ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ШИЛИНА

Мария Александровна

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата

биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, академик

Николай Николаевич Никольский

Санкт-Петербург

2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 5

ВВЕДЕНИЕ 6

Актуальность исследования 6

Цель и задачи исследования 8

Основные положения, выносимые на защиту 9

Научная новизна работы 10

Теоретическое и практическое значение работы 11

Апробация работы 11

Список работ, опубликованных по теме диссертации 12

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 16

1.1. Основные этапы в истории открытия и изучения стволовых клеток 16

1.2. Свойства и классификация стволовых клеток 19

1.3. Эмбриональные стволовые клетки 20

1.4. Фетальные стволовые клетки 24

1.5. Стволовые клетки взрослого организма 25

1.5.1. Гемопоэтические стволовые клетки 25

1.5.2. Мезенхимные стволовые клетки 28

1.5.3. Тканеспецифичные прогениторные клетки 29

1.6. Эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека 29

1.7. Иммортализация и онкогенная трансформация 34

1.8. Генетическая стабильность эМСК в процессе культивирования и возможность спонтанной трансформации 37

1.9. Эндометриоз 40

1.10. Стволовые клетки и стресс 42

1.11. Влияние гипертермии на репарацию ДНК 43

1.12.Влияние теплового шока на мезенхимные стволовые клетки 43

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ 45

2.1. Материал.....45

2.2. Получение и культивирование эМСК.....45

2.3.Оценка морфологии клеток 46

2.4.Иммунофенотипирование 46

2.5.Активность пролиферации.....46

2.6.Анализ клеточного цикла.....46

2.7.Адипогенная дифференцировка 47

2.8.Остеогенная дифференцировка 47

2.9.Децидуальная дифференцировка 48

2.10.Иммунофлуорисцентный анализ.....48

2.11.Криоконсервация и разморозка клеток.....49

2.12.Сублетальное температурное воздействие.....49

2.13.Кариотипический анализ.....49

2.14.Молекулярное кариотипирование.....50

2.15. Транскриптомный анализ 51

2.16.Выявление активности SA-β-gal.....51

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....52

3.1.Характеристика линий эМСК, полученных от здоровых доноров 52

3.1.1.Морфологическая характеристика линий эМСК на ранних этапах культивирования 52

3.1.2.Фенотипирование анализируемых эМСК.....53

3.1.3.Оценка пролиферативной активности эМСК in vitro 54

3.1.4. Мультипотентный статус анализируемых эМСК 55

3.1.5.Кариотипический анализ окрашенных на G-диски хромосом 58

3.1.6.Молекулярное кариотипирование анализируемых линий 63
3.1.7.Оценка старения клеточных культур, анализируемых эМСК 65
3.2. Характеристика эМСК, полученных от доноров больных аденомиозом.....68
3.2.1.Сравнительный анализ физиологических параметров эМСК от донора с аденомиозом и здорового донора. 69
3.2.2.Оценка генетической стабильности эМСК от доноров с аденомиозом в сравнении с эМСК от здоровых доноров.....69
3.2.3.Оценка старения эМСК от донора с аденомиозом 71
3.3. Исследование клеточного ответа на сублетальное температурное воздействие и характеристика клеток, переживших термострессс 72
3.3.1.Стресс индуцированное преждевременное старение эМСК после сублетального теплового шока.....73
3.3.2.Исследование потомков эМСК, переживших сублетальный тепловой шок.....75
3.3.3.Кариотипирование G-бандированных хромосом.....77
3.3.4.Молекулярное кариотипировнание.....79
3.3.5.Транскриптомный анализ потомков эМСК, переживших тепловой шок.....79
3.3.6.Анализ репликативного старения эМСК, переживших тепловой шок.....83
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....94
ВЫВОДЫ 95
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....96

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СК – стволовые клетки

МСК - мезенхимные (стромальные) стволовые клетки

эМСК– мезенхимные стволовые клетки эндометрия

ЭСК - эмбриональные стволовые клетки

BSA – бычий сывороточный альбумин

КД – кальцемид

CD – кластер дифференцировки

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид

DMEM – питательная среда Игла в модификации Дюльбекко

DMSO – диметилсульфоксид

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

FBS – бычья эмбриональная сыворотка

FITC – флюоресцеин изотиоцианат

HLA –главный комплекс гистосовместимости

PBS – фосфатно-солевой буфер

PI – йодистый пропидий

CGH – сравнительная геномная гибридизация

FISH– флуоресцентная гибридизация in situ

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

MEF’s – мышиные эмбриональные фибробласты

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

На стволовые клетки (СК) человека обращается пристальное внимание в связи с их возможным практическим использованием в медицине, поэтому очень важно понимать биологию этих клеток. Применение мезенхимных стволовых клеток (МСК) в регенеративной медицине с каждым годом получает все большее развитие. В качестве источника МСК до недавнего времени чаще всего служил костный мозг, жировая ткань, пуповинная кровь. Сравнительно недавно описан новый тип МСК, который получают из эндометрия (эМСК). Доступность, возможность неинвазивного метода получения исходного материала, высокая пролиферативная активность и мультипотентность эМСК не только ставят их в один ряд с другими более изученными типами МСК, но и указывают на некоторые преимущества (Meng et al., 2007; Hida et al., 2008; Gargett et al., 2009). Так как количества МСК в исходном материале недостаточно для трансплантации, его увеличивают культивированием клеток. Поскольку продолжительное культивирование может быть потенциальным источником накопления генетических изменений в клетках, возникает вопрос, не может ли это приводить к клеточной трансформации. Под спонтанной трансформацией нормальных МСК человека понимают иммортализацию и возможную малигнизацию. Несколько статей, в которых была описана спонтанная трансформация МСК человека in vitro, со временем были отозваны авторами данных работ, так как была показана кросконтаминация культур трансформированными клетками (Rubio et al., 2005; de la Fuente et al., 2010; Torsvik et al., 2010). Тем не менее, некоторые предпосылки для обсуждения данной проблемы остаются. Вопрос о возможности спонтанной трансформации МСК чрезвычайно актуален, поскольку он касается онкологической и генетической безопасности трансплантируемого материала.

Другим важным аспектом исследования свойств эМСК является вопрос, сохраняют ли клетки функциональную стабильность при длительном культивировании. Основными

свойствами МСК являются их фенотипический профиль экспрессии поверхностных маркеров и их мультипотентный статус — способность клеток дифференцироваться в трех направлениях: в адипогенные, хондрогенные и остеогенные клетки.

Еще одним фактором, который может оказывать влияние на физиологическое и генетическое состояние культивируемых эМСК, является состояние здоровья донора. Поэтому исследование эМСК, полученных от доноров с заболеваниями, непосредственно связанными с патологией эндометрия, является неотъемлемой частью общей характеристики эМСК в системе invitro.Аденомиоз – одна из форм эндометриоза, распространенного заболевания женской репродуктивной системы, которое может приводить к бесплодию у женщин (Matalliotakis et al., 2003; Missmer, Cramer 2003; deHondt et al., 2005; Hompes et al., 2007; Kepkep et al., 2007; Maheshwari et al., 2012). Это заболевание характеризуется моноклональным ростом клеток и может иметь признаки злокачественного роста, включая локальные инвазии и метастазирование (Gaetjeetal., 1995; Jimbo et al., 1997; Sharpe-Timms, 1997).

В настоящее время, известно, что клетки, выделенные из очагов эндометриоза, характеризуются генетической нестабильностью на уровне кариотипа. Основными типами изменений является появление анеуплоидных клеток и наличие морфологических изменений на уровне хромосом. В ряде работ показано, что в перестройки вовлекаются определенные хромосомы кариотипического набора. Так, при изучении эндометриозных клеток различной локализации показано, что на фоне общей кариотипической дестабилизации наиболее часто в перестройки (делеции, дупликации, транслокации) вовлекается материал хромосом 7 и 11 (Bouquet de Jolinière et al., 1997; Gogusev et al., 2000; Korner et al., 2006). Получение и кариотипическая характеристика клеточных линий эМСК от больных с разными формами эндометриоза, будет способствовать пониманию проблемы эндометриоза.

Другим вопросом является, как и в какой степени факторы внешней среды влияют на СК. Одним из них является изменение температурного режима при культивировании клеток. Хотя реакция клеток на тепловой шок является одной из наиболее изученных, ответ СК на повышение температуры, а также судьба клеток, переживших тепловой стресс, мало исследованы. Изучение реакции эМСК человека на тепловой стресс является очень важным направлением исследований трансплантационной медицины.

Оценка физиологической, генетической стабильности эМСК, полученных от разных доноров, возможности их спонтанной трансформации в системе invitroпри культивировании в стандартных условиях, в условиях термошока будет иметь решающее значение при оценке возможности использования данных клеток в качестве материала для клеточной терапии различных заболеваний.

Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы – изучить генетическиеи физиологические характеристики эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека, полученных от разных доноров, при их культивировании в стандартных условиях и после теплового шока.

Задачи работы:

1. Охарактеризовать эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека, полученные от здоровых доноров, по некоторым физиологическим (типу роста, мультипотентному статусу, экспрессии поверхностных маркеров, пролиферативной активности) и генетическим (морфологической и молекулярной структуры кариотипа) параметрам.

2. Охарактеризовать эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека от донора с аденомиозом по некоторым физиологическим (типу роста, мультипотентномустатусу, экспрессии поверхностных маркеров, пролиферативной

активности) и генетическим (морфологической и молекулярной структуры кариотипа) параметрам.

3. Сравнить физиологические и цитогенетические характеристики эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека от больного и здоровых доноров.

4. Оценить стабильность потомков эндометриальных мезенхимных стволовых клеток, переживших сублетальное тепловое воздействие, с помощью G-бандирования хромосом, молекулярного кариотипирования и транскриптомного анализа.

5. Оценить, способны ли клетки в процессе культивирования иммортализоваться и перейти в трансформированное состояние.

Основные положения, выносимые на защиту

1. эМСК, полученные из десквамированного эндометрия менструальной крови здоровых доноров, донора с заболеванием репродуктивной системы (аденомиозом) и потомков клеток, переживших сублетальный температурный стресс, по физиологическим параметрам (адгезивность к пластику, пролиферация в системе in vitro, экспрессия поверхностных маркеров, мультипотентный статус) не различаются.

2. Перевод эМСК из системы in vivo в систему in vitro может сопровождаться появлением клеточных вариантов скариотипическими изменениями – анеуплоидией и структурными хромосомными перестройками. Частота встречаемости генетически дефектных клеток индивидуальна для каждой линии. Кариотипические изменения возникающиев процессе культивирования не приводят к иммортализации и трансформации клеток.

3. В эМСК от донора с аденомиозом наблюдается повышенная нестабильность структуры кариотипа с преимущественным вовлечением в перестройки (поломки) определенных хромосом набора (хромосом 7 и 11). Наблюдаемые цитогенетические изменения не приводят к иммортализации/клеточной трансформации.

4. Потомки эМСК, пережившие сублетальный ТШ, характеризуются вспышкой кариотипической нестабильности. Результаты транскриптомного анализа показали, что изменения, возникшие в результате термостресса не направлены в сторону онкогенной клеточной трансформации.

Научная новизна работы

Впервые изучены характеристики линии эМСК от донора с аденомиозом и проведен их анализ в сравнении с клетками от здоровых доноров. Установлено, что по изученным физиологическим свойствам (типу роста, мультипотентному статусу, экспрессии поверхностных маркеров, пролиферативной активности) свойства клеток сходны. Для генетической характеристики клеток использовали методы G-бандирования и молекулярное кариотипирование. Кариотипическая характеристика клеток от донора с аденомиозом выявила повышенную нестабильностью структуры кариотипа с преимущественным вовлечением в перестройки хромосом 7 и 11. Перестройки хромосом, которые могут быть маркерами данного заболевания, методом молекулярного кариотипирования не выявлены.

В рамках данной работы впервые изучены генетические характеристики потомков эМСК, переживших сублетальный ТШ. Методом G-бандирования установлено, что потомки эМСК, пережившие сублетальный ТШ, характеризуются вспышкой кариотипической нестабильности, на этом фоне молекулярное кариотипирование никаких изменений в геноме в связи с ТШ не регистрирует. Транскриптомный анализ показал, что изученные клетки не вступают на путь клеточной трансформации.

Сравнение результатов G-бандированияи молекулярного кариотипирования показало, что данные методы информативны на разных уровнях организации генома. Они дополняют друг друга и расширяют информацию о генетической стабильности клеток.

Все проанализированные в настоящей работе линии эМСК человека при длительном культивировании вступают в фазу репликативного старения и не подвергаются иммортализации/трансформации.

Теоретическое и практическое значение работы

Работа имеет как фундаментальную, так и прикладную направленность. В данной работе были исследованы физиологические и генетические характеристики эМСК в условиях invitro. Простой и неинвазивный способ получения эМСК, активная пролиферация и мультипотентность данных клеток делают их подходящим субстратом для клеточной терапии. Изучение возможности спонтанной трансформации эМСК в процессе длительного культивирования показало, что анализируемые клетки спонтанно не трансформируются в культуре. По результатам можно считать, что эМСК могут стать подходящим клеточным материалом при разработке подходов к лечению различных заболеваний и травм методами, основанными на принципах клеточной терапии. Полученные клетки могут служить объектом таких фундаментальных исследований в биологии, как исследования механизмов пролиферации, дифференцировки и межклеточных взаимодействий СК взрослого организма.

Результаты работы важны и полезны при использовании эМСК в качестве клеточного материала в целях регенеративной медицины.

Полученные в работе данные могутбыть использованы в курсах лекций для студентов медицинских и биологических ВУЗов.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 20 печатные работы, в том числе 5 статей и 15 тезисов. Материалы диссертации были представлены на XXXIX Неделе науки СПбГПУ, «XL Неделе науки СПбГПУ», «VIII Международной конференции по молекулярной

генетике соматических клеток», «38thcongressFEBS», «IV Конференции молодых ученых Института цитологии РАН по биологии клетки в культуре», «IV съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированных генетических симпозиумов», «XVII Всероссийском симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра», «IV международной научно-практической конференции - постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», «Международной конференции Хромосома 2015», «1st InternationalConference Celltechnologiesattheedge: research&practice.Recentachievementsinstemcellsresearch», «CellSymposium: AgingandMetabolism 2016», «ICCB 2016 Congress», и на научных семинарах отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта Института цитологии РАН.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи:

1. Гринчук Т.М., **Шилина М.А.,** Алексеенко Л.Л. 2014. Нарушение стабильности структуры кариотипа фибробластов китайского хомячка линии CHL V-79 RJK в процессе длительного культивирования при повышенной температуре. Цитология. 56(11): 841–849.

2. Домнина А.П., Новикова П.В., Фридлянская И.И., **Шилина М.А**., Зенин В.В., Никольский Н.Н. 2015. Индукция децидуальной дифференцировки в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках. Цитология 57(12):880-884.

3. **Шилина М.А.**, Домнина А.П., Кожухарова И.В., Зенин В.В., Анисимов С.В., Никольский Н.Н., Гринчук Т.М. 2015.Характеристика культуры эндометриальных мезенхимных стволовых клеток, полученных от пациентки с аденомиозом. Цитология. 57(11):771-779.

4. **Шилина М.А.,** Гринчук Т.М., Никольский Н.Н. 2016.Оценка генетической стабильности эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека методами морфологического и молекулярного кариотипирования. Цитология . 58(11): 825-831.

5. **Mariia Shilina,** Nikolay Nikolsky, Larisa Alekseenko and Tatiana Grinchuk. 2016. Genetic Stability and Aging. Journal of Gerontology & Geriatric Research 5:6.

Тезисы докладов международных и отечественных конференций:

1. Шилина М.А., Гринчук Т.М. 2010. Изменение структуры кариотипа в клетках китайского хомячка линии CHLV-79 RJK, отселектированных на устойчивость к повышенной температуре. «XXXIX Неделя науки СПбГПУ». Материалы конференции. ЧастьXVI: 19.

2. **Шилина М.А.**, Гринчук Т.М. 2011. Эмбриональные стволовые клетки человека в культуре. Характеристика кариотипа линии С910. «XL Неделя науки СПбГПУ». Материалы конференции. ЧастьXVI: 32-33

3. Гринчук Т.М., Земелько В.И., Домнина А.П., **Шилина М.А.**, Алексеенко Л.Л., Никольский Н.Н. 2011. Кратковременное увеличение температуры при культивировании эмбриональных стволовых клеток человека приводит к дестабилизации генома на уровне кариотипа. «VIII Международная конференция молекулярная генетика соматических клеток». Материалы конференции: 81-82.

4. 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. 55(9):633-634.

5. **ShilinaM.A.**, GrinchukT. M., DomninaA. P., ZemelkoV. I., NikolskyN. N. 2013. Analysisofkaryotypicstabilityofhumanendometrial stem cells during long-term cultivation. Abstracts of 38th congress FEBS: SW04.S21–40

6. **Шилина М.А.**, Алексеенко Л.Л., Гринчук Т.М. 2014.Кариологический анализ эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека в условиях сублетального термостресса.«IV Конференция молодых ученых Института цитологии РАН по биологии клетки в культуре». Цитология 56 (5):388-389.

7. **Шилина М.А.**, Домнина А.П., Земелько В.И., Никольский Н.Н., Гринчук Т.М. 2014. Эндометриальные стволовые клетки, как объект для изучения возможных кариотипических изменений при заболеваниях женской репродуктивной системы. «IVсъезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы». Материалы конференции ВОГиС: 98.

8. **Шилина М.А.**, Земелько В.И., Гринчук Т.М. 2014.Перевод стволовых клеток человека из системы invivo в условия invitro может приводить к появлению клеточных вариантов с отклонениями от нормы.«XVII Всероссийский симпозиум "Структура и функции клеточного ядра», Цитология 56 (9): 691.

9. **Шилина М.А.**, Земелько В.И., Кожухарова И.В., Домнина А.П., Кирсанов А.А., НикольскийН.Н., ГринчукТ.М..2014. Кариотип, как тест - система в целях диагностики эндометриоза. «IV международная научно-практическая конференция Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Сборник трудов: 202.

10. **Шилина М.А.**, Гринчук Т.М. 2015. Цитогенетический анализ в диагностике патологий эндометрия. «Международная конференция Хромосома 2015». Материалы конференции: 172-173.

11. Пономарцев Н.В., **Шилина М.А.**, Гринчук Т.М., Енукашвили Н.И. 2015.Деконденсация и транскрипция прицентромерной ДНК при тепловом шоке в клетках линии U-937 и первичной культуре эндометриальных мезенхимальных стволовых клеток. «Международная конференция Хромосома 2015». Материалы конференции: 144-146

12. VinogradovA.E., **ShilinaM.A.**, AnatskayaO.V., AlekseenkoL.L., GrinchukT.M., NikolskyN.N. 2016. Next generation sequencing shows long-term transcriptome activation in human endometrial mesenchymal stem cells after sublethal heat shock. «1st International Conference Cell technologies at the edge: research &practice. Recent achievements in stem cells research». Материалыконференции: 117

13. **Shilina M.A.**, Alekseenko L.L., Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., Grinchuk T.M., Nikolsky N.N.. 2016. Endometrial mesenchymal stem cells escaped heat-shock induced cellular senescence preserve genomic stability. «Cell Symposium: Aging and Metabolism». Электронныйсборниктезисов.

14. Alekseenko L.L., Lyublinskaya O.G., **Shilina M.A.**, Nikolsky N.N. 2016. Human endometrialmesenchymal stem cells accumulated in GO/G1 phase are less sensitive to heat shock induced premature senescence than proliferating cells**.«**Aging and Metabolism». Электронныйсборниктезисов.

15. **Shilina M.**, Vinogradov A., Alekseenko L., Grinchuk T., Anatskaya O., Nikolsky N. Stress response of endometrial mesenchymal stem cells progeny survived sub-lethal heat shock is not associated with transformation. «ICCB 2016 Congress». Материалыконференции:245.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основные этапы в истории открытия и изучения стволовых клеток

Термин «стволовая клетка» (СК) впервые был предложен в 1909 году российским ученым А. А. Максимовым в ходе изучения гемопоэтической системы млекопитающих (Maximow, 1909).

Современное понятие заключается в том, что СК - это недифференцированные клетки (не претерпевшие в ходе онтогенеза дифференцировки). Развитие многоклеточных организмов начинается с одной стволовой клетки - зиготы. В результате многочисленных циклов деления и процесса дифференцировки образуются все виды клеток, характерные для данного биологического вида. В организме человека более 220 разновидностей клеток, претерпевших в процессе онтогенеза дифференцировку. Помимо дифференцированных клеток, во всех тканях в организме есть пул СК, выступающих в качестве резервных, благодаря ним осуществляется обновление и восстановление тканей и органов. В процессе старения организма количество этих клеток уменьшается.

В 1981 г. были получены первые постоянные линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши (Evans, Kaufman, 1981). Эти работы развивались в спокойном академическом русле и не привлекали к себе пристального внимания научной общественности.

Первые постоянные линии ЭСК человека были получены в США в 1998 г. (Tomson et al., 1998). Эта работа была отнесена к одному из наиболее крупных достижений биологии XX в. Основной интерес и внимание научной общественности к линиям ЭСК человека связаны с перспективами их использования в клинике. Однако к настоящему времени не было заявлено ни об одном случае клинического использования клеток, полученных из ЭСК человека, хотя рядом компаний анонсируется возможность в самое ближайшее время предоставитьполученные из ЭСК человека нейроны для лечения травм спинного мозга, а также клетки, производящие инсулин, для лечения диабета. В 2006 г. собственные линии ЭСК человека имели уже более 20 стран. Среди них — США, Великобритания, Япония,

Израиль, Россия, Китай, Швеция, Турция, Дания и другие страны (Thomson et al.,1998; Reubinoff et al, 2000; Amit, Itskovitz-Eldor, 2002; Zeng et al.,2004; Findikli et al.,2005; Li et al.,2005; Oh et al., 2005; Simon et al., 2005; Skottman et al., 2005; Van de Stolpe et al., 2005;Baharvand et al., 2006; Heins et al., 2006; Lysdahl et al., 2006; Ware et al., 2006; Киселев, Лагарькова, 2006). На настоящий моментв мире насчитывается около 500 культур ЭСК человека. При этом, несмотря на запрет финансирования работ по получению новых линии ЭСК из американского государственного бюджета, именно США лидируют по общему числу линий ЭСК человека. Только в Институте репродуктивной генетики (г. Чикаго)к началу 2006 г. насчитывалось 144 культуры ЭСК человека, полученные как от здоровых людей, так и от пациентов с генетическими (наследственными) заболеваниями (Verlinsky et al., 2005).

В России в нескольких ведущих биологических институтах (Институт цитологии и генетики в Новосибирске, Институт биологии развития РАН, Институт биологии гена РАН, Институт цитологии РАН) проводятся работы по получению и анализу клеточных линий ЭСК человека. По мере изучения свойств ЭСК ученые столкнулись с рядом проблем, затрудняющих работу в данном направлении - со сложностями в культивирование клеток in vitro и поддержании их в плюрипотентном состоянии; с потенциальной возможностью их генетической трансформации; с невозможностью использования в медицинской практике ЭСК человека, культивировавшихся на фидере иного видового происхождения; с вероятностью их иммунного отторжения при имплантации реципиенту (Swijnenburg et al., 2005). Кроме этого, большим препятствием по выделению ЭСК из бластоцисты стали запреты на работу с зародышевым материалом, введенные целым рядом стран.

Все это заставило исследователей искать альтернативные источники стволовых клеток. В настоящее время все больше внимания уделяется стволовым клеткам взрослого организма. Пионерами в этой области были советские ученые А.Я. Фриденштейн и И.Л.

Чертков, выделившие в 1968 году из ткани костного мозга популяцию клеток, обладающих высокой эффективностью клонирования и способностью дифференцироваться в клетки мезенхимального ряда (Фриденштейн, Чертков, 1968). Эти клетки получили название мезенхимные стромальные клетки. Позднее была показана способность МСК костного мозга дифференцироваться в кардиомиоциты, нейроны и астроциты (Pittenger et al., 1999; Jori et al., 2005). В настоящее время МСК приковывают к себе все большее внимание в связи с потенциальной возможностью их использования в заместительной клеточной терапии и возможностью проведения алогенных трансплантаций.

Наиболее широко используемым источником стволовых клеток, помимо клеток костного мозга, являются мезенхимные клетки пуповинной крови (Harriis et al., 2007) и жировой ткани (Parker, Katz, 2006).

К 2015 году в мире произведено более 100.000 трансплантаций мезенхимных стволовых клеток различного происхождения (Rocha et al., 2000; Wu et al., 2000; Cwynarski et al., 2001; Mueller, Glowacki, 2001; Wagner et al., 2002; Koh, Chao, 2004; Kai et al., 2004; Yamada et al., 2004; Ma et al., 2015; Sun et al., 2015; Wang et al., 2013; Singh, et al., 2016). К 2005 году перечень заболеваний, при лечении которых может быть успешно применена трансплантация стволовых клеток, достигает нескольких десятков. В настоящее время основное внимание уделяется лечению с использованием СК, заболеваний сердечно-сосудистой, эндокринной систем, неврологических заболеваний, болезней печени, желудочно-кишечного тракта, легких, заболеваний мочеполовой, опорно-двигательной систем, заболеваний кожи. Разработаны международные протоколы лечения рассеянного склероза. Проводятся многоцентровые исследования при лечении инфаркта миокарда и сердечной недостаточности. Разрабатываются подходы к лечению инсульта, болезни Паркинсона и Альцгеймера. Однако вопрос безопасности использования этих клеток для трансплантации и возможности их спонтанной трансформации остается открытым.

Для понимания биологии стволовых клеток человека сделано многое, но остается еще ряд нерешенных вопросов. Исследования стволовых клеток человека не теряют своей актуальности и все больше направлены на разработку подходов использования СК для целейрегенеративной медицины.

1.2. Свойства и классификация стволовых клеток

Все СК обладают двумя неотъемлемыми свойствами:

- самообновлением - способностью сохранять свой фенотип неизменным после деления (без дифференцировки).
- дифференцировочным потенциалом — способностью производить разныетипыклеток при определенных условиях

На сегодняшний день существует несколько классификаций СК.

По возможности дифференцироваться СК делятся на следующие группы:

- **Тотипотентные СК** могут дифференцироваться в клетки эмбриональных и экстраэмбриональных тканей. Такие клетки могут дать начало полноценному жизнеспособному организму. К ним относится зигота и клетки, образованные при первых нескольких циклах деления зиготы.
- **Плюрипотентные СК** - потомки тотипотентных, способны давать начало практически всем тканям и органам, за исключением экстраэмбриональных тканей (например, плаценты). Из этих стволовых клеток развиваются три зародышевых листка: эктодерма, мезодерма, энтодерма.
- **Мультипотентные СК** способны дифференцироваться в клетки разных тканей, но многообразие их видов ограничено пределами одного зародышевого листка.
- **Олигопотентные клетки** дифференцируются лишь в некоторые, близкие по свойствам, типы клеток. К ним относятся клетки лимфоидного и миелоидного ряда, участвующие в процессе кроветворения.

• **Унипотентные клетки (клетки-предшественницы)** — незрелые клетки, которые, строго говоря, уже не являются стволовыми, так как могут производить лишь один тип клеток. Они способны к многократному самовоспроизведению, что делает их долговременным источником клеток одного конкретного типа и отличает от дифференцированных клеток.

В зависимости от источника происхождения, стволовые клетки можно разделить на эмбриональные, фетальные и СК взрослого организма.

1.3. Эмбриональные стволовые клетки

Источником выделения ЭСКявляется внутренняя клеточная масса бластоцисты на стадии 3-5 дня развития зародыша (Рис. 1).

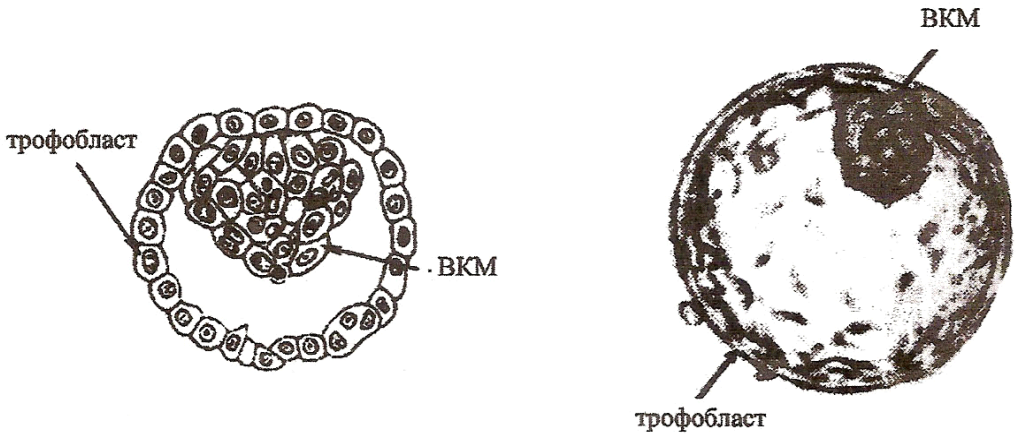


Рис. 1. Бластоциста млекопитающих

Слева – схематическое изображение (по Толкину, 1987)

Справа – фотография (http://ftp.jinr.ru/drrr/Timofeeff/Kor-Shev/present/Kiselev.pdf.)

Клетки ВКМ служат источником для формирования тела зародыша. Эти клетки, активно пролиферируя, дают начало трем зародышевым листкам, формируя в дальнейшем ткани и органы зародыша (Рис. 2).

