

УДК 575:57.086

## КАРИОТИПИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

© 2025 г. Т. М. Гринчук, М. А. Шорохова\*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

\*E-mail: Shili-mariya@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.04.2025

После доработки 05.05.2025

Принята к публикации 13.05.2025

Стволовые клетки (СК) представляют огромный интерес для регенеративной медицины благодаря их способности к самообновлению и дифференцировке. Основным условием их использования является генетическая стабильность. Кариотипический анализ является ключевым инструментом для оценки генетической стабильности СК. Данные о генетической стабильности СК при переводе в условия *in vitro* не однозначны, поэтому их комплексное рассмотрение может помочь в отборе клеточных вариантов СК для использования в целях регенеративной медицины. В нашем обзоре мы рассмотрели данные из литературных источников, а также собственные данные о кариотипических характеристиках различных СК *in vitro*, а именно: об эмбриональных СК мыши, эмбриональных СК человека и взрослых СК человека. Сведения, полученные в результате сравнительного анализа разнотипных СК *in vitro*, позволили дать обобщенную оценку стабильности кариотипа СК в культуре. Результаты анализа говорят в пользу того, что при переводе любых СК в систему *in vitro* вероятны генетические изменения на уровне кариотипа. Возникающие изменения могут носить как случайный характер, так и закрепляться отбором. В случае возникновения кариотипических отклонений в СК *in vitro* онкогенный потенциал таких клеток значительно возрастает.

**Ключевые слова:** стволовые клетки, хромосомы, эктопическая конъюгация, нарушенная конденсация, хромосомные поломки, анеуплоидия, дестабилизация

*Принятые сокращения:* СК — стволовые клетки.

DOI: 10.7868/S3034606125030013

Стволовые клетки (СК) человека привлекают к себе все больше внимания. Возможность их использования в регенеративной медицине, исследовательских целях значительно расширяет горизонты современной биологии и медицины. Различают эмбриональные и взрослые стволовые клетки. Одной из наиболее важных генетических характеристик СК является структура генома на уровне кариотипа. В норме кариотип клеток характеризуется постоянством числа и структуры хромосом.

Так как при клиническом использовании СК исходного клеточного материала обычно недостаточно, его увеличивают путем культивирования СК *in vitro*. Поскольку продолжительное культивирование может быть потенциальным источником накопления генетических изменений в клетках, для использования СК в терапевтических целях необходима уверенность в их генетиче-

ской стабильности. Генетическая нестабильность, регистрируемая в процессе выделения и культивирования СК, остается важным фактором, препятствующим внедрению СК в клиническую практику. Основанием для беспокойства является представление о том, что генетические отклонения в клетке могут привести к ее онкогенной трансформации. В этой связи кариотипический анализ, основанный на изучении числа и морфологии хромосом набора, приобретает особую значимость (Meng et al., 2007; Passerini et al., 2016; Negi, 2019).

