

УДК 57.085.2

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. В. А. Никитина¹*, Т. А. Астрелина¹, И. В. Кобзева¹, В. Ю. Нугис¹, Е. Е. Ломоносова¹, В. В. Семина¹, В. А. Брунчуков¹, Д. Ю. Усупжанова¹, В. А. Брумберг¹, А. А. Расторгуева¹, Т. В. Карасева¹, А. С. Самойлов¹

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, 123098 Россия

*E-mail: nikitinava@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.11.2020 г.

После доработки 20.01.2021 г.

Принята к публикации 17.02.2021 г.

Проведено цитогенетическое исследование клеточных линий мезенхимных мультипотентных стромальных клеток (ММСК), выделенных из костного мозга, жировой ткани, плаценты и слизистой оболочки десны человека. Кариологический анализ с использованием двух методов окраски хромосом (GTG и mFISH) показал нормальный диплоидный кариотип большинства линий ММСК до 5 пассажа культивирования. Клональные хромосомные транслокации были выявлены в 3 из 22 исследованных ММСК, что составляет 14%. При анализе 22 линий ММСК выявлена достаточно низкая частота клеток с хромосомными aberrациями (ХА) (в пределах 5%). Среди клеток с хромосомными повреждениями (3–5%), выявленных при mFISH-анализе 1440 метафазных пластинок, на нестабильные хромосомные aberrации (фрагменты, дицентрические хромосомы) приходится около 65, а на стабильные (транслокации) – 35% всех повреждений. Полученные результаты подтверждают важность цитогенетических исследований клеточных линий ММСК, предназначенных для медицинских целей. Накопление данных о хромосомной и кариотипической изменчивости при разных сроках культивирования позволит определить допустимые пределы для отбора генетически стабильных диплоидных клеточных линий ММСК с целью предотвращения нежелательных последствий их применения в терапевтических целях.

Ключевые слова: мезенхимные мультипотентные стромальные клетки, кариотип, хромосомные aberrации, клонообразование, мультицветная флуоресцентная гибридизация

DOI: 10.31857/S0041377121030081

К диплоидным клеточным линиям человека относятся однородные клеточные популяции с ограниченным сроком жизни и стабильным кариотипом с диплоидным набором хромосом, их получают из первичных клеточных культур тканей здоровых доноров. Диплоидные линии фибробластоподобных клеток востребованы во многих отраслях науки и практической медицины, а также при производстве вакцинных и иммунобиологических препаратов (Petricciani, 2006; Полянская, 2018). Мезенхимные мультипотентные стромальные клетки (ММСК) – фибробластоподобные, недифференцированные, диплоидные соматические стволовые клетки с ограниченным числом генераций, редко трансформирующиеся и нетуморогенные при введении интактным животным (Soukup et al., 2006; Wang et al., 2012). Высокий проли-

феративный потенциал и способность к образованию больших колоний клеток при культивировании *in vitro* позволяет производить однородную стабильную клеточную популяцию за короткий промежуток времени и делает ММСК удобной моделью изучения биологических процессов у человека. А благодаря значительному регенеративному потенциалу, низкой иммуногенности и быстрой дифференцировке в специализированные типы клеток ММСК востребованы в практической медицине (Mastrolia et al., 2019; Neri, 2019; Costa et al., 2020).

Требования к первичным и перевиваемым клеточным линиям регулируются в РФ общей фармакопейной статьей (ОФС.1.7.2.0011.15), руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов, 2013), федеральным законом 180-ФЗ “О биомедицинских клеточных продуктах”. Кариологический анализ является необходимым элементом в первых двух. Его проведение можно разделить на два этапа: видовая идентификация (анализ набора и строения хромосом, характер-

Принятые сокращения: ММСК – мезенхимные мультипотентные стромальные клетки; ХА – хромосомные aberrации; GTG – дифференциальная окраска хромосом с использованием трипсина и красителя Гимза; mFISH – мультицветная флуоресцентная гибридизация *in situ*.

ных для клеток данного биологического вида) и оценка стабильности кариотипа (оценка частоты спонтанных хромосомных аномалий) исследуемой клеточной линии. Часто кариологический анализ линий ММСК, предназначенных для медицинских целей, ограничивается первым этапом. Научные данные о генетической стабильности ММСК человека неоднозначны. Разными авторами продемонстрирована как неизменность кариотипа, так и различные типы клональных и неклональных хромосомных aberrаций (ХА) и анеуплоидий в ММСК (Soukup et al., 2006; Wang et al., 2012; Barcholt et al., 2013; Айзенштадт и др., 2018).

Выявление хромосомных аномалий в любой клеточной популяции, растущей *in vitro*, в первую очередь связано со спонтанным уровнем ХА в клетках донора, имеющим определенный темп возникновения и реализации в популяции человека (Бочков, Чеботарёв, 1989). Он возникает в связи с постоянным воздействием внешних и внутренних мутагенных факторов физической (различных типов излучений, в основном, естественного радиационного фона, экстремальной температуры), химической (химических мутагенов, загрязняющих окружающую среду, некоторых лекарственных препаратов) и биологической (вирусов) природы. Во вторую — с aberrантными клетками, возникшими *de novo* уже в процессе культивирования при отсутствии тканевой регуляции. ХА могут стать причиной возникновения мутаций в генах, контролирующих процессы клеточной пролиферации, дифференцировки и гибели, что ведет к генетической нестабильности клеток и, возможно, к злокачественной трансформации (Rangel, 2017). Поддержание нормального кариотипа является надежным индикатором генетической стабильности и может рассматриваться как критерий медицинского использования клеточной линии (Borgonovo et al., 2014).

Целью настоящего исследования стало описание кариотипов и оценка частот ХА в клеточных линиях ММСК человека, выделенных из разных тканей. Использовали два метода кариотипирования — GTG и mFISH, которые позволяют с одинаковой чувствительностью оценить состав хромосом в кариотипе, провести анализ отдельных хромосом, определить ХА размером более 5–10 млн пар нуклеотидов, а также описать точки разрывов хромосом в ММСК здоровых доноров.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали клеточные линии ММСК, выделенные из: аспиратов костного мозга после пункции подвздошной кости; липоаспирата передней брюшной стенки; слизистой оболочки зубодесневых карманов; пупочного канатика; плодной части плаценты (хориональной пластинки и ворсин плаценты) человека. Линии одного происхождения были получены от разных здоровых доноров.

Плаценту получали от рожениц с одноплодной, физиологически протекавшей беременностью, закончившейся нормальными родами после самостоятельного или оперативного родоразрешения. Информированное согласие на забор, сохранение и использование было получено от 22-х доноров клеточного материала (табл. 1). Клеточные линии из плодной части плаценты и пупочного канатика при изложении результатов исследования объединены в одну группу “ММСК плаценты”, так как они имеют общее происхождение в эмбриогенезе внезародышевых органов.

Для выделения ММСК использовали механический (в случае костного мозга) или ферментативный метод (остальные ткани). Костный мозг разводили в равном объеме фосфатно-солевого буферного раствора pH 7.4 (Stem Cell Biology, USA) и наслаивали на рабочий раствор с градиентом плотности (1.077 г/л), центрифугировали 30 мин при 400 g. Мононуклеарные клетки, собранные с границы раздела фаз, дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (при 300 g, 7 мин).

Липоаспират отмывали фосфатно-солевым буфером и суспендировали, после чего подвергали ферментативной диссоциации с помощью 0.1%-ной коллагеназы I типа (Worthington Biochemical Corporation, США). Деагрегацию ткани проводили на магнитной мешалке при температуре 37°C в течение 40 мин, затем центрифугировали 7 мин при 300 g.