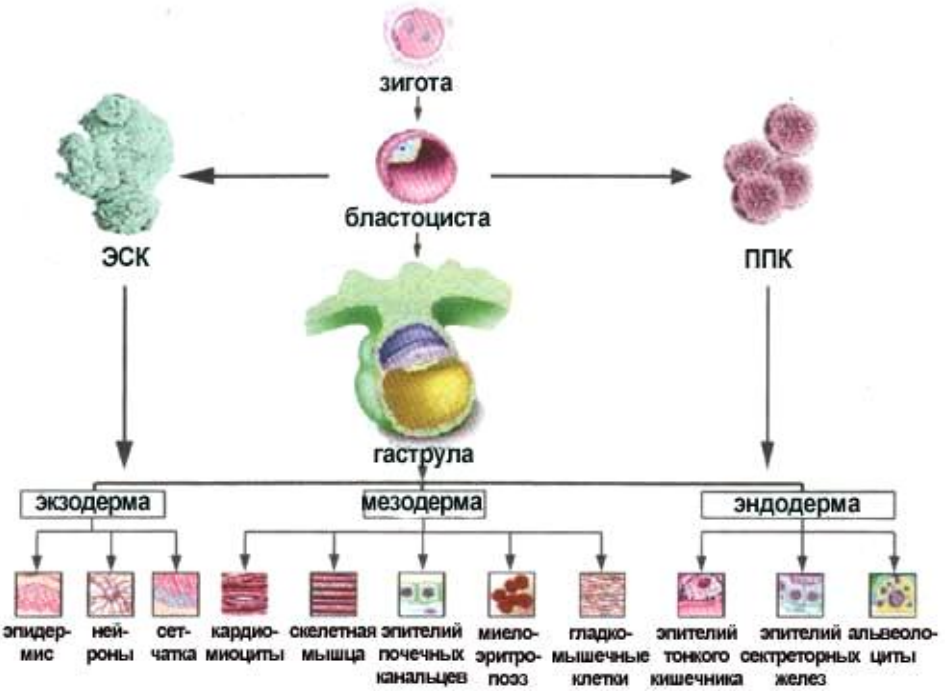


Рис.2. Развитие производных 3-х зародышевых листков из ЭСК и ВКМ бластоцисты (http://stem-cells.ru/).

Свойства ЭСК:

• Плюрипотентность – это способность клеток к дифференцировке в любые типы клеток организма. (Рис.3)

Рис.3. Основные направления дифференцировки ЭСК (Гривенников, 2008)

• ЭСК способны к самоподдержанию, путем неограниченного количества симметричных делений, то есть делений, при которых обе дочерние клетки полностью идентичны родительской.

• ЭСК способны включаться в развитие при инъекции в зародыш на ранних стадиях эмбриогенеза. При этом производные трансплантированных клеток будут обнаруживаться в производных всех трех зародышевых листков, а так же в линии половых клеток, что дает широкие возможности при получении линий нокаутных животных.

Получение и культивирование ЭСК

Выделение ЭСК весьма трудоемко, требует больших навыков и связано с определенными техническими трудностями.

Существует несколько способов получения линий ЭСК. Самым распространенным является метод извлечения клеток ВКМ из бластоцисты на 3-5 днях развития и перевод этих клеток в культуру. Так как выделяемого материала крайне мало работа с бластоцистой на таком раннем этапе развития крайне сложна. Также существует метод получения ЭСК человека из морулы (Strelchenko, Verlinsky 2006) и из отдельного бластомера (Klimanskaya et al., 2006)

Полученные клетки ВКМ переводятся в условия in vitro. Культивирование ЭСК проводится на слое фидерных (от англ. ‘to feed’- питать) клеток, обеспечивающих наличие необходимых факторов для роста ЭСК. В качестве фидера могут выступать мышиные эмбриональные фибробласты (MEF’s) или трансформированные фибробласты мыши линии STO (Park et al., 2003; Крылова и др., 2003). Для ЭСК человека показана возможность использования в качестве фидерного слоя фибробластов крайней плоти человека (Amit et al., 2003; Inzunza et al., 2005), а также мезенхимных клеток костного мозга, либо клеток эндометрия человека (Lee et al., 2004). Вопрос выбора фидерного слоя является важным при культивировании ЭСК.

Маркеры ЭСК

Под молекулярными маркерами подразумевают набор антигенов, характерных для того или иного типа клеток. Классическими маркерами ЭСК являются щелочная фосфатаза,

транскрипционный фактор Oct-4, высокая теломеразная активность и ряд поверхностных маркеров, например TRA 1-60, SSEA-3 и SSEA-4 (для клеток человека) и SSEA-1 (для ЭСК мыши), распознаваемых моноклональными антителами к специфическим эмбриональным или опухоль-определяющим антигенам.

Физиологическое значение большинства маркеров остается неясным, за исключением Oct-4. Исследования, проведенные на ЭСК и эмбрионах мыши, выявили критическую роль Oct-4 в поддержании плюрипотентного состояния ранних эмбриональных клеток и клеток половой линии.

Oct-4 является транскрипционным фактором, содержащим POU домен. Этот белок кодируется геном *pou5fl* и проявляется с восьмиклеточной стадии эмбриона мыши. Он необходим для формирования внутренней клеточной массы бластоцисты (в клетках трофэктодермы он отсутствует). Соответствующая активность гена Oct-4 поддерживает недифференцированное состояние эмбриональных клеток, а ее повышение или отсутствие вызывает их преобразование в клетки энтодермы, мезодермы или трофэктодермы (Niwa et al., 2000), то есть важно не только наличие данного транскрипционного фактора в клетке, но и его определенный уровень. Дифференцировка клеток внутренней массы сопровождается понижением уровня Oct-4, а изменение уровня синтеза Oct-4 в ЭСК в свою очередь приводит к потере клетками плюрипотентности и их переходу в дифференцированное состояние. Кроме Oct-4, имеется еще ряд транскрипционных факторов, синтезируемых в основном недифференцированными ЭСК, например Nanog, который занимает важное место в иерархии факторов, определяющих недифференцированную природу ЭСК, и происхождение. Если ген nanog заблокирован, эмбриональные клетки превращаются в примитивную энтодерму. В отсутствие ростового фактора LIF повышенная активность гена nanog обеспечивает плюрипотентное состояние ЭСК мыши. Подобно гену *oct-4*, в клетках соматических тканей ген nanog не проявляется, за исключением фетального мозга, репродуктивных органов (семенников и яичников) и

клеток эмбриональной карциномы. По мере спонтанной дифференцировки ЭСК человека в эмбриоидные тельца активность этого гена снижается.

ЭСК и клиническое применение

Каждый человек обладает уникальным набором антигенов тканевой совместимости HLA (human leucocyte antigens), и их несовпадение у донора и реципиента является важнейшей причиной несовместимости при трансплантации. В вопросе о клиническом применении ЭСК есть свои плюсы и минусы. Важный плюс ЭСК состоит в том, что они не экспрессируют HLA. Соответственно, шанс того, что донорские эмбриональные клетки будут отторгнуты организмом реципиента, очень невысок. При пересадке иммунодефицитным животным эмбриональные стволовые клетки способны образовывать тератомы (опухоли сложного многотканевого строения), некоторые из них могут стать злокачественными. Достоверных данных о том, как ведут себя эти клетки в иммунокомпетентном организме, например, в организме человека, нет.

Также значительной проблемой является этический аспект использованияэтих клеток, так как источником получения ЭСК, по сути, является материал зародыша человека, хоть и на ранней стадии. Другой проблемой при применении ЭСК является то, что используемые методики дифференцировки ЭСК не дают 100 %-ной гарантии того, что все клетки в культуре дифференцировались, существенно повышая, таким образом, риск формирования тератом и тератокарцином в организме реципиента (Hollowell, 2002). Таким образом, несмотря на очевидную уникальность свойств ЭСК, использованиеих в регенеративной медицине сопряженос определенными рисками.

1.4. Фетальные стволовые клетки

Фетальные стволовые клетки получают из абортивного материала (9—12 неделя развития). Эти клетки более дифференцированы, чем ЭСК, но менее дифференцированы, чем СК взрослого организма. Это связано с тем, что на стадии 256 клеток в человеческом

эмбрионе начинают выделяться первичные органы и ткани. Именно эти первичные структуры в последующем дадут начало всем органам и тканям человека.

Использование такого биоматериала также вызываетэтические проблемы. В некоторых странах - Украина, Великобританияпродолжаются работы по их изучению,но в большинстве стран подобные работы не поддерживаются государством и осуждаются общественностью.

1.5. Стволовые клетки взрослого организма

Несмотря на то, что СК взрослого организма обладают меньшим дифференцировочным потенциалом по сравнению с эмбриональными и фетальными стволовыми клетками, этический аспект их исследования и применения не вызывает серьёзных споров, а возможность использования аутогенного материала обеспечивает безопасность трансплантации таких клеток.

СК взрослого организма можно подразделить на три основных группы: гемопоэтические, мультипотентные мезенхимные и тканеспецифические прогениторные клетки.

1.5.1.Гемопоэтические стволовые клетки

Особое место в иммунной системе отводят гемопоэтической стволовой клетке (ГСК), дающей начало подавляющему большинству клеточных элементов иммунной системы (Рис.4). Впервые вопрос о мультипотентности стволовой гемопоэтической клетки поставил выдающийся русский гистолог А.А. Максимов. В 20-х годах XX в. он заявил, что стволовая клетка подобна костномозговому малому лимфоциту, обладает способностью к самоподдержанию, и из нее развиваются все клетки крови (эритроциты, моноциты, тромбоциты, лимфоциты). В настоящее время разработаны методы получения фракций, обогащенных стволовыми клетками, не только из костного мозга, но и из периферической и пуповинной крови. Уровень ГСК в пуповинной крови такой же, как и в костном мозге, а в периферической крови значительно ниже.

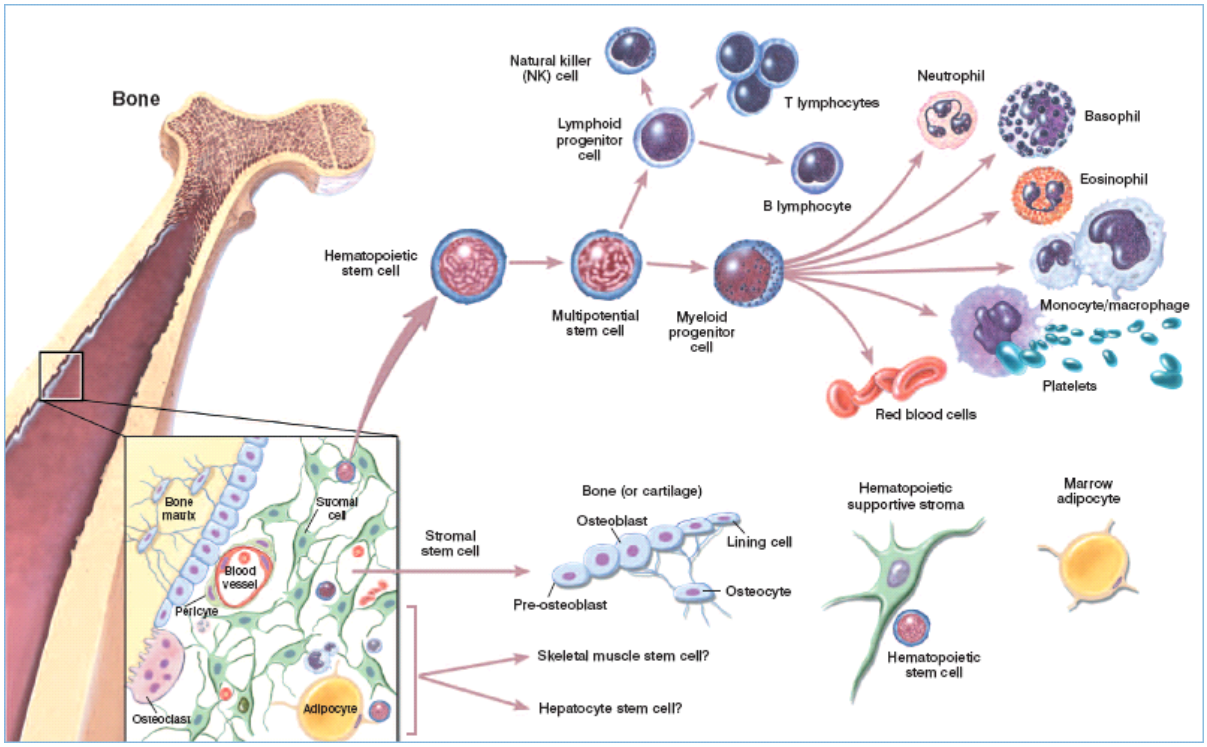


Рис.4. Схематическое изображение костного мозга с включенными в него ГСК и пути их дифференцировки (https://stemcells.nih.gov/info/2001report/chapter5.htm).

Определены ключевые поверхностные маркеры, характерные для стволовых гемопоэтических клеток человека: CD34, CD133, CD38, Thy-1 (CD90), C-kit (CD117) и др. (Рис.5). Ключевым и практически значимым маркером таких клеток человека является CD34 — высокогликолизированный трансмембранный белок типа 1 семейства сиаломуцинов с адгезивными свойствами. Приблизительно 1-3% ядросодержащих клеток костного мозга и 0,5% мононуклеарных клеток периферической крови экспрессируют молекулы CD34.

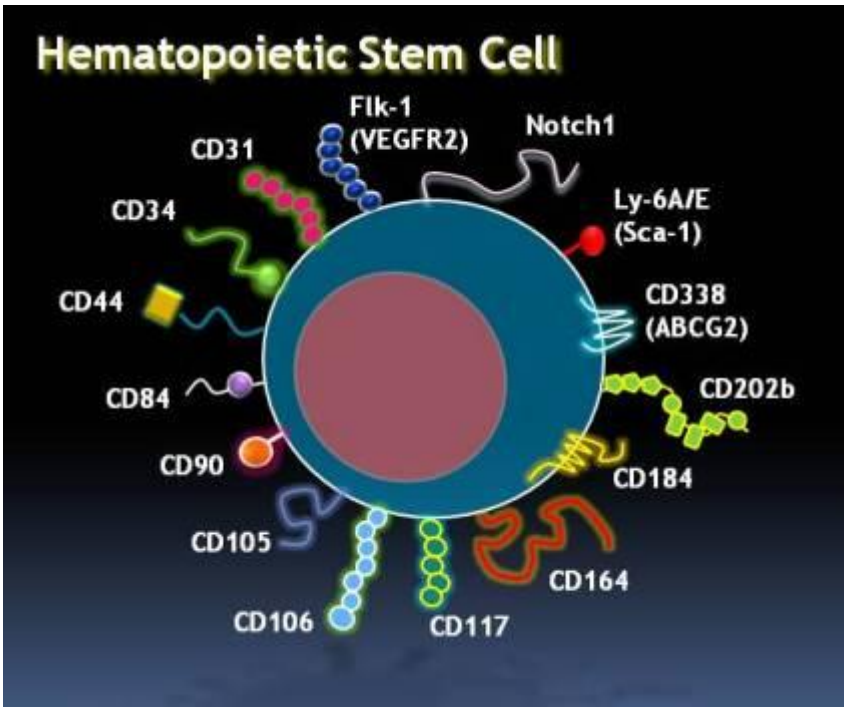


Рис.5. Поверхностные CD маркеры ГСК. (http://hdimagelib.com/hematopoietic%20stem%20cells%20markers).

Таким образом, ГКС, как малодифференцированная клетка, способна к самоподдержанию, мультипотентности, пролиферации, дифференцировке, колониеобразованию. Способность к самоподдержанию определяется тем, что одна из возникших дочерних клеток дифференцируется, а другие остаются недифференцированными, локализуются в особых клеточных «нишах» и служат источником образования последующих поколений клеток. Такое асимметричное деление позволяет говорить о «бессмертности» стволовых клеток. ГСК характеризуются мультипотентностью - дают начало клеточным линиям, конечные элементы которых образуют форменные элементы крови, а также ряд специализированных тканевых клеток иммунной системы. Потенциал образования клеточной массы у ГСК огромен — стволовые клетки костного мозга ежедневно продуцируют огромное количество клеток, составляющих форменные элементы периферической крови.

Способность ГСК к миграции, проникновению сквозь гистогематические барьеры, имплантации в тканях и клоногенному росту послужила основой для трансплантации

клеток костного мозга при целом ряде заболеваний, связанных с патологией системы кроветворения. Трудности работы с ГСК связанны с тем, что они присутствуют в костном мозге, пуповинной и периферической крови в весьма незначительных количествах, поэтому выделение эти клеток вызывает значительные сложности.

1.5.2.Мезенхимные стволовые клетки

В 1968 году группа ученых (Friedenstein et al., 1968) впервые выделили из ткани костного мозга популяцию клеток, адгезивных к пластику, и имеющих фибробласто-подобную форму с характерными круговыми завихрениями. Клетки обладали высокой эффективностью клонирования и способностью дифференцироваться в другие типы клеток мезодермы. Клетки, первоначально названные как образующие колонии фибробласты (CFU-F), позже получили название мезенхимных стволовых клеток (МСК). Позднее была показана способность МСК костного мозга дифференцироваться в кардиомиоциты, нейроны и астроциты (Pittenger et al., 1999; Jori et al., 2005).

Кроме костного мозга, МСК были выделены из жировой ткани, пуповинной крови, амниотической жидкости, а также из ткани эндометрия, скелетных мышц, хрящей, сухожилий, пульпы зуба, периодонтальной связки, синовиальной мембраны, лёгких и др. (Zuk et al., 2001; De Bari et al., 2001; Salingcarnboriboon et al., 2003; Seo et al., 2004; Cho et al., 2004; Gargett, 2006; Parker,Katz, 2006; De Coppi et al., 2007). К настоящему времени самыми распространенными источниками для выделения МСК, помимо костного мозга, являются жировая ткань (Parker, Katz, 2006) и пуповинная кровь (Bieback, Kltiter, 2007). Комплексное изучение свойств соматических стволовых клеток из различных источников позволило заключить, что они, в целом, совпадают со свойствами мезенхимных стволовых клеток костного мозга, в первую очередь по морфологии и профилю экспрессии маркерных антигенов. МСК обладают высокой пролиферативной активностью и способны дифференцироваться в разные ткани взрослого организма.

Международное общество клеточной терапии разработало и утвердило критерии по определению мультипотентных МСК человека, независимо от источника их происхождения:

1. Адгезивность к пластику.

2. Позитивная экспрессия - CD73, CD90 и CD105, а также CD13, CD29, и CD44. Отсутствие экспрессии поверхностных маркеров CD19, CD34, CD45, CD117, CD130 и HLA-DR (класса II) характеризует клетки, как клетки, имеющие мезенхимный стромальный, а не гемопоэтический фенотип.

3. Мультипотентный статус должен быть подтвержден их способностью дифференцироваться в другие типы клеток мезодермы, такие как остеобласты, адипоциты и хондроциты (Salem, Thiemermann, 2010).

Основное достоинство МСК состоит в возможности использования аутологичных клеток для трансплантации в целях регенеративной терапии.

1.5.3.Тканеспецифичные прогениторные клетки

Тканеспецифичные прогениторные клетки (клетки-предшественницы) располагаются в различных тканях и органах и отвечают за обновление их клеточной популяции, то есть замещают погибшие клетки. В своем большинстве эти клетки унипотентны, т.е. могут дифференцироваться только в один тип клеток.

1.6. Эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека

В последние годы появилось большое число публикаций о выделении и использовании СК мезенхимной природы из эндометрия (эМСК) (Hida et al., 2008; Patel et al., 2008; Götte, 2011; Земелько и др., 2011).

Эндометрий – это внутренняя слизистая оболочка полости матки (Рис.6). Из клеток этой ткани развиваются некоторые внезародышевые органы, в частности, плацента. В последней фазе менструального цикла женщины эндометрий начинает активно расти, и, если не начинается беременность, часть его клеток отделяется и удаляется из матки с

менструальной кровью. Эндометрий состоит из трех слоев: базального, который не отторгается во время менструации; поверхностного, состоящего из компактных эпителиальных клеток, которые выстилают полость матки; промежуточного, спонгиозного слоя. Последние два слоя составляют функциональный слой, подвергающийся основным циклическим изменениям в течение менструального цикла и отторгающийся в период менструации. Долгое время считалось, что именно базальный слой содержит клетки, пролиферативная активность и пластичность которых определяют возможность циклической регенерации эндометрия в течение всего детородного периода.

В настоящее время предполагают, что не только базальный, но и функциональный слой участвует в регенерации эндометриальной ткани (Cervello et al., 2010, 2011).

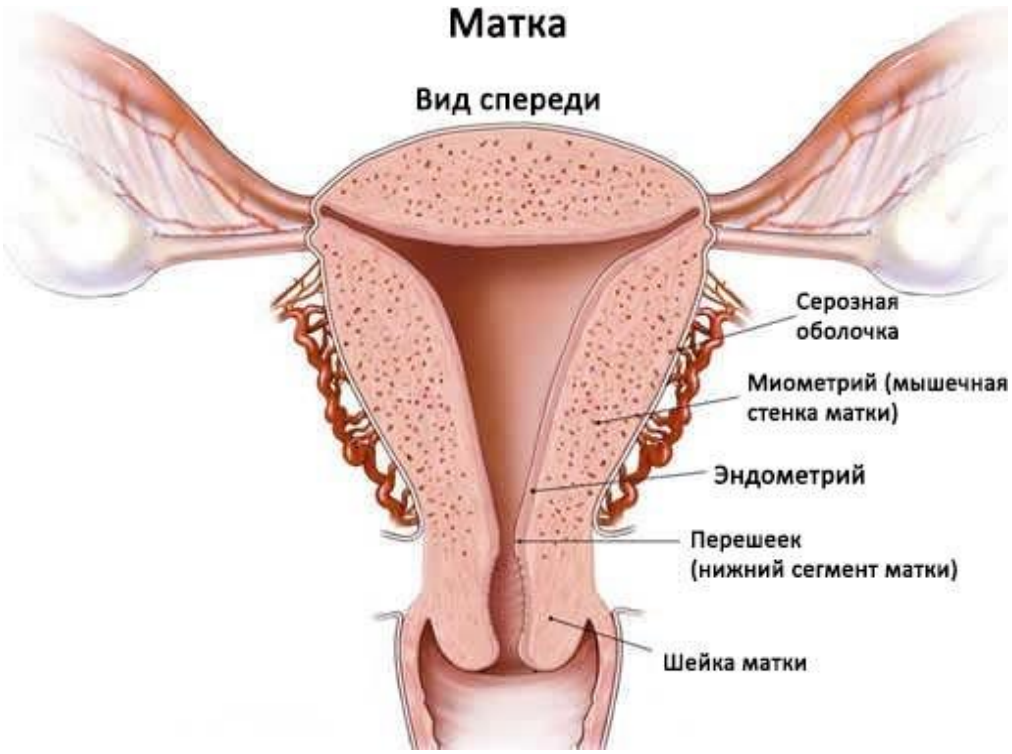


Рис.6. Схематическое изображение матки (http://www.women-medcenter.ru/Endometrij/).

В процессе ассиметричного деления взрослые СК генерируют более дифференцированные, так называемые коммитированные прогениторные клетки с относительно высокой пролиферативной активностью. Дальнейшая дифференцировка

приводит к образованию терминально дифференцированных железистых эпителиальных клеток эндометрия, стромальных или эндотелиальных клеток (Diaz-Flores et al., 2006).

Предположение о существование стволовых клеток эндометрия высказывалось еще в середине прошлого века (Hartman, 1944; Padykula et al., 1984; Tresserra et al., 1999). Однако впервые клеточная популяция эндометриальных СК была изолированаи охарактеризована лишь в 2004 г. (Chan et al., 2004; Cho et al., 2004). Исследователи обнаружили присутствие в ткани эндометрия небольшого количества стромальных клеток, обладающими клоногенными свойствами. Это послужило толчком для более детального изучения прогениторных клеток эндометрия. Описанные клетки по набору экспрессируемых мембранных антигенов CD9, CD29, CD44, CD105, CD90, CD73 и отсутствия маркеров ГСК CD45, CD34, CD19,были отнесены к клеткам с преобладанием свойств мезенхимальных стволовых клеток (Gargett et al., 2007; Tsuji et al., 2008; Cervello et al., 2011; Schüring et al., 2011). В 2007—2008 гг. сразу несколько групп исследователей независимо друг от друга выделили и охарактеризовали СК из образцов менструальной крови (Cui et al., 2007; Meng et al., 2007; Toyoda et al., 2007; Dimitrov et al., 2008; Hida et al., 2008; Patel et al., 2008; Мусина и др., 2008). Клетки десквамированного эндометрия широко представлены в менструальной крови, и выделение эМСК для последующего использования возможно даже из образцов малого объема. Разные экспериментаторы используют различные методики для выделения и культивирования эМСК in vitro, что приводит к выделению линий эМСК, различающихся между собой по свойствам и фенотипу. Нужно отметить, что некоторые исследователи наблюдали различия в свойствах клеток, выделенных из менструальной крови и из образцов ткани эндометрия (Gargett, Masuda, 2010; Allickson, Xiang, 2012). Клеточная фракция, изолированная из менструальной крови, является мультипотентной, обладает клоногенными свойствами. Многими исследователями отмечена высокая скорость пролиферации стволовых клеток

эндометриального происхождения и их способность к длительному культивированию (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008; Gargett et al., 2009).

Одним из наиболее важных свойств эндометриальных стволовых клеток является их высокая пластичность. В определенных условиях эМСК могут дифференцироваться в клетки тканей мезодермального (миоциты, кардиомиоциты, остеоциты, адипоциты, эндотелиоциты), эктодермального (нейроны) и эндодермального (гепатоциты, клетки поджелудочной железы и дыхательного эпителия) рядов (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008).

После отработки технологии выделения, размножения и направленной дифференцировки эМСК in vitro эти клетки были использованы в трансплантационных экспериментах. В одном из первых исследований было показано, что трансплантация эМСК, выделенных из ткани эндометрия и менструальной крови человека (интактных и дифференцированных в миогенном направлении) в мышечную ткань мышей с дистрофией Дюшена, приводила к частичной регенерации скелетной мышечной ткани (Cui et al., 2007). В работе Н. Хида с соавторами выделенные из образцов ткани эндометрия и менструальной крови человека эМСК были способны с высокой эффективностью дифференцироваться in vitro в предшественники кардиомиоцитов, демонстрирующие характерный комплекс признаков, включая способность к спонтанному сокращению (Hida et al., 2008). Трансплантация эМСК из образцов ткани эндометрия и менструальной крови человека в миокард модельным животным (крысам с моделированным инфарктом миокарда) продемонстрировала высокую эффективность дифференцировки клеток в кардиомиоциты in vivo в зоне инфаркта. Для эМСК менструальной крови была показана возможность достичь функционального эффекта (уменьшения зоны фиброза и восстановления систолической функции левого желудочка у модельных животных), что позволило сделать вывод о высоком потенциале эМСК менструальной крови в качестве субстрата клеточной терапии сердечной патологии (Hida et al., 2008). Высокий

ангиогенный потенциал эМСК, соответствующий их биологической роли в циклическом восстановлении чрезвычайно богатой кровеносными сосудами ткани эндометрия (Angle, 2008), послужил обоснованием для трансплантации эМСК менструальной крови мышам, у которых была смоделирована критическая ишемия конечностей (Murphy et al., 2008). эМСК способны оказывать не только трофический эффект, но и выступать в роли антиканцерогенного фактора. Показано, что трансплантированные МСК десквамированного эндометрия замедляют рост глиомы у крыс. При этом наблюдается уменьшение объема опухоли на 46% по сравнению с контролем, что обуславливается снижением плотности сосудистой сети в опухоли. (Han et al., 2009).

Первым случаем клинического применения эМСК была аллогенная трансплантация этих клеток четырем больным рассеянным склерозом (Zhong et al., 2009). Это исследование продемонстрировало отсутствие побочных эффектов и безопасность использования данного вида мезенхимальных стволовых клеток. Второй случай применения эМСК был описан при лечении пациента с мышечной дистрофией Дюшена. эМСК вводились внутримышечно двумя циклами через четыре месяца. После обоих циклов наблюдалось увеличение мышечной массы во всех группах мышц и нормализация уровня дистрофина. Никаких неблагоприятных эффектов в течение трех лет наблюдения за пациентом отмечено не было (Ichim et al., 2010a). Те же авторы описывают успешное применение эМСК при лечении хронической сердечной недостаточности (Ichim et al., 2010b). Перспективным направлением является возможность использования эМСК для коррекции патологии самой эндометриальной ткани (Cervello et al., 2011, Домнина и др. 2015; Tan et al., 2016). Предполагают, что эМСК способны к регенерации эндометриальной ткани и могут быть использованы для лечения синдрома Ашермана, характеризующегося нарушением структуры и функции эндометрия.

Ряд таких факторов, как неинвазивный и относительно легкодоступный способ получения, высокая пролиферативная активность in vitro, а также успешное применение в

экспериментальных и первых клинических исследованиях делают эМСК менструальной крови весьма перспективным источником стволовых клеток для использования в терапевтических целях.

1.7. Иммортализация и онкогенная трансформация

Наиболее фундаментальная черта раковых клеток связана с их способностью поддерживать неограниченную пролиферацию (иммортализация). Клетки нормальных тканей имеют механизмы жесткого контроля вступления и прохождения через цикл клеточного деления, тем самым поддерживая нормальное строение и функции ткани. Раковые клетки с помощью дерегулирование пролиферативного сигналинга,становятся ограничения в пролиферации.