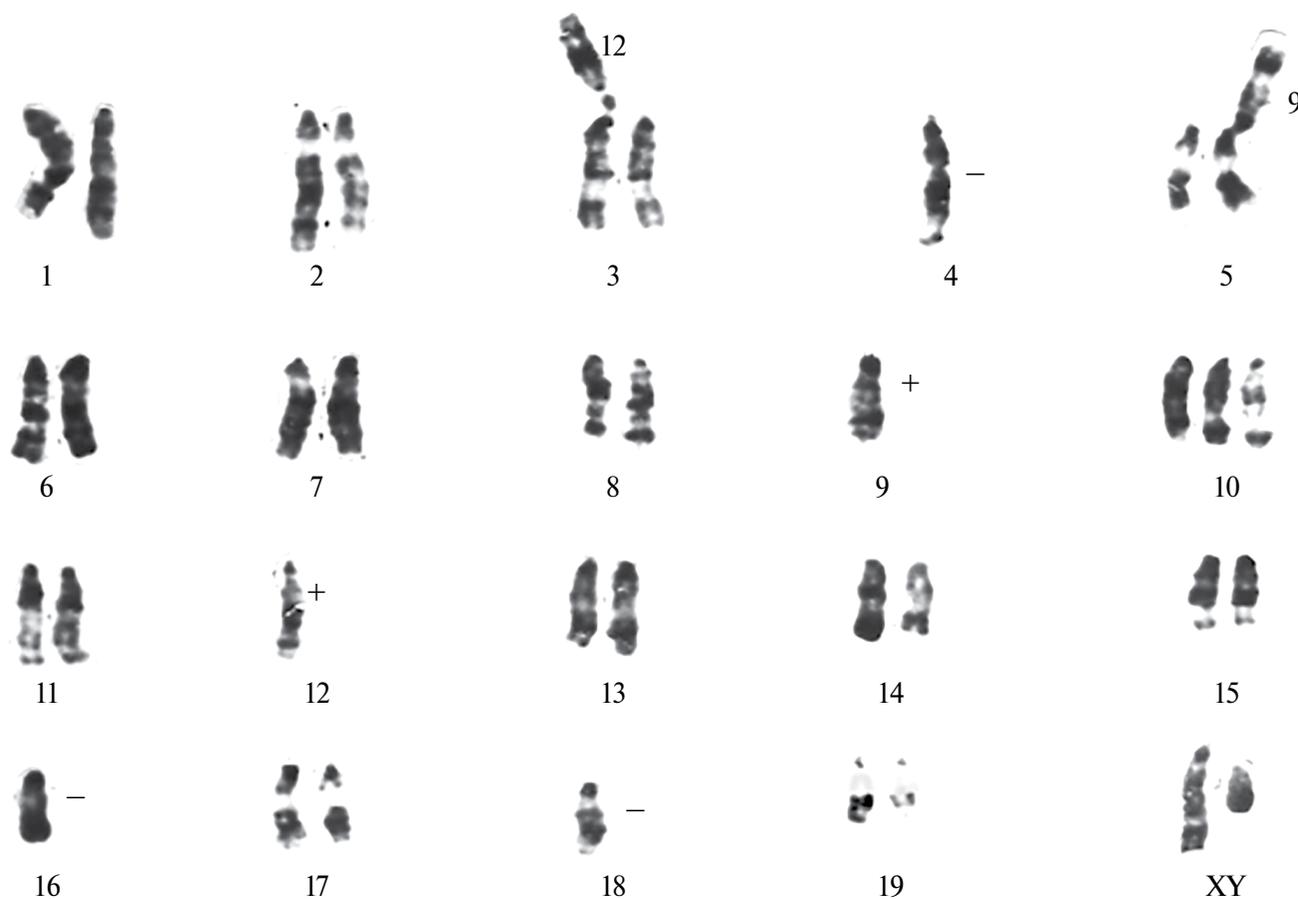
В предлагаемом обзоре мы собрали сведения о кариотипических характеристиках СК разного генеза при переводе их из системы *in vivo* в систему *in vitro*. Систематизация накопленных данных представляет особую актуальность, так как может помочь в отборе клеточных вариантов СК для использования в регенеративной медицине.

## КАРИОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СК В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

**Эмбриональные стволовые клетки мыши.** Вхождение в проблему кариотипической стабильности СК *in vitro* на мировом уровне началось с анализа эмбриональных СК мыши (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981). Развитие исследований в данном направлении показало, что в условиях *in vitro* стабильность генома мышинных эмбриональных СК может нарушаться. Отклонения от нормы были зарегистрированы в виде изменения количества ДНК в клетках (Миталипов и др., 1994) и нарушения копийности отдельных хромосом набора (Park et al., 1998; Guo et al., 2005; Maitra et al., 2005). Так, при анализе четырех линий эмбриональных СК мыши с применением многоцветной окраски FISH (Guo et al., 2005) в двух из анализируемых линий наблюдали нормальный диплоидный кариотип, а в двух других клеточных линиях выявляли разнотипные клональные и неклональные

хромосомные нарушения: трисомию, инверсию, делеции, Робертсоновские транслокации. Клетки с кариотипическими дефектами сохраняли морфологию и экспрессию поверхностных маркеров, типичных для СК мыши. Количество генетически дефектных клеток возрастало в процессе культивирования и с увеличением размера колоний. В дестабилизации генома независимых линий некоторые хромосомы имели преимущество.

