

(в норме $0,22 \pm 0,02$ ед.опт.пл./мг общ. липидов). Превышение нормативных значений при этом имелось, соответственно у 40 (80%) и 39 (78%) женщин. Уровень триеновых конъюгатов (ТК) исходно был в I группе $0,041 \pm 0,003$ ед.опт.пл./мг общ. липидов, во II $0,040 \pm 0,002$ ед.опт.пл./мг общ. липидов (в норме $0,027 \pm 0,002$ ед.опт.пл./мг общ. липидов). Повышенным данный показатель, соответственно, был у 36 (72%) и 35 (70%) больных. Показатель оснований Шиффа (ОШ) находился в среднем на уровне $22,7 \pm 0,06$ отн. ед./мг общ. липидов в I группе и $23,0 \pm 0,07$ отн. ед./мг общ. липидов во II (норма $15,3 \pm 0,12$ отн. ед./мг общ. липидов). Превышение нормативных значений ОШ при этом имелось, соответственно у 32 (64%) и 30 (60%) женщин.

В результате повторного исследования продуктов ПОЛ нами были получены следующие данные. После использования ОМТ произошло достоверное уменьшение содержания ДК в среднем на 36% до $0,19 \pm 0,04$ ед.опт.пл./мг общ. липидов. Нормализация этого параметра имела место у 45 (90%) женщин. По окончании лечебных мероприятий с использованием ОМТ содержание ТК уменьшилось на 36,6% ($p < 0,05$) до $0,026 \pm 0,002$ ед.опт.пл./мг общ. липидов, уровень их оставался выше лишь у 6 (12%) пациенток женщин. Аналогично на 30,4% ($p < 0,05$) снизился до $15,3 \pm 0,2$ отн. ед./мг общ. липидов нормы под воздействием общей магнитотерапии уровень наиболее агрессивных, конечных продуктов ПОЛ – ОШ, оставаясь повышенным лишь у 7 (14%) больных.

Традиционное лечение не имело заметного влияния на показатели молекулярных продуктов ПОЛ, в результате чего они оставались повышенными у большинства больных II группы.

Выяснилось, что активность двух ферментов, обладающих антиоксидантной активностью – каталазы и супероксиддисмутазы, исходно была снижена. Так, уровень каталазы составлял в I

группе $469,4 \pm 12,5$ Ед/г Нв в мин, в II $453,2 \pm 13,4$ Ед/г Нв в мин и был меньше нормы, соответственно, у 42 (84%) и 40 (80%) пациенток. Супероксиддисмутазы находилась в I группе на уровне $521,8 \pm 9,2$ Ед/г Нв в мин, в II $530,2 \pm 4,4$ Ед/г Нв в мин, и была снижена у 39 (78%) и 38 (76%) женщин, соответственно.

По окончании курса ОМТ был отмечен рост активности каталазы на 11,7%, она увеличилась до $547,5 \pm 11,2$ Ед/г Нв в мин ($p < 0,05$), достигнув нормы у 47 (94%) пациенток.

Активность супероксиддисмутазы на фоне ОМТ выросла $610,6 \pm 13,1$ Ед/г Нв в мин ($p < 0,05$), т.е. на 14,6%, по сравнению с исходным, нормализация данного параметра имела место у 42 (84%) больных.

В II группе изменения активности антиоксидантных ферментов были минимальными.

Таким образом, комплекс клинико-лабораторных исследований выявил разностороннее нормализующее воздействие общей магнитотерапии на гомеостаз пациенток, страдающих обострением хронического цервицита, что позволяет заключить о целесообразности ее включения в арсенал средств борьбы с этой распространенной патологией.

Выводы

1. При наличии у больных обострения хронического цервицита на фоне стандартного медикаментозного лечения рекомендуется использование общей магнитотерапии на установке магнитотерапевтической импульсной трехфазной УМТИ-3Ф («Колибри – эксперт»).

2. Больную помещают в положении «лежа на спине» на специальную кушетку с 3-мя соленоидами, создающими импульсы затухающего переменного магнитного поля с вариациями индукции 3,5 - 32 мТл и частотой 100 Гц. Рекомендуемая конфигурация соленоидов – «призма».

3. Рекомендуемая длительность одной процедуры – 20 мин, продолжительность курса лечения – 12 процедур.