Биоптат слизистой десны инкубировали в среде, содержащей DMEM F12, 2% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 200 Ед/мл пенициллина, 200 мг/мл стрептомицина, 200 Ед/мл амфотерицина и 100 Ед/мл гентамицина (StemCell Technology, США), при 37°C не менее 8 ч. Затем диспергировали и инкубировали в 0.25%-ном растворе трипсин—EDTA при 37°C в течение 1 ч, отмывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали в 0.15%-ной коллагеназе II типа (Sigma, США) при 37°C в течение 2 ч.

Фрагменты пупочного канатика, хориональной пластинки или ворсин плаценты тщательно промывали фосфатно-солевым буфером и подвергали ферментативной диссоциации с помощью 0.075%-ной коллагеназы I типа (Worthington Biochemical Corporation, США) в течение 40 мин при 37°C. Далее проводили фильтрацию через нейлоновое сито с размером пор 100 мкм (Corning, США), центрифугировали при 300 g 7 мин.

Полученные клеточные суспензии высаживали в вентилируемые культуральные флаконы при 37°C и 5% CO₂ в культуральной среде MesenCult™ MSC Basal Medium Human (Stem Cell Biology, США). Через 1–3 сут неприлипшие клетки удаляли сменной среды. Через 14 сут клетки снимали с пластика с помощью 0.25%-ного раствора трипсин—EDTA и затем пассировали каждые 7 сут до окончания культивирования. Все клеточные линии культивировали в одинаковых условиях в бессывороточной среде Mes-

Таблица 1. Краткое описание клеточных линий и метода цитогенетического исследования

Линия	Описание источника клеточной линии	Метод
BM136	Аспират костного мозга из задней ости подвздошной кости мужчины	GTG
BM175	Аспират костного мозга из задней ости подвздошной кости мужчины	GTG
BM183	Аспират костного мозга из задней ости подвздошной кости женщины	GTG mFISH
BM231	Аспират костного мозга из задней ости подвздошной кости мужчины	mFISH
DB1	Аспират костного мозга из задней ости подвздошной кости мужчины	mFISH
LB1	Аспират костного мозга из задней ости подвздошной кости мужчины	mFISH
Adip360	Липоаспират передней брюшной стенки женщины	mFISH
Adip381	Липоаспират передней брюшной стенки женщины	mFISH
Adip442	Липоаспират передней брюшной стенки женщины	mFISH
Adip685	Липоаспират передней брюшной стенки мужчины	GTG
Adip690	Липоаспират передней брюшной стенки мужчины	GTG
Chor-354	Плодная часть плаценты, срок гестации: 39 нед., самостоятельные роды	mFISH
E1	Плодная часть плаценты, срок гестации: 40 нед., кесарево сечение	mFISH
PEpl-10	Плодная часть плаценты, срок гестации: 39 нед., кесарево сечение	mFISH
PE12	Плодная часть плаценты, срок гестации: 36 нед., кесарево сечение	GTG
Plac115	Плодная часть плаценты, срок гестации: 39 нед., кесарево сечение	GTG
Plac186	Плодная часть плаценты, срок гестации: 39 нед., кесарево сечение	GTG
Plac674	Плодная часть плаценты, срок гестации: 36 нед., кесарево сечение	GTG
Plate352	Плодная часть плаценты, срок гестации: 40 нед., кесарево сечение	mFISH
Vart351	Вартонов студень пупочного канатика, срок гестации: 39 нед., самостоятельные роды	mFISH
Dg15	Слизистая оболочка десны зубодесневых карманов мужчины	GTG
Ging-Ram	Слизистая оболочка десны зубодесневых карманов мужчины	mFISH

enCult™ MSC Basal Medium Human (Stem Cell Biology, США).

Принадлежность к ММСК оценивали с учетом требований международной организации клеточной терапии (Dominici et al, 2006). Дифференцировку клеток проводили по стандартным методикам согласно инструкции производителя (Biological Industries, США). На 3-ем пассаже при достижении клетками 80–90% конfluence проводили смену питательной среды на индукционные среды: полные питательные среды с дифференцировочными факторами для остеогенной (MSCgo™ Osteogenic XF dif-

ferentiation media; Biological Industries, США), хондрогенной (MSCgo™ Chondrogenic differentiation medium; Biological Industries, США) и адипогенной (MSCgo™ Adipogenic XF differentiation media; Biological Industries, США) дифференцировки. В качестве контроля использовали ММСК тех же образцов и пассажей, культивированные в стандартной ростовой среде без добавления дифференцировочных добавок.

Иммунофенотип ММСК исследовали на проточном цитометре BDFACS Canto II. Окрашивание клеток проводили с помощью моноклональных антител

против поверхностных антигенов CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, HLA-DR, конъюгированных с флюорохромами в соответствии с рекомендациями производителя (BDBiosciences, США).

Для контроля происхождения и отсутствия кросс-контаминации клеточных линий проводили анализ коротких tandemных повторов (STR-типирование) с использованием набора реагентов COrDIS Plus (Гордиз, Россия). Для выделения ДНК использовали ПЦР-совместимый реагент для лизиса COrDIS Sprint (Гордиз, Россия), а также мультиплексную амплификацию 19-ти STR-маркеров и локуса амелогенина человека; капиллярный электрофорез выполняли по инструкции производителя (Гордиз, Россия).

Для проведения цитогенетического исследования через 2–3 сут после пассирования клеток при достижении клетками фазы логарифмического роста во флакон добавляли колхицин на 4–5 ч, в отдельных случаях – на 18 ч для накопления митотических клеток. После этого клетки снимали со дна флакона с помощью раствора трипсин–ЭДТА (StemCell, США) (2–5 мин при 37°C). Гипотонизацию проводили 0.55%-ным раствором KCl (10 мин при 37°C). Фиксировали клетки смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (в соотношении 3 : 1) с использованием 3-х смен фиксатора. Полученные клеточные суспензии раскапывали на охлажденные влажные стекла и подсушивали. Для GTG-анализа цитогенетические препараты обрабатывали 0.25%-ным трипсином и окрашивали красителем Гимза.

Для окраски mFISH цитогенетические препараты подвергали щелочной денатурации, проводили гибридизацию с дифференциально мечеными специфичными ДНК-зондами (24Xyte; MetaSystems, Germany) в течение 24–48 ч. Затем препараты отмывали в растворе 0.4-кратного SSC при 72°C 2 мин и в растворе 2-кратного SSC-Tween 20, 30 с при комнатной температуре, контрастировали красителем DAPI, следуя протоколу производителя (MetaSystems, Germany). Препараты автоматически сканировали и фотографировали, а затем анализировали с помощью программного обеспечения Ikarus или Isys (Metasystems, Германия). Для анализа отбирали метафазные пластинки, в том числе полиплоидные, по принципу общей цитологической пригодности. Количество полиплоидных клеток (%) оценивали по общепринятым критериям (Миронов, 2013) с помощью микроскопа при увеличении объектива 10× при анализе 500–1000 метафазных пластинок после сканирования препарата в системе MetaSystems Metafer (Metasystems, Германия). Признаком клональной в соответствии с международной цитогенетической номенклатурой (Shaffer et al., 2013) считали выявление трех идентичных клеток с гипопloidией или двух с гиперпloidией или структурной хромосомной аномалией.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали *t*-критерий Стьюдента при альтернативной изменчивости. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы с уровнем значимости $P < 0.05$ (Рокицкий, 1967).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено исследование 22-х линий ММСК человека, выделенных из разных источников: костного мозга (6), жировой ткани (5), плаценты (9), слизистой оболочки десны (2) (табл. 1). Первичные культуры разных тканей отличались по клеточному составу. Наряду с веретеновидными клетками в культурах костного мозга наблюдали округлые клетки без митотического рисунка с частичным прикреплением к пластику, плацентарных тканей (распластанные клетки полигональной или звездчатой формы с несколькими отростками), жировой ткани (полигональные клетки с вакуолями в цитоплазме) и слизистой десны (эпителиоподобные клетки). После первого пассажа клеточные линии, выделенные из разных тканей, морфологически практически не отличались, были гомогенными по клеточному составу, состояли из фибробластоподобных клеток с четко очерченным ядром, перинуклеарной зернистостью и длинными отростками, образующими многослойные колонии.