В ряде работ в процессе культивирования неоднократно выявлялась полная либо частичная утрата одной из половых X-хромосом (Rastan, Robertson, 1985; Liu et al., 1997; Park et al., 1998; Guo et al., 2005; Maitra et al., 2005; Минина и др., 2010). В наших работах (Гринчук и др. 2009) анализ ряда клеточных линий эмбриональных СК мыши после длительного (от нескольких месяцев до нескольких лет) культивирования выявил наличие дополнительного генетического материала в виде микрохромосом и межхромосомных ассоциаций в клетках (рис. 1).



**Рис. 1.** Кариотип эмбриональных СК мыши линии Rosa. Околодиплоидный кариотип, эктопическая конъюгация с образованием двуплечих хромосом, моносомия по хромосомам 16, 18; трисомия хромосомы 10. Собственные данные.

**Эмбриональные СК человека.** Цитогенетические исследования, связанные с изучением кариотипической стабильности эмбриональных СК человека, начатые с момента получения постоянных линий (Thomson, 1998), подтвердили результаты цитогенетического анализа эмбриональных СК мыши. Согласно наблюдениям одних исследователей, кариотип эмбриональных СК человека в процессе культивирования относительно длительное время сохранял кариотипическую стабильность (Brimble et al., 2004; Buzzard et al., 2004; Cowan et al., 2004; Rosler et al., 2004; Hanson, Caisander, 2005); согласно другим — уже на ранних пассажах возникали кариотипические изменения. (Cowan et al., 2004; Draper et al., 2004; Inzunza et al., 2005; Hoffman et al., 2005; Maitra et al., 2005; Mitalipova et al., 2005; Caisander et al., 2006; Heins et al., 2006). В этой связи весьма показательна работа, в которой Cowan и соавторы (2004) анализировали 17 клеточных линий эмбриональных СК человека и в двух из них при культивировании до 22-го пассажа выявили хромосомные аберрации (инверсии). На более поздних пассажах (с 29-го по 34-й) стабильность кариотипа была нарушена ещё в четырех линиях (Cowan et al., 2004).

В результате изучения других работ было установлено, что в процесс дестабилизации генома эмбриональных СК человека вовлекались предпочтительно определенные хромосомы (чаще других хромосомы 12, 17, 20, X) (Cowan et al., 2004; Draper et al., 2004; Hoffman et al., 2005; Inzunza et al., 2005; Maitra et al., 2005; Mitalipova et al., 2005; Caisander et al., 2006; Heins et al., 2006). В результате комплексного мониторинга эмбриональных СК человека группы российских исследователей на фоне линий со стабильным кариотипом выявили линии с пятью хромосомными аберрациями (Прохорович и др. 2007; Рубцов и др., 2007; Lagarkova et al., 2010).

