

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Никитина В.А.¹, Жанатаев А.К.², Чаушева А.И.¹, Дурнев А.Д.²
1 – лаборатория мутагенеза ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, зав. лаб. Куцев С.И.
2 – лаборатория фармакологии мутагенеза ФГБУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, зав. лаб. Дурнев А.Д.

Санкт-Петербург, 5-6 июня 2013 г

Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review

Jannie van Echten-Arends^{1†}, S
Birgit Sikkema-Raddatz³, Joha
Maas Jan Heineman^{1,2}, Fulco v

¹Section of Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Groningen, Groningen, The Netherlands ²Center for Reproductive Medicine, Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands ³Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Groningen, Groningen, The Netherlands ⁴The D

Table II Summary of the findings of 36 studies on the chromosomal makeup of human preimplantation embryos.

	All embryos (n = 815)	Developing, cleavage-stage embryos analysed for ≥8 chromosomes (n = 107)
Diploid	177 (22%)	15 (14%)
Mosaic	599 (73%)	77 (72%)
Diploid–aneuploid mosaic	480 (59%)	49 (46%)
% Diploid cells	(10155/14116) (72%)	(151/324) (47%)
Aneuploid mosaic	119 (15%)	28 (26%)
Other abnormalities	39 (5%)	15 (14%)
Haploid	3 (<1%)	1 (1%)
Polyploid	5 (<1%)	1 (1%)
Aneuploid	18 (2%)	4 (4%)
Monosomy	13 (2%)	3 (3%)
Trisomy	5 (<1%)	1 (1%)
Complex abnormal	13 (2%)	9 (8%)

Среди всех эмбрионов (n=815)

Диплоидных – 22%

Мозаичных – 73%

Среди развивающихся эмбрионов
(n=107)

Диплоидных – 14%

Мозаичных – 72%

Эмбриональные стволовые клетки

автор	Описание ХА	Количество линий с ХА	Общее количество исследованных линий
<i>Inzunza J. et all</i> Mol. Hum. Reprod, 2004	изодицентрик X	1	3
<i>Draper JS et all</i> Nat. Biotechnol, 2004	амплификация 17q трисомия 12	3	5
<u>Buzzard JJ</u> <i>et all</i> Nat. Biotechnol, 2004	транслокация X и 17	1	6
<u>Rosler ES</u> <i>et all</i> Dev. Dyn, 2004	трисомия 20	3	3
<u>Heins N</u> <i>et all</i> Stem Cells, 2004	трисомия 13 и триплоидия	2	6
<i>Maitra A et all</i> Nat. Genet., 2005	амплификация 17q трисомия 1, 8, 20 моносомия 13, 18	5	9
<i>Рубцов Н.Б. и др.</i> Мед. Генетика, 2007	перестройки хромосом 4, 9, 18	2	2

Donor-Derived Brain Tumor Following Neural Stem Cell Transplantation in an Ataxia Telangiectasia Patient

Ninette Amariglio^{1,2}, Abraham Hirshberg³, Bernd W. Scheithauer⁴, Yoram Cohen¹, Ron Loewenthal⁵, Luba Trakhtenbrot², Nurit Paz¹, Maya Koren-Michowitz², Dalia Waldman⁶, Leonor Leider-Trejo⁷, Amos Toren⁶, Shlomi Constantini⁸, Gideon Rechavi^{1,6*}

1 Cancer Research Center, Sheba Medical Center and Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel-Aviv, Israel, **2** Institute of Hematology, Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Israel, **3** Department of Oral Pathology, School of Dental Medicine, Tel Aviv University, Tel-Aviv, Israel, **4** Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, United States of America, **5** Tissue Typing Laboratory, Sheba Medical Center and Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel-Aviv, Israel, **6** Department of Pediatric Hemato-Oncology, Sheba Medical Center and Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel-Aviv, Israel, **7** Institute of Pathology, Tel-Aviv Medical Center, Tel-Aviv, Israel, **8** Pediatric Neurosurgery, Dana Children's Hospital, Tel-Aviv Medical Center, and Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel-Aviv, Israel

Funding: The authors received no specific funding for this study.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Academic Editor: Alain Fischer, Hôpital Necker-Enfants Malades, France

ABSTRACT

Background

Neural stem cells are currently being investigated as potential therapies for neurodegenerative diseases, stroke, and trauma. However, concerns have been raised over the safety of this experimental therapeutic approach, including, for example, whether there is the

