

ПРОБЛЕМА НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© Г. Г. Полянская

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru*

Широкое использование стволовых клеток человека в биомедицинских технологиях приводит к необходимости анализа геномной стабильности культивируемых стволовых клеток разного происхождения. В обзоре приведены данные о генетически стабильных и нестабильных постоянных линиях эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека, их дифференцированных производных и взрослых стволовых клетках. Рассмотрены причины появления геномной нестабильности, проведен анализ методов, используемых для изучения генома клеточных линий. Приведенные в обзоре результаты свидетельствуют о необходимости периодического анализа геномной стабильности всех типов стволовых клеток. Необходимо также проведение молекулярно-генетического анализа с целью исключения контаминации стволовых клеток опухолевыми клетками. Этот аспект особенно важен в связи с активным использованием взрослых стволовых клеток в регенеративной медицине.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки, нейральные стволовые клетки, теломеры, структура кариотипа, геномная нестабильность.

Анализ геномной нестабильности актуален в связи с использованием стволовых клеток человека в регенеративной медицине. Задача данного обзора состоит в анализе геномной нестабильности стволовых клеток разного происхождения: эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), их дифференцированных производных и стволовых клеток взрослого организма или эмбриона (далее — взрослые стволовые клетки). Прежде чем перейти непосредственно к теме обзора и пониманию причин геномной нестабильности, необходимо рассмотреть типы клеточных линий, к которым относятся разные стволовые клетки человека.

Существует два основных типа клеточных линий — неиммортиализованные, или диплоидные, и иммортиализованные, или постоянные, клеточные линии.

Неиммортиализованные клеточные линии имеют преимущественно диплоидный кариотип, характерный для организма донора. Еще одним общим свойством клеток этих линий является ограниченный срок жизни, который определяется не длительностью культивирования, а числом удвоений клеточных популяций, характеризующим пролиферативную активность. С увеличением числа клеточных удвоений в процессе культивирования диплоидных линий пролиферация клеток постепенно прекращается, и клеточная популяция входит в фазу репликативного старения. Оно обусловлено укорочением теломера, происходящим при каждом цикле репликации ДНК и соответственно при каждом клеточном делении вследствие выключения фермента теломеразы уже на ранних стадиях эмбриогенеза (Прайс, 1997; Хейфлик, 1997; Vodnar et al., 1998). Дальнейшей судьбой клеток в фазе репликативного старения могут быть либо после-

дующая дегенерация и гибель клеток, либо длительное существование живых клеток с крайне низкой пролиферативной активностью без спонтанного приобретения неограниченного пролиферативного потенциала (Hayflick, 1965; Matsumura et al., 1979) и с возможным переключением на другой метаболический путь (Гаврилов, Гаврилова, 1991).

К диплоидным клеточным линиям относится широкий спектр клеточных линий, различающихся, в частности, по дифференцировочному потенциалу. Можно выделить линии, детерминированные к дифференцировке в определенном направлении, т. е. прогениторные, преимущественно унипотентные, а также линии стволовых клеток, выделенные из разных тканей взрослых доноров или эмбрионов и обладающие свойством мультипотентности. К таким линиям относятся мезенхимные стволовые клетки разного происхождения. Недавно было показано, что линии мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека, согласно основной характеристике диплоидных клеточных линий, при длительном культивировании сохраняют нормальный кариотип, вступают в фазу репликативного старения и в дальнейшем погибают без перерождения в трансформированные клетки (Домнина и др., 2013). Дифференцированные производные ЭСК могут быть в начальной стадии дифференцировки прогениторными клетками или мультипотентными (мезенхимные стволовые клетки). Одной из основных характеристик стволовых клеток является их способность к самообновлению. В связи с этим они имеют низкий уровень теломеразной активности, что означает поддержание определенной длины теломер или их более медленное укорочение по сравнению с другими диплоидными линиями.

Одним из механизмов, сдерживающих укорочение теломер, может быть асимметричное деление стволовых клеток. В процессе такого деления из одной материнской клетки образуются истинно стволовая недифференцированная клетка и клетка, коммитированная к дифференцировке (Serakinci et al., 2008). Авторы утверждают, что смысл такого деления состоит в том, что стволовые клетки без большого числа клеточных делений и соответственно с ограниченным числом укорочений теломер дают начало большому количеству коммитированных клеток, т. е. в дальнейшем дифференцированных, тогда как недифференцированные клетки проявляют крайне низкую пролиферативную активность. При этом родительская нить ДНК всегда остается в недифференцированных клетках, а вновь реплицированная нить — в дифференцирующейся сестринской клетке. Этот механизм способствует защите стволовых клеток от ошибок репликации и соответственно защищает их от вовлечения в мутагенез и канцерогенез. Низкая пролиферативная активность и соответственно низкая теломеразная активность выявлены в мезенхимных стволовых клетках разного происхождения, в нейральных и гематопоетических стволовых клетках, а также в стволовых клетках кожного эпидермиса, эпителия кишечника, волосных фолликулов и др. (Микер, Коффи, 1997; Serakinci et al., 2008; Jeon et al., 2011; Ogura et al., 2014).

Способность клеток к самообновлению особенно существенна при возникновении экстремальных ситуаций, связанных с болезнями, причиной которых является апоптоз или некроз определенной популяции клеток. Изменение микроокружения в этих случаях ведет к усилению пролиферативной активности, что обеспечивается либо отсутствием активного укорочения теломер, либо удлинением теломер. Надо подчеркнуть, что низкий уровень теломеразной активности как наиболее распространенный механизм стабилизации длины теломер в стволовых клетках недостаточен для стабильного поддержания теломер. Поэтому стволовые клетки, полученные из эмбрионов или взрослых доноров, имеют ограниченный срок жизни, который уменьшается с возрастом донора, и в конечном счете наступает фаза репликативного старения. Низкий уровень теломеразной активности и относительно короткие теломеры в таких стволовых клетках, возможно, являются защитой против развития рака, и это может быть основной причиной для существования жесткого баланса между пролиферацией и экспрессией теломеразы (Serakinci et al., 2008).

Образование иммортализованных, или постоянных, клеточных линий сопряжено со многими генетическими и цитогенетическими изменениями в клеточных популяциях, включая стабилизацию длины теломер с помощью нескольких механизмов, к которым относятся экспрессия теломеразы, ретроинтегрируемый вирусный провирус, рекомбинационный механизм, названный альтернативным механизмом удлинения теломер (ALT — alternative mechanisms for lengthening of telomeres), и эпигенетические изменения, связанные с модификациями хроматина в теломерных и около-теломерных районах хромосом (Дункан, Редел, 1997; Микер, Коффи, 1997; Редел и др., 1997; Sherr, DePinho, 2000; Serakinci et al., 2008; Artandi, DePinho, 2010). К иммортализованным линиям относится широкий спектр разных по происхождению и свойствам клеточных линий. Важно подчеркнуть, что линии ЭСК также относятся к иммортализованным (постоянным) клеточным линиям. Любые постоянные линии обладают свойством не-

ограниченной пролиферации, значительно превышающей 60 удвоений (число Хейфлика) без периода репликативного старения. Тем не менее линии ЭСК стоят особняком от остальных постоянных клеточных линий. Источником их получения являются ранние эмбриональные клетки стадии развития — не позднее бластоцисты. Источником же получения большинства остальных постоянных клеточных линий являются клетки, составляющие уже вполне определенные ткани либо эмбриона, либо взрослого организма. Промежуточное положение занимают линии тератокарцином и эмбриональных клеток, полученные из зародышевых половых клеток различных стадий развития. Линии ЭСК имеют два важнейших свойства, отличающих их от остальных постоянных линий. Во-первых, они обладают свойством плюрипотентности, т. е. способности дифференцироваться в производные трех зародышевых листков и в линию половых клеток *in vitro* и *in vivo*. Во-вторых, линии ЭСК преимущественно сохраняют диплоидный кариотип. Эти характеристики частично сближают их с линиями взрослых стволовых клеток. Стабильность генома любых стволовых клеток человека является определяющим фактором их структурно-функциональной целостности, которая проявляется в сохранении оптимального баланса между пролиферацией и дифференцировкой.