Системы контроля целостности генома клеток условно можно разделить на две группы: 1) репарационные системы, выявляющие и исправляющие ошибки, которые приводят к изменениям последовательности нуклеотидов в ДНК, и 2) системы контроля клеточного цикла, предотвращающие дальнейшее размножение клеток, в которых уже произошли или могут произойти нарушения структуры или числа хромосом.

Предполагается, что нарушения в системе репарации двунитевых разрывов ДНК, осуществляемой путем гомологичной рекомбинации, могут приводить к развитию определенных форм опухолей. На это указывает тот факт, что супрессорные белки BRCA1 и BRCA2, терминальные мутации которых ответственны за наследственные формы рака молочной железы и яичников (Карпухини др., 2002; Byrski et al., 2008; Киселев и др., 2011), обладают способностью образовывать комплекс с белком RAD51 - гомологом бактериального белка RecA, ответственным за гомологичную рекомбинацию (Hallajian et al., 2017;Kolinjivadi et al., 2017; Buys et al., 2017).Однако следует заметить, что репарация двунитевых разрывов ДНК происходит в определенные периоды клеточного цикла, остановка в которых резко увеличивает эффективность процесса. Не исключено, что способность белка BRCA1 повышать экспрессию $p21^{WAF1/CIP1}$ через p53-зависимые и p53-

независимые механизмы (Privat et al., 2010) и, наоборот, подавлять трансактивационную способность белка Myc (Xu et al., 2010) направлена именно на остановку клеточного цикла в поврежденных клетках.

Большое значение для инактивации контрольных точек клеточного цикла имеет дисфункция некоторых опухолевых супрессоров и протоонкогенов, в частности *p53, pRb,MYC и RAS* (Рис. 7).

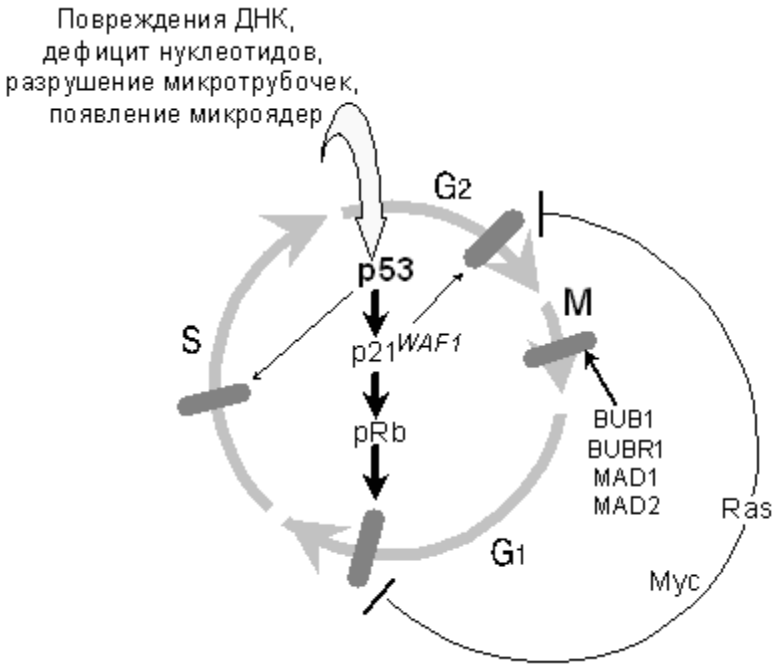


Рис. 7. Контрольные точки клеточного цикла и участие в их регуляции некоторых опухолевых супрессоров и онкогенов (http://www.rosoncoweb.ru/library/oncogene/03.php)

p53 является одним их ключевых компонентов клеточного цикла, он активируется в ответ на самые разные неблагоприятные воздействия, в том числе и приводящие к генетическим нарушениям - разрывы ДНК, недостаток нуклеотидов, разрушение микротрубочек, отсутствие сегрегации хромосом в митозе или ее неправильное завершение, приведшее к образованию микроядер (Sablina et al., 2001; Pantic et al., 2010; Muller,Vousden, 2013). При этом сенсорами повреждений ДНК являются ДНК-протеинкиназа и/или белок ATM (Ataxia-Teleangioectasia Mutated), обладающие способностью, с одной стороны, распознавать свободные концы ДНК, а с другой, -

фосфорилировать p53 по Ser-15, препятствуя тем самым его связыванию с белком Mdm2, последующему транспорту из ядра и деградации (Prives, 1998; Giaccia, Kastan, 1998). Одним из следствий активации p53 является изменение экспрессии регулируемых им генов, таких как *BAX, BCL2* и др., контролирующих апоптоз и $p21^{WAF1}$, *GADD45* (Growth Arrest and DNA Damage-induced), экспрессия которых приводит к остановке клеточного цикла. В результате клетка, в которой уже произошли или только могут произойти генетические изменения, либо гибнет в результате индукции апоптоза, либо останавливается в G1- или G2-, а иногда в S-фазе клеточного цикла. Выбор между двумя возможными реакциями клетки на активацию p53 - апоптозом и остановкой клеточного цикла - зависит от множества факторов: гистогенетического типа клеток (например, в нормальных фибробластах, как правило, наблюдается остановка клеточного цикла, тогда как в лимфоцитах - апоптоз), степени активации p53, уровня функциональной активности сигнального пути $p21^{WAF1}$-pRb-E2F, ответственного за остановку в G1 и т.д. (Agarwal et al.,1998; Amundson et al., 1998; Duronio, Xiong, 2013), а точка остановки клеточного цикла определяется в первую очередь тем, в какой фазе клеточного цикла находится клетка в момент повышения экспрессии p53 и каким фактором вызвана его активация. Нарушения функции p53, характерные для большинства различных новообразований человека, значительно ослабляют проверочные функции контрольных точек клеточного цикла и одновременно ингибируют индукцию апоптоза, что наряду с некоторыми другими последствиями дисфункции p53, в частности утратой механизма, ограничивающего образование дополнительных центросом, резко увеличивает вероятность появления пролиферирующих клеток со спонтанно возникшими или индуцированными генетическими аномалиями - изменениями числа хромосом, разрывами и рекомбинациями хромосом или амплификацией отдельных генов.

Активация некоторых протоонкогенов также может ослаблять работу контрольных точек клеточного цикла (Рис. 7) и, как следствие, увеличивать генетическую

нестабильность. Так, гиперэкспрессия *Myc* позволяет преодолеть ингибирующее действие $p21^{WAF1}$ на комплексы циклин D - Cdk4 и циклин E - Cdk2, отменяя, таким образом, остановку в G1, вызываемую активацией p53. Гиперфункция Ras тоже может вызывать ослабление работы контрольных точек в G1 и G2 и индуцировать генетическую нестабильность, но проявляться такие эффекты могут только в клетках, имеющих те или иные аномалии p53-регулируемых сигнальных путей (Schubbert et al., 2007).

Часто встречающиеся в новообразованиях человека изменения опухолевых супрессоров (инактивация *p53, pRb* и, возможно, $p16^{INK4a}$-$p19^{ARF}$) и/или протоонкогенов (активация *MYC, RAS* и др.) приводит к дисфункции контрольных точек клеточного цикла и нестабильности генома. Кроме того, в опухолевых клетках закономерно выявляются изменения и некоторых других генов, ответственных за поддержание целостности генома. Более того, врожденные инактивирующие мутации не только *p53* или *pRb*, но и некоторых из генов репарационных систем неизменно приводят к развитию определенных новообразований. Это свидетельствует о важнейшей роли генетической нестабильности в генезе опухолей и/или их дальнейшей прогрессии. Хотя повышенная нестабильность генома, вероятно, не является строго необходимой для онкогенеза, без нее практически невозможно возникновение в одной клетке достаточного числа мутаций, определяющих злокачественный характер роста опухолей.

1.8. Генетическая стабильность эМСК в процессе культивирования и возможность спонтанной трансформации

Применение МСК в регенеративной медицине с каждым годом получает все большее развитие.

Использование МСК в терапевтических целях подразумевает наличие их генетической стабильности, в частности стабильного кариотипа. Тем не менее, в настоящее время в литературе нет полной ясности относительно генетической стабильности МСК при наращивании биомассы in vitro в терапевтических целях. Несмотря на то, что во многих

публикациях есть указания на то, что МСК при культивировании характеризуются постоянством структуры кариотипа, данные некоторых авторов показывают, что при переводе в систему in vitro кариотип МСК претерпевает те или иные изменения. Одни авторы придерживаются точки зрения, что случайные кариотипические изменения клеток не поддерживаются отбором в процессе культивирования и, следовательно, не вызовут проблем при их клиническом использовании (Bernardo et al., 2007; Tarte et al., 2010; Sensebe et al., 2012; Jones et al., 2013; Roemeling-van Rhijn et al., 2013; Roselli et al., 2013; Zaman et al., 2014). Другие считают, что при определенных обстоятельствах возникшие кариотипические нарушения могут получить селективное преимущество и потенциально стать источником клеточной трансформации (Buyanovskaya et al., 2009; Ben-David et al., 2011, 2012; Ueyama et al., 2012; Borghesi et al., 2013; Froelich et al., 2013; Borgonovo et al., 2014). Несколько статей, в которых исходно была описана спонтанная трансформация МСК человека in vitro, со временем были отозваны авторами этих работ, так как была показана кросконтаминация этих культур трансформированными клетками (Rubio et al., 2005; de la Fuente et al., 2010; Torsvik et al., 2010). На данный момент в литературе имеется только одна публикация в которой была показана спонтанная трансформация МСКinvitro и которая еще не была отозвана (Pan et al., 2014). В этой работе была описана спонтанная трансформация 2-х из 40 линий МСК, выделенных из печени и 2-х из 5 линий МСК, выделенных из костного мозга. Методологически эта работа выполнена грамотно и не вызывает сомнений. Однако стоит отметить, что клетки печени были выделены от больных доноров, что могло послужить причиной спонтанной трансформации. Относительно МСК из костного мозга, высокая частота спонтанно трансформированных линий– 2 линии из 5 вызывает удивление. На данный момент, кроме этой работы, спонтанной трансформации МСК не было показано ни в одной лаборатории мира. Потому вопрос о возможности спонтанной трансформации МСК человека остается открытым.

Разными авторами при исследовании независимых клеточных культур МСК, выделенных из костного мозга, было выявлено наличие повторяющихся изменений, связанных с определенными хромосомами, в частности неслучайная трисомия хромосом 5, 7, 8, 9, 20. Эти авторы полагают, что количество анеуплоидных вариантов в процессе длительного культивирования может возрастать и стать причиной дальнейшей клеточной иммортализации (трансформации) (Tarte et al., 2010; Redaelli et al 2012). Анализируя миелоидные и лимфоидные злокачественные новообразования, Мительман выявил в клетках трисомию хромосом 5, 7 и 20 (Mitelman et al., 2014). При изучении МСК костного мозга от пациентов с раком костей и мягких тканей (ретинобластомы с подавлением супресора опухолей гена RB1) этот же автор обнаружил моносомию хромосомы 13.

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

Использование стволовых клеток в регенеративной медицине требует значительной биомассы клеток, для этого перед использованием, клетки накапливаются длительным культивированием в системе in vitro. Именно поэтому крайне важно проверять генетическую стабильность и безопасность клеток. Никаких признаков токсичности или

туморогенности при трансплантацииэМСК экспериментальным животным выявлено не было (Allickson, 2011). Все это указывает на перспективность использования эМСК в заместительной терапии.

1.9. Эндометриоз

Генетическая стабильность выделенных эМСК зависит от состояния здоровья донора. Существует заболевание женской репродуктивной системы, связанное именно с патологией эндометрия – это эндометриоз.

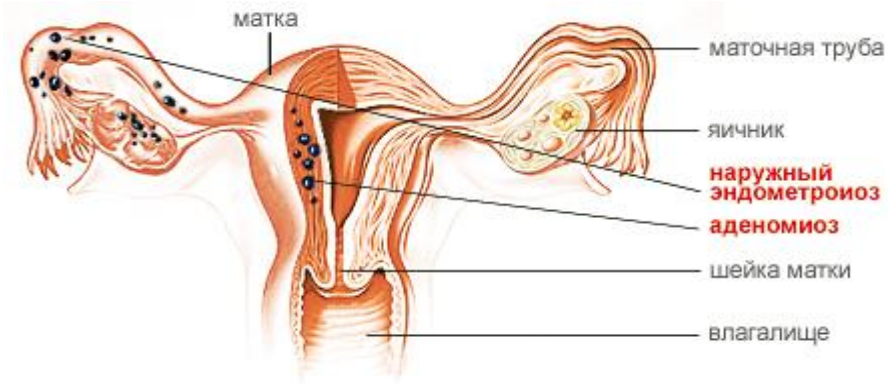


Рис.8. Схематичное изображение вариантов локализации эндометриоза (http://www.androlog-med.ru/uslugi/jendometrioz-matki).

Эндометриоз - это распространённое гинекологическое заболевание, при котором клетки эндометрия разрастаются за пределами этого слоя (Рис.8), и является частой причиной бесплодия и тазовых болей у 10-15% женщин репродуктивного возраста (Missmer et al., 2003; Gupta et al., 2008; Hompes et al., 2007; De Hondt et al., 2005). Различают генитальный (в пределах половых органов — матки, яичников) и экстрагенитальный (вне половой системы — пупок, кишечник и т. д.) эндометриоз (Markham, et al.,1989). Генитальный эндометриоз подразделяется на наружный генитальный эндометриоз к которому относятся эндометриоз яичников и тазовой брюшины, и внутренний генитальный эндометриоз (аденомиоз), при котором эндометрий «врастает» в миометрий (Рис.8). Матка при этом приобретает округлую или шаровидную форму и может быть увеличена до размеров, характерных для 5-6 недель беременности.

По распространению и глубине поражения тканей эндометриозом различают 4 степени заболевания: I степень — единичные поверхностные очаги, II степень — несколько более глубоких очагов, III степень — множество глубоких очагов эндометриоза, небольшие эндометриоидные кисты одного или обоих яичников, тонкие спайки брюшины, IV степень — множество глубоких очагов, большие двусторонние эндометриоидные кисты яичников, плотные сращения органов, прорастание влагалища или прямой кишки.

Некоторые исследования показывают, что эндометриоз является заболеванием множественной этиологии, обусловленной наследственными, гормональными, иммунологическими, экологическими и другими факторами (Olive, Schwartz, 1993; Brinson et al., 1997). Эпидемиологические исследования выявили семейную тенденцию этого заболевания (Ranney, 1971; Malinak et al., 1980; Simpson et al., 1980; Lamb et al., 1986; Moen, Magnus, 1993; Moen, 1994), что свидетельствует о его наследственном характере.

Это заболевание характеризуется моноклональным ростом клеток и может иметь признаки злокачественного роста, включая локальные инвазии и метастазирование (Gaetje et al., 1995; Jimbo et al., 1997; Sharpe-Timms, 1997). В 1997 году было показано злокачественное преобразование клеток эндометрия при эндометриозе (Jimbo et al., 1997; Fukunaga et al., 1997).

В настоящее время, известно, что клетки, выделенные из очагов эндометриоза, характеризуются генетической нестабильностью на уровне кариотипа. Основными типами изменений является появление анеуплоидиных клеток и наличие морфологических изменений на уровне хромосом, что характерно для процесса клеточной трансформации.

В ряде работ показано, что в перестройки вовлекаются определенные хромосомы кариотипического набора. Так, при изучении эндометриозных клеток различной локализации показано, что на фоне общей кариотипической дестабилизации наиболее

часто в перестройки (делеции, дупликации, транслокации) вовлекается материал хромосом 7 и 11 (Bouquet de Jolinière et al., 1997; Gogusev et al., 2000; Korner et al., 2006).

Несмотря на то, что аденомиоз является одной из форм эндометриоза, на настоящий момент известно всего несколько работ, посвященных исследованию генетики аденомиоза (Pandis et al., 1994; Wang et al., 2002, Шилина и др. 2014).

1.10. Стволовые клетки и стресс

Большое влияние на генетическую и физиологическую стабильность СК оказывают различные экзогенные факторы.

Большинство стрессов окружающей среды - осмотический, температурный, оксидативный, воздействие тяжелых металлов, ионизирующая радиация и др., сильно влияют на жизнеспособность клеток - изменяют конформацию белков, нарушают структуру ДНК и липидов, клеточный цикл и т.д. (Kempner, 1993; Rydberg, 2001; Catalá, 2010). Воздействие стресса на эукариотические клетки может ингибировать инициацию трансляции и приводить к образованию цитоплазматических РНК-белковых комплексов – стрессовых гранул (Buchan, Parker, 2009). Вследствие этого в организмах выработалась способность инициировать адаптивные пути клеточного ответа для сохранения или восстановления клеточного гомеостаза (Gupta et al., 2010).

Стволовые клетки могут по-разному реагировать на стрессовые воздействия. Мягкий стресс может стимулировать дифференцировку стволовых клеток. Результатом жесткого стресса является некроз (Harmon et al.,1990; VanderWaal et al., 1997). Сублетальные дозы различных стрессорных факторов приводят к апоптозу (O'Neill et al, 1998; Hildebrandt et al., 2002) или старению (SIPS) (Alekseenko et al., 2014). Реакция зависит от типа клеток и интенсивности стрессового воздействия (Takahashi et al., 2004; Pawlik et al., 2012; Alekseenko et al., 2014).

1.11.Влияние гипертермии на репарацию ДНК

Тепловой шок (ТШ) является одним из важных и наиболее изученных клеточных стрессов. Клеточный ответ на ТШ является высоко консервативным и базируется, главным образом, на действии стресс-индуцированных белков и факторов теплового шока (ТШ белков и ТШ факторов). Однако в ответ на ТШ, так или иначе, вовлечены разные клеточные компартменты (Velichko et al., 2013). Различают мягкий, не приводящий к гибели клеток, и жесткий, деструктивный, ТШ.

Гипертермия оказывает значительное влияние на систему репарации ДНК после повреждений. Влияние ТШ на систему репарации ДНК лежит в основе феномена, названного тепловой радиочувствительностью и применяется для лечения рака (Kampinga et al., 2004). Точный механизм радиосенсибилизации все еще обсуждается. Одна из гипотез предполагает, что тепловая радиосенсибилизация является результатом торможения репарации ДНК, вызванной ионизирующей радиацией (IR) (Kampinga et al., 2004; Batuello et al., 2009; Dynlacht et al., 2011). Кроме торможения систем репарации, ТШ сам является фактором, повреждающим ДНК. Причем ТШ может вызывать формирование как однонитевых (SSBs) (Corry et al., 1977; Jorritsma, Konings, 1984; Warters et al., 1985), так и двунитевых разрывов ДНК (DSBs) (Velichko et al., 2012),что в свою очередь может привести к поломкам хромосом.

1.12.Влияние теплового шока на мезенхимные стволовые клетки

Исследования влияния ТШ на МСК начались сравнительно недавно. Немногочисленные опубликованные работы выполнены на культивируемых мезенхимных клетках, подвергнутых мягкой гипертермии. Исследовали влияние температурных изменений на основные свойства МСК, пролиферативный потенциал и способность к дифференцировке в различные производные мезодермы. МСК человека, выделенные из разных тканей, пролиферируют in vitro и могут пассироваться в течение длительного времени. Количество пассажей для этих клеток зависит от многих причин

(возраста донора, тканевого источника, условий культивирования), но оно всегда лимитировано. По мере культивирования пролиферативная активность клеток снижается, и клетки постепенно погибают. В основе гибели этих клеток лежит механизм, который называют клеточным старением. Замедление процесса старения культивируемыхМСКимеет важное значениене только для понимания фундаментальных механизмов старения, но и для практического применения этих клеток, поскольку позволяет увеличить биомассу этих клеток.

В недавних исследованиях было показано, что после сублетального температурного воздействия часть эМСК подвергается SIPS, а часть клеток после восстановительного периода продолжают свою пролиферацию (Alekseenko et al., 2014). Литературных данных об исследовании МСК, переживших жесткий ТШ, на данный момент мало.

При культивировании, а также после трансплантации стволовые клетки могут оказаться в условиях ТШ и поэтому знание того, какие свойства сохраняют или теряют выжившие стволовые клетки имеет важное значение.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Материал

Клеточные линии получали в соответствии со стандартным протоколом (Земелько и др. 2011). Скрининг 15 лабораторных линий эндометриального происхождения, 4 из которых были получены диссертантом лично, подтвердил их мезенхимный статус. 5 из них были выбраны для углубленного анализа в настоящей работе (условно обозначены, как линия 2304, 2206, 2804, 14021 и 0404).

2.2. Получение и культивирование эМСК

Менструальную кровь, содержащую фрагменты эндометрия, получали от женщин, проходивших подготовку к экстракорпоральному оплодотворению в Международном центре репродуктивной медицины (г. Санкт-Петербург). Возраст женщин варьировал от 24 до- 40 лет. Забор крови проводили на 2 день менструального цикла. Кровь собирали аспиратором Ipas MVA plus с насадкой диаметром 4 мм, введенным в цервикальный канал до внутреннего зева. От каждого донора было отобрано в среднем по 1-2 мл менструальной крови. Полученный образец переносили в фосфатно-солевой буфер PBS (Sigma, США) с добавлениемцитрата натрия и 10% смеси антибиотика-антимикотика (смесь пенициллина, стрептомицина и амфотерицина) (Sigma , США). В этом растворе при 4ºС образцы транспортировали в лабораторию для дальнейшей работы. В лабораторных условиях кровь центрифугировали (1500 об/ мин), осадок, содержащий фрагменты эндометрия ресуспендировали в PBS с 10% антибиотика-антимикотика и инкубировали при 37°С в течение 1 часа, после чего снова центрифугировали (1500 об/ мин). Осажденные клетки переносили в 6-см чашки Петри (Corning, США) и культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS; HyClone, США), 1 % смеси антибиотика и антимикотика, 1 % глутамакса в течение 3−7 сут, периодически заменяя среду на свежую. Полученную популяцию адгезивных

клеток пересевали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и EDTA (Invitrogen, США). Плотность при пересеве составляла 14−15 тыс. клеток/см^2.

2.3.Оценка морфологии клеток

Оценка морфологии клетокпроводилась постоянно с использованием светового микроскопа Nikon Eclipse TS100 с объективами 4x, 20x и 40x.

2.4.Иммунофенотипирование

Для подтверждения мезенхимного происхождения культивируемых клеток проводили иммунофенотипический анализ на CD-маркеры. Суспензию единичных клеток получали с использованием 0.05%-ного трипсина и EDTA (Invitrogen, США). Клетки (1 млн/мл) ресуспендировали в растворе PBS, содержащем 5 % эмбриональной бычьей сыворотки. К суспензии клеток добавляли набор антител, конъюгированных с FITC (против CD34, CD44, CD45, CD90, CD 130) и меченных флуорофором фикоэретрином (PE) (CD 13, CD19, CD29, CD73, CD105, CD117, HLA-DR). Анализ проводили с использованием проточногоцитофлуориметра Epics XL (Beckman Coulter, США).

2.5.Активность пролиферации

Активность пролиферации оценивали с помощью кривых клеточного роста. Для их построения в 3-сантиметровые чашки Петри высевали по 100 тыс. клеток и культивировали в среде DMEM/F12 (см. выше). В течение 6 сут каждые 24 ч производили подсчет клеток в камере Горяева. Среднее время удвоения популяции рассчитывали по формуле: $Td = tlg2/lg(N_t/N_0)$, где Td – среднее время удвоения популяции, t – время прироста популяции, N_t – число клеток через время t, N_0 – исходное число клеток.

2.6.Анализ клеточного цикла

Клеточную суспензию пермеабилизовали раствором сапонина **(**250 мкг/мл**)** в течение 30 мин при комнатной температуре, затем добавляли РНКазу А (250 мкг/мл), йодистый пропидий (50 мкг/мл) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили, используя

цитофлуориметрEpics XL (Beckman Coulter, США). Доля клеток в разных фазах цикла определялась при помощи программного обеспечения WinList и ModFit LT.

2.7.Адипогенная дифференцировка

Для этого клетки ($2x10^4$ клеток/см^2) высевали на чашки Петри (Corning, США), покрытые 0.1%-ным желатином (Sigma, США). По достижении 80% конфлюэнтности ростовую среду DMEM/F12 заменяли на дифференцировочную – DMEM/F12, содержащую 10 % FBS, 1 % смеси антибиотика, глутамакса, 1мМ дексамитазона (Sigma, США), 0.5 мМ изобутилметилксантина (Sigma, США), 10 мкг/мл рекомбинантного инсулина человека (Sigma, США) и 100 мМ индометацина. В ней клетки культивировали в течение 6 суток с заменой половины среды на новую каждые 2 сутки, после чего вновь переводили на ростовую среду (на 2 суток), содержащую 10 мкг/мл инсулина для поддержания их жизнеспособности. Время дифференцировки клеток составляло 5 недель. После чего клетки фиксировали 10%-ным формальдегидом в течение 1 ч. Жировые капли окрашивали красителем Oil Red (Sigma, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Контрольные клетки культивировали в ростовой среде без добавления стимулирующих факторов.

2.8.Остеогенная дифференцировка

Клетки (2 × 104 клеток/см^2) высевали в чашки Петри(Corning, США), покрытые 0.1%-ным желатином. После образования монослоя (100 % конфлюентности) ростовую среду DMEM/F12 заменяли на дифференцировочную – DMEM/F12, содержащую 10 % FBS, 1 % смеси антибиотика, глутамакса, 100 нМ дексаметазона, 10 мМ бета-глицерофосфата, 0.2 мМ аскорбин-2-фосфата. Клетки дифференцировали 3−5 недель со сменой половины объема среды каждые 2−3 суток. Затем клетки фиксировали 70%-ным ледяным этанолом (1 ч) и окрашивали ализариновым красным (pH 4.1) (Sigma, США) в течение 30 мин. Контрольные клетки культивировали в ростовой среде без добавления стимулирующих факторов.

2.9.Децидуальная дифференцировка

На 2-3 пассажах клетки эМСК рассевали в 24-луночные планшеты(Corning, США)в среде DMEM/F12, содержащей 10% коровьей эмбриотнальной сыворотки, 1 % смеси антибиотика, 1 % глутамакса. После достижения клеточной культурой80% конфлюэнтности, клетки переводили на 24 часа на среду без сыворотки. Затем проводили замену среды на дифференцировочную, которая содержала 2% коровьей эмбриональной сыворотки и 1 мМ 8-Br-cAMP (Sigma, США), со сменой среды на свежую каждые 3-е сутки культивирования. Контрольные клетки культивировали таким эе образом, но без добавления 8-Br-cAMP. На 7-е сутки из контрольных и дифференцированных клеток отбирали среду для определения пролактина и IGFBP-1, содержание которых определяли с помощью готовых наборов для иммуноферментного анализа (ELISA), для определения пролактина (Abcam, США) и IGFBP-1 (Sigma, США). Определение общей концентрации белка в каждой исследуемой лунке проводили по методу Бредфорда. Концентрации пролактина и IGFBP-1, определенные методом иммуноферментативного анализа, соотносили с содержанием общего белка в каждой исследуемой лунке.

2.10.Иммунофлуорисцентный анализ

Клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали 4%-ным раствором формалина и проводили пермеабилизацию 0.2—0.5%-ным раствором Тритона X-100. Блокирование неспецифического связывания осуществляли с помощью 1%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина на PBS в течение 30 мин. В качестве первых антител использовали мышиные моноклональные антитела против бета-III-тубулина (в разведении 1:1000), Hsp70(1:1), Ki-67(1:500)и кроличьи поликлональные антитела против нестина (1:100), в качестве вторых антител – козьи антимышиные антиглобулины CY3 (1: 300), и козьи антикроличьи антитела, конъюгированные с CY2 (1:300). Ядра окрашивали раствором DAPI (1 мкг/мл, Merk, США). После окраски покровные стекла с клетками помещали в заключающую среду (Life Technologies, США). Анализ препаратов проводили

под микроскопом Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия) при увеличениях объектива 40х и 100х, фотографировали камерой Leica DFC 420C (Германия).

2.11.Криоконсервация и разморозка клеток

Криоконсервацию клеток проводили по стандартному протоколу: клетки открепляли от поверхности флаконов 0.05%-ным раствором трипсина с EDTA (Invitrogen, США), помещали в культуральную среду и центрифугировали. Супернатант удаляли, осевшие клетки ресуспензировали в растворе 90%-ной бычьей FBS, содержащей 10 % DMSO (Sigma, США), и переносили в криовиалы (Nunc, США). Материал подвергали глубокой заморозке со скоростью 1°С/мин и хранили в жидком азоте.

Разморозку клеток проводили по стандартному протоколу: ампулу с клетками быстро нагревали на водяной бане при 37°С, клетки отмывали от DMSO в теплой ростовой среде, клеточную суспензию центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспензировали, добавляли культуральную среду и переносили во флаконы для дальнейшего культивирования.

2.12.Сублетальное температурное воздействие

Для обработки эМСК сублетальным тепловым шоком, клетки (50 тыс на чашку) высевали на 3-см чашки Петри(Corning, США) и культивированли в 2 мл среды в течении 2 суток. Через 48 часов после посева проводили температурную обработку. Клетки прогревали в водяной бане при 45°С в течение 30 мин. После чего возвращали в нормальные условия культивирования (37°С).

