

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА МЕТОДАМИ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНОГО КАРИОТИПИРОВАНИЯ

© М. А. Шилина,¹ Т. М. Гринчук, Н. Н. Никольский

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹ электронный адрес: shili-mariya@yandex.ru

Цель настоящего исследования — оценить генетическую стабильность методом дифференциальной окраски хромосом на G-диски и методом молекулярного кариотипирования на примере одной линии ЭМСК и сравнить разрешающую способность каждого метода для исследования стабильности генетического аппарата ЭМСК. Анализ метафазных платинок (пассажи 6 и 15) методом G-бэндинга показал, что на обоих этапах культивирования преимущество (более 80 %) имели клетки со стандартным набором хромосом. В кариотипически «дефектных» клетках хромосомные изменения (анеуплоидия, изохромосомы, хромосомы с поломками и межхромосомные ассоциации с возникновением псевдодвулучий хромосом) носили случайный характер. Молекулярное кариотипирование, проведенное на этих же пассажах, показало стабильность генетического материала каждой хромосомы. Исключение составили хромосомы 7 и 14, в которых были выявлены микродупликации в локусах 7q36.3 (62 кб) и 14q11.2 (165кб). Предполагается, что данные изменения обусловлены генетическими особенностями донора данных клеток. Сопоставление результатов морфологического и молекулярного кариотипирования позволяет считать, что использованные в работе методы дополняют друг друга в определении генетической стабильности клеток.

Ключевые слова: кариотипирование, молекулярное кариотипирование, стволовые клетки.

Принятые сокращения: ЭМСК — эндометриальные мезенхимные стволовые клетки, МСК — мезенхимные стволовые клетки.

Применение мезенхимных стволовых клеток (МСК) в регенеративной медицине с каждым годом получает все большее развитие. В настоящее время известно несколько источников получения МСК — костный мозг, жировая ткань, десквамированный эндометрий и пуповинная кровь (Parker, Katz, 2006; Bieback, Klitter, 2007). Основными достоинствами этих клеток являются доступность их получения и отсутствие этических проблем при использовании. Они относительно легко культивируются, обладают высоким пролиферативным потенциалом *in vitro*, характеризуются мультипотентностью, способностью секретировать факторы, улучшающие трофику и оказывающие иммуномодулирующее и противовоспалительное действие (Phinney, Sensebe, 2013).

Использование МСК в терапевтических целях подразумевает наличие их генетической стабильности, в частности стабильного кариотипа. Тем не менее в настоящее время в литературе нет полной ясности относительно генетической стабильности МСК при наращивании биомассы *in vitro* в терапевтических целях. Несмотря на то что во многих публикациях есть указания на то, что МСК при культивировании характеризуются постоянством структуры кариотипа, данные некоторых авторов показывают, что при переводе в систему *in vitro* кариотип МСК претерпевает те или иные изменения. Одни авторы придерживаются точки зрения о том, что случайные кариотипи-

ческие изменения клеток не поддерживаются отбором в процессе культивирования и, следовательно, не вызовут проблем при их клиническом использовании (Bernardo et al., 2007; Tarte et al., 2010; Sensebe et al., 2012; Jones et al., 2013; Roemeling-van Rhijn et al., 2013; Roselli et al., 2013; Zaman et al., 2014). Другие считают, что при определенных обстоятельствах возникшие кариотипические нарушения могут получить селективное преимущество и потенциально стать источником клеточной трансформации (Buyanovskaya et al., 2009; Ben-David et al., 2011, 2012; Ueyama et al., 2012; Borghesi et al., 2013; Froelich et al., 2013; Borgonovo et al., 2014). Прямые доказательства спонтанной трансформации МСК человека в культуре в литературе отсутствуют. Несколько статей, в которых исходно была описана спонтанная трансформация МСК человека *in vitro*, со временем были отозваны авторами этих работ, так как была показана кроссконтаминация этих культур трансформированными клетками (Rubio et al., 2005; De la Fuente et al., 2010; Torsvik et al., 2010). Тем не менее некоторые предпосылки для обсуждения данной проблемы остаются.

Разными авторами при исследовании независимых клеточных культур МСК, выделенных из костного мозга, было выявлено наличие повторяющихся изменений, связанных с определенными хромосомами, в частности неслучайная трисомия хромосом 5, 7, 8, 9 и 20. Эти авторы

полагают, что количество анеуплоидных вариантов в процессе длительного культивирования может возрастать и стать причиной дальнейшей клеточной иммортализации/трансформации (Tarte et al., 2010; Redaelli et al., 2012). Анализируя миелоидные и лимфоидные злокачественные новообразования, Мительман и соавторы выявили трисомию хромосом 5, 7 и 20 (Mitelman et al., 2014). При изучении МСК костного мозга от пациентов с раком костей и мягких тканей (ретинобластомы с подавлением супрессора опухолей гена RB1) эти же авторы обнаружили моносомию хромосомы 13.

