

Аномалии кариотипа в линиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от российских доноров

Пожитнова В.О., Свиридова В.В., Кислова А.В., Свиридов Ф.С., Жегло Д.Г., Воронина Е.С.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

Введение. Кариотипирование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) – общепринятый этап характеристики генетической стабильности клеточных линий, необходимый при их регистрации и дальнейшем научном и медицинском использовании. Для текущего мониторинга возникновения рекуррентных аномалий кариотипа допустимо применение таргетных методов анализа (FISH, количественная ПЦР), однако спектр возникающих хромосомных aberrаций может зависеть от особенностей протоколов культивирования клеток, принятых в конкретных лабораториях.

Цель: выявление аномалий кариотипа в выборке линий иПСК, полученных от российских доноров, методом стандартного цитогенетического анализа и сравнение их с известными из литературных данных рекуррентными aberrациями.

Методы. Кариотипирование культур иПСК проводили на 7-28 пассаже. Для уточнения частоты трисомии, выявленной при анализе кариотипа, в отдельных случаях применяли FISH с центромерными зондами. Проанализированы кариотипы 34 линий иПСК, полученных от 19 доноров.

Результаты. Выявлены две линии с численными хромосомными аномалиями (+8 и +20), три линии с крупными структурными хромосомными перестройками (дупликация в 2q и две дупликации в 1q) и одна линия со спонтанными неклональными хроматидными разрывами. Дополнительный FISH-анализ с центромерными зондами линии с мозаичной трисомией 8 и аутологичной ей линии с нормальным кариотипом выявил присутствие низкопредставленного аномального клона в обеих линиях. Таким образом, частота возникновения хромосомной нестабильности в проанализированной выборке линий иПСК соответствует литературным данным. Хромосомные aberrации в двух из семи аномальных линиях не описаны как частые рекуррентные генетические аномалии в иПСК, используемые для таргетных методов контроля генетической стабильности клеток.

Заключение. Наше исследование дает представление о частоте и структуре аномалий кариотипа в иПСК, полученных от российских доноров, и обосновывает рациональность комбинирования полногеномных и таргетных методов оценки генетической стабильности этих клеток. Представленные данные могут быть использованы для разработки рекомендаций по оценке качества культур иПСК.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, кариотип, хромосомные aberrации, геномная нестабильность.

Для цитирования: Пожитнова В.О., Свиридова В.В., Кислова А.В., Свиридов Ф.С., Жегло Д.Г., Воронина Е.С. Аномалии кариотипа в линиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от российских доноров. *Медицинская генетика* 2023; 22(12): 59-66.

Автор для корреспонденции: Жегло Д.Г.; e-mail: dianazheglo@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» на выполнение НИР в 2023 году.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 30.11.2023

Karyotype abnormalities in induced pluripotent stem cells derived from Russian donors

Pozhitnova V.O., Sviridova V.V., Kislova A.V., Sviridov P.S., Zheglo D., Voronina E.S.

Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechie st., Moscow, 115478, Russian Federation

Background. Karyotyping of induced pluripotent stem cells (iPSCs) is a generally accepted stage of characterization of the genetic stability of cell lines, necessary for their registration and further scientific and medical use. Recurrent karyotype anomalies can be also detected by targeted methods (FISH, qPCR), however, the laboratory-specific peculiarities of cell handling protocols can influence the pattern of aberrations.

Aim. Identification of karyotype abnormalities in iPSC lines obtained from Russian donors and their comparison with recurrent aberrations known from literature data.

Methods. Karyotyping of iPSC cultures was carried out on passage 7-28, FISH with centromeric probes was used in specific cases to clarify the frequency of trisomy detected during karyotype analysis.

Results. We analyzed karyotypes of 34 iPSC lines obtained from 19 donors. Two lines with numerical chromosomal abnormalities (+8 and +20), three lines with large structural chromosomal rearrangements (duplication in 2q and two duplications in 1q) and one

line with spontaneous non-clonal chromatid breaks were revealed. Additional FISH analysis with centromeric probes of a line with mosaic trisomy 8 and an autologous line with a normal karyotype revealed the presence of an abnormal clone in both lines. Thus, the frequency of karyotype abnormalities in the analyzed iPSC lines corresponds to the literature data. Chromosomal aberrations in two of the seven abnormal lines are not described as frequent recurrent genetic anomalies in iPSCs used for targeted methods for monitoring the genetic stability of cells.

Conclusions. Our study clarifies the frequency and structure of karyotype anomalies in iPSCs obtained from Russian donors and substantiates the rationality of combining genome-wide and targeted methods for assessing the genetic stability of these cells. The presented data can be used to develop recommendations for assessing the quality of iPSC.

Keywords: induced pluripotent stem cells, karyotype, chromosomal aberrations, genome instability.

For citation: Pozhitnova V.O., Sviridova V.V., Kislova A.V., Sviridov P.S., Zheglo D., Voronina E.S. Karyotype abnormalities in induced pluripotent stem cells derived from Russian donors. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(12): 59-66. (In Russ.)

Corresponding author: Zheglo D.; **e-mail:** dianazheglo@gmail.com

Funding. The research was carried out within the state assignment and funding of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

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

Accepted: 30.11.2023

Введение

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) и их дифференцированные производные имеют высокий потенциал применения в клеточной терапии и фундаментальных исследованиях. Спонтанные хромосомные aberrации в иПСК, часто наблюдаемые при их культивировании, могут оказывать значительное влияние на биологические свойства клеток, в частности, на функциональную состоятельность клеточных продуктов, способность к онкогенной трансформации и чувствительность к протоколам элиминации остаточных недифференцированных клеток [1, 2].

Отсутствие прецедентов в клинической практике, высокая частота генетических изменений неясного функционального значения и сложность валидации генетических методов не позволяют выработать абсолютные критерии безопасности и вынуждают принимать временные предпочтительные критерии выбора линий для банкирования, учитывающие «приемлемый риск» и определяемые ситуативно [2, 3]. Контроль качества и генетической безопасности линий иПСК клинического назначения может включать кариотипирование, полноэкзомное и полногеномное секвенирование, микроматричный анализ, сфокусированные на изменениях генома, отсутствующих в исходной линии до репрограммирования и/или затрагивающих гены, связанные с онкогенезом, плюрипотентностью или способностью к дифференцировке [3]. Высокопроизводительные и полногеномные методы анализа

рекомендуется использовать на критических стадиях экспериментов и переходе к дорогостоящим этапам работы, тогда как для текущего контроля стабильности линий рационально применение таргетных FISH и ПЦР для выявления рекуррентных перестроек через каждые 5-10 пассажей [4].

Наиболее часто наблюдаемыми рекуррентными перестройками в иПСК являются трисомии по хромосомам 1, 8, 12, 17, 20, X, изохромосома 20q, а также дупликации районов хромосом 1q25-q41, 12p11-pter, 17q25-qter и 20q11.21 [5]. Моносомии и делеции более редки и, как правило, затрагивают хромосомы 10, 18 и 22 [4].

Рекуррентные перестройки в иПСК связывают с селекцией предсуществующих или спонтанно возникших мутаций при репрограммировании или адаптации к условиям культивирования. Таким образом, спектр наблюдаемых генетических аномалий может определяться особенностями протоколов, принятых в конкретных лабораториях [3, 4]. Например, при получении универсального HLA-гаплогенотипа линий иПСК для японской популяции была отмечена крайне высокая частота однородительской дисомии хромосомы 11, возникшей в линиях от 7 из 8 доноров, причем все 12 линий одного из этих доноров оказались несущими эту аномалию [3].

Кариотипирование — относительно быстрый и недорогой метод генетического анализа, преимуществами которого являются возможность полногеномного учета хромосомных и геномных мутаций в единич-

ных клетках, включая сбалансированные и мозаичные aberrации, а также однозначная интерпретация функциональной значимости обнаруженных аномалий (в силу низкого разрешения) [4]. В нашей работе проведен анализ кариотипа 34 линий иПСК из собственных коллекций лабораторий ФГБНУ МГНЦ и московского отделения сетевого центра коллективного пользования «Всероссийская коллекция биологических образцов наследственных болезней», дающий представление о структуре и частоте возникновения генетических аномалий, а также о перспективах применения таргетных методов оценки генетической стабильности клеточных линий, полученных от российских доноров.

Методы

Культуры иПСК

Линии иПСК были получены репрограммированием дермальных фибробластов или клеток мочевого осадка (линии от пациентов P14, P19 и P20) в лабораториях генетики стволовых клеток и редактирования генома ФГБНУ МГНЦ. Клетки, предназначенные для кариотипирования, культивировали на шестилучных планшетах, покрытых витронектином (Gibco™) или матригелем IPS-Verified Star Matrigengel (ABW) в среде TeSR-E8 (StemCell Technologies Inc.) в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C при ежедневной смене среды. При достижении 30-40% конfluence клеток предсинхронизировали истощением среды в течение 1 дополнительных суток и внесением свежей порции среды за 24 часа до фиксации.

Получение препаратов метафаз

Для получения суспензии одиночных клеток колонии иПСК снимали смесью 0,25% трипсина-ЭДТА и раствора Версена (ПанЭко, Россия) в пропорции 1:1, проводили гипотонизацию в 0,55% KCl при 37°C 14 минут и фиксировали в смеси метанола и ледяной уксусной кислоты 3:1. Суспензии фиксированных иПСК раскапывали на влажные охлажденные предметные стекла и высушивали над горелкой.

Кариотипирование

G-подобную окраску хромосом получали нанесением на слайды глицериновой фотозащитной среды с DAPI (Abcam) с добавлением в качестве контрастирующего агента 0,3 мг/мл актиномина Д (Serva). Препараты анализировали под флуоресцентным микроскопом Axio Imager 2 (Zeiss), изображения инвер-

тировали и кариотипировали с помощью программного обеспечения CytoLabView (Applied Spectral Imaging) согласно действующей версии Международной номенклатуры хромосом человека (ISCN 2020). Для каждой линии анализировали не менее 15 метафазных пластинок, при обнаружении клональных аномалий кариотипа, количество анализируемых клеток увеличивали до 30 и более.

Флуоресцентная гибридизация *in situ*

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) проводилась с использованием зонда SE 8 (D8Z1) red (Poseidon, Kreatech), специфичного к центромере хромосомы 8, согласно рекомендациям производителя. Препараты метафазных хромосом выдерживали 2 мин в 2xSSC (0,3 M NaCl, 0,03 M NaCitrate, pH 7,0) при 37°C, проводили предобработку пепсином в 0,01 M HCl 5 минут при 37°C. Стекла инкубировали в фосфатно-солевом буфере (PBS) комнатной температуры 3 минуты и в растворе PBS с 50 mM MgCl₂ 5 минут. Предфиксацию формалином (1% формалин в PBS / 50 mM MgCl₂) проводили при комнатной температуре в течение 10 минут, затем промывали в PBS 3 минуты и дегидратировали в этаноле. Проводили совместную денатурацию в гибридайсере Thermobrite (StatSpin), запрограммированном на денатурацию 5 минут при 75°C и гибридизацию при 37°C в течение ночи. Постгибридизационная отмывка включала двухминутную инкубацию в 2xSSC/0,1% Tween-20 при комнатной температуре, двухминутную инкубацию в 0,4xSSC/0,3% Tween-20 при 75°C и 1-минутную инкубацию в 2xSSC/0,1% Tween-20 при комнатной температуре, затем дегидратировали в этаноле. Препараты заключали в глицериновую фотозащитную среду с DAPI (Abcam), анализ проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Imager A2 при увеличении 1000x.

Статистический анализ

Доля линий с аномалиями кариотипа представлена как $M \pm m$ (ошибка доли). Сравнение частоты трисомии по хромосоме 8 проводили с использованием критерия χ^2 Пирсона, множественные попарные сравнения — с поправкой Бонферрони.

Результаты и обсуждение

Анализируемые в работе клеточные линии были получены от 16 пробандов с подтвержденными наследственными заболеваниями и 3 здоровых доноров с целью последующей разработки на их основе методов

клеточной терапии генетических и социально-значимых заболеваний и пополнения биобанка сетевого центра коллективного пользования «Всероссийская коллекция биологических образцов наследственных болезней». Кариотипирование иПСК, как первичный метод оценки генетической стабильности полученных линий, проводили на 7-28 пассаже (табл. 1). В 6 из 34 линий ($17,65\% \pm 6,54\%$) были обнаружены клональные хромосомные aberrации и в одной линии ($2,94\% \pm 2,9\%$) — неклональные спонтанные хроматидные разрывы. Частота возникновения хромосомных aberrаций в исследованной выборке иПСК сопоставима с данными других лабораторий [3, 6].

Структурные хромосомные перестройки

В линии P5Lmix была обнаружена дупликация значительной части длинного плеча хромосомы 1 (1q23-q44) в 67% метафазных пластинок (рис. 1А). В ли-

нии от неродственного пациента P16L2 кариотипирование выявило дупликацию чуть меньшего размера, 1q25-q44, в 17% метафазных пластинок (рис. 1Б). Эти перестройки отсутствовали в других линиях, полученных от этих двух доноров, что указывает на их спонтанное возникновение в процессе культивирования. Полная или частичная трисомия по длинному плечу хромосомы 1 — одна из наиболее часто наблюдаемых рекуррентных aberrаций в иПСК, с минимальным районом амплификации, составляющим, по разным данным, один бэнд 1q32.1 [4] или сегмент 1q25-q41 [5]; также описана рекуррентная CNV с увеличением числа копий в бэнде 1q31.3, затрагивающая 4 гена [14]. Этот регион включают в число мишеней для таргетного анализа стабильности генома иПСК методами FISH [4], количественной ПЦР [15] и капельной цифровой ПЦР [16]. Высокая частота обнаружения, а также сходство с перестройками, наблюдаемыми в опухолях различного происхождения, указывают на то, что

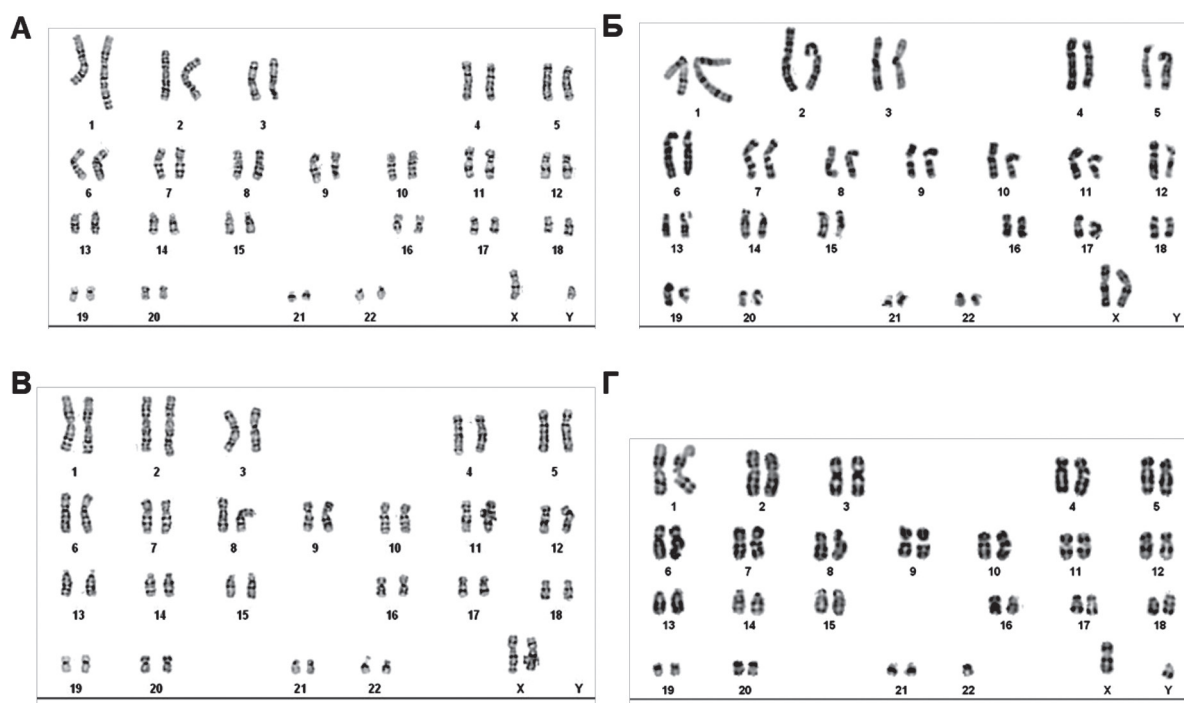


Рис. 1. Кариограммы линий иПСК со структурными хромосомными и хроматидными aberrациями А. dup(1)(q23-q44) в линии P5Lmix; Б. dup(1)(q25-q44) в линии P16L2; В. dup(2)(q32;q33) в линии P8L1; Г. хроматидные разрывы в линии P5L5. Результаты стандартного цитогенетического исследования записаны в соответствии с действующей версией международной цитогеномной номенклатуры (ISCN, 2020).

Fig. 1. Karyograms of iPSC lines with structural chromosomal and chromatid aberrations А. dup(1)(q23-q44) in the P5Lmix line; Б. dup(1)(q25-q44) in the P16L2 line; В. dup(2)(q32;q33) in the line P8L1; Г. chromatid breaks in the P5L5 line. The results of a standard cytogenetic study are recorded in accordance with the current version of the international cytogenomic nomenclature (ISCN, 2020).

Таблица 1. Список линий iPSC и результаты их кариотипирования
(в соответствии с действующей версией международной цитогеномной номенклатуры ISCN, 2020)

Table 1. List of iPSC lines and the results of their karyotyping
(in accordance with the current version of the international cytogenomic nomenclature ISCN, 2020)

донор	Диагноз	линия	пассаж	кариотип	альтернативное название, ссылка на публикацию
P1	муковисцидоз, гомозиготная мутация <i>CFTR</i> F508del	P1L5	12	46,XY	RCMGi001-A [7]
P2	муковисцидоз, гомозиготная мутация <i>CFTR</i> F508del	P2L1	17	46,XY	
		P2L2	16	46,XY	
P4	муковисцидоз, две гетерозиготные мутации <i>CFTR</i> N1303K/3821delT	P4L1	17	46,XX	
		P4L6	16	46,XX	
P5	муковисцидоз, гомозиготная мутация <i>CFTR</i> F508del	P5L1	27	46,XY	RCMGi005-A [8]
		P5Lmix	23	46,XY,dup(1)(q23q44)[14] / 46,XY[1]	
		P5L5	12	46,XY[35] / 46,XY,cttb[7]	-
			17	46,XY	RCMGi005-B [8]
P6	муковисцидоз, две гетерозиготные мутации <i>CFTR</i> F508del/W1282X	P6L2	16	46,XY	RCMGi004-A [9]
		P6L8	16	46,XY	RCMGi004-B [9]
P7	муковисцидоз, гомозиготная мутация <i>CFTR</i> F508del	P7L2	17	46,XX	RCMGi002-A [10]
P8	муковисцидоз, гомозиготная мутация <i>CFTR</i> F508del	P8L1	17	46,XX,dup(2)(q32;q33)[14] / 46,XX[6]	-
		P8L2	16	46,XX	RCMGi007-A
		P8L8	15	46,XX	
P9	муковисцидоз, две гетерозиготные мутации <i>CFTR</i> F508del/del 2,3 (21kb)	P9L1	23	46,XX	RCMGi008-A [11]
P10	мукополисахаридоз 4В типа, две гетерозиготные мутации <i>GLB1</i> с.808T>G (р.Тур270Asp), вторая мутация — инсерция процессированного псевдогена	P10L1	22	46,XY	RCMGi011-A [12]
		P10L2	20	46,XY	RCMGi011-B [12]
		P10L3	17	46,XY	
P11	мукополисахаридоз 6 типа, <i>ARSB</i> с.966G>A (р.Тр322*) и на втором аллеле рекомбинация с соседним геном	P11L3	15	46,XX	RCMGi012-A
P12	Здоровый донор	P12L3	16	46,XX	
P13	синдром Лебера, <i>MT-ND4</i> : m.11778	P13L8	17	46,XX	
		P13L10	15	46,XX[18] / 47,XX,+20[4]	
P14	прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия, гетерозиготная мутация <i>ACVR1</i> с.6176G>A (р.Ary206His)	P14L1	17	46,XY	RCMGi009-A [13]
P16	здоровый донор, носитель гетерозиготной мутации <i>G6PC</i> с.247C>T	P16L2	16	46,XX[25] / 46,XX,dup(1)(q25q44)[5]	
		P16L4	19	46,XX	
P17	Гликогеноз типа 1А, гомозиготная мутация <i>G6PC</i> с.247C>T (р.Arg83Cys)	P17L16	18	46,XX	
P18	гликогеноз типа 1а, две гетерозиготные мутации <i>G6PC</i> : с.247C>T (р.Arg83Cys) <i>G6PC</i> : с.508C>T (р.Arg170Term)	P18L2	25	46,XY	
		P18L7	20	46,XY	
P19	прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия, гетерозиготная мутация <i>ACVR1</i> с.6176G>A (р.Ary206His)	P19L3	18	46,XY	
			28	46,XY[30]	
		P19L7	18	46, XY[27]/47,XY,+8[3]	RCMGi006-A
P20	прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия, гетерозиготная мутация <i>ACVR1</i> с.6176G>A (р.Ary206His)	P20L7	7	46,XY	
МАК	здоровый донор	МАК-A	16	46,XY	
		МАК-C	20	46,XY	
		МАК-F	18	46,XY	

эта аберрация может способствовать лучшей адаптации клеток к культивированию *in vitro* и иметь онкогенный потенциал. В частности, недавно было показано, что трисомия 1q — одно из наиболее ранних изменений генома при развитии опухолей, критичное для выживания опухолевых клеток и сходное по эффекту с состоянием «зависимости от онкогенов» [17]. В нашем исследовании дупликация 1q встретилась в 5,9% линий (2 из 34 линий) от 10,5% (2/19) доноров и была единственной рекуррентной структурной хромосомной аберрацией.

В линии P8L1 выявлено наличие дополнительного материала на длинном плече хромосомы 2, вероятно, представляющего собой интерстициальную дупликацию 2q32-q33 (рис. 1B). Частота метафазных пластинок с этой аберрацией была не менее 70%. При этом, две другие линии от этого донора имели нормальный кариотип. В связи с обнаружением хромосомной аберрации линия была исключена из биобанка и оказалась недоступной для дальнейшего изучения. По данным литературы, аномалии хромосомы 2 относительно редки в ИПСК и не входят в число рекуррентных перестроек [5, 16]. Этот район хромосомы генетически не стабилен при раке кишечника [18].

Численные хромосомные аберрации

По результатам кариотипирования в линии P19L7, полученной из клеток мочевого осадка, был обнаружен клон с трисомией по хромосоме 8, доля которого составила 10% от проанализированных метафазных пластинок, при этом вторая линия от этого пациента имела нормальный кариотип по результатам анализа 20 мета-

фазных пластинок. Для уточнения уровня мозаицизма была проведена FISH обеих линий с зондами, специфичными к центромере хромосомы 8. Для исследования были использованы клеточные суспензии того же 18-го пассажа. FISH-анализ выявил трисомию и во второй исследованной линии. Доля ядер с трисомией 8 составила 10,9% и 7,2% в P19L3 и P19L7, соответственно (табл. 2), что значительно превышало частоту трисомии 8 в линии P1L5, использованной в качестве контроля, и известные из литературы значения фоновой частоты трисомий по любой паре хромосом, выявляемой методом FISH в плюрипотентных клетках, которые составляют 1–2% [19]. Определенные методом FISH частоты аномального клона близки или ниже порога детекции клональных аберраций при стандартном кариотипировании, который обычно оценивается в 10–14% [4, 5]. Для отслеживания динамики представленности аномального клона в процессе культивирования линия P19L3 была также проанализирована методом FISH на 28-м пассаже, и трисомия 8 была выявлена в 6,4% ядер, то есть несколько снизилась, но оставалась аномально высокой. Кариотипирование 30 метафазных пластинок того же пассажа не выявило анеуплоидных клеток, что объяснимо пределами чувствительности метода: для исключения 10%-го мозаицизма с достоверностью 95% требуется анализ 30 метафаз, а 6%-го — не менее 50 метафаз [5]. Причиной наличия одинакового аберрантного клона в обеих линиях может быть как кросс-контаминация образцов, так и присутствие аномальных клеток в исходном материале донора, что требует дальнейших исследований. Не исключается и независимое их возникновение, так как во многих исследованиях трисомию 8 включают в число рекуррентных аномалий кариотипа

Таблица 2. Результаты FISH с зондом SE 8 (D8Z1), специфичным к центромере 8

Table 2. FISH with centromere 8-specific probe SE 8 (D8Z1) results

линия	1 сигнал	2 сигнала	3 сигнала	4 сигнала	п ядер
P19L7 p18	39	941	77	12	1069
	3,65%	88,03%	7,20%*	1,12%	
P19L3 p18	55	891	118	15	1079
	5,10%	82,58%	10,94%**	1,39%	
P19L3 p28	31	1025	73	10	1139
	2,72%	90,00%	6,41%***	0,88%	
P1L5 p19	78	1065	16	2	1161
	7,32%	91,73%	1,38%	0,17%	

Примечание: * достоверно отличается от контроля (линии P1L5), $p = 2,6268 \times 10^{-12}$; ** $p = 6,6000 \times 10^{-16}$; *** $p = 7,5300 \times 10^{-10}$.

иПСК [4, 16]. Известно, что трисомия по хромосоме 8 — одна из наиболее частых генетических aberrаций при хронических миелопролиферативных заболеваниях.

Трисомия хромосомы 20 была обнаружена при анализе кариотипа линии P13L10, частота аномальных метафазных пластинок составила 18%. Частичная и полная трисомия 20 ассоциирована с адаптацией клеток к культивированию *in vitro* и с онкогенным потенциалом [1].

Нестабильные хромосомные aberrации

Единичные спонтанные хроматидные разрывы были нередкой находкой при кариотипировании линий иПСК и не учитывались при анализе кариотипа, однако в одной линии, P5L5, было обнаружено аномально высокое их количество. На 12-м пассаже в 16,7% клеток наблюдались неклональные спонтанные хроматидные разрывы, количество которых варьировало от 1 до 5 на метафазу (рис. 1Г). Разрывы затрагивали хромосомы 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 15. Примечательно, что многие локусы, в которых происходили спонтанные разрывы, совпадали с афидиколин-чувствительными ломкими сайтами хромосом в иПСК, охарактеризованными нашей лабораторией [20]. В трёх хромосомных локусах, 4q22, 5q21 и 10q22, хроматидные разрывы были детектированы более одного раза, и их положение может соответствовать известным афидиколин-чувствительным ломким сайтам *FRA4F*, *FRA5F* и *FRA10D*. Причина появления таких клеток может быть связана как со спонтанной субклональной мутацией, вызвавшей хромосомную нестабильность, так и с неоптимальными условиями культивирования, предшествовавшими анализу. В пользу первого варианта свидетельствует достаточно высокое количество разрывов в отдельных метафазных пластинках (аномальный клон) при их полном отсутствии в подавляющем большинстве клеток. Повторное кариотипирование этой линии на 17-м пассаже показало спонтанную элиминацию аномальных клеток (табл. 1).

Выводы

Анализ кариотипа в выборке иПСК, полученных от пробандов с наследственными заболеваниями и здоровых доноров из российской популяции, выявил как часто встречающиеся хромосомные аномалии, так и редкие для этого типа клеток (нерекуррентные), которые были бы пропущены при использовании таргетных методов анализа стабильности гено-

ма иПСК. Кариотипирование позволило обнаружить низкопредставленные мозаичные хромосомные aberrации, присутствующие с частотой около 10%, что сопоставимо с порогом чувствительности количественной ПЦР и превышает возможности детекции методом хромосомного микроматричного анализа [4, 15]. При этом, в одном образце анеуплоидный клон с трисомией 8 всё же не был выявлен при стандартном анализе 20 метафаз и оказался случайной находкой при таргетном FISH-анализе, который был проведен в связи с обнаружением аномалии кариотипа в аутологичной линии. Результаты работы свидетельствуют о широких возможностях кариотипирования при оценке генетической стабильности иПСК, преимуществами которого являются полногеномный охват и разрешение на уровне единичных клеток. Представленные данные могут быть использованы для разработки рекомендаций по оценке качества культур иПСК.

Литература/References

1. Andrews P.W., Barbaric I., Benvenisty N., Draper J.S., Ludwig T., Merkle F.T., et al. The consequences of recurrent genetic and epigenetic variants in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2022;29:1624–36.
2. Keller A., Spits C. The Impact of Acquired Genetic Abnormalities on the Clinical Translation of Human Pluripotent Stem Cells. *Cells*. 2021;10:3246.
3. Yoshida S., Kato T.M., Sato Y., Umekage M., Ichisaka T., Tsukahara M., et al. A clinical-grade HLA haplobank of human induced pluripotent stem cells matching approximately 40% of the Japanese population. *Med*. 2023;4:51–66.e10.
4. McIntire E., Taapken S., Leonhard K., Larson A.L. Genomic Stability Testing of Pluripotent Stem Cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2020;52:e107.
5. Baker D., Hirst A.J., Gokhale P.J., Juarez M.A., Williams S., Wheeler M., et al. Detecting Genetic Mosaicism in Cultures of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep*. 2016;7:998–1012.
6. Molina-Ruiz F.J., Introna C., Bombau G., Galofre M., Canals J.M. Standardization of Cell Culture Conditions and Routine Genomic Screening under a Quality Management System Leads to Reduced Genomic Instability in hPSCs. *Cells*. 2022;11:1984.
7. Kondrateva E., Adilgerееva E., Amelina E., Tabakov V., Demchenko A., Ustinov K., et al. Generation of induced pluripotent stem cell line (RCMGi001-A) from human skin fibroblasts of a cystic fibrosis patient with p.F508del mutation. *Stem Cell Res*. 2020;48:101933.
8. Panchuk I., Kondrateva E., Demchenko A., Grigorieva O., Erofeeva A., Amelina E., et al. Generation of two induced pluripotent stem cell lines (RCMGi005-A/B) from human skin fibroblasts of a cystic fibrosis patient with homozygous F508del mutation in CFTR gene. *Stem Cell Res*. 2022;64:102896.
9. Kondrateva E., Demchenko A., Slesarenko Y., Pozhitnova V., Yasinovsky M., Amelina E., et al. Generation of two induced pluripotent stem cell lines (RCMGi004-A and -B) from human skin fibroblasts of a cystic fibrosis patient with compound heterozygous F508del/W1282X mutations in CFTR gene. *Stem Cell Res*. 2021;52:102232.

10. Kondrateva E., Demchenko A., Slesarenko Y., Yasinovsky M., Amelina E., Tabakov V., et al. Derivation of iPSC line (RCMGi002-A) from dermal fibroblasts of a cystic fibrosis female patient with homozygous F508del mutation. *Stem Cell Res.* 2021;53:102251.
11. Kondrateva E., Panchuk I., Demchenko A., Grigorieva O., Zheglo D., Voronina E., et al. Generation of induced pluripotent stem cell line (RCMGi008-A) from human skin fibroblasts of a cystic fibrosis patient with compound heterozygous F508del/CFTRdela2.3 mutations in CFTR gene. *Stem Cell Res.* 2022;63:102854.
12. Panchuk I.O., Grigorieva O.V., Kondrateva E.V., Kurshakova E.V., Tabakov V.Yu., Bychkov I.O., et al. Generation of two iPSC lines from patient with Mucopolysaccharidosis IV B type and autosomal recessive non-syndromic hearing loss 12. *Stem Cell Res.* 2023;71:103183.
13. Kondrateva E., Grigorieva O., Kurshakova E., Panchuk I., Pozhitnova V., Voronina E., et al. Generation of induced pluripotent stem cell line (RCMGi009-A) from urine cells of patient with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Stem Cell Res.* 2023;70:103133.
14. Martins-Taylor K., Nisler B.S., Taapken S.M., Compton T., Crandall L., Montgomery K.D., et al. Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2011;29:488–91.
15. Laing O., Halliwell J., Barbaric I. Rapid PCR Assay for Detecting Common Genetic Variants Arising in Human Pluripotent Stem Cell Cultures. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2019;49:e83.
16. Assou S., Girault N., Plinet M., Bouckenheimer J., Sansac C., Combe M., et al. Recurrent Genetic Abnormalities in Human Pluripotent Stem Cells: Definition and Routine Detection in Culture Supernatant by Targeted Droplet Digital PCR. *Stem Cell Rep.* 2020;14:1–8.
17. Girish V., Lakhani A.A., Thompson S.L., Scaduto C.M., Brown L.M., Hagenson R.A., et al. Oncogene-like addiction to aneuploidy in human cancers. *Science.* 2023;381:eadg4521.
18. Brueckner L.M., Sagulenko E., Hess E.M., Zheglo D., Blumrich A., Schwab M., et al. Genomic rearrangements at the FRA2H common fragile site frequently involve non-homologous recombination events across LTR and L1(LINE) repeats. *Hum Genet.* 2012;131:1345–59.
19. Dekel-Naftali M., Aviram-Goldring A., Litmanovitch T., Shamash J., Reznik-Wolf H., Laevsky I., et al. Screening of human pluripotent stem cells using CGH and FISH reveals low-grade mosaic aneuploidy and a recurrent amplification of chromosome 1q. *Eur J Hum Genet.* 2012;20:1248–55.
20. Kislova A.V., Zheglo D., Pozhitnova V.O., Sviridov P.S., Gadzhieva E.P., Voronina E.S. Replication stress causes delayed mitotic entry and chromosome 12 fragility at the ANKS1B large neuronal gene in human induced pluripotent stem cells. *Chromosome Res.* 2023;31:23.