

Тот факт, что в ассоциации вовлекаются предпочтительно определенные хромосомы набора (хромосомы 13, 14, 15, 21), позволяет предполагать, что модификационные нарушения метилирования стрессового характера связаны с определенными хромосомами набора и носят неслучайный характер.

Природа изохромосом до конца не ясна. Возникают они как случайные образования и не закрепляются отбором. Наиболее распространено мнение, что изохромосомы возникают в результате нерасхождения гомологичных хромосом в митозе. Однако это объяснение не исключает версии о том, что их возникновение связано с повышенной способностью к агглютинации, то есть с нарушением метилирования в прицентромерных районах гомологичных хромосом (Maitra et al., 2005). Согласно нашим данным, в этот процесс неоднократно вовлекались гомологи все той же хромосомы 15, которая включалась и в ассоциации (Шорохова, Гринчук, 2021).

В работе с клеточными культурами мезенхимных СК стоит учитывать, что в процессе культивирования клетки подвергаются репликативному старению. В труде Полянкой и соавторов (Poljanskaya et al., 2022) подчеркивается, что коллекции клеточных культур, включая мезенхимные СК, требуют строгого контроля качества, поскольку с увеличением числа пассажей в клетках могут накапливаться генетические и эпигенетические дефекты, которые способны влиять на пролиферативную активность, дифференцировочный потенциал и безопасность клеток.

Подводя итог, можно сказать, что мезенхимные стволовые/стромальные клетки способны претерпевать кариотипические изменения при переводе из системы *in vivo* в систему *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные говорят в пользу того, что при переводе СК в систему *in vitro* и их культивировании возникают генетические изменения на уровне кариотипа. Они могут носить как случайный характер, так и закрепляться отбором. Возникающая нестабильность связана с нарушением механизмов клеточного деления, ведущего к анеуплоидии, структурным перестройкам на уровне хромосом и нарушениям метилирования ДНК. Последние в свою очередь приводят к наруше-

ниям конденсации гомологов и возникновению межхромосомных ассоциаций.

Полученные данные подчеркивают важность кариотипического анализа в контроле за генетической стабильностью СК при культивировании *in vitro*. С этих позиций кариотипический анализ рассматривается как важный инструмент для оценки безопасности клеточных линий СК при их клиническом использовании. Генетические изменения, возникающие при переводе клеток *in vitro* и их дальнейшем культивировании, могут быть небезопасны при использовании их в медицинских целях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-10126).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бочков Н. П., Воронина Е. С., Катосова Л. Д., Кулешов Н. П., Никитина В. А., Чаушева А. И. 2009. Генетическая безопасность клеточной терапии. Вестник российской академии медицинских наук. Т. 9. С. 5. Bochkov N. P., Voronina E. S., Katosova L. D., Kuleshov N. P., Nikitina V. A., Chausheva A. I. 2009. Genetic safety of cell therapy. Bull. Russ. Acad. Med. Sci. V. 9. P. 5.
- Гринчук Т. М., Шилина М. А., Кожухарова И. В., Пуговкина Н. А. 2013. Прогрессия кариотипической нестабильности эмбриональных стволовых клеток человека в процессе продолжительного культивирования. Цитология. Т. 55. С. 633. Grinchuk T. M., Shilina M. A., Kozhukharova I. V., Pugovkina N. A. 2013. Progression of karyotypic instability of human embryonic stem cells during long-term cultivation. Tsitologiya (Russ.). V. 55. P. 633.
- Гринчук Т. М., Алексеенко Л. Л., Иванцов К. М., Лянгузова М. С., Пуговкина Н. А., Ковалева З. В. 2009. Изменения структуры кариотипа стволовых клеток