Для оценки генетической стабильности клеток используют разные методы: кариотипирование с использованием дифференциальной окраски хромосом на G-диски, спектральное кариотипирование (SKY), флуоресцентная гибридизация ДНК *in situ* (FISH), сравнительная геномная гибридизация (aCGH) — молекулярное кариотипирование, анализ в условиях цитохалазинового блока (CBMN), микросателлитное генотипирование, сиквенирование РНК и выявление хромосомных aberrаций на основе паттернов экспрессии генов (Wang et al., 2005; Bernardo et al., 2007; Buyanovskaya et al., 2009; Tarte et al., 2010; Ben-David et al., 2011; Tang et al., 2012; Ueyama et al., 2012; Borghesi et al., 2013; Froelich et al., 2013; Jones et al., 2013; Roemeling-van Rhijn et al., 2013; Roselli et al., 2013; Sensebe, 2013; Borgonovo et al., 2014; Cornelio et al., 2014; Zaman et al., 2014). Каждый из методов имеет свою степень точности, чувствительности и диапазон возможностей.

Цель настоящего исследования — оценить генетическую стабильность МСК человека, выделенных из десквамированного эндометрия, в связи с переводом в условия *in vitro* с использованием двух методов кариотипирования — метода дифференциальной окраски хромосом на G-диски и метода молекулярного кариотипирования, основанного на геномной гибридизации на чипах.

В задачу работы входило сопоставить данные каждого метода, оценить их разрешающую способность и вклад в исследование стабильности генетического аппарата МСК в культуре на примере одной линии МСК, полученной из десквамированного эндометрия.

Материал и методика

Биологический материал. Работу проводили на линии эМСК, выделенных из десквамированного эндометрия менструальной крови (Земелько и др., 2011). Клетки культивировали на среде Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 (Gibco, США), содержащей 10 % бычьей фетальной сыворотки (HyClone, США), 1 % антибиотика-антимикотика и 1 % глутамакса (GlutaMAXTM, Gibco, США), пересевали с плотностью 1 : 3—1 : 4 с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA (Invitrogen, США) дважды в неделю.

Для проведения кариотипического анализа окрашенных на G-диски метафазных пластинок клетки рассеивали с плотностью 14—15 тыс. кл./см². Через 23—25 ч в культуральную среду вводили митостатик

колцеид, используя маточный раствор 10 мг/мл (Sigma, США). Время обработки клеток колцеидом составляло 1 ч. После этого среду удаляли, клетки переводили в суспензию, обрабатывая их 0.05%-ным раствором трипсина, центрифугировали, осадок ресуспендировали и обрабатывали гипотоническим раствором KCl (0.56 %) приблизительно 1 ч (время подобрано экспериментально), осаждали центрифугированием (1300 об/мин), ресуспендировали и фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1, на холоде, 3 смены фиксатора, общее время фиксации 1.5 ч). Фиксированный материал раскапывали на холодные, влажные предметные стекла. Препараты в течение 1 нед высушивали при комнатной температуре. Хромосомы окрашивали на G-диски красителем Гимза (Fluka, США) после предварительной трипсинизации. Препараты метафазных пластинок с хорошим разбросом метафазных хромосом анализировали под световым микроскопом Axioscop (Carl Zeiss, Германия) при увеличениях объектива 20× и 100×. Идентифицировали хромосомы в соответствии с Атласом хромосом человека (Мамаева, 2002). Анализ клеток проводили на 6-м и 15-м пассажах.