Описан случай возникновения многоочаговой нейроглиальной опухоли головного мозга у 13-летнего мальчика, больного атаксией-телеангиэктазией, получившего ранее неоднократные внутримозжечковые и интратекальные инъекции фетальных нейральных стволовых клеток. Показано, что эти опухоли образовались из донорских клеток, причем как минимум от двух доноров

Мезенхимальные стволовые клетки

Wang Y et al Cytotherapy -2005	-высокий уровень теломеразной активности - моносомия X, амплификации 10q26, 16p13.3, 18p11.2 -при введении этой субпопуляции клеток мышам обнаружены многочисленные опухоли
Rubio D et al Cancer Res , 2005	-моносомия X, транслокации 3, 5, 8, 11 хромосом -при введении мышам обнаружены опухоли
Serakinci N et al Oncogene , 2004	-МСК, трансдуцированные hTERT -делеция Ink4a/ARF, мутация KRAS -гиперметилическое протормирование промотора гена DBCCR1
Miura M et al. Stem Cells , 2006	-трисомия 2 -дополнительные хромосомы с материалом хромосомы 15, частичная делеция плеча 14 хромосомы в сочетании с разными комбинациями анеуплоидий
В. М. Михайлов и соавт. Цитология , 2010	-опухоли у мышей: мезенхимомы, фибросаркомы и саркомы. Внутри опухолей выявлены скопления адипоцитов, хрящевых клеток, костные балки с очагами эритроидного, миелоидного и тромбоцитарного кроветворения, а также участки нейрональной ткани с клетками глии

МСК в качестве клеточной терапии

- синдром Гурлера, болезнь Паркинсона, метахроматическая лейкоцисторфия, несовершенный остеогенез, остеоартрит
- сердечно-сосудистые заболевания, ишемический инсульт
- травмы, сопровождающиеся крупными костными дефектами
- иммуномодулирующие свойства МСК используют для снижения реакции «трансплантат против хозяина»
- низкая иммуногенность МСК дополнительный источник при недостаточном количестве гемопоэтических стволовых клеток в трансплантате или при его неполном приживлении

МСК легко выделить из костного мозга или жировой ткани

Выделение, культивирование и введение клеток пациенту не связано с техническими и этическими проблемами