Вне зависимости от первичного источника, во всех линиях ММСК была подтверждена способность клеток к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях (данные не представлены). При анализе иммунофенотипа с помощью проточной цитометрии во всех клеточных линиях, вне зависимости от первичного источника, было выявлено присутствие в большом количестве (более 96%) маркеров ММСК: CD90 (N-гликозилированный заякоренный белок с вариабельным иммуноглобулиноподобным доменом), CD105 (эндоглин), CD73 (экто-5'-нуклеотидаза); и малое количество (менее 1.7%) маркеров гемопоэтического и лимфоцитарного происхождения – CD34, CD45, а также HLA-DR.

Анализ амплифицированных ПЦР-продуктов STR-локусов (электрофореграммы STR-профилей не представлены) подтвердил стабильность генетических профилей и отсутствие кросс-контаминации в исследованных клеточных образцах при культивировании.

Конституциональный кариотип доноров всех клеточных линий был нормальным: 46,XX (женский) или 46,XY (мужской). Для анализа хромосомной изменчивости во всех исследованных клеточных линиях оценивали частоты возникновения ХА: одиночных и парных фрагментов, внутри- и межхромосомных хроматидо-хроматидных обменов, крупных делеций, дупликаций и инверсий, сбалансированных и несбалансированных транслокаций, дисцентри-

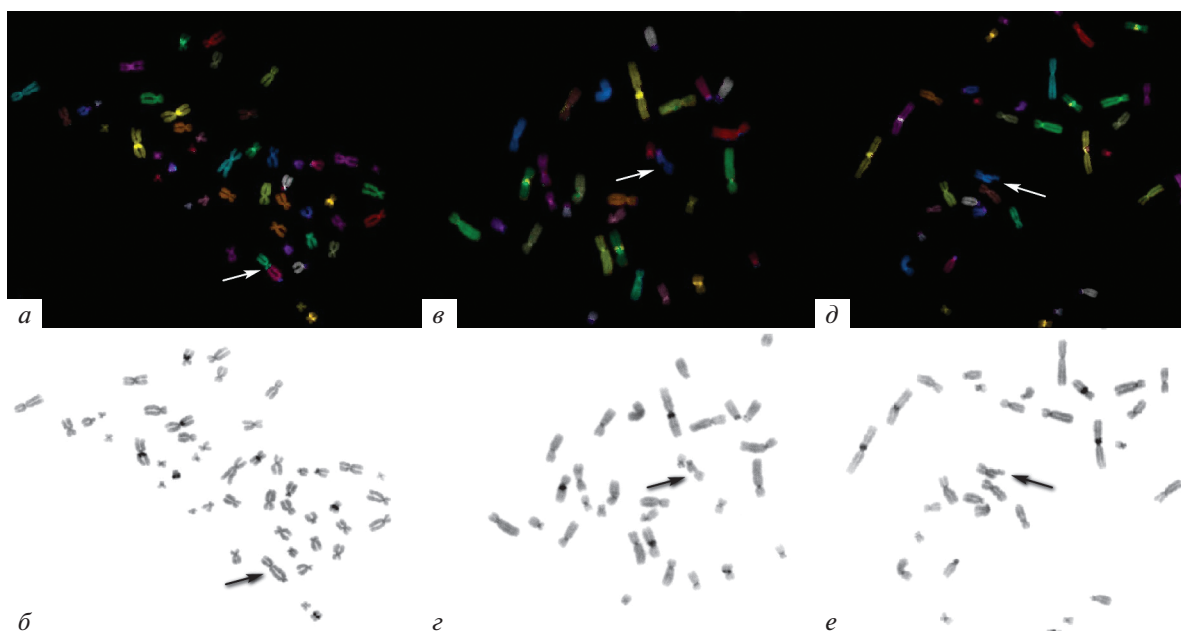


Рис. 1. Фрагменты метафазных пластинок с хромосомными aberrациями. Окраска по методу FISH (а, в, д) и красителем DAPI (инvertированное изображение) (б, г, е). Стрелками обозначены: дицентрическая хромосома (а, б) и хроматидные фрагменты (в, г, д, е).

ческих хромосом (рис. 1, 2). Попарное межлинейное сравнение долей aberrантных клеток во всех линиях ММСК из разных источников показало отсутствие

значимых различий между линиями от разных доноров из одинаковых и разных источников при разных методах окраски хромосом (во всех случаях $P > 0.01$).

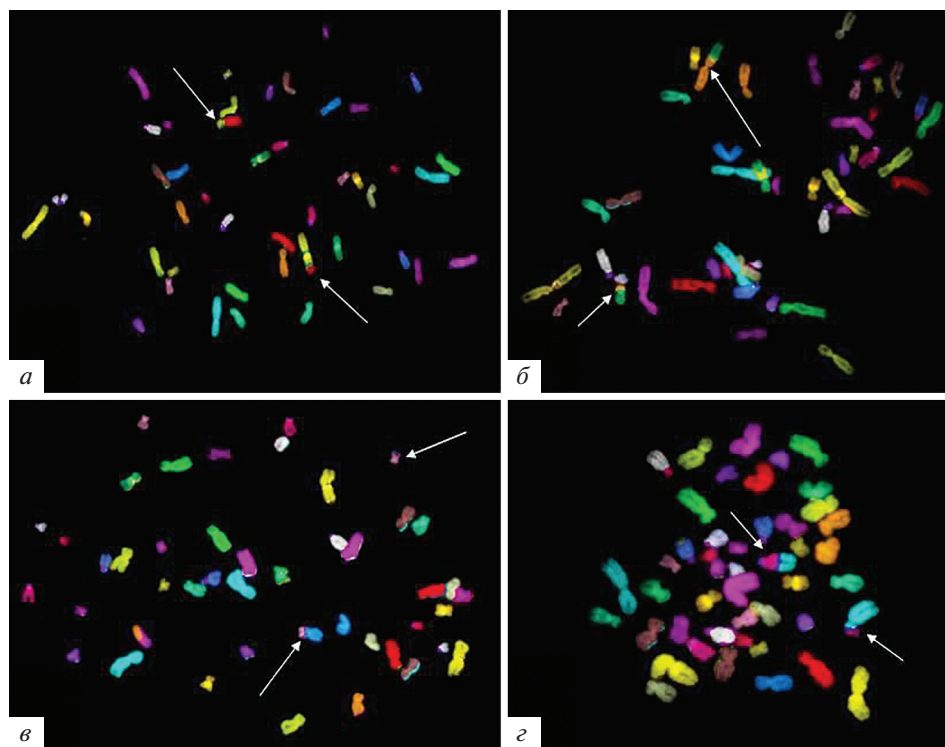


Рис. 2. Метафазные пластинки со сбалансированными хромосомными транслокациями между хромосомами 1 и 15 (а), 8 и 9 (б), хромосомами X и 17 (в), 2 и 15 (д); перестроенные хромосомы обозначены стрелками, окраска mFISH.