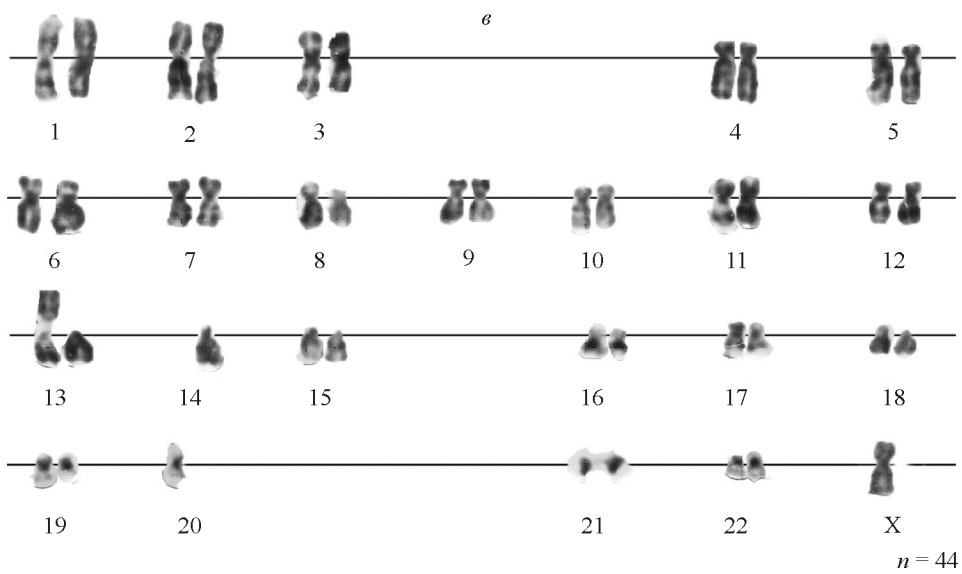
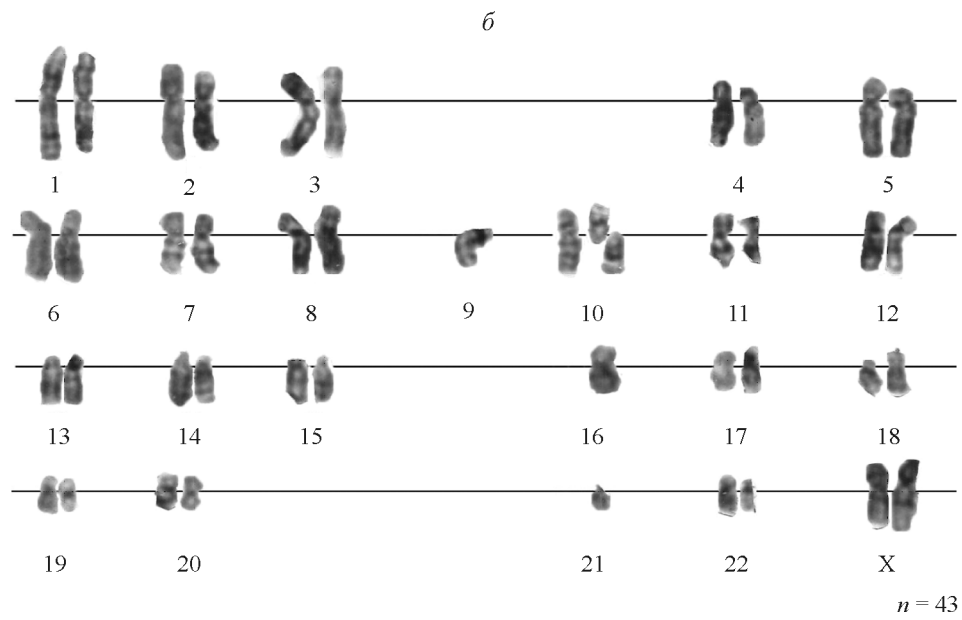
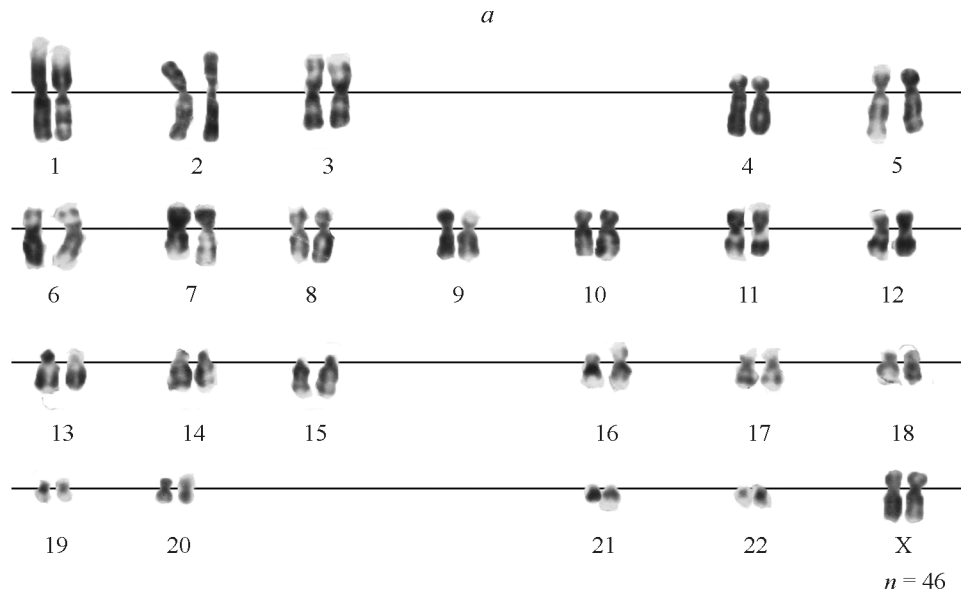
Молекулярное кариотипирование проводили с использованием набора HumanCytoSNP-12 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Клетки анализировали на 6-м и 14-м пассажах. Для анализа их высевали по 300 тыс. на чашку диаметром 6 см. Через 72 ч клетки лизировали для выделения ДНК. Подготовка ДНК для анализа, гибридизация и отмывки, окраска и сканирование препарата были выполнены в соответствии со стандартными протоколами фирмы Illumina. Образцы гибридизовали на олигонуклеотидных микрочипах высокой плотности, содержащих 300 тыс. изотермических зондов, охватывающих неповторяющиеся генные и межгенные области генома человека. Сканирование готовых проб проводили с помощью iScan (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США). Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Genome Studio Genotyping Module и BlueFuse (Illumina).

