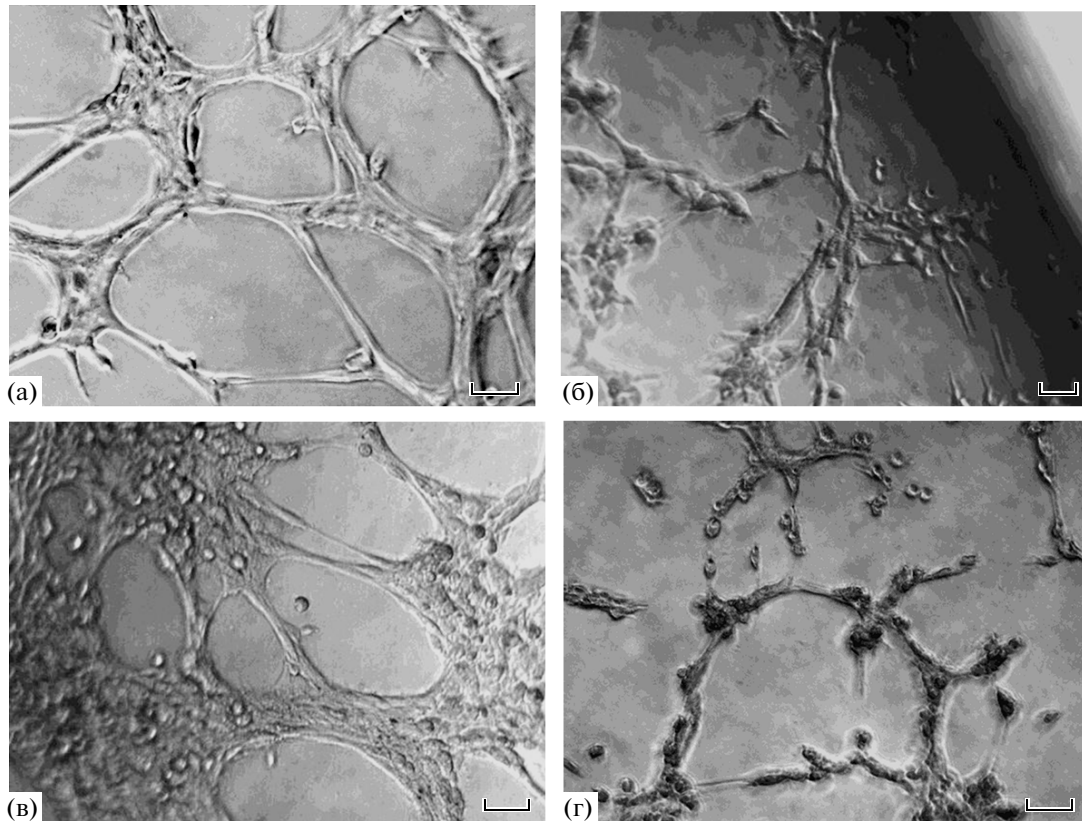


Рис. 1. Капилляроподобные структуры на поверхности матригеля, образованные культурами предопухолевых клеток. Фазовый контраст. Культуры предопухолевых клеток, населявших поверхность имплантированных пластинок: (а) – клетки 2n; (б) – клетки 1014; (в) – клетки CVAII; (г) – клетки F10. Масштабная линейка 50 мкм.

проявляли некоторые свойства эндотелия, и в то же время окрашивались на α -SMA (рис. 3а–3г).

При исследовании экспрессии мРНК оказалось, что все протестированные клетки активно экспрессировали мРНК *VEGF-A* (рис. 4). При этом не было обнаружено каких-либо различий в уровнях экспрессии мРНК *VEGF-A* между клетками, различающимися по степени злокачественности. Экспрессии мРНК *VEGFR2/Flk1* выявлено не было (рис. 4). Такой профиль экспрессии не соответствует клеткам эндотелия и скорее характерен для перицитов и макрофагов.

