

В.А. Никитина, Т.А. Астрелина, В.Ю. Нугис, И.В. Кобзева, Е.Е. Ломоносова, Ю.Б. Сучкова, Т.Ф. Маливанова, В.А. Брунчуков, Д.Ю. Усупжанова, В.А. Брумберг, А.А. Расторгуева, Е.И. Добровольская, Т.В. Карасева, М.Г. Козлова, М.В. Пустовалова, А.К. Чигасова, Н.Ю. Воробьева, А.Н. Осипов, А.С. Самойлов

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В МАЛЫХ И СРЕДНИХ ДОЗАХ

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Виктория Андреевна Никитина, e-mail: nikitinava@yandex.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Оценить влияние однократного воздействия рентгеновского излучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр на частоты и спектр хромосомных aberrаций (ХА) в клеточной линии мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) человека в процессе длительного культивирования.

Материал и методы: ММСК выделяли из слизистой ткани десны человека ферментативным способом и культивировали в бес-сывороточной среде. Присутствие поверхностных антигенов определяли с помощью метода проточной цитометрии. Способность клеточной линии дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях исследовали с использованием индукционных сред. Аутентификацию осуществляли методом генотипирования полиморфных STR-локусов, цитогенетический анализ – методом мультицветной флуоресцентной гибридизации *in situ* (mFISH). Облучение проводили на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия) при мощности дозы 40 мГр/мин, напряжении 100 кВ, токе 0,8 мА.

Результаты: На первом пассаже после облучения статистически достоверное увеличение частоты неклональных ХА по сравнению с контролем зафиксировано после облучения в дозе 80, но не 250 и 1000 мГр. На поздних этапах культивирования средняя частота разрывов на хромосому в группе необлученных клеток не отличалась от значений, полученных после облучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр ($p > 0,05$). Однако в ММСК, облученных в дозе 80 мГр, чаще происходили повреждения в парах хромосом 6 и 10, а в дозе 1000 мГр – в паре хромосом 9. Однократное облучение ММСК *in vitro* не повлияло на рост и прогрессию характерных для исследованной первичной клеточной линии ММСК клональных клеток с хромосомными транслокациями и моносомией X, но привело к увеличению представленности клона с тетрасомией 8. Общее количество возникших *de novo* случайных клонов с хромосомными транслокациями увеличилось только после облучения в дозе 1000 мГр.

Заключение: Незначительные колебания доли клеток с неклональными ХА в зависимости от полученной дозы на ранних сроках после облучения (1–4 пассаж) исчезали на поздних этапах культивирования (8–14 пассаж). Средние частоты разрывов в хромосомах облученных и необлученных ММСК не отличались, но после облучения повреждения в некоторых хромосомах могли происходить чаще, чем в других. Однократное рентгеновское облучение ММСК может способствовать росту и прогрессии первичных патологических цитогенетических клонов независимо от полученной дозы, а также увеличению общего количества возникших *de novo* клеточных клонов с хромосомными транслокациями.

Ключевые слова: мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, хромосомные aberrации, mFISH, рентгеновское излучение, малые дозы

Для цитирования: Никитина В.А., Астрелина Т.А., Нугис В.Ю., Кобзева И.В., Ломоносова Е.Е., Сучкова Ю.Б., Маливанова Т.Ф., Брунчуков В.А., Усупжанова Д.Ю., Брумберг В.А., Расторгуева А.А., Добровольская Е.И., Карасева Т.В., Козлова М.Г., Пустовалова М.В., Чигасова А.К., Воробьева Н.Ю., Осипов А.Н., Самойлов А.С. Цитогенетический анализ клеточной линии мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека при длительном культивировании после воздействия рентгеновского излучения в малых и средних дозах // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2023. Т. 68. № 1. С. 5–14. DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-1-5-14

V.A. Nikitina, T.A. Astrelina, V.Yu. Nugis, I.V. Kobzeva, E.E. Lomonosova, Yu.B. Suchkova, T.F. Malivanova, V.A. Brunchukov, D.Yu. Usupzhanova, V.A. Brumberg, A.A. Rastorgueva, E.I. Dobrovolskaya, T.V. Karaseva, M.G. Kozlova, M.V. Pustovalova, A.K. Chigasova, N.Yu. Vorobyeva, A.N. Osipov, A.S. Samoilov

Cytogenetic Analysis of the Cell Line of Multipotent Human Mesenchymal Stromal Cells during Long-Term Cultivation after Exposure to X-Ray Radiation at Low and Medium Doses

A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

Contact person: V.A. Nikitina, e-mail: nikitinava@yandex.ru

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the frequency and spectrum of chromosome aberrations under X-Ray exposure at doses of 80, 250, and 1000 mGy in a human multipotent mesenchymal stromal cell (MMSC) cell line during long-term cultivation.

Material and methods: MMSCs were isolated from human gingival mucosa by an enzymatic method and cultured in a serum-free medium. The presence of surface antigens was determined using the method of flow cytometry. The ability of the cell line to differentiate in the osteogenic, adipogenic, and chondrogenic directions was studied using induction media. Authentication was performed by genotyping of

polymorphic STR loci, cytogenetic analysis was performed by multicolor fluorescent *in situ* hybridization (mFISH). Irradiation was carried out on an X-ray biological unit RUB RUST-M1 (Russia) at a dose rate of 40 mGy/min, a voltage of 100 kV, and a current of 0.8 mA. **Results:** At the first passage after irradiation, a statistically significant increase in the frequency of non-clonal CA compared with the control was recorded at a dose of 80, but not 250 and 1000 mGy. At the late stages of cultivation, the average frequency of breaks per chromosome in the group of non-irradiated cells did not differ from the values obtained after irradiation at doses of 80, 250, and 1000 mGy ($p > 0.05$). However, in MMSCs irradiated at a dose of 80 mGy, damage occurred more often in pairs of chromosomes 6 and 10, and at a dose of 1000 mGy, in a pair of chromosomes 9. A single irradiation of MMSCs *in vitro* did not affect the growth and progression of MMSCs characteristic of the studied primary cell line, of clonal cells with chromosome translocations and monosomy X, but led to an increase in the representation of a clone with tetrasomy 8. The total number of random clones with chromosome translocations that arose *de novo* increased after irradiation at a dose of 1000 mGy.

Conclusion: Minor fluctuations in the proportion of cells with non-clonal CA, depending on the dose received in the early stages after irradiation (passage 1–4), disappeared at the later stages of cultivation (passage 8–14). There were no differences in mean frequencies between irradiated and non-irradiated MMSCs, but after irradiation, damage to some chromosomes could occur more frequently than others. A single X-ray irradiation of MMSCs can promote the growth and progression of primary pathological cytogenetic clones, regardless of the dose received, as well as an increase in the total number of *de novo* cell clones with chromosomal translocations that have arisen. A single X-ray irradiation of MMSCs can promote the growth and progression of primary pathological cytogenetic clones, regardless of the dose received, as well as an increase in the total number of *de novo* cell clones with chromosomal translocations that have arisen.

Keywords: mesenchymal multipotent stromal cells, chromosome aberrations, mFISH, X-ray irradiation, low doses

For citation: Nikitina VA, Astrelina TA, Nugis VYu, Kobzeva IV, Lomonosova EE, Suchkova YuB, Malivanova TF, Brunchukov VA, Usupzhanova DYu, Brumberg VA, Rastorgueva AA, Dobrovolskaya EI, Karaseva TV, Kozlova MG, Pustovalova MV, Chigasova AK, Vorobyeva NYu, Osipov AN, Samoilov AS. Cytogenetic Analysis of the Cell Line of Multipotent Human Mesenchymal Stromal Cells during Long-Term Cultivation after Exposure to X-Ray Radiation at Low and Medium Doses. Medical Radiology and Radiation Safety. 2023;68(1):5–14. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-1-5-14

Введение

Соматические или тканевые стволовые клетки – это недифференцированные, характеризующиеся свойствами самообновления и пластичности, долгоживущие клетки, присутствующие во всех тканях организма человека. Для сохранения функциональной активности и генетической стабильности тканевые стволовые клетки *in vivo* могут длительное время не вступать в стадию митоза [1–3]. Состояние покоя, с одной стороны, позволяет избежать ошибок репликации и сохранить клеточный пул стволовых клеток в тканях, а с другой – способствует накоплению генетических нарушений, возникающих в результате спонтанного мутагенеза. Преимущественным способом репарации в неделящихся клетках является негомологичная рекомбинация (NHEJ), подверженная ошибкам, приводящим к формированию различных структурных хромосомных перестроек [1, 4–7]. После активации пролиферации возможным механизмом сохранения исходной ДНК-матрицы стволовых клеток является асимметричное деление, при котором одна дочерняя клетка остаётся стволовой и сохраняет способность к самоподдержанию, а вторая – вступает на путь дифференциации. Предполагается, что пространственное разделение таких клеток *in vivo* обеспечивает тканевое микроокружение: клетки с матричной ДНК остаются в «стволовой нише», а клетки с дочерней вновь синтезированной цепочкой ДНК, с возможными ошибками, дифференцируются, утрачивая способность к делению [4, 8].