Результаты

Кариотипирование эМСК методом дифференциальной окраски хромосом на G-диски, проведенное на 6-м и 15-м пассажах, показало, что в обеих популяциях большинство клеток имело набор хромосом, типичный для человека в норме (рис. 1, *a*). На этом фоне единичные клеточные варианты (10 % клеток) характеризовались наличием атипичного кариотипа (рис. 1, *b*, *в*). Выявленные изменения были связаны с наличием моно- (или) трисомии тех или иных хромосом набора и как следствие — с вариабельностью числа хромосом в клетках, с наличием изохромосом, хромосом с поломками и носили случайный характер (см. таблицу). Помимо этого, наблюдали неспецифические слипания негомологичных хромосом (эктопическую конъюгацию), приводящие к возникновению псевдодвуплечих хромосом. На 15-м пассаже неоднократно наблюдали моносомию по X-хромосоме.

Рис. 1. Кариотип эМСК. G-бэндинг.

a — нормальный кариотип, отклонений нет; *b* — 6-й пассаж, моносомия хромосом 9, 16 и 21, прицентромерная поломка одного из гомологов хромосомы 10 с сохранением p- и q-плеч; *в* — 15-й пассаж, эктопическая конъюгация между хромосомами 13 и 14, изохромосома 21, моносомия по хромосомам 20 и X.



Характер кариотипических изменений ЭМСК на разных пассажах

Хромосома	Аберрация						
	пассаж 6				пассаж 15		
	поломки	трисомия	моносомия	нет двух гомологов	моносомия	изохромосома	РТ
1	—	1	—	—	1	—	—
2	—	—	1	—	—	—	—
3	—	—	1	—	—	—	—
4	—	—	—	1	1	—	—
5	—	—	2	—	—	—	—
6	—	—	1	—	1	—	—
7	—	—	—	—	2	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	2	—	—	—	—
10	1	—	—	—	—	—	—
11	—	—	1	—	—	—	—
12	—	—	1	—	1	—	—
13	—	—	1	—	—	—	1
14	—	—	1	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—	1	—
16	1	—	—	—	1	—	—
17	—	—	—	—	2	—	—
18	—	—	—	—	1	—	—
19	—	—	1	—	—	—	—
20	—	—	1	—	1	—	—
21	—	—	1	1	1	—	—
22	—	—	—	—	1	—	—
X	—	—	—	—	5	—	—

Примечание. На 6-м пассаже проанализировано 10 метафаз, на 15-м — 16 метафаз. Отсутствие граф говорит об отсутствии изменений: на 6-м пассаже не обнаружено изохромосом и Робертсоновских транслокаций (РТ), а на 15-м пассаже не обнаружено хромосомных поломок, трисомий и отсутствия двух гомологов.

Молекулярное кариотипирование ЭМСК, проведенное на 6-м и 14-м пассажах, показало, что все пары хромосом (кроме 7 и 14) по своей генетической структуре в 100 % проанализированной популяции не отличались от аналогичных хромосом кариотипического набора человека в норме. Хромосомы 7 и 14 характеризовались наличием микродупликаций, локализованных в локусах 7q36.3 в 62 680 п. н. (62 кб) и 14q11.2 в 165 456 п. н. (165 кб), и маркировали данные клетки (рис. 2).

Обсуждение

В научном мире распространено мнение о том, что дестабилизация кариотипа является одним из проявлений неопластической трансформации. До недавнего времени одним из наиболее распространенных методов оценки кариотипической стабильности был G-бэндинг метафазных хромосом. Показано, что в основе нарушения стабильности клеточного генома лежит нарушение механизма клеточного деления, которое приводит к дисбалансу генетического материала в дочерних клетках. Он вызван поломками хромосомного материала с возможной частичной делецией или транслоцированием, с дупликациями и истинными амплификациями. Эти элементы неста-

бильности, направленные на изменение топологии генома, приводят к ослаблению контроля его генетической стабильности. Развитие метода молекулярного кариотипирования позволило более углубленно подойти к оценке стабильности генетического аппарата на молекулярном уровне.