2.13.Кариотипический анализ

Для получения препаратов метафазных хромосом клетки рассевали с плотностью 14—15 тыс. кл./см^2. Через 24 ч половину питательной культуральной среды заменяли на свежую, тем самым стимулируя их к делению. Через 23—25 ч для накопления клеток в стадии метафазы в культуральную среду вводили митостатик - колцемид (10 мг/мл; Sigma, США). Время действия колцемида подбирали экспериментально. Через

определенное время культуральную среду удаляли, клетки открепляли от пластика, суспензию центрифугировали, осадок ресуспензировали, проводили гипотоническую обработку 0.56%-ным раствором KCl *(*время подбирали экспериментально), после чего клетки фиксировали на холоде (-20 °C) смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1) (3 смены фиксатора, общее время фиксации 1.5 ч). Фиксированный материал раскапывали на охлажденные влажные предметные стекла. Препараты в течение 1 нед высушивали при комнатной температуре, после чего метафазные пластинки окрашивали на G-диски красителем Гимза (Fluka, США). Метафазные пластинки анализировали под световым микроскопом Axioscop (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива 20X и 100X. Хромосомы идентифицировали в соответствие с Атласом хромосом человека (Мамаева, 2002).

2.14.Молекулярное кариотипирование

Молекулярное кариотипирование осуществляли с использованием набора HumanCytoSNP-12 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) в соответствии с протоколом фирмы изготовителя. На 6-м и 14-м пассажах на 6-см чашку Петри(Corning, США) высевали по 300 тыс. эМСК. Через 72 часа их лизировали для выделения ДНК и отправляли в фирму «Геноаналитика». Подготовка ДНК для анализа, гибридизация, отмывки, окраска и сканирование препарата были выполнены в соответствии со стандартными протоколами Illumina Infinium_HD_Ultra. Образцы гибридизовали на олигонуклеотидных микрочипах высокой плотности, содержащих 300,000 изотермических зондов, охватывающих неповторяющиеся генные и межгенные области генома человека. Сканирование готовых проб проводили с помощью iScan (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США). Полученные результаты обрабатывали с помощью GenomeStudio Genotyping Module (Illumina) и BlueFuse (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США).

2.15. Транскриптомный анализ

Для проведения транскриптомного анализа клетки открепляли от пластика с помощью 0.05%-ного трипсина и EDTA, проводили несколько (2-3) отмывок раствором PBS, после чего отцентрифугированный осадок замораживали и транспортировали вфирму «Генотек».Размороженные клетки лизировали, из лизата выделяли мРНК и очищали ее, после чего создавали кДНК библиотеки. Двухконцевые фрагменты последовательностей РНК длиной 100 нт получали секвенированием (Next-Generation Sequencing, NGS) по технологии Illumina. Для их обработки использовали программное обеспечение Trimmomatic. Затем фрагменты были соотнесены с каноническим неизбыточным транскриптомом человека, представленном в базе данных RefSeq с использованием программного обеспечения Bowtie 2.

Нормализация данных проводилась методом, представленным в пакете LIMMA ("quantile"). Категории генов были взяты из базы данных GeneOntology (GeneOntologyConsortium 2015). В качестве источника молекулярных путей была выбрана база NCBI BioSystems. Имеющаяся в NCBI BioSystems избыточность категорий (полученных из разных баз) была удалена путем объединения категорий с одинаковыми наборами генов. Белок-белковые взаимодействия были взяты из базы данных STRING.

2.16.Выявление активности SA-β-gal

Оценку клеточного старения проводили по выявлению активности фермента SA-β-Gal. Клетки (по 100 тыс.) высевали на 3-сантиметровые чашки Петри (Corning, США)и культивировали в стандартных условиях. По достижении 50% конфюэнтности клетки промывали раствором PBS и фиксировали 4%-ным раствором формальдегида. Окраску проводили с помощью специального набора реактивов «Senescence-galactosidase staining kit» (Cell Signaling, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Активность SA-β-Gal оценивали визуально под световым микроскопом по появлению синих гранул в цитоплазме клеток.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1.Характеристика линий эМСК, полученных от здоровых доноров

Для исследования физиологического и генетического поведения эМСК в условиях invitro были проанализированы эМСК 4-х линий, полученные из десквамированного эндометрия менструальной кровиздоровых доноров. Из каждого биологического образца было выделено по одной линии эМСК. Полученные нами клеточные линии условно обозначены 2304, 2206, 2804, 14021.

3.1.1.Морфологическая характеристика линий эМСК на ранних этапах культивирования

Одной из особенностей, характерных для мезенхимных стволовых клеток, является их адгезивность к пластику. При переносе образца менструальной крови на чашку Петрис ростовой средой, отдельные клетки или их скопления прикреплялись к поверхности чашки и начинали пролиферировать. На Рис.9а стрелкой указан фрагмент эндометриальной ткани, из которого начинают «выползать» эМСК. В процессе дальнейшего культивирования эти клетки приобретали типичную фибробластоподобную морфологию. Они активно пролиферировали in vitro и образовывали монослой. На Рис.9б представлена культура эМСК на 5-ом пассаже культивирования. Видны фибробластоподобные эМСК, образующие характерные круговые завихрения. Морфологическианализируемые эМСК разных линий между собой не отличались.

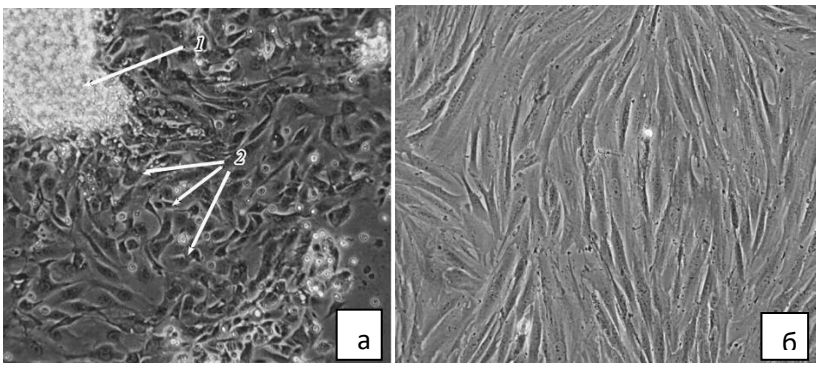
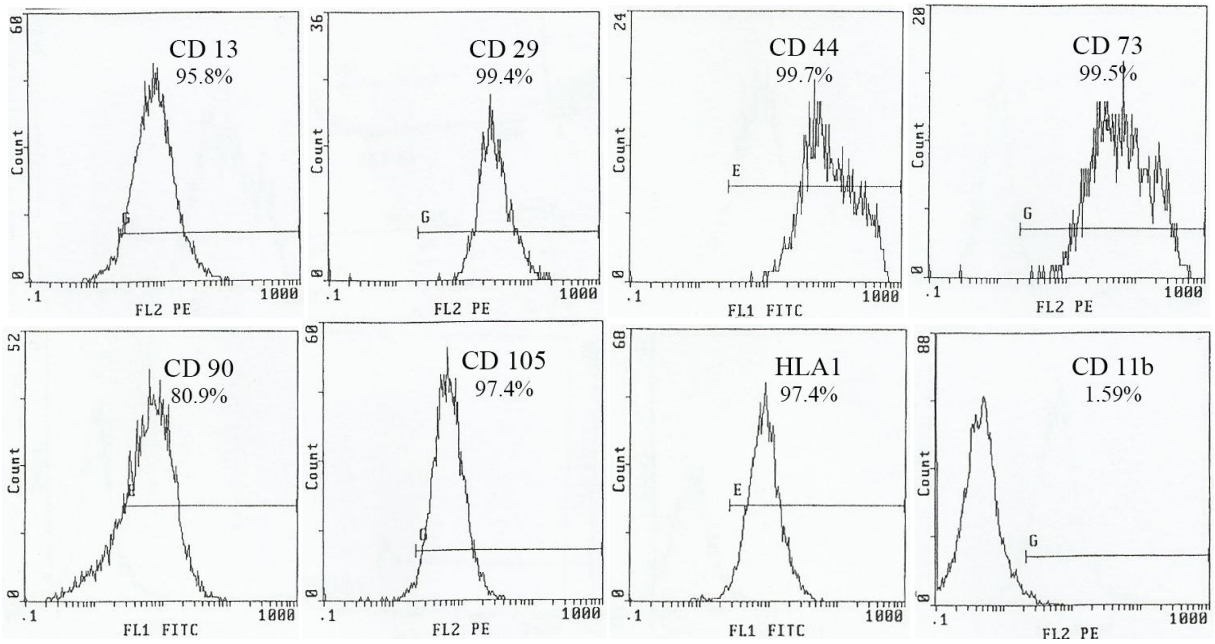


Рис.9. эМСК линии 2804: *а - 5-й день после введения клеток в систему invitro, 1 – фрагмент эндометриальной ткани; 2 – клетки, выползающие из фрагмента*

эндометриальной ткани.б - 5-й пассаж после введения клеток в культуру, монослой эМСК фибробластоподобной морфологии.

3.1.2.Фенотипирование анализируемых эМСК

Цитометрическое фенотипирование показало, что клетки проанализированных линий экспрессировали поверхностные маркеры мезенхимного ряда, а именно CD13, CD 29, CD44, CD73, CD 90 и CD 105 и не экспрессировали гемопоэтические маркеры: CD 11b, CD34, CD 45, CD 117,CD 130 и HLA-DR класса 2 (Рис.10). Профиль экспрессии фенотипических маркеров между линиями был идентичен, что свидетельствуют о том, что анализируемые клеточные линии имеют мезенхимное происхождение.



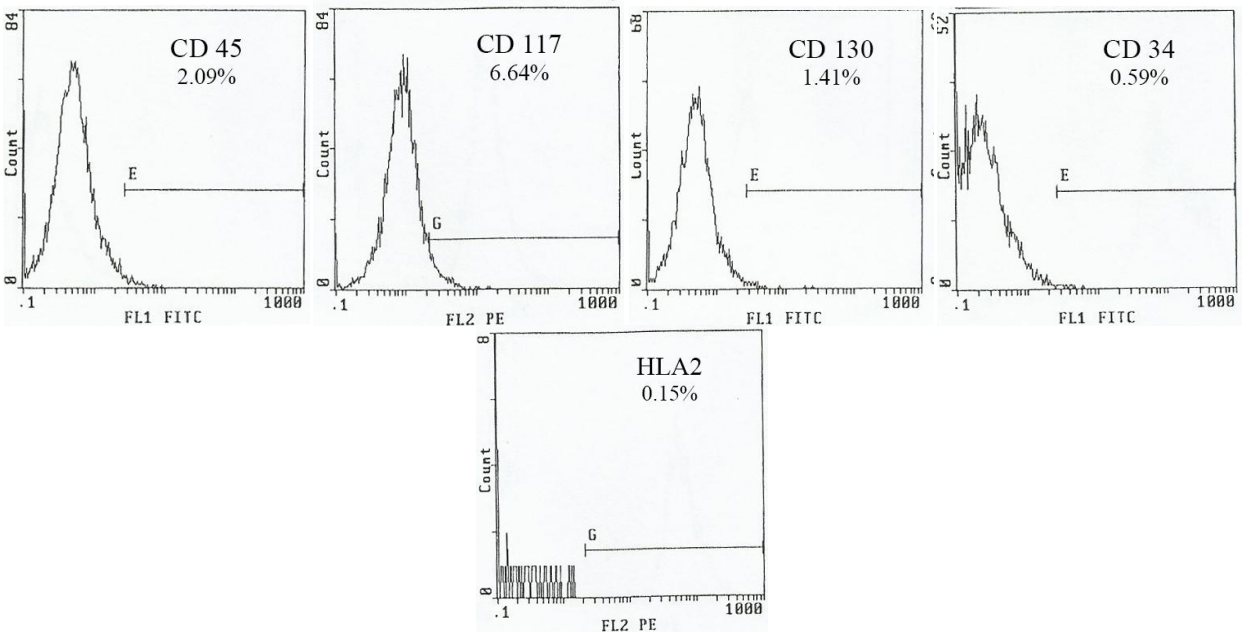


Рис.10. Уровень экспрессии (в %) поверхностных маркеров эМСК. Проточная цитофлуориметрия (на примере линии 2804, пассаж3)

По оси абцисс − интенсивность флуоресценции; *по оси ординат* − число клеток.

3.1.3.Оценка пролиферативной активности эМСК in vitro

В Табл. 1 приведены данные по характеристике времени удвоения популяций, которое в разных линиях варьировало в близких пределах от 23 до 25 ч.Для сравнения, время удвоения клеток костного мозга даже на ранних пассажах составляет около 60 ч (Rosland et al., 2009).

Таблица 1. Оценка пролиферативной активности эМСК на раннем пассаже

Линия/пассаж	**Время удвоения популяции,часы**
2304/p5	**23,5**
2206/p4	**24**
2804/p6	**24,5**
14021/p3	**23**

3.1.4. Мультипотентный статус анализируемых эМСК

Дифференцировка в адипогенном и остеогенном направлении

Была проведена направленная дифференцировка эМСК анализируемых линий в адипоциты (Рис.11) и остеобласты (Рис.12). Все клеточные культуры характеризовались специфическими гистологическими признаками, характерными для клеток данных типов. Так, для адипоцитов это накопление жировых вакуолей в цитоплазме, для остеобластов – наличие кальциевых отложений. В полученныхадипоцитах окрашенные Oil Red жировые капли располагаются в перинуклеарном пространстве цитоплазмы (Рис.11). Это гистологически отличает адипоциты, дифференцированные из эМСК менструальной крови, от адипоцитов, полученных из МСК жировой ткани и костного мозга, где жировые вакуоли распределены по цитоплазме равномерно (Musina et al., 2006).

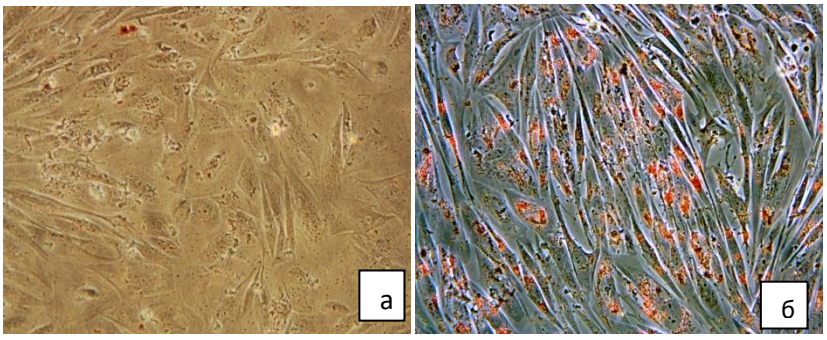


Рис.11. Направленная дифференцировка эМСК линии 2304 в адипогенном направлении:*а –контрольные, недифференцированные клетки; б – адипоциты, жировые вакуоли окрашены красителем Oil Red.*

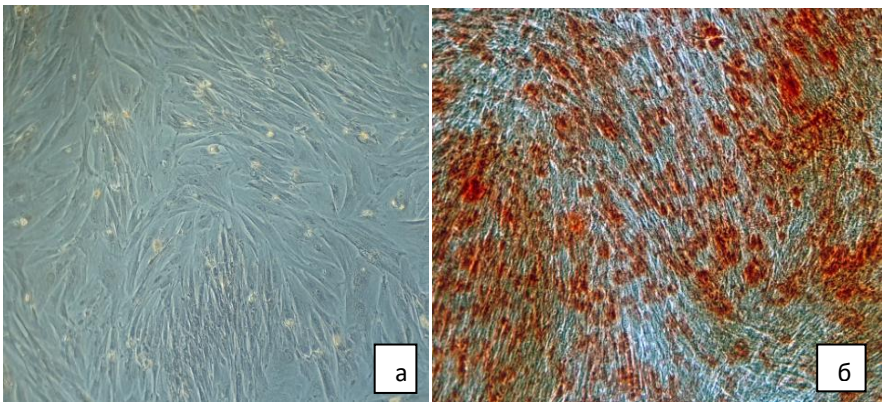


Рис.12. Направленная дифференцировка эМСК линии 2304в остеогенном направлении: *а –контрольные, недифференцированные клетки; б – остеобласты, отложения кальция окрашены красителем ализариновым красным.*

Дифференцировка в децидуальном направлении.

В процессе децидуальной дифференцировки под влиянием 1мМ 8-Br-cAMP, фибробластоподобная морфология клеток изменялась. Клетки приобретали полигональную форму, ядро укрупнялось, что характерно для децидуальных клеток. На Рис.13 представлены клетки в культуре после воздействия 8-Br-cAMP. Основными маркерами, характеризующими децидуальные клетки, является секреция пролактина. Результаты секреции пролактина и IGFBP-1 в контрольных и индуцированных к дифференцировке эМСК показаны на Рис.13. Видно, что контрольные клетки имеют низкий уровень секреции (Рис 14). На 7-е сутки культивирования в среде, содержащей 8-Br-cAMP, уровень пролактина резко возрастал. Сходные результаты были получены при измерении секреции IGFBP-1. У контрольных эМСК уровень IGFBP-1 низкий. Через 7 суток культивирования в присутствии 8-Br-cAMP его уровень значительно увеличился.

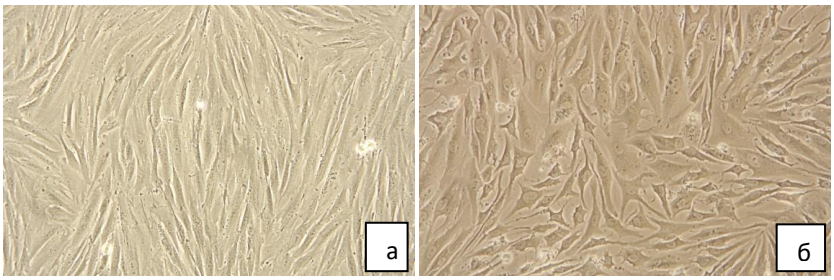


Рис.13. Изменение морфологии эМСК, дифференцированных в децидуальном направлении: *а – контрольные, недифференцированные клетки, б – дифференцированные клетки.*

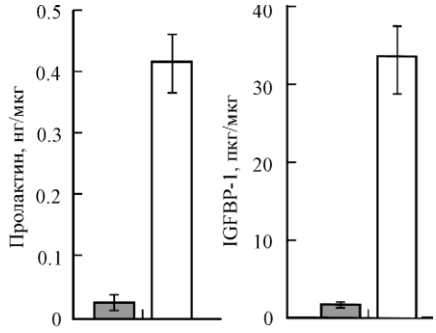


Рис.14. Секреция пролактина и IGFBP-1 в эМСК линии 2304 при дифференцировке в децидуальном направлении. Серые столбцы – контрольные клетки, белые столбцы – дифференцированные клетки.

Анализ экспрессии маркеров нейрональных предшественников

Анализ экспрессии маркеров нейрональных предшественников в анализируемых эМСК показал, что клетки экспрессировали нестин (Рис.15 а) и бета-III-тубулин (Рис 15 б), что свидетельствует об их предрасположенности к дифференцировке в нейрональные клетки.

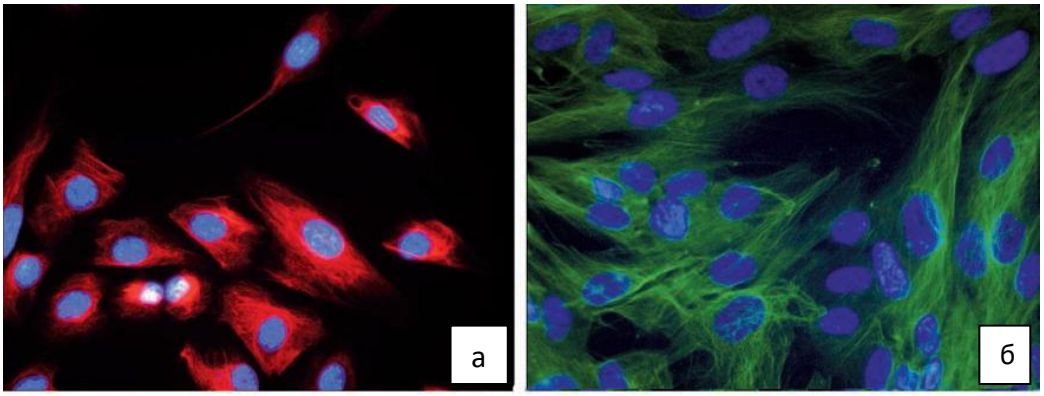


Рис.15.Экспрессия маркеров нейрональных предшественников: *а- нестин, б- бета-III-тубулин. эМСК линии 2804.*

Сравнительный анализ всех вышеперечисленных физиологических характеристик клеток различий между анализируемыми линиями не выявил.

Было показано, что все проанализированные эМСК адгезивны к пластику, экспрессируют поверхностные маркеры, характерные для мезенхимных стволовых клеток, дифференцируются в адипогенном, остеогенном направлении, что соответствует основным критериям фенотипирования МСК Международного общества клеточной терапии. Также была показана дифференцировка в тканеспецифическом направлении, а именно в децидуальные клетки.

3.1.5.Кариотипический анализ окрашенных на G-диски хромосом

Кариотипирование клеток линий эМСК с применением дифференциальной окраски метафазных хромосом на G-диски проводилось на нескольких этапах культивирования - ранних (3-6 пассаж), средних (13-15 пассаж) и поздних (22 пассаж).

Анализ на ранних этапах культивирования

Кариотипический анализ, проведенный на раннем этапе культивирования, в 4 линиях выявил как клетки, имеющие набор хромосом, типичный для человека в норме (Рис.16), так и клеточные варианты, которые характеризовались наличием атипичного кариотипа. Выявленные изменения были связаны с наличием моно и/или трисомии тех или иных хромосом набора (Рис.17, Рис.18), и как следствие, с вариабельностью числа хромосом в клетках, с наличием изохромосом, хромосом с поломками (Рис. 18, Рис.19), неспецифическими слипаниями негомологичных хромосом (эктопические коньюгации) (Рис.17). Частота встречаемости клеток с отклонениями и количество вовлеченных в перестройки хромосом между линиями отличались. В линии 2304 клетки с отклонениями составляли 18% от общей популяции клеток. Все перестройки носили случайный характер. Сходная картина наблюдалась и в популяции клеток линии 14021, но процент клеток с отклонениями был больше – 35% и неоднократно были обнаружены поломки хромосомы 1. В линиях 2206 и 2804 процент клеток с кариотипическими отклонениями

составил 40 и 45%, соответственно. Отклонения носили как случайный, так и закономерный характер.

В эМСК линии 2206 структурные изменения включали в себя толькохромосомные поломки. Несмотря на высокую частоту встречаемости клеток с атипичным кариотипом, сами изменения были случайными, исключением может быть только поломка по второй хромосоме, обнаруженная на 3 метафазных пластинках.

Клетки линии 2804 характеризовались неслучайными поломками хромосомного материала хромосом 1 и 7.

Линии различались по количеству перестроек, приходящихся на один кариотип. Для линии 2304 на один кариотип с отклонениями приходится от 1 до 3 перестроек (измененных хромосом), для линии 2206 – от 2 до 6, для линии 2804 – 3-5 перестроек на один измененный кариотип, для 14021 – от 2 до 6.

Сравнительный анализ кариотипических характеристик всех исследуемых линий показал, что на первых этапах культивирования (3-6 пассажи) они различаются по степенистабильности. В линиях 2304 и 14021 на ранних этапах культивирования выявлялисьредкие отклонения от нормы, которые носили случайный характер. В линиях 2206 и 2804 количество клеток с перестройками и количество вовлеченных в отклонения хромосом было больше.

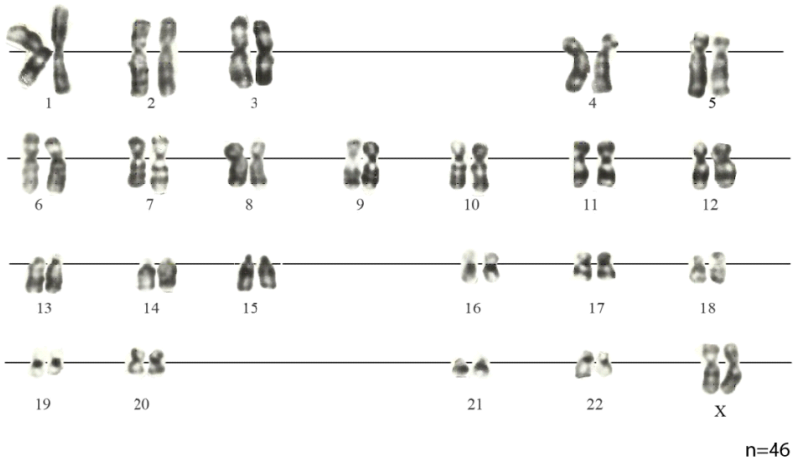


Рис.16. Нормальный кариотип эМСК человека. Линия 2304.

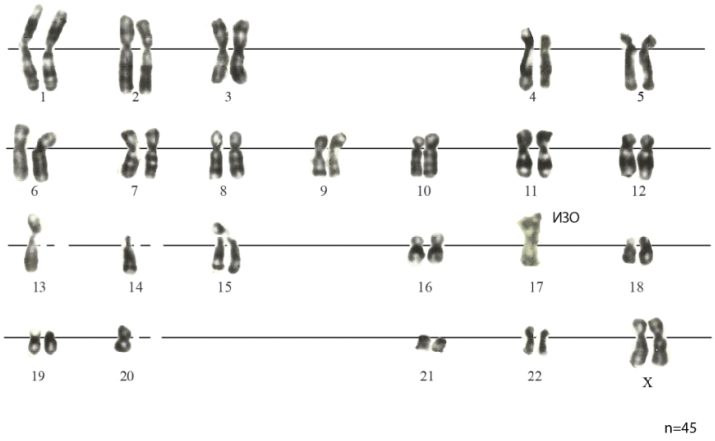


Рис.17. Кариотип эМСК линии 2304 на раннем этапе культивирования: эктопическая конъюгация между хромосомами 13/22, 15/21, изохромосома 17.

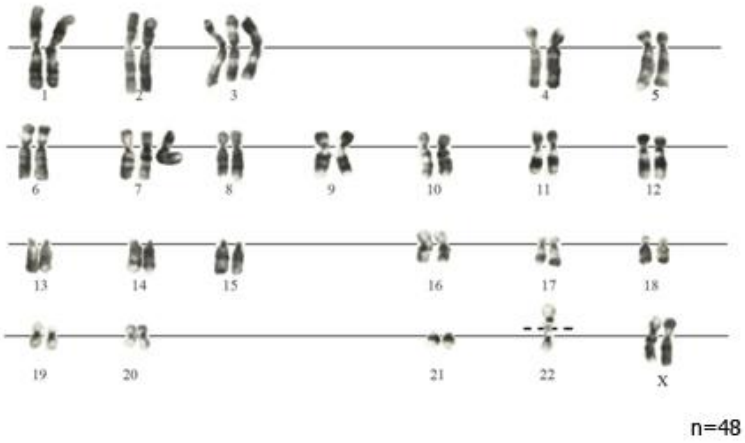


Рис. 18. Кариотип эМСК линии 2304 на раннем этапе культивирования: трисомия хромосомы 3, 7; изохромосома 22.

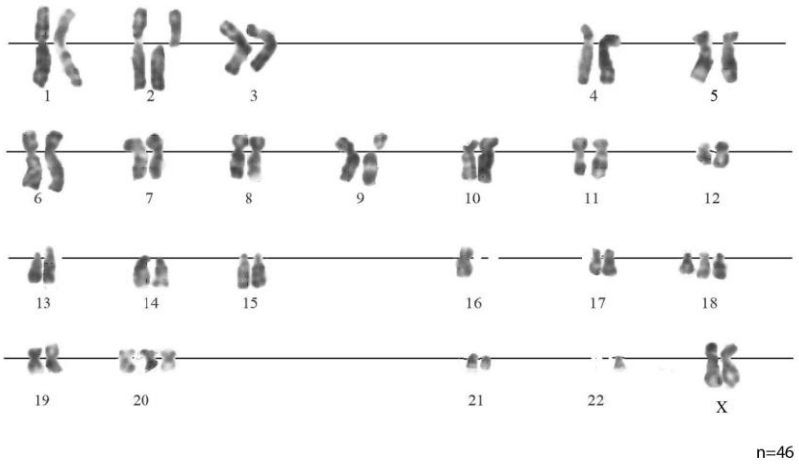


Рис. 19. Кариотип эМСК линии 2206 на раннем этапе культивирования: прицентромерная поломка хромосомы 2 и 9, моносомия хромосомы 16, 22, трисомия хромосомы 18, 20.

Кариотипирование на промежуточных этапах культивирования

Кариотипический анализ на промежуточных этапах культивирования (13-16 пассажи) был проведен для трех линий – 2304 (15-й пассаж), 2206 (13-й пассаж), и 14021 (14-й пассаж). Типы кариотипических изменений по сравнению с ранним этапом культивирования остались теми же. Сравнительный анализ между линиями на среднем этапе культивирования выявил значительные различия между линиями. В процессе культивирования в линии 2304 отобрались клеточные варианты с преимущественно нормальным кариотипом (90% клеточной популяции). Характер изменений в линии 2206 отличался от 2-х других линий. В клетках линии 2206 кариотипическая нестабильность осталась на прежнем уровне. Однако, в процесс дестабилизации были вовлечены другие хромосомы, а именно 3, 12, 16 и X. Этот факт подтверждает, что изменения, произошедшие на ранних этапах культивирования, нивелировались отбором. Количество вовлекаемых в перестройки хромосом на кариотип осталось прежним– от 2 до 6.