Способность к самообновлению, морфологическая и иммунофенотипическая схожесть, зависимость от микроокружения, подтвержденная экспериментально возможность опухолевой трансформации – это свойства не только нормальных соматических, но и раковых стволовых клеток. Происхождение опухолевых стволовых клеток из клеточного пула тканевых стволовых клеток является предметом обсуждения, в том числе и Международной комиссии по радиационной защите, один из докладов которой посвящен исследованиям механизмов радиационно-индуцированного канцерогенеза и биологии стволовых клеток [1]. Особое внимание уделяется исследованию отдаленных эффектов ионизирующего излучения в малых дозах, получаемых в результате воздействия естественного радиационного фона, при использовании диагностических и лечебных медицинских

процедур, связанных с применением ионизирующих излучений. Проблема обсуждается в аспекте сравнительной оценки радиочувствительности соматических стволовых клеток, выделенных из разных тканей, и взаимосвязи механизмов радиационного канцерогенеза с возраст-зависимым истощением «стволового» пула.

ММСК – гетерогенная популяция соматических мультипотентных стромальных фибробластоподобных клеток, обнаруженных во многих тканях и органах человека. Они демонстрируют свойства пластичности, высокой пролиферативной активности и генетической стабильности при культивировании [9], а по радиорезистентности *in vitro*, по мнению M.F. Chen et al [10], сопоставимы с опухолевой иммортализованной клеточной линией аденокарциномы легкого человека A549. После воздействия ионизирующего излучения в больших дозах *in vitro* ММСК могут сохранять профиль поверхностных рецепторов (иммунофенотип) и способность к дифференцировке в трех направлениях (хондрогенном, адипогенном, остеогенном), но при этом их пролиферативная активность и способность к клонообразованию могут снижаться, сопровождаясь появлением экспрессии биологических маркеров, ассоциированных со старением [11–13]. *In vivo* стромальные клетки костного мозга считаются более радиорезистентными по сравнению с гемопоэтическими. Об этом свидетельствуют факты обнаружения аутологических ММСК в костном мозге пациентов после тотального облучения и высокодозной химиотерапии с последующей успешной аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток [2, 14]. Механизмы радиорезистентности ММСК до конца не изучены, но есть сведения об эффективном ответе ММСК *in vitro* на радиационно-индуцированные повреждения ДНК на уровне сигнальных путей, регулирующих контрольные точки клеточного цикла и запуск репарации [10].

Исследование цитогенетических эффектов воздействия радиации на стволовые клетки человека, в частности ММСК, позволяет оценить не только количественный кластогенный эффект облучения (способность к образованию двунитевых разрывов ДНК), но и, при использовании технологии длительного культивирования *in vitro*, отследить отсроченные эффекты, обусловленные некорректной репарацией радиационно-

индуцированных разрывов ДНК, открывая возможность интерпретации канцерогенной индукции без привязки к моделям дозовых кривых. В этом случае при анализе учитывается не только общее количество хромосомных повреждений, но и особенности клонообразования, клеточной прогрессии и отбора клеток с ХА, а также распределения спонтанных и радиационно-индуцированных разрывов хромосом по геному.

Увеличение частоты возникновения ХА разного типа является одним из самых чувствительных и специфичных биологических маркеров радиационного поражения [15]. Для оценки влияния ионизирующего излучения на частоты ХА в ММСК человека в настоящем исследовании был использован метод мультицветного FISH окрашивания хромосом (mFISH), который, благодаря точной идентификации всех пар хромосом кариотипа человека, позволяет описать все известные типы хромосомных повреждений размером более 5 Мб и уменьшить объём статистически значимой выборки анализируемых метафазных клеток.

Материал и методы

Выделение и культивирование ММСК

Биоптат слизистой десны инкубировали в среде, содержащей DMEM F12, 2 % фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 200 Ед/мл пенициллина, 200 мг/мл стрептомицина, 200 Ед/мл амфотерицина и 100 Ед/мл гентамицина (StemCell Technology, США), при 37 °С не менее 8 ч. Затем диспергировали и инкубировали в 0,25 %-ном растворе трипсин-EDTA при 37 °С в течение 1 ч, отмывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали в 0,15 %-ной коллагеназе II типа (Sigma, США) при 37 °С в течение 2 ч. Полученные клеточные суспензии отмывали фосфатно-солевым буфером и высаживали в вентилируемые культуральные флаконы при 37 °С и 5 % CO₂ в культуральной среде MesenCult™ MSC Basal Medium Human (Stem Cell Biology, США). Через 1–3 сут неприлипшие клетки удаляли сменой среды. Через 14 сут клетки снимали с пластика с помощью 0,25 %-ного раствора трипсин-EDTA и затем пассировали каждые 7 сут в бессывороточной среде MesenCult™ MSC Basal Medium Human (Stem Cell Biology, США).

Оценка дифференцировочного потенциала и иммунофенотипа ММСК

Принадлежность к ММСК оценивали с учетом требований Международной организации клеточной терапии [16]. Дифференцировку клеток осуществляли по стандартным методикам согласно инструкции производителя (Biological Industries, США). На 3-ем пассаже при достижении клетками 80–90 % конfluenceности производили смену питательной среды на индукционные среды: полные питательные среды с дифференцировочными факторами для остеогенной (MSCgo™ Osteogenic XF differentiation media; Biological Industries, США), хондрогенной (MSCgo™ Chondrogenic differentiation medium; Biological Industries, США) и адипогенной (MSCgo™ Adipogenic XF differentiation media; Biological Industries, США) дифференцировки. В качестве контроля использовали ММСК тех же образцов и пассажей, культивированных в стандартной ростовой среде без добавления дифференцировочных добавок.

Имунофенотип ММСК исследовали на проточном цитометре BDFACS Canto II. Окрашивание клеток проводили с помощью моноклональных антител против поверхностных антигенов CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, HLA-DR, конъюгированных с флуорохромами в соответствии с рекомендациями производителя (BDBiosciences, США).

Аутификация ММСК с использованием STR-типирования

Для контроля происхождения и отсутствия кросс-контаминации клеточной линии выполняли анализ коротких tandemных повторов (STR-типирование) с использованием набора реагентов COrDIS Plus (Гордиз, Россия). Для выделения ДНК применяли ПЦР-совместимый реагент для лизиса COrDIS Sprint (Гордиз, Россия), затем запускали мультиплексную амплификацию 19-ти STR-маркеров и локуса амелогенина человека и разделяли фрагменты с использованием капиллярного электрофореза (Гордиз, Россия).

Облучение ММСК

Облучение клеток проводили однократно на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия), оснащенной двумя рентгеновскими излучателями, при мощности дозы 40 мГр/мин, напряжении 100 кВ и силе тока 0,8 мА (фильтр 1,5 мм А1) с охлаждением термогранулами до температуры 4 °С. Культуральные флаконы с конfluenceнтным монослоем ММСК облучали в среде культивирования, полученные дозы составили 80, 250 и 1000 мГр. Погрешность отпускаемой дозы не превышала 15 %.

Цитогенетический анализ препаратов ММСК

Цитогенетический анализ ММСК проводили до начала эксперимента на 5-ом пассаже культивирования, а затем после облучения – на 1, 4, 8, 10, 12 и 14-ом пассажах после воздействия рентгеновского излучения. На каждом пассаже исследовали четыре группы культур: необлученные клетки в качестве контроля и облученные в дозах 80, 250 и 1000 мГр. Для проведения цитогенетического исследования через 2–3 сут после пассирования при достижении клетками фазы логарифмического роста во флакон добавляли колхицин до конечной концентрации 0,005 мкг/мл на 4–5 ч для накопления митотических клеток. После этого клетки снимали со дна флакона с помощью раствора трипсин-EDTA (StemCell, США) (2–5 мин при 37 °С). Гипотонизацию осуществляли 0,55 %-ным раствором KCl (10 мин при 37 °С). Фиксировали клетки смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (в объёмном соотношении 3:1) с использованием трех смен фиксатора. Полученные клеточные суспензии раскапывали на охлажденные влажные стекла и подсушивали.