4. Противопоказания к общей магнитотерапии:

- общие противопоказания для назначения физиотерапии;
- выраженная гипотония;
- наличие искусственного водителя ритма
- интенсивное кровотечение и/или состояние выраженной гипокоагуляции
- резкая гипотония
- беременность

Литература

1. Фаталиева Г.Г., Гречканев Г.О., Чандра-Д'Мелло Р. Общая магнитотерапия в комплексном лечении больных хроническими неспецифическими цервицитами // Физиотерапия, бальнеология, реабилитация. – №5.-2009.- С. 41 – 44.
2. Фаталиева Г.Г., Гречканев Г.О., Чандра-Д'Мелло Р. Коррекция некоторых показателей гомеостаза у больных с хроническими неспецифическими цервицитами при использовании общей магнитотерапии // Уральский медицинский журнал.- №10 (75).- 2010. – С. 148-151.
3. Фаталиева Г.Г., Чандра-Д'Мелло Р. Использование общей магнитотерапии для коррекции показателей липопероксидации у больных с хроническим цервицитом в сочетании с хроническим аднекситом // Современные технологии в медицине. №4. – 2010. – С.98-100.

Список сокращений

- АОСЗ – антиоксидантная система защиты
 ДК – диеновый конъюгат
 ИЛ – интерлейкин
 ИРИ – иммунорегуляторный индекс
 МПО – миелопероксидаза
 МТ – магнитотерапия
 ОЛ – общие липиды
 ОШ – основание Шиффа
 ПОЛ – перекисное окисление липидов
 ТК – триеновый конъюгат
 ЦИК – циркулирующий иммунный комплекс

Сведения об авторах:

Фаталиева Г.Г., кандидат мед. наук, «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России 603950, ГСП-470, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1 Тел. +7-831-419-98-20. E-mail: dec-fois@gma.nnov.ru

About the authors:

Fatalieva G.G., Candidate of Medicine, Nizhny Novgorod State Medical Academy of the Ministry of health of Russia 10/1, Minin Sq., Nizhny Novgorod 603005 RUSSIA. Tel.: +7-831-419-98-20. E-mail: dec-fois@gma.nnov.ru

Смолянинов А.Б.^{1,2,3}, Жаров Е.В.⁴, Айзенштад А.А.^{1,2,3},
Шунькина К.В.^{1,2}, Пирожков И.А.^{2,3}, Трофимова И.Л.^{1,2}

Профилактика нарушений кариотипа при трансплантации культур аутологических мезенхимальных стволовых клеток для восстановительного лечения

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

²Покровский Банк Стволовых Клеток, Санкт-Петербург

³Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, НИЛ клеточных технологий, Санкт-Петербург

⁴Центральная клиническая больница РАН, Москва

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в настоящее время обнаружены и выделены из костного мозга, жировой и мышечной тканей, плаценты, пупочного канатика. Они являются предшественниками большинства тканей человека, и могут быть успешно применены при лечении таких заболеваний, как инфаркт миокарда, кардиомиопатии, сахарный диабет, печеночная недостаточность, различных аутоиммунных заболеваний. Целью данной работы явилась идентификация хромосомных нарушений и определение числа пассажей для МСК, выделенных из жировой ткани (МСКЖТ), костного мозга (МСККМ) и пупочного канатика (МСКПК), при котором клетки сохраняют нормальный кариотип. Установлено, что даже при непродолжительном пассировании кариотип МСК может изменяться, для исключения клонального характера обнаруженных перестроек необходимо повторное кариотипирование культур. Кроме того, МСК являются интересной моделью изучения роли структурно-функционального статуса хромосом или их отдельных локусов.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, кариотип, спонтанная онкогенетическая трансформация, клеточная терапия.