Макрофаги и перициты при определенных условиях способны к образованию капилляроподобных структур. Однако, макрофаги не являются предшественниками ИТ-сарком, так как ранее в опытах по индукции ИТ-сарком у радиационных химер (Barnes et al., 1971; Мойжесс, Пригожина, 1972) было показано, что эти опухоли образуются из местных клеток, а не из клеток костного мозга, потомками которых являются макрофаги.

Способность перицитов к образованию капилляроподобных структур на матригеле в условиях гипоксии продемонстрирована в работе Ченя и др. (Chen et al., 2012). Перициты могут про-

являть себя и как полипотентные стволовые клетки: Фен и др. (Feng et al., 2011) показали, что в ответ на повреждение ткани и при росте зуба некоторые перициты превращаются в мезенхимальные клетки, способные дифференцироваться в специализированные одонтобласты. И хотя значительная часть одонтобластов оказалась неперичитарного происхождения, авторы высказывают мнение, что перициты могут быть дополнительным источником мезенхимальных стволовых клеток. С этим мнением хорошо согласуются результаты работы Дара и др. (Dag et al., 2012), в которой полученные из человеческих плюрипотентных стволовых клеток перициты при имплантации вместе с матригелем иммунодефицитным мышам при соответствующих индукционных экспериментальных условиях проявляли способность образовывать различные мезенхимальные ткани: костную, жировую, хрящевую и мышечную, то есть проявили свойства мезенхимальных стволовых клеток.

То обстоятельство, что полученные нами предшественники ИТ-сарком имеют некоторые черты перицитов (профиль экспрессии генов *VEGFR2/Flk1* и *VEGF-A*, экспрессия α -SMA, спо-

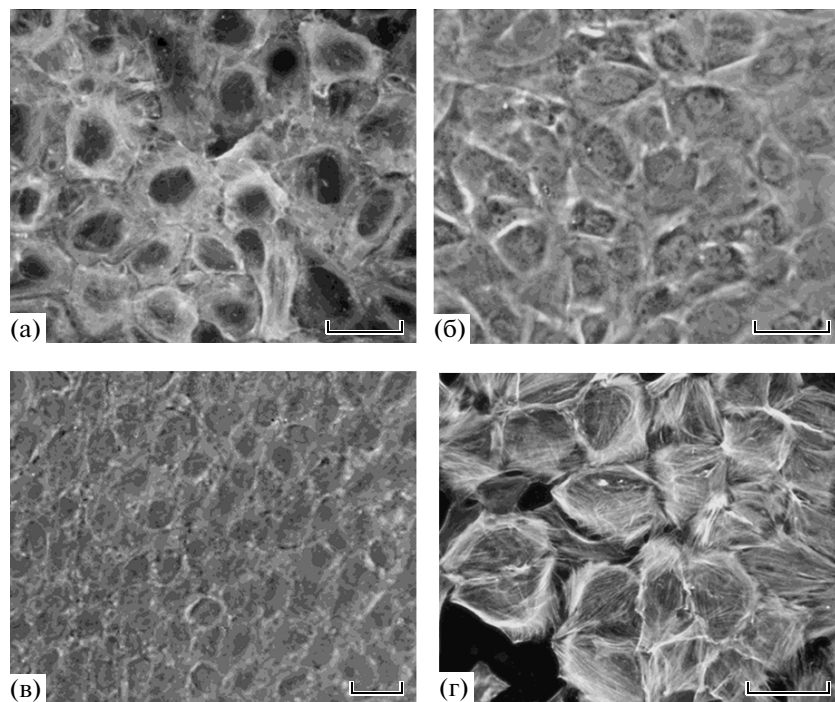


Рис. 2. Монослой, эпителиоподобный типа “cobblestone”, образованный на пластике культурами предопухолевых клеток: (а, г) – иммунофлуоресцентная окраска антителами к α -SMA; (б, в) – фазовый контраст. Культуры предопухолевых клеток, населявших поверхность имплантированных пластинок: (а) – клетки 2n; (б) – клетки 1014; (в) – клетки СВАII; (г) – клетки F10. Масштабная линейка 50 мкм.