Таблица 2. Хромосомная изменчивость в линиях ММСК

Линия	Метафазы, %	Хромат. фрагменты, %	Хромос. фрагменты, %	ТЛ, %	ДЦ, %	Доли клеток с ХА, %
Окраска GTG						
BM136	43	0(0)	0(0)	1(233)	0(0)	2.33 ± 2.30
BM175	35	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.00 ± 2.63
BM183	33	0(0)	1(303)	1(303)	0(0)	6.06 ± 4.15
Adip685	50	1(20)	0(0)	0(0)	0(0)	2.00 ± 1.98
Adip690	25	1(40)	0(0)	0(0)	0(0)	4.00 ± 3.90
Plac115	27	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.00 ± 3.03
Plac186	66	0(0)	0(0)	2(303)	0(0)	3.03 ± 2.11
Plac674	40	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.00 ± 2.09
PE12	105	1(095)	0(0)	1(095)	0(0)	1.90 ± 1.33
Dg15	22	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.00 ± 4.00
Всего метафаз	446					
M ± m, %		067 ± 039	023 ± 022	112 ± 050	0 ± 0	2.02 ± 0.67
Окраска mFISH						
BM183	115	3(261)	0(0)	0(0)	0(0)	2.61 ± 1.49
DB1	100	2(2)	0(0)	2(2)	0(0)	4.00 ± 1.96
LB1	64	0(0)	1(156)	1(156)	0(0)	3.13 ± 2.17
BM231	31	2(646)	1(3.23)	1(323)	0(0)	12.92 ± 6.02
Adip360	61	0(0)	1(164)	2(328)	0(0)	4.92 ± 2.77
Adip381	16	0(0)	0(0)	1(625)	0(0)	6.25 ± 6.05
Adip442	31	0(0)	0(0)	0(0)	1(323)	3.23 ± 3.17
Vart351	43	0(0)	0(0)	1(233)	0(0)	2.33 ± 2.30
Plate352	33	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.00 ± 2.79
E1	122	0(0)	2(164)	0(0)	0(0)	1.64 ± 1.15
Ging-Ram	49	0(0)	1(204)	0(0)	0(0)	2.04 ± 2.02
Всего метафаз	665					
M ± m, %		1.05 ± 0.40	0.91 ± 0.37	1.20 ± 0.42	0.15 ± 0.15	3.31 ± 0.69

Примечание к табл. 2, 3. ХА – хромосомные aberrации; Хромат., Хромос. – хроматидные, хромосомные соответственно; ТЛ – транслокации; ДЦ – дицентрические хромосомы.

В среднем, при окраске GTG было выявлено ХА в ММСК костного мозга $2.80 \pm 1.56\%$, жировой ткани – $3.00 \pm 1.97\%$, плаценты – $1.23 \pm 0.71\%$, десны – $0 \pm 0\%$; статистически достоверные отличия между этими группами отсутствуют ($P > 0.05$). Суммарная частота ХА при анализе 446 метафаз, окрашенных методом GTG, составила $2.02 \pm 0.67\%$. При окраске mFISH было выявлено ХА в ММСК костного мозга в среднем $5.66 \pm 1.31\%$, жировой ткани – $4.80 \pm 2.06\%$, плаценты – $1.32 \pm 0.71\%$, десны – $2.04 \pm 2.02\%$; статистически достоверные отличия между этими значениями отсутствуют ($P > 0.05$). Суммарная частота ХА в mFISH-окрашенных метафазах ММСК составила $3.31 \pm 0.69\%$ (табл. 2).

Кариотип клеточных линий PEp1-10 и Chog-354. Для изучения структуры кариотипа ММСК был проведен расширенный цитогенетический анализ

методом mFISH двух линий, выделенных из плацентарной ткани (PEp1-10 и Chog-354, табл. 3). В 96.6% случаев (426 из 441 митотических клеток) линии PEp1-10 был определен нормальный диплоидный кариотип 46,XX, а в 3.4% случаев выявлены ХА (табл. 3). 67% ХА приходилось на хроматидные, хромосомные фрагменты и дицентрические хромосомы с парными фрагментами а 33% ХА – на транслокации, в том числе робертсоновские.

Из 334 метафаз линии Chog-354 в 17 (5.1%) были выявлены хромосомные повреждения, 312 (93.4%) имели нормальный кариотип. Остальные клетки (1.5%) несли клональные перестройки, ХА в них учитывали как одно событие. Расчет доли ХА проводили исходя из общего числа проанализированных клеток. Соотношение частот хромосомных транслокаций и фрагментов составило 35 к 65. Кроме того, в

Таблица 3. Хромосомные aberrации в клеточных линиях REp1-10 и Chor354

Линия ММСК	Метафазы	Хромат. фрагменты	Хромос. фрагменты	ТЛ	ДЦ	Всего ХА
REp1-10	441 (100%)	4 (0.91%)	4 (0.91%)	5 (1.13%)	2 (0.45%)	15 (3.40 ± 0.86%)
Chor-354	334 (100%)	5 (1.50%)	6 (1.80%)	6 (1.80%)	0 (0%)	17 (5.09 ± 1.20%)

Выявленные ХА: t(3;10;22)(p13;q112;q112); t(11;14)(q12;p112); t(12;14)(p112;p112); rob(14;22)(q10;q10); t(16;20)(p112;p112),chr(16;20)(p112;p112); dic(7;14)(q112;q24),chr(7;14)(q112;q24)x2; dic(10;11)(q23;q13),chr(10;11)(q23;q13); chtb(X)(q22); chtb(6)(q14); chtb(7)(q22); chtb(14)(q24); chr(1)(p22); chr(2)(p21); chr(6)(q21)

ХА, выявленные в диплоидных клетках: t(X;17)(p221;q21) [3]; t(1;5)(q31;p13) [4]; t(1;10)(p361;q112); t(2;6;16)(q31;q25;q112); t(8;21)(p21;p112); rob(14;14)(p10;p10); chtb(1)(p31); chtb(3)(q22); chtb(8)(q13); chtb(14)(q23); chtb(19)(p12); chr(X)(q27); chr(6)(q12); chr(8)(q23); chr(10)(q24); chr(17)(p12); chr(19)(p13)
 полиплоидных клетках*: t(2;6;16)(q31;q25;q112)x2; t(11;14)(q22;q24); t(14;22)(p112;q112); chtb(X)(p21); chtb(2)(q32); chtb(3)(q26); chr(6); chr(X)(?); chr(1)(p10)

Курсивом выделены клональные ХА, в квадратных скобках указано их число; t – транслокация, rob – Робертсоновская транслокация, dic – дицентрическая хромосома, chtb – хроматидный разрыв, chr – хромосомный разрыв. * ХА, выявленные в полиплоидных клетках, не учитывали при подсчете среднего; полиплоидные клетки не входят в общее число проанализированных метафаз.

этой линии выявили три клональных ХА со структурными сбалансированными маркерными перестройками хромосом (см. ниже), одна из которых была дублирована в полиплоидной клетке, то есть повреждение произошло в диплоидной клетке до полиплоидизации.

Распределение спонтанных разрывов хромосом по геному в ММСК. На рис. 3 представлены результаты распределения частот разрывов на 1 Мб (1 млн пар оснований) длины каждой из хромосом, рассчитанные с использованием геномной базы Human Genome Assembly, версии GRCh38.p13. Клональные aberrации учитывались как одно событие. Всего 1776 метафазных клеток и 93 хромосомных повреждения были проанализированы в клеточных линиях REp1-10, Chor-354 и в объединенной группе ММСК из разных тканей. Средние частоты разрывов хромосом в этих группах не отличались ($P > 0.05$). При анализе межхромосомных колебаний частот разрывов статистически достоверных отличий не выявлено в Chor-354 и в объединенной группе ММСК. В кле-

точной линии REp1-10 разрывы в хромосомах 14 и 22 возникали чаще, чем в других (достоверные отличия от основной генеральной совокупности данных, t -критерий $P < 0.05$) (рис. 3).

