

СТАБИЛЬНОСТЬ КАРИОТИПА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

© 2021 г. М. А. Шорохова¹, *, Т. М. Гринчук¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: shili-mariya@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.06.2021 г.

После доработки 18.06.2021 г.

Принята к публикации 01.07.2021 г.

Применение мезенхимных стволовых клеток человека (МСК) предполагает генетическую стабильность трансплантируемого клеточного материала и наличие его в значительном количестве. Нарастание биомассы клеток возможно только в условиях *in vitro*, что сопряжено с возможными рисками нарушения их генетической стабильности. В настоящей работе проанализирована кариотипическая стабильность 3-х клеточных линий МСК эндометрия (эМСК) после введения клеток в культуру и в процессе последующего культивирования. Установлено, что при переводе в систему *in vitro* клетки претерпевали кариотипические изменения. Профиль изменчивости проанализированных эМСК носил индивидуальный характер. Установлено, что клетки линии без грубых нарушений в структуре хромосом претерпели реверсию к кариотипической норме. Клетки с нарушениями генетического материала, вызванными хромосомными поломками и анеуплоидией в процессе культивирования имели тенденцию к последующей дестабилизации. Полученные данные вносят существенный вклад в изучение стабильности генетического аппарата эМСК.

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

DOI: 10.31857/S0041377121050102

Активный поиск доступных и удобных в работе источников стволовых клеток человека с большими потенциальными для регенеративной медицины привел к обнаружению мезенхимных стволовых клеток (МСК) в десквамированном эндометрии менструальной крови человека (Meng et al., 2007; Земелько и др., 2011). В настоящее время МСК эндометрия (эМСК) рассматриваются как перспективный клеточный материал для использования в медицинских целях. Основанием этого послужили доступность донорского материала, возможность неинвазивного способа выделения клеток и их высокий пролиферативный потенциал в культуре (Zuo et al., 2018). Установлено, что эМСК способны секретировать большое количество VEGF, HGF и JGF1 – факторов, играющих ключевую роль в восстановлении и регенерации тканей (Domnina et al., 2020). Применение МСК в терапевтических целях предполагает генетическую стабильность трансплантируемого клеточного материала и наличие его в значительном количестве. Нарастание биомассы МСК возможно только в усло-

виях *in vitro*, что сопряжено с возможными рисками нарушения их генетической стабильности.

Важным тестом, способным оценить стабильность генома как на уровне клетки, так и на уровне популяции является кариотипический анализ. Применение метода дифференциальной окраски хромосом на G-диски (G-banding) позволяет оценить стабильность генома на основании данных о числе хромосом и их морфологии. Стандартный кариотипический набор характеризуется постоянством числа хромосом и их структуры. Любые отклонения рассматриваются как нежелательные и характеризуют клетку как генетически дефектную (Heng et al., 2013). Данный анализ приобретает особую значимость в связи с представлением о том, что нарушение генетической стабильности клеток может стать причиной развития онкогенной клеточной трансформации (Ross et al., 2011). Вопрос о стабильности эМСК в связи с переводом клеток в условия культуры остается открытым. Данные, полученные к настоящему моменту разными авторами на МСК различного происхождения, противоречивы. Согласно одним работам, при переводе в условия *in vitro* МСК остаются кариотипически стабильны (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008), согласно другим – приобретают кариотипиче-

Принятые сокращения: МСК – мезенхимные стволовые клетки; эМСК – эндометриальные МСК.

ские изменения (Borgonovo et al., 2014). В связи с тем, что ЭМСК рассматриваются как перспективный материал для использования в регенеративной медицине, оценка кариотипической стабильности этих клеток в культуре является актуальным вопросом.

Задача настоящей работы заключалась в том, чтобы проанализировать кариотипическую стабильность 3-х клеточных линий ЭМСК после введения клеток в культуру и в процессе последующего культивирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки и их культивирование. Исследовали 3 линии ЭМСК человека (рабочие названия линий: 1, 2, 3), полученные и охарактеризованные в ИНЦ РАН (Санкт-Петербург). Клетки анализируемых линий имели поверхностные маркеры мезенхимного ряда (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105) и не несли гемопоэтические маркеры (CD11b, CD34, CD45, CD117, CD130, HLA-DR класса 2). Клетки всех 3-х линий были способны к направленной к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях (Земелько и др. 2011).

Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1% антибиотика-антимикотика и 1% GlutaMAX (Gibco, США). Клетки пересевали 2 раза в неделю в соотношении 1 : 3–1 : 4, используя 0.05%-ный раствор трипсин–ЭДТА (Invitrogen, США).