Smolyaninov A.B.^{1,2,3}, Zharov E.V.⁴, Eisenstadt A.A.^{1,2,3},
Shunkina K.V.^{1,2}, Pirozhkov I.A.^{2,3}, Trofimova I.L.^{1,2}

Prevention of karyotype in transplantation of autologous mesenchymal stem cell cultures for medical rehabilitation

(a review of the literature and own data)

¹ Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg

² Pokrovsky Stem Cell Bank, St. Petersburg

³ Northwestern State Medical University name I.I. Mechnikova, Laboratory cellular technologies, St. Petersburg

⁴ Central Clinical Hospital RAS, Moscow

Mesenchymal stem cells are being discovered and isolated from bone marrow, fat and muscle tissue, placenta, umbilical cord. They are, are the precursors of most human tissues, and can be used successfully in the treatment of diseases such as myocardial infarction, cardiomyopathy, diabetes, liver failure, various autoimmune diseases. The aim of this study was to identify chromosomal abnormalities and determine the number of passages for mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow and umbilical cord at which the cells retain a normal karyotype. It was established that even after brief passaging karyotype mesenchymal stem cells may be varied to avoid clonal rearrangements detected character must re karyotyping cultures. In addition, mesenchymal stem cells are interesting models to study the role of structural and functional status of chromosomes or their loci.

Key words: mesenchymal stem cells, karyotype, spontaneous onkogeneti?eska? transformation, cell therapy.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в настоящее время обнаружены и выделены из костного мозга, жировой и мышечной тканей (Bernardo et.al., 2007; Кругляков и др., 2008; Kim et.al., 2010), плаценты, пупочного канатика (Mihu et.al., 2008; Kestendjieva et.al., 2008; Kim et.al., 2010; Fan et.al., 2011). Они являются предшественниками большинства тканей человека, и могут быть успешно применены при лечении таких заболеваний, как инфаркт миокарда, кардиомиопатии (Abdel-Latif et.al., 2007; Kuci et.al., 2012), сахарный диабет (Dominguez-Bendala, 2012), печеночная

недостаточность (Ogawa, Miyagawa, 2009), различных аутоиммунных заболеваний (Le Blanc K., Ringden O., 2005; Kuci et.al., 2012). Кроме того, МСК могут быть использованы для лечения последствий ожогов различной локализации и этиологии (Oh et.al., 2008), келоидных и гипертрофических рубцов (Kuci et.al., 2012), заживления трофических язв, ишемии нижних конечностей, токсических гепатитов, а также в травматологии и челюстно-лицевой хирургии (Суздальцева и др., 2011; Guzmán-Urbe et.al., 2012).

Количество МСК, полученных из различных источников для проведения

терапии недостаточно, и перед клеточной трансплантацией требуется их наращивание в культуре. Культивирование сопряжено с изменениям на молекулярном и хромосомном уровнях, и может оказать крайне негативное влияние на клетку, вплоть до ее опухолевой трансформации (Rubio et.al., 2005; Redaelli et.al., 2012; Ueyama et.al., 2012; Binato et.al., 2013). Так в ряде работ было показано, что длительное культивирование приводит к появлению хромосомных мутаций (Rubio et.al., 2005; Wislet-Gendebien et.al., 2012), трансплантация таких МСК вызывает образование опухолей в организме реципи-

ентов (Rubio et.al., 2005; Miura et.al., 2006; Rosland et.al., 2009). Однако в ряде других (Aguilar et.al., 2007; Bernardo et.al., 2007) такой корреляции не наблюдалось.

В связи с активным развитием клеточных технологий и перспективами их применения в медицине изучению стабильности генома МСК человека уделяется все больше внимания. Целью данной работы явилась идентификация хромосомных нарушений и определение числа пассажей для МСК, выделенных из жировой ткани (МСКЖТ), костного мозга (МСККМ) и пупочного канатика (МСКПК), при котором клетки сохраняют нормальный кариотип.

Материалы и методы

Выделение и культивирование МСК.

МСК, полученные в ходе пункции костного мозга или аспирации жировой ткани, выделялись на градиенте фикола (StemCell Technologies), МСКПК – ферментативным методом; после чего высевались на флаконы 75 см² и культивировались в течение 25–40 суток. Через двое-трое суток наблюдали прикрепленные к пластику фибробластоподобные колонии. Первый пересев культуры МСК проводили через 10–12 сут. после эксплантации, далее культуру пересевали каждые 5–7 суток с исходной плотностью $1,3 \times 10^3$ клеток/см². МСК культивировали с использованием AdvanceStem Media (Nuclone, Новая Зеландия) с добавлением 20% StemCell Supplement (Nuclone, Новая Зеландия) и раствора пенициллина/стрептомицина до конечной концентрации 100 мкг/мл (Nuclone, Новая Зеландия). Замену питательной среды производили каждые 3 суток. Часть культур криоконсервировали, используя стандартную методику (Stacey, Masters, 2008), после хранения при необходимости размораживали и культивировали снова.

