

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

**Кушнірук Вероніка Олегівна**

УДК 575.174 + 575.113 + 576.5 + 576.3

**КАРІОТИПІЧНА ЕВОЛЮЦІЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ДОРОСЛОЇ  
ЛЮДИНИ НОВОЇ ЛІНІЇ 4VL ПРИ АДАПТАЦІЇ ДО УМОВ *IN VITRO***

03.00.22 - молекулярна генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата наук

Київ – 2018

Дисертація є рукопис.

Роботу виконано у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор  
**Лукаш Любов Леонідівна,**  
Інститут молекулярної біології і генетики  
НАН України,  
завідувач відділу генетики людини.

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Сиволоб Андрій Володимирович,**  
Київський Національний університет імені Тараса  
Шевченка,  
Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»,  
професор кафедри молекулярної та медичної генетики;

кандидат біологічних наук, доцент  
**Подольська Світлана Володимирівна,**  
Національна медична академія післядипломної освіти  
імені П.Л. Шупика,  
доцент кафедри медичної та лабораторної генетики.

Захист дисертації відбудеться «23» жовтня 2018 року о 10-30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного 150, м. Київ, 03143.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного 150, м. Київ, 03143.

Автореферат розісланий «\_\_» вересня 2018 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук, с.н.с.

Крупська І.В.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність.** Дана робота присвячена актуальній проблемі молекулярної генетики: каріотипічній еволюції стовбурових клітин дорослої людини при їхній адаптації до змінених умов існування.

Еволюції каріотипу клітинних ліній присвячено багато робіт, проте переважна більшість із них проводилась із використанням злоякісних клітин людини, які початково містять хромосомні аберації, характеризуються підвищеною генетичною нестабільністю, ламкістю хромосом, порушенням роботи генів-онкосупресорів і регуляції клітинного циклу (Magrath I.T. 1980, Lengauer C. 1998, Kops G.J. 2005, Wilkens L. 2012, Onoda N. 2014, Lang J. 2015, Степаненко О.А. 2016, Gebauer F. 2016, Kaseb H.O. 2016) чи клітин гризунів, які, як відомо, значно легше піддаються іморталізації порівняно з клітинами людини (Frosina G. 2001, Rangarajan A. 2004). Частина іморталізованих або стабільних ліній клітин людини походить від плюрипотентних ембріональних стовбурових клітин, головною з небажаних властивостей яких є здатність формувати тератоми (Blum B. 2009, Hentze H. 2009, Bulic-Jakus F. 2016, Bedel A. 2017, Lee A.S. 2017). Крім того, робота з останніми має біоетичні обмеження (King N.M. 2014).

З іншого боку, первинні клітинні культури, виділені з нормальних тканин дорослого організму людини, мають обмежений проліферативний потенціал: після певного періоду росту настає ліміт Хейфліка, відбувається старіння та загибель культури (Hayflick L. 1961). На відміну від інших видів, спонтанна іморталізація первинних клітин людини практично неможлива, тому для отримання стабільних ліній використовують цілий ряд вірусів (SV40, Епштейна-Барр, папіломавіруси, аденовіруси) або векторні конструкції з геном теломерази hTERT та онкогенів; проте вектори теж можуть становити небезпеку, наприклад, збільшуючи ризик інсерційних мутацій (Фрешни Р.Я. 2010, Pertek A. 2014). В літературі існують чисельні дані стосовно каріотипічної мінливості таких клітинних ліній; показано, що експресія ранніх вірусних генів призводить до індукції генних і хромосомних мутацій, а також - підсилення ознак злоякісної трансформації, появи пухлиноутворювальної здатності (Лукаш Л.Л. 2002, Lukash L.L. 2013, Speiseder T. 2016). Дестабілізацію клітинного геному спричиняють також і самі векторні конструкції (Lin Y. C. 2014, Nguyen H.T. 2013, Mayshar Y. 2010, Peterson S.E. 2014, Lamm N. 2016).

В деяких дослідженнях вивчались процеси і закономірності каріотипічної еволюції іморталізованих клітинних ліній ссавців (Оленов Ю.М. 1977, Вахтин Ю.Б. 1980, Мамаева С.Е. 1996, Frosina G. 2001, Rangarajan A. 2004). Як приклад, хромосомна нестабільність клітинних ліній ЕГК миші при становленні їх *in vitro* асоційована з інактивацією контрольної точки мітозу, появою мутантного білка p53 і зміною експресії одного із ключових репаративних ензимів O<sup>6</sup>-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (Яцишина А.П. 2007).

Незважаючи на величезну кількість існуючих клітинних ліній, виникає потреба в нових, особливо таких, що отримані з нормальних тканин дорослого організму та мають необмежений проліферативний потенціал, тобто, є іморталізованими.