Для окраски mFISH цитогенетические препараты подвергали щелочной денатурации, проводили гибридизацию с дифференциальными мечеными специфичными ДНК-зондами (24XСyte; MetaSystems, Germany) в течение 24–48 ч. Затем препараты отмывали в растворе 0,4-кратного SSC при 72 °С в течение 2 мин и в растворе 2-кратного SSC-Tween 20 в течение 30 с при комнатной температуре, контрастировали красителем DAPI, следуя протоколу производителя (MetaSystems, Germany). Препараты автоматически сканировали и фотографировали, а затем анализировали с помощью программного обеспечения ISYS (Metasystems, Германия). Для анализа отбирали метафазные пластинки по принципу общей цитологической пригодности. Признаком клоальности в соответствии с международной цитогенетической номенклатурой [17] считали выявление трех идентичных клеток с гипопloidией или двух с гиперпloidией или структурной хромосомной аномалией.

Статистическая обработка

Статистический анализ экспериментальных данных проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 7. Значимость различий оценивали с помощью точного критерия Фишера и *t*-критерия Стью-

дента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы с уровнем значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Клеточная линия ММСК слизистой десны человека была охарактеризована до начала эксперимента и соответствовала требованиям Международной организации клеточной терапии [16]. На 5-ом пассаже культивирования она представляла собой морфологически гомогенную фибробластоподобную монослойную культуру клеток с четко очерченными ядрами, перинуклеарной зернистостью и длинными отростками. Способность клеток к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях была подтверждена согласно протоколу производителя. При анализе иммунофенотипа с помощью проточной цитометрии было выявлено присутствие в большом количестве (более 96 %) маркеров, характерных для ММСК: CD90 (N-гликозилированный заякоренный белок с варибельным иммуноглобулиноподобным доменом), CD105 (эндоглин), CD73 (экто-5'-нуклеотидаза) и малое количество (менее 1,7 %) маркеров гемопоэтического и лимфоцитарного происхождения – CD34, CD45, а также HLA-DR.

С использованием мультилокусного генотипирования полиморфных STR-локусов хромосомной ДНК была описана уникальная комбинация 19 STR-маркеров (табл. 1). После длительного культивирования и облучения не было обнаружено мутаций, меняющих последовательности или количество STR повторов, что свидетельствует об отсутствии кросс-контаминации в исследованных клеточных образцах и о стабильности генетических профилей клеточной линии.

Таблица 1
Локусы STR–повторов исследованной клеточной линии ММСК
Loci of STR (short tandem repeats) in the studied MMSC cell line

Маркер	Расположение на хромосоме	Локусы STR–повторов
X/Y амелогенин	Xp22.1–22.3 Yp11.2	Присутствует Присутствует
D3S1358	3p21.31	15 / 16
TH01	11p15.5	9,3 / 9,3
D12S391	12p13.2	18 / 19
D1S1656	1q42	17,3 / 17,3
D10S1248	10q26.3	11 / 15
D22S1045	22q12.3	11 / 17
D2S441	2p14	14 / 15
D7S820	7q21.11	9 / 10
D13S317	13q31.1	8 / 11
FGA	4q31.3	21 / 21
TPOX	2p25.3	8 / 8
D18S51	18q21.33	12 / 14
D16S539	16q24.1	11 / 12
D8S1179	8q24.13	13 / 14
CSF1PO	5q33.1	10 / 11
D5S818	5q23.2	11 / 12
VWA	12p13.31	17 / 17
D21S11	21q21.1	29 / 30
SE33	6q14	22 / 35,2

Для цитогенетического описания исследованной клеточной линии ММСК на пятом пассаже культивирования были проанализированы 252 митотические клетки, исходный кариотип которых был охарактеризован как нормальный мужской (46,XY) (табл. 2). В 3,2 % клеток наблюдали полиплоидию, кратное увеличение набора

Таблица 2

Цитогенетическая характеристика
исходной клеточной линии ММСК человека

Cytogenetic characterization of the original human MMSC cell line

Характеристика	Цитогенетическое описание	Доля клеток, %
Кариотип конституциональный	46,XY [221]	87,7±2,1
Полиплоидия	92,XXYY [8]	3,2±1,1
Неклональные транслокации	46,XY,t(X;1)(p22.1;p22) [1] 46,XY,t(X;2)(p21;q12) [1] 46,XY,t(Y;1)(p11.2;p13) [1] 46,XY,t(2;6)(q37;q13),t(16;22)(q22;q13) [1] 46,XY,t(2;7)(q14;p15) [1] 46,XY,t(2;17)(p21;p11.2) [1] 46,XY,t(7;13)(p22;q12) [1] 46,XY,t(6;9)(q24;q34) [1] 46,XY,t(6;9)(q21;q31) [1] 46,XY,t(5;16)(q11.2;p13.3) [1]	4,0±1,2
Клональные клетки (всего)		5,2±1,4
Тетрасомия 8	48,XY,+8,+8 [6]	2,4±1,0
Моносомия X	45,X,-Y [3]	1,2±0,7
Транслокация 1	46,XY,t(1;16)(p13;q13) [2]	0,8±0,6
Транслокация 2	46,XY,t(5;9)(p13;q34) [2]	0,8±0,6

Примечание: В квадратных скобках дано количество клеток с указанным кариотипом

хромосом, что соответствует ранее полученным данным о частоте полиплоидии в ММСК человека из разных источников и от разных доноров [18]. В 4 % клеток были выявлены неклональные ХА, в 5,2 % – клональные хромосомные аномалии (табл. 2). Частота спонтанных неклональных ХА соответствует полученным ранее результатам об уровне хромосомных aberrаций в линиях ММСК, выделенных из разных тканей человека [18]. Среди клеток с клональными хромосомными аномалиями, 3,6 % были анеуплоидными: с моносомией X (потерей хромосомы Y) и тетрасомией 8 (двумя дополнительными хромосомами 8); а остальные 1,6 % содержали хромосомные транслокации: t(1;16)(p13;q13) и t(5;9)(p13;q34). Ранее было показано, что для части культур ММСК уже на ранних пассажах в процессе адаптации к условиям культивирования *in vitro* характерно подобное клонообразование клеток с аномальным кариотипом. Это связывают с нерегулируемым накоплением ХА и дальнейшим отбором тех из них, которые влияют на селективную пролиферацию, а также колониеобразующим характером роста фибробластоподобных клеточных линий [19–21]. Все выявленные цитогенетические клоны были небольшими и не превышали 10 %-ный уровень, допустимый Международным обществом клеточной терапии [22]. Этот факт наряду с описанным STR профилем и низким уровнем неклональных ХА позволяет сделать вывод о генетической стабильности исследованной клеточной линии до пятого пассажа культивирования.

Дальнейший цитогенетический анализ проводили, ведя отсчёт пассажей от дня рентгеновского облучения (1, 4, 8, 10, 12 и 14 пассажи) и сравнивая группы необлученных (0 мГр) и облученных (80, 250 и 1000 мГр) ММСК. На первом пассаже после облучения статистически достоверное увеличение доли клеток с неклональными ХА по сравнению с контрольной группой (0 мГр) наблюдали только при дозе 80 мГр ($p < 0,05$), в отличие от групп 250 и 1000 мГр ($p > 0,05$). На последующих пассажах ни одна из групп облученных клеток (80, 250, 1000

Таблица 3

Частоты ХА в клеточной линии ММСК на разных пассажах культивирования после облучения в различных дозах
Frequencies of CA (chromosomal aberrations) in the MMSC cell line at different passages of cultivation after irradiation at different doses