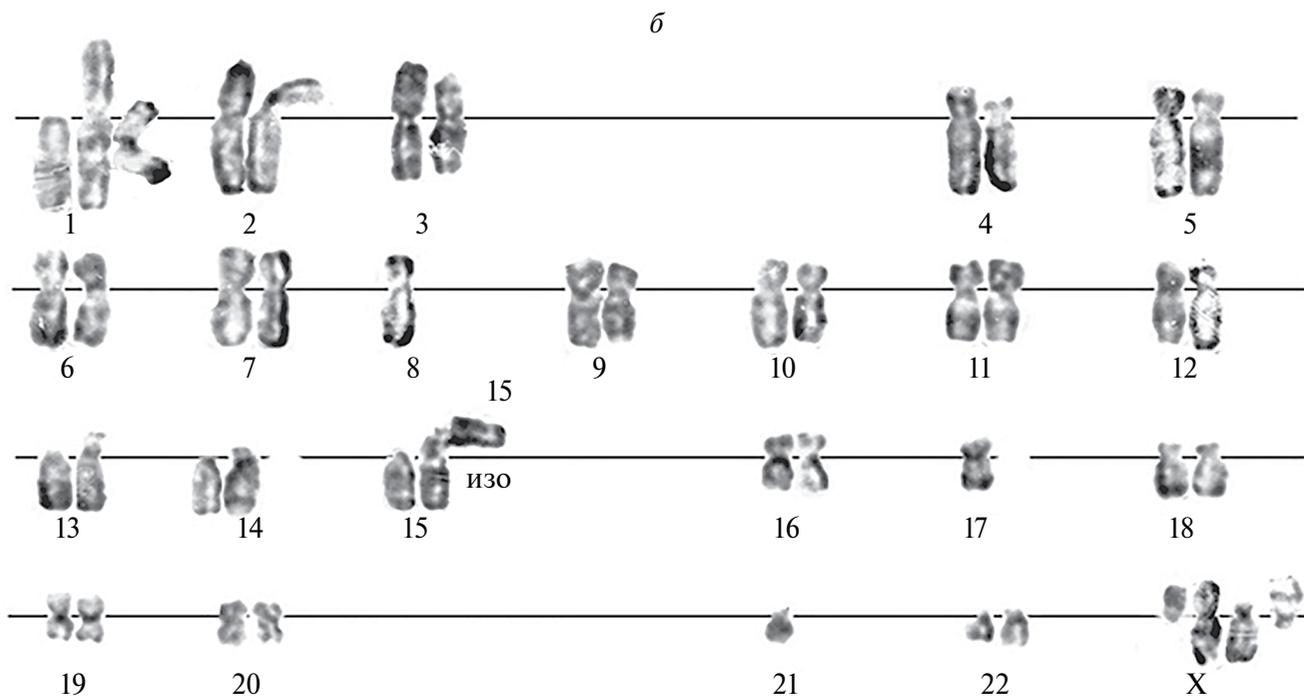
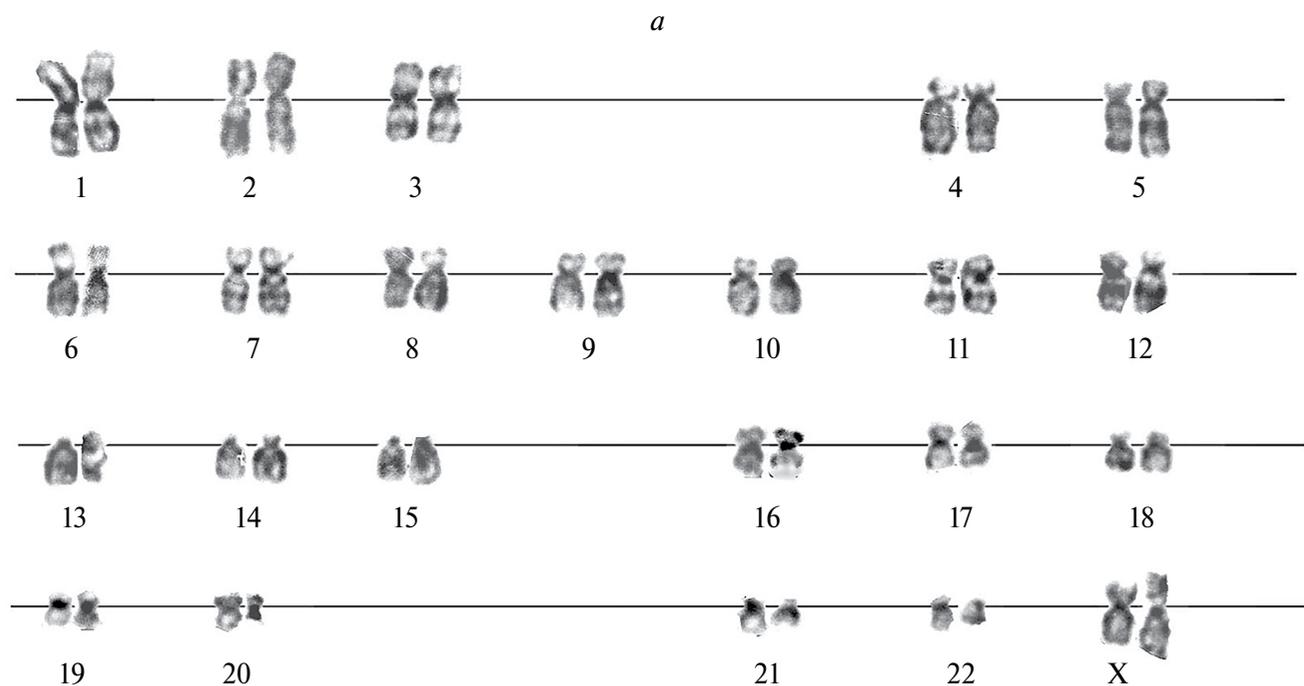
Многолетний детальный анализ ряда линий эмбриональных СК человека, проведенный Лагарьковой с соавторами (Lagarkova et al., 2010), показал, что одна линия, начиная с 36-го пассажа, в течение 20 последующих маркировалась делецией в хромосоме 4; с 43-го пассажа в культуре дополнительно выявлялась значительно увеличенная в размере аберрантная хромосома (производная хромосомы 9), маркирующая линию. В этой же работе другая линия имела маркерную кольцевую хромосому (производная хромосомы