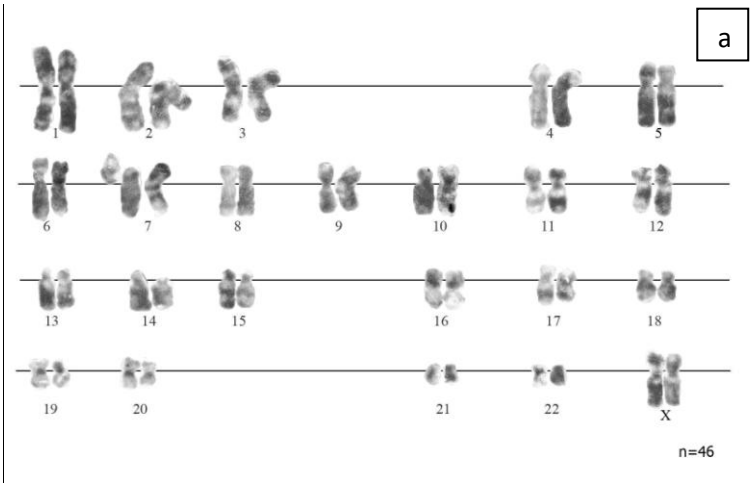
В линии 14021 наоборот, наблюдалась большая кариотипическая нестабильность по сравнению с более стабильным кариотипом на раннем этапе культивирования (67% кариотипов с отклонениями). Неоднократно в поломки вовлекались хромосомы № 3, 6, 10

и X. Анеуплоидия преимущественно была представлена моносомией или вообще отсутствием 2-х гомологов. Моносомия хромосом 10-13 и 17 встретилась неоднократно. Количество перестроек на кариотип увеличилось, на средних этапах культивирвания на кариотип прошлось от 5 до 10 перестроенных хромосом.

Кариотипирование на поздних этапах культивирования

На позднем 22-м пассаже был проведен кариотипический анализ для линии 2804. Характер изменений по сравнению с ранними этапами культивирования остался прежним. Кариотипический анализ G-бандированных хромосом в 40% проанализированных пластинок выявил хромосомные поломки. Чаще всего поломки затрагивали 2, 5, 10 и X хромосомы. Неоднократноанеуплоидия была выявлена по хромосомам 11, 12 –моносомия, 14 – трисомия. Количество перестроенных хромосом, приходящихся на кариотип с отклонениями, по сравнению с ранними пассажами увеличилось и составило от 5 до 10 хромосом на клетку (Рис.20).

Сравнение кариотипических данных для эМСК линии 2804 на раннем (пассаж 3) и позднем (пассаж 22) пассажах позволяет заключить, что количество клеток с кариотипической нестабильностью на всем протяжении культивирования осталось прежним, но количество вовлекаемых в перестройки хромосом увеличилось. Важно отметить, что закономерностей вовлечения конкретных хромосом в перестройки по мере культивирования выявлено не было.



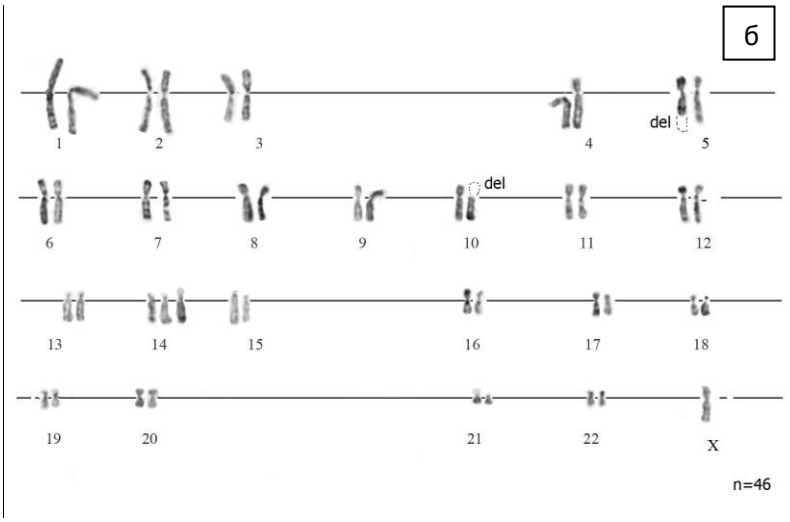


Рис. 20. Кариотип эМСК линии 2804:

а – пассаж 5, прицентромерная поломка хромосомы 7.

б – пассаж 22, дистальная поломка хромосомы 5, прицентромерная поломка хромосомы 10 с делецией p-плеча, моносомия хромосомы X, трисомия хромосомы 14.

3.1.6.Молекулярное кариотипирование анализируемых линий

Линия 2304. Молекулярное кариотипирование эМСК, проведенное на 6-м и 14-м пассажах, показало, что 22 пары хромосом, по своей генетической структуре в 100% проанализированной популяции не отличались от аналогичных хромосом кариотипического набора человека в норме. Одна пара хромосом – 7, характеризовались наличием микродупликации, которая была локализованы в локусе 7q36.3 в 62,680 пн (62 кб) и маркировала данные клетки (Рис.21). Также методом молекулярногокариотипирования была выявлена потеря гетерозиготности по 7 хромосоме в локусе 7q36.3.

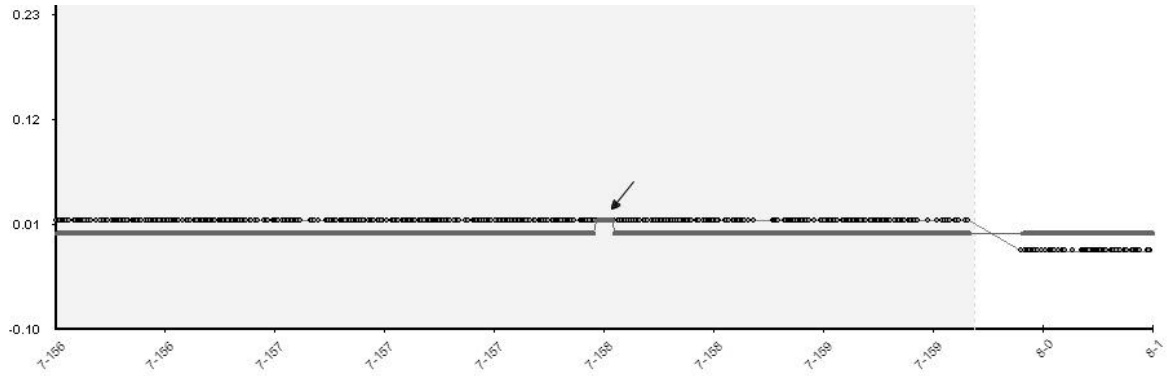


Рис. 21. Результаты молекулярного кариотипирования.

По оси абсцисс – обозначение длины 7-й хромосомы в геноме; *по оси ординат* – логарифм величины сигнала, отн. ед. *Стрелка* показывает дупликацию в 7-й хромосоме локуса 7q36.3 размером 62680 п.н. (62 кб). *Точки* -- отклонения от нормы по каждому из SNP (Single nucleotide polymorphism) только по интенсивности сигнала, *сплошная линия* -- отклонение группы SNP от нормы при комбинировании интенсивности сигнала и генотипа.

Линия 14021. Молекулярное кариотипирование эМСК, проведенное на 6-м и 14-ом пассаже, выявило микродупликации по 17 хромосоме и потерю гетерозиготности по 8 хромосоме.

Линия 2804.Анализ клеток на 6-м пассаже выявил наличие микродупликаций в 6 и 10 хромосомах и потерю гетерозиготности по 3-й хромосоме.

Клетки линии 2206 на 6-м пассаже характеризовались микродупликацией по 17-ой хромосоме и потерей гетрозиготности по хромсомам 5,9,19.(Табл. 2)

Таблица 2. Результаты молекулярного кариотипирования

эМСК линии, пассаж	Хромосомы, задействованные в перестройках
2304/ p6,p14	7
14021/ p6	17, 8
2804/ p6	6,10, 3
2206/ p6	17, 5,9,19

Сопоставление данных морфологического кариотипирования эМСК и молекулярного кариотипирования позволило говорить о том, что полученные в настоящей работе данные представляют характеристику кариотипа клеток на разных уровнях организации генома, и один метод дополняет другой. Как показал анализ G-окрашенных хромосом, эМСК разных линий различаются по степени кариотипического шума. Отклонения от нормы, выявляемые методом молекулярного кариотипирования, не были обнаружены методом кариотипирования G-бандированных хромосом, так как дупликации слишком малы, чтобы быть выявленными при разрешении светового микроскопа, а потеря гетерозиготности морфологическими методами не выявляется.

Вместе с тем не обнаружение таких отклонений, как хромосомные поломки, методом молекулярного кариотипирования может быть объяснено, тем, что поломки выявлялись в разных локусах хромосом, при этом нередко наблюдалось сохранение генетического материала, в этом случае выявить подобное отклонение методом молекулярного кариотипирования методически невозможно.

Трисомии и моносомии не были подтверждены методом молекулярного кариотипирования. Этот факт может быть обусловлен несколькими причинами. В случае когда по конкретным хромосомам одновременно наблюдалась и моносомия, и трисомия, для молекулярного кариотипирования они компенсировали друг друга, так как анализ проводится на популяционном уровне. В случае, когда моносомия или трисомия не компенсировали друг друга, они наблюдались в проценте, меньшем пороговой чувствительности метода молекулярного кариотипирования.

3.1.7.Оценка старения клеточных культур, анализируемых эМСК

Согласно литературным данным число удвоений для эМСК колеблется от 25−30 (Hida et al., 2008) до 68 в отдельных случаях (Meng et al., 2007).

В нашей работе высокая эффективность клонирования эМСК (около 60 %) также свидетельствует о высоком пролиферативном потенциале данных клеток. По мере

культивирования пролиферативная активность клеток постепенно снижалась (Рис.23, Рис.24), морфология клеток изменялась (Рис.22). На поздних пассажах (пассаж 23 - 28) клетки увеличивались в размерах и переставали образовывать монослой. Эти морфологические признаки характерны для клеточного старения.

Для идентификации клеточного старения использовали окраску на ассоциированную со старением SA-β-галактозидазу. По мере культивирования число SA-β-галактозидаза - позитивных клеток постепенно увеличивалось (Рис. 22) и к 28-ом пассажу достигает 100 %. В общей сложности все полученные нами линии прошли около 35—40 удвоений клеточной популяции, что составляет 24-29 пассажей, после чего клетки необратимо утрачивали способность делиться, и культура постепенно погибла.

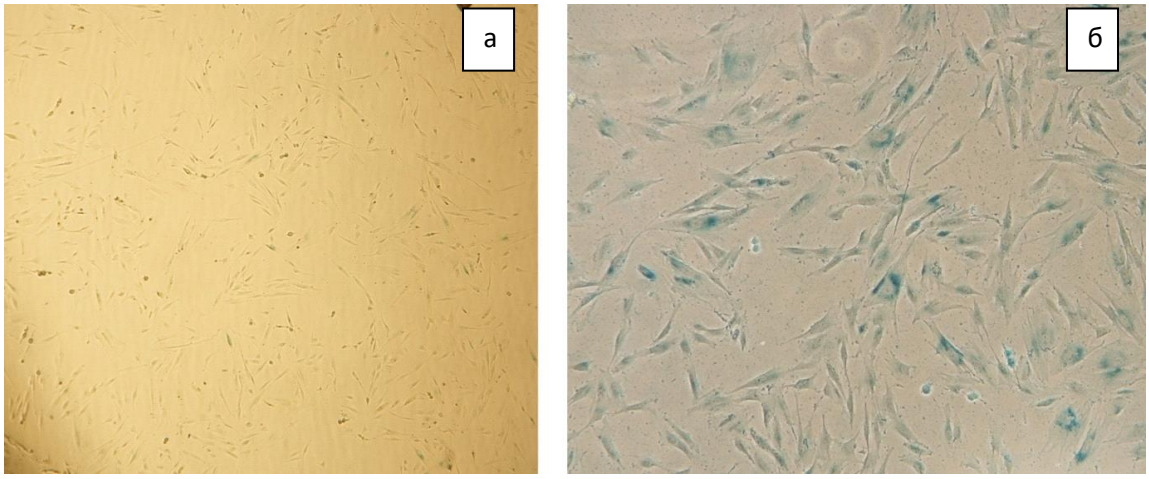


Рис. 22. Экспрессия sa-β- галактозидазы в эМСК линии 2804: *а- 7-й пассаж; б- 26-й пассаж.*

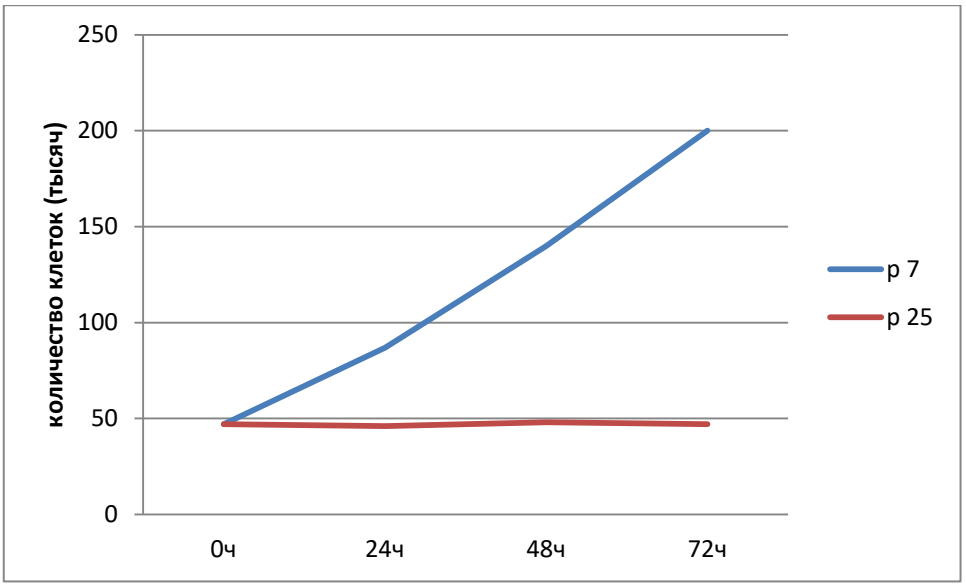


Рис. 23. Кривые клеточного роста эМСК линии 2304.

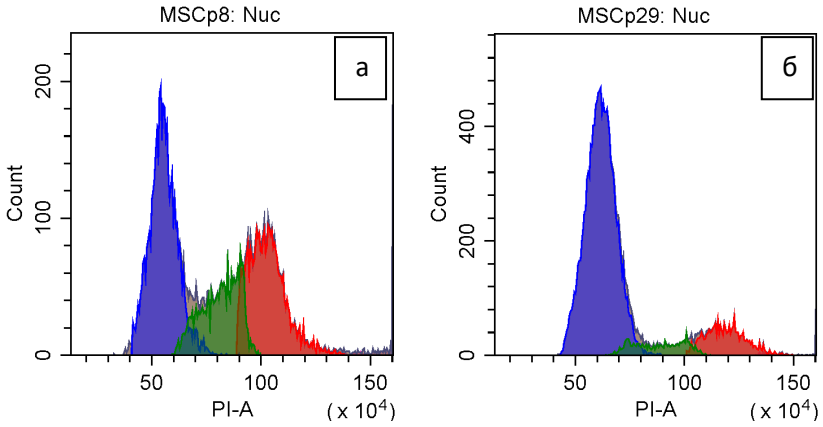


Рис. 24 Клеточный цикл эМСК линии 2304:*а – на 8-м пассаже; б - на 29 –м пассаже*.

Установлено, что, несмотря на то, что пролиферативная активность эМСК по мере культивирования снижалась, клетки сохраняли экспрессию характерных для эМСК поверхностных маркеров. Профиль экспрессии маркеров не менялся даже на поздних пассажах (20-26 пассажи). Они по-прежнему были позитивны по маркерам МСК CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и негативны по гематопоэтическим маркерам CD34 и HLA-DR (класс II).

Полученные в настоящей работе данные о том, что все 4 проанализированные линии эМСК к 26-30-ому пассажу переставали делиться и входили в фазу репликативного

старения, позволяет сделать вывод, что обнаруженные нами кариотипические изменения не приводят к их иммортализации и трансформации в условиях in vitro.

В результате можно заключить, что физиологических различий между клетками анализируемых линий выявлено не было. При этом все проанализированные линии характеризовались различным уровнем генетического шума. Из 4-х проанализированных линий только одна имела стабильный кариотип, но частота встречаемости случайных отклонений по мере культивирования уменьшилась. Остальные клеточные линии характеризовались значительным уровнем кариотипического шума, судьба которого с пассированием для каждой линии была индивидуальна. То, что все 4 проанализированные линии эМСК к 26-30-ому пассажу переставали делиться и входили в фазу репликативного старения, позволяет сделать вывод, что обнаруженные нами кариотипические изменения не приводят к их иммортализации и трансформации в условиях invitro.

Однако, несмотря на отсутствие иммортализации и клеточной трансформации подобные различия между эМСК разных клеточных линий ставят вопрос о тщательном предварительном анализе клеток, с использованием нескольких методов генетического анализа, для выбора наиболее стабильной культуры для использования в целях клеточной терапии.

3.2. Характеристика эМСК, полученных от доноров больных аденомиозом.

Для ответа на вопрос, насколько состояние здоровья донора влияет на эМСК в культуре, имеются ли физиологические или генетические различия между эМСК, полученных от здоровых доноров и доноров с заболеваниями, и подвергаются ли эМСК от больных доноров спонтанной трансформации in vitro были исследованы эМСК, полученные от донора с аденомиозом. Аденомиоз – одна из форм эндометриоза, распространенного заболевания женской репродуктивной системы, которое может приводить к бесплодию у женщин (Matalliotakis et al., 2003; Missmer, Cramer 2003.; de Hondt et al., 2005; Hompes, et al., 2007; Kepkep et al., 2007; De Maheshwar et al., 2012).

Была изучена линия эМСК, названная 0404, полученная из десквамированного эндометрия менструальной крови донора с заболеванием аденомиозом.

3.2.1.Сравнительный анализ физиологических параметров эМСК от донора с аденомиозом и здорового донора.

По своим физиологическим параметрам эМСК от донора с аденомиозом была очень сходна с клетками от здоровых доноров. Клетки имеют фибробластоподобную морфологию, профиль экспрессии поверхностных маркеров, типичный для мезенхимных клеток. С помощью метода направленной дифференцировки в адипогенном и остеогенном направлении был подтвержден их мультипотентный статус. Линия 0404 активно пролиферировала до 19 пассажа и вошла в фазу репликативного старения только к 30-омупассажу. Идентификацию клеточного старения проводили по морфологическим изменениямснижению клеточной пролиферации и определению активности фермента SA-β-gal. По мере культивирования количество клеток с синими гранулами в цитоплазме (SA-β-gal-позитивных) увеличивалось и к 30 пассажу достигало 100 %.

3.2.2.Оценка генетической стабильности эМСК от доноров с аденомиозом в сравнении с эМСК от здоровых доноров

Кариотипический анализ окрашенных на G-диски хромосом

Кариотипический анализ метафазных хромосом клеток линии от донора с аденомиозом выявил хромосомные отклонения в анализируемых клетках. Характер отклонений был таким же, как и у клеток от здоровых доноров – анеуплоидизация, хромосомные поломки, транслокации. Однако, количество клеток с отклонениями от нормального кариотипа было значительно больше, чем в контрольных клетках, и составляло 93 % популяции. Здесь также обнаружены как случайные изменения, так и неслучайные (встреченные в популяции неоднократно). Для линии 0404 изменение числа копий неоднократно наблюдали в определенных хромосомах набора: трисомию – в хромосомах 1, 3, 6, 7 и 21;

моносомию – в хромосомах 5, 11, 15, 16 и 17, неслучайные поломки затрагивали материал хромосом 7 и 11 (Рис.25).

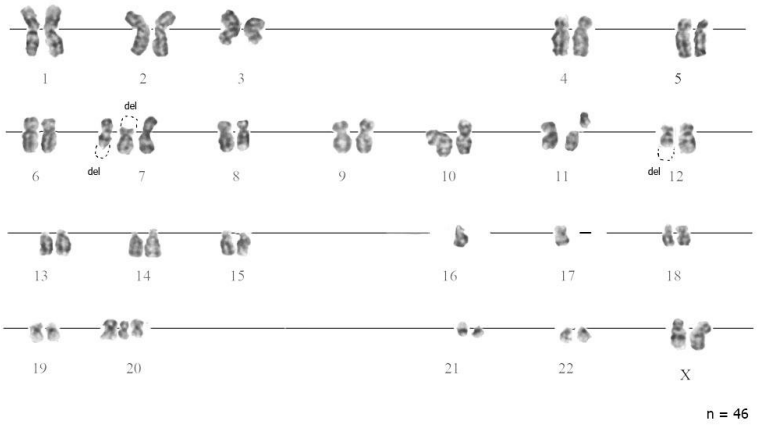


Рис. 25. Кариотип эМСК линии 0404, от донора с аденомиозом. Прицентромерные поломки хромосом 7, 11, дистальная поломка хромосомы 12, моносомия хромосомы 16, 17, трисомия хромосомы 7, 20.

Молекулярное кариотипирование клеток линии 0404, проведенное на 6-м пассаже культивирования, никаких отклонений от нормы на молекулярном уровне не выявило (Рис.26).

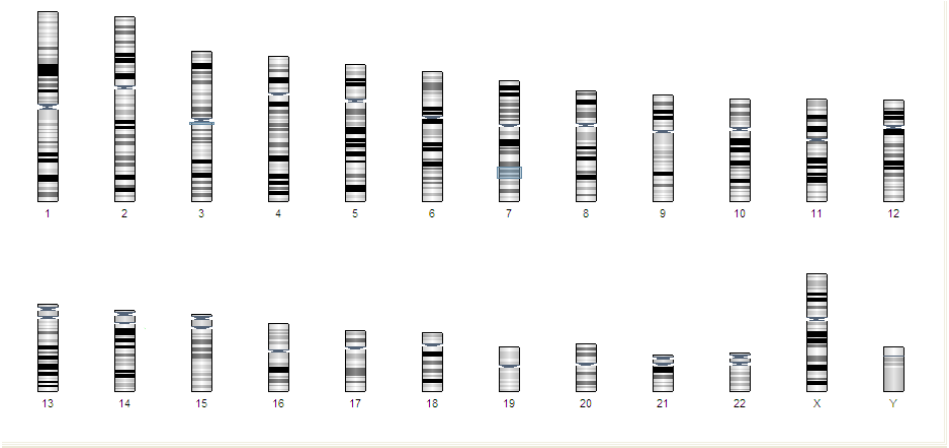


Рис. 26. Молекулярное кариотипирование линии 0404 на 6-м пассаже. Отсутствие отклонений от нормы.

Сравнительный анализ результатов кариотипирования G-бандированных хромосом и молекулярного кариотипирования показал, что, хотя клетки от донора с аденомиозом

характеризуются значительной кариотипической нестабильностью, перестроек кариотипа с возникновением новых маркерных хромосом не произошло.

3.2.3.Оценка старения эМСК от донора с аденомиозом

эМСК линии 0404 активно пролиферировали до 19 пассажа, после чего клетки вошли в фазу репликативного старения, скорость пролиферации постепенно снижалась (Рис.27), а процент клеток, позитивных по экспрессии sa-β- Галактозидазы, увеличивался (Рис.28). К 30-ому пассажу клетки перестали делиться.

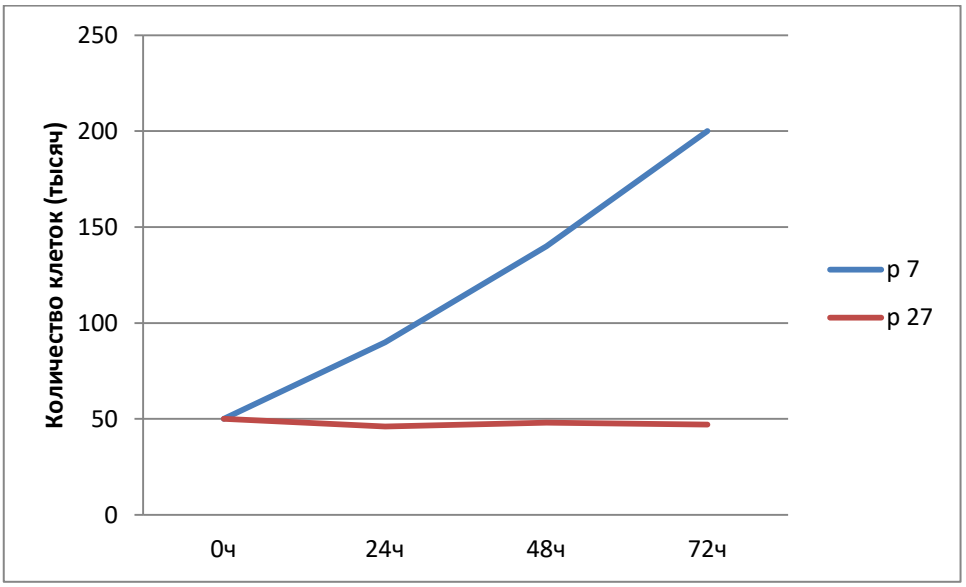


Рис. 27. Кривые клеточного роста эМСК линии 0404.

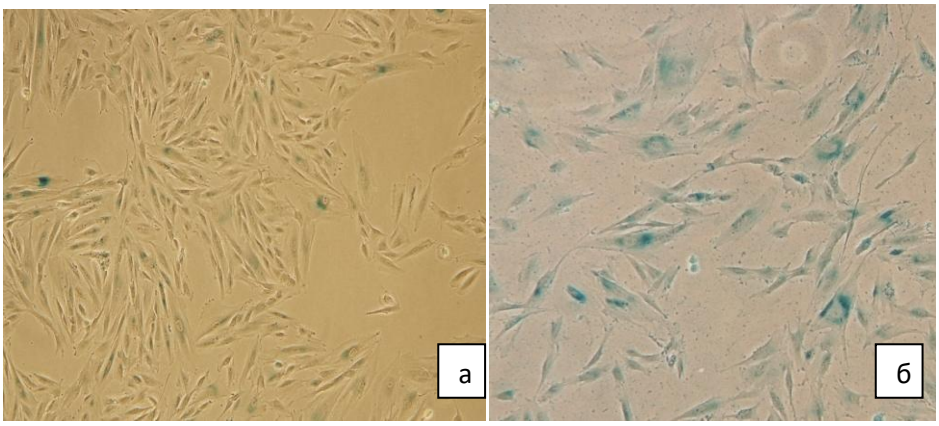


Рис. 28. Экспрессия SA-β- Галактозидазы в эМСК линии 0404*: а – на 9 пассаже; б - на 30-м пассаже.*

В результате можно заключить, что несмотря на то, что анализируемые эМСК от донора с аденомиозом имеют явные признаки дестабилизации генома, остановка

пролиферации этих клеток к 26-ому пассажу и начало фазы их репликативного старения позволили говорить о том, что обнаруженные кариотипические изменения не приводят к иммортализации и трансформации анализируемых клеток в условиях in vitro.

3.3. Исследование клеточного ответа на сублетальное температурное воздействие и характеристика клеток, переживших термостресс

Для исследования влияния экзогенного стрессового фактора, в качестве которого было выбрано сублетальное температурное воздействие, на эМСК в условиях in vitro был проведен ряд экспериментов, в ходе которых эМСК линии 2304 подвергали сублетальному температурному воздействию (30 мин, 45С), после чего клетки возвращали в нормальные условия культивирования (37С). Анализировались клетки сразу после температурной обработки и потомки клеток, выживших после сублетального температурного шока (через 6 пассажей после температурного воздействия) (Рис. 29).

Рис.29. Схема построения опыта для исследования клеточного ответа на сублетальное температурное воздействие и характеристики клеток, переживших термостресс.

3.3.1.Стресс индуцированное преждевременное старение эМСК после сублетального теплового шока

Анализируя реакцию эМСК на сублетальное температурное воздействие было обнаружено, что в течение 72 часов после сублетального ТШ количество клеток оставалось неизменным, в то время как число клеток в непрогретой культуре за этот период увеличивалось в 3 раза (Рис.30). С помощью анализа клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии было выявлено, что популяция клеток после ТШ имеет 2 блока - G2/M и G0G1. Большая часть клеток преимущественно останавливалась в G2/M блоке (Рис.31). Анализ экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki67 показал, что после ТШ его экспрессия постепенно снижалась, и через 72 часа после воздействия только единичные клетки имели фокусы Ki67(Рис. 32). В клетках после ТШ наблюдалось резкое усиление экспрессии белка p21, ингибитора циклин-зависимых киназ, и его экспрессия оставалась на высоком уровне вплоть до 72 часов после прогрева (Рис. 33). Вместе с тем наблюдалось постепенное увеличение фокусов γH2AX, маркера разрывов ДНК, который выявляли с помощью окраски антителами против белка γH2AX (Рис.32). Также в клетках после ТШ было обнаружено увеличение активности SA-β-галактозидазы (Рис. 34). Все вышеперечисленное говорит в пользу того, что под влиянием ТШ часть клеток претерпевает стресс-индуцированное преждевременное старение. Принято считать, что SIPS, как и апоптоз, является важным опухолево-супрессорным механизмом, предотвращающим пролиферацию клеток, которые потенциально способны трансформироваться.