Пас-саж	Число мета-фаз	Транс-локации некло-нальные	Транс-локаций всего	Хромосо-мные и хро-матидные фрагменты	Дру-гие ХрА [^]	Частота клеток с не-клональны-ми ХрА, %
0 мГр						
1	75	0,013	0,013	0,027	0	4,00±2,26
4	92	0,065	0,065	0,000	0	6,52±2,57
8	103	0,087	0,087	0,010	0	9,71±2,92
10	100	0,050	0,060	0,030	0	8,08±2,74
12	109	0,064	0,064	0,018	0	8,26±2,64
14	63	0,032	0,032	0,048	0	7,94±3,41
80 мГр						
1	93	0,054	0,054	0,065	0,011	12,90±3,48*
4	93	0,086	0,108	0	0	8,79±2,97
8	110	0,045	0,055	0,018	0,018	8,26±2,64
10	95	0,042	0,042	0,011	0	5,26±2,29**
12	56	0,036	0,036	0,018	0,018	7,14±3,44
14	112	0,018	0,018	0,036	0	5,36±2,13**
250 мГр						
1	97	0,021	0,021	0,041	0	6,19±2,45
4	97	0,113	0,155	0	0	11,83±3,35
8	103	0,068	0,117	0,010	0,010	9,18±2,92
10	100	0,020	0,030	0,040	0	6,06 ±2,4
12	91	0,055	0,066	0,011	0	6,67±2,63
14	66	0,015	0,015	0,030	0,015	6,06±2,94
1000 мГр						
1	103	0,068	0,126	0,010	0,010	9,28±1,47
4	78	0,103	0,103	0,013	0	11,54±3,62
8	113	0,097	0,106	0,009	0	10,71±2,92
10	94	0,053	0,053	0,011	0	6,38±2,52
12	74	0,027	0,041	0	0	2,74±1,91
14	111	0,063	0,126	0,036	0	10,58±3,02

Примечания:

[^] – Центрические кольца, дицентрики, инсерции;
 * – Статистически существенные отличия при сравнении с контрольной группой (0 мГр);
 ** – Статистически существенные отличия при сравнении с первым пассажем после облучения в дозе 80 мГр

мГр) существенно не превышала контрольные значения (табл. 3). При этом уровень ХА в ММСК, облученных в дозе 80 мГр, снижался в процессе культивирования, статистически значимые отличия были выявлены между первым и десятым, а также первым и четырнадцатым пассажами (12,90 ± 3,48 против 5,26 ± 2,29 и 5,36 ± 2,13 соответственно, табл. 3). Наблюдаемые флуктуации доли клеток с ХА в зависимости от полученной дозы на ранних сроках после облучения (1–4 пассаж) не вписывались в линейно-квадратичную модель ($Y=aD + \beta D^2$) дозовой зависимости. Более того, на поздних этапах культивирования (8-14 пассаж) они были нивелированы (рис. 1). Средние частоты неклональных ХА на поздних пассажах не отличались в облученных (80, 250, 1000 мГр) и необлученных культурах (0 мГр) и в среднем составили 7,53 ± 0,68 % (от 6,5 до 8,5 %). При сравнении с уровнем ХА в необлученных ММСК до начала эксперимента на 5 пассаже (4,0 ± 1,2 %) были выявлены статистически существенные отличия ($p < 0,05$). Повышение частоты ХА на поздних пассажах, видимо, связано с эффектом накопления aberrантных клеток в диплоидных клеточных линиях при культивировании [18–20]. После облучения в спектре ХА появлялись центрические

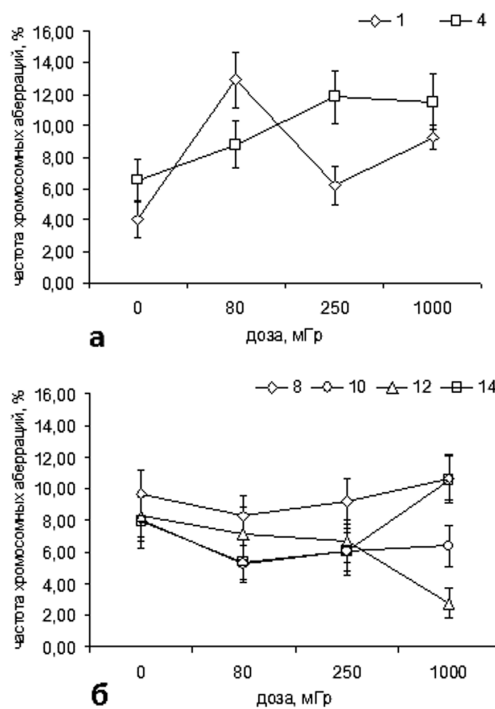


Рис. 1. Кривые зависимости частот ХА от дозы облучения на ранних (а) и поздних (б) пассажах культивирования ММСК

Fig.1. Dependency curves for CA frequencies and irradiation dose at early (a) and late (b) passages of MMSC cultivation

кольца, дицентрики и инсерции (вставка участка одной хромосомы в другую), а также комплексные ХА, сочетающие транслокации по трем и более хромосомам одновременно. Таким образом, был зафиксирован «кластерный эффект» радиации, связанный с формированием пострепарационных сложных (комплексных) перестроек. В то же время, при учёте только количественных параметров, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии значимого влияния однократного рентгеновского облучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр на уровень неклональных ХА в исследованной клеточной линии ММСК человека на поздних этапах культивирования.

Отсутствие значимого повышения уровня ХА на ранних пассажах после облучения 250 и 1000 мГр может быть связано с временной остановкой клеточного цикла в клетках с радиационными повреждениями ДНК [10], в этом случае получение метафазных клеток методически невозможно. Нельзя исключать и известные факты о радиорезистентности ММСК *in vitro* [10–14], связанные с эффективными процессами активации контрольных точек клеточного цикла, антиоксидантной защитой и репарации разрывов ДНК в них. Интересен тот факт, что кинетика репарации двойных разрывов в культивируемых ММСК человека после облучения в малых и средних дозах может отличаться. Через 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозе 80 мГр наблюдали феномен длительного поддержания повышенного числа фокусов γ H2AX (до 33 %), тогда как в тот же временной промежуток после облучения в дозе 1000 мГр только 1,3 % γ H2AX фокусов было зафиксировано в ядрах ММСК [23, 24].

Кроме того, осуществление экспериментов по оценке радиочувствительности адгезивных клеточных линий *in vitro* затрудняет асинхронность процесса пролиферации в них. Даже при тщательном планировании невозможно избежать вариабельности количественных эффектов из-за нахождения клеток в культуре на разных стадиях клеточного цикла с разной степенью чувствительности

к облучению. Поэтому дальнейший анализ был связан с описанием и интерпретацией качественных эффектов однократного облучения на длительно-культивируемые ММСК, таких как изменение представленности существующих цитогенетических клонов, отбор клеток с новыми генетическими нарушениями и клонообразование, клеточная прогрессия, а также распределение спонтанных и радиационно-индуцированных разрывов хромосом в кариотипе.

Для выявления нестабильности отдельных пар хромосом была рассчитана частота возникновения и распределения повреждений в них в облученных и необлученных культурах ММСК. Для этого средние частоты разрывов на каждые 100 проанализированных метафаз были пересчитаны на 1 Мб (1 млн пар оснований) длины каждой из хромосом с использованием геномной базы Human Genome Assembly, версии GRCh38.p14 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human/data] (рис. 2). Средняя частота разрывов на пару хромосом в группе необлученных клеток ($0,0020 \pm 0,0003$) не отличалась от значений, полученных после облучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр, соответственно: $0,0021 \pm 0,0003$; $0,0018 \pm 0,0002$; $0,0023 \pm 0,0002$ ($p > 0,05$). Однако при анализе внутригрупповых распределений частот разрывов по разным хромосомам оказалось, что в клетках, получивших дозу 80 мГр, повреждения в хромосомах 6 и 10 происходили чаще, чем в остальных. Также как в группе после облучения в дозе 1000 мГр, средняя частота разрывов в хромосоме 9 была выше, чем в других. Частоты разрывов по этим парам хромосом находились за пределами двух стандартных отклонений от

средних значений при нормальном распределении в группах (80 и 1000 мГр) и выпадали за 95 % основных данных, то есть принадлежали другой генеральной совокупности. Значения частот разрывов по хромосомам 6 ($0,0047$) и 10 ($0,0047$) после облучения в дозе 80 мГр и 9 ($0,0050$) после облучения в дозе 1000 мГр были выше среднegrupповых даже с учетом поправки на множественность сравнений (t -критерий, $p < 0,05$). Небольшое количество выявленных мутационных событий пока не позволяет сделать вывод о специфичности хромосомных повреждений в исследованной линии ММСК после облучения. В то же время, полученные результаты могут лечь в основу дальнейших исследований радиочувствительности отдельных хромосом, их районов и локусов.