18), возникшую вследствие терминальных поломок с последующим их слипанием; 20 % клеток третьей линии были анеуплоидными с числом хромосом 60—65; в четвертой линии были выявлены дицентрическая хромосома и хроматидные фрагменты. Некоторые изменения стабильно наследовались на протяжении нескольких десятков пассажей. Важно, что клетки линий, маркированных изменением в хромосомах 9 и 18, характеризовались увеличенной скоростью клеточной пролиферации, что свойственно клеткам с повышенным онкогенным потенциалом, однако сохраняли физиологические характеристики нормальных эмбриональных СК человека (Lagarkova et al., 2010).

В наших исследованиях эмбриональных СК человека (Кожухарова и др., 2009) также была выявлена кариотипическая нестабильность клеток, связанная с моно- или трисомиями по отдельным хромосомам, изохромосомами, хромосомами с нарушенной конденсацией гомологов и межхромосомными плазматическими ассоциациями, приводящими к образованию псевдодвуплечих хромосом (рис. 2а, б). Все линии имели индивидуальный профиль изменчивости. Выявляемые изменения носили случайный характер, хотя некоторые хромосомы (13—15, 21) вступали в межхромосомные ассоциации предпочтительно.

При анализе лабораторных линий эмбриональных СК человека авторы показали, что клетки с трисомией хромосомы 12, в отличие от клеток с нормальным кариотипом, характеризовались неправильным клеточным делением с образованием множественных веретен деления (Moon et al., 2011). Такие клетки имели усиленный пролиферативный потенциал. После трансплантации производных таких клеток животным у них со временем наблюдали возникновение опухолеподобных тканей (без образования тератом) (Moon et al., 2011).

Таким образом, сопоставление данных кариотипического анализа линий эмбриональных СК разного видового происхождения (мыши и человека) позволило сделать вывод, что в условиях *in vitro* в эмбриональных СК стабильность кариотипа может нарушаться. Характер нарушений связан с появлением в клеточных популяциях анеуплоидных вариантов и разнотипных структурно перестроенных хромосом.



**Рис. 2.** Кариотип эмбриональных СК линии С910. *a* — Пассажа 7, нарушение конденсации между гомологами хромосом 5, 13–16, 18–22, X. *б* — Пассажа 33: прицентромерная поломка хромосом 1 и X; изохромосома 15; моносомия хромосомы 17, 21; трисомия хромосомы 15, X; различная конденсация между гомологами хромосом 3, 5, 6, 9, 10, 12, 20, X. Собственные данные.

КАРИОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
МЕЗЕНХИМНЫХ СК В СИСТЕМЕ  
*IN VITRO*

Открытие мезенхимных стволовых/стромальных клеток во взрослом организме человека вызвало новую волну исследований, направленных на всестороннее их изучение. Установлено, что резидентные мезенхимные СК базируются практически во всех тканях, различаясь по ряду физиологических и генетических характеристик в зависимости от места природной локализации.