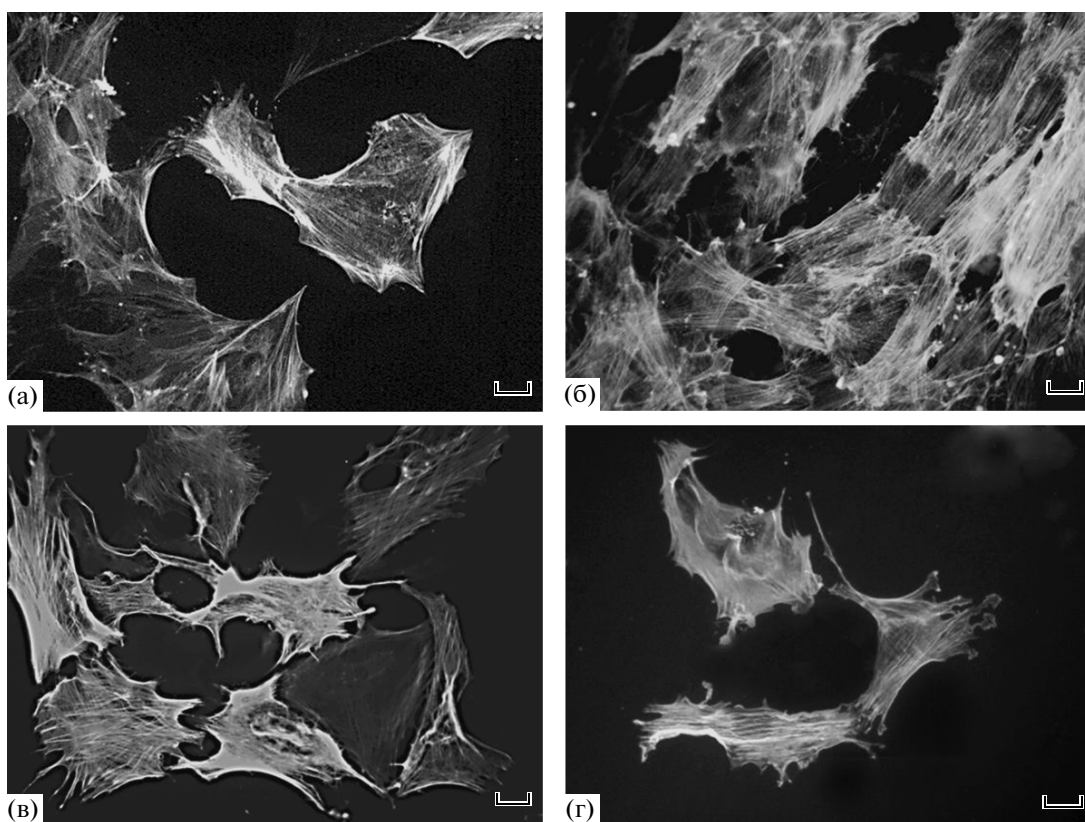


Рис. 3. Иммунофлуоресцентная окраска антителами к α -SMA. Культуры предопухолевых клеток, населявших поверхность имплантированных пластинок: (а) – клетки 2n; (б) – клетки 1014; (в) – клетки СВАII; (г) – клетки F10. Масштабная линейка 20 мкм.

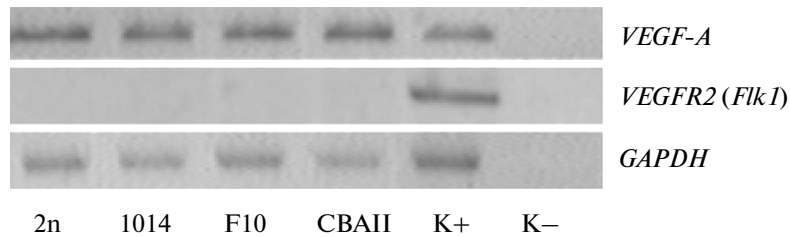


Рис. 4. Экспрессия мРНК фактора роста *VEGF-A* и рецептора *VEGFR2 (Flk1)* в полученных с разных пластинок предопухолевых клетках (2n, 1014, F10 и CBAII) ИТ-сарком. К+, К– — положительный и отрицательный контроли.