Клональные ХА. Эти ХА были обнаружены в 3-х из 22-х исследованных клеточных линий (двух из костного мозга и одной из плацентарной ткани). Все клоны были небольшими, появлялись до 5-го пассажа культивирования. В клональных aberrациях были задействованы хромосомы X, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 15, 16, 17. В двух линиях ММСК, выделенных из костного мозга – VM136 и LB1 – выявлены малочисленные клоны с кариотипами 46,XY,t(1;15)(q12;q21) (рис. 4) и 46,XY,t(4;7)(q21;q22), составляющие $4.6 \pm 3.2\%$ и $3.1 \pm 2.2\%$ соответственно. В клетках Chor-354 выявлено сразу три клона клеток с хромосомными перестройками, доли которых составляют 0.9 ± 0.52 , 1.2 ± 0.6 и $0.3 \pm 0.3\%$. Для двух первых были характерны простые реципрокные сбалансированные транслокации с участием двух хромосом: 46,X,t(X;17)(p22.1;q21) и 46,XX,t(1;5)(q31;p13) (рис. 4). В третьем клоне была

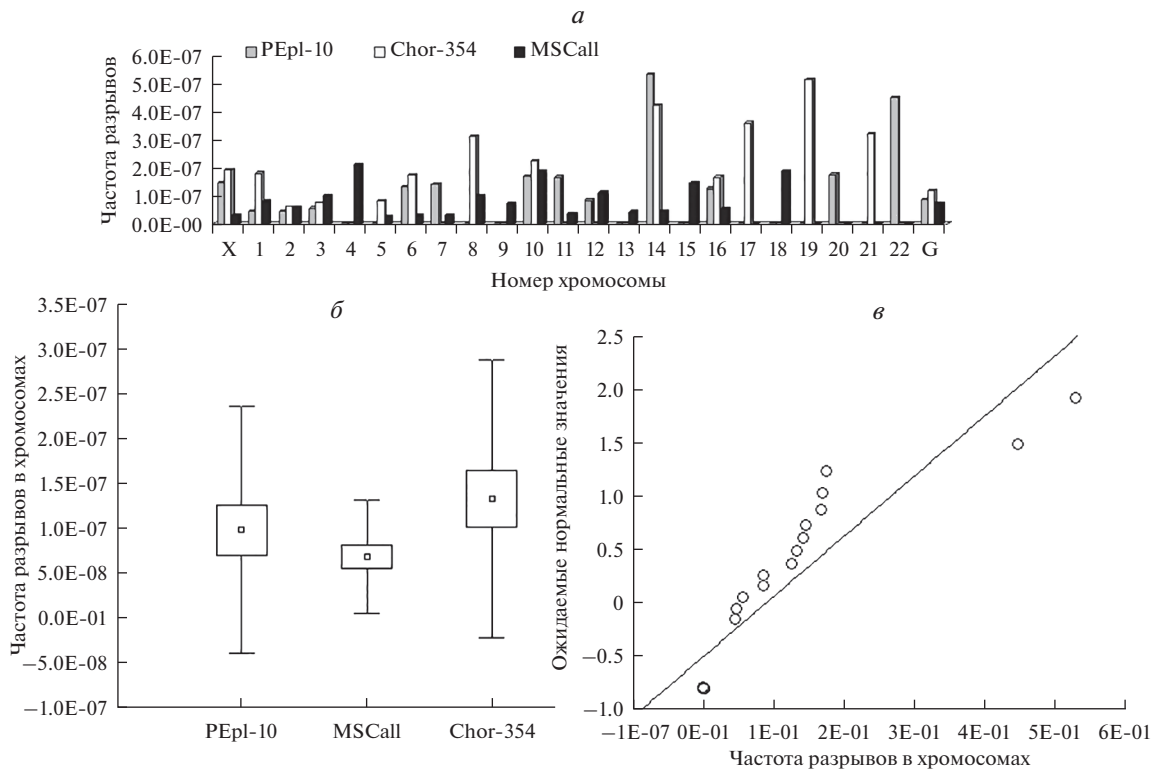


Рис. 3. Распределение частот разрывов хромосом на 1 млн пар оснований (1 Mb) в ММСК линий PEpl-10, Chor-354 и в объединенной группе ММСК (MSCall). *а* – Средние частоты разрывов (столбцы) по каждой из хромосом, X – половая хромосома X, G – средняя частота разрывов хромосом. *б* – Средние частоты разрывов хромосом (квадратик внутри столбца), ошибки средних значений (верхняя и нижняя границы столбца), стандартное отклонение (вертикальные отрезки). *в* – Распределение частот разрывов хромосом (кружки) в клеточной линии PEpl-10; прямая линия – ожидаемые значения нормального распределения. Хромосомы 14 и 22 отличаются от основной генеральной совокупности данных ($P < 0.05$).

определена комплексная перестройка с участием хромосом 2, 6 и 16 с образованием трех дериватов: $\text{der}(2)(2\text{pter} \rightarrow 2\text{q}31::16\text{q}11.2 \rightarrow 16\text{qter})$; $\text{der}(6)(6\text{pter} \rightarrow 6\text{q}25::2\text{q}31 \rightarrow 2\text{qter})$; $\text{der}(16)(16\text{pter} \rightarrow 16\text{q}11.2::6\text{q}25 \rightarrow 6\text{qter})$. Такая же перестройка была дублирована в одной из полиплоидных клеток.

Полиплоидия. Частота встречаемости полиплоидных делящихся клеток в линиях ММСК значительно варьировала (от 0 до 24.6%, табл. 4). В целом, в клетках линий, выделенных из плаценты, частота полиплоидов была выше (13.6%) по сравнению с клетками линий, выделенных из костного мозга (7.02%), жировой ткани (7.48%) и десны (2.0%). Пределы варибельности частоты полиплоидных клеток были наименьшими в ММСК, выделенных из плаценты (7.6–18.6%) по сравнению с клетками линий из костного мозга (1.8–17.1%) и жировой ткани (0–24.6%).

При кариотипическом анализе в 4-х плацентарных ММСК (Vart351, E1, PEpl-10 и Chor354) на 3–5 пассажах культивирования были выявлены эндомтозы (эндоредупликации), обнаружившиеся в виде квадрихромосом в метафазе (рис. 5). Это тип полиплоидии, характерный для быстроделющихся тканей,

при котором после репликации ДНК хромосомы не расходятся к полюсам.

ОБСУЖДЕНИЕ

Первичные культуры ММСК имели фенотипические особенности, свойственные тканям, из которых они были выделены. Ко второму passages культуры исследованные клеточные линии можно было охарактеризовать как однородные фибробластоподобные, со схожими уровнями иммунологических маркеров.

Несмотря на то, что разные по происхождению ММСК окрашивали разными методами, мы заметили некоторые особенности при определении ХА при GTG- и mFISH-анализах. Разные методы в равной степени хорошо выявляли хромосомные транслокации (1.12 и 1.2% соответственно; табл. 2), но не ацентрические фрагменты и дицентрические хромосомы с парными фрагментами. Фрагменты визуализировались хуже после обработки препаратов трипсином (GTG-окраска), чем при DAPI-контрастировании хромосом (mFISH). От общего числа хромосомных повреждений на них приходилось 44% при GTG- и

Таблица 4. Частоты полиплоидии в разных линиях ММСК

Линия	Метафазы	ПП-метафазы, %	Линия	Метафазы	ПП-метафазы, %
BM136	645	2.3 ± 0.6	Dg15	1000	2.0 ± 0.4
BM175	525	17.1 ± 1.6	Ging-Ram	812	2.0 ± 0.5
BM183	660	9.2 ± 1.1	Vart351	516	18.6 ± 1.7
DB1	1000	1.8 ± 0.4	Plate352	660	12.1 ± 1.3
LB1	960	2.0 ± 0.4	E1	1098	15.6 ± 1.1
BM231	775	9.7 ± 1.1	Plac186	660	7.6 ± 1.0
Adip360	610	24.6 ± 1.7	Plac674	600	12.5 ± 1.3
Adip381	512	6.3 ± 1.1	PE12	1050	15.2 ± 1.1
Adip442	496	6.5 ± 1.1	PEpl-10	995	11.5 ± 1.0
Adip685	875	0 ± 0.1	Chor-354	668	13.8 ± 1.3
Adip690	920	0 ± 0.1	115pl-p4	1000	15.2 ± 1.1

ПП – полиплоидные.