Данные о карiotипировании линий мезенхимных СК в условиях *in vitro* неоднозначны. В одних публикациях есть указания на то, что структура карiotипа клеток в условиях культуры не меняется (Patel et al., 2008; Binato et al., 2013; Wang et al., 2013). В других работах показано, что в условиях *in vitro* мезенхимные СК человека могут претерпевать разнотипные карiotипические нарушения, связанные как с количественными изменениями в наборе хромосом, так и с морфологическими изменениями их структуры (Dualibi et al., 2012; Borgonovo et al., 2014; Nikitina et al., 2018; Кольцова и др., 2020).

В этой связи необходимо отметить приоритетные данные группы исследователей под руководством Бочкова (Бочков и др., 2009; Никитина и др., 2010; Чаушева и др., 2011), которые первыми в России описали в культурах мезенхимных СК из костного мозга человека хромосомные и геномные изменения, некоторые из них встречались с высокой частотой. Карiotипические дефекты фиксировали уже на ранних этапах культивирования (на пассажах 3–5).

В последующих работах других авторов тоже присутствовала карiotипическая вариабильность мезенхимных СК из костного мозга человека *in vitro* (Kundrotas et al., 2016; Zamani et al., 2022), причем уже на ранних пассажах выявлялись анеуплоидные клеточные варианты, хотя на 87 % карiotип клеточной популяции оставался стабилен (Kundrotas et al., 2016). Отмечено наличие как карiotипически стабильных, так и нестабильных клеточных линий (Zamani et al., 2022).

Никитина с соавторами (Nikitina et al., 2018) при анализе длительно культивируемой линии мезенхимных СК из слизистой оболочки десен человека выявила карiotипические отклонения: начиная с 12-го пассажа культивирования, зафиксированы клоны клеток с маркерными хромосомными абберациями. Кроме этого, были описаны случайные

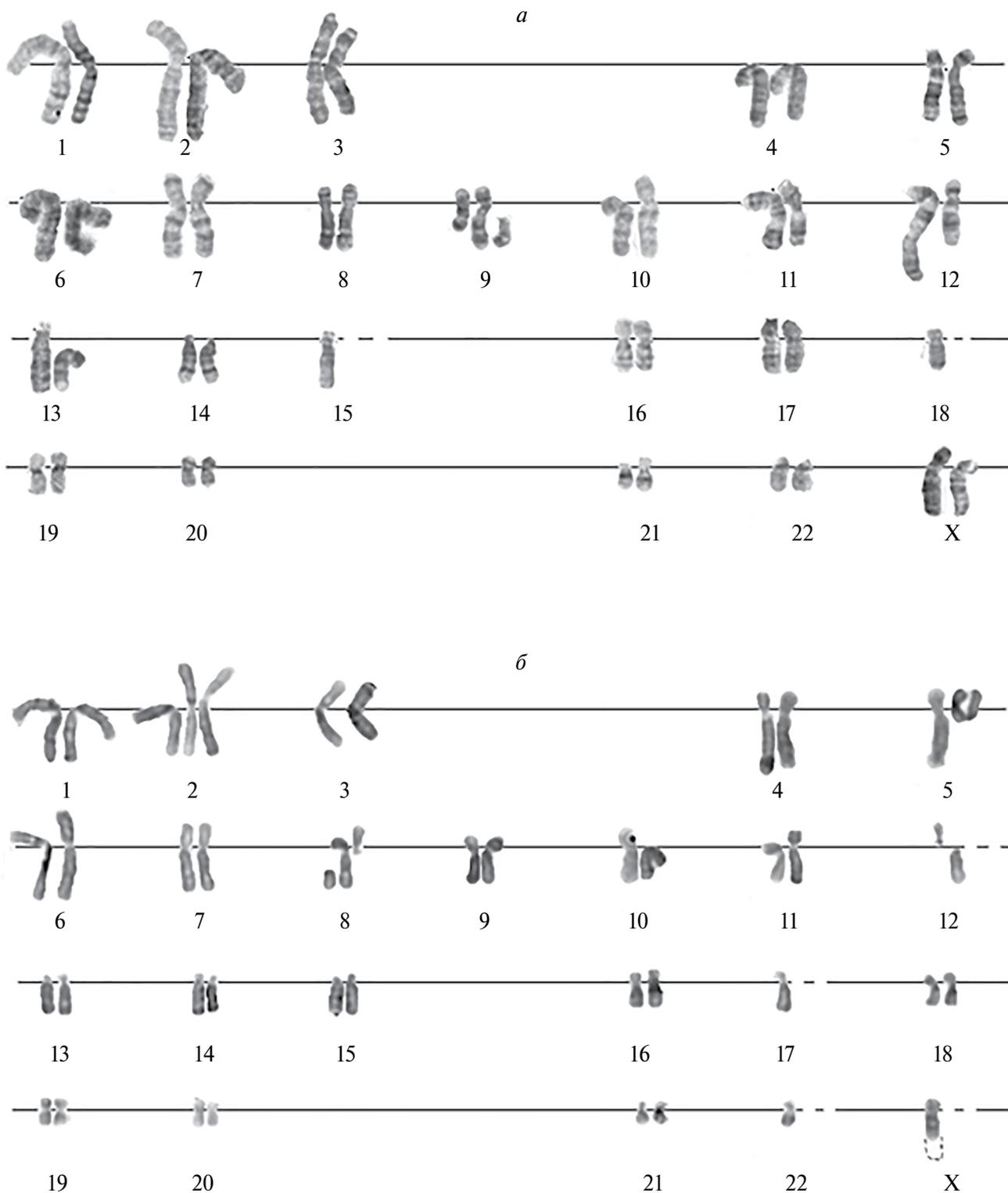
хромосомные отклонения при длительном культивировании мезенхимных СК. Вместе с тем при культивировании преимущество все же получали клетки с нормальным карiotипом.