способность образовывать капилляроподобные структуры), а также свойство полипотентности, проявляющееся в разнообразии морфологических типов возникающих из них опухолей (Jonhson et al., 1973, 1980), позволяет допустить возможность того, что именно эти клетки являются предшественниками ИТ-сарком.

Полученный нами результат — отсутствие экспрессии мРНК одного из основных маркеров клеток эндотелия *VEGFR2/Flk1* в клетках, проявляющих признаки эндотелиальных клеток — мог бы объясняться также эндотелио-мезенхимальным переходом (EndMT). Известно, что при действии на эндотелиальные клетки TGF- β наблюдается их трансдифференцировка, вследствие которой возникает экспрессия α -SMA (Arciniegas et al., 1992; Frid et al., 2002), а также происходит утрата специфических маркеров эндотелия (фактора Виллебранда и VE-кадхерина) (Deissler et al., 2006). Можно было бы допустить, что и специфический для эндотелия рецептор *VEGFR2/Flk1* также мог быть утрачен в результате такого перехода. Однако, в работе Моонена и др. (Moonen et al., 2010) клетки эндотелия, подвергшиеся EndMT, существенно снизили уровни экспрессии ряда эндотелиальных маркеров и приобрели характеристики мезенхимальных клеток (в частности, экспрессию α -SMA и калпонины), но уровень экспрессии *VEGFR2* снизился незначительно, что указывает на то, что экспрессия этого рецептора в клетках эндотелия весьма консервативна.

Еще одно предположение, а именно, что *VEGFR2/Flk1*, изначально присутствовавший на клетках-предшественниках ИТ-сарком, был утрачен в процессе опухолевой трансформации не согласуется с данными работы (Kakiuchi-Kiyota et al., 2013). В этой работе при исследовании большого количества гемангиосарком (и ряда гемангиом) различной этиологии — вызванных у мышей различными генотоксичными и не генотоксичными веществами, а также спонтанных, было показано, что все они экспрессировали этот рецептор. Эти опухоли экспрессировали также маркер эндотелиальных клеток CD31, но не имели фактора Виллебранда. Последний является поздним маркером дифференцировки эндотелиальных клеток; поэтому авторы делают вывод, что

опухоли происходят из не до конца дифференцированных предшественников эндотелиальных клеток. Эти данные интересно сопоставить с результатами работы Морозовой и др. (Морозова и др., 2013), в которой гемангиоэндотелиомы (ГЭ), возникающие в капсуле почки у самцов мышей СВА под действием канцерогена 1,2-диметилгидразина, также при наличии экспрессии *VEGF-A* были лишены экспрессии *VEGFR2/Flk1*. Учитывая тот факт, что в норме капсулы почки лишены сосудов, а также наблюдающуюся атипичию эндотелия ГЭ, авторы сделали вывод о том, что эти опухоли происходят не из дифференцированных эндотелиальных клеток.

Учитывая приведенные выше литературные данные и на основе полученных нами результатов можно высказать предположение, что ИТ-саркомы возникают из мезенхимальных стволовых клеток, которые *in vivo* в процессе ИТ-канцерогенеза принимают промежуточные клеточные состояния и способны проявлять те или иные черты различных клеточных типов, а именно — черты эндотелиальных клеток и перицитов/гладкомышечных клеток.

Вопрос, какая из обсуждавшихся выше или других возможностей действительно реализуется, требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 11-04-01473а и 14-04-01228а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мойжесс Т.Г.* О генезе экспериментальных сарком // Сборник научных трудов VIII Всероссийская конференция по патологии клетки. М.: МДВ, 2010. С. 154–155.
- Мойжесс Т.Г.* Канцерогенез, индуцируемый инородными телами // Явления индукции и дифференцировки при опухолевом росте. М.: Наука, 1981. С. 70–105.
- Мойжесс Т.Г., Александрова А.Ю.* Попытка идентификации клеток-предшественников сарком при канцерогенезе, индуцированном инородным телом, с помощью моноклональных антител // Сборник научных трудов Второго Российского конгресса по патофизиологии. Москва, 2000. С. 263.
- Мойжесс Т.Г., Васильев Ю.М.* Клетки эндотелиального ряда как возможный предшественник сарком, ин-