Кариотипический анализ. Использовали метод дифференциальной окраски хромосом на G-диски. Для приготовления препаратов клетки высевали с плотностью $(14–15) \times 10^3$ кл./см². Через 24–25 ч в культуру добавляли 0.02 мг/мл колцемида (Sigma, США) на 1 ч. Затем среду удаляли, клетки открепляли от пластика 0.05%-ным раствором трипсина, клеточную суспензию центрифугировали (1500 об./мин), супернатант удаляли, осадок ресуспензировали и подвергали гипотонической обработке 0.56%-ным раствором KCl (1 ч). Затем суспензию центрифугировали (1300 об./мин), супернатант удаляли, клеточную суспензию фиксировали в течение 1.5 ч холодной смесью метанола с уксусной кислотой (3 : 1), трижды заменяя за это время фиксатор на свежий. Фиксированный материал раскапывали на холодные и влажные предметные стекла. Препараты в течение 1 нед. высушивали при комнатной температуре. Метафазные пластинки окрашивали красителем Гимза на фосфатном буфере после предварительной трипсинизации (Биолот, Россия). Цитогенетический анализ проводили с использованием светового микроскопа Axio Scop (Carl Zeiss, Германия) при увеличениях объектива 20× и 100×. Хромосомы идентифициро-

вали в соответствии с международной номенклатурой (Mitelman, 1995) и атласом хромосом человека (Мамаева, 2000).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитогенетический анализ препаратов метафазных хромосом ЭМСК показал, что клетки всех 3-х линий уже с ранних пассажей проявляли признаки кариотипической гетерогенности. Профиль кариотипической нестабильности для каждой линии был индивидуален.

Линия 1. В популяции линии 1 на 3-ем пассаже культивирования были обнаружены два варианта клеток: около 50% клеток в популяции имели стандартный набор хромосом, другая часть популяции характеризовалась кариотипическими дефектами. Дефекты были связаны с появлением изохромосом (возникших в результате неполного расхождения в митозе гомологичных копий) и хромосом с нарушенной конденсацией в одной из копий, а также с межхромосомными ассоциациями (эктопической конъюгацией) и возникновением моно- или трисомии по отдельным хромосомам (рис. 1). Выявленные изменения носили случайный характер. Исключение составляли межхромосомные ассоциации с неоднократным вовлечением в них хромосом 13, 14, 15, при этом вторым партнером сцепления могла быть любая хромосома набора. В результате повторного анализа клеток этой линии на 6-ом пассаже были выявлены такие же изменения, как и на 3-ем, однако появился новый тип хромосомных отклонений — хромосомные поломки (рис. 1). Хромосомные поломки затрагивали область центромеры, при этом наблюдались полное или частичное сохранение генетического материала. Частота встречаемости клеток с кариотипическими отклонениями была несколько больше по сравнению с более ранним пассажем. Каждое выявленное изменение само по себе было уникальным, что говорит о случайном характере выявляемых кариотипических отклонений. Кариотипический анализ на 15-ом пассаже выявил, что анализируемая клеточная культура стабилизировалась. Преимущество имели клетки с нормальным кариотипом (рис. 1). Нарушение конденсации в гомологах отсутствовало. Двуплечая изохромосома (15/15) равно как и эктопическая конъюгация (13/14) встретились единожды. В 4-х клетках из 16 наблюдали моносомию случайного характера. Хромосомные поломки отсутствовали.

Линия 2. Клетки линии 2 на 3-ем пассаже так же, как и клетки линии 1 характеризовались наличием 2-х субпопуляций: с нормальным кариотипом и с кариотипическими отклонениями. Однако число клеток с нормальным кариотипом составляло только