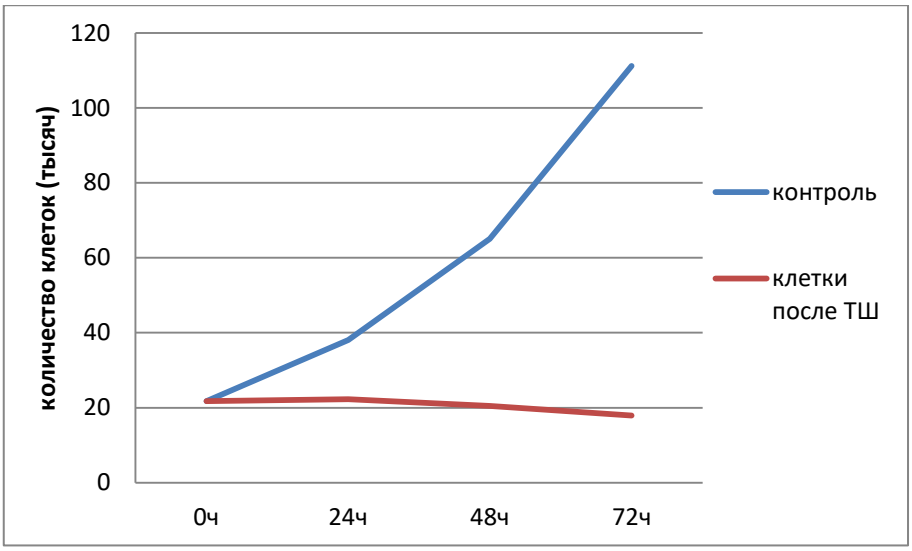


Рис. 30. Кривые клеточного роста эМСК линии 2304 после ТШ .

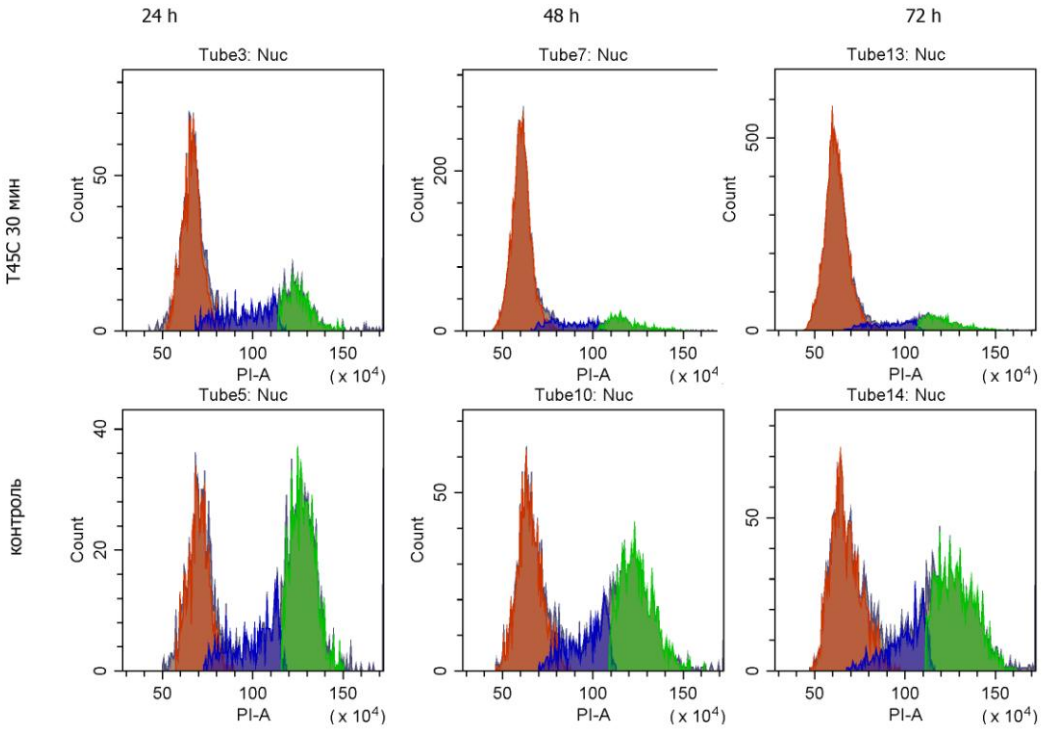


Рис. 31. Клеточный цикл эМСК линии 2304 после ТШ

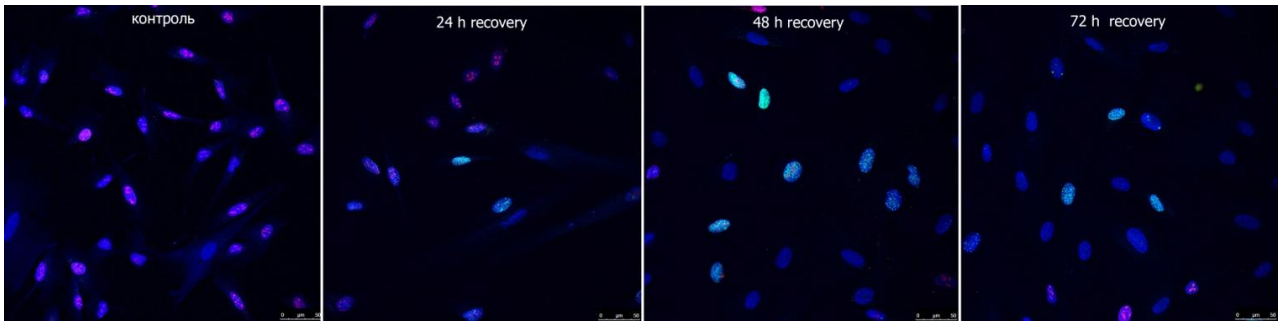


Рис.32. Иммунофлуоресцентный анализ экспресии маркера пролиферации Ki67 (*красный*) и маркера разрывов ДНК - γH2AX (*зеленый*), в эМСК линии 2304 до и после воздействия сублетального ТШ. Ядра окрашены Dapi (*синий*).

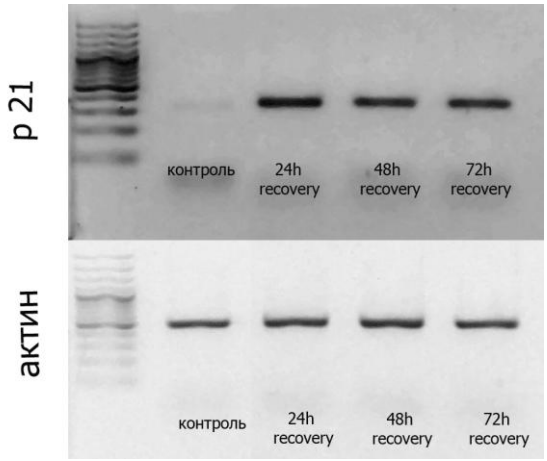


Рис. 33. Экспрессия p21,ингибитора циклин-зависимых киназ, в эМСК линии 2304 после ТШ методами ОТ-ПЦР

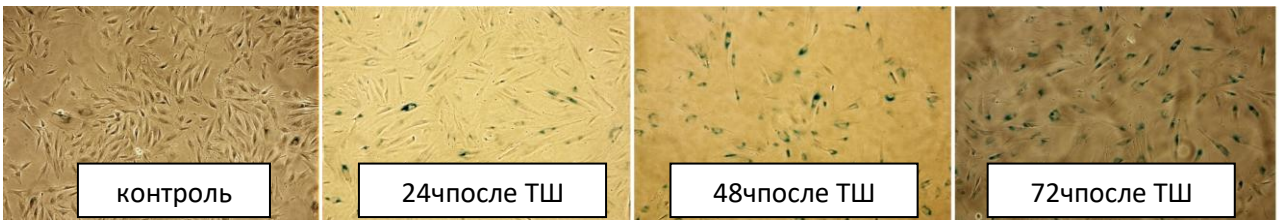


Рис. 34. Увеличение числа SA-β-галактозидаза-позитивных клеток с измененной морфологией в эМСК после сублетального ТШ.

3.3.2.Исследование потомков эМСК, переживших сублетальный тепловой шок

Через 4-5 дня после прогрева клетки были пересеяны. Прикрепившиеся клетки сохранили фибробластоподобную морфологию (Рис. 34) и возобновили пролиферацию.

Пролиферирующие клетки экспрессировали теже поверхностные маркеры (CD-маркеры), что и контрольные клетки, не подвергшиеся сублетальному ТШ. Потомки сохраняли свой мультипотентный статус (Рис. 35, 36) также, как и клетки исходной линии.

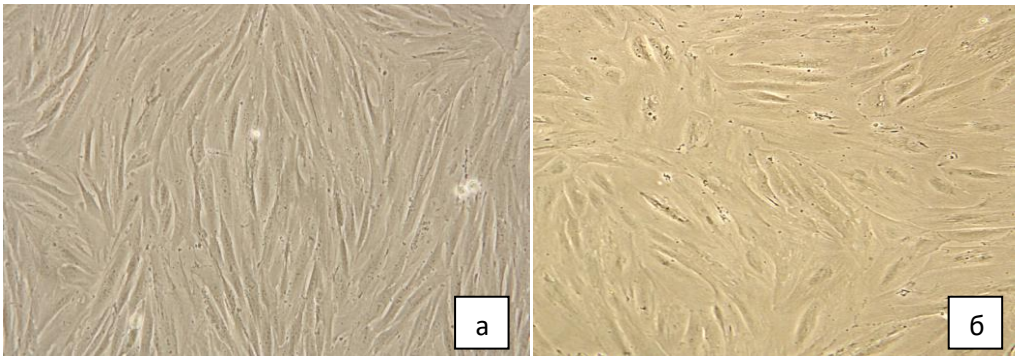


Рис.35. Морфология потомков эМСК линии 2304, переживших ТШ: *а-контроль. эМСК без ТШ. б- потомков эМСК, переживших ТШ, на 6-м пассаже после ТШ.*

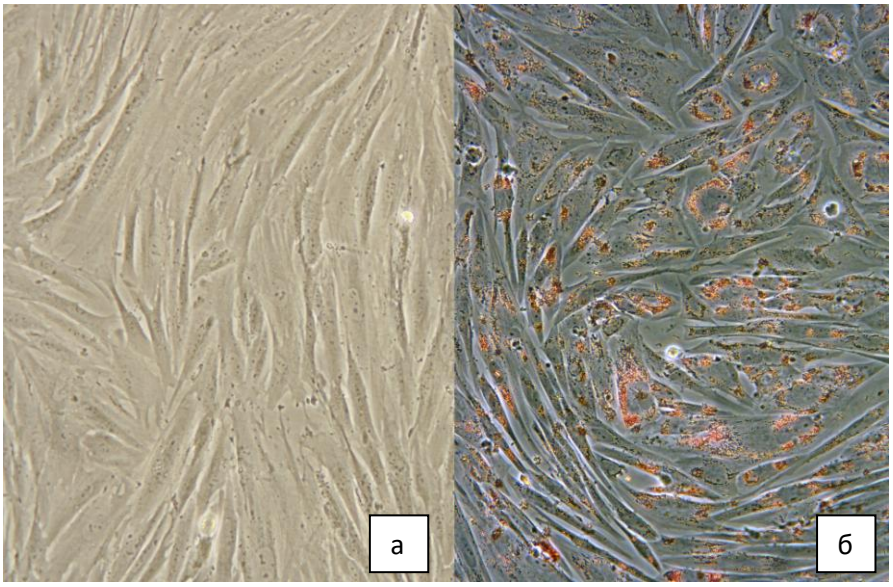


Рис. 36. Направленная дифференцировка потомков эМСК линии 2304, переживших ТШ, в адипогенном направлении: *а – контроль, б - адипогенная дифференцировка (окраска OilRed).*

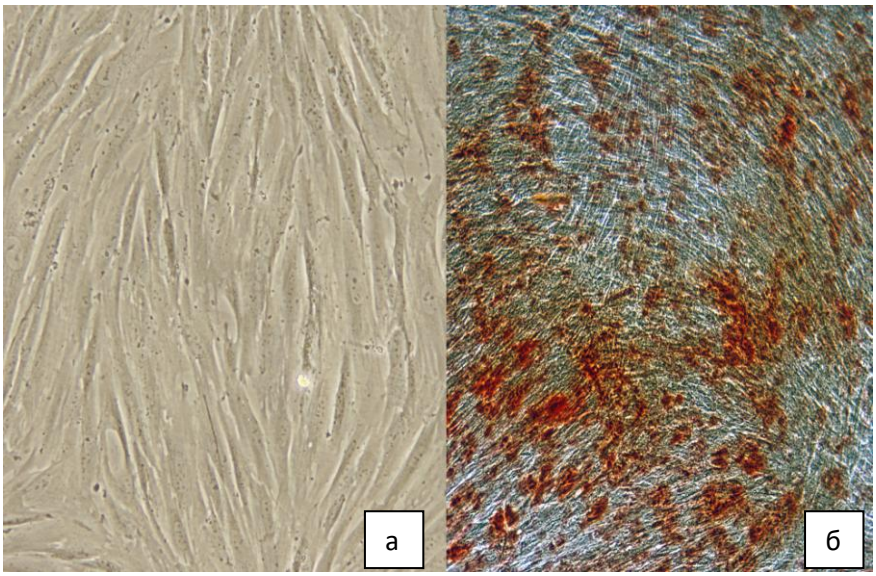


Рис. 37. Направленная дифференцировка потомков эМСК линии 2304, переживших ТШ, в остеогенном направлении: *а –контроль, б - остеогенная дифференцировка (окраска Ализарином).*

3.3.3.Кариотипирование G-бандированных хромосом.

Кариотипический анализ эМСК линии 2304 на 6-м пассаже после температурной обработки выявил изменения в структуре кариотипа в 75% проанализированных метафазных пластинок. Характер изменений был тем же, что и на раннем пассаже для линии 2304 – нарушение копийности, хромосомные поломки. Но количество хромосом набора вовлеченных в процесс дестабилизации, равно как и количество кариотипически дефектных клеток было резко увеличено, по сравнению с контрольными клетками. Нарушение копийности тех или иных хромосом набора было как случайным, так и закономерным, связанным с конкретными хромосомами. Моносомия наиболее часто наблюдалась по хромосомам 10,11,13, 22; а трисомия - по хромосомам 1 и 3 (Рис.38). В отличие от контрольных клеток основным типом структурных изменений были поломки. Хромосомные поломки затрагивали разные участки хромосом, прицентромерные поломки встречались чаще. Генетический материал хромосом 1-4 чаще всего вовлекался в поломки (Рис.39). Нарушение стабильности в структуре кариотипа в ряде клеток было сопряжено с вовлечением в этот процесс разных хромосом набора. В изменения

(анеуплоидия и поломки) в пределах кариотипа было вовлечено от 1-2 до 10 хромосом.

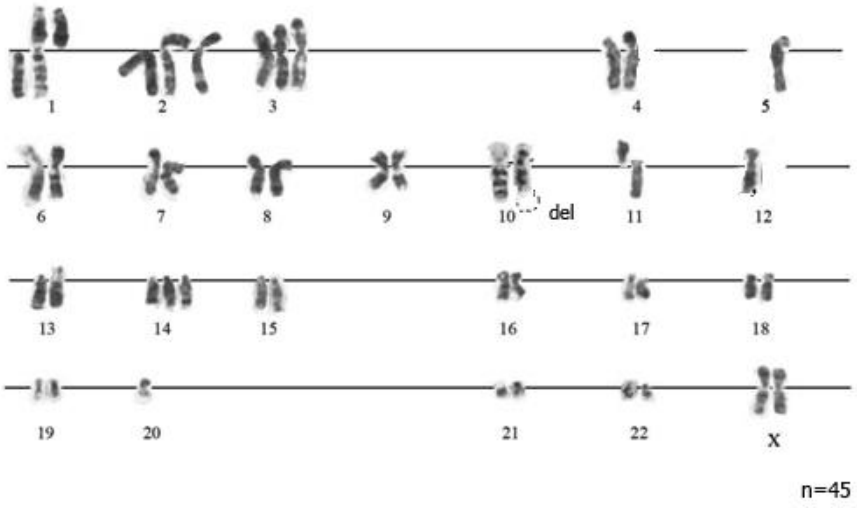


Рис. 38. Кариотип эМСК линии 2304 после ТШ, прицентромерная поломка хромосомы 1 с сохранением p- и q-плеча, трисомия хромосомы 2, 3, 14, терминальная делеция хромосомы 10, моносомия и прицентромерная поломка хромосомы 11, моносомия хромосомы 5, 12, 20.

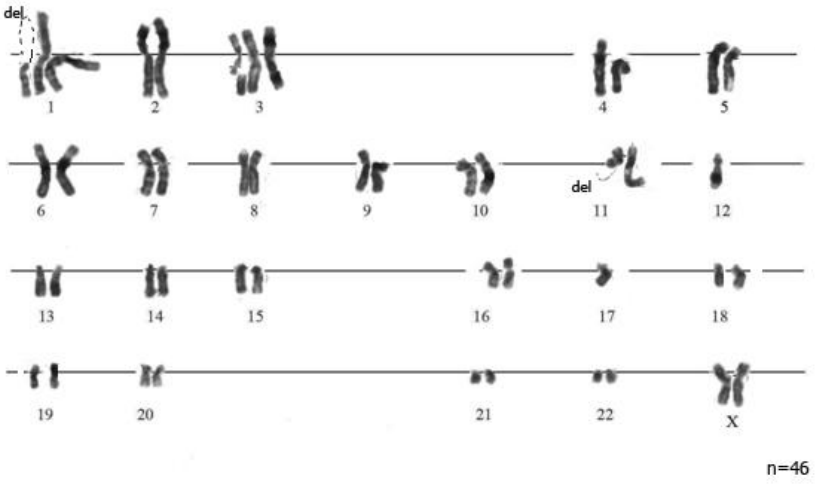


Рис. 39. Кариотип эМСК линии 2304 после ТШ, экстракопирование q-плеча хромосомы 1, трисомия хромосомы 3 с прицентромерной поломкой одной копии, терминальная делеция хромосомы 11, моносомия хромосомы 12, 17.

На основании полученных данных можно говорить о том, что соблюдение температурного режима очень важно при культивировании клеток. ТШ может приводить к вспышке кариотипической нестабильности.

3.3.4.Молекулярное кариотипировнание

Сравнительный анализ контрольных эМСК, постоянно культивируемых в стандартных условиях, и подвергшихся ТШ, методом молекулярного кариотипирования различий не выявил. В обоих вариантах клеток в 100% были выявлены дупликации хромосом 7 (7q36.3 в 62,680 пн (62 кб)).

Сопоставление результатов морфологического и молекулярного кариотипирования показало, что, хотя температурный стресс вызывает дестабилизацию структуры кариотипа, возникшие перестройки не связаны с молекулярными изменениями в структуре ДНК, носят случайный характер и не закрепляются отбором.

3.3.5.Транскриптомный анализ потомков эМСК, переживших тепловой шок

Для исследования адаптивных особенностей эМСК человека через 6 пассажей после сублетального ТШ мы провели биоинформатический анализ данных транскриптомного анализа. В общей сложности было выявлено 10888 генов с различиями в уровне экспрессии между контролем и опытом более, чем в 1.2 раза. В настоящее время именно такой порог для различий в уровне экспрессии считают оптимальным для выявления изменений активности биологических модулей (Ideker et al., 2011)

Из них 3770 генов было гиперэкспрессировано и 3520 генов гипоэкспрессировано более чем в 2 раза, и около 2000 генов было активировано и подавлено более чем в 5 раз.

Один из наиболее важных вопросов, касающихся исследования стволовых клеток и их применения в регенеративной медицине, это их генетическая безопасность. Для того, чтобы на него ответить, мы исследовали модули генов с различной экспрессией между пережившими ТШ и контрольными клетками на наличие хорошо установленных признаков онкогенности, которые были определены и классифицированы Дугласом

Ханонаном и Робертом Вайнбергом (2011) для соматических клеток. Эти признаки включают в себя (1) усиление пролиферацие; (2) подавление онкосупрессоров и их сигнализации (в основном из семейств TP53 и RB); (3) устойчивость к апоптозу, вызванную индукцией онкогенов (преимущественно Myc, Ras); (4) индукцию ангиогенеза; (5) активацию инвазии и метастазирования за счет программ эпителиально-мезенхимального перехода; (6) репликативное бессмертие.

В эМСК, переживших ТШ, были индуцированы сигнальные пути, относящиеся к первой половине клеточного цикла, включая G/S переход, репликацию ДНК, разделение хроматид и метафазу, в то время как пути регуляции телофазы, кариокинеза и цитокинеза изменены не были (Рис.40). При этом активация путей клеточного цикла была сбалансирована индукцией онкосупрессоров TP53 (>2,8 раза), p16 (>6 раз), p21 (>2 раз) и путей, относящихся к транскрипционной регуляции TP53, регуляции метаболизма TP53 и пути прямых эффекторов TP53 (Рис.40, Рис.41). Важно отметить, что по классификации Д. Ханохана и Р.Вайнберга (2011), с трансформацией ассоциируется только пролиферативный сигналинг, несбалансированный старением, апоптозом или онкосупрессорами (Hanahan, Winberg 2011). Другие признаки трансформации не проявились или были подавлены. Проонкогенные модули, регулируемые c-Myc, RAS, MAPK, ERBB, EGFR были подавлены, как и индуктор устойчивой пролиферации EGFR (более чем в 4 раза). Также, наши данные не выявили изменения путей ангиогенеза, путей метастазирования, связанных с эпителиально-мезенхимальным и мезенхимально-эпителиальным переходами и индукции путей репликативного бессмертия, связанных с поддержанием теломер и активностью теломераз.

Помимо перечисленных признаков онкогенности Д. Ханохан и Р.Вайнберг выделили 4 показателя, которые могут способствовать ее возникновению. Это (1) нестабильность генома; (2) переключение энергетического обмена с аэробного дыхания на анаэробное и

усиление пути метаболизма глутамина; (3) активация воспалительных процессов; (4) подавление активности клеток-киллеров.

Из этих характеристик наши данные совпали только с признаками нестабильности генома (1), такими как снижение активности генов репарации двойных разрывов *ATM* (в 5 раз), *ATR* (в 3 раза), *BRCA1* (в 2 раза), *RAD9A* (в 3,9 раза) и активацией молекулярного пути «Деградация белков клеточного цикла до прохождения контрольной точки митоза». Активация этого пути соответствует данным морфологического кариотипирования G-бандированных хромосом. В тоже время, недостаточность пути репарации двойных разрывов ДНК с участием *ATM, ATR и BRCA1* была компенсирована активацией генов *TP53BP1, H2AFX, H2AFY и PARP1*, которые также вовлечены в этот процесс и координированной индукцией путей эксцизионной репарации и репарации ДНК разрывов.

Изменений в энергетическом обмене, способствующих трансформации, мы также не обнаружили, поскольку генные модули энергетического обмена показали активацию митохондрий и не имели признаков эффекта Вайнберга. Наши данные не выявили также повышенной активности провоспалительного сигналинга, и сниженной киллерной активности.

Таким образом, наши данные не выявили классических признаков онкогенности в переживших ТШ эМСК.

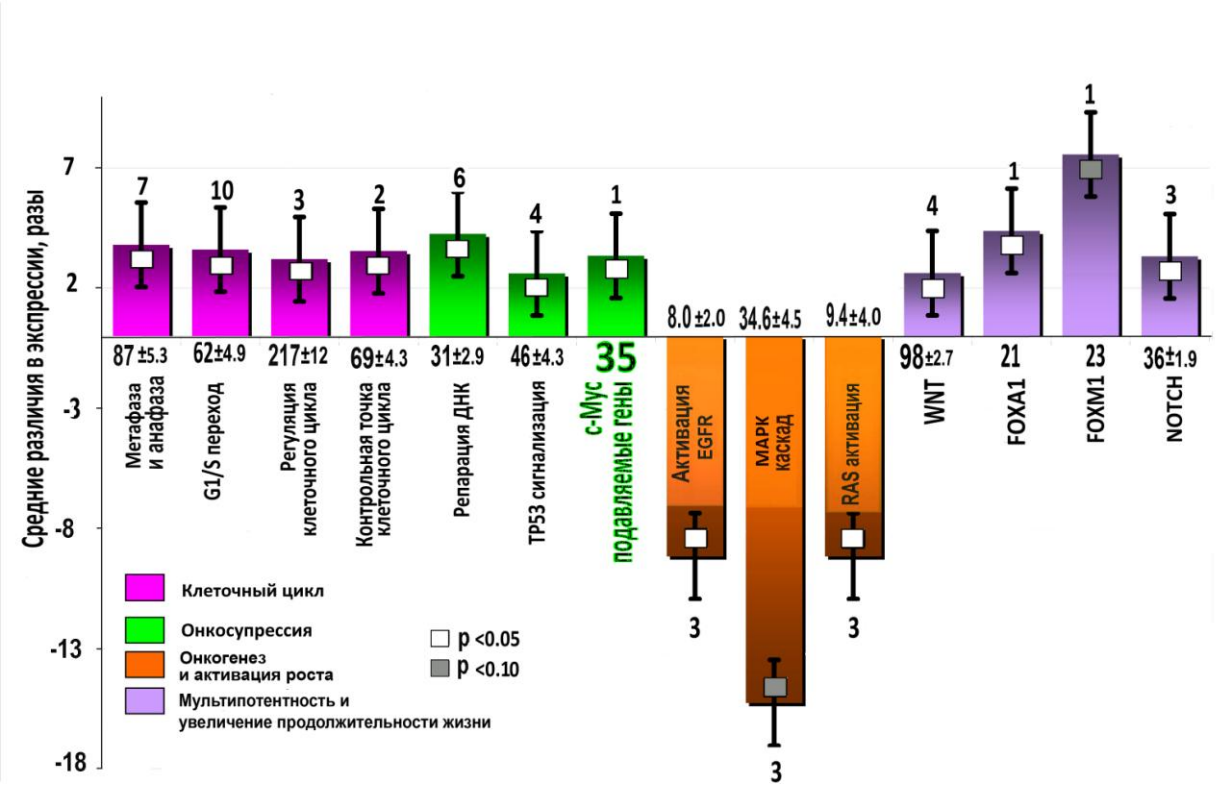


Рис. 40. Экспрессия генов, входящих в функциональные группы, в потомках эМСК, переживших ТШ, относительно контрольных эМСК, не подвергнутых ТШ.

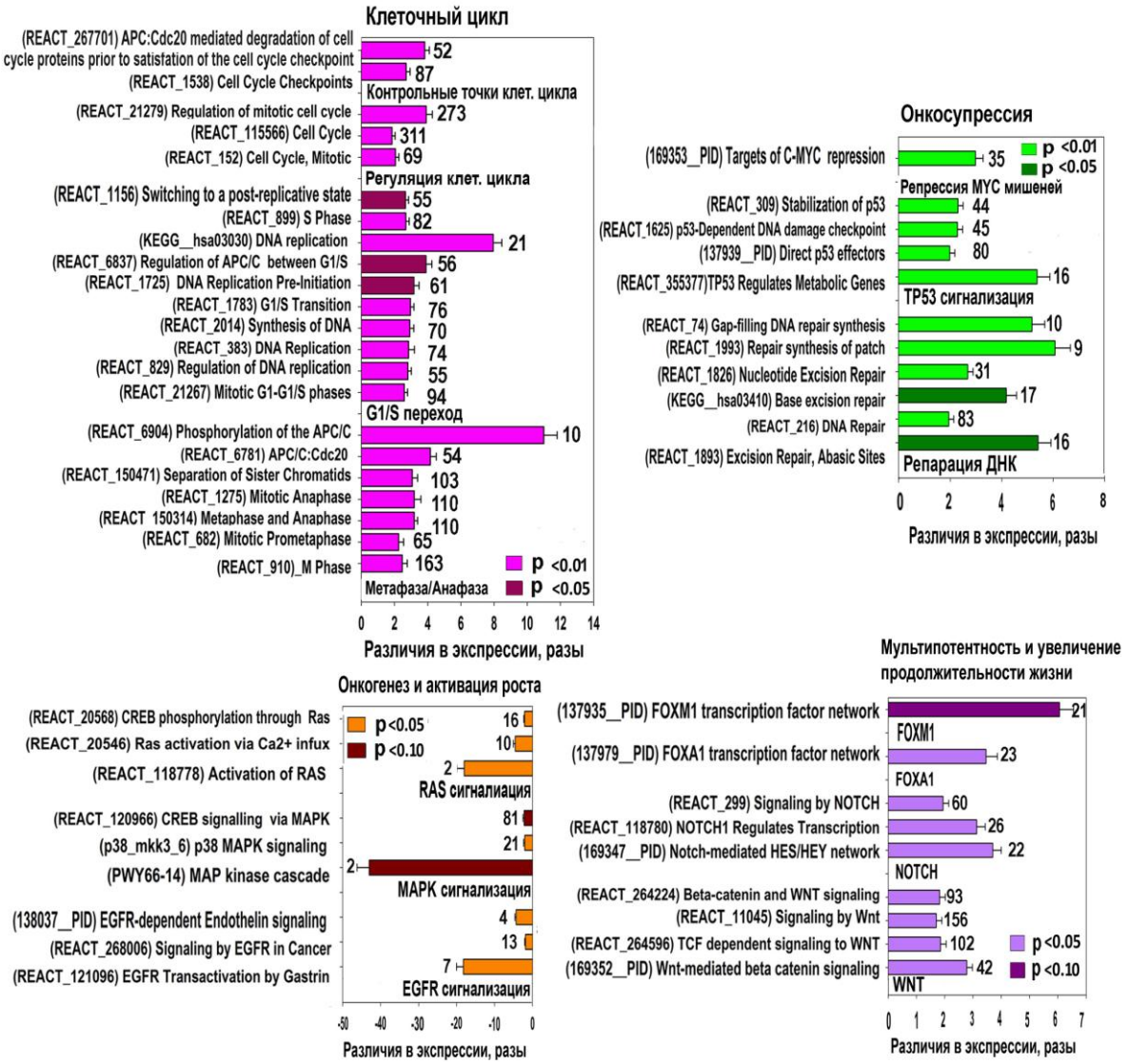


Рис. 41. Распределение молекулярных путей регуляции трансформации по функциям.