Сопоставление данных морфологического кариотипирования ЭМСК и молекулярного кариотипирования позволило говорить о том, что полученные в настоящей работе данные представляют характеристику кариотипа клеток на разных уровнях организации генома, и один метод дополняет другой. Как показал анализ G-окрашенных хромосом, ЭМСК уже на раннем, 6-м, пассаже представлены двумя субпопуляциями. Одна характеризуется наличием стандартного кариотипа в большинстве клеток, другая — разнообразными случайными изменениями его структуры, типичными для клеток, претерпевших сбой в программе клеточного деления (Todaro, Green, 1963; Romanov et al., 2001; Miura et al., 2006). Согласно имеющимся данным, в процессе более продолжительного культивирования клеток судьба случайных перестроек может сложиться по-разному: они либо сохраняют статус случайных образований, либо могут быть элиминированы из популяции, либо в силу каких-то обстоятельств не только сохраняются в популяции, но и приобретут селективное

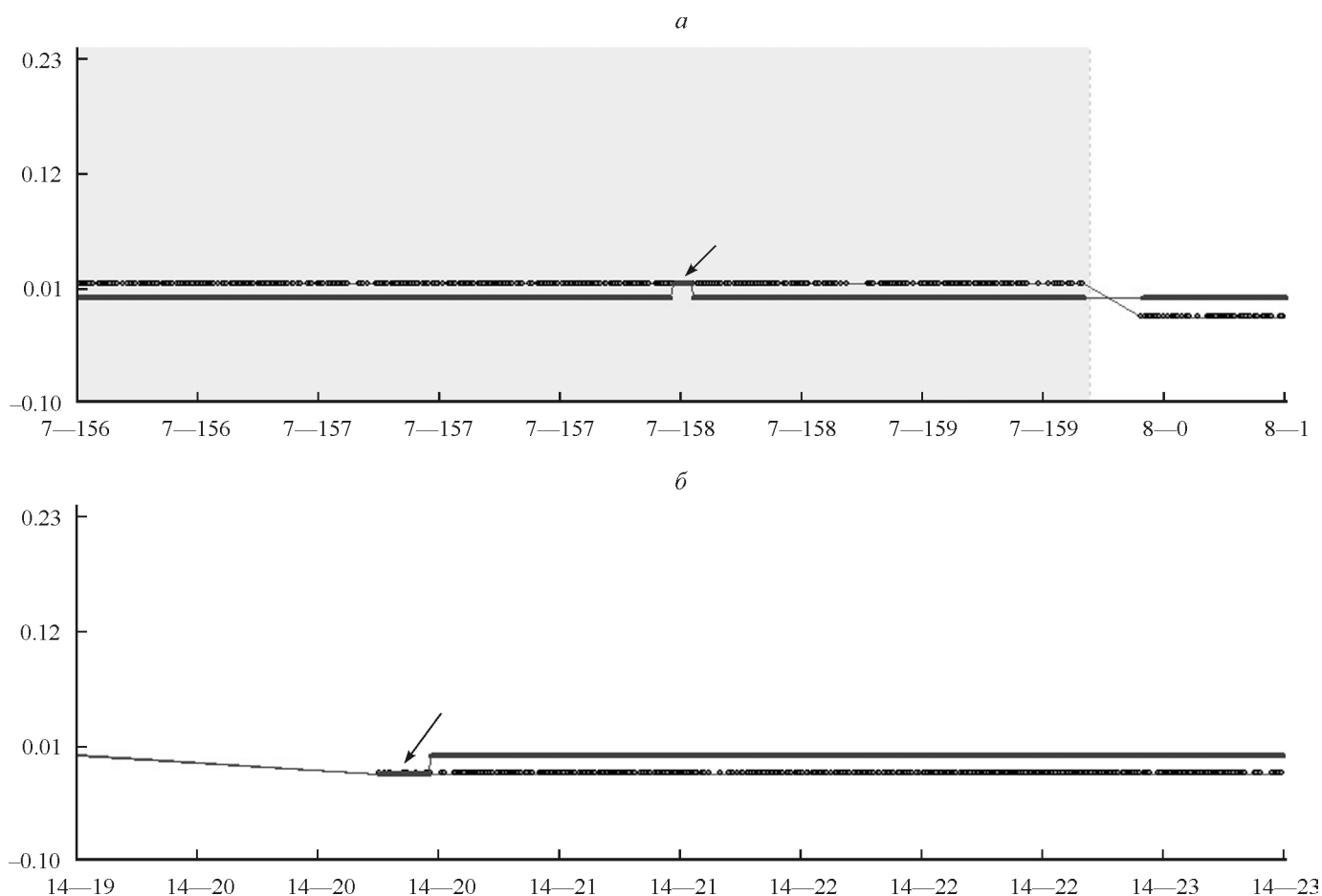


Рис. 2. Результаты молекулярного кариотипирования.