Ранее нами было показано, что у участника ликвидации Чернобыльской аварии (цитогенетическая доза 3,2 Гр) распределение разрывов хромосом по геному было неравномерным, частота их возникновения оказалась значительно ниже в хромосомах 13 и 20. Наибольшее количество разрывов было описано в хромосомных регионах: 1p32–p36.1, 3p21–22, 5q31–q35, 6p21–p22, 8q11.2–q13, 10q24–q26, 12p13, 14p10–q13, 14q24 [25]. Радиочувствительными могут быть сегменты хромосом, характеризующиеся повышенной мутагенностью. К ним относятся участки ДНК, прикрепленные к ядерному матриксу, находящиеся в конформационном состоянии изгиба или петли [6, 7]. Репарация в них индуцированных и неиндуцированных двуниевых разрывов ДНК посредством несовершенной негомологичной рекомбинации, характерной для неделящихся тканевых

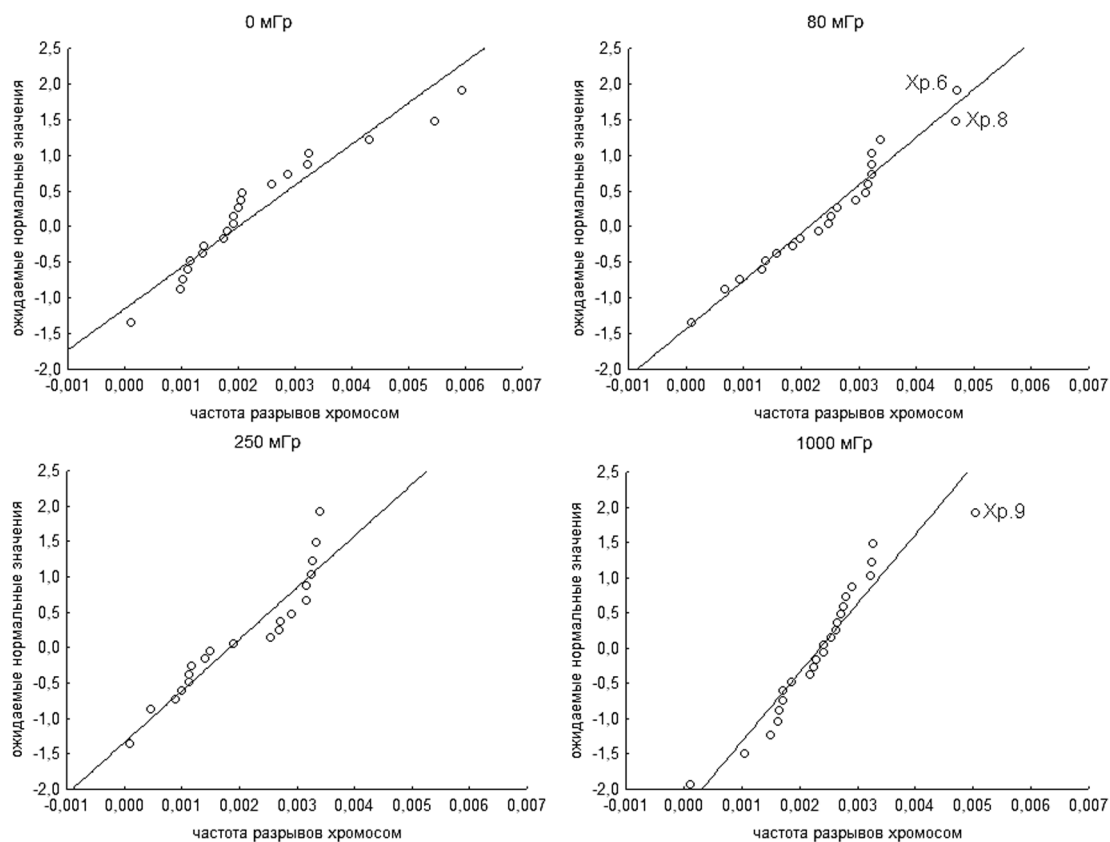


Рис. 2. Распределение частот разрывов хромосом на 1 млн пар оснований (1 Мб) в ММСК до и после облучения. Прямые линии – ожидаемые значения нормального распределения, \circ – хромосомы. Статистически достоверные отличия ($p < 0,05$) от основной генеральной совокупности данных выявлены для хромосом 6 и 10 (Хр.6 и Хр.10) после облучения 80 мГр и хромосомы 9 (Хр.9) после облучения 1000 мГр

Fig.2. Frequency distribution of chromosome breaks per 1 million base pairs (1 Mb) in MMSK before and after irradiation. Straight lines are the expected values of the normal distribution, \circ are chromosomes. Statistically significant differences ($p < 0,05$) from the main general dataset were found for chromosomes 6 and 10 (Хр.6 and Хр.10) after exposure to 80 mGy and chromosome 9 (Хр.9) after exposure to 1000 mGy

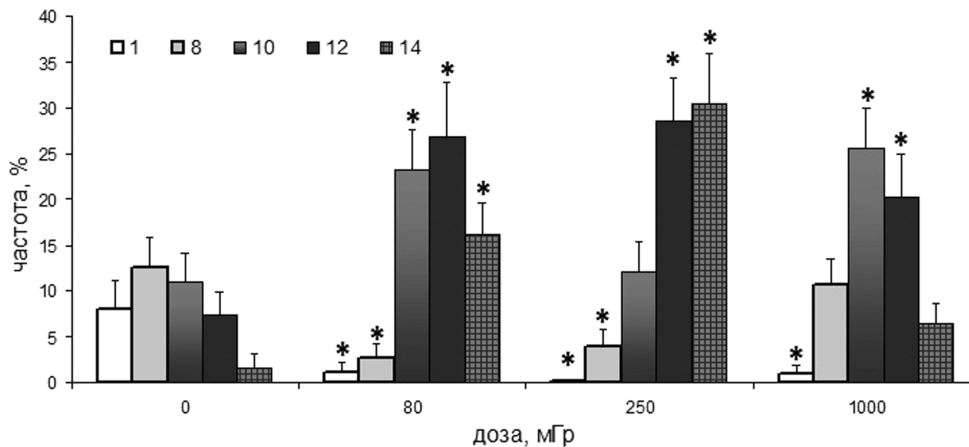


Рис. 3. Частота выявления клональных клеток с тетрасомией по восьмой хромосоме (48,XY,+8,+8) в зависимости от дозы рентгеновского облучения и пассажа культивирования ММСК: 1–14 – пассажи культивирования, * – статистически достоверные отличия от контрольной группы (0 мГр)
 Fig. 3. The frequency of detection of clonal cells with tetrasomy on the eighth chromosome (48,XY,+8,+8) depending on the dose of X-ray irradiation and passage of MMSC cultivation: 1–14 – cultivation passages, * – statistically significant differences from the control group (0 mGy)

стволовых клеток, может приводить к возникновению хромосомных перестроек, таких как транслокации и инверсии. Точки разрывов в этих участках хромосом ассоциированы с риском развития лейкозов [6, 26]. Накопление экспериментальных результатов о частотах появления таких «горячих точек» после облучения в разном диапазоне доз в процессе культивирования может стать одним из подходов для оценки качественных эффектов ионизирующего излучения с использованием диплоидных клеточных линий ММСК человека.