Нові можливості отримання стабільних клітинних ліній з'явилися після відкриття явища перепрограмування геному диференційованих клітин ссавців у стовбурові плюрипотентні за допомогою введення векторних конструкцій, що містять гени Oct3/4, Sox2, Klf4 таc-Myc (Takahashi K., Yamanaka S. 2006). На даний час у світі відбувається зміна парадигми відносно індукції чи відновлення плюрипотентного стану клітин без використання чужорідного генетичного матеріалу, застосовуючи обробку мРНК, малими хімічними молекулами чи спеціальними середовищами з гормонами або цитокінами (Kim D. 2009, Warren L. 2010, Zhou Y.Y. 2013, Higuchi A. 2015, Ghazizadeh Z. 2017).

У відділі генетики людини ІМБГ НАН України отримано нову іморталізовану клітинну лінію 4BL із клітин периферійної крові здорового дорослого донора з використанням спеціального середовища, що містить складний комплекс ростових факторів і цитокінів (Лукаш Л.Л. 2011).

У літературі наявні лише уривчасті відомості про еволюцію каріотипу клітинних ліній, що ведуть походження від нормальних тканин дорослої людини, і фактично, жодна з груп науковців не досліджувала в динаміці каріотипічні зміни репрограмованих клітин, отриманих з використанням спеціальних середовищ та рекомбінантних ростових факторів. В той же час клітинні лінії, особливо ті, які отримані із нормальних тканин, є цінними об'єктами досліджень, тому важливо вивчати особливості і наслідки їхньої каріотипічної еволюції в культурі. Літературні відомості стосовно стандартних клітинних ліній свідчать про те, що адаптація клітин до нових умов існування, як правило, супроводжується суттєвими перебудовами хромосомного апарату і зміною регуляції багатьох генів, що може суттєво впливати на результати досліджень. Відповідно, регулярний моніторинг каріотипу клітинних ліній в динаміці є необхідним. Окрім мінливості хромосомного апарату, нас цікавило можливе адаптивне значення генів, що містяться в ділянках дуплікацій/делецій для пристосування до нових умов існування, а також динаміка змін молекулярно-генетичних, морфологічних, ростових характеристик та стовбурового потенціалу нової клітинної лінії 4BL при її тривалому культивуванні *in vitro*.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалась в рамках бюджетних наукових тем відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Особливості експресії репаративного ензиму O<sup>6</sup>-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази в умовно нормальних та пухлинних клітинних лініях» (номер державної реєстрації 0108U008526, 2009 – 2013 рр.), та «Регуляція експресії гена репаративного ензиму MGMT під впливом деяких біологічно активних речовин (гормонів, цитокінів, лектинів та ін.) у клітинах ссавців», (№ державної реєстрації 0115U000355, 2014-2018 рр.), а також у двох наукових проектах, одержаних на конкурсній основі: «Альтернативні моделі для тестування клітинних препаратів на онкогенність» (№ державної реєстрації 0114U003877, 2014-2016 рр.), який фінансується відділенням цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при НАН України і «Розробка методу одержання біотехнологічних раневих покриттів для подальшого використання в медицині» (№ Договору 33/2015, 2015-2019рр., № державної

реєстрації 0115 U 001358).

**Мета і задачі дослідження.** Основною метою роботи було комплексне дослідження каріотипічної еволюції, молекулярно-генетичних, морфологічних і ростових особливостей та стовбурового потенціалу нової клітинної лінії 4BL при її адаптації до умов культивування *in vitro*.

Для досягнення мети сформульовано наступні завдання:

1. Дослідити морфологічні та ростові особливості клітин людини лінії 4BL, отриманої із периферійної крові здорового дорослого донора з використанням спеціального середовища, що містить комплекс ростових факторів.

2. Визначити здатність клітин лінії 4BL рости без прикріплення до субстрату (тест у напіврідкому агарі) і диференціюватись в адипогенному, остеогенному та міогенному напрямках.

3. Дослідити імунофенотип клітинної лінії 4BL за допомогою проточної цитофлуориметрії.

4. Проаналізувати динаміку каріотипічних змін клітинної лінії 4BL в процесі тривалого культивування *in vitro*: визначити модальний клас хромосом, кількісні геномні та хромосомні перебудови.

5. Визначити основні риси каріотипічної мінливості досліджуваної клітинної лінії: спектр і частоту основних структурних аберацій хромосом та наявність маркерних хромосом.

6. Дослідити рівень експресії генів, що кодують теломеразу *hTERT* і онкосупресор *p53* на ранніх та пізніх пасажах культивування.

7. Дослідити можливу кореляцію між зростанням рівня хромосомної нестабільності і експресією гена репаративного ензиму *MGMT* як при становленні клітинної лінії 4BL, так і під впливом зовнішнього стрес-чинника (висока йонна сила середовища).

8. Проаналізувати ультраструктурні аберації хромосомної ДНК клітин 4BL за допомогою агару CGH та їхню можливу селективну перевагу при тривалому культивуванні.

**Об'єкт дослідження:** нова клітинна лінія 4BL, виділена із периферійної крові здорового дорослого донора та еволюція її каріотипу при культивуванні *in vitro*.