Линии ЭСК и взрослых стволовых клеток человека являются уникальными экспериментальными моделями для фундаментальных исследований в разных областях клеточной и молекулярной биологии, а также для прикладных исследований в области регенеративной медицины, фармакологии и токсикологии. Одним из препятствий для использования ЭСК человека в регенеративной медицине является опасность возникновения в процессе культивирования нестабильности генома, способствующей, в частности, опухолевой трансформации ЭСК. Геномная нестабильность возникает также и при культивировании взрослых стволовых клеток, но значительно реже, чем в линиях ЭСК.

Рассмотрим кратко методы, используемые для анализа геномной нестабильности любых клеточных линий. Для геномного анализа широко используют ряд цитогенетических методов — кариотипический анализ дифференциально окрашенных хромосом, в частности G-окрашивание, а также флуоресцентную гибридизацию ДНК *in situ* (FISH) на метафазных хромосомах и интерфазных ядрах. Метод G-окрашивания позволяет учитывать разные структурные и количественные изменения хромосом. Метод FISH на интерфазных ядрах в отличие от G-окрашивания позволяет учитывать только потери или амплификации целых хромосом или их районов. Оба метода информативны в определении клональных (неслучайных) хромосомных изменений. Метод G-окрашивания улавливает клональные aberrации, присутствующие в 2 из 20 клеток, а метод FISH на интерфазных ядрах — в 2 из 200 клеток. Вариацией FISH являются M-FISH, а также метод спектрального кариотипирования (SKY), позволяющие проводить многоцветное кариотипирование на метафазных пластинках. Эти методы позволяют выявлять разные структурные и численные (анеуплоидия) изменения хромосом при разрешающей способности $\sim(50-200) \cdot 10^6$ пар оснований, тогда как геном составляет $\sim 3000 \cdot 10^6$ пар оснований. Оба метода являются промежуточными между классическими цитогенетическими и молекулярно-биологическими. Используемые в исследовании геномной нестабильности молекулярные

методы имеют большую разрешающую способность. Так, метод сравнительной геномной гибридизации, основанный на использовании микрочипов ДНК (aCGH), позволяет проводить полногеномную идентификацию, анализируя изменение числа копий ДНК. Метод анализа единичного нуклеотидного полиморфизма (SNP) позволяет идентифицировать точковые мутации и потерю гетерозиготности. Недостатком молекулярных методов в отличие от цитогенетических является невозможность учета геномных клональных изменений, составляющих менее 20 % (Baker et al., 2007; Meisner, Johnson, 2008; Macleod, Drexler, 2013).

Далее в обзоре анализируются данные о генетически стабильных и нестабильных постоянных линиях ЭСК человека, их дифференцированных производных и линиях взрослых стволовых клеток с использованием перечисленных методов.

Геномная нестабильность линий ЭСК человека

Нормальная структура кариотипа — 46, XX или 46, XY — представляет собой важнейшую характеристику, определяющую статус ЭСК человека. Действительно, большое количество постоянных линий ЭСК человека являются генетически стабильными даже при длительном культивировании. Так, исследования, проведенные на 125 линиях ЭСК разными методами в разных лабораториях и в разных странах, свидетельствуют о том, что около 70 % линий кариотипически стабильны. Причем при увеличении длительности культивирования до 450 удвоенных клеточных популяций в линиях, не имеющих кариотипических изменений на ранних пассажах, наблюдается постепенное увеличение хромосомной нестабильности, но не более чем в 30 % исследованных линий. При увеличении длительности культивирования свыше 500 удвоенных частота кариотипически аномальных линий приближается к 50 % (Amps et al., 2011). Основные характеристики, определяющие статус линий ЭСК человека следующие: 1) неограниченная пролиферация клеток, значительно превышающая 60 удвоенных клеточной популяции (число Хейфлика), при отсутствии периода репликативного старения; 2) поддержание высокой теломеразной активности, обеспечивающей стабильную длину теломера, необходимую для поддержания пролиферативной активности; 3) наличие нормального кариотипа; 4) экспрессия специфических поверхностных эмбриональных антигенов SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 и экспрессия транскрипционных факторов Oct-4 и Nanog; 5) способность к ненаправленной (без использования специальных индукторов) дифференцировке в производные трех зародышевых листков и в линию половых клеток *in vitro* и *in vivo*. Следует подчеркнуть, что некоторые из приведенных выше основных свойств, характеризующих ЭСК человека, устойчиво проявляются как в кариотипически нормальных, так и в аномальных линиях.

Некоторые кариотипические отклонения могут проявиться лишь по дифференцировочному потенциалу, в основном *in vivo* (Herszfeld et al., 2006; Feki et al., 2008; Yang et al., 2010; Biancotti et al., 2012; Zucchelli et al., 2012). Таким образом, кариотипический анализ является неотъемлемой частью контроля стабильности линий ЭСК человека. Его следует проводить как до, так и после получения постоянной линии ЭСК, т. е. после того как ЭСК

прошли более 60 удвоенных клеточной популяции, и в процессе дальнейшего культивирования. Надо подчеркнуть, что кариотипически аномальные линии могут быть пригодны для фундаментальных исследований в области раннего эмбрионального развития и канцерогенеза, некоторые из них могут быть использованы в качестве моделей для фармакологических исследований. Но они совершенно непригодны для использования в прикладных исследованиях, связанных с регенеративной медициной. Для этих целей необходим контроль геномной стабильности линий ЭСК не только с помощью кариотипического метода, но и с помощью методов с большей разрешающей способностью.

Следует отметить, что в ЭСК человека неэффективна контрольная точка (checkpoint) на границе фаз G_1/S клеточного цикла, ответственная за репарацию повреждений ДНК, в частности за вырезание отдельных нуклеотидов (NER). Однако за счет активации регуляторов апоптоза на этой стадии происходит элиминация клеток с поврежденной ДНК. Но часть генных мутаций сохраняется, возможно, за счет мутаций в ключевых апоптотических генах. Такие клетки могут получить преимущество вследствие активной пролиферации. Возможно, что в дальнейшем отбор быстро растущих клеток приведет к появлению крупных хромосомных изменений. В результате при длительном культивировании может произойти злокачественная трансформация. Таким образом, отсутствие системы репарации может способствовать увеличению генных мутаций, которые обеспечивают в дальнейшем появление генетически аберрантных линий ЭСК человека (Гордеева, Миталипов, 2008; Нука-Nouspikel et al., 2012; Nouspikel, 2013). Надо отметить, что клетки могут бороться с возникшими повреждениями ДНК разными путями, которые зависят как от природы и количества повреждений, так и от типа клеток. Для ЭСК наиболее оптимальным является апоптоз, так как другой путь, связанный со старением, которое вытесняет такие клетки из пролиферативного пула, плохо работает в ЭСК за счет отсутствия экспрессии ключевых генов, контролирующих клеточный цикл, таких как *pRb*, некоторых факторов *E2F*, и низкой экспрессии генов *p16* и *p21* (Nouspikel, 2013).

В связи с возможностью появления точковых мутаций в геноме ЭСК для исследования генетической нестабильности существенны молекулярные методы анализа, так как их разрешающая способность позволяет определять небольшие изменения в ДНК. Так, есть данные о том, что в 25 % кариотипически нормальных линий ЭСК обнаружена амплификация района 20q11.21, которая в ряде линий связана с увеличением скорости роста клеточных популяций (Amps et al., 2011). В кариотипически нормальных линиях были обнаружены изменения числа нескольких копий ДНК в разных хромосомах (Zucchelli et al., 2012). Было показано, что в ЭСК в отличие от других соматических клеток отсутствует корреляция между возникновением контрольной точки митотического веретена (mitotic-spindle checkpoint), ответственной за прикрепление хромосом к митотическому веретену и за начало расхождения сестринских хроматид, и инициацией апоптоза, что может способствовать хромосомной нестабильности и приводить к анеуплоидии (Mantel et al., 2007). По-видимому, для полного анализа геномной нестабильности необходимо сочетание разных методов.