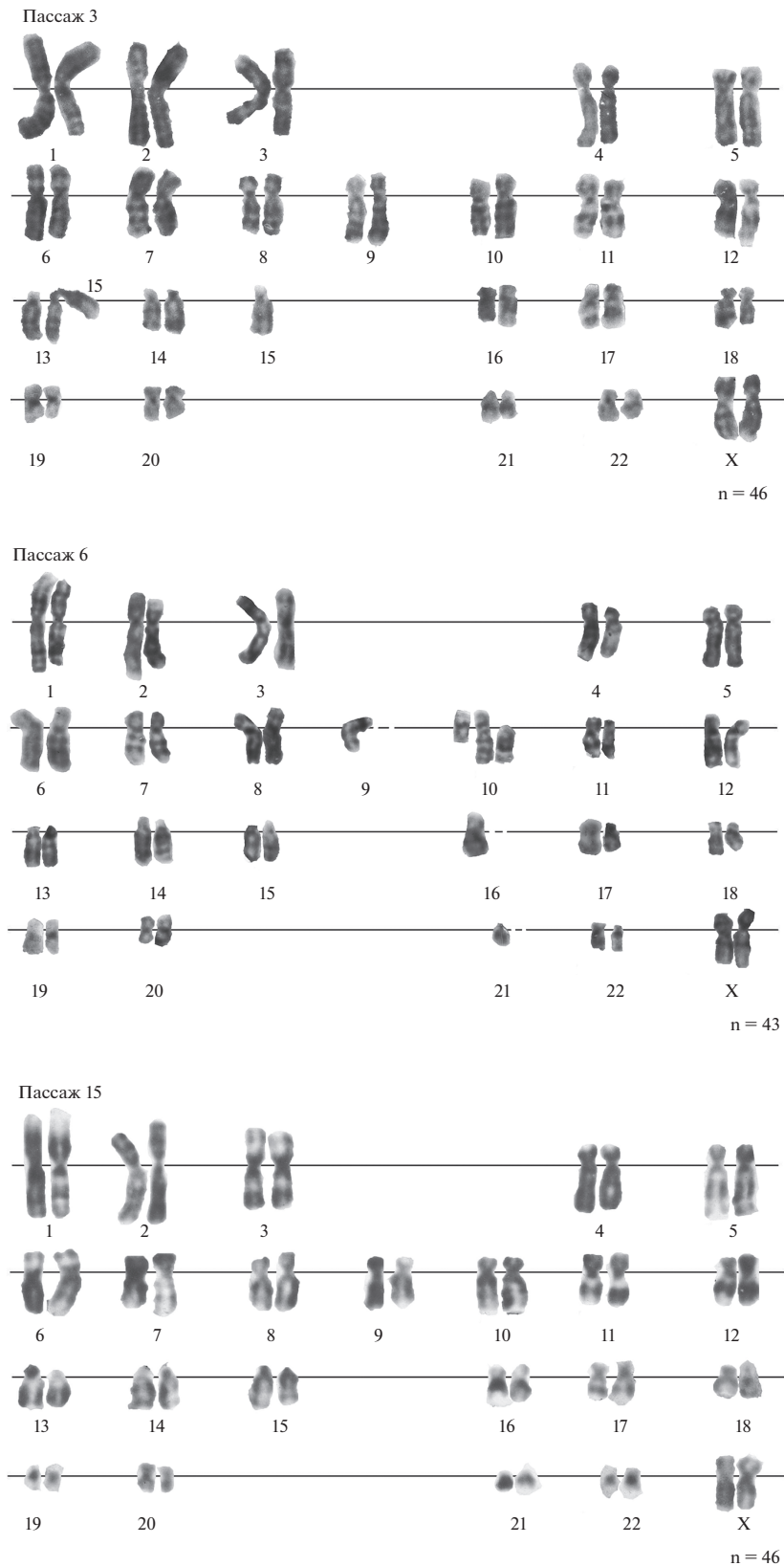
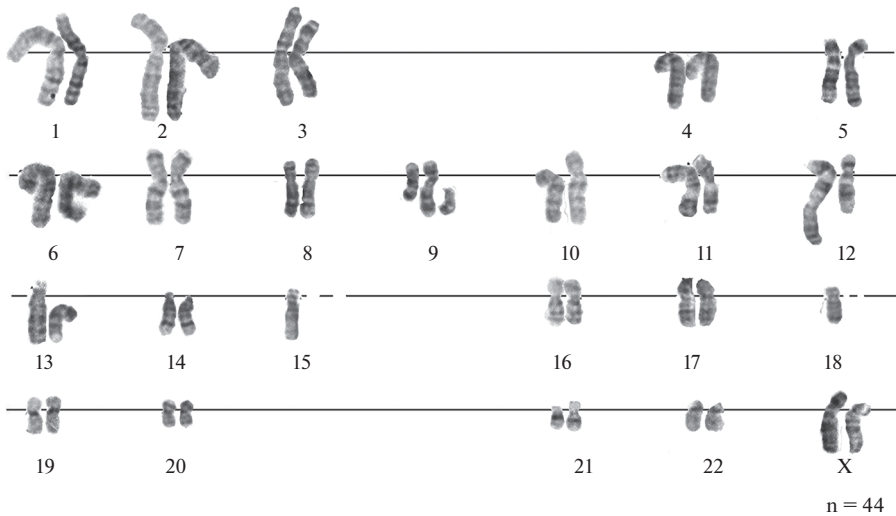


Рис. 1. Кариотипы клеток линии 1 на разных этапах культивирования. Пассаж 3: эктопическая конъюгация хромосом 13 и 15. Пассаж 6: моносомия по хромосомам 9, 16 и 21; прицентромерная поломка хромосомы 10 с сохранением материала. Пассаж 15: нормальный кариотип. На рис. 1–3: n – число хромосом в кариотипе.