- дуцированных имплантированным инородным телом // Цитология. 2013. Т. 55. № 8. С. 548–551.
- Мойжесс Т.Г., Пригожина Е.Л.* О гистогенезе пластмассовых сарком у радиационных химер // Цитология. 1972. Т. 14. С. 659–661.
- Мойжесс Т.Г., Пригожина Е.Л.* Локализация предопухольных элементов при пластмассовом канцерогенезе // Бюлл. экспер. биол. и мед. 1973. № 9. С. 92–94.
- Морозова О.В., Карамышева А.Ф., Шавочкина Д.А.* Экспрессия VEGFA в процессе индукции 1,2-диметилгидразином злокачественной гемангиоэндотелиомы почечной капсулы у мышей // Вопросы онкологии. 2013. Т. 59. № 6. С. 766–770.
- Пожарисский К.М., Кыштообаева А.Ш., Климашевский В.Ф. и др.* Морфогенез и гистогенез экспериментальной злокачественной гемангиоэндотелиомы // Вопросы онкологии. 1990. Т. 36. № 4. С. 440–447.
- Arciniegas E., Sutton A.B., Allen T.D. et al.* Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells *in vitro* // J. Cell Sci. 1992. V. 103. P. 521–529.
- Azhdari M., Baghaban-Eslamnejad M., Baharvand H., Aghdami N.* Therapeutic potential of human-induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells in a bleomycin-induced scleroderma mouse model // Stem Cell Res. 2013. V. 10. № 3. P. 288–300.
- Barnes D.W.H., Evans E.P., Loutit J.F.* Local origin of fibroblasts deduced from sarcomas induced in chimaeras by implants of pliable disks // Nature. 1971. V. 233. P. 267–268.
- Brand K.G., Buoen L.C., Brand I.* Foreign body tumorigenesis: timing and location of preneoplastic events // J. Natl. Cancer Inst. 1971. V. 47. P. 829–836.
- Chen C.W., Okada M., Proto J.D. et al.* Human pericytes for ischemic heart repair // Stem Cells. 2012. doi: 10.1002/stem.1285).
- Culmes M., Eckstein H.H., Burgkart R. et al.* Endothelial differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells is improved by epigenetic modifying drug BIX-01294 // Eur. J. Cell Biol. 2013. V. 92. № 2. P. 70–79.
- Dar A., Domev H., Ben-Yosef O. et al.* Multipotent vasculogenic pericytes from human pluripotent stem cells promote recovery of murine ischemic limb // Circulation. 2012. V. 125. P. 87–99.
- Deissler H., Deissler H., Lang G.K., Lang G.E.* TGF β induces transdifferentiation of iBREC to α SMA-expressing cells // Int. J. Mol. Med. 2006. V. 18. № 4. P. 577–582.
- Feng J., Mantesso A., De Bari C. et al.* Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair // PNAS. 2011. V. 108. № 16. P. 6503–6508.
- Ferrara N., Gerber H.P., Le Couter J.* The biology of VEGF and its receptors // Nat. Med. 2003. V. 9. P. 669–676.
- Fischer L.J., McIlhenny S., Tulenko T.* Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force // J. Surg. Res. 2009. V. 152. № 1. P. 157–166.
- Frid M.G., Kale V.A., Stenmark K.R.* Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: *in vitro* analysis // Circ. Res. 2002. V. 90. № 11. P. 1189–1196.
- Janeczek Portalska K., Leferink A., Groen N. et al.* Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells // PLoS One. 2012. 7(10): e46842. doi: 10.1371/journal.pone.0046842.
- Johnson K.H., Ghobrial H.K.G., Buoen L.C. et al.* Nonfibroblastic origin of foreign body sarcomas implicated by histological and electron microscopic studies // Cancer Res. 1973. V. 33. P. 3139–3150.
- Johnson K.H., Ghobrial H.K.G., Buoen L.C. et al.* Ultrastructure of cell types cultured during preneoplasia from implant surfaces and foreign-body-reactive tissues in mice // J. Natl. Cancer Inst. 1980. V. 64. № 6. P. 1383–1392.
- Kakiuchi-Kiyota S., Crabbs T.A., Arnold L.L. et al.* Evaluation of expression profiles of hematopoietic stem cell, endothelial cell, and myeloid cell antigens in spontaneous and chemically induced hemangiosarcomas and hemangiomas in mice // Toxicol. Pathol. 2013. V. 41. № 5. P. 709–721.
- Maharaj A.S., Saint-Geniez M., Maldonado A.E. et al.* Vascular endothelial growth factor localization in the adult // Am. J. Pathol. 2006. V. 168. P. 639–648.
- Matthews W., Jordan C.T., Wiegand G.W. et al.* A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations // Cell. 1991. V. 65. P. 1143–1152.
- Mihaila S.M., Frias A.M., Pirraco R.P. et al.* Human adipose tissue-derived SSEA-4 subpopulation multi-differentiation potential towards the endothelial and osteogenic lineages // Tissue Eng. Part A. 2013. V. 19. № 1–2. P. 235–246.
- Moonen J.-R.A.J., Krenning G., Brinker M.G.L. et al.* Endothelial progenitor cells give rise to pro-angiogenic smooth muscle-like progeny // Cardiovascular Res. 2010. V. 86. P. 506–515.
- Skalli O., Ropraz P., Trzeciak A.* A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation // J. Cell Biol. 1986. V. 103. P. 2787–2796.
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice // Nature. 1995. V. 376. P. 62–66.
- Shojaei S., Tafazzoli-Shahdpoor M., Shokgozar M.A., Haghhighipour N.* Effect of mechanical and chemical stimuli of differentiation of human adipose-derived stem cells into endothelial cells // Int. J. Artif. Organs. 2013. V. 36. № 9. P. 63–73.
- Smadja D.M., Bièche I., Helley D. et al.* Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances *in vitro* angiogenesis with up-regulation of integrin α (6) // J. Cell. Mol. Med. 2007. V. 11. № 5. P. 1149–1161.
- Talavera-Adame D., Ng T.T., Gupta A.* Characterization of microvascular endothelial cells isolated from the dermis of adult mouse tails // Microvasc. Res. 2011. V. 82. № 2. P. 97–104.
- Yamaguchi T.P., Dumont D.J., Conlon R.A. et al.* Flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. // Development. 1993. V. 118. P. 489–498.
- Zhang X., Nan Y., Wang H. et al.* Model microgravity enhances endothelium differentiation of mesenchymal stem cells // Naturwissenschaften. 2013. Bd. 100. № 2. S. 125–133.