3.3.6.Анализ репликативного старения эМСК, переживших тепловой шок

При длительном культивировании восстановившиеся после сублетального стресса эМСК подвергались репликативному старению. С увеличением числа удвоений клетки морфологически изменялись (увеличивались в размере), их пролиферация замедлялась, появлялось значительное число клеток с позитивной экспрессией β–галактозидазы, связанной со старением (Рис.42).

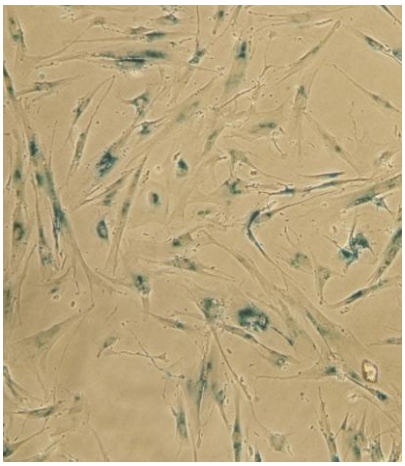


Рис. 42.Экспрессия SA-β-галактозидазы в потомках эМСК на 30-м пассаже, переживших ТШ на 6-м пассаже.

В результате можно подвести итог, чтопосле сублетального ТШ часть популяции эМСК подвергается SIPS. Клетки, избежавшие SIPS, продолжают свою пролиферацию. На 6-м пассаже потомки эМСК, переживших ТШ, физиологически не отличаются от контрольных клеток. Методом кариотипического анализа G-бандированных хромосом была детектированна вспышка кариотипической нестабильности. Сопоставление результатов морфологического и молекулярного кариотипирования показало, что, хотя температурный стресс вызывает дестабилизацию структуры кариотипа, возникшие перестройки не связаны с молекулярными изменениями в структуре ДНК, носят случайный характер и не закрепляются отбором. Результаты транскриптомного анализа не выявили классических признаков онкогенности в переживших ТШ эМСК. Таким образом, несмотря на значительную дестабилизацию кариотипа, анализируемые клетки не встают на путь злокачественной трансформации. Факт репликативного старения этих клеток подтверждает отсутствие иммортализации, а следовательно, и трансформации этих клеток.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биология стволовых клеток человека является активно развивающимся направлением современной биологии и медицины. Это связанно с потенциальной возможностью их использования в целях регенеративной медицины. Наиболее перспективны для этих целей МСК человека.

При выделении клеточной линии из биопсийного материала МСК должны быть идентифицированы. В этой связи Международное общество клеточной терапии декларировало базовые критерии по определению мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека, независимо от источника их происхождения: адгезивность к пластику при стандартных условиях культивирования; позитивная экспрессия CD105, CD73, CD90 и отсутствием экспрессии гемопоэтических маркеров CD19, CD34, CD45 и HLA-DR (класса II); направленная дифференцировка в другие клетки мезодермы invitro (Husein, Thiemermann, 2010).

Проанализированные в данной работе эМСК, полученные из десквамированного эндометрия, полностью соответствуют критериям Международного общества клеточной терапии по определению мультипотентных МСК человека, а именно: адгезивны к пластику при стандартных условиях культивирования; характеризуются позитивной экспрессией поверхностных маркеров мезенхимного ряда CD13, CD 29, CD44, CD73, CD 90 и CD 105 и не экспрессировали гемопоэтические маркеры: CD 11b, CD34, CD 45, CD 117,CD 130 и HLA-DR класса 2; дифференцируются под воздействием определенных стимулов в другие клетки мезодермы (адипоциты, остеобласты).

Фенотипирование изученных клеток позволило заключить, что мы имели дело именно с МСК. Проанализированные линии по физиологическим параметрам не отличаются друг от друга.

Учитывая высокий потенциал МСК с точки зрения клинического применения, важным является вопрос о генетической стабильности клеток и возможности их спонтанной трансформации.

Так как количества МСК в исходном материале, как правило, недостаточно для трансплантации, клиническое использование МСК подразумевает накопление биомассы в условия invitro. Поскольку перевод клеток из условий invivo в условия invitro и дальнейшее их культивирование может стать потенциальным источником накопления генетических изменений в клетках, одной из задач настоящего исследования было проанализировать степень кариотипической стабильности эМСК при культивировании и определить могут ли выявленные изменения приводить к спонтанной трансформации.

Ранее в исследованиях МСК грызунов были обнаружены высокий уровень анеуплоидии, иммортализация клеточных культур и их спонтанная трансформация. Данные о спонтанной трансформации МСК грызунов в условиях invitro повысило внимание и вызвало беспокойство исследователей по поводу возможности использования человеческих МСК в медицинских целях (Foudah et al., 2009; Miura et al., 2006).

Для оценки степени генетической стабильности анализируемых эМСК в настоящей работе было использовано несколько методов кариотипирования.

Сопоставление данных морфологического и молекулярного кариотипирования эМСК, проведенное в настоящей работе, позволило говорить о том, что данные представляют характеристику кариотипа клеток на разных уровнях организации генома и один метод дополняет другой. Как показал анализ G-окрашенных хромосом, эМСК уже на раннем 6-ом пассаже были представлены двумя субпопуляциями. Одна характеризовалась наличием стандартного кариотипа в большинстве клеток; другая - разнообразными случайными изменениями его структуры, типичными для клеток, претерпевших сбой в программе клеточного деления (Todaro, Green, 1963; Romanov et al., 2001; Miura et al., 2006). Согласно имеющимся литературным данным в процессе более

продолжительного культивирования клеток судьба случайных перестроек может сложиться по-разному: либо они сохранят статус случайных образований, либо могут быть элиминированы из популяции, либо, в силу каких-то обстоятельств, могут сохраниться в популяции и даже приобрести селективное преимущество (Bernardo et al., 2007; Røsland et al., 2009;Tarte et al., 2010; Ueyama et al., 2011; Sensebe et al., 2012; Jones et al., 2013; Roemeling-van Rhijn et al., 2013; Roselli et al., 2013; Zaman et al., 2014). Так, например некоторыми исследователями показано, что длительное культивирование клеточных линий сопряжено с частичной или полной утратой половых хромосом (Мамаева, 2002; Гринчук и др., 2008; Попов и др., 2009). В других исследованиях показано, что генетические и эпигенетические изменения происходят в клетках в процессе их адаптации к условиям жизни в культуре (Enver et al., 2005; Baker et al., 2007; Nestor et al., 2015).

При исследовании генетического состояния клеток важным является выбор метода анализа и понимание его разрешающей способности. Особенностью метода молекулярного кариотипирования является то, что конкретные изменения в геноме выявляются в том случае, если они возникли не менее, чем в 10 % клеток. Метод фиксирует только количественные изменения ДНК в хромосомах на популяционном уровне и улавливает перестройки, начиная с размера 0.5—1 Mb. Классический метод G-бэндинга способен обнаруживать перестройки размером только более 5 Mb. Геномная гибридизация на чипах улавливает все типы хромосомной мозаичности, когда частота встречаемости таких клеток составляет не менее 10—15 %.

Во многих современных цитогенетических работах используются несколько методов кариотипического анализа одновременно, что дает более полную картину генетического состояния клеток. В работе Бернардо с соавторамипри анализе культур МСК, полученных из костного мозга здоровых доноров, методами кариотипирования Q-бандированных хромосом и методом молекулярного кариотипирования не было

выявлено кариотипических изменений на протяжении всего процесса культивирования клеток вплоть до старения культур (Bernardo et al., 2007). В работе других авторов при изучении МСК из жировой ткани методом морфологического кариотипирования изменений в процессе культивирования не было выявлено, тогда, как методом молекулярного кариотипирования в 3-х хромосомах одной из линий были обнаружены делеции (Meza-Zepeda et al., 2007). Известно, что кариотипически аномальные клетки могут нивелироваться из клеточной популяции в следствии апоптоза, остановки клеточного цикла или репликативного старения. В нескольких исследованиях при анализе МСК с помощью методов FISH и CGH была обнаружена высокая частота встречаемости клеток с анеуплоидией в стареющих клетках на поздних этапах культивирования (Tarte et al., 2010; Estrada et al., 2013; Wang et al., 2013). Однако остановка их пролиферации предполагает, что анеуплоидия не приводят к онкогенезу.

Существуют данные о том, что изменения в структуре генома клеточных линий МСК могут быть связаны с генетическими особенностями донора, от которого был получен исходный биологический материал. Так, выявлены донор-зависимые хромосомные аберрации в пяти культурах МСК, выделенных из костного мозга (Tarte et al., 2010). Молекулярный анализ, проведенный в настоящей работе, выявил некоторые отклонения в структуре хромосом, анализируемых эМСК (дупликации и потерю гетерозиготности), которые не были обнаружены методом морфологического кариотипирования, в связи с малыми размерами аббераций. Можно предположить, что они тоже связаны с генетическими особенностями доноров данных клеток. Эти результаты подтверждают, что генетическая стабильность культивируемых МСК зависит от генетических особенностей донора клеток.

Так же подлежит обсуждению степень влияния состояния здоровья донора на физиологию и стабильность кариотипакультивируемых эМСК. Проведенное в данной работе подробное исследование физиологических свойств эМСК от донора с аденомиозом

в сравнении с эМСК от здоровых доноров показало, что в условиях invitro клетки друг от друга не отличались. Аналогичные литературные данные на данный момент отсутствуют.

Анализ генетической стабильности клеток от донора с аденомиозом в сравнении с эМСК от здорового донора выявил значительные различия между клетками.эМСК от больного донора характеризовались усилением кариотипической нестабильности (в первую очередь хромосомными поломками), сопровождающейся вовлечением в этот процесс определенных хромосом набора.

Из данных литературы известно, что клетки, выделенные из очагов эндометриоза, характеризуются генетической нестабильностью на уровне кариотипа. Основные изменения –анеуплоидизация и наличиеморфологически дефектных хромосом. В своих исследованиях М. Корнер с коллегами показали, что при эндометриозе яичников, эндометриоидной аденокарциноме, а также в редких случаях в нормальном эндометрии одним из наиболее часто встречающихся изменений в клетках является трисомия хромосом 1 и 7 и моносомия хромосом 9 и 17. Частота встречаемости этих изменений увеличивалась по мере развития заболевания (Korner et al., 2006). Ж.Б. Жолинер с соавторами, работая с клеточной линией, полученной из перитонеального очага эндометриоза IV стадии, с помощью R-бэндинга обнаружил, что исследуемые клетки имели многочисленные хромосомные аберрации, в том числе потерю одного из гомологов X, 4q, 5q , трисомию по хромосомам 7, 8 и 10 и тетрасомию по хромосомам 17, 18, 19 и 20 (Bouquet de Jolinière et al., 1997). В исследованиях других авторов было показано, что анеуплоидия по хромосоме 17 в клетках, выделенных из очагов эндометриоза, оказалась значительно выше, чем в клетках от здорового донора (Kosugi et al., 1998). Согласно общепринятому представлению эндометриоз считается доброкачественным заболеванием, однако, имееются редкие сообщения о злокачественном преобразовании этих клеток (Jimbo et al., 1997; Fukunaga et al., 1997).

По результатам анализа, проведенного в данной работе, необходимо отметить, наличие в кариотипе эМСК от донора с аденомиозом как моносомиков, так и трисомиков. В одних случаях моносомия по той или иной хромосоме кариотипического набора носила случайный характер, в других - встречалась неоднократно (трисомия хромосом 1, 3, 6, 7, 21; моносомия хромосом 5, 11, 15, 16, 17). Другой стороной кариотипической нестабильности изученных в настоящей работе аденомиозных клеток является повышенная ломкость определенных хромосом набора, приводящая к возникновению дефектных хромосом. Неоднократные поломки были обнаружены нами в хромосомах 7 и 11. Интересно, что аналогичная генетическая нестабильность хромосомы 7 была обнаружена ранее при анализе первичных культур от 3-х пациентов с диагнозом аденомиоз (Pandis et al., 1995). Между тем, делеция хромосомы 7 описана в опухолевых клетках лейомиомы матки (Ozisik et al., 1993). Ломкость хромосомы 11 с потерей *p*-плеча, обнаруженная нами в эМСК от донора с аденомиозом, была также описана в эндометриозных клетках яичников (Gogusev et al., 1998). Сатох с соавторами с использованием FISH-анализа клеток, выделенных из легочных метастазов эндометриальной стромальной саркомы, тоже показали кариотипические изменения (межхромосомные транслокации), связанные с хромосомами 7 и 11 (Satoh et al., 2003). Из чего можно заключить, что обнаруженная нами в рамках настоящей работы повышенная нестабильность хромосом 7 и 11, согласуется с имеющимися литературными данными и может быть связана с заболеванием репродуктивной системы донора клеток.

Для того, чтобы ответить на вопрос, сопряжены ли возникшие генетические изменения с трансформацией проанализированных нами клеток, было проведено их длительное культивирование. Несмотря на кариотипические отклонения, обнаруженные в эМСК от донора с аденомиозом, к 25 пассажу они, также как и клетки от здоровых доноров, вступили в фазу репликативного старения и к 28-30 пассажам переставали делиться. Как известно, вступление клеток в фазу репликативного старения говорит о том, что

культивируемые клетки не претерпели иммортализацию и, следовательно, онкогенную трансформацию.

В настоящей работе были проведены эксперементы, направленные на исследование влияния ТШ на эМСК в культуре. Согласно накопленным в литературе данным нарушения в структуре кариотипа могут быть индуцированы экзогенными стрессами (Гринчук и др., 2014). Один из них – ТШ. Показано, что ТШ индуцирует хромосомные аберрации в клетках китайского хомячка (Dewey et al., 1971) .

Известно, что ТШ может воздействовать на целостность ДНК двояко: как непосредственно, так и через арест репликационной вилки (Velichko et al., 2012). Многочисленные исследования описывают ответ СК человека на повреждение, но лишь немногие работы, появившиеся совсем недавно, посвящены изучению потомков СК, переживших стресс. В своем большинстве они сделаны на ЭСК. На ЭСК мыши при воздействии перекиси водорода было обнаружено, что большинство клеток после стрессового воздействия подверглись апоптозу. Выжившие после сублетального воздействия клетки, проявляли пролиферативную активность, сопоставимую с контрольными клетками (без стрессового воздействия перекиси водорода) и экспрессировали маркеры плюрипотентности (Guo et al., 2010). Аналогичные результаты были получены для мышиных ЭСК, выживших после воздействия γ-радиации (Rebuzzini et al., 2012). ЭСК после облучения в сублетальных дозах были способны генерировать тератомы и экспрессировать гены, отвечающие за плюрипотентность (Sokolov et al., 2010; Wilson et al., 2010). В работе Л.Л. Алексеенко с соавторами показано, что МСК, выжившие после сублетального нагревания, характеризовались физиологическими свойствами сопоставимыми с физиологическими свойствами контрольными клетками (Alekseenko et al., 2014). Другие литературные данные о судьбе МСК после жесткого ТШ на данный момент отсутствуют.

В связи с тем, что работ в этом направлении мало, в настоящей работе изучению физиологического и генетического состояния эМСК после сублетального температурного воздействия было уделено особое внимание.

Клетки были кариотипированы через 6 пассажей культивирования в нормальных условиях (при 37°С) после ТШ. Кариотипический анализ потомков переживших ТШ, методом G-бэндинга выявил вспышку кариотипической нестабильности. В подавляющем большинстве клеток (80%) были выявлены изменения, связанные как с нарушением копийности хромосом, так и с появлением разнотипных хромосомных поломок. Анализ данных клеток методом молекулярного кариотипирования специфических изменений, связанных с температурным шоком, не выявил. Сопоставление результатов классического и молекулярного кариотипированием указывает на то, что хотя температурный стресс вызывает дестабилизацию структуры кариотипа, возникшие перестройки не закрепляются отбором.

Анализ потомков, переживших ТШ показал, что морфологически потомки не отличались от родительских клеток, при длительном культивировании подвергались репликативному старению, с увеличением числа удвоений клетки морфологически изменялись (увеличивались в размере и уплощались), их пролиферация замедлялась, появлялось значительное число клеток с высокой активностью β–галактозидазы, связанной со старением. Эти клетки экспрессировали поверхностные CD маркеры мезенхимных СК и сохраняли высокую пластичность. Они были способны дифференцироваться в адипоциты и остеобласты (производные мезодермы).

Таким образом, наличие в кариотипе изученных эМСК хромосомных поломок, до настоящего времени рассматриваемых как один из возможных показателей клеточной трансформации, в нашем случае не может обсуждаться как один из показателей перехода клеток из нормального состояния в трансформированное. Подтверждением тому являются результаты транскриптомного анализа, которые выявили подавление в

проанализированных клетках генов, участвующих в процессе клеточной трансформации. Отсутствие иммортализации изученных клеток было подтверждено фактом их репликативного старения после 25-ого пассажа культивирования.

Результаты настоящей работы показали, что контроль генетической стабильности МСК должен быть неотъемлемой частью определения характеристик линий, предназначенных для клинического применения. При этом использование лишь одного метода анализа для оценки генетической стабильности представляется недостаточным, так как только совокупность морфологических и молекулярных методов анализа позволяют получить более полную картину генетической стабильности клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе были исследованы эМСК, полученные от здоровых доноров, от донора с заболеванием репродуктивной системы (аденомиозом) и потомки клеток, переживших сублетальный температурный стресс. Изученные клеточные варианты, экспрессировали маркеры, типичные для МСК, дифференцировались в клетки мезенхимального ряда. Генетически линии эМСК в условиях invitro характеризовались возникновением кариотипически дефектных клеток – анеуплоидов и клеток с нарушениями в структуре хромосом. Частота встречаемости аберрантных клеток была индивидуальна для каждой линии. Клеточные варианты от донора с аденомиозом характеризовались повышенным уровнем кариотипической нестабильности с неслучайным вовлечением в перестройки (поломки) хромосом 7 и 11.Часть популяции эМСК, претерпевших сублетальный ТШ, подвергалась стресс-индуцированному преждевременному старению (SIPS). Потомки клеток, избежавших SIPS, характеризовались вспышкой кариотипической нестабильности, с вовлечением в перестройки большей части кариотипического набора. Методы молекулярного кариотипирования и транскриптомного анализа, несмотря на существенную кариотипическую нестибильность, возникшую у потомков эМСК после ТШ, не выявили признаков клеточной трансформации.

Тот факт, что эМСК всех проанализированных линий в процессе длительного культивирования входили в фазу репликативного старения, позволяет сделать вывод о том, что они не подвергаются иммортализации и трансформации.

ВЫВОДЫ

1. Клеточные линии эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека, полученные от разных доноров, в системе invitro обладают сходными физиологическими характеристиками, типичными для клеток мезенхимного ряда: фибробластоподобным типом роста, мультипотентным статусом, экспрессией поверхностных маркеров, высокой пролиферативной активностью.

2. Перевод эндометриальных мезенхимных стволовых клеток из системы invivo в систему invitro может сопровождаться появлением клеток с нарушениями в структуре кариотипа. Частота встречаемости дефектных клеток индивидуальна для каждой линии.

3. Эндометриальным мезенхимным стволовым клеткам от донора с заболеванием репродуктивной системы – аденомиозом, свойственна повышенная нестабильность структуры кариотипа с неслучайным вовлечением в перестройки хромосом 7 и 11.

4. Потомки эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека, переживших сублетальный тепловой шок, характеризуются вспышкой кариотипической нестабильности, с вовлечением в перестройки большей части хромосом кариотипического набора. Метод молекулярного кариотипирования, несмотря на существенную кариотипическую нестабильность анализируемых клеток, обнаруженную G-бэндингом, признаков клеточной трансформации не выявил.

5. Профиль экспрессии генов в потомках клеток, переживших ТШ, по данным транскриптомного анализа, отличается от профиля экспрессии генов исходных клеток. Выявленные изменения не направлены в сторону клеточной трансформации.

6. Все проанализированные эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека при длительном культивировании вступали в фазу репликативного старения и не подвергались иммортализации/трансформации.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гринчук Т.М., Иванцов К.М., Алексеенко Л.Л., Кожухарова И.В., Зайчик А.М., Петров И.С., Михайлов В.М., Попов Б.В. 2008.Характеристика культуры мезенхимных стволовых клеток мыши, экспрессирующих GFP. Цитология. 50 (12):1029–1034.

2. Домнина А.П., Новикова П.В., Фридлянская И.И., Шилина М.А., Зенин В.В., Никольский Н.Н. 2015. Индукция децидуальной дифференцировки в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках. Цитология. 57(12):880–884.

3. Домнина А.П., Фридлянская И.И., Земелько В.И., Пуговкина Н.А., Ковалева З.В., Зенин В.В., Гринчук Т.М., Никольский Н.Н. 2013. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации. Цитология. 55 (1): 69–74.

4. Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнина А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Кирсанов А. А., Бичевая 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. 53 (12) : 919–929.

5. Карпухин А.В., Логинова А.Н., Хомич Е.В., Поспехова Н.И. 2002. Наследственная предрасположенность к раку молочной железы. Медицинская генетика 1(6): 254–261.

6. Киселев С.Л., Лагарькова М.А. 2006. Эмбриональные стволовые клетки человека. Природа №10: 49–54.

7. Киселев В.И., Муйжнейк Е.Л. 2011. Наследственный рак и современные возможности лекарственной коррекции генетических дефектов.1–16.

8. Крылова Т. А., . Зенин В. В, Мусорина Н. С., Баранов В. С., Бичевая Н. К., Корсак В. С., Никольский Н. Н., Пинаев Г. П., Полянская Г. Г. 2003. Получение и характеристика постоянных линий эмбриональных стволовых клеток человека. Цитология: 45 (12): 1172–1177.

9. Мамаева С. Е. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. Москва: Науч. Мир. 231

10. Мусина Р.А., Белявский А.В., Тарусова О.В.,Соловьева Е.В., Сухих Г.Т. 2008. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови. Кл.техн. биол. мед. 2:110–114.

11. 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 invitro. Цитология. 51(2): 91–102.

12. Фриденштейн А.Я., Четков И.Л. 1968. Стволовая лимфоидная клетка и ее дифференцировка. Успехи современной биологии. №1: 19–23.

13. AlekseenkoL.L., ZemelkoV.I., DomninaA.P., LyublinskayaO.G., ZeninV.V., PugovkinaN.A., KozhukharovaI.V., BorodkinaA.V., GrinchukT.M., FridlyanskayaI.I., NikolskyN.N. 2014. Sublethal heat shock induces premature senescence rather than apoptosis in human mesenchymal stem cells. Cell Stress and Chaperones. 19(3):355–366.

14. Allickson J., Xiang C. 2012. Human adult stem cells from menstrual blood and endometrial tissue. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 13: 419–420.

15. Amit M., Margulets V., Segev H., Shariki K., Laevsky I., Coleman R., Itskovitz-Eldor J. 2003. Human feeder layers for human embryonic stem cells. Biology of reproduction. 68(6): 2150—2156.

16. Amundson S.A., Myers T.G., Fornace A.J.Jr. 1998. Oncogene, 17: 3287–3299.

17. Baker D.E., Harrison N.J., Maltby E., Smith K., Moore H.D., Shaw P.J., Heath P.R., Holden H., Andrews P.W. 2007. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. Nat. Biotechnol. 25: 207–215.

18. Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Büscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Mačiulaitis R., Palomäki T., Schneider C.K., Sensebé L., Tachdjian G., Tarte K., Tosca L., Salmikangas P. 2013. Risk of tumorigenicity in

mesenchymal stromal cell-based therapies-Bridging scientific observations and regulatory viewpoints. Cytotherapy. 15: 753–759.

19. Batuello C.N., Kelley M.R., Dynlacht J.R. 2009. Role of Ape1 and base excision repair in the radioresponse and heat-radiosensitization of HeLa Cells. Anticancer Res. 29:1319–1325.

20. Ben-David U., Mayshar Y., Benvenisty N. 2011. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. Cell Stem Cell 9: 97–102.

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

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

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

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

25. Borghesi A., Avanzini M.A., Novara F., Mantelli M., Lenta E., Achille V., Cerbo R.M., Tzialla C., Longo S., De Silvestri A., Zimmermann L.J., Manzoni P., Zecca M., Spinillo A., Maccario R., Zuffardi O., Stronati M. 2013. Genomic alterations in human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells call for stringent quality control before any possible therapeutic approach. Cytotherapy.15:1362–1373.

26. 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. 36: 202–207.

27. Bouquet de Joliniere J., Validire P., Canis M., Doussau M., Levardon M., Gogusev J. 1997. Human endometriosis-derived permanent cell line (FbEM-1) : establishment and characterization. Hum. Reprod. Update. 3 : 117–123.

28. Brinton L. A., Gridley G., Persson I., Baron J., Bergqvist A. 1997. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. Am. J. Obstetrics Gynecol. 176: 572-579.

29. Brinton L. A., Gridley G., Persson I., Baron J., Bergqvist A. 1997. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. Am. J. Obstetrics Gynecol. 176: 572-579.

30. Briquet A., Dubois S., Bekaert S., Dolhet M., Beguin Y., Gothot A. 2010. Prolonged ex vivo culture of human bone marrow mesenchymal stem cells influences their supportive activity toward NOD/SCID-repopulating cells and committed progenitor cells of B lymphoid and myeloid lineages. Haematologica.95(1):47–56.

31. Buchan J.R., Parker R. 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. Mol Cell. 36: 932–941.

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

33. Buys S.S., Sandbach J.F., Gammon A., Patel G., Kidd J., Brown K.L., Sharma L., Saam J., Lancaster J., Daly M.B.2017. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. Cancer. . doi: 10.1002/cncr.30498.

34. Catalá A. 2010. A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. Biochem Biophys Res. Commun. 399: 318–323.

35. Cervello I, Mas A, Gil-Sanchis C., Peris L., Faus A., Saunders P.T., Critchley H.O., Simón C. 2011. Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. PLoS One. 6:e21221

36. Cervello I., Gil-Sanchis C., Mas A., Delgado-Rosas F., Martínez-Conejero J.A., Galán A., Martínez-Romero A., Martínez S., Navarro I., Ferro J., Horcajadas J.A., Esteban

F.J., O'Connor J.E., Pellicer A., Simón C. 2010. Human endometrial side population cells exhibit genotypic and functional features of somatic stem cells. PloS One. 5:e10964.

37. Chan R.W., Schwab K.E., Gargett C.E. 2004. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. Biol. Reprod. 70:1738–1750.

38. Cho N.H., Park Y.K., Kim Y.T., Yang H., Kim S.K. 2004. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. Fertil. Steril. 81:403–407.

39. Cliby W., Ritland S., Hartmann L., Dodson M., Halling K.C., Keeney G., Podratz K.C., Jenkins R.B. 1993. Human epithelial ovarian cancer allelotype. Cancer Res.53: 2393-2398.

40. Cmielova J., Havelek R., Soukup T., Jiroutová A., Visek B., Suchánek J., Vavrova J., Mokry J., Muthna D., Bruckova L., Filip S., English D., Rezacova M. 2012. Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. Int J. Radiat Biol. 88:393–404.

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

42. Corry P.M., Robinson S., Getz S. 1977. Hyperthermic effects on DNA repair mechanisms. Radiology. 123:475–482.

43. Cui C.H., Uyama T., Miyado K., Terai M., Kyo S., Kiyono T., Umezawa A. 2007. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. Mol. Biol. Cell. 18: 1586–1594.

44. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten F P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum. 44 (8):1928–1942.

45. De Coppi P., Bartsch G. Jr., Siddiqui M.M., Xu T., Santos C.C., Perin L., Mostoslavsky G., Serre A.C., Snyder E.Y., Yoo J.J., Furth M.E., Soker S., Atala A. 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat. Biotechnol. 25 : 100−106.

46. De Hondt A., Peeraer K., Meuleman C., Meeuwis L., De Loecker P., D'Hooghe T. M. 2005. Endometriosis and subfertility treatment: a review. Minerva Ginecol. 57: 257–267.

47. De Joliniere J. B., Validire P., Canis M., Doussau M., Levardon M., Gogusev J. 1997. Human endometriosis-derived permanent cell line (FbEM-1): establishment and characterization. Human Reprod. Update. 3: 117–123.

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

49. Dewey W.C., Westra A., Miller H.H., Nagasawa H. 1971. Heatinduced lethality and chromosomal damage in synchronized Chinese hamster cells treated with 5-bromodeoxyuridine. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. 20: 505–520.

50. Diaz-Flores L.J., Madrid J.F., Gutierrez R., Varela H., Valladares F., Alvarez-Argüelles H., Díaz-Flores L.2006. Adult stem and transit-amplifying cell location. Histol Histopathol. 21: 995–1027.

51. Dimitrov R., TimevaT., Kyurkchiev D., Stamenova M., Shterev A., Kostova P., Zlatkov V., Kehayov I., Kyurkchiev S. 2008. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. Reproduction. 135: 551–558.