Пассаж 3



Пассаж 14

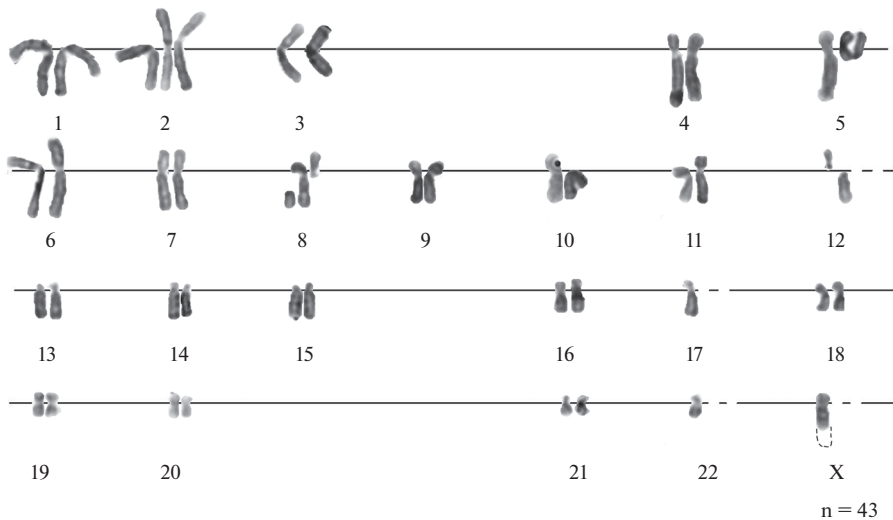


Рис. 2. Кариотипы клеток линии 2 на разных этапах культивирования. Пассаж 3: поломка хромосомы 9 с сохранением материала; эктопическая конъюгация хромосом 12 и 15. Пассаж 14: трисомия по хромосоме 2, моносомия хромосом 12, 17, 22 и X; прицентромерная поломка с сохранением материала хромосом 8 и 12; делеция в хромосоме X.

25%. Характер выявленных изменений существенно отличался от изменений в клетках линии 1. Основными изменениями, выявленными в клетках линии 2, были хромосомные поломки и моносомия (рис. 2). В клетках проанализированной популяции наблюдали преимущественно вовлечения определенных хромосом в изменения. Так, в 3-х метафазных пластинках наблюдали прицентромерные поломки в хромосоме 1. И по этой же хромосоме неоднократно наблюдали трисомию. Изменения в других хромосомах (поломки с сохранением генетического материала, частичной его утратой или транслоцированием безцентромерного локуса на другую хромосому) носили слу-

чайный характер. В отдельных клетках выявляли эктопическую конъюгацию между нехомологичными хромосомами с участием в качестве одного из партнеров хромосом 12 и 15 (рис. 2).

Повторный кариотипический анализ клеток линии 2 на 14-ом пассаже выявил значительное увеличение степени кариотипической дестабилизации популяции. Характер выявляемых кариотипических дефектов остался таким же, как и на раннем этапе культивирования, однако количество хромосом, равно, как и количество клеток, вовлекаемых в отклонения, значительно увеличилось. В процесс дестабилизации были включены все хромосомы набора за ис-