59% при mFISH-окраске. Примерное соотношение (65 : 35) между нестабильными (хромосомные и хроматидные фрагменты, дицентрические хромосомы) и стабильными (транслокации) абберациями было характерно для всех исследованных ММСК при окраске mFISH, а при GTG-анализе оно составляло 44 : 56 (табл. 2, 3). Метод mFISH позволил более точно и однозначно интерпретировать большинство ХА в метафазах с разной степенью конденсации ДНК.

Средние значения частот неклональных ХА составили 2–3% и соответствовали ранее описанным для ММСК (Бочков, Никитина, 2008). Неклональные ХА выявляли в ММСК человека, выделенных из кожи век, костного мозга, вены пупочного канатика (Duarte et al., 2012; Borgonovo et al., 2014; Полянская, 2018). Исследование частот ХА является актуальной задачей при оценке генетической стабильности ММСК. Высокая частота хромосомных повреждений может быть признаком кариотипической нестабильности (Полянская, 2018) и причиной инактивации генов опухолевой супрессии и амплификации онкогенов в культивируемых клеточных линиях (Borgonovo et al., 2014).

Нестабильность отдельных районов хромосом можно описать распределением разрывов в них. Исходя из того, что основной вклад в спонтанный уровень ХА в неопухолевых клетках человека вносит естественный фон радиации, распределение разрывов по хромосомам должно было быть равномерным. Это подтвердилось для среднегрупповых значений ММСК из разных тканей и клеток линии Chor-354, но не для клеточной линии PEpl-10, в которой разрывы в хромосомах 14 и 22 происходили чаще, чем в других. Однако небольшое количество выявленных мутационных событий пока не позволяет сделать окончательный вывод о специфичности хромосомных повреждений и тканевой или индивидуальной вариабельности. На ранних пассажах (3–5) в процессе адаптации к условиям культивирования в клеточных линиях могут возникать разные типы ХА, их описание и анализ частот являются важными задачами регулирования вопросов о цитогенетической пригодности биомедицинских продуктов.

В независимых исследованиях в ММСК были описаны цитогенетические клоны с три- и тетрасомией 8, моносомией 6, сбалансированными хромосомными транслокациями (Бочков и др., 2007; Буя-

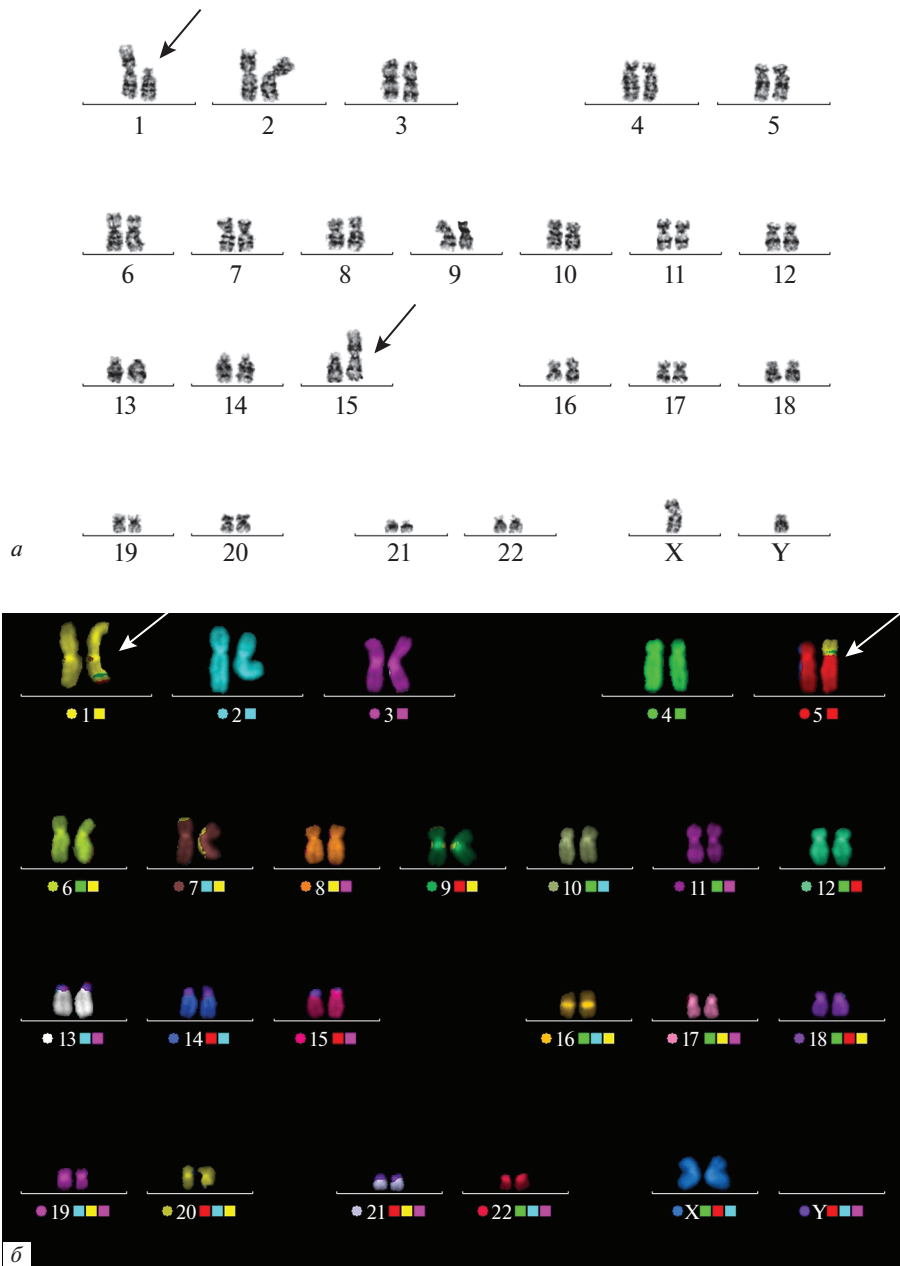


Рис. 4. Кариограммы с клональными хромосомными транслокациями (обозначены стрелками). *а* – клетки VM136: 46,XY,t(1;15)(q12;q21), окраска GTG; *б* – клетки Chor-354: 46,XX,t(1;5)(q31;p13), окраска mFISH.

новская и др., 2009; Serakinci et al, 2014; Nikitina et al, 2018; Кольцова и др., 2020) на разных пассажах культивирования. При длительном культивировании рост патологических клонов мог прекращаться, приостанавливаться или значительно подавлять пролиферацию нормальных клеток в культуре. Например, по результатам исследования линии VM136, не вошедшим в эту статью, клон с транслокацией $t(1;15)$ не удалось выявить уже на 7 пассаже культивирования.