В настоящее время при использовании перечисленных методов или их сочетаний накоплен большой мате-

риал, свидетельствующий о нарушениях генетической стабильности (Cowan et al., 2004; Draper et al., 2004; Inzunza et al., 2004; Maitra et al., 2005; Impeh et al., 2006; Plaia et al., 2006; Baker et al., 2007; Harrison et al., 2007; Spits et al., 2008; Yang et al., 2008; Gopalakrishna-Pillai, Iverson, 2010; Yang et al., 2010; Taarpen et al., 2011; Biancotti et al., 2012). Анализ многочисленных данных по геномной нестабильности ЭСК позволил провести ряд обобщений. Так, при длительном культивировании накапливаются клетки с численными и структурными хромосомными нарушениями. Изучение кариотипической структуры клеточных линий на разных пассажах выявило частую амплификацию отдельных районов или целых хромосом 1, 12, 17, 20 и X. Обнаружено, что увеличение количества генетического материала, т.е. увеличение дозы определенных генов этих хромосом, способствует более активной пролиферации по сравнению с диплоидными культурами.

Предполагается, что наблюдаемые повторяющиеся хромосомные изменения могут иметь адаптивный характер, так как в этих хромосомах локализованы гены, обеспечивающие клеткам ускоренный рост в условиях *in vitro*. Так, есть данные о том, что экспрессия генов, ответственных за клеточную пролиферацию и апоптоз в кариотипически аномальной линии (дупликация района 1p32-1p34) повышена, тогда как экспрессия генов опухолевой супрессии (*p53*, *Rb* и *BRCA1*) снижена. Кроме того, повышена экспрессия некоторых онкогенов, локализованных в дублированном районе: *HKR3*, *LCK*, *JUN* и *TAL1* (Yang et al., 2010). Показано также, что в 12-й хромосоме (12p13) локализован ген *NANOG* (Baker et al., 2007), сверхэкспрессия которого стимулирует самообновление ЭСК и предотвращает дифференцировку; в этом же локусе находится ген-регулятор клеточного цикла *CCTB2*, а антиапоптотические онкогены *KRAS* и *SOX5* локализованы в районе 12p11.2-12; в хромосомах X, 17 и 20 находятся антиапоптотические гены *BIRC4*, *BIRC5* и *BCL2L1* (Baker et al., 2007; Harrison et al., 2007; Ardehali et al., 2011); в хромосоме 20 обнаружена дупликация района 20q11.21, включающего в себя ген стволовости *DNMT3B*, повышенная экспрессия которого способствует улучшению ростовых характеристик ЭСК (Spits et al., 2008). Накоплены данные и по изменчивости других хромосом, часть из которых не связана с адаптацией *in vitro* ЭСК человека.

Существенно отметить, что при длительном культивировании появляются генетические нарушения, выявляемые в различных раковых клетках и часто совпадающие по локализации с кариотипическими изменениями ЭСК, носящими адаптивный характер. Эти нарушения включают в себя изменения числа копий генов и изменения уровня метилирования промоторов ряда генов. Так, с помощью молекулярных методов анализа ДНК показано, что в нескольких линиях ЭСК имеет место усиление метилирования гена *RASSF1* (гена опухолевой супрессии, локализованного в 3-й хромосоме). Эпигенетическое выключение этого гена путем метилирования промоторов известно для многих раковых опухолей (Maitra et al., 2005). Тем не менее подробный анализ метилирования ДНК в кариотипически нормальных и аномальных линиях ЭСК одного происхождения свидетельствует об отсутствии существенных различий между ними по характеру метилирования, а также об отсутствии зависимости характера метилирования от длительности культивирования. Эти данные позволяют предположить, что генетиче-

ская нестабильность играет незначительную роль в возникновении эпигенетической нестабильности линий ЭСК (Amps et al., 2011).

В некоторых линиях ЭСК были обнаружены амплификации генных локусов, содержащих онкоген *c-MYC*, присутствующие в большинстве раковых опухолей. Амплификация районов 17-й и 20-й хромосом включает в себя гены разных по происхождению раковых опухолей. Так, часто встречаемая амплификация 17q связана с нейробластомами и с тестикулярными опухолями из зародышевых клеток. Антиапоптотический ген *BIRC5* также экспрессируется в нейробластомах (Baker et al., 2007; Spits et al., 2008). Кроме того, присутствие изохромосомы 12p, часто наблюдаемое при длительном культивировании, было обнаружено в тестикулярных опухолях зародышевых клеток человека. Потери отдельных хромосом или их районов также наблюдаются в ЭСК, но значительно реже, чем приобретения.

Было отмечено, что при получении линий ЭСК человека из анеуплоидных эмбрионов выживали и образовывали линии преимущественно эмбрионы, имеющие трисомию по разным хромосомам, тогда как эмбрионы с моносомией по разным аутосомам быстро погибали (Biancotti et al., 2012). Анализ большого количества данных показал, что хромосомная нестабильность, наблюдаемая при G-окрашивании, FISH-анализе и использовании молекулярных методов, наиболее часто связана с анеуплоидией, дупликациями, делециями и транслокациями, тогда как инверсии наблюдаются значительно реже (Cowan et al., 2004). Таким образом, совершенно очевидно, что при длительном культивировании в разных клеточных линиях могут накапливаться генетические повреждения, влияющие, в частности, на приобретение клетками онкогенных свойств. Из многочисленных экспериментальных данных следует, что имеются определенные адаптивные кариотипические изменения, которые, с одной стороны, обеспечивают постоянное самообновление ЭСК, а с другой — совпадают с изменениями, способствующими малигнизации.

Адаптация ЭСК представляет собой динамичный процесс, который может проходить путем использования нескольких механизмов (Baker et al., 2007). Предполагается, что имеют место как минимум 5 независимых механизмов, связанных с увеличением хромосомного материала, включающего в себя гены, локализованные в коротком и длинном плечах 17-й хромосомы (17p21-qter или 17p11.20), в двух районах короткого плеча 12-й хромосомы (12p11.2-12 или 12p13), трисомия по X-хромосоме. Возможно и взаимодействие указанных механизмов клеточной адаптации. Процесс адаптации ЭСК может помочь исследовать, во-первых, механизмы, которые контролируют пролиферацию и способность к дифференцировке или апоптозу ЭСК человека, а во-вторых, механизмы малигнизации на примере приобретения нормальными стволовыми клетками статуса малигнизированных ЭСК человека. Такие линии могут являться моделью для изучения механизмов канцерогенеза (Baker et al., 2007; Harrison et al., 2007; Feki et al., 2008). Показано, в частности, что вариант клеточной линии ЭСК человека WA09, имеющий геномные изменения, выявленные с помощью метода CGH, был дифференцирован *in vitro* в нейральные предшественники и трансплантирован иммунодефицитным мышам. В результате вместо тератом образовались опухоли со свойствами медуллобластомы (Werbowsky-Ogilvie et al., 2012).

Недавно опубликована работа, в которой впервые проведен масс-спектрометрический анализ определения 2583 белков, экспрессирующихся в нормальных и аномальных ЭСК человека (Sun et al., 2014). Анализ выявил 316 белков, экспрессия которых существенно различается между нормальными и аномальными линиями. Показана увеличенная экспрессия белков HDAC2 и CTNBN1 как в ранней, так и в поздней неопластической стадии, которая может служить маркером для прогноза злокачественной трансформации ЭСК человека.

Обобщая приведенные данные по геномной нестабильности линий ЭСК, можно предположить, что изначальная иммортализация ЭСК человека, связанная с наличием теломеразной активности, которая является обязательным условием иммортализации в большинстве типов клеток, облегчает начало канцерогенеза. По-видимому, нестабильные условия культивирования могут приводить к злокачественной трансформации. В таких условиях ЭСК человека спонтанно трансформируются, подобно клеткам мыши. Известно, что у мыши клетки многих тканей и клеточные культуры имеют постоянную теломеразную активность и обладают способностью к спонтанной трансформации (Sherr, DePinho, 2000).