Выявление в исследованной первичной клеточной линии ММСК постоянных цитогенетических клонов (табл. 2) позволило, наряду с поставленной целью, оценить влияние рентгеновского излучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр на рост и прогрессию клональных клеток с хромосомными (транслокации) и геномными (анеуплоидии) мутациями. В трех из четырех описанных клонов (моносомия X, транслокация 1 и 2, табл. 2) статистически достоверных различий в необлученных и облученных культурах не выявлено. Количественные изменения в процессе культивирования были зафиксированы только для клона с тетрасомией по хромосоме 8 (рис. 3). В необлученных ММСК доля клона с тетрасомией 8 достигала максимума на восьмом пассаже культивирования, а затем уменьшалась. Высокий пролиферативный потенциал клеток с кариотипом 48,XY,+8,+8, скорее всего, связан с увеличением числа копий онкогена с-MYC, который расположен на длинном плече хромосомы 8. Клоны с полисомией 8 ранее были описаны в диплоидных клеточных линиях ММСК, колонии таких клеток могут достигать довольно больших размеров благодаря селективному преимуществу перед клетками с нормальным кариотипом [19]. В облученных культурах ММСК значительный рост клона с тетрасомией 8 наблюдали позже, только на 10, 12 и 14-ом пассажах (рис. 3). Наибольшие значения были после облучения в дозе 80 мГр на 12-ом пассаже, в дозе 250 мГр на 12 и 14 пассажах и в дозе 1000 мГр на 10-ом пассаже культивирования. В этих точках отношение частот метафазных клеток с тетрасомией 8 к остальным варьировало от 25:75 до 30:70. Для сравнения, в первичной необлученной линии ММСК (на пятом пассаже культивирования) доля этого клона от общего количества метафаз составляла всего 3%, а в необлученном контроле (т.е. при продолжении культивирования) не превышала 12%. Таким

образом, после облучения количество клональных делящихся клеток с тетрасомией 8 в ММСК значительно увеличивалось (рис. 3). Выявление клона с полисомией по 8 хромосоме является диагностическим критерием для некоторых злокачественных заболеваний крови, более того, его наличие может указывать на резистентность к химио- и радиотерапии и влиять на показатели продолжительности жизни у пациентов [27]. В нашем исследовании после облучения ММСК в клональных клетках с тетрасомией 8 наблюдали и качественные изменения – дополнительные ХА: хромосомные фрагменты, транслокации, инверсии и дицентрики. Выявленные ХА наблюдали в части клональных клеток с тетрасомией 8 во всех группах, начиная с первого пассажа после облучения и независимо от полученной дозы (80, 250 или 1000 мГр). На рис. 4 показаны примеры метафаз с ХА в клоне с тетрасомией по 8 хромосоме. В одной из них имеется дицентрик с сопутствующим хромосомным фрагментом, а в другой – дополнительная транслокация t(11;14) (между хромосомами 11 и 14). Дополнительные ХА в клональных опухолевых клетках являются показателями генетической нестабильности клона [28]. Возможно, это и стало причиной клональной прогрессии на поздних этапах культивирования после облучения и

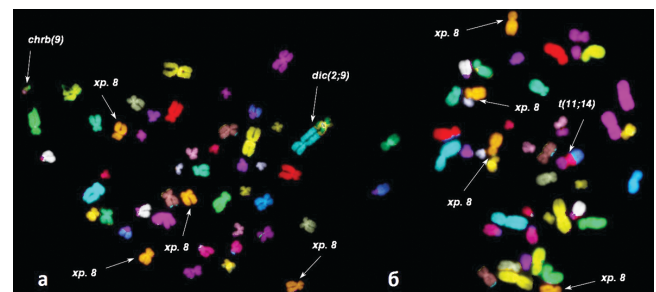


Рис. 4. Примеры метафазных пластинок клональных клеток с тетрасомией по хромосоме 8 и дополнительными aberrациями в виде: а – дицентрической хромосомы и б – транслокации: Хр. 8 – хромосома 8; dic(2;9) – дицентрическая хромосома, включающая хромосомы 2 и 9, с сопутствующим хромосомным фрагментом – chrb(9); t(11;14) – транслокация между хромосомами 11 и 14
 Fig. 4. Metaphase plates of clonal cells with tetrasomy on the 8 chromosome and scattered aberrations: а – dicentric chromosome and б – translocation: Хр. 8 – chromosome 8; dic(2;9) is a dicentric chromosome, including chromosomes 2 and 9, with an accompanying chromosomal fragment, chrb(9); t(11;14) – translocation between chromosomes 11 and 14

вызывает очевидные аналогии с возникновением радиорезистентных клонов злокачественных клеток при лечении онкологических заболеваний и, в целом, с отсроченными канцерогенными эффектами ионизирующего излучения в малых дозах у человека.

Кроме описанных выше, в облученных и необлученных культурах в процессе культивирования было выявлено еще восемь цитогенетических клонов, возникших *de novo* (табл. 4). В клональные хромосомные транслокации были вовлечены хромосомы X, 1, 2, 4–10, 12, 13, 15 и 16. Все выявленные клональные хромосомные транслокации описаны как сбалансированные, то есть при их возникновении не произошло грубых изменений кариотипа, связанных с потерей генетического материала. Проллиферативная способность клональных клеток с транслокациями, по всей видимости, не отличалась от остальных (с нормальным кариотипом), что, в свою очередь, определило их малочисленность в культуре ММСК. Этот факт затрудняет проведение достоверного статистического анализа представленности каждого клона на отдельных пассажах культивирования в каждой из групп до и после облучения. Более того, методически невозможно отсортировать клоны, закономерно возникающие при культивировании *in vitro* интактной ММСК от тех, что были индуцированы в результате облучения. Однако при сравнении общей (суммарной) доли вновь возникнувших клональных клеток с хромосомными транслокациями в необлученных и облученных культурах, было выявлено, что их количество увеличивалось после однократного рентгеновского облучения в дозе 1000 мГр (табл. 4). Полученные результаты подтверждают данные о том, что при культивировании ММСК характер прироста патологических клонов может значительно меняться: увеличиваться, приостанавливаться или полностью прекращаться [9, 18–20, 29, 30]. При этом наибольшей представленностью, по-видимому, характеризуются цитогенетические клоны с изменениями, влияющими на скорость пролиферации. Однократное воздействие рентгеновского излучения на клеточную линию ММСК человека может вызвать рост и прогрессию наиболее пролиферативно-активных и злокачественных первичных клеточных клонов и увеличить вероятность возникновения новых клональных ХА.

Заключение

Незначительные колебания доли клеток с неклональными ХА в зависимости от полученной дозы на ранних сроках после облучения (1–4 пассаж), исчезали на поздних этапах культивирования (8–14 пассаж). Средняя частота неклональных ХА на поздних пассажах культивирования как облученных, так и необлученных ММСК превышала спонтанный уровень ХА исследованной клеточной линии до начала эксперимента, что скорее связано с накоплением хромосомных мутаций в условиях длительного культивирования, а не с облучением. В то же время, в спектре хромосомных повреждений

Таблица 4

Процент клеток с клональными транслокациями в клеточной линии ММСК человека после облучения в различных дозах
Percentage of cells with clonal translocations in the human MMSC cell line after irradiation

Доза, мГр	0	80	250	1000
t(X;2)(p21;q12)	–	0,54	–	1,22
t(2;4)(p24;q12), t(6;12)(q24;q12)	0,38	–	0,72	–
t(2;10)(q11.2;q26)	0,13	0,18	–	–
t(2;15)(p13;q22)	–	–	–	1,75
t(6;9)(q13;p23)	–	–	0,54	–
t(7;15)(p22;q22)	–	0,36	–	–
t(8;15)(q24;p10)	–	–	–	0,35
t(9;13)(p13;q12)	0,38	0,36	1,26	0,17
Доля клеток с клональными транслокациями	1,3±0,5	1,4±0,5 (<i>p</i> = 0,1991)	2,5±0,7 (<i>p</i> = 0,0598)	3,5±0,8* (<i>p</i> = 0,0094)

Примечание: * – Статистически существенные отличия при сравнении с контрольной группой (0 мГр)