Определение иммунофенотипа культур клеток

После каждого пассажа часть флаконов культур МСК каждого образца отбирали для проведения иммунофенотипирования методом проточной цитофлуориметрии с окрашиванием антителами к специфическим поверхностным маркерам: CD34-, CD45-, CD44+, CD90+, CD105+. Для этого клетки снимали со стенок флаконов раствором трипсина – версена (в соотношении 1:3), промывали

дважды в PBS, добавляли раствор антител, конъюгированных с флуорохромом. Инкубировали при комнатной температуре в 20 мин, и анализировали на проточном цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter, США). Анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения СХР.

Цитогенетический анализ

Для приготовления препаратов метафазных хромосом выбирали флаконы с покрытием дна клетками не более 70–80%. К культурам клеток добавляли колхицин в конечной концентрации 0,2 мкг/мл на 3–4 ч. Клетки снимали со стенок флакона с помощью раствора трипсин-версена (в соотношении 1:3), добавляли 5 мл 0,56% раствором KCl на 15–20 мин. при комнатной температуре для гипотонизации, перед центрифугированием добавляли 75 мкл упрощенного фиксатора Карнуа (этиловый спирт: ледяная уксусная кислота, в соотношении 3:1). Фиксацию проводили с использованием трех смен фиксатора. Полученную суспензию клеток раскапывали на мокрые охлажденные стекла с высоты 30–50 см. Готовые препараты метафазных хромосом окрашивали раствором Hoechst 33258 с последующим контрастированием актиномицином D, заключали в раствор на основе цитратно-фосфатного буфера и глицерина.

Анализ проводили с помощью микроскопа AxioScope A1, Carl Zeiss (Германия). Для получения фотоизображений использовали программное обеспечение Ikaros, Meta Systems (Германия).

Результаты

В работе были проанализированы 10 культур МСККМ, 4 МСКЖТ и 6 МСКПК, находящиеся на разных этапах пассирования. Все исследованные культуры клеток имели на своей поверхности маркеры МСК: CD34-, CD45-, CD44+, CD90+, CD105+.

Анализ числа и структуры хромосом (кариотипирование) проводили на 6–27 метафазных пластинках, результаты цитогенетического анализа суммированы в табл. Различия в количестве проанализированных метафаз связано с неодинаковым митотическим потенциалом клеток, взятых в исследование. Во всех исследованных культурах МСКЖТ в результате цитогенетического анализа хромосомных aberrаций обнаружено не было. В то время как в культурах

МСККМ и МСКПК были идентифицированы структурные и количественные перестройки хромосомного набора (таблица 1).

Для 6 культур МСККМ и 1 МСКПК цитогенетический анализ был выполнен после криоконсервирования клеток и повторного их культивирования. В половине проанализированных культур клетки сохраняли стабильный кариотип (таб., ВМ-10,13,28). В двух образцах (ВМ-30 и №2 МСКПК) обнаруженный на более ранних пассажах aberrентный кариотип не подтвердился. Однако, для одной культуры (ВМ-31) на более позднем пассаже был обнаружен полиморфный вариант расположения структурного гетерохроматина. Следует также отметить, что в трех случаях при кариотипировании МСККМ нам не удалось получить метафазные хромосомы, а на препаратах детектировались только ядра клеток.

Таким образом, результаты проведенного нами цитогенетического анализа свидетельствуют о том, что клетки с хромосомными aberrациями могут обнаруживаться независимо от количества пройденных культурой пассажей (таблица 1).

Обсуждение

МСК человека считаются одним из самых перспективных видов аутологичного материала для клеточной терапии и тканевой инженерии (Rubio et.al., 2005). На данный момент в большинстве случаев МСК получают в ходе пункции костного мозга или аспирацией жировой ткани. Альтернативным источником МСК является пупочный канатик (Kestendjieva et.al., 2008), т.к. его клетки характеризуются более высоким пролиферативным потенциалом по сравнению, например, с МСККМ (Kern et. al., 2006; Chao et.al., 2012). Среднее количество МСК, которые можно получить у пациента или выделить из биологического материала (плаценты, пупочного канатика) обычно не превышает $1-5 \times 10^5$, в то время как терапевтическая доза составляет $1-2 \times 10^6$ клеток на 1 кг тела пациента (Binato et.al., 2013), то есть $70-150 \times 10^6$ клеток (из расчета среднего веса пациента – 70 кг). Недостаточное для терапевтических целей число МСК требует их наращивания в культуре, что нередко сопряжено с изменениями хромосомного набора клеток (Rubio et.al., 2005; Wislet-Gendebien et.al., 2012;

Таблица 1.