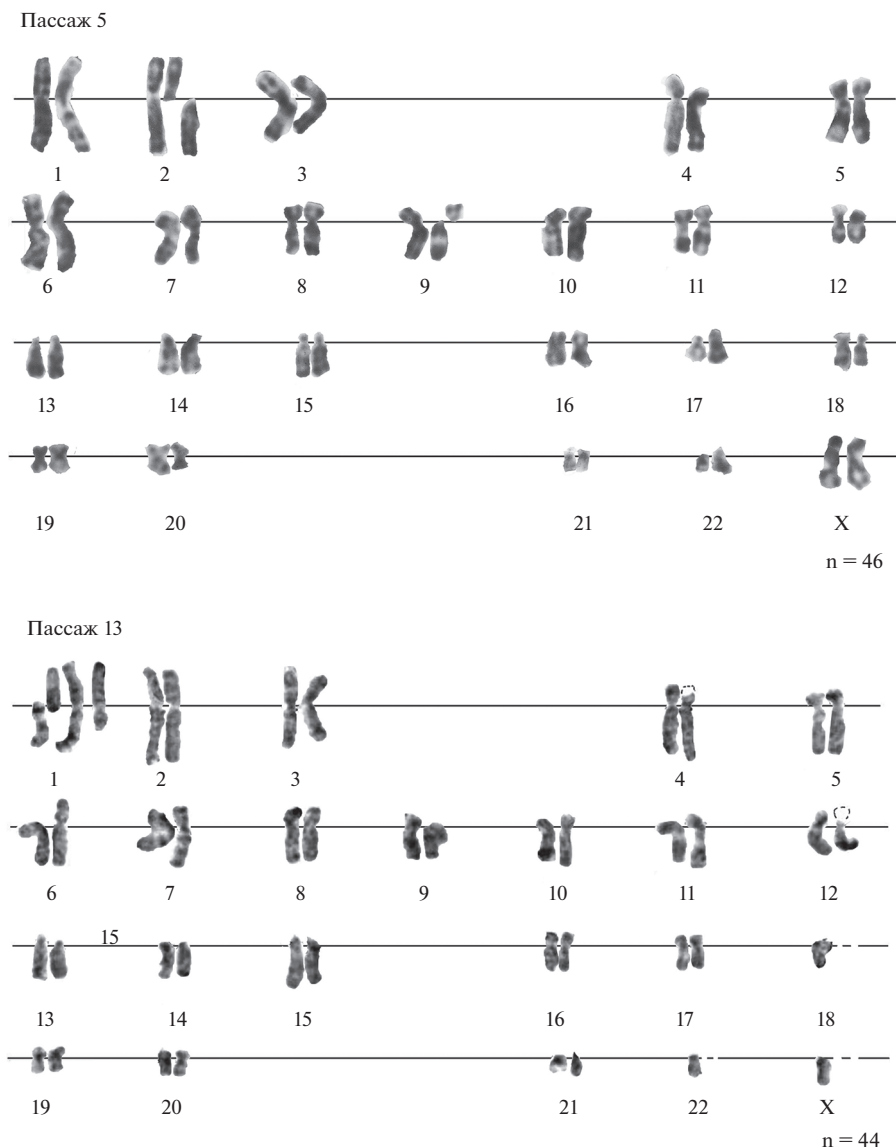


Рис. 3. Кариотипы клеток линии 3 на разных этапах культивирования. Пассаж 5: прицентромерная поломка с сохранением материала в хромосомах 2 и 9. Пассаж 13: трисомия и поломка двух гомологов хромосомы 1 с сохранением материала и делетированием соответственно; делеция в *p*-плече хромосом 4 и X; делеция *p*-плеча хромосомы 12; моносомия по хромосоме 18, 22, X.

ключением хромосомы 16. Клетка могла быть маркирована не одним, а несколькими разнотипными изменениями (рис. 2). Хромосомные поломки в большинстве случаев сопровождалась делетированием части хромосомного материала. Такие изменения как наличие изохромосом и межхромосомных ассоциаций были единичными. В некоторых клетках наблюдали отсутствие сразу двух гомологов.

Линия 3. По степени гетерогенности на начальном этапе культивирования (пассаж 5) клетки этой линии были схожи с клетками линии 2, и большая часть популяции имела кариотипические дефекты. Выявляемые отклонения были представлены хромо-

сомными поломками, как с сохранением, так и утратой генетического материала, и анеуплоидией наличием трисомий и моносомий по отдельным хромосомам (рис. 3). Повышенной нестабильностью характеризовались хромосомы 2 и 4. Вовлечение в кариотипические изменения остальных хромосом набора носило случайный характер. Анализ клеток линии 3 на 13-ом пассаже показал, что характер изменений и доля популяции с кариотипическими дефектами остались такими же, как на 6-ом пассаже. Однако на 13-ом пассаже наблюдали увеличение количества хромосом, вовлекаемых в перестройки, в некоторых клетках в перестройки были вовлечены обе гомоло-

гичные хромосомы. Хромосомные поломки в хромосомах 6, 12, 16 и X были выявлены неоднократно (рис. 3). Число хромосом, вовлеченных в анеуплоидию при этом существенно не изменилось (на 6-ом пассаже число хромосом, вовлеченных в анеуплоидию было 11, на 13-ом пассаже – 12 из кариотипического набора). Эктопическая конъюгация была найдена только в одной клетке.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из того, что эмМК рассматриваются как перспективные источники биоматериала для использования в регенеративной и восстановительной терапии, важно знать, насколько они генетически стабильны в условиях культуры. Существуют данные, что в связи с переводом в искусственные условия жизнедеятельности клетки претерпевают разного типа стрессы, связанные со способом посева, с реактивами, используемыми при культивировании, с плотностью культуры (Jacobs et al., 2016), а также с температурным режимом (Tan et al., 2019), влажностью, насыщением клеток кислородом (Ueyama et al., 2012), продолжительностью культивирования и человеческим фактором (Rajamani et al., 2014). Есть данные, что при культивировании стволовых клеток энзиматический способ посева клеток способствует дестабилизации клеточного генома (Ruby, Zheng, 2009).