облученных ММСК были обнаружены характерные для радиационного поражения нестабильные aberrации (центрические кольца и дицентрические хромосомы), а также стабильные комплексные ХА и инсерции. Средняя частота разрывов на хромосому в группе необлученных клеток не отличалась от значений, полученных после облучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр (*p* > 0,05). Однако в клетках, получивших дозу 1000 мГр, чаще происходили повреждения в хромосоме 9, а дозу 80 мГр – в хромосомах 6 и 10 (*p* < 0,05). Однократное рентгеновское облучение в дозах 80, 250 и 1000 мГр не влияло на рост и прогрессию характерных для исследованной первичной клеточной линии ММСК клональных клеток с хромосомными транслокациями t(1;16), t(5;9) и моносомией по хромосоме X(45,X,-Y), но приводило к увеличению представленности клона с двумя дополнительными копиями хромосомы 8(48,XY,+8,+8). После однократного облучения в дозе 1000 мГр общее количество возникших *de novo* клеточных клонов с хромосомными транслокациями увеличивалось по сравнению с контрольной группой. Детальное исследование количественных и качественных цитогенетических характеристик с применением высокотехнологичных методов позволяет рассмотреть особенности процессов формирования и накопления ХА в длительно культивируемых ММСК после облучения. Модельные системы на основе облученных культивируемых *in vitro* соматических стволовых клеток человека не позволяют в полной мере отразить физическую величину поглощенной дозы в диапазоне до 1 Гр с использованием цитогенетического метода, но могут быть использованы для исследования отдаленных стохастических эффектов ионизирующего излучения, механизмов радиорезистентности, а также индивидуальной и тканевой радиочувствительности.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Niwa O., Barcellos-Hoff M.H., Globus R.K., Harrison J.D., Hendry J.H., Jacob P., et al. ICRP Publication 131: Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection // Ann. ICRP. 2015. V.44, No. 3-4. P. 7-357. DOI: 10.1177/0146645315595585.
- Hendry J.H., Niwa O., Barcellos-Hoff M.H., Globus R.K., Harrison J.D., Martin M.T., et al. ICRP Publication 131: Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection // Ann. ICRP. 2016. V.45, No. 1. P. 239-252. DOI: 10.1177/0146645315621849.
- Morikawa S., Mabuchi Y., Kubota Y., Nagai Y., Niibe K., Hiratsu E., et al. Prospective Identification, Isolation, and Systemic Transplantation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells in Murine Bone Marrow // J. Exp. Med. 2009. V.206, No. 11. P. 2483-2496. DOI: 10.1084/jem.20091046.
- Cairns J. Mutation Selection and the Natural History of Cancer // Nature. 1975. No. 255. P. 197–200. DOI: 10.1038/255197a0.
- Ильин Л.А., Рождественский Л.М., Котеров А.Н., Борисов Н.М. Актуальная радиобиология: Курс лекций. М.: Издательский дом МЭИ. 2015. 240 с. ISBN 978-5-383-00932-1.

6. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний: Учебное пособие для студентов медицинских вузов. СПб.: Специальная Литература, 1997. 287 с. ISBN 5-87685-076-4.
7. Gothe H.J., Minneker V., Roukos V. Dynamics of Double-Strand Breaks: Implications for the Formation of Chromosome Translocations // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018. No. 1044. P. 27-38. DOI:10.1007/978-981-13-0593-1_3.
8. Терских В.В., Васильев А.В., Воротеяк Е.А. Поляризация и ассиметричное деление столовых клеток // *Цитология.* 2007. Т.49, № 11. С. 933-938.
9. Бочков Н.П., Никитина В.А. Цитогенетика стволовых клеток человека // *Молекулярная медицина.* 2008. № 3. С. 40-47.
10. Chen M.F., Lin C.T., Chen W.C., Yang C.T., Chen C.C., Liao S.K., et al. The Sensitivity of Human Mesenchymal Stem Cells to Ionizing Radiation // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006. V.66, No. 1. P. 244-253. DOI:10.1016/j.ijrobp.2006.03.062.
11. Fekete N., Erle A., Amann E.M., Fürst D., Rojewski M., Langonné A., et al. Effect of High-Dose Irradiation on Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells // *Tissue Engineering Part C Methods.* 2015. V.21, No. 2. P. 112-122. DOI: 10.1089/ten.TEC.2013.0766.
12. Nicolay N.H., Lopez Perez R., Saffrich R., Huber P.E. Radio-Resistant Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Resistance and Potential Implications for the Clinic // *Oncotarget.* 2015. V.6, No. 23. P. 19366-19380. DOI: 10.18632/oncotarget.4358.
13. Sugrue T., Lowndes N.F., Ceredig R. Mesenchymal Stromal Cells: Radio-Resistant Members of the Bone Marrow // *Immunol Cell. Biol.* 2013. V.91, No. 1. P. 5-11. DOI: 10.1038/icb.2012.61.
14. Rieger K., Marinets O., Fietz T., Körper S., Sommer D., Mücke C., et al. Mesenchymal Stem Cells Remain of Host Origin Even a Long Time after Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell or Bone Marrow Transplantation // *Exp. Hematol.* 2005. V.33, No. 5. P. 605-611. DOI: 10.1016/j.exphem.2005.02.004.
15. Ломоносова Е.Е., Нугис В.Ю., Снигирева Г.П., Козлова М.Г., Никитина В.А., Галстян И.А. Цитогенетический анализ культур лимфоцитов периферической крови пациента в отдаленные сроки после аварийного облучения с помощью трехцветного FISH-метода // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2022. Т.62, № 1. С. 5-17. DOI: 10.31857/S0869803122010064.
16. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., et al. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement // *Cytotherapy.* 2006. V.8, No. 4. P. 315-317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
17. Shaffer L.G., McGowan-Jordan J., Schmid M. ISCN 2013: an International System for Human Cytogenetic Nomenclature - 2013. Basel: Karger, 2013.
18. Никитина В.А., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Нугис В.Ю., Ломоносова Е.Е., Семина В.В. и др. Цитогенетическая характеристика диплоидных линий мезенхимных мультипотентных стромальных клеток // *Цитология.* 2021. Т.63, № 3. С. 207-220. DOI 10.31857/S0041377121030081.
19. Бочков Н.П., Воронина Е.С., Катосова Л.Д., Никитина В.А. Цитогенетическое исследование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека в процессе культивирования // *Медицинская генетика.* 2009. Т.12, № 90. С. 3-6.
20. Кольцова А.М., Зенин В.В., Петросян М.А., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Получение и характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из разных областей плаценты одного донора // *Цитология.* 2020. Т.62, № 9. С. 623-637. DOI:10.31857/S0041377120090035.
21. Полянская Г.Г. Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор) // *Клеточные культуры.* 2018;34:3-18.
22. Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., et al. Risk of Tumorigenicity in Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies - Bridging Scientific Observations and Regulatory Viewpoints // *Cytotherapy.* 2013. V.15, No. 7. P. 753-759. DOI:10.1016/j.jcyt.2013.03.005.
23. Pustovalova M., Grekhova A., Astrelina T., Nikitina V., Dobrovolskaya E., Suchkova Y., et al. Accumulation of Spontaneous γ H2AX Foci in Long-Term Cultured Mesenchymal Stromal Cells // *Aging.* 2016. V.8, No. 12. P. 3498-3506. DOI: 10.18632/aging.101142.
24. Pustovalova M., Astrelina T.A., Grekhova A., Vorobyeva N., Tsvetkova A., Blokhina T., et al. Residual γ H2AX Foci Induced by low Dose X-Ray Radiation in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Do Not Cause Accelerated Senescence in the Progeny of Irradiated Cells // *Aging.* 2017. V.9, No. 11. P. 2397-2410. DOI: 10.18632/aging.101327.
25. Nikitina V., Nugis V., Astrelina T., Zheglo D., Kobzeva I., Kozlova M., et al. Pattern of Chromosomal Aberrations Persisting Over 30 Years in a Chernobyl Nuclear Power Plant Accident Survivor: Study Using mFISH // *J. Radiat. Res.* 2022. V.63, No. 2. P. 202-212. DOI:10.1093/jrr/rrab131.
26. Величко А.К., Разин С.В., Кантидзе О.Л. Клеточный ответ на повреждения ДНК, возникающие в рибосомных генах // *Молекулярная биология.* 2021. Т.55, № 2. С. 210-222. DOI: 10.31857/S0026898421020142.
27. Hemsing A.L., Hovland R., Tsykunova G., Reikvam H. Trisomy 8 in Acute Myeloid Leukemia // *Expert Rev. Hematol.* 2019. V.12, No. 11. P. 947-958. DOI: 10.1080/17474086.2019.1657400.
28. Dugan L.C., Bedford J.S. Are Chromosomal Instabilities Induced by Exposure of Cultured Normal Human Cells to Low- or High-LET Radiation? // *Radiat. Res.* 2003. V.159, No. 3. P. 301-311. DOI:10.1667/0033-7587(2003)159[0301:aciibe]2.0.co;2.
29. Serakinci N., Gulberg P., Burns J.S., Abdallah B., Schröder H., Jensen T., et al. Adult Human Mesenchymal Stem Cell as a Target for Neoplastic Transformation // *Oncogene.* 2004. V.23, No. 29. P. 5095-5098. DOI:10.1038/sj.onc.1207651.
30. Nikitina V., Astrelina T., Nugis V., Ostashkin A., Karaseva T., Dobrovolskaya E., et al. Clonal Chromosomal and Genomic Instability During Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Long-Term Culture // *PLoS One.* 2018. V.13, No. 2. P. e0192445. DOI:10.1371/journal.pone.0192445.