Some Molecular and Genetic Properties of Progenitor Cells in Sarcomas Induced with Foreign Body

O. V. Morozova, A. F. Karamysheva, and T. G. Moizhess

Scientific Research Institute of Carcinogenesis, Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115478 Russia

e-mail: 7012002@inbox.ru

Received June 21, 2013; in final form, March 13, 2014

Abstract—One of the important questions in understanding the mechanisms of carcinogenesis induced with foreign body (or plastic carcinogenesis), is a question about normal progenitor cells in sarcomas (FB sarcomas) appearing in close proximity to the plastic plate implanted under the skin of an experimental animal. There is an assumption in literature that progenitor cells in FB sarcomas originate from vascular endothelium cells feeding a connective tissue capsule that forms around foreign body. In our research, we studied mRNA expression of one of the endothelial cell markers—receptor *VEGFR2/Flk1*—and growth factor *VEGF-A*, which interacts with it, in precancerous cells of FB sarcomas in mice. In examined cells, mRNA expression of *VEGF-A* was found while mRNA expression of *VEGFR2/Flk1* was absent. In light of this and formerly established properties of progenitor cells in FB sarcomas, possibilities of the origin of these sarcomas from endothelial cells, pericytes, and pluripotent mesenchymal stem cells are being discussed.

Keywords: sarcomas induced with foreign body, precancerous cell cultures, gene expression, *VEGF-A*, *VEGFR2/Flk1*