Home > Find Studies > Search Results

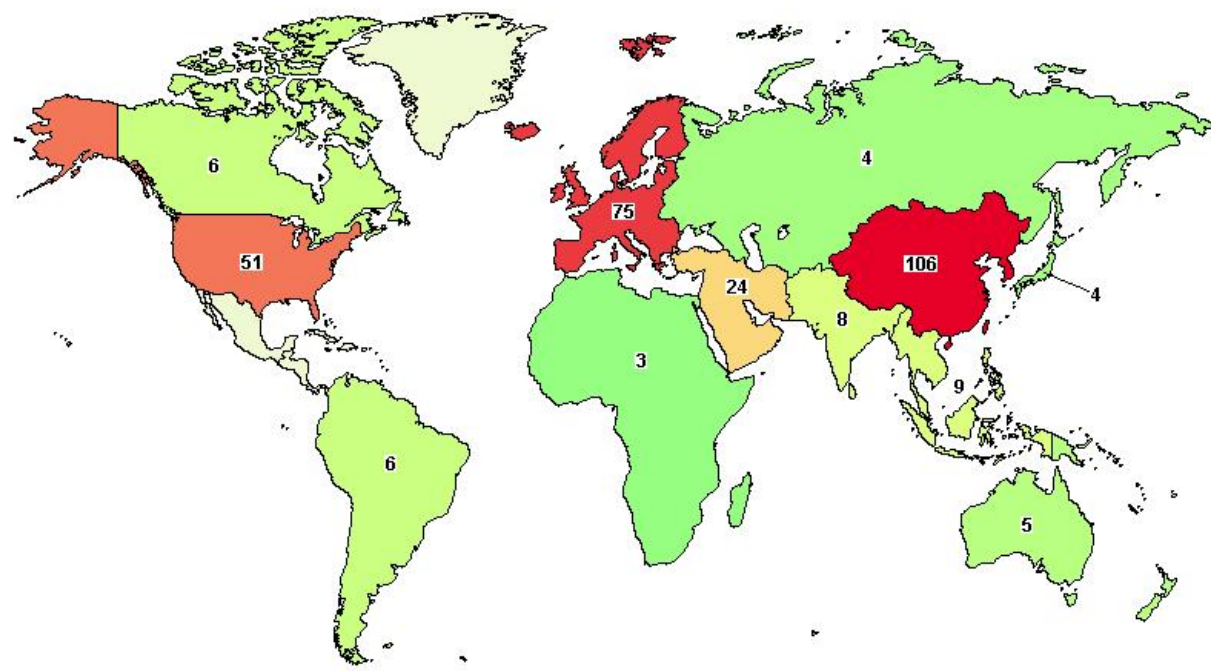
Text Size ▾

297 studies found for: multipotent mesenchymal stromal cells
[Modify this search](#) | [How to Use Search Results](#)

- List
- By Topic
- On a Map**
- Search Details

297 studies found, shown on map.
A similar map is available for all studies in ClinicalTrials.gov

Click on the map below to show a more detailed map (when available) or search for studies (when map not available).



Colors indicate number of studies with locations in that region
Least Most
Labels give exact study count

Region Name	Number of Studies	Hints:
-------------	-------------------	--------

Работа проведена под руководством академика РАМН, д.м.н., зав. лаб. мутагенеза Н.П. Бочкова
сотрудниками лаборатории:
Платонова В.И., Катосова Л.Д., Воронина Е.С., Чаушева А.И.,
Никитина В.А.

Всего обследовано 57 культур из костного мозга и 20 культур из жировой ткани.

Культуры МСК 2-5-го пассажей (3-10 клеточных делений) относили к группе ранних пассажей, а 10-15 (17-20 клеточных делений) – поздних.

МСК из костного мозга

Костный мозг здоровых доноров,
предназначенный для трансплантации.

В сотрудничестве с центром детской гематологии, онкологии и иммунологии (директор – член-корреспондент РАМН А.Г. Румянцев)

МСК из жировой ткани

Плановые операции на брюшной полости, или в результате операции липосакции передней брюшной стенки здоровых доноров.

В сотрудничестве с лабораторией молекулярной биологии ФГБУ МГНЦ РАМН (руководитель: д.б.н. Вейко Н.Н.) и ЗАО «Рементекс» (руководитель проф. Гольдштейн Д.В.)

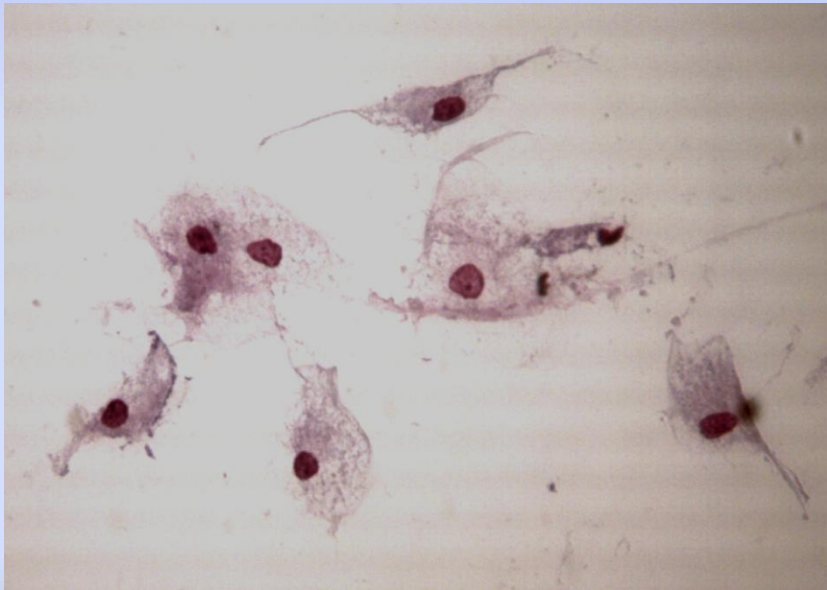
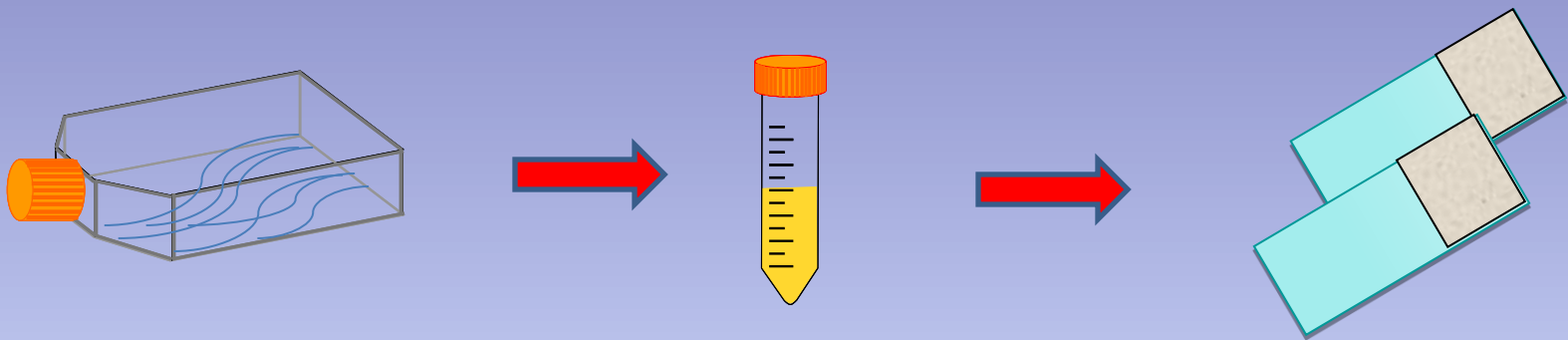
Номенклатура Международной организации клеточной терапии