Тем не менее тенденция к накоплению хромосомных аномалий имеет место не во всех проанализированных линиях. Поэтому неясно, является основной причиной появления хромосомной нестабильности предрасположенность определенных генотипов к накоплению мутаций или конкретные условия культивирования. Показаны межлинейные различия между линиями ЭСК по частоте мутаций, что позволяет предполагать разную генетическую предрасположенность к хромосомной нестабильности (Närvä et al., 2010; Zucchelli et al., 2012). Есть данные, свидетельствующие о том, что уже на ранних пассажах обнаружены значительные кариотипические изменения, возможно изначально имеющиеся в бластомере и обеспечившие образование малигнизированной линии ЭСК (Feki et al., 2008; Novatta et al., 2010). Показано также наличие структурных кариотипических аномалий на ранних пассажах и отсутствие на поздних (Taarken et al., 2011).

Совершенно очевидно, что условия культивирования, особенно при длительном ведении культуры, должны оказывать существенное влияние на кариотипическую стабильность линий ЭСК человека. Так, фидерное культивирование ЭСК показало, что происхождение фидера влияет на качество ЭСК (Richards et al., 2002, 2003; Skottman, Novatta, 2006), что может приводить к селективному преимуществу определенных кариотипических вариантов. К такому же результату может привести несоответствие субстрата и ростовой среды в бесфидерных системах культивирования (Villa-Diaz et al., 2010). Показано, что использование при культивировании ЭСК человека фидерных клеток, образующих плотный монослой, приводит к кариотипическим изменениям, ведущим к малигнизации (Yang et al., 2008). Перевод ЭСК с фидерной системы на бесфидерную с использованием в качестве субстрата белков внеклеточного матрикса и обычного культурального пластика при длительном культивировании приводит к возникновению кариотипических изменений, затрагивающих хромосомы 7 и 12, сходные с изменениями в опухолевых клетках (Imreh et al., 2006). Есть данные о том, что механический метод пересева ЭСК успешнее, чем энзиматический, поддерживает нормальный кариотип. Одним из объяснений этому может быть

то, что механический метод позволяет пересевать отдельные группы клеток, а не единичные клетки. В случае пересева единичных клеток может возникнуть селективное преимущество аномальных ЭСК, обладающих повышенной клоногенной активностью (Maitra et al., 2005; Herszfeld et al., 2006; Ludwig et al., 2006). По-видимому, и генетическая предрасположенность, и условия культивирования вносят существенный вклад в появление кариотипической нестабильности линий ЭСК.

Как указывалось выше, достаточно большое количество линий не претерпевает кариотипических изменений. В частности, при получении нами трех линий ЭСК от разных доноров использовали механический метод пересева, в качестве фидера использовали эмбриональные мезенхимные фибробласты человека. После длительного культивирования (более 120 удвоений клеточной популяции) количественный и структурный кариотипический анализ не выявил клональных изменений в кариотипе. Далее из двух линий были получены две сублинии, длительно культивировавшиеся в бесфидерной системе, имеющей в качестве субстрата смесь белков внеклеточного матрикса, синтезированных фидерными клетками. Эти сублинии прошли соответственно более 300 и 115 удвоений клеточной популяции и также сохранили нормальный диплоидный кариотип (Кольцова и др., 2011, 2012). Следует подчеркнуть, что в этих работах использовали только количественный и структурный (G-окрашивание) кариотипический анализ. Нельзя исключить, что молекулярные методы анализа, обладающие большей разрешающей способностью, выявили бы генные изменения.

Тем не менее разные геномные нарушения могут вносить разный вклад в малигнизацию ЭСК человека. Есть точка зрения, согласно которой большинство геномных изменений может быть безвредным для ЭСК и дальнейшего использования их в клеточной терапии (Peterson, Loring, 2014). Авторы основываются на наличии хромосомного мозаицизма в организме человека, связанного с неклональными хромосомными изменениями. Так, в дермальных фибробластах, используемых для получения индуцированных плюрипотентных клеток, этими авторами обнаружено большое количество вариаций по числу копий ДНК. Таким образом, мозаицизм, опосредованный геномными вариациями, является нормальным явлением и может быть вполне толерантным или даже полезным. Однако пока неясно, какие конкретные точковые мутации являются опасными, а какие нет, т. е. какие мутации при дальнейшем культивировании приведут к адаптивным кариотипическим изменениям, а какие элиминируются из популяции или окажутся нейтральными. Поэтому геномный анализ необходим для выявления любых мутаций (Peterson, Loring, 2014).

Таким образом, при использовании линий ЭСК в регенеративных медицинских технологиях длительность культивирования должна быть сокращена до минимума. Как только ЭСК образовали постоянную линию, сразу же необходимо провести цитогенетический анализ и получить необходимое для последующей работы количество биомассы.

Рядом авторов обнаружен поверхностный биомаркер CD30, который также может быть использован для определения геномной нестабильности. Маркер CD30 относится к семейству факторов некроза опухоли. Он экспрессируется на трансформированных ЭСК человека. Его экспрессия обнаружена и на нескольких кариотипически нестабильных, но немалигнизированных сублиниях ЭСК

с единичными хромосомными аномалиями. В связи с этим можно выявить хромосомные аномалии на ранних стадиях развития нестабильности (Herszfeld et al., 2006). Таким образом, с помощью флуоресцентоактивированного клеточного сортирования (FACS) можно проводить мониторинг культур ЭСК человека и в дальнейшем определять аномальные кариотипические варианты в клеточных популяциях ЭСК. Но, учитывая, что экспрессия этого поверхностного маркера, по-видимому, обусловлена только определенными генетическими изменениями, нельзя утверждать, что маркер CD30 является универсальным маркером для любой хромосомной нестабильности. Поэтому необходимо сочетание разных методов для выявления хромосомной нестабильности, особенно при использовании ЭСК в трансплантационной медицине.

Геномная нестабильность дифференцированных производных ЭСК

Хромосомная нестабильность может возникать не только в недифференцированных ЭСК человека, но и в их дифференцированных производных. Так, недавно показано, что при длительном культивировании нейральных прогениторных клеток, полученных из 6 линий ЭСК, возникают экстракопирование длинного плеча хромосомы 1 (1q) и последующая прыгающая транслокация ее на разные хромосомы (Varela et al., 2012). Это явление сопровождается приобретением клетками «иммортального» фенотипа и отсутствием приживления трансплантата при введении иммунодефицитным крысам. Учитывая случайность локализации экстракопированного 1q-плеча на разных реципиентных хромосомах, выдвинули предположение о том, что именно первичная амплификация 1q вызывает изменения характера нейральной дифференцировки, а также может способствовать процессу малигнизации. Известно, что амплификация 1q-плеча имеет место при образовании разных опухолей. Возможно, что геномные изменения могут возникнуть в процессе направленной дифференцировки ЭСК из-за изменений условий культивирования. Изменение условий может способствовать селекции новых генетических вариантов. Геномные изменения в дифференцированных клетках выявить сложнее, чем в недифференцированных ЭСК, так как пролиферативная активность снижается и применение кариотипического анализа затруднено. В этих случаях необходимо использование молекулярных методов, в частности SNP. Так, с помощью этого метода показано, что аномальная популяция клеток, присутствующая в недифференцированных клетках линии WA07, была отселектирована в процессе направленной дифференцировки в кардиомиоциты. В результате через 5 сут дифференцированная популяция характеризовалась дупликациями в хромосоме 20 (Peterson, Loring, 2014). Анализ нейральных стволовых клеток, полученных из ЭСК человека, выявил трисомию по длинному плечу хромосомы 20 (20q), которая ранее не обнаруживалась в этих клетках. Известно, что трисомия 20q часто возникает в ЭСК (Ben-David et al., 2011). Авторы предполагают, что эта хромосомная перестройка появилась до начала дифференцировки в нейральные стволовые клетки. Амплификация районов 20-й хромосомы была обнаружена в разных по происхождению раковых опухолях (Baker et al., 2007).