В основе генетических изменений в клетках, связанных с воздействием стрессовых факторов, лежат разные механизмы: сбой в программе клеточного деления, возникновение двухцепочечных разрывы ДНК и изменения метилирования ДНК. Возникающие изменения инициируют неправильную сегрегацию тех или иных хромосом кариотипического набора, возникновение ане-, полиплоидии, которая сама по себе может стать индуктором последующей нестабильности, разнотипных несбалансированных хромосомных перестроек и конформационных изменений в хромосомах. Важно отметить, что возникающие отклонения на уровне кариотипа могут носить как случайный, так и неслучайный характер. В настоящем исследовании повышенной склонностью к агрегации характеризовались хромосомы 13, 14 и 15. Интересно, что связь этих хромосом с неслучайной эктопической конъюгацией была описана и ранее на различных типах МК человека и мыши (Гринчук и др., 2008; Кольцова и др., 2018; Мусорина и др., 2019). Природа этого явления до конца не ясна. Тем не менее, существует предположение, что агрегация хромосом, равно как и изменения конденсации хроматина связаны с нарушениями метилирования ДНК (Heng et al., 2013).

В настоящей работе мы показали, что анализируемые в настоящей работе эмМК при переводе в условия *in vitro* претерпели генетические изменения. Однако профиль кариотипической изменчивости и динамика его развития оказались разными.

Наибольший интерес в связи с относительной кариотипической стабильностью вызывают клетки линии 1. Структурные изменения хромосом на раннем 3-ем пассаже определялись только такими генетическими изменениями, как эктопическая конъюгация негомологичных хромосом, неспецифические нарушения конденсации некоторых хромосом набора, сбой в программе клеточного деления, связанные с появлением в кариотипе изохромосом. Усиление кариотипической изменчивости на 6-ом пассаже, связанное с наличием единичных поломок хромосомного материала, нивелировалось при последующем культивировании и не оказывало влияния на изменение генетического статуса клеток. К 15-му пассажу большинство возникших ранее кариотипических изменений исчезали, и линия могла рассматриваться как кариотипически стабильная. Возможность подобной генетической реверсии к норме была описана Сталтзом с соавторами (Stultz et al., 2016) при анализе клеточных линий МК. Эти авторы установили, что на ранних этапах культивирования (3, 5-й пассажи) клетки характеризовались нестабильным кариотипом, однако к 7-ому пассажу 3 клеточные линии из 6 вернулись к нормальному кариотипу.

Две другие наши линии эмМК (линия 2 и 3), полученные, как и линия 1, в пределах одной лаборатории при использовании одинаковых питательных сред и прочих условий работы с клетками *in vitro*, уже на ранних этапах культивирования проявляли генетическую нестабильность, связанную с поломками хромосом и значительной степенью анеуплоидизации популяции. Каждая линия в процессе культивирования характеризовались индивидуальным профилем кариотипической изменчивости. В отличие от линии 1 выявленные изменения были связаны с поломками хромосомного материала и анеуплоидией. Зарегистрированная на первых этапах нестабильность прогрессировала во времени, в процесс дестабилизации вовлекались дополнительные хромосомы.

Сравнение полученных в настоящей работе данных с литературными данными по кариотипированию других типов МК показало, что если изменения в структуре кариотипа эмМК ограничивались преимущественно поломками хромосомного материала, а также моно- и трисомиями, в МК иного происхождения спектр возникающих aberrаций был значительно шире и включал транслокации, дубликации, кольцевые хромосомы, дицентрики, теломерные

ассоциации (Гринчук и др., 2008; Попов и др., 2009; Муссорина и др., 2019; Кольцова и др., 2020; Pesserini et al., 2016). Такой широкий спектр хромосомных изменений характерен для раковых опухолей. В этой связи наличие подобных перестроек в популяциях стволовых клеток настораживает, т. к. может рассматриваться как предпосылка к их трансформации, в частности, злокачественной (Гринчук и др., 2008; Попов и др., 2009; Pesserini et al., 2016).