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

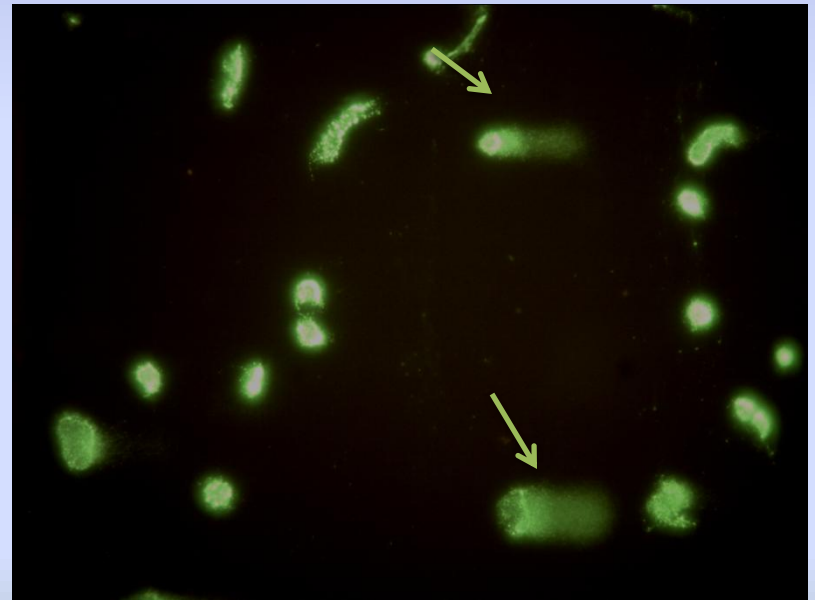
1. МСК – это фибробластоподобные, способные к адгезии клетки, сохраняющие свои свойства при культивировании
2. МСК дифференцируются в остеобласты, адипоциты и хондроциты *in vitro*
3. МСК экспрессируют маркеры: CD105, CD73, CD90 и не экспрессируют: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a (или CD19), HLA-DR

M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, et al. POSITION PAPER. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 2006, Vol. 8, No. 4, 315-317.

Метод гель-электрофореза отдельных клеток (comet assay)

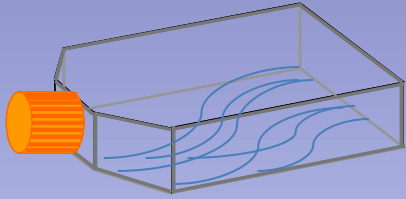


МСК (окраска азур-эозин)

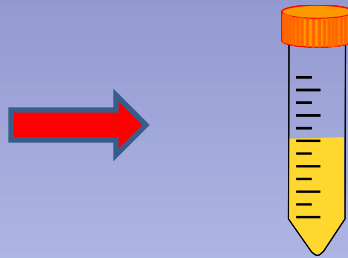


ДНК-кометы МСК (стрелками указаны апоптотические клетки)