Данные по имплантации кариотипически нормальных ЭСК иммунодефицитным мышам показали с по-

мощью SNP-анализа существенное увеличение геномной нестабильности в образовавшихся тератомах по сравнению с параллельно культивируемыми ЭСК доноров (Zucchelli et al., 2012). Авторы полагают, что, когда адаптация ЭСК *in vitro* произошла и скорость новых мутаций минимальна, при инъекции этих клеток мышам *in vivo* ЭСК реадaptируются к новым условиям среды с помощью усиления геномной нестабильности. Но есть и другие данные, свидетельствующие о неоднозначном поведении ЭСК с многочисленными геномными нарушениями при дифференцировке в мезенхимные производные (Karagiannidou et al., 2014). Авторами показано, что линии ЭСК (HUES-7 и -9), несущие геномные нарушения, дифференцируются *in vitro* в МСК, которые активно растут и входят в фазу старения через 5—16 пассажей. При этом авторами не было обнаружено никаких различий между пролиферативным потенциалом этих МСК и МСК, полученных из костного мозга. Молекулярно-генетический анализ (aCGH) не выявил значительных хромосомных различий между линиями. По-видимому, в процессе дифференцировки может отсутствовать положительная селекция ЭСК с хромосомными нарушениями. Эти данные указывают, что генетически нестабильные ЭСК могут поддерживать способность к дифференцировке в МСК, которые *in vitro* нормально растут и не превращаются в трансформированные клетки (Karagiannidou et al., 2014). В связи с представленными неоднозначными результатами авторы подчеркивают необходимость проведения контроля генетической стабильности не только в недифференцированных ЭСК человека, но и в их дифференцированных производных, используя для этого как кариотипические, так и молекулярные методы анализа.

Геномная нестабильность стволовых клеток взрослого организма

Проблема нестабильности генома существует не только в ЭСК человека и в их дифференцированных производных, но и в стволовых клетках взрослого организма. Из данных литературы следует, что есть достаточное количество генетически стабильных линий взрослых стволовых клеток. Но в ряде исследований выявлена геномная нестабильность. Например, в МСК костного мозга на ранних пассажах наблюдается клональная генетическая нестабильность, включающая в себя анеуплоидию отдельных хромосом, но не связанная с адаптивными кариотипическими изменениями и не способствующая дальнейшей трансформации (Tarte et al., 2010). Более того, трисомия по хромосоме 5 и редкие трисомии по хромосомам 8 и 20, по-видимому, являются вредными для выживания клеточной популяции, так как они быстро исчезают в процессе культивирования. Через 8 нед после трансплантации культуры МСК с хромосомными нарушениями у иммунодефицитных мышей не было обнаружено опухолей. Отсутствие опухолей показано также через 2 года после аналогичной трансплантации пациенту. Причем установлено, что наблюдаемая генетическая нестабильность не зависит от условий культивирования, а, скорее, зависит от конкретного донора (Tarte et al., 2010). В другом исследовании показано наличие уже трансформированной клеточной популяции из МСК костного мозга взрослого человека на ранних пассажах (Wang et al., 2005). Кариотипические изменения состояли в моносомии по хромосоме X и в дупликациях по хромосомам 10

(10q26), 16 (16p13.3) и 18 (18p11.2). Авторы предполагают, что в данном случае возможно присутствие небольшого количества аномальных клеток уже в костном мозге донора, частота которых увеличилась при последующем культивировании *in vitro*.

С помощью метода сравнительной геномной гибридизации (aCGH), позволяющего провести полногеномную идентификацию хромосомных изменений, показано, что уже после 3-го пассажа в МСК из пупочного канатика обнаруживаются клоны, несущие геномные нарушения, представляющие трисомию по хромосоме 10 и делецию района хромосомы 7 (7q35) (Borghesi et al., 2013). Частота этих нарушений возрастала при последующем культивировании, что свидетельствует о пролиферативном преимуществе этих клеток. Несмотря на то что клетки в процессе культивирования миновали фазу старения и возобновили активную пролиферацию, в момент исследования они не приобрели выраженного опухолевого фенотипа. Анализ микросателлитной ДНК подтвердил отсутствие контаминации другими клетками. Также показано, что в некоторых клонах МСК из пупочного канатика при культивировании до 30-го пассажа обнаруживаются геномные изменения, но без опухолевой трансформации (Wang et al., 2013).

Рассмотрим подробно работу, в которой собран большой материал по численным и структурным хромосомным нарушениям в линиях стволовых клеток, выделенных из разных источников (Ben-David et al., 2011). Показано, что при анализе 144 культур МСК хромосомные aberrации встречаются в 4 % всех просмотренных вариантов. В двух линиях отмечены моносомия по хромосоме 13, в четырех — моносомия по хромосоме 6q, в одной — увеличение копий хромосом 7q и 17q и еще в одной — трисомия по хромосоме 19. В нейральных стволовых клетках (НСК) были выявлены трисомия по хромосомам 7 и 19, моносомия и трисомия по хромосомам 10 и 18 соответственно. В целом частота aberrаций при просмотре 97 культур НСК составляет 9 %. Большинство идентифицированных aberrаций повторяется в определенном типе стволовых клеток. Так, показано, что моносомия по хромосоме 6q и 13 преимущественно наблюдаются в МСК, трисомия по хромосоме 19 — в НСК. Хромосомные изменения могут быть как на ранних, так и на поздних пассажах. Авторы приводят данные по сходству между отмеченными хромосомными нарушениями в МСК и НСК с имеющимися нарушениями в определенных опухолях. Так, в МСК моносомия по хромосоме 13 сходна с мезенхимными опухолями (липомы, хондросаркомы и остеосаркомы), в НСК трисомия по хромосоме 7 — с различными опухолями мозга. Показана корреляция между снижением экспрессии туморсупрессорного гена *Rb*, который локализован в хромосоме 13 (13q14) в культурах МСК, и моносомией по этой хромосоме и опухолями мезенхимного происхождения. Тем не менее авторы отмечают, что сходство между хромосомными aberrациями в культурах и опухолях не означает обязательного приобретения клетками опухолевых свойств.

Особое внимание следует обратить на результаты, свидетельствующие о спонтанной иммортализации взрослых стволовых клеток. За последние несколько лет появились данные, свидетельствующие о возможности спонтанной трансформации МСК (Rubio et al., 2005; Rosland et al., 2009). Но через некоторое время последовало опровержение от самих авторов, которые обнаружили с помощью анализа коротких tandemных повторов ДНК

(STR) контаминацию клетками опухолевых линий HT-1080, остеосаркомы U-2 OS, U-251 и U-373 (De la Fuente et al., 2010; Torsvik et al., 2010). В другой работе трансплантация длительно культивируемых нормальных нейральных стволовых клеток hsNSC привела к спонтанной иммортализации и опухолевой трансформации *in vivo* (Wu et al., 2011). В результате выделенные из внутричерепной опухоли клетки образовали иммортализованную злокачественную линию T1, характеризующуюся, в частности, неслучайными кариотипическими изменениями, связанными как с анеуплоидией, так и со структурными перестройками разных хромосом. Авторы предполагают, что причиной малигнизации было длительное культивирование клеток исходной неиммортализованной линии, в процессе которого произошла мутация в гене рецептора эпидермального фактора роста *EGFR*. Но следует подчеркнуть, что проведенный ими сравнительный анализ коротких tandemных повторов ДНК (STR) не подтвердил одинакового происхождения этих линий, что авторы объяснили значительной генетической нестабильностью линии T1. Однако другие авторы, проанализировавшие повторно с помощью STR полученные линии hsNSC и T1, а также варианты линии HeLa, пришли к заключению о том, что линия T1 идентична линии HeLa, т. е. тоже имеет место контаминация опухолевыми клетками. Поэтому полученные данные вызывают большие сомнения (Torsvik et al., 2012).