**Предмет дослідження:** зміни каріотипу, а також особливості морфологічних, ростових, молекулярно-генетичних характеристик та стовбурового потенціалу клітин лінії 4BL в процесі її становлення та стабілізації *in vitro*.

**Методи дослідження.** Для вирішення поставлених завдань були використані цитогенетичні, молекулярно-генетичні, цитологічні і біохімічні методи: отримання метафазних пластинок, рутинне та диференційне забарвлення хромосом з подальшим каріотипуванням, FISH-аналіз, матрична порівняльна геномна гібридизація – агару CGH, виділення РНК, синтез кДНК, ПЛР в реальному часі, Вестерн-блот аналіз, культивування клітин *in vitro*, цитологічне забарвлення клітин і фотографування живих клітин та забарвлених препаратів, отримання та аналіз кривих росту, тест у напіврідкому агарі, диференціювання клітин в адипогенному, остеогенному та міогенному напрямках, проточна цитофлуориметрія, статистична обробка даних.

**Наукова новизна одержаних результатів.** У роботі вперше досліджено каріотипічну еволюцію, молекулярно-генетичні, морфологічні, ростові особливості та стовбуровий потенціал нової клітинної лінії 4BL, отриманої із периферійної крові здорового дорослого донора, на різних етапах культивування при адаптації до умов *in vitro*.

Виявлено експресію гена теломерази в клітинах лінії 4BL на різних пасажах культивування, що підтверджує її іморталізацію. Визначено імунофенотип клітин лінії 4BL: CD105+CD73+CD90-CD45-CD34-CD14-, за яким, вони, ймовірно, належать до мезенхімальних негемопоетичних стовбурових клітин. Показано здатність клітин рости в напіврідкому агарі та диференціюватись в адипогенному, остеогенному та міогенному напрямках, що підтверджує стовбуровий потенціал клітин лінії 4BL.

Проведено аналіз каріотипу нової стовбурової лінії клітин людини 4BL за допомогою комплексу методів та здійснено порівняння із стовбуровими та раковими клітинними лініями і встановлено такі закономірності: втрата статевої хромосоми протягом тривалого культивування і не випадковий характер хромосомних аберацій, що подібно до умов в організмі.

Визначено унікальний комплекс структурних аберацій хромосом: t(1;11)(q12;p15), der(2)(p11~12), t(5;15)(q10;p10), t(12;15)(p10;q10), t(16;21)(q13;p11) та шість маркерних хромосом, які за даними FISH-аналізу містять деривати 4-ї та 17-ї хромосом, що може стати штрих-кодом лінії 4BL при її паспортизації.

Незважаючи на виявлені хромосомні аберації, виявлено домінування біядиплоїдного модального класу із каріотипом 42-43 хромосоми в клітинах лінії 4BL протягом більше 10 років культивування.

Досліджено, що клітинна лінія 4BL адаптувалась до виживання в умовах *in vitro* з притаманними їй морфологією, ростовими властивостями та хромосомними перебудовами, і дія стабілізуючого добору в стандартних умовах культивування спрямована на їхнє підтримання. Показано повторну індукцію хромосомної нестабільності, характерної для етапу становлення еволюції каріотипу, внаслідок дії стрес-фактора на етапі стабілізації каріотипу клітин лінії 4BL. Встановлено позитивну кореляцію між рівнем хромосомної нестабільності і експресією репаративного ензиму MGMT.

Порівняльний цитогенетичний аналіз клітин лінії 4BL, проведений на різних стадіях культивування, дозволяє припустити стабілізований стан каріотипу на пізніх пасажах та висловити гіпотезу про хвилеподібний характер каріотипічної еволюції: від 120-го до 205-го пасажу зберігаються основні значні перебудови (дуплікації 2, 10, 16, 19 і делеції 4, 10, 12, 13, 17, X) та утворюються незначні нові, які елімінуються на наступному досліджуваному пасажі; також відбуваються зміни плоідності клітин суб-модальних класів при збереженні домінування основного модального класу. Досліджено комплекс хромосомних аберацій клітин лінії 4BL за допомогою методу агау CGH, проаналізовано масив генів, які входять до їхнього складу та зроблено припущення щодо їхньої можливої селективної переваги.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримано нову стовбурову клітинну лінію 4BL із периферійної крові здорового дорослого донора без

використання чужорідного генетичного матеріалу з метою вивчення каріотипічної еволюції та зв'язку цього процесу з іморталізацією. Клітинну лінію 4BL можна рекомендувати як модельний об'єкт для вивчення фундаментальних процесів: адаптації до умов тривалого культивування *in vitro*, каріотипічної еволюції в регресивних умовах, а також, зважаючи на її тривале підтримання у культурі – понад 10 років – як аналог вікових змін клітин людини при старінні. Також можливе використання досліджуваної клітинної лінії для тестування лікарських препаратів та інших біотехнологічних цілей, а враховуючи джерело походження даної клітинної лінії (периферійна кров дорослого здорового донора), вона може бути використана як відносний контроль при проведенні досліджень на