Мы наблюдали клонообразование клеток с цитогенетическими нарушениями в 14% (3-х из 22) ММСК до 5-го пассажа культивирования. Все кло-

ны были небольшими и не превышали 10%-ный уровень, допустимый Международным обществом по клеточной терапии (Barkholt et al., 2013). Линия Chor-354 отличалась от двух остальных выраженной хромосомной нестабильностью как в диплоидных, так и в кариотипированных полиплоидных клетках. Кроме того, в ней было выявлено сразу три клональных транслокации, причем, одна из них была дублирована в полиплоидной клетке. Известно, что полиплоидия является компенсаторным механизмом восполнения части потерянного в результате делеций, анеуплоидий и несбалансированных перестро-

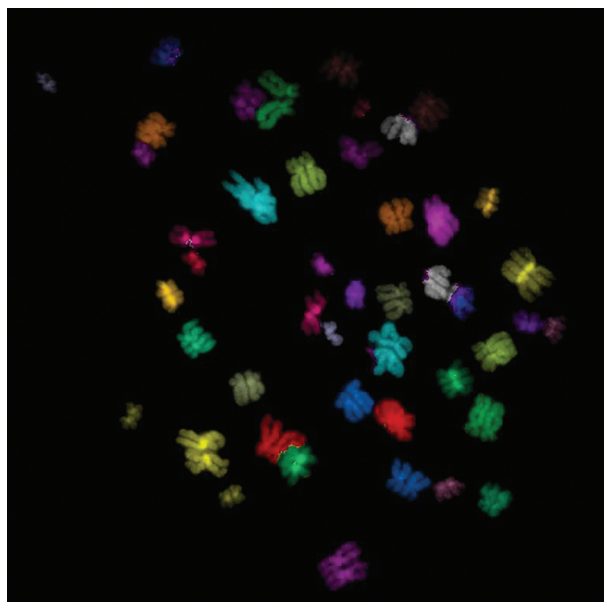


Рис. 5. Пример клетки с эндоредупликацией, окраска mFISH.

ек генетического материала при формировании субклонов в процессе адаптации постоянных опухолевых клеточных линий к условиям *in vitro* (Мамаева, 1996). С другой стороны, прогрессию хромосомной нестабильности и анеуплоидии в полиплоидных клетках рассматривают как важное звено патогенеза злокачественных опухолей и тканевых нарушений, связанных со старением (Tanaka et al., 2018).

Полиплоидия встречается и в физиологических условиях в некоторых тканях человека (Tanaka et al., 2018), в диплоидных клеточных линиях фибробластов она может достигать 3–5%, в ММСК костного мозга после культивирования – до 2% (Borgonovo et al., 2014). По результатам некоторых научных исследований (Grimes et al., 2009; Borgonovo et al., 2014) и нашим данным частота полиплоидов может широко варьировать не только в клеточных линиях из разных источников и от разных доноров, но и в разных популяциях одной линии ММСК (Кольцова и др., 2020). Повышенная частота полиплоидии в линиях плаценты в нашей работе требует дальнейшего изучения с использованием дополнительных методов анализа (интерфазной цитогенетики, измерения количества ДНК в клетке). В тоже время, полученные данные могут свидетельствовать о тканевой принадлежности полиплоидных клеток, что косвенно подтверждается сведениями о присутствии клеток с эндоредупликациями в тканях плаценты человека (Edgar et al., 2014). Также известно, что высокая частота тетраплоидии в прямых препаратах хориона довольно регулярно встречается, причем при развивающейся нормальной беременности эта форма полиплоидии может быть ограничена исключительно пла-

центой (Баранов, Кузнецова, 2007). А в первичных культурах ворсин хориона человека доля полиплоидных клеток может достигать 12% (Grimes et al., 2009).

В большинстве исследованных линий около 90% клеток имели нормальный диплоидный кариотип. В клетках Chor-354 это значение с учетом полиплоидии (13.8%), спонтанных ХА (5.1%) и клонов (2.4%) составило всего около 79%. Допустимое количество клональных, неклональных хромосомных или геномных нарушений для диплоидных клеточных линий ММСК можно обсуждать в связи с их назначением. Для тех, которые используют только *in vitro* подойдут регламенты оценки клеточных линий-продуцентов иммунобиологических препаратов. Поддержание диплоидного стабильного кариотипа в 75% клеток достаточно для сохранения биологических свойств линии в фазе активного роста (ОФС.1.7.2.0011.15). Для медицинского использования Международное общество клеточной терапии не рекомендует к терапевтическому применению ММСК с 10%-ыми клонами aberrantных клеток. При этом предельная частота полиплоидии и неклональных ХА не регулируются (Barkholt et al., 2013; Полянская, 2018). Чаще всего такой подход дает представление только о конституциональном кариотипе донора ткани, но не хромосомной стабильности клеточной линии.

В тоже время, данные об осложнениях клеточной терапии (в том числе, глионейрональных новообразованиях из донорских клеток) у людей после трансплантации ММСК и других стволовых клеток, культивируемых *in vitro*, вызывают настороженность

(Bauer et al., 2018). Пока патологическая значимость тех или иных хромосомных нарушений и их влияние на физиологические, биологические свойства и онкогенность ММСК обсуждается, решение об их терапевтическом применении принимается с учетом оптимального соотношения риска и пользы (Negi, 2019). Накопление данных о частоте хромосомной и кариотипической изменчивости и характере распределения разрывов в хромосомах позволит определить допустимые пределы для отбора генетически стабильных диплоидных клеточных линий ММСК, предназначенных для медицинских целей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2025 гг. на период до 2030 г.” Медицинского биофизического центра им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

От каждого из включенных в исследование доноров клеточного материала было получено информированное добровольное согласие на его забор, сохранение и использование.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Айзенштадт А.А., Сказина М.А., Котелевская Е.А., Елсукова Л.В., Золина Т.Л., Пономарцев Н.В., Галактионов Н.К., Галембо И.А., Иволгин Д.А., Масленникова И.И., Енукашвили Н.И. 2018. Характеристики мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека при длительном культивировании *in vitro*. Вестник Сев.-Зап. гос. мед. университета им. И.И. Мечникова. Т. 10. № 1. С. 11. (Aizenshtadt A.A., Skazina M.A., Kotelevskaya E.A., Yelsukova L.V., Zolina T.L., Ponomartsev N.V., Galaktionov N.K., Galemba I.A., Ivolgin D.A., Maslennikova I.I., Erukashvily N.I. 2018. Characterization of umbilical cord mesenchymal stromal cells during long-term expansion *in vitro*. Herald of North-Western I.I. Mechnikov State Medical University. V. 10 № 1. P. 11.)
- Баранов В.С., Кузнецова Т.В. 2007. Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты. СПб.: Издательство Н-Л. 640 С. (Baranov V.S., Kuznetsova T.V. Cytogenetics of human embryonic development: scientific and practical aspects. 2007. St. Petersburg: Publishing House N-L. 640 pp.)
- Бочков Н.П., Воронина Е.С., Косякова Н.В., Лир Т., Ржанинова А.А., Катосова Л.Д., Платонова В.И., Гольдштейн Д.В. 2007. Хромосомная изменчивость мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека. Клеточные технологии в биологии и медицине. № 1. С. 11. (Bochkov N.P., Voronina E.S., Kosyakova N.V., Lyir T., Rzhaniнова A.A., Katosova L.D., Platonova V.I., Rzhaniнова A.A., Goldshtein D.V., Liehr T. 2007. Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells. Bulletin of Exper. Biol. Med. V. 143. № 1. P. 122.)
- Бочков Н.П., Никитина В.А. 2008. Цитогенетика стволовых клеток человека. Молекулярная медицина. № 3. С. 40. (Bochkov N.P., Nikitina V.A. 2008. Cytogenetics of human stem cells. Mol. Med. (Russ.) № 3. P. 40.)
- Бочков Н.П., Чеботарёв А.Н. 1989. Наследственность человека и мутагены внешней среды. М.: Медицина. 270 С. (Bochkov N.P., Chebotarev A.N. 1989. Human heredity and environmental mutagens. M.: Medicine. 270 pp.)
- Буяновская О.А., Кулешов Н.П., Никитина В.А., Воронина Е.С., Катосова Л.Д., Бочков Н.П. 2009. Спонтанная анеуплоидия и клонообразование в стволовых клетках жировой ткани при разных сроках культивирования. Клеточные технологии в биологии и медицине. № 3. С. 123. (Buyanovskaya O.A., Kuleshov N.P., Bochkov N.P., Nikitina V.A., Voronina E.S., Katosova L.D. 2009. Spontaneous aneuploidy and clon formation in adipose tissue stem cells during different periods of cultivation. Bull. Exper. Biol. Med. V. 148 № 1. P. 109.)
- 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. № 9. С. 623. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Petrosyan M.A., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Polyanskaya G.G. 2020. Obtaining and characterization of lines of mesenchymal stem cells isolated from different areas of the placenta of one donor. Tsitologiya. V. 62. № 9. P. 623.)
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенной из десны человека. Цитология. Т. 61. № 8. С. 658. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Polyanskaya G.G. 2019. Derivation and characterization of mesenchymal stem cell line isolated from human gingiva. Tsitologiya. V. 61. № 8. P. 658.)
- Мамаева С.Е. 1996. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология. Т. 38. № 8. С. 787. (Mamaeva S.E. 1996. Regularities of karyotypic evolution of cells in culture. Tsitologiya. V. 38. № 8. P. 787.)
- Миронов А.Н. (ред.). 2013. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). 2. М.: Гриф и К. 536 с. (Mironov A.N. (Ed.) 2013. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs (immunobiological drugs). 2. M.: Grif and K. 536 pp.)
- Полянская Г.Г. 2018. Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор). Клеточные культуры. №. 34. С. 3. (Polyanskaya G.G. 2018. Comparative analysis of the lines of human mesenchymal stem cells derived in the collection of cell cultures of vertebrates. (Review). Cell Cultures (Inform. Bull.), № 34. P. 3.)