- мышь в процессе культивирования *in vitro*. Тезисы докладов V Съезда генетиков и селекционеров. Часть II. С. 235. *Grinchuk T. M., Alekseenko L. L., Ivantsov K. M., Lyanguzova M. S., Pugovkina N. A., Kovaleva Z. V.* 2009. Changes in the structure of the karyotype of mouse stem cells during *in vitro* cultivation. Abstracts of the V Congress of Geneticists and Breeders. Part II. P. 235.
- Кожухарова И. В., Фридлянская И. И., Ковалева З. В., Пуговкина Н. А., Алексеенко Л. Л., Зенин В. В., Иванцов К. М., Леонтьева О. К., Гринчук Т. М., Никольский Н. Н.* 2009. Новые линии эмбриональных стволовых клеток человека С612 и С910. Цитология. Т. 51. С. 551. *Kozhukharova I. V., Fridlyanskaya I. I., Kovaleva Z. V., Pugovkina N. A., Alekseenko L. L., Zenin V. V., Ivantsov K. M., Leontyeva O. K., Grinchuk T. M., Nikolsky N. N.* 2009. New lines of human embryonic stem cells С612 and С910. Tsitologiya. T. 51. P. 551.
- Кольцова А. М., Зенин В. В., Петросян М. А., Турилова В. И., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г.* 2020. Получение и характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из разных областей плаценты одного донора. Цитология. Т. 62. С. 713. *Koltsova A. M., Zenin V. V., Petrosyan M. A., Turilova V. I., Yakovleva T. K., Polyanskaya G. G.* 2020. Obtaining and characterizing mesenchymal stem cell lines isolated from different areas of the placenta of one donor. Tsitologiya. T. 62. P. 713. <https://doi.org/10.31857/S0041377120090035>
- Минина Ю. М., Жданова Н. С., Шилов А. Г., Толкунова Е. Н., Листовых М. А., Томилин А. Н.* 2010. Нестабильность хромосомного состава культивируемых *in vitro* плюрипотентных клеток мыши. Цитология Т. 52. С. 420. *Minina Yu. M., Zhdanova N. S., Shilov A. G., Tolkunova E. N., Listovyykh M. A., Tomilin A. N.* 2010. Instability of the chromosomal composition of *in vitro* cultured mouse pluripotent cells. Tsitologiya. V. 52. P. 420.
- Миталипов Ш. М., Миталипова М. М., Иванов В. И.* 1994. Влияние длительности культивирования на плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток (ЕЗ) мыши. Онтогенез. Т. 25. С. 19. *Mitalipov Sh. M., Mitalipova M. M., Ivanov V. I.* 1994. Effect of cultivation duration on the pluripotency of mouse embryonic stem cells (ESCs). Ontogenesis. Vol. 25. P. 19.
- Никитина В. А., Осипова Е. Ю., Катосова Л. Д., Румянцев С. А., Скоробогатова Е. В., Шаманская Т. В., Бочков Н. П.* 2010. Исследование генетической стабильности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Т. 150. С. 560. *Nikitina V. A., Osipova E. Yu., Katosova L. D., Rumyantsev S. A., Skorobogatova E. V., Shamanskaya T. V., Bochkov N. P.* 2010. Study of genetic stability of multipotent mesenchymal stromal cells of human bone marrow. Bull. Exper. Biol. Med. V. 150. P. 560.
- Рубцов Н. Б., Прохорович М. А., Лагарькова М. А., Карамышева Т. В., Киселев С. Л.* 2007. Цитогенетика стабильных линий эмбриональных стволовых клеток человека hESM01—04. Мед. генетика. Т. 6. С. 11. *Rubtsov N. B., Prokhorovich M. A., Lagarkova M. A., Karamysheva T. V., Kiselev S. L.* 2007. Cytogenetics of stable lines of human embryonic stem cells hESM01-04. Med. Genetics. V. 6. P. 11
- Рубцов Р. Б.* 2007. Культуры эмбриональных стволовых клеток человека серии HESM: хромосомные перестройки и стабильность кариотипа. Бюлл. экспер. биол. мед. Т. 3. С. 143. *Rubtsov R. B.* 2007. Cultures of human embryonic stem cells of the HESM series: chromosomal rearrangements and karyotype stability. Bull. Exper. Biol. Med. V. 3. P. 143.
- Чаушева А. И., Никитина В. А., Жанатаев А. К., Дурнев А. Д., Бочков Н. П.* 2011. ДНК-повреждения в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках человека при разных сроках культивирования. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. Т. 6. С. 39. *Chausheva A. I., Nikitina V. A., Zhanataev A. K., Durnev A. D., Bochkov N. P.* 2011. DNA damage in human multipotent mesenchymal stromal cells at different cultivation times. Cell Transplantol. Tissue Eng. V. 6. P. 39.
- Шорохова М. А., Гринчук Т. М.* 2021. Стабильность кариотипа мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека *in vitro*. Цитология. Т. 63. С. 491. *Shorokhova M. A., Grinchuk T. M.* 2021. Stability of the karyotype of human endometrial mesenchymal stem cells *in vitro*. Tsitologiya (Russ.). V. 63. P. 491. <https://doi.org/10.31857/S0041377121050102>
- Binato R., de Souza Fernandez T., Lazzarotto-Silva C., Du Rocher B., Mencalha A., Pizzatti L., Bouzas L. F., Abdelhay E.* 2013. Stability of human mesenchymal stem cells during *in vitro* culture: Considerations for cell therapy. Cell Prolif. V. 46. P. 10. <https://doi.org/10.1111/cpr.12002>
- Borgonovo T., Vaz I. M., Senegaglia A. C., Rebelatto C. L. K., Brofman P. R. S.* 2014. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. V. 36. P. 202. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.03.006>
- Brimble S. N., Zeng X., Weiler D. A., Luo Y., Liu Y., Lyons I. G., Freed W. J., Robins A. J., Rao M. S., Schulz T. C.* 2004. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. Stem Cells Dev. V. 13. Art. ID: 585. <https://doi.org/10.1089/scd.2004.13.585>