Результаты цитогенетического исследования культур клеток		
№ п/п	Номер пассажира	Формула кариотипа
МСККМ		
BM-10	2, 4	46,XY[15-19]*
BM-12	3	46,XY[6]
BM-13	2, 3, 4	46,XY[6, 12, 16]
BM-15	1	46,XY[27]
	3, 4	Нет метафазных пластинок
BM-27	3	46,XY[7]
	9	Нет метафазных пластинок
BM-28	2, 3	46,XX[7-15]
BM-30	3	44,XX,der(1;14)t(p33;q32),-14,-16 [1]/45,X[1]/ 46,XX[21]
	4	46,XX[15]
BM-31	3	46,XY[17]
	7	46,XY,9phqh[8]
BM-32	2	46,XY[15]
BM-33	1	46,XY[9]
МСКЖТ		
1	4	46,XX[6]
2	3	46,XX[13]
3	8, 9	46,XX[8-10]
4	7	46,XY[11]
МСКПК		
1	3	46,XY[16]
2	2	46,XY,der(10)(?),der(12)(?)[1]/ 46,XY,der(6)(?)[1]/ 46,XY,t(12;14)(q11;q11.1),+add[1]/46,XY [13]
	3	46,XY [15]
3	3	46,XYqh-[22]
4	3	46,XY[10]
5	3	46,XY[15]
6	6	46,XX,der(9)[1]/ 46,XX,-7(?),+addC(?)der7(?),- 16,+22[1]/ 45,XX,der(10)?,-19[1]/ 46,XX [7]

* – в квадратных скобках указано количество проанализированных метафаз.

Binato et al., 2013). Так как большинство опухолей имеют абберантный кариотип, характеризующийся изменением структуры или количества хромосом (Roschke et al., 2008), вопрос об онкогенетическом потенциале МСК – один из важнейших в свете их клинического применения (Кругляков и др., 2008).

В нашей работе было установлено, что МСККМ и МСКПК изменяют свой кариотип при пассировании. Однако в ряде случаев сложно было установить, чем было вызвано появление клона клеток с абберантным кариотипом – условиями культивирования и приготовления препаратов метафазных хромосом, либо спонтанной трансформацией этих клеток. Так, энзиматический метод пассирования, т.е. необходимость использования раствора трипсин-версена для снятия клеток со стенок флаконов, и адгезивные свойства данных культур не

только привносят технические сложности в процесс приготовления цитогенетических препаратов, но и могут привести к спонтанным перестройкам хромосом (Шалыгина и др., 2009; Moralli et al., 2011). Также известно, что МСК, прошедшие спонтанную трансформацию, не экспрессируют на своей поверхности прежние маркеры, их иммунофенотип описан как: CD133+, CD34-, CD45-, CD105-, VEGF receptor+ (Motaln et al., 2010). Однако в нашем случае иммунофенотип культур сохранялся прежним (рис.1). Вероятно, что обнаруженные нами абберации связаны с отсутствием клонального характера данных перестроек (Binato et al., 2013). На это указывает и тот факт, что в 2 образцах обнаруженные хромосомные перестройки не подтвердились при последующем цитогенетическом анализе на более поздних пассажах.

Следует также отметить, что в случае с МСККМ, МСКЖТ и МСКПК человека приходится иметь дело с культурами, характеризующимися нестабильным количеством митозов. В нашем исследовании мы не получили препараты метафазных хромосом в трех проведенных анализах. Данный факт, по-видимому, связан с низким митотическим индексом клеток, взятых в исследование, что невозможно оценить визуально перед приготовлением препаратов хромосом. Также известно, что МСК длительное время пребывают в интерфазе, затем быстро проходят митоз и снова переходят в состояние пролиферативного покоя (Пальцев, 2009).