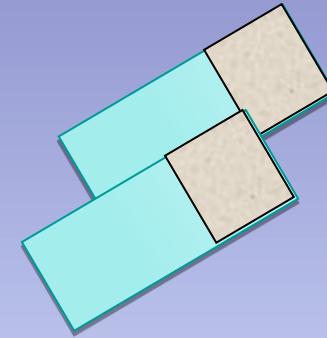
Культура МСК



Гипотонизация
Фиксация



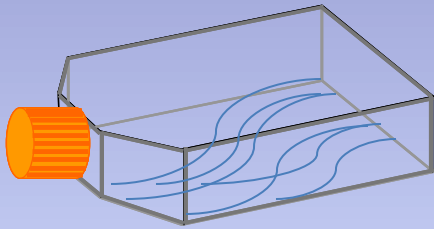
Приготовление
цитогенетических препаратов



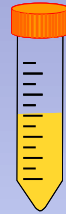
**GTG-кариотипирование,
учет хромосомных aberrаций**



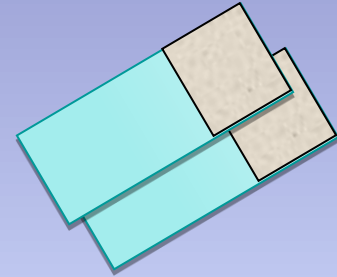
Культура МСК



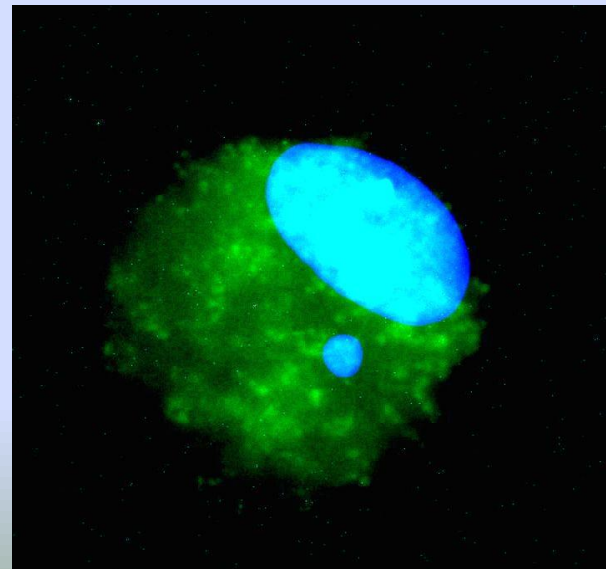
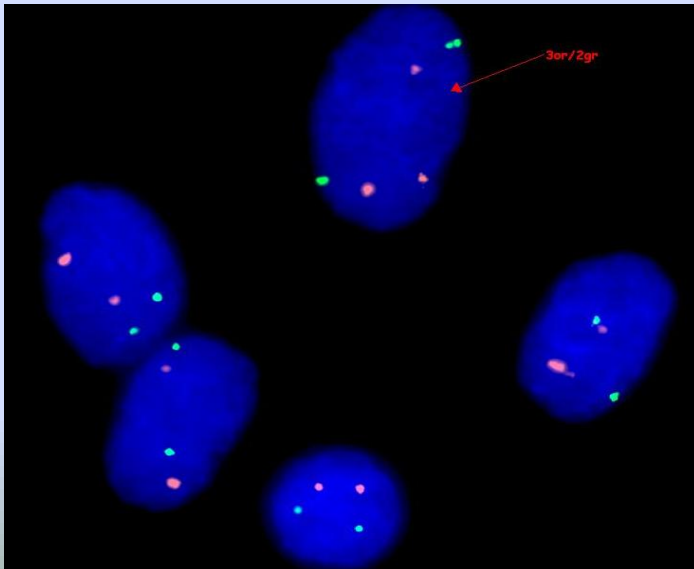
Гипотонизация
Фиксация