При исследовании генетической стабильности мезенхимных СК костного мозга человека от десяти доноров с использованием метода SKY авторы обнаружили хромосомные аномалии уже на ранних пассажах (Stultz et al., 2016). В процессе культивирования эти авторы выявляли клетки с нормальными карiotипами, анеуплоидными и с межхромосомными транслокациями, а также карiotипы с делециями и дубликациями. Стоит отметить, что анеуплоидия была наиболее частой наблюдаемой аномалией, однако носила случайный характер.

Нами в процессе анализа эндометриальных мезенхимных СК от разных доноров также были выявлены клетки с карiotипическими изменениями в системе *in vitro* (Шорохова, Гринчук, 2021). Карiotипические дефекты были связаны с возникновением моно- или трисомии и хромосом с нарушенной конденсацией в одной из копий, а также с межхромосомными ассоциациями, появлением изохромосом и хромосомными поломками (рис. 3а, б). Выявленные изменения носили случайный характер. Тем не менее хромосомы 13, 14, 15, 21 вовлекались в межхромосомные ассоциации неоднократно. Профиль карiotипической изменчивости каждой линии в связи с преводом их в систему *in vitro* был индивидуален.

Обсуждая характер карiotипической изменчивости, исследователи в большинстве случаев фиксируют внимание на анеуплоидии и структурных хромосомных перестройках (Heng, 2013). Нарушению конденсации в гомологичных хромосомах и возникновению межхромосомных ассоциаций до недавнего времени уделялось мало внимания.

В наши дни существуют данные о том, что причиной асинхронности при конденсации хромосом является нарушение метилирования ДНК, возникающее в одном из гомологов. Межхромосомные ассоциации также связывают с нарушениями метилирования (Maitra et al., 2005). Именно эти нарушения в митозе могут способствовать возникновению разнотипных несбалансированных хромосомных перестроек, в том числе поломок. Поломки могут быть как случайными, так и сопряженными с повышенной ломкостью определенных локусов (Dekaban, 1965).



**Рис. 3.** Кариотип эндометриальных мезенхимных СК линии 2206. *a* — Пассаж 3: поломка хромосомы 9 с сохранением материала; эктопическая конъюгация хромосом 12 и 15. *б* — Пассаж 14: трисомия по хромосоме 2; моносомия хромосом 12, 17, 22 и X; прицентромерная поломка с сохранением материала хромосом 8 и 12; делеция в хромосоме X. (Цит. по: Шорохова и др., 2021. Опубликовано с разрешения редколлегии и издательства «Наука»).

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. Grinchku 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

- мышы 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. Т. 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. Т. 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](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