52. Dolan E.B., Haugh M.G., Tallon D., Casey C., McNamara L.M. 2012. Heat-shock-induced cellular responses to temperature elevations occurring during orthopaedic cutting. J R Soc Interface. 9:3503–3513.

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

54. Duronio R. J., Xiong Y. 2013. Signaling Pathways that Control Cell Proliferation. Cold Spring Harb Perspect Biol.(3): a008904.

55. Dynlacht J.R., Batuello C.N., Lopez J.T., Kim K. K., Turchi J. J. 2011. Identification of Mre11 as a target for heat radiosensitization. Radiat Res. 176:323–332.

56. Enver T., Soneji S., Joshi C., Brown J., Iborra F., Orntoft T., Thykjaer T., Maltby E., Smith K., Abu Dawud R. 2005.Cellular differentiation hierarchies in normal and culture-adapted human embryonic stem cells. Hum. Mol. Genet.:14:3129–3140.

57. Evans M.J., Kaufman M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 292: 154–156.

58. Findikli N., Kahraman S., Akcin O., Sertyel S., Candan Z. 2005. Establishment and characterization of new human embryonic stem cell lines. Reprod. Biomed. Online. 10 : 617–627.

59. Foudah D., Redaelli S., Donzelli E., Bentivegna A., Miloso M., Dalprà L., Tredici G.. 2009. Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. Chromosome Res. 17(8): 1025–1039.

60. Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 6: 230–247.

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

62. Fukunaga M., Nomura K., Ishikawa E., Ushigome S. 1997. Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumours. Histopathol. 30: 249-255.

63. Gaetje R., Kotzian S., Herrmann G., Baumann R., Starzinski-Powitz A. 1995. Invasiveness of endometriotic cells in vitro. The Lancet. 346:1463–1464.

64. Gargett C.E. 2007. Review article: stem cells in human reproduction. Reproductive Sciences. 14(5):405–424.

65. Gargett C.E., Masuda H. 2010. Adult stem cells in the endometrium. Mol. Hum. Reprod. 16: 818–834.

66. Gargett C.E., Schwab K.E., Zillwood R.M., Nguyen H.P., Wu D. 2009. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. Biol. Reprod. 80:1136–1145.

67. Gargett CE. 2006. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells. Aust. NZ J. Obstet. Gynaecol. 46 : 250–253.

68. Gogusev J., Bouquet de Jolinière J., Telvi L., Doussau M., du Manoir S.,Stojkoski A., Levardon M. 2000. Genetic abnormalities detected by comparative genomic hybridization in a human endometriosis-derived cell line. Mol Hum Reprod. 6(9):821–827.

69. Goligorsky MS, Chen J, Patschan S. 2009. Stress-induced premature senescence of endothelial cells: a perilous state between recovery and point of no return. Curr Opin Hematol 16:215–219.

70. Götte M. 2011. Characterization of endometrial mesenchymal stemlike cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. Fertil Steril. 95:423–426.

71. Guo Y.L., Chakraborty S., Rajan S.S., Wang R., Huang F. 2010. Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence, and self-renewal. Stem Cells Dev. 19: 1321–1331.

72. Gupta S., Knowlton A.A. 2002. Cytosolic HSP60, hypoxia and apoptosis. Circulation. 106: 2727–2733.

73. Hallajian Z., Mahjoubi F., Nafissi N.2017. Simultaneous ATM/BRCA1/RAD51 expression variations associated with prognostic factors in Iranian sporadic breast cancer patients. Breast Cancer. doi: 10.1007/s12282-016-0750-z.

74. Han X., Meng X., Yin Z., Rogers A., Zhong J., Rillema P., Jackson J.A., Ichim T.E., Minev B., Carrier E., Patel A.N., Murphy M.P., Min W.P., Riordan N.H.2009. Inhibition of intracrani- al glioma growth by endometrial regenerative cells. Cell Cycle. 8:606–610.

75. Harmon B.V., Corder A.M., Collins R.J., Gobé G.C., Allen J., Allan D.J., Kerr J.F.1990. Cell death induced in a murine mastocytoma by 42–47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. Int J Radiat Biol. 58:845–858.

76. Harris D.T., Badowski M., Ahmad N., Gaballa M.A. 2007. The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine. Expert. Opin. Biol. Ther. 7 : 1311−1322

77. Hartman C.G. 1944. Regeneration of the monkey uterus after surgical removal of the endometrium and accidental endometriosis.West J Surg Obstet Gynecol. 52:87–102.

78. Heins N., Lindahl A., Karlsson U., Rehnstrom M., Caisander G., Emanuelsson K., Hanson C., Semb H., Bjorquist P., Sartipy P., Hyllner J. 2006. Clonal derivation and characterization of human embryonic stem cell lines. J. Biotechnol. 122 : 511–520.

79. Hida N., Nishiyama N., Miyoshi S., Kira S., Segawa K., Uyama T., Mori T., Miyado K., Ikegami Y., Cui C., Kiyono T., Kyo S., Shimizu T., Okano T., Sakamoto M., Ogawa S., Umezawa A.2008. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. Stem Cells. 26:1695–1704.

80. Hildebrandt B., Wust P., Ahlers O., Dieing A., Sreenivasa G., Kerner T., Felix R., Riess H. 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. Crit Rev Oncol Hematol. 43:33–56.

81. Holland A. J. and Cleveland D.W. 2012.Telomere dysfunction and loss of p53 cooperate in defective mitotic segregation of chromosomes in cancer cells. EMBO Rep. 13(6): 501–514.

82. Hollowell J.G., Staehling N.W., Flanders W.D., Hannon W.H., Gunter E.W., Spencer C.A., Braverman L.E. 2002. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). J Clin Endocrinol Metab. 87(2):489–499.

83. Hompes P.G., Mijatovic V. 2007. Endometriosis: The way forward. Gynecol. Endocrinol. 23: 5–12.

84. Honchel R., McDonnell S., Schaid D.J., Thibodeau S.N. 1996. Tumor necrosis factor-

alpha allelic frequency and chromosome allelic imbalance in patients with colorectal cancer. Cancer Res. 56: 145–149.

85. Hronik-Tupaj M., Rice W.L., Cronin-Golomb M., Kaplan D.L., Georgakoudi I. 2011. Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields. Biomed Eng Online. 10:19.

86. Husein K.S., Thiemermann C. 2010. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. Stem cells. 28 : 585–596.

87. Ichim T.E., Alexandrescu D.T., Solano F., Lara F., Campion Rde N., Paris E., Woods E.J., Murphy M.P., Dasanu C.A., Patel A.N., Marleau A.M., Leal A., Riordan N.H. 2010a. Mesenchymal stem cells as antiinflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. Cell Immunol 260(2):75–82.

88. Ichim T.E., Solano F., Lara F., Rodriguez J.P., Cristea Octav, Minev B., Ramos F., Woods E.J., Murphy M. P., Alexandrescu D. T., Patel A. N., Riordan N. H. 2010b. Combination stem cell therapy for heart failure. Int Arch Med. 3(5).

89. Ideker T, Dutkowski J, Hood L. 2011.Boosting signal-to-noise in complex biology: prior knowledge is power. Cell. 144:860–863.

90. Inzunza J., Gertow K., Stromberg M.A., Matilainen E., Blennow E., Skottman H., Wolbank S., Ahrlund-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. 23(4):544–549.

91. Jiang W. P., Dewald G., Brundage E., Mucher G., Schildhaus H. U., Zerres K., Bond J. S. 1995. Fine mapping of MEP1A, the gene encoding the α subunit of the metalloendopeptidase meprin, to human chromosome 6P21.Biochem. Biophys. Res. Commun. 216: 630–635.

92. Jimbo H., Yoshikawa H., Onda T., Yasugi T., Sakamoto A., Taketani Y. 1997. Prevalence of ovarian endometriosis in epithelial ovarian cancer. Int. J. Gynecol. Obstetrics. 59: 245–250.

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

94. Jori F.P., Napolitano M.A., Melone M.A., Cipollaro M., Cascino A., Altucci L., Peluso G., Giordano A., Galderisi U. 2005. Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. J Cell Biochem. 94: 645–655.

95. Jorritsma J.B., Konings A.W. 1984. The occurrence of DNA strand breaks after hyperthermic treatments of mammalian cells with and without radiation. Radiat Res. 98:198–208.

96. Kampinga H.H., Dynlacht J.R., Dikomey E. 2004. Mechanism of radiosensitization by hyperthermia (> or = 43 degrees C) as derived from studies with DNA repair defective mutant cell lines. Int J Hyperth 20:131–139.

97. Kempner E.S. 1993. Damage to proteins due to the direct action of ionizing radiation. Q Rev Biophys. 26:27–48.

98. Kepkep K., Tuncay Y. A., Göynümer G., Tutal E. 2007. Transvaginal sonography in the diagnosis of adenomyosis: which findings are most accurate? Ultrasound ObstetricsGynecol. 30: 341–345.

99. Kihana T., Hamada K., Inoue Y., Yano N., Zketan H., Murao S., Ukita M., Matsuura S..1995. Mutation and allelic loss of the p53 genein endometrial carcinomaincidence and outcome in 92 surgical patients. Cancer. 76: 72–78.

100.Klimanskaya I., Chung Y., Becker S., Lu S.J., Lanza R. 2006. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. Nature. 444: 481–485.

101.Koh L.P., Chao N.J. 2004. Umbilical cord blood transplantation in adults using myeloablative and nonmyeloablative preparative regimens. Biol Blood Marrow Transplant. 10(1):1–22.

102.Kolinjivadi A.M., Sannino V., de Antoni A., Técher H., Baldi G., Costanzo V. 2017. Moonlighting at replication forks: a new life for homologous recombination proteins BRCA1, BRCA2 and RAD51. FEBS Lett. doi: 10.1002/1873-3468.12556.

103.Korner M., Burckhardt E., Mazzucchelli L. 2006. Higher frequency of chromosomal aberrations in ovarian endometriosis compared to extragonadal endometriosis: a possible link to endometrioid adenocarcinoma. Modern Pathol. 19: 1615–1623.

104.Lamb K., Hoffmann R.G., Nichols, T.R. 1986. Family trait analysis: a case control study of 43 women with endometriosis and their best friends. Am. J. Obstet. Gynecol. 154: 596–601.

105.Lee J.B., Song J.M., Lee J.E., Park J.H., Kim S.J., Kang S.M., Kwon J.N, Kim M.K., Roh S.I., Yoon H.S.2004. Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. Reproduction. 128(6):727–735

106.Li T., Zhou C. Q., Mai Q. Y., Zhuang G. L. 2005. Establishment of human embryonic stem cell line from gamete donors. Chin. Med. J. 118 : 116–122.

107.Lysdahl H., Gabrielsen A., Minger S. L., Patel M. J., Fink T., Petersen K., Ebbesen P., Zahar V. 2006. Derivation and characterization of four new human embryonic stem cell lines: the Danish experience. Reprod. Biomed. Online. 12 : 119–126

108.Maheshwari A., Gurunath S., Fatima F., Bhattacharya S. 2012. Adenomyosis and subfertility: a systematic review of prevalence, diagnosis, treatment and fertility outcomes. Human Reprod. Update. 18: 374-392.

109.Malinak L.R., Buttrum V.C., Elias S., Simpson J.L. 1980. Heritable aspects of endometriosis. II. Clinical characteristics of familial endometriosis. Am. J. Obstet. Gynecol.137: 332–338.

110.Matalliotakis I. M., Kourtis A. I., Panidis D. K. 2003. Adenomyosis. Obstetrics Gynecol. Clinics North Am. 30: 63–82.

111.Maximow A.A. 1909. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. Folia Haematologica. 8: 125–134.

112.McManus D. T., Yap E. P. H., Maxwell P., Russell S. E. H., Toner P. G., McGee J. D. 1994. p53 expression, mutation, and allelic deletion in ovarian cancer. J. pathol. 174:159–168.

113.Meng X., Ichim T.E., Zchong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K.W., Thebaud B., Riordan N.H. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. J. Transl. Med. 5: 57–66.

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

115.Missmer S. A., Cramer D. W. 2003. The epidemiology of endometriosis. Obstetrics Gynecol. Clinics North Am.30: 1–19.

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

117. Miura F., Kawaguchi N., Sese J., Toyoda A., Hattori M., Morishita S., Ito T. 2006. A large-scale full-length cDNA analysis to explore the budding yeast transcriptome. PNAS 103(47):17846–17851.

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

119.Moen M.H. 1994. Endometriosis in monozygotic twins. Acta Obstet.Gynecol. Scand. 73: 59–62.

120.Moen M.H., Magnus P. 1993. The familial risk of endometriosis. ActaObstet. Gynecol.

Scand. 72: 560–564.

121.Muller P., Vousden K. 2013.p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology* 15:2–8.

122.Murphy M.P., Wang H., Patel A.N., Kambhampati S., Angle N., Chan K., Marleau A.M., Pyszniak A., Carrier E., Ichim T.E., Riordan N.H. 2008. Allogeneic endometrial regenerative cells: An «Off the shelf solution» for critical limb ischemia? J. Transl. Med. 6:45.

123.Musina R. A., Bekchanova E. S., Belyavskii A. V., Sukhikh G. T. 2006. Differentiation potential of mesenchymal stem cells of different origin. Bull. Exp. Biol. Med. 141: 147–151.

124.Nestor C.E., Ottaviano R., Reinhardt D., Cruickshanks H.A., Mjoseng H.K., McPherson R.C., Lentini A., Thomson J.P., Dunican D.S., Pennings S., Anderton S.M., Benson M., Meehan R.R. 2015. Rapid reprogramming of epigenetic and transcriptional profiles in mammalian culture systems. Genome Biol. 16:11. doi: 10.1186/s13059-014-0576-y.

125.Niwa H., Miyazaki J., SmithA. G. 2000.Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells Nature Genetics 24: 372 – 376.

126.O'Neill K.L., Fairbairn D.W., Smith M.J., Poe B.S. 1998. Critical parameters influencing hyperthermia-induced apoptosis in human lymphoid cell lines. Apoptosis. 3:369–375.

127.Oh S. K., Kim H. S., Ahn H. J., Seol H. W., Kim Y. Y., Park Y. B., Yoon C. J., Kim D. W., Kim S. H., Moon S. Y. 2005. Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. Stem Cells. 23: 211–219.

128.Olive D.L., Schwartz L.B. 1993. Endometriosis. N. Engl. J. Med. 328: 1759-1769

129.Osborne R.J., Leech V.L. 1994. PCR allelotyping of human ovarian cancer. Br. J. Cancer. 69: 429–438.

130.Ozisik Y.Y., Meloni A.M., Surti U., Sandberg A.A. 1993. Deletion 7q22 in uterine leiomyoma. A cytogenetic review. Cancer Genet. Cytogenet. 71: 1–6.

131.Padykula H.A., Coles L.G., McCracken J.A. 1984. A zonal pattern of cell proliferation and differentiation in the rhesus endometrium during the estrogen surge. Biol Reprod. 31:1103–18.

132.Pandis N., Karaiskos C., Bardi G., Sfikas K., Tserkezoglou A., Fotiou S., Heim S1995. Chromosome analysis of uterine adenomyosis detection of the leiomyoma-associated del(7q) in three cases. Cancer Genet. Cytogenet. 80:118–120.

133.Park J. H., Kim S. J., Oh E. J., Moon S. Y., Roh S., Kim C. G., Yoon H. S. 2003. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. Biol. Reprod. 69: 2007–2014.

134.Parker A.M., Katz A.J. 2006. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. Expert. Opin. Bio. Ther. 6: 567−578.

135.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. 17:303–331.

136.Pawlik A., Nowak J.M, Grzanka D., Gackowska L., Michalkiewicz .J, Grzanka A. 2012. Hyperthermia induces cytoskeletal alterations and mitotic catastrophe in p53-deficient H1299 lung cancer cells. Acta Histochem. 115(1):8–15.

137.Phinney D.G., Sensebé L. 2013. Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. Cytotherapy. 15: 140–145.

138.Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 284 : 143–147.

139.Prinsloo E., Setati M.M., Longshaw V.M., Blatch G.L. 2009. Chaperoning stem cells: a role for heat shock proteins in the modulation of stem cell self-renewal and differentiation? BioEssays. 31:370–377.

140.Privat M., Aubel C., Arnould S., Communal Y., Ferrara M., Bignon Y.J. 2010. AKT and p21 WAF1/CIP1 as potential genistein targets in BRCA1-mutant human breast cancer cell lines. Anticancer Res. 30(6):2049–2054.

141.Prives C. 1998. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. Cell 95: 5–8.

142.Ranney B. 1971. Endometriosis. IV. Hereditary tendency. Obstet. Gynecol.37: 734–737.

143.Rebuzzini P., Pignalosa D., Mazzini G., Di Liberto R., Coppola A., Terranova N., Magni P., Redi C.A., Zuccotti M., Garagna S. 2012. Mouse embryonic stem cells that survive γ-rays exposure maintain pluripotent differentiation potential and genome stability. J Cell Physiol 227:1242–1249.

144.Redaelli S., Bentivegna A., Foudah D., Miloso M., Redondo J., Riva G., Baronchelli S., Dalprà L.,Tredici G. 2012. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of in vitro cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther. 3:47.

145.Richter K., Haslbeck M., Buchner J. 2010. The heat shock response: life on the verge of death. Mol Cell. 40:253–266.

146.Roemeling-van Rhijn M., de Klein A., Douben H., Pan Q., van der Laan L.J., Ijzermans J.N., Betjes M.G., Baan C.C., Weimar W., Hoogduijn M.J. 2013. Culture expansion induces non-tumorigenic aneuploidy in adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. Cytotherapy. 15:1352–1361.

147.Romanov S. R., Kozakiewicz K. B., Holst C.R., Stampfer M. R., Haupt L. M., Tlsty T. D. 2001. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. Nature. 409: 633–637.

148.Roselli E.A., Lazzati S., Iseppon F., Manganini M., Marcato L., Gariboldi M.B., Maggi F., Grati F.R., Simoni G. 2013. Fetal mesenchymal stromal cells from cryopreserved human chorionic villi: cytogenetic and molecular analysis of genome stability in long-term cultures. Cytotherapy. 15:1340–1351.

149.Røsland G. V., Svendsen A., Torsvik A., Sobala E., McCormack E., Immervoll H., Mysliwietz J., Tonn J.C., Goldbrunner R., Lønning E., Bjerkvig R., Schichor C. 2009. Long-term cultures of bone marrow–derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. Cancer Res. 69: 5331–5339.

150.Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M.C., de la Fuente R., Cigudosa J.C., Lloyd A.C.,Bernad A., 2005.Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res. 65:3035–3039.

151.Rydberg B. 2001. Radiation-induced DNA damage and chromatin structure. Acta Oncol. 40(6):682–685.

152.Sablina A.A., Chumakov P.M., Levine A.J., Kopnin B.P. 2001. p53 activation in response to microtubule disruption is mediated by integrin-Erk signaling. Oncogene 20(8):.899–909.

153.Salem H.K., Thiemermann C. 2010. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. Stem cells. 28(3): 585–596.

154.Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K et al. 2003. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. Exp. Cell Res. 287(2):289– 300.

155.Satoh Y., Ishikawa Y., Miyoshi T., Mukai H., Okumura S., Nakagawa K. 2003. Pulmonary metastases from a low-grade endometrial stromal sarcoma confirmed by chromosome aberration and fluorescence in-situ hybridization approaches: a case of recurrence 13 years after hysterectomy. Virchows Arch. 442: 173–178.

156.Schubbert S., Shannon K., Bollag G. 2007.Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nature Reviews Cancer 7: 295–308.

157.Schüring A.N., Schulte N., Kelsch R., Röpke A., Kiesel L., Götte M. 2011. Characterization of endometrial mesenchymal stemlike cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. Fertil Steril. 95:423–6.

158.Sensebé L. 2013.Beyond genetic stability of mesenchymal stromal cells.Cytotherapy. 15: 1307–1308.

159.Sensebé L., Tarte K., Galipeau J., Krampera M., Martin I., Phinney D.G., Shi Y. 2012. Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. Cell Stem Cell. 10: 9–10.

160.Seo B.M., Miura M., Gronthos S., Bartold P.M., Batouli S., Brahim J., Young M., Robey P.G., Wang C.Y., Shi S.2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet. 364(9429):149–155.

161.Sharpe-Timms K. L. 1997. Basic research in endometriosis. Obstetrics Gynecol. Clinics North Am. 24: 269–290.

162.Simon C., Escobedo C., Valbuena D., Genbacev O., Galan A., Krtolica A., Asensi A., Sanchez E., Esplugues J., Fisher S., Pellicer A. 2005. First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions. Fertil. Steril. 83: 246–249.

163.Simpson J.L., Elias S., Malinak L.R., Buttram V.C. 1980. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. Am. J. Obstet. Gynecol.137: 327–331.

164.Singh A., Singh A., Sen D. 2016. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010–2015). Stem Cell Research & Therapy. 7:82

165.Skottman H., Mikkola M., Lunbdin K., Olsson C., Stromberg A. M., Tuuri T., Otonkoski T., Hovatta O., Lahesmaa R. 2005. Gene expression signatures of seven individual human embryonic stem cell lines. 23: 1343–1356.

166.Sokolov M., Panyutin I., Onyshchenko M., Panyutin I., Neumann R. 2010. Expression of pluripotency-associated genes in the surviving fraction of cultured human embryonic stem cells is not significantly affected by ionizing radiation. Gene. 455:8–15.

167.Stolberg S., McCloskey K.E. 2009. Can shear stress direct stem cell fate? Biotechnol Progress. 25:10–19.

168.Strelchenko N., Verlinsky Y. 2006. Embryonic stem cells from morula. Meth. Enzymol. 418:93–108.

169.Sui B., Hu C., Liao L., Chen Y., Zhang X., Fu, X., Jin, Y. 2016. Mesenchymal progenitors in osteopenias of diverse pathologies: differential characteristics in the common shift from osteoblastogenesis to adipogenesis. Scientific Reports. 6: 30186.

170.Swijnenburg R.-J., Tanaka M., Vogel H., Baker J., Kofidis T., Gunawan F., Lebl D.R., Caffarelli A.D., de Bruin J.L., Fedoseyeva E.V., Robbins R.C. 2005. Embryonic Stem Cell Immunogenicity Increases upon Differentiation after Transplantation into Ischemic Myocardium.Circulation, 112, I166-I172.

171.Takahashi A., Matsumoto H., Nagayama K., Kitano M., Hirose S., Tanaka H., Mori E., Yamakawa N., Yasumoto J., Yuki K., Ohnishi K., Ohnishi T. 2004. Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing. Cancer Res. 64:8839–8845.

172.Tan J., Li P., Wang Q., Li Y., Li X., Zhao D., Xu X., Kong L. 2016. Autologous menstrual blood-derived stromal cells transplantation for severe Asherman's syndrome.Hum Reprod. 31(12):2723–2729.

173.Tang D.Q., Wang Q., Burkhardt B.R., Litherland S.A., Atkinson M.A., Yang L.J. 2012.In vitro generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. Am. J. Stem Cells. 1: 114–217.

174.Tarte K., Gaillard J., Lataillade J.J., Fouillard L., Becker M., Mossafa H., Tchirkov A., Rouard H., Henry C., Splingard M., Dulong J., Monnier D., Gourmelon P., Gorin N.C., Sensebé L. 2010. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. Blood. 115: 1549–1553.

175.Tashiro H., Isacson C., Levine R., Kurman R.J., Cho K.R., Hedrick L. 1997. p53 Gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. Am. J. Pathol. 150:177–185.

176.Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 282 (5391): 1145–1147.

177.Tibiletti M.G., Bernasconi B., Furlan D., Riva C., Trubia M., Buraggi G., Franchi M., Bolis P., Mariani A., Frigerio L., Capella C., Taramelli R. 1996. Early involvement of 6q in surface epithelial ovarian tumors. Cancer Res. 56: 4493–4498.

178.Todaro G. J., Green H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. J. Cell biol. 17: 299–313.

179.Torsvik A., Rosland G.V., Svendsen A., Molven A., Immervoll H., McCormack E., Lonning P.E., Primon M., Sobala E., Tonn J.C., Goldbrunner R., Schichor C., Mysliwietz J., Lah T.T., Motaln H., Knappskoq S., Bjerkviq R. 2010. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. Cancer Res. 70: 6393–6396.

180.Tower J. Stress and stem cells. 2012. WIREs Dev Biol. doi: 10.1002/wdev.56.

181.Toyoda M., Cui C., Umezawa A. 2007. Myogenic transdifferentiation of menstrual bloodderived cells. Acta Myol. 26:176–178.

182.Tresserra F., Grases P., Ubeda A., Pascual M.A., Grases P.J., Labastida R.1999. Morphological changes in hysterectomies after endometrial ablation. Hum Reprod. 14:1473–1477.

183.Tsuji S., Yoshimoto M., Takahashi K., Noda Y., Nakahata T., Heike T. 2008. Side population cells contribute to the genesis of human endometrium. Fertil Steril. 90(4 Suppl):1528–1537.

184.Ueyama H., Horibe T., Hinotsu S., Tanaka T., Inoue T., Urushihara H., Kitagawa A., Kawakami K. 2012. Chromosomal variability of human mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions. J. Cell Mol. Med. 16:.72–82.

185.Van de Stolpe A., van den Brink S., van Rooijen M., Ward-van Oostwaard D., van Inzen W., Slaper-Cortenbach I., Fauser B., van den Hout N., Weima S., Passier R., Smith N., Denning C., Mummery C. 2005. Human embryonic stem cells: towards therapies for cardiac disease. Derivation of a Dutch human embryonic stem cell line. Reprod. Biomed. Online. 11: 476–485.

186.VanderWaal R., Malyapa R.S., Higashikubo R., Roti Roti J.L. 1997. A comparison of the modes and kinetics of heat-induced cell killing in HeLa and L5178Y cells. Radiat Res. 148:455–462.

187.Velichko A.K., Markova E.N., Petrova N.V., Razin SV, Kantidze OL. 2013. Mechanisms of heat shock response in mammals. Cellular and Molecular Life Sciences. 70(22):4229–4241.

188.Velichko AK, Petrova NV, Kantidze OL, Razin SV. 2012. Dual effect of heat shock on DNA replication and genome integrity. Mol Biol Cell. 23:3450–3460.

189.Verlinsky Y., Strelchenko N., Kukharenko V., Rechitsky S., Verlinsky O., Galat V., Kuliev A. 2005. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. Reprod. Biomed. Online. 10: 105–110.

190.Vincenti V., Cassano C., Rocchi M., Persico M. G. 1996. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21. 3. Circulation. 93: 1493–1495.

191.Vinogradov A.E., Shilina M.A., Anatskaya O.V., Alekseenko L.L., Grinchuk T.M., Nikolsky N.N. 2016. Next generation sequencing shows long-term transcriptome activation in human endometrial mesenchymal stem cells after sublethal heat shock. Materials of 1st International Conference "Cell technologies at the edge: research & practice. Recent achievements in stem cells research": 117.

192.Wang P.H., Shyong W.Y., Lin C.H., Chen Y.J., Li Y.F., Chao H.T., Yuan C.C. 2002. Analysis of genetic aberrations in uterine adenomyosis using comparative genomic hybridization. Anal. Quant. Cytol. Histol. 24: 1–6.

193.Wang Y., Huso D.L., Harrington J., Kellner J., Jeong D.K., Turney J., McNiece I.K. 2005. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. Cytother. 7: 509–519.

194.Wang Y., Zhang Z., Chi Y., Zhang Q., Xu F., Yang Z., Meng L., Yang S., Yan S., Mao A., J Zhang, 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. 4:e950.

195.Ware C. B., Nelson A. M., Blau C. A. 2006. A comparison of NIH-approved human ESC lines. Stem Cells. 24: 2677–2684.

196.Warters R.L., Brizgys L.M., Axtell-Bartlett J. 1985. DNA damage production in CHO cells at elevated temperatures. J Cell Physiol. 124:481–486.

197.Wilson K.D., Sun N., Huang M., Zhang W.Y., Lee A.S., Li Z., Wang S.X., Wu J.C. 2010. Effects of ionizing radiation on self-renewal and pluripotency of human embryonic stem cell. Cancer Res.; 70: 5539–5548.

198.XuJ., ChenY., OlopadeO. I. 2010. MYC and Breast Cancer.Genes Cancer. 1(6): 629–640.

199.Yu S.P., Wei Z., Wei L. 2013. Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy. Translational stroke research. 4(1):76–88.

200.Zaman W.S., Makpol S., Sathapan S., Chua K.H. 2014. Long-term in vitro expansion of human adipose-derived stem cells showed low risk of tumourigenicity. J. Tiss. Eng. Regen. Med. 8: 67–76.

201.Zeng X., Miura T., Luo Y., Bhattacharya B., Condie B., Chen J., Ginis I., Lyons I., Mejido J., Puri R. K., CRao M. S., Freed W. J. 2004. Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. Stem Cells. 22: 222–231.

202.Zhang J., Huang X., Wang H., Liu X., Zhang T., Wang Y. 2015. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy.Stem Cell Res Ther.6: 234.

203.Zhong Z., Patel A.N., Ichim T.E., Riordan N.H., Wang H., Min W.P., Woods E.J., Reid M., Mansilla E., Marin G.H., Drago H., Murphy M.P., Minev B. 2009. Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. J. Transl. Med. 7: 15−21.

204.Ziegler A., Field L.L., Sakagushi A.Y. 1990. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6. Cytogenet. Cell Genet.55:118–121.

205.Zuk P.A, Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 7:211–228.