В наших более ранних работах, проведенных на клеточных линиях эмСК методами молекулярного кариотипирования и секвенирования следующего поколения мы установили, что клетки с такими кариотипическими отклонениями как хромосомные поломки и анеуплоидия не имели онкогенного трансформационного потенциала (Vinogradov et al., 2017; Shilina et al., 2018). Обсуждая генетические дефекты, выявленные нами в прокариотипированных эмСК, можно говорить о том, что скорее всего они носят адаптивный характер, хотя донороспецифическое влияние на структурную нестабильность для линий 2 и 3 не исключается. Согласно полученным нами данным эмСК при переводе из системы *in vivo* в систему *in vitro* могут иметь индивидуальную историю адаптивных генетических изменений в связи с чем разный генетический статус.

Полученные в настоящей работе данные говорят в пользу того, что эмСК от линии к линии могут различаться как по начальному уровню кариотипической гетерогенности, так и по ее развитию в процессе пассирования. Наиболее благоприятным для нормализации культуры является наличие на ранних пассажах клеток с редкими неклональными дефектами, не затрагивающими структуру хромосом. Возникновение структурно перестроенных хромосом и выраженной анеуплоидии, как правило, имеет негативные последствия и ведет к последующей прогрессирующей во времени дестабилизации генома, что нежелательно, т. к. может спровоцировать онкогенную трансформацию. Поскольку клетки, не имеющие грубых изменений в структуре хромосом с единичными случайными изменениями, имеют шанс к нивелированию возникших на первых этапах культивирования изменений и возврату к генетической норме, при получении новых клеточных линий стволовых клеток важен их кариотипический анализ на ранних этапах культивирования. Не менее важна цитогенетическая оценка стволовых клеток при непосредственном использовании их в терапевтических целях.

Настоящее исследование представляет собой оригинальные приоритетные данные о генетической стабильности эмСК в культуре.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00108).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не проводили экспериментов на животных или людях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гринчук Т.М., Иванцов К.М., Алексеенко Л.Л., Кожухарова И.В., Зайчик А.М., Петров Н.С., Михайлов В.М., Попов Б.В. 2008. Характеристика культуры мезенхимных стволовых клеток мыши, экспрессирующих GFP. Цитология. Т.50. С. 1029. (Grinchuk T.M., Ivantsov K.M., Alekseenko L.L., Kozhukharova I.V., Zaichik A.M., Petrov N.S., Mikhailov V.M., Popov B.V. 2008. Characterization of the culture of mouse mesenchymal stem cells expressing GFP. Tsitologiya. V. 50. P. 1029.)
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. С. 919. (Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artsybasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Beachevaya N.K., Korsak V.S., Nikolskiy N.N. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium. Identification, characterization and use as a feeder layer for the cultivation of human embryonic stem lines. Tsitologiya. V. 53. P. 919.)
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2018. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток выделенных из пульпы молочного зуба человека. Цитология. Т.60. С. 955. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Polyanskaya G.G. 2018. Obtaining and characterization of a line of mesenchymal stem cells isolated from the pulp of a human milk tooth. Tsitologiya. V. 60. P. 955.) <https://doi.org/10.1134/S0041377118120015>
- 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 characterization of mesenchymal stem cell lines isolated from different areas of the placenta of the same donor. Tsitologiya. V. 62. P. 713) <https://doi.org/10.31857/S0041377120090035>
- Мамаева С.Е. 2002. Атлас хромосом — постоянные клеточные линии человека и животных. М.: Науч. мир. 231 с. (Mamaeva S.E. 2002. Atlas chromosomes permanent cell lines of human and animals. M.: Nauchny mir. 231 p.)