- Buzzard J. J., Gough N. M., Crook J. M., Colman A. 2004. Karyotype of human ES cells during extended culture (multiple letters). *Nat. Biotechnol.* V. 22. Art. ID: 381. <https://doi.org/10.1038/nbt0404-381>
- Caisander G., Park H., Frej K., Lindqvist J., Bergh C., Lundin K., Hanson C. 2006. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged *in vitro* culture. *Chromosome Res.* V. 14. P. 131. <https://doi.org/10.1007/s10577-006-1019-8>
- 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. *N. Engl. J. Med.* V. 350. P. 1353. <https://doi.org/10.1056/nejmsr040330>
- Dekaban A. 1965. Persisting clone of cells with an abnormal chromosome in a woman previously irradiated. *J. Nucl. Med.* V. 6. P. 740.
- 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. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* V. 22. P. 53. <https://doi.org/10.1038/nbt922>
- Evans M. J., Kaufman M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* V. 292. P. 154. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Ginis I., Luo Y., Miura T., Thies S., Brandenberger R., Gerecht-Nir S., Amit M., Hoke A., Carpenter M. K., Itskovitz-Eldor J., Rao M. S. 2004. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* V. 269. P. 360. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.12.034>
- Guo J., Jauch A., Holtgreve-Grez H., Schoell B., Erz D., Schrank M., Janssen J. W. C. 2005. Multicolor karyotype analyses of mouse embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* V. 41. P. 278. <https://doi.org/10.1290/990771.1>
- Hanson C., Caisander G. 2005. Human embryonic stem cells and chromosome stability. *APMIS.* V. 113. P. 751. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm_305.x
- Heng H. H. Q., Liu G., Stevens J. B., Abdallah B. Y., Horne S. D., Ye K. J., Bremer S. W., Chowdhury S. K., Ye C. J. 2013. Karyotype heterogeneity and unclassified chromosomal abnormalities. *Cytogenet. Genome Res.* V. 139. P. 144. <https://doi.org/10.1159/000348682>
- Hoffman L. M., Hall L., Batten J. L., Young H., Pardasani D., Baetge E. E., Lawrence J., Carpenter M. K. 2005. X-Inactivation status varies in human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* V. 23. P. 1468. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0371>
- Inzunza J., Gertow K., Strömberg M. A., Matilainen E., Blennow E., Skottman H., Wolbank S., Ährlund-Richter L., Hovatta O. 2005. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells.* V. 23. P. 544. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0201>
- Kundrotas G., Gasperskaja E., Slapsyte G., Gudleviciene Z., Krasko J., Stumbryte A., Liudkeviciene R. 2016. Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget.* V. 7. P. 10788. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7456>
- Lagarkova M. A., Ereemeev A. V., Svetlakov A. V., Rubtsov N. B., Kiselev S. L. 2010. Human embryonic stem cell lines isolation, cultivation, and characterization. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* V. 46. P. 284. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9282-6>
- Liu X., Wu H., Loring J., Hormuzdi S., Distech C. M., Bornstein P., Jaenisch R. 1997. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev. Dyn.* V. 209. P. 85. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199705\)209:1<85::AID-AJA8>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199705)209:1<85::AID-AJA8>3.0.CO;2-T)
- Maitra A., Arking D. E., Shivapurkar N., Ikeda M., Stastny V., Kassaei K., Sui G., Cutler D. J., Liu Y., Brimble S. N., Noaksson K., Hyllner J., Schulz T. C., Zeng X., Freed W. J., et al. 2005. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* V. 37. P. 1099. <https://doi.org/10.1038/ng1631>
- Martin G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* V. 78. P. 7634. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- Meng X., Ichim T. E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K. W., Thébaud B., Rioridan N. H. 2007. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *J. Transl. Med.* V. 5. Art. ID: 57. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57>
- Mitalipova M. M., Rao R. R., Hoyer D. M., Johnson J. A., Meisner L. F., Jones K. L., Dalton S., Stice S. L. 2005. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* V. 23. Art. ID: 19. <https://doi.org/10.1038/nbt0105-19>
- Neri S. 2019. Genetic Stability of Mesenchymal Stromal Cells for regenerative medicine applications: a fundamental biosafety aspect. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. Art. ID: 2406. <https://doi.org/10.3390/ijms20102406>
- Nikitina V., Astrelina T., Nugis V., Ostashkin A., Kara-seva T., Dobrovolskaya E., Usupzhanova D., Suchkova Y., Lomonosova E., Rodin S., Brunchukov V., Lauk-Dubitskiy S., Brumberg V., Machova A.,