Особый интерес в свете современных представлений вызывают клетки, в кариотипе которых присутствуют полиморфные варианты расположения гетерохроматиновых блоков (BM-31 и №3 МСКПК, табл. 1). В настоящее время появляется все больше исследований, доказывающих вклад гетерохроматиновых районов в эмбриогенез и гаметогенез человека (Баранов, Кузнецова, 2007; Parris, 2009, 2010; Probst, Almouzni, 2011). Спорным остается вопрос о значимости полиморфных вариантов гетерохроматина при невынашиваемости беременности и наследственной патологии (Баранов, Кузнецова, 2007). Однако исследования, посвященные изучению структурно-функциональных свойств гетерохроматина МСК скудны. Известно, что гетерохроматиновые районы изменяют свое положение в пространстве ядра при дифференцировке МСК (Лавров, Вольдгорн, 2011) и перед их вступлением в апоптоз (Raz et al., 2006). Чем вызвано появление полиморфного расположения гетерохроматина хромосомы 9 в образце МСККМ BM-3, и каким образом это может отразиться на свойствах клеток остается неясным. Следует отметить, что в литературе отсутствуют описания подобных случаев.

Таким образом, даже при непродолжительном пассировании кариотип МСК может изменяться, для исключения клонального характера обнаруженных перестроек необходимо повторное кариотипирование культур. Кроме того, МСК являются интересной моделью изучения роли структурно-функционального статуса хромосом или их отдельных локусов.