- Мусорина А.С., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Характеристика неиммортилизованной линии мезенхимных стволовых клеток, выделенных из эпикардальной жировой ткани человека. Цитология. Т. 61. С. 272. (Musorina A.S., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Polyanskaya G.G. 2019. Characteristics of a non-immortalized line of mesenchymal stem cells isolated from human epicardial adipose tissue. Tsitologiya. V. 61. P. 272) <https://doi.org/10.1134/S0041377119040047>
- Попов Б.В., Петров Н.С. Михайлов В.М., Томилин А.Н., Алексеенко Л.Л., Гринчук Т.М., Зайчик А.М. 2009. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимных стволовых клеток в культуре *in vitro*. Цитология. Т. 51. С. 91. (Popov B.V., Petrov N.S. Mikhailov V.M., Tomilin A.N., Alekseenko L.L., Grinchuk T.M., Zaichik A.M. 2009. Spontaneous transformation and immortalization of mesenchymal stem cells in *in vitro* culture. Tsitologiya. V. 51. P. 91.)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.03.006>
- Domnina A., Ivanova J., Alekseenko L., Kozhukharova I., Borodkina A., Pugovkina N., Smirnova I., Lyublinskaya O., Fridlyanskaya I., Nikolsky N. 2020. Three-dimensional compaction switches stress response programs and enhances therapeutic efficacy of endometrial mesenchymal stem/stromal cells. Front. Cell Dev. Biol. V. 8. P. 473. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00473>
- Heng H.H., 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>
- Jacobs K., Zambelli F., Mertzaniadou A., Smolders I., Geens M., Nguyen H.T., Barbé L., Sermon K., Spits C. 2016. Higher-density culture in human embryonic stem cells results in DNA damage and genome instability. Stem Cell Reports. V. 6. P. 330. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.01.015>
- 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. P. 57. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57>
- Mitelman F. (Ed.) 1995. ISCN: Intrnation system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger. 114 p.
- 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. P. 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/10.1038/ncomms10754>
- Rajamani K., Li Y.S., Hsieh D.K., Lin S.Z., Harn H.J., Chiou T.W. 2014. Genetic and epigenetic instability of stem cells. Cell Transplant. V. 23. P. 417. <https://doi.org/10.3727/096368914X678472>
- Ross A.L., Leder D.E., Weiss J., Izakovic J., Grichnik J.M. 2011. Genomic instability in cultured stem cells: Associated risks and underlying mechanisms. Regen. Med. V. 5. P. 653. <https://doi.org/10.3727/096368914X678472>
- Ruby K.M., Zheng B. 2009. Gene targeting in a HUES line of human embryonic stem cells via electroporation. Stem Cells. V. 27. P. 1496. <https://doi.org/10.1002/stem.73>
- Shilina M.A., Grinchuk T.M., Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., Alekseenko L.L., Elmuratov A.U., Nikolsky N.N. 2018. Cytogenetic and transcriptomic analysis of human endometrial msc retaining proliferative activity after sublethal heat shock. Cells. V. 7. P. 184. <https://doi.org/10.3390/cells7110184>
- 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>
- Tan Z., Chan Y.J.A., Chua Y.J.K., Rutledge S.D., Pavelka N., Cimini D., Rancati G. 2019. Environmental stresses induce karyotypic instability in colorectal cancer cells. Mol. Biol. Cell. V. 30. P. 42. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-10-0626>
- Ueyama H., Horibe T., Hinotsu S., Tanaka T., Inoue T., Urushihara H., Kitagawa A., Kawakami K. 2012. Chromosomal variability of human mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions. J. Cell Mol. Med. V. 16. P. 72. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01303.x>
- Vinogradov A.E., Shilina M.A., Anatskaya O.V., Alekseenko L.L., Fridlyanskaya I.I., Krasnenko A., Kim A., Korostin D., Ilynsky V., Elmuratov A., Tsyganov O., Grinchuk T.M., Nikolsky N.N. 2017. Molecular Genetic Analysis of Human Endometrial Mesenchymal Stem Cells That Survived Sublethal Heat Shock. Stem Cells Int. e:2362630. <https://doi.org/10.1155/2017/2362630>
- Zuo W., Xie B., Li C., Yan Y., Zhang Y., Liu W., Huang J., Chen D. 2018. The clinical applications of endometrial mesenchymal stem cells. Biopreserv. Biobank. V. 16. P. 158. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.0057>

Stability of the Human Endometrial Mesenchymal Stem Cells Karyotype *In Vitro*

M. A. Shorokhova^{a,*} and T. M. Grinchuk^a

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

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

The use of stem cells for therapeutic purposes presupposes the significant quantities and genetic stability of the transplanted cells. An increase in cell biomass is may only *in vitro*, which is associated with probable risks of their genetic stability violation. In this work, we analyzed the karyotypic stability of 3 endometrial MSC (eMSC) cell lines after

the transfer of cells in vitro and during subsequent cultivation. We are showing the cells underwent karyotypic changes after transferred to in vitro system. The variability profile of analyzed eMSCs had an individual character. It was found the cells without gross chromosomal changes underwent a reversion to the karyotypic norm. Cells with chromosomal breaks and aneuploidy tended to further destabilize during cultivation. The obtained data make a significant contribution to the eMSC genetic study.

Keywords: MSCs, eMSCs, chromosomes, ectopic conjugation, impaired condensation, chromosomal breakdowns, aneuploidy