По оси абсцисс — обозначение длины 7-й (а) и 14-й (б) хромосом в геноме; по оси ординат — логарифм величины сигнала, отн. ед. Стрелка показывает дупликацию в 7-й хромосоме (а) локуса 7q36.3 размером 62 680 п. н. (62 кб) и в 14-й хромосоме (б) локуса 14q11.2 размером 165 456 п. н. (165 кб). Точки — отклонения от нормы по каждому из SNP (Single nucleotide polymorphism) только по интенсивности сигнала, сплошная линия — отклонение группы SNP от нормы при комбинировании интенсивности сигнала и генотипа.

преимущество (Bernardo et al., 2007; Rosland et al., 2009; Tarte et al., 2010; Ueyama et al., 2011; Sensebe et al., 2012; Jones et al., 2013; Roemeling-van Rhijn et al., 2013; Roselli et al., 2013; Zaman et al., 2014). Так, показано, что длительное культивирование клеточных линий сопряжено с частичной или полной утратой половых хромосом (Мамаева, 2002; Гринчук и др., 2008; Попов и др., 2009). В настоящей работе методом G-бэндинга в эмСК на 15-м пассаже тоже была выявлена утрата одной из копий X-хромосомы. Это позволило нам предположить, что морфологическая нестабильность структуры кариотипа клеток этой клеточной линии сопровождается элиминацией (полной или частичной) X-хромосомы.

Особенностью применяемого метода молекулярного кариотипирования является то, что конкретные изменения в геноме выявляются в том случае, если они возникли не менее чем у 7 % клеток. Метод фиксирует только количественные изменения ДНК в хромосомах на популяционном уровне и улавливает перестройки начиная с размера 0.5—1 Мб. Классический метод G-бэндинга способен обнаруживать перестройки размером только более 5 Мб.

В работе итальянских исследователей при анализе культур МСК, полученных из костного мозга здоровых доноров методами кариотипирования Q-бандированных

хромосом и методом молекулярного кариотипирования, не было выявлено каритипических изменений на протяжении всего процесса культивирования вплоть до старения культур (Bernardo et al., 2007). В работе других авторов при изучении МСК из жировой ткани методом обычного кариотипирования изменений в процессе культивирования не было выявлено, тогда как методом молекулярного кариотипирования в трех хромосомах одной из линий были обнаружены делеции (Meza-Zepeda et al., 2007). Наши исследования по изучению стабильности кариотипа эмСК после кратковременного воздействия на клетки повышенной температуры, проведенные с использованием тоже двух методов кариотипирования, на фоне вспышки каритипической нестабильности (90 % клеток), выявленной при анализе дифференциально окрашенных хромосом, на молекулярном уровне изменений не выявили (Vinogradov et al., 2016).

В настоящей работе молекулярное кариотипирование не обнаружило отклонений, которые выявляются методом морфологического кариотипирования. Полное совпадение молекулярных характеристик большей части хромосом набора с соответствующими молекулярными характеристиками хромосом человека в норме позволяет говорить о том, что культивирование эмСК (с 6-го по 14-й пассаж) не приводит к нарушению их генетической

стабильности. С этих позиций кариотипическая нестабильность эмСК, обнаруженная с использованием G-бэндинга, может рассматриваться как некий генетический «шум», который в большей или меньшей степени может быть свойствен любой клеточной популяции, особенно в связи с адаптацией к изменению условий существования.

Таким образом, молекулярное кариотипирование эмСК десквамированного эндометрия позволило нам охарактеризовать эту линию как стабильную, несмотря на то что изменения в структуре хромосом, выявленные G-бэндингом, присутствовали. На этом фоне дупликации в хромосомах 7 и 14, обнаруженные только методом молекулярного кариотипирования, но на разных пассажах (6-м и 14-м), заслуживают особого внимания. Существуют данные о том, что изменения в структуре генома клеточных линий МСК могут быть связаны с генетическими особенностями донора, от которого был получен исходный биологический материал. Так, выявлены донорзависимые хромосомные aberrации в пяти культурах МСК, выделенных из костного мозга (Tarte et al., 2010). Обсуждая природу дупликаций в хромосомах 7(7q36.3) и 14(14q11) эмСК, проанализированных нами, можно предположить, что они также связаны с генетическими особенностями донора данных клеточек.