- Kobzeva I., Bushmanov A., Samoilov A.* 2018. Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture. *PLoS One* V. 13. Art. ID: e0192445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192445>
- Park J. I., Yoshida I., Tada T., Takagi N., Takahashi Y., Kanagawa H.* 1998. Trisomy 8 does not affect differentiative potential in a murine parthenogenetic embryonic stem cell line. *Jpn. J. Vet. Res.* V. 46. P. 29.
- Passerini V., Ozeri-Galai E., De Pagter M. S., Donnelly N., Schmalbrock S., Kloosterman W. P., Kerem B., Storchová Z.* 2016. The presence of extra chromosomes leads to genomic instability. *Nat. Commun.* V. 7. Art. ID: 10754. <https://doi.org/10.1038/ncomms10754>
- Patel A. N., Park E., Kuzman M., Benetti F., Silva F. J., Allickson J. G.* 2008. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: Isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant* V. 17. P. 303. <https://doi.org/10.3727/096368908784153922>
- Poljanskaya G. G., Bobkov D. E., Koltsova A. M., Musorina A. S., Mikhailova N. A.* 2022. Creation, working principles, development of applied and scientific activities of the collection of cell cultures of vertebrate (review). *Bio. Comm.* V. 67. P. 312. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2022.406>
- Rastan S., Robertson E. J.* 1985. X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* V. 90. P. 379. <https://doi.org/10.1242/dev.90.1.379>
- Stultz B. G., McGinnis K., Thompson E. E., Lo Surdo J. L., Bauer S. R., Hursh D. A.* 2016. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during *in vitro* culture. *Cytother.* V. 18. P. 336. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.11.017>
- Thomson J. A.* 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* V. 282. P. 1145. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- 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.* V. 4. Art. ID: e950. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.480>
- Zamani H., Karami F., Mehdizadeh M., Baakhlag S., Zamani M.* 2022. Long term culture of mesenchymal stem cells: no evidence of chromosomal instability. *Asian Pac. J. Cancer Biol.* V. 7. P. 349. <https://doi.org/10.31557/apjcb.2022.7.4.349-353>

KARYOTYPIC VARIATIONS OF STEM CELLS *IN VITRO*

T. M. Grinchuk, M. A. Shorokhova*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, Russia

**e-mail: Shili-mariya@yandex.ru*

Stem cells (SCs) are of great interest for regenerative medicine due to their ability to self-renew and differentiate. The main condition for their use is their genetic stability. Karyotypic analysis is a key tool for assessing the genetic stability of SCs. Data on the genetic stability of SCs when transferred to *in vitro* conditions are ambiguous, so their comprehensive consideration can help in the selection of SC cellular variants for use in regenerative medicine. In this review, we examined data from literary sources, as well as our own data on the karyotypic characteristics of various SCs *in vitro*, namely: mouse embryonic SCs, human embryonic SCs and adult human SCs. The data obtained as a result of a comparative analysis of different types of SCs *in vitro* allowed us to give a generalized assessment of the stability of the SC karyotype in culture. The results of the analysis indicate that when transferring any SCs to the *in vitro* system, genetic changes at the karyotype level are likely. The resulting changes can be either random or fixed by selection. In the event of karyotypic abnormalities in SCs *in vitro*, the oncogenic potential of such cells increases significantly.

Keywords: stem cells, chromosomes, ectopic conjugation, impaired condensation, chromosomal breaks, aneuploidy, destabilization