Привлекает внимание работа, в которой был проведен сравнительный анализ длины теломер у МСК крысы, которые обладают способностью к спонтанной трансформации с признаками малигнизации, и МСК человека, у которых этот феномен практически отсутствует. Авторы пришли к выводу о том, что причиной различий между этими видами являются изначально более короткие теломеры у МСК человека и в связи с этим невозможность этих клеток избежать репликативного старения (He et al., 2014). Тем не менее совсем недавно были представлены новые результаты о спонтанной опухолевой трансформации МСК из костного мозга человека при длительном культивировании (Pan et al., 2014). На основании представленных доказательств, включая анализ коротких tandemных повторов ДНК (STR), подтверждающий отсутствие клеточной контаминации, эти результаты пока представляются более убедительными, чем предыдущие. Геномная нестабильность, выявленная с помощью полногеномного анализа ДНК-профиля, проявилась в изменениях числа копий ДНК. В частности, несколько аномалий было выявлено в хромосоме 1. Подобные аномалии встречаются, например, в миелоидных малигнизациях. Была выявлена экспрессия ряда генов, специфичных для трансформированных клеток, которые могли бы потенциально служить биомаркерами для диагностики культур с целью раннего выявления возможной трансформации. Тем не менее нельзя исключить корректив в результате дальнейших углубленных исследований полученной трансформированной линии.

Таким образом, приведенные в обзоре данные свидетельствуют о том, что вопрос о геномной нестабильности взрослых стволовых клеток находится в стадии накопления результатов; обобщающие выводы по геномной нестабильности пока сделать сложно. Тем не менее очевидно, что геномная нестабильность взрослых стволовых клеток существует, хотя она возникает гораздо реже, чем в ЭСК. Поэтому с учетом использования взрослых стволовых клеток, и в частности МСК, в терапевтических це-

лях для лечения различных заболеваний необходима выработка общих принципов анализа МСК.

На международной конференции (Cell Products Working Party and the Committee for Advanced Therapies) с участием ведущих европейских экспертов был дан ряд рекомендаций по работе с МСК (Barkholt et al., 2013). В частности, необходимо выбрать условия культивирования, при которых клетки будут равномерно пролиферировать со средней скоростью без добавления большого количества ростовых факторов. Надо поддерживать минимальное число удвоений клеточных популяций с целью избежания хромосомных аномалий, использовать для цитогенетического анализа как кариотипические, так и молекулярные методы. Рекомендуется инициировать несколько клеточных образцов для вхождения в фазу старения, чтобы получить информацию об их потенциальной геномной нестабильности при использовании более экстремальных условий. Относительно последней рекомендации есть данные о возможности приобретения МСК опухолевых свойств при воздействии различными стрессами (Crowder et al., 2013; Tang et al., 2013). Кроме того, с учетом возможности использования стволовых клеток для лечения различных заболеваний надо иметь в виду, что хроническое воспаление связано с увеличением экспрессии цитокинов, АФК, азотных соединений и хемокинов, т. е. с изменением микроокружения, что может инициировать геномную нестабильность (Roschke, Rozenblum, 2013). Из-за неоднозначности получаемых результатов следует обязательно контролировать состояние взрослых стволовых клеток с помощью молекулярно-генетического анализа для исключения их контаминации опухолевыми клетками. Этот вопрос приобретает еще большее значение в связи с использованием взрослых стволовых клеток, в частности МСК, в регенеративной медицине.

Заключение

Суммируя рассмотренные данные, можно сделать вывод о том, что во всех типах стволовых клеток человека может возникать геномная нестабильность. Но частота и характер этой нестабильности разные. В ЭСК часть геномных изменений носит адаптивный характер. Эти адаптивные кариотипические изменения, частота которых существенно увеличивается при длительном культивировании, с одной стороны, способствуют постоянному самообновлению ЭСК, а с другой — малигнизации. Геномная нестабильность в дифференцированных производных опосредована возможностью перехода адаптивных изменений ЭСК в дифференцированные производные, а также возникновением геномных изменений под влиянием новых условий культивирования, связанных с направленной дифференцировкой. Возможно также и отсутствие геномной нестабильности в дифференцированных производных кариотипически нестабильных линий ЭСК. Данные по геномной нестабильности взрослых стволовых клеток находятся в стадии накопления. Обобщающие выводы о характере геномной нестабильности пока сделать сложно. Очевидно только, что частота возникновения нестабильности взрослых стволовых клеток значительно ниже, чем ЭСК. С учетом возможности использования всех стволовых клеток в биомедицинских технологиях необходимо проведение периодического контроля геномной стабильности этих линий с использованием кариотипических и молекулярных мето-

дов анализа. На основании результатов, полученных при исследовании геномной нестабильности взрослых стволовых клеток, следует подчеркнуть необходимость проведения молекулярно-генетического анализа с целью исключения контаминации стволовых клеток опухолевыми клетками.

Автор выражает глубокую благодарность Т. К. Яковлевой (Институт цитологии РАН) за ценные советы при обсуждении статьи.

Список литературы

- Гаврилов Л. А., Гаврилова Н. С. 1991. Биология продолжительности жизни. М.: Наука. 280 с. (Gavrilov L. A., Gavrilova N. S. 1991. Biology lifetime. M.: Nauka. 280 p.)
- Гордеева О. Ф., Миталипов Ш. М. 2008. Плюрипотентные стволовые клетки: поддержание генетической и эпигенетической стабильности и перспективы клеточных технологий. Онтогенез. 39 (6) : 405—419. (Gordeeva O. F., Mitalipov Sh. M. 2008. Pluripotent stem cells: maintenance of genetic and epigenetic stability and prospects of cell technologies. Ontogenez. 39 (6) : 405—419.)
- Домнина А. П., Фридрихская И. И., Земелько В. И., Пуговкина Н. А., Ковалева З. В., Зенин В. В., Гринчук Т. М., Никольский Н. Н. 2013. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации. Цитология. 55 (1) : 69—74. (Domnina A. P., Fridlianskaia I. I., Zemelko V. I., Pugovkina N. A., Kovaleva Z. V., Zenin V. V., Grinchuk T. M., Nikolsky N. N. 2013. Mesenchymal stem cells of human endometrium do not undergo spontaneous transformation during long-term cultivation. Tsitologiya. 55 (1) : 69—74.)
- Дункан Э. Л., Реддел Р. Р. 1997. Генетические изменения, связанные с иммортализацией. Биохимия. 62 (11) : 1477—1490. (Duncan E. L., Reddel R. R. 1997. Genetic changes associated with immortalization. Biochemistry. 62 (11) : 1477—1490.)
- Кольцова А. М., Воронкина И. В., Гордеева О. Ф., Зенин В. В., Лифанцева Н. В., Мусорина А. С., Смагина Л. В., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2012. Разработка новой бесфицелной системы и характеристика полученных в ней сублиний эмбриональных стволовых клеток человека при аутогенном и аллогенном культивировании. Цитология. 54 (8) : 637—651. (Koltsova A. M., Voronkina I. V., Gordeeva O. F., Zenin V. V., Lifantseva N. V., Musorina A. S., Smagina L. V., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2012. Developing of a new feeder-free system and characterization of human embryonic stem cell sublines derived in this system under autogenic and allogenic culturing. Tsitologiya. 54 (8) : 637—651.)
- Кольцова А. М., Гордеева О. Ф., Крылова Т. А., Лифанцева Н. В., Мусорина А. С., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. 2011. Сравнительные характеристики новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a. Онтогенез. 42 (4) : 249—263. (Koltsova A. M., Gordeeva O. F., Krylova T. A., Lifantseva N. V., Musorina A. S., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. 2011. Comparative characteristics of new human embryonic stem cell lines SC5, SC6, SC7 and SC3a. Ontogenez. 42 (4) : 249—263.)
- Микер А. К., Коффи Д. С. 1997. Теломераза: многообещающий маркер биологического бессмертия половых, стволовых и раковых клеток. Биохимия. 62 (11) : 1547—1557. (Meeker A. K., Coffey D. S. 1997. Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem and cancer cells. Biochemistry. 62 (11) : 1547—1557.)
- Прайс К. М. 1997. Синтез теломерной С-цепи. Биохимия. 62 (11) : 1423—1431. (Price C. M. 1997. Synthesis of telomeric C-strand. Biochemistry. 62 (11) : 1423—1431.)
- Реддел Р. Р., Брайан Т. М., Мернейн Д. П. 1997. Иммортализованные клетки без измеримой активности теломеразы. Биохимия. 62 (11) : 1467—1476. (Reddel R. R., Bryan T. M., Murnan