Таким образом, совокупность данных морфологического и молекулярного кариотипирования позволяет получить более полную картину генетической стабильности эмСК, необходимую при подготовке их к использованию в целях регенеративной медицины, и оценить безопасность их использования.

Авторы выражают благодарность компании «Геноаналитика» и Александру Мазуру за помощь в проведении молекулярного кариотипирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068; молекулярное кариотипирование) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-01820; G-бэндинг).

Список литературы

Гринчук Т. М., Иванцов К. М., Алексеенко Л. Л., Кожухарова И. В., Зайчик А. М., Петров И. С., Михайлов В. М., Попов Б. В. 2008. Характеристика культуры мезенхимных стволовых клеток мыши, экспрессирующих GFP. Цитология 50 (12): 1029—1034. (Grinchuk T. M., Ivantsov K. M., Alekseenko L. L., Kozhukharova I. V., Zaichik A. M., Petrov I. S., Mikhailov V. M., Popov B. V. 2008. Characteristics culture mouse mesenchymal stem cells expressing GFP. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 50 (12): 1029—1034.)

Мамаева С. Е. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Науч. мир. 231 с. (Mataveva S. E. 2002. Atlas chromosomes permanent cell lines of human and animals. Moscow: Sci. World. 231 p.)

Попов Б. В., Петров И. С., Михайлов В. М., Томилин А. Н., Алексеенко Л. Л., Гринчук Т. М., Зайчик А. М. 2009. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимных стволовых клеток в культуре *in vitro*. Цитология 51 (2): 91—102. (Popov B. V., Petrov I. S., Mikhailov V. M., Tomilin A. N., Alekseenko L. L., Grinchuk T. M., Zaichik A. M. 2009. Spontaneous transformation and immortalization of mesenchymal stem cells in culture *in vitro*. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 51 (2): 91—102.)

Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Buscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Macculaitis R., Palomaki T., Schneider C.K., Sensebe 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. 9: 97—102.

Ben-David U., Mayshar Y., Benvenisty N. 2012. Significant acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stem cells: response to Sensebe et al. Cell Stem Cell. 10: 10—11.

Bernardo M. E., Zaffaroni N., Novara F., Cometa A. M., Avanzini M. A., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone M. G., Zuffardi O., Locatelli F. 2007. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term *in vitro* culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. Cancer. 67: 9142—9149.

Bickmore W. 2001. Karyotype analysis and chromosome banding. MRC human genetics unit. Encyclopedia Life Sci. 1—7.

Bieback K., Kluter H. 2007. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. Curr. Stem Cell Res. Ther. 2: 310—323.

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.

Borgonovo T., Vaz I. M., Senegaglia A. C., Rebelatto C. L., Brofman P. R. 2014. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a cell technology center. Rev. Bras. Hematol. Hemotol. 36: 202—207.

Buyanovskaya O.A., Kuleshov N.P., Nikitina V.A., Voronina E. S., Katosova L. D., Bochkov N. P. 2009. Spontaneous aneuploidy and clone formation in adipose tissue stem cells during different periods of culturing. Bull. Exp. Biol. Med. 148: 109—112.

Cornélio D. A., Tavares J. C., Pimentel T. V., Cavalcanti G. B., de Medeiros S. R. 2014. Cytokinesis-block micronucleus assay adapted for analysing genomic instability of human mesenchymal stem cells. Stem Cells Develop. 23: 823—838.

De la Fuente R., Bernad A., Garcia-Castro J., Martin M. C., Cigudosa J. C. 2010. Spontaneous human adult stem cell transformation (retraction of vol. 65, pg 3035, 2005). Cancer Res. 70: 6682.

Duarte D. M., Cornélio D. A., Corado C., Medeiros V. K., de Araújo L. A., Cavalcanti G. B. J., de Medeiros S. R. 2012. Chromosomal characterization of cryopreserved mesenchymal stem cells from the human subendothelium umbilical cord vein. Regen. Med. 7: 147—157.

Froelich K., Mickler J., Steusloff G., Technau A., Ramos Tira-do M., Scherzed A., Hackenberg S., Radeloff A., Hagen R., Kleinsasser N. 2013. Chromosomal aberrations and deoxyribonucleic acid single-strand breaks in adipose-derived stem cells during long-term expansion *in vitro*. Cytotherapy. 15: 767—781.

Jones M., Varela-Garcia M., Skokan M., Bryce S., Schowinsky J., Peters R., Vang B., Brecheisen M., Startz T., Frank N., Nankervis B. 2013. Genetic stability of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in the Quantum System. Cytotherapy. 15: 1323—1339.

Meza-Zepeda L. A., Noer A., Dahl J. A., Micci F., Myklebost O., Collas P. 2008. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. J. Cell. Mol. Med. 12: 553—563.