- Рокицкий П.Ф. 1967. Биологическая статистика. Минск: Высшая школа. 328 с. (Rokitsky P.F. 1967. Biological statistics. Minsk: Vishaya shkola. 328 p.)
- Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Buscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Mačiulaitis R., Palomäki T., Schneider C.K., Sensebé L. et al. 2013. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies – bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy*. V. 15. P. 753.
- Bauer G., Elsallab M., Abou-El-Enein M. 2018. Concise review: A comprehensive analysis of reported adverse events in patients receiving unproven stem cell-based interventions. *Stem Cells Transl. Med.* V. 7. P. 676.
- 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. Hemoter.* V 36. P. 202.
- Costa L.A., Eiro N., Fraile M., Gonzalez L.O., Saá J., Garcia-Portabella P., Vega B., Schneider J., Vizoso F.J. 2020. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 22. P. 1.
- Duarte D.M., Cornélio D.A., Corado C., Medeiros V.K., de Araújo L.A., Cavalvanti G.B. Jr., de Medeiros S.R. 2012. Chromosomal characterization of cryopreserved mesenchymal stem cells from the human subendothelium umbilical cord vein. *Regen Med.* V. 7. P. 147.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. V. 8. P. 315.
- Edgar B., Zielke N. & Gutierrez C. 2014. Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* V. 15. P. 197.
- Grimes B.R., Steiner C.M., Merfeld-Clauss S., Traktuev D.O., Smith D., Reese A., Breman A.M., Thurston V.C., Vance G.H., Johnstone B.H., Slee R.B., March K.L. 2009. Interphase FISH demonstrates that human adipose stromal cells maintain a high level of genomic stability in long-term culture. *Stem Cells Dev.* V. 18. P. 717.
- Mastrolia I., Foppiani E.M., Murgia A., Candini O., Samarelli A.V., Grisendi G., Veronesi E., Horwitz E.M., Dominici M. 2019. Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. *Stem Cells Transl. Med.* V. 8. P. 1135.
- Neri S. 2019. Genetic stability of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine applications: A fundamental biosafety aspect. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 2406.
- Nikitina V., Astrelina T., Nugis V., Ostashkin A., Karaseva T., Dobrovolskaya E., Usupzhanova D., Suchkova Y., Lomonosova E., Rodin S., Brunchukov V., Lauk-Dubitskiy S., Brumberg V., Machova A., Kobzeva I., Bushmanov A., Samoilo V. 2018. Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture. *PLoS One.* 2018. V. 13. P. e0192445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192445>
- Petricciani J.C. 2006. Cell substrates: where do we stand after 50 years of discussion? *Dev. Biol. (Basel).* V. 123. P. 11.
- Rangel N., Forero-Castro M., Rondón-Lagos M. 2017. New Insights in the Cytogenetic Practice: Karyotypic Chaos, Non-Clonal Chromosomal Alterations and Chromosomal Instability in Human Cancer and Therapy Response. *Genes (Basel).* V. 3. P. 155.
- Serakinci N., Fahrioglu U., Christensen R. 2014. Mesenchymal stem cells, cancer challenges and new directions. *Eur. J. Cancer.* V. 50. P. 1522.
- Shaffer L.G., McGowan-Jordan J., Schmid M. 2013. ISCN 2013: An international system for human cytogenetic nomenclature. International standing committee on human cytogenetic. Karger. 144 p.
- Soukup T., Mokry J., Karbanová J., Pytlík R., Suchomel P., Kucerová L. 2006. Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow: Cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics. *Acta Medica.* 2006. V. 49. P. 27.
- Tanaka K., Goto H., Nishimura Y., Kasahara K., Mizoguchi A., Inagaki M. 2018. Tetraploidy in cancer and its possible link to aging. *Cancer Sci.* V. 109. P. 2632.
- Wang Y., Han Z.B., Song Y.P., Han Z.C. 2012. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. *Stem Cells Int.* 2012. P. 652034. <https://doi.org/10.1155/2012/652034>

The Cytogenetic Characteristic of Mesenchymal Multipotent Stromal Cell Diploid Lines

V. A. Nikitina^{a,*}, T. A. Astrelina^a, I. V. Kobzeva^a, V. Yu. Nugis^a, E. E. Lomonosova^a, V. V. Semina^a,
V. A. Brunchukov^a, D. Yu. Usupzhanova^a, V. A. Brumberg^a, A. A. Rastorgueva^a,
T. V. Karaseva^a, and A. S. Samoylov^a

^aState Research Center Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia, Moscow, 123098 Russia

*e-mail: nikitinava@yandex.ru

The cytogenetic study of mesenchymal multipotent stromal cells (MMSC) lines isolated from bone marrow, adipose tissue, placenta and mucous human have been carried out Karyological analysis had showed a normal diploid karyotype of MMSC up to the 5th passage of cultivation Clonal chromosomal translocations have detected in 3 of the 22 (14%) MMSCs The rate of cells with chromosomal aberrations in GTG analysis was $202 \pm 0.67\%$ (10 cell lines), and in mFISH – $331 \pm 0.69\%$ (11 cell lines) Unstable chromosomal aberrations (fragments, dicentric chromosomes)

have been accounted for 65%, and stable (translocations) – 35% of all cells with chromosomal damages (3–5%) identified by mFISH analysis of 1440 metaphase. These results have confirmed the importance of cytogenetic studies of MMSCs intended for medical purposes. The accumulation of chromosomal and karyotypic variability data at different periods of cultivation will have made determination of limits for the selection of genetically stability diploid MMSCs in order to prevent unwanted consequences of their use for therapeutic purposes.

Keywords: Mesenchymal multipotent stromal cells, karyotype, chromosome aberrations, clone formation, multicolor fluorescent in situ hybridization