- ne J. P. 1997. Immortalized cells with no detectable telomerase activity. *Biochemistry*. 62 (11) : 1467—1476.)
- Хейфлик Л. 1997. Смертность и бессмертие на клеточном уровне. *Биохимия*. 62 (11) : 1380—1393. (Hayflick L. 1997. Mortality and immortality at the cellular level. *Biochemistry*. 62 (11) : 1380—1393.)
- Amps K., Andrews P. W., Anyfantis G., Armstrong L., Avery S. et al. 2011. The international stem cell initiative. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat. Biotechnol.* 29 : 1132—1144.
- Ardehali R., Inlay M. A., Ali S. R., Tang C., Drukker M., Weissman I. L. 2011. Overexpression of BCL2 enhances survival of human embryonic stem cells during stress and obviates the requirement for serum factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 108 : 3282—3287.
- Artandi S. E., DePinho R. A. 2010. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 31 : 9—18.
- Baker D. E. C., Harrison N. J., Maltby E., Smith K., Moore H. D., Shaw P. J., Heath P. R., Holden H., Andrews P. W. 2007. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vitro*. *Nat. Biotechnol.* 25 : 207—215.
- Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Büscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Mačičulaitis R., Palomäki T., Schneider C. K., Sensebé L., Tachdjian G., Tarte K., Tosca L., Salmikangas P. 2013. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies—bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy*. 15 : 753—759.
- Ben-David U., Mayshar Y., Benvenisty N. 2011. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. *Cell Stem Cell*. 92 : 97—102.
- Biancotti J. C., Narwani K., Mandefro B., Golan-Lev T., Buehler N., Hill D., Svendsen C. N., Benvenisty N. 2012. The *in vitro* survival of human monosomies and trisomies as embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 9 : 218—224.
- Bodnar A. G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu C. P., Morin G. B., Harley C. B., Shay J. W., Lichtsteiner S., Wright W. E. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 279 : 349—352.
- Borghesi A., Avanzini M. A., Novara F., Mantelli M., Lenta E., Achille V., Cerbo R. M., Tziella C., Longo S., De Silvestri A., Zimmermann L. J., Manzoni P., Zecca M., Spinillo A., Maccario R., Zuffardi O., Stronati M. 2013. Genomic alterations in human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells call for stringent quality control before any possible therapeutic approach. *Cytotherapy*. 15 : 1362—1373.
- Cowan C. A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J. P., Wang S., Morton C. C., McMahon A. P., Powers D., Melton D. A. 2004. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *New Engl. J. Med.* 350 : 1353—1356.
- Crowder S. W., Horton L. W., Lee S. H., McClain C. M., Hawkins O. E., Palmer A. M., Bae H., Richmond A., Sung H. J. 2013. Passage-dependent cancerous transformation of human mesenchymal stem cells under carcinogenic hypoxia. *FASEB J.* 27 : 2788—2798.
- De la Fuente R. L., Bernad A., Garcia-Castro J., Martin M. C., Cigudosa J. C. 2010. Retraction: spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 7016 : 6682.
- Draper J. S., Smith K., Gokhale P., Moore H. D., Maltby E., Johnson J., Meisner L., Zwaka T. P., Thomson J. A., Andrews P. W. 2004. Recurrence gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 22 : 53—54.
- Feki A., Bosman A., Dubuisson J. B., Irion O., Dahoun S., Pelte M. F., Hovatta O., Jaconi M. E. 2008. Derivation of the first Swiss human embryonic stem cell line from a single blastomere of an arrested four-cell stage embryo. *Swiss Med. Wkly.* 138 : 540—550.
- Gopalakrishna-Pillai S., Iverson L. E. 2010. Astrocytes derived from trisomic human embryonic stem cells express markers of astrocytic cancer cells and premalignant stem-like progenitors. *BMC Med. Genomics.* 27 : 3—12.
- Harrison N. J., Baker D., Andrews P. W. 2007. Culture adaptation of embryonic stem cells eschews germ cell malignancy. *Int. J. Androl.* 30 : 275—281.
- Hayflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37 : 614—636.
- He L., Zheng Y., Wan Y., Song J. 2014. A shorter telomere is the key factor in preventing cultured human mesenchymal stem cells from senescence escape. *Histochem. Cell Biol.* Doi: 10.1007/s00418-014-1210-5.
- Herszfeld D., Wolvetang E., Langton-Bunker E., Chung T. L., Filipczyk A. A., Houssami S., Jamshidi P., Koh K., Laslett A. L., Michalska A., Nguyen L., Reubinoff B. E., Tellis I., Auerbach J. M., Ording C. J., Looijenga L. H., Pera M. F. 2006. CD30 is a survival factor and a biomarker for transformed human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 24 : 351—357.
- Hovatta O., Jaconi M., Töhönen V., Béna F., Gimelli S., Bosman A., Holm F., Wyder S., Zdobnov E. M., Irion O., Andrews P. W., Antonarakis S. E., Zucchelli M., Kere J., Feki A. 2010. A teratocarcinoma-like human embryonic stem cell (hESC) line and four hESC lines reveal potentially oncogenic genomic changes. *PLoS ONE*. 5 (4) : e10263.
- Hyka-Nouspikel N., Desmarais J., Gokhale P. J., Jones M., Meuth M., Andrews P. W., Nouspikel T. 2012. Deficient DNA damage response and cell cycle checkpoints lead to accumulation of point mutations in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 30 : 1901—1910.
- Imreh M. P., Gertow K., Cederwall J., Unger C., Holmberg K., Szoke K., Csoregh L., Fried G., Dilber S., Blennow E., Ahrlund-Richter L. 2006. *In vitro* culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells. *J. Cell. Biochem.* 99 : 508—516.
- Inzunza J., Sahlen S., Holmberg K., Stromberg A. M., Teerijoki H., Blennow E., Hovatta O., Malmgren H. 2004. Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation. *Mol. Hum. Reprod.* 10 : 461—466.
- Jeon B. G., Kumar B. M., Kang E. J., Ock S. A., Lee S. L., Kwack D. O., Byun J. H., Park B. W., Rho G. J. 2011. Characterization and comparison of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity and gene expression in human mesenchymal stem cells and cancer cells of various origins. *Cell Tissue Res.* 345 : 149—161.
- Karagiannidou A. L., Varela I., Giannikou K., Tzetis M., Spyropoulos A., Paterakis G., Petrakou E., Theodosaki M., Goussatis E., Kanavakis E. 2014. Mesenchymal derivatives of genetically unstable human embryonic stem cells are maintained unstable but undergo senescence in culture as do bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Reprogram.* 16 : 1—8.
- Ludwig T. E., Bergendahl V., Levenstein M. E., Yu J., Probasco M. D., Thomson J. A. 2006. Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat. Methods*. 3 : 637—646.
- MacLeod R. A. F., Drexler H. G. 2013. Classical and molecular cytogenetic analysis. *Methods Mol. Biol.* 946 : 39—60.
- Maitra A., Arking D. E., Shivapurkar N., Ikeda M., Stastny V., Kassauei K., Sui G., Cutler D. J., Liu Y., Brimble S. N., Noaks-Kon K., Hyllner J., Schulz T. C., Zeng X., Freed W. J., Crook J., Abraham S., Colman A., Sartipy P., Matsui S., Carpenter M., Gazdar A. F., Rao M., Chakravarti A. 2005. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 37 : 1099—1103.
- Mantel C., Guo Y., Lee M. R., Kim M. K., Han M. K., Shibayama H., Fukuda S., Yoder M. C., Pelus L. M., Kim K. S., Broxmeyer H. E. 2007. Checkpoint-apoptosis uncoupling in human and mouse embryonic stem cells: a source of karyotypic instability. *Blood*. 109 : 4518—4527.
- Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L. 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J. Gerontol.* 34 : 328—334.
- Meisner L. F., Johnson J. 2008. Protocols for cytogenetics studies of human embryonic stem cells. *Methods*. 45 : 133—141.
- Närvä E., Autio R., Rahkonen N., Kong L., Harrison N., Kitsberg D., Borghese L., Itskovitz-Eldor J., Rasool O., Dvorak P., Hovatta O., Otonkoski T., Tuuri T., Cui W., Brustle O., Baker D., Malt-

- by E., Moore H. D., Benvenisty N., Andrews P. W., Yli-Harja O., Lahesmaa R. 2010. High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity. *Nat. Biotechnol.* 28 : 371—377.
- Nouspikel T. 2013. Genetic instability in human embryonic stem cells: prospects and caveats. *Future Oncol.* 9 : 867—877.
- Ogura F., Wakao S., Kuroda Y., Tsuchiyama K., Bagheri M., Heneidi S., Chazenbalk G., Aiba S., Dezawa M. 2014. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cells Develop.* 23 : 717—728.
- Pan Q., Fouraschen S. M., de Ruiter P. E., Dinjens W. N., Kwekkeboom J., Tilanus H. W., van der Laan L. J. 2014. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 239 : 105—115.
- Peterson S. E., Loring J. F. 2014. Genomic instability in pluripotent stem cells: implications for clinical applications. *J. Biol. Chem.* 289 : 4578—4584.
- Plaia T. W., Josephson R., Liu Y., Zeng X., Orbing C., Toumadje A., Brimble S. N., Sherrer E. S., Uhl E. W., Freed W. J., Schulz T. C., Maitra A., Rao M. S., Auerbach J. M. 2006. Characterization of a new NIH registered variant human embryonic stem cell line BGO1V: a tool for human embryonic stem cell research. *Stem Cells.* 24 : 531—546.
- Richards M., Fong C. Y., Chan W. K., Wong P. C., Bongso A. 2002. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 20 : 933—936.
- Richards M., Tan S., Fong C.-Y., Biswas A., Chan W.-K., Bongso A. 2003. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 21 : 546—556.
- Roschke A. V., Rozenblum E. 2013. Multi-layered cancer chromosomal instability phenotype. *Front. Oncol.* 3 : 302.
- Rosland G. V., Svendsen A., Torsvik A., Sobala E., McCormack E., Immervoll H., Mysliwicz J., Tonn J. C., Goldbrunner R., Lønning P. E., Bjerkvig R., Schichor C. 2009. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* 69 : 5331—5339.
- Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M. C., de la Fuente R., Cigudosa J. C., Lloyd A. C., Bernad A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 65 : 3035—3039.
- Serakinci N., Graakjaer J., Kolvraa S. 2008. Telomere stability and telomerase in mesenchymal stem cells. *Biochimie.* 90 : 33—40.
- Sherr C. J., DePinho R. A. 2000. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell.* 102 : 407—410.
- Skottman H., Hovatta O. 2006. Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction.* 132 : 691—698.
- Spits C., Mateizel I., Geens M., Mertzanidou A., Staessen C., Vandekelde Y., Van der Elst J., Liebaers I., Sermon K. 2008. Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 26 : 1361—1363.
- Sun Y., Yang Y., Zeng S., Tan Y., Lu G., Lin G. 2014. Identification of proteins related to epigenetic regulation in the malignant transformation of aberrant karyotypic human embryonic stem cells by quantitative proteomics. *PLoS ONE.* 9 : e85823.
- Taapken S. M., Nisler B. S., Newton M. A., Sampsel-Barron T. L., Leonhard K. A., McIntire E. M., Montgomery K. D. 2011. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29 : 313—314.
- Tang Q., Chen Q., Lai X., Liu S., Chen Y., Zheng Z., Xie Q., Maldonado M., Cai Z., Qin S., Ho G., Ma L. 2013. Malignant transformation potentials of human umbilical cord mesenchymal stem cells both spontaneously and via 3-methylcholanthrene induction. *PLoS ONE.* 8 : e81844.
- Tarte K., Gaillard J., Lataillade J. J., Fouillard L., Becker M., Mossafa H., Tchirkov A., Rouard H., Henry C., Splingard M., Dulong J., Monnier D., Gourmelon P., Gorin N. C., Sensebé L. on behalf of Société Française de Greffe de Moelle et Thérapie Cellulaire. 2010. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood.* 115 : 1549—1553.
- Torsvik A. L., Rosland G. V., Bjerkvig R. 2012. Spontaneous transformation of stem cells *in vitro* and the issue of cross-contamination. *Int. J. Biol. Sci.* 8 : 1051—1052.
- Torsvik A., Rosland G. V., Svendsen A., Molven A., Immervoll H., McCormack E., Lønning P. E., Primon M., Sobala E., Tonn J. C., Goldbrunner R., Schichor C., Mysliwicz J., Lah T. T., Motaln H., Knappskog S., Bjerkvig R. 2010. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track — letter. *Cancer Res.* 70 : 6393—6396.
- Varela C., Denis J. A., Polentes J., Feyeux M., Aubert S., Champon B., Piétu G., Peschanski M., Lefort N. 2012. Recurrent genomic instability of chromosome 1q in neural derivatives of human embryonic stem cells. *J. Clin. Invest.* 122 : 569—574.
- Villa-Diaz L. G., Nandivada H., Ding J., Nogueira-de-Souza N. C., Krebsbach P. H., O'Shea K. S., Lahann J., Smith G. D. 2010. Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 28 : 581—583.
- Wang Y., Huso D. L., Harrington J., Kellner J., Jeong D. K., Turney J., McNiece I. K. 2005. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy.* 7 : 509—519.
- Wang Y., Zhang Z., Chi Y., Zhang Q., Xu F., Yang Z., Meng L., Yang S., Yan S., Mao A., Zhang J., Yang Y., Wang S., Cui J., Liang L., Ji Y., Han Z. B., Fang X., Han Z. C. 2013. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis.* 4 : e950.
- Werbowetski-Ogilvie T. E., Morrison L. C., Fiebig-Comyn A., Bhatia M. 2012. *In vivo* generation of neural tumors from neoplastic pluripotent stem cells models early human pediatric brain tumor formation. *Stem Cells.* 30 : 392—404.
- Wu W., He Q., Li X., Zhang X., Lu A., Ge R., Zhen H., Chang A. E., Li Q., Shen L. 2011. Long-term cultured human neural stem cells undergo spontaneous transformation to tumor-initiating cells. *Int. J. Biol. Sci.* 7 : 892—901.
- Yang S., Lin G., Tan Y. Q., Deng L. Y., Yuan D., Lu G. X. 2010. Differences between karyotypically normal and abnormal human embryonic stem cells. *Cell Prolif.* 43 : 195—206.
- Yang S., Lin G., Tan Y. Q., Zhou D., Deng L. Y., Cheng D. H., Luo S. W., Liu T. C., Zhou X. Y., Sun Z., Xiang Y., Chen T. J., Wen J. F., Lu G. X. 2008. Tumor progression of culture-adapted human embryonic stem cells during long-term culture. *Genes Chromosomes Cancer.* 47 : 665—679.
- Zucchelli M., Ström S., Holm F., Malmgren H., Sahlén S., Religa P., Hovatta O., Kere J., Inzunza J. 2012. *In vivo* differentiated human embryonic stem cells can acquire chromosomal aberrations more frequently than *in vitro* during the same period. *Stem Cells Develop.* 21 : 3363—3371.

THE PROBLEM OF GENOMIC INSTABILITY OF CULTIVATED HUMAN STEM CELLS

G. G. Poljanskaya

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru

The wide application of human stem cells in biomedical technologies leads to the necessity to analyze the genomic stability of cultivated stem cells of different origin. The review presents data on genetically stable and unstable continuous lines of human embryonic stem cells (hESC), their differentiated derivatives and adult stem cells. Causes of genomic instability occurrence are considered and analysis of the methods used to study the genome of cell lines has been carried out. The results presented in this review demonstrate the need for periodic control of genomic instability of all types of stem cells. Molecular-genetic analysis in order to avoid contamination of adult stem cell lines by tumor cells is also needed. This aspect is particularly important in connection with the active use of the adult stem cells for regenerative medicine.

Key words: embryonic stem cells, mesenchymal stem cells, neural stem cells, telomere, karyotypic structure, genomic instability.