Mitelman F., Johansson B., Mertens F. 2014. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer. Available from: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.

Miura M., Miura Y., Padilla-Nash H., Molinolo A., Fu D., Patel V., Seo B., Sonoyama W., Zheng J. J., Baker C., Chen W., Ried T., Shia S. 2006. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. Stem Cells. 24: 1095—1103.

- Parker A. M., Katz A. J. 2006. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Exp. Opin. Biol. Ther.* 6 : 567—578.
- Phinney D. G., Sensebé L. 2013. Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. *Cytotherapy.* 15 : 140—145.
- Redaelli S., Bentivegna A., Foudah D., Miloso M., Redondo J., Riva G., Baronchelli S., Dalprà L., Tredici G. 2012. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of *in vitro* cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 3 : 47.
- Roemeling-van Rhijn M., de Klein A., Douben H., Pan Q., van der Laan L. J., Ijzermans J. N., Betjes M. G., Baan C. C., Weimar W., Hoogduijn M. J. 2013. Culture expansion induces non-tumorigenic aneuploidy in adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 15 : 1352—1361.
- Romanov S. R., Kozakiewicz K. B., Holst C. R., Stampfer M. R., Haupt L. M., Tlsty T. D. 2001. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature.* 409 : 633—637.
- Roselli E. A., Lazzati S., Iseppon F., Manganini M., Marcato L., Gariboldi M. B., Maggi F., Grati F. R., Simoni G. 2013. Fetal mesenchymal stromal cells from cryopreserved human chorionic villi: cytogenetic and molecular analysis of genome stability in long-term cultures. *Cytotherapy.* 15 : 1340—1351.
- Rosland G. V., Svendsen A., Torsvik A., Sobala E., McCormack E., Immervoll H., Mysliwicz J., Tonn J. C., Goldbrunner R., Lonning 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.
- Sensebé L. 2013. Beyond genetic stability of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 15 : 1307—1308.
- Sensebé L., Tarte K., Galipeau J., Krampera M., Martin I., Phinney D. G., Shi Y. 2012. Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell.* 10 : 9—10.
- Tang D. Q., Wang Q., Burkhardt B. R., Litherland S. A., Atkinson M. A., Yang L. J. 2012. *In vitro* generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. *Amer. J. Stem Cells.* 1 : 114—217.
- 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. 2010. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood.* 115 : 1549—1553.
- Todaro G. J., Green H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 17 : 299—313.
- Torsvik A., Rosland G. V., Svendsen A., Molven A., Immervoll H., McCormack E., Lonning 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.
- Ueyama H., Horibe T., Hinotsu S., Tanaka T., Inoue T., Urushihara H., Kitagawa A., Kawakami K. 2012. Chromosomal variability of human mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions. *J. Cell Mol. Med.* 16 : 72—82.
- Vinogradov A. E., Shilina M. A., Anatskaya O. V., Alekseenko L. L., Grinchuk T. M., Nikolsky N. N. 2016. Next generation sequencing shows long-term transcriptome activation in human endometrial mesenchymal stem cells after sublethal heat shock. *Mater. of 1st Internat. Conf. «Cell technologies at the edge: research & practice. Recent achievements in stem cells research».* 117.
- 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.
- Zaman W. S., Makpol S., Sathapan S., Chua K. H. 2014. Long-term *in vitro* expansion of human adipose-derived stem cells showed low risk of tumorigenicity. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 8 : 67—76.

Поступила 10 V 2016

GENETIC STABILITY OF ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STEM CELLS MEASURE BY MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR KARYOTYPING

M. A. Shilina,¹ T. M. Grinchuk, N. N. Nikolsky

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

¹e-mail: shili-mariya@yandex.ru

The aim of this study was to monitor the genetic stability of endometrial mesenchymal stem cells by G-banding and molecular karyotyping (comparative genomic hybridization assay). We evaluated the each method resolution ability and their contribution to the study genetic stability of eMSC. G-banding karyotyping performed on passages 6 and 15 showed that more than 80 % cells had normal karyotype. But in a small part of the cell population were found random changes of karyotype: aneuploidy, isochromosomes, chromosome breakages, interchromosomal association. Molecular karyotyping was carried out on the 6th and 14th passages and revealed genomic stability but not for chromosomes 7 and 14. Microduplications 7q36.3 (62 kb) and 14q11.2 (165kb) were revealed in these chromosomes. We consider these aberrations as the aberrations derived from the donor of these cells. The morphological and molecular karyotyping complemented each other. Using these techniques, we can analyze karyotypic stability at different levels of genome organization.

Key words: karyotyping, molecular karyotyping, stem cells.