Литература

1. Bernardo M., Zaffaroni N., Novara F., Cometa A., Avanzini M., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone M., Zuffardi O., Locatelli F. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms // *Cancer Res.*- 2007.- Vol. 67.- № 19.- P. 9142- 9149.
2. Круляков П., Соколова И., Полицев Д. Стволовые клетки дифференцированных тканей взрослого организма // *Цитология* – 2008.- Т.50.- № 7. -с.557-567.
3. Kim J., Jeon H., Yang Y., Oh W., Chang J. Application of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in disease models // *World J.Stem Cells.*- 2010.- Vol.26.- №2(2).-P.34-38.
4. Mihiu C., Mihiu D., Costin N., Rus Ciuca D., Su?man S., Ciortea R. Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord // *Rom J. Morphol. Embryol.*- 2008.- Vol.49.- №4.- P.441-446.
5. Kestendjieva S., Kyurkchiev D., Tsvetkova G., Mehandjiev T., Dimitrov A., Nikolov A., Kyurkchiev S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord // *Cell Biol.Int.*- 2008.- Vol. 32.- № 7.- P. 724-732.
6. Fan C., Zhang Q., Zhou J. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord // *Stem Cell Rev.* – 2011.- Vol. 7.- № 1.- P. 195-207.
7. Abdel-Latif A., Bolli R., Tleyjeh I., Montori V., Perin E., Hornung C., Zuba-Surma E., Al-Mallah M., Dawn B. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis // *Arch.Intern.Med.*- 2007.-Vol.167.- № 10.-P.989-997.
8. Kuci S., Henschler R., Muller I., Biagi E., Meisel R. Basic Biology and Clinical Application of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: From Bench to Bedside // *Stem Cells Inter.*- 2012.- Vol. 2012.- P. 1-3.
9. Dominguez-Bendala J., Lanzoni G., Inverardi L., Ricordi C. Concise review: mesenchymal stem cells for diabetes // *Stem Cells Transl. Med.* – 2012.- Vol. 1.- № 1.- P. 59-63.
10. Ogawa S, Miyagawa S. Potentials of regenerative medicine for liver disease // *Surg. Today.* – 2009.- Vol. 39.- № 12. P.1019-1025.
11. Le Blanc K., Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation.- 2005.- *Biol.Blood Marrow Transplant.*- Vol.11.- № 5.- P.321-34.
12. Oh J., Kim M., Shin M., Lee H., Ko J., Wee W., Lee J. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury // *Stem Cells.*- 2008.-Vol. 26.- № 4. P.1047-1055.
13. Guzm?n-Uribe D., Alvarado -Estrada K., de Jeus Pozos Guillen A., Perez S., Ibanez R. Development of A Three-Dimensional Tissue Construct from Dental Human Ectomesenchymal Stem Cells: In Vitro and In Vivo Study // *The Open Dentistry Jour.*- 2012.- Vol. 6.- Suppl. M4.- P. 226-234.
14. Суздальцева Ю.Г., Жидких С.Ю., Пар В.И., Бурунова В.В., Горюнов С.В., Смирнова Г.О., Жидких Н.В., Воронов А.В., Ярыгин К.Н., Ступин В.А. Мезенхимальные стволовые клетки пуповины новорожденного в терапии длительно незаживающих ран // *Стволовые клетки и регенеративная медицина: сб.статей.*- 2011.- с. 181-205.
15. Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M., de la Fuente R., Cigudosa J., Lloyd A., Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation // *Cancer Res.*- 2005.- Vol.65.- P.3035-3039.
16. Redaelli S., Bentivegna A., Foudah D., Miloso M., Redondo J., Riva G., Baronchelli S., Dalpra L., Tredici G. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of in vitro cultured human bone marrow mesenchymal stem cells // *Stem Cell Res.& Therapy.*-2012.- Vol.3.- № 47.- P. 1-17.
17. Ueyama H., Horibe T., Hinotsu S., Tanaka T., Inoue T., Urushihara H., Kitagawa A., Kawakami K. Chromosomal variability of human mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions // *J.Cell Mol.Med.*- 2012.-Vol.16.- № 1.- P.72-82.
18. Binato R., de Souza Fernandez T., Lazzarotto-Silva C., Du Rocher B., Mencalha A., Pizzatti L. , Bouzas L., Abdelhay E. // Stability of human mesenchymal stem cells during in vitro culture: considerations for cell therapy.- *Cell Prolif.*- 2013.- Vol. 46. -P. 10-22.
19. Wislet-Gendebien S., Poulet2 C., Neirinckx V., Hennuy B., Swingland J., Laudet E., Sommer L., Shakova O., Bours V., Rogister B. In vivo tumorigenesis was observed after injection of in vitro expanded neural crest stem cells isolated from adult bone marrow // *PLOS.* - 2012.- Vol.7.- Issue 10.- P. 1-13.
20. Miura M., Miura Y., Padilla-Nash H., Molinolo A., Fu B., Patel V., Seo B., Sonoyama W., Zheng J., Baker C., Chen W., Ried T., Shi S. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation // *Stem Cells.*- 2006.- Vol.24.- №4.- P.1095-1103.
21. Rosland G., Svendsen A., Torsvik A., Sobala E., McCormack E., Immervoll H., Mysliwicz J., Tonn J.-C., Goldbrunner R., Lonning P., Bjerkvig R., Schichor C. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation // *Cancer Res.*- 2009.- Vol. 69.- № 13.- P. 5331-5339.
22. Aguilar S., Nye E., Chan J., Loebinger M., Spencer-Dene B., Fisk N., Stamp G., Bonnet D., Janes S. Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung // *Stem Cells.*- 2007.-Vol.25.- № 6.-P.1586-1594.
23. Stacey G., Masters J. Cryopreservation and banking of mammalian cell line // *Nat.Protoc.* – 2008.- Vol. 3.- № 12.- P. 1981- 1989.
24. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kl?ter H., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue // *Stem Cells.*- 2006.- Vol.24.- № 5.-P.1294-1301.
25. Chao Y., Wu H., Chan C., Tsai C., Peng C., Wu K. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell transplantation // *J.Biomed. Biotechnol.*- 2012.-Vol. 2012.- P. 1-5.
26. Roschke A. , Glebov O., Lababidi S., Gehlhaus K., Weinstein J., Kirsch I. Chromosomal instability is associated with higher expression of genes implicated in epithelial-mesenchymal transition, cancer invasiveness, and metastasis and with lower expression of genes involved in cell cycle checkpoints, dna repair, and chromatin maintenance // *Neoplasia.* - 2008.- Vol. 10.- № 11.- P. 1222-1230.
27. Moralli D., Yusuf M., Mandegar M., Khoja S., Monaco Z., Volpi E. An Improved Technique for Chromosomal Analysis of Human ES and iPS Cells // *Stem Cell Rev.*- 2011.- Vol.7.- № 2.- P.471-470.
28. Motaln H., Schichor C., Lah T. Human Mesenchymal Stem Cells and Their Use in Cell-Based Therapies // *Cancer.*- 2010.- Vol.116.- № 11.- P. 2519-2530
32. Parris G.E. A hypothetical Master Development Program for multi-cellular organisms:Ontogeny and phylogeny // *Biosci Hypotheses.* – 2009. – № 2. – P. 3-12.