REFERENCES

1. Niwa O., Barcellos-Hoff M.H., Globus R.K., Harrison J.D., Hendry J.H., Jacob P., et al. ICRP Publication 131: Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection. Ann. ICRP. 2015;44;3-4:7-357. DOI: 10.1177/0146645315595585.
2. Hendry J.H., Niwa O., Barcellos-Hoff M.H., Globus R.K., Harrison J.D., Martin M.T., et al. ICRP Publication 131: Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection. Ann. ICRP. 2016;45;1:239-252. DOI: 10.1177/0146645315621849.
3. Morikawa S., Mabuchi Y., Kubota Y., Nagai Y., Niibe K., Hiratsu E., et al. Prospective Identification, Isolation, and Systemic Transplantation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells in Murine Bone Marrow. *J. Exp. Med.* 2009;206;11:2483-2496. DOI: 10.1084/jem.20091046.
4. Cairns J. Mutation Selection and the Natural History of Cancer. *Nature.* 1975;255:197-200. DOI: 10.1038/255197a0.
5. Ilin L.A., Rozhdestvenskiy L.M., Koterov A.N., Borisov N.M. *Aktualnaya Radiobiologiya = Actual Radiobiology. A Course of Lectures.* Moscow Publ., 2015. 240 p. ISBN 978-5-383-00932-1 (In Russ.).
6. Gorbunova V.N., Baranov V.S. *Vvedeniye v Molekulyarnuyu Diagnostiku i Genoterapiyu Nasledstvennykh Zabolevaniy = Introduction to Molecular Diagnostics and Gene Therapy of Hereditary Diseases. A Textbook for Students of Medical Universities.* St. Petersburg Publ., 1997. 287 p. ISBN 5-87685-076-4 (In Russ.).
7. Gothe H.J., Minneker V., Roukos V. Dynamics of Double-Strand Breaks: Implications for the Formation of Chromosome Translocations. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018;1044:27-38. DOI:10.1007/978-981-13-0593-1_3.
8. Terskikh V.V., Vasilyev A.V., Vorotelyak Ye.A. Polarization and Asymmetric Division of Stem Cells. *Tsitologiya.* 2007;49;11:933-938 (In Russ.).

9. Bochkov N.P., Nikitina V.A. Cytogenetics of Human Stem Cells. *Molekulyarnaya Meditsina* = Molecular Medicine. 2008;3:40-47 (In Russ.).
10. Chen M.F., Lin C.T., Chen W.C., Yang C.T., Chen C.C., Liao S.K., et al. The Sensitivity of Human Mesenchymal Stem Cells to Ionizing Radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006;66;1:244-253. DOI:10.1016/j.ijrobp.2006.03.062.
11. Fekete N., Erle A., Amann E.M., Fürst D., Rojewski M., Langonné A., et al. Effect of High-Dose Irradiation on Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Tissue Engineering Part C Methods*. 2015;21;2:112-122. DOI: 10.1089/ten.TEC.2013.0766.
12. Nicolay N.H., Lopez Perez R., Saffrich R., Huber P.E. Radio-Resistant Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Resistance and Potential Implications for the Clinic. *Oncotarget*. 2015;6;23:19366-19380. DOI: 10.18632/oncotarget.4358.
13. Sugrue T., Lowndes N.F., Ceredig R. Mesenchymal Stromal Cells: Radio-Resistant Members of the Bone Marrow. *Immunol Cell. Biol.* 2013;91;1:5-11. DOI: 10.1038/icb.2012.61.
14. Rieger K., Marinets O., Fietz T., Körper S., Sommer D., Mücke C., et al. Mesenchymal Stem Cells Remain of Host Origin Even a Long Time after Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell or Bone Marrow Transplantation. *Exp. Hematol.* 2005;33;5:605-611. DOI: 10.1016/j.exphem.2005.02.004.
15. Lomonosova Ye.Ye., Nugis V.Yu., Snigireva G.P., Kozlova M.G., Nikitina V.A., Galstyan I.A. Cytogenetic Analysis of Peripheral Blood Lymphocyte Cultures of the Patient in the Long Term after Emergency Irradiation Using the Tricolor FISH Method. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya* = Radiation Biology. Radioecology. 2022;62;1:5-17. DOI: 10.31857/S0869803122010064 (In Russ.).
16. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., et al. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*. 2006;8;4:315-317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
17. Shaffer L.G., McGowan-Jordan J., Schmid M. ISCN 2013: an International System for Human Cytogenetic Nomenclature - 2013. Basel, Karger, 2013.
18. Nikitina V.A., Astrelina T.A., Kobzeva I.V., Nugis V.Yu., Lomonosova Ye.Ye., Semina V.V., et al. The Cytogenetic Characteristic of Mesenchymal Multipotent Stromal Cell Diploid Lines. *Tsitologiya*. 2021;63;3:207-220. DOI 10.31857/S0041377121030081 (In Russ.).
19. Bochkov N.P., Voronina Ye.S., Katosova L.D., Nikitina V.A. Cytogenetic Study of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells of Humans in the Process of Cultivation. *Meditsinskaya Genetika* = Medical Genetics. 2009;12;90:3-6 (In Russ.).
20. Koltsova A.M., Zenin V.V., Petrosyan M.A., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Polyanskaya G.G. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from Different Regions of the Placenta of the Same Donor. *Tsitologiya*. 2020;62;9:623-637. DOI:10.31857/S0041377120090035 (In Russ.).
21. Polyanskaya G.G. Comparative Analysis of the Lines of human Mesenchymal Stem Cells Derived in the Collection of Cell Cultures of Vertebrates. (Review). *Kletochnyye Kultury*. 2018;34:3-18 (In Russ.).
22. Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., et al. Risk of Tumorigenicity in Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies - Bridging Scientific Observations and Regulatory Viewpoints. *Cytotherapy*. 2013;15;7:753-759. DOI:10.1016/j.jcyt.2013.03.005.
23. Pustovalova M., Grekhova A., Astrelina T., Nikitina V., Dobrovolskaya E., Suchkova Y., et al. Accumulation of Spontaneous γ H2AX Foci in Long-Term Cultured Mesenchymal Stromal Cells. *Aging*. 2016;8;12:3498-3506. DOI: 10.18632/aging.101142.
24. Pustovalova M., Astrelina T.A., Grekhova A., Vorobyeva N., Tsvetkova A., Blokhina T., et al. Residual γ H2AX Foci Induced by low Dose X-Ray Radiation in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Do Not Cause Accelerated Senescence in the Progeny of Irradiated Cells. *Aging*. 2017;9;11:2397-2410. DOI: 10.18632/aging.101327.
25. Nikitina V., Nugis V., Astrelina T., Zhiglo D., Kobzeva I., Kozlova M., et al. Pattern of Chromosomal Aberrations Persisting Over 30 Years in a Chernobyl Nuclear Power Plant Accident Survivor: Study Using mFISH. *J. Radiat. Res.* 2022;63;2:202-212. DOI:10.1093/jrr/rrab131.
26. Velichko A.K., Razin S.V., Kantidze O.L. Cellular Response to DNA Damage Occurring in Ribosomal Genes. *Molekulyarnaya Biologiya* = Molecular Biology. 2021;55;2:210-222. DOI: 10.31857/S0026898421020142 (In Russ.).
27. Hemsing A.L., Hovland R., Tsykunova G., Reikvam H. Trisomy 8 in Acute Myeloid Leukemia. *Expert Rev. Hematol.* 2019;12;11:947-958. DOI: 10.1080/17474086.2019.1657400.
28. Dugan L.C., Bedford J.S. Are Chromosomal Instabilities Induced by Exposure of Cultured Normal Human Cells to Low- or High-LET Radiation? *Radiat. Res.* 2003;159;3:301-311. DOI:10.1667/0033-7587(2003)159[0301:aciibe]2.0.co;2.
29. Serakinci N., Guldborg P., Burns J.S., Abdallah B., Schrøder H., Jensen T., et al. Adult Human Mesenchymal Stem Cell as a Target for Neoplastic Transformation. *Oncogene*. 2004;23;29:5095-5098. DOI:10.1038/sj.onc.1207651.
30. Nikitina V., Astrelina T., Nugis V., Ostashkin A., Karaseva T., Dobrovolskaya E., et al. Clonal Chromosomal and Genomic Instability During Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Long-Term Culture. *PLoS One*. 2018;13;2:e0192445. DOI:10.1371/journal.pone.0192445.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.09.2022. **Принята к публикации:** 25.11.2022.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study had no sponsorship.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.09.2022. **Accepted for publication:** 25.11.2022.