Приготовление
цитогенетических
препаратов

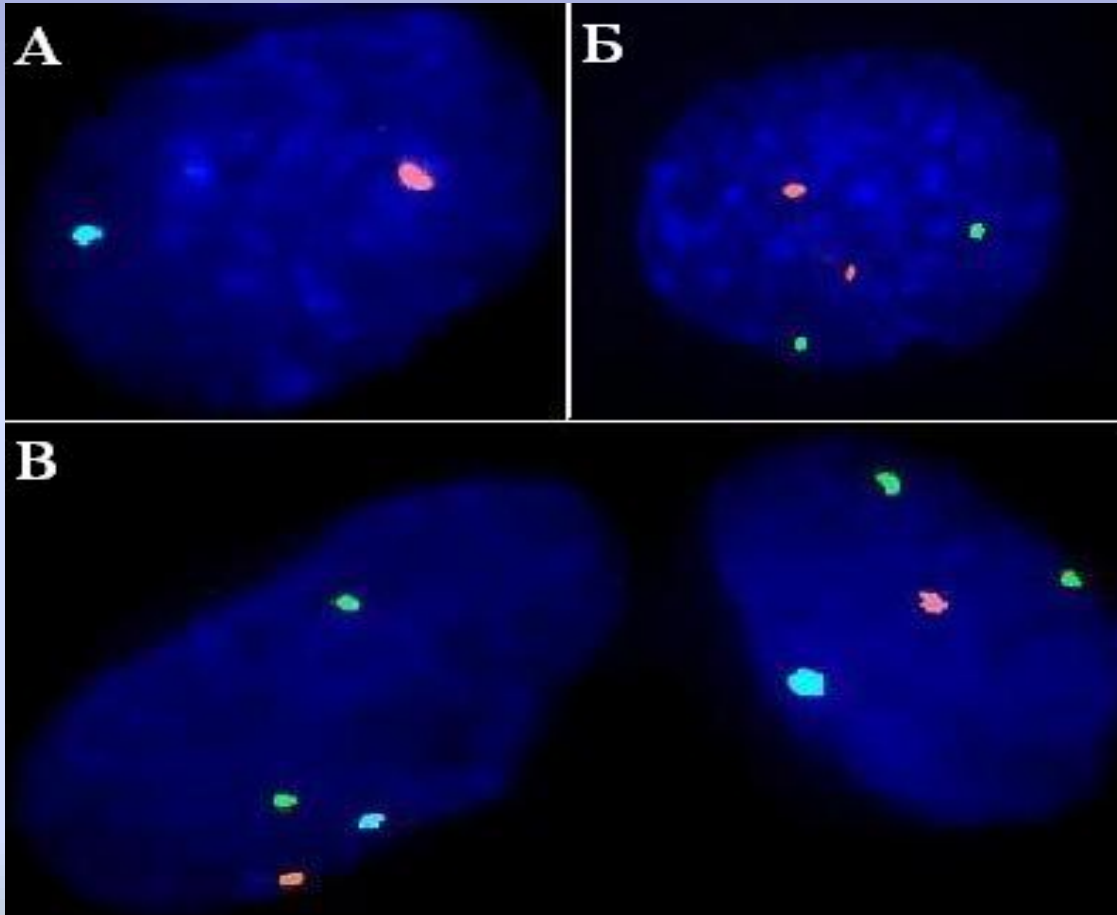


**FISH анализ интерфазных ядер
микроядерный тест**



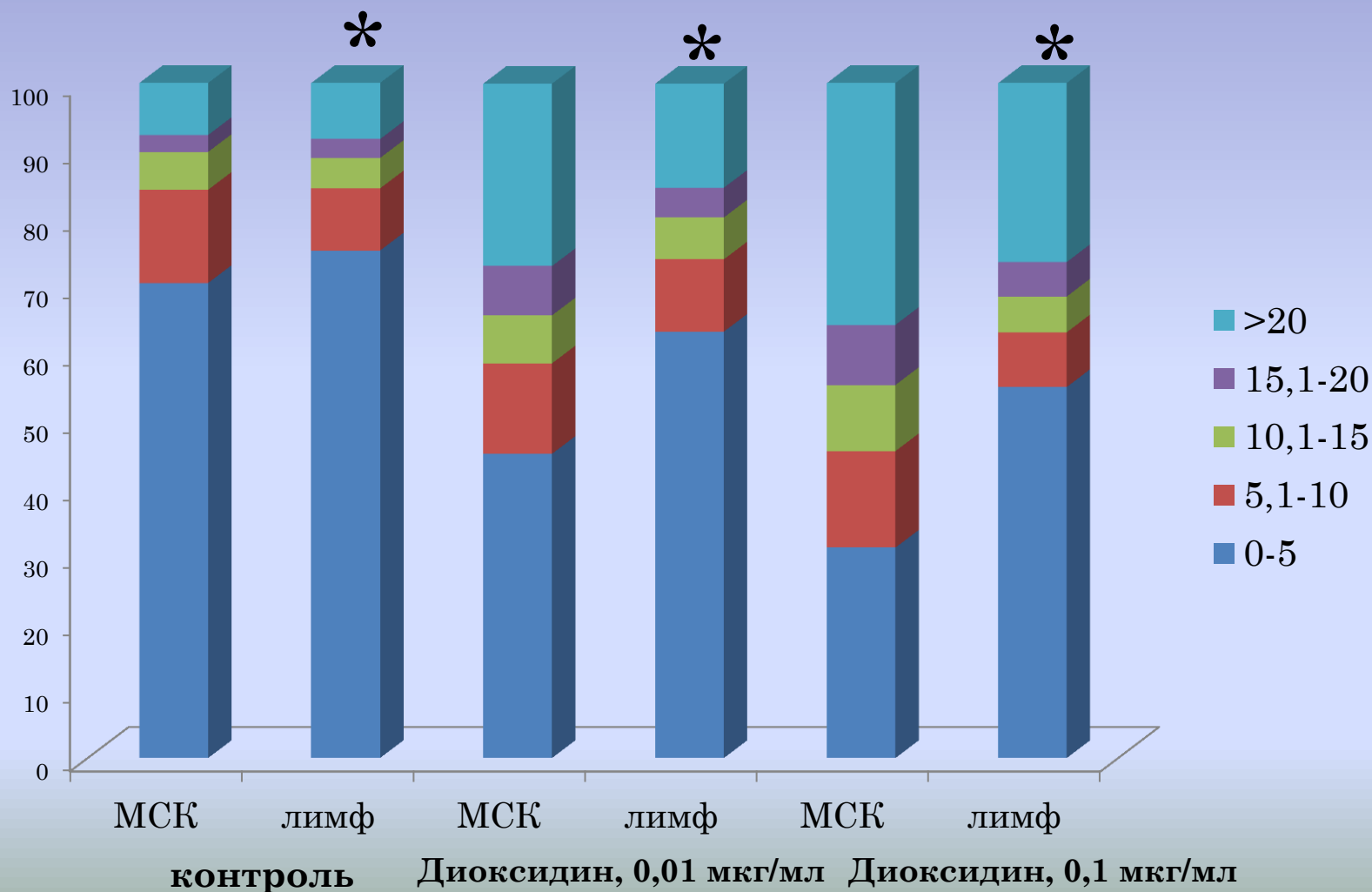
FISH – исследование

Использовали центромер-специфичные ДНК-зонды на хромосомы 6, 8, 11, X, Y



А - хромосомы X и Y (голубой и оранжевый сигналы), **Б** - хромосомы 6 и 8 (оранжевый и зеленый сигналы), **В** - хромосомы X, Y, 11 (голубой, оранжевый и зеленые сигналы).

При сравнительном исследовании культур жтМСК и лимфоцитов выявлено, что МСК более чувствительны к кластогенному действию диоксидина



Выявленные генетически нестабильные культуры МСК

МСК, выделенные из	Номер культуры по протоколу	№ пассажа	Характеристика
костного мозга	2В	4, 6, 12	<i>-трисомия 8</i>
	18В	10	<i>высокий уровень -ДНК повреждений (16,5%), -апоптотических комет (18,3%) -микроядер (13‰)</i>
	25В	4, 10	<i>-моносомия X высокий уровень -ДНК повреждений (9,1%), -апоптотических комет (10,2%) -микроядер (13‰)</i>
жировой ткани	2	10	<i>-моносомия 6</i>
	4	12	<i>-моносомия 6</i>
	R9	2	<i>-высокий уровень микроядер (14‰)</i>
	R16	2	<i>высокий уровень -ДНК повреждений (12,8%) и -микроядер (15‰)</i>

Необходима разработка рабочего протокола скрининга клонов аномальных клеток в клеточных продуктах

1 этап:

Методы генотоксикологии (ДНК-комет, учета хромосомных aberrаций или микроядерный тест)

В сочетании с GTG кариотипированием

2 этап:

молекулярные цитогенетические методы для подтверждения и количественной оценки

Дальнейшие исследования: разработка алгоритма действий и расчета вероятностных рисков для количественной и качественной оценки генетических нарушений в культурах клеток

Для этого необходимо накопление данных о стабильности МСК, выявление наиболее частых вариантов хромосомных и геномных мутаций, поиск молекулярных маркеров клеточной онкотрансформации и корреляции между числом предмутационных событий и возникновением клонов aberrантных клеток

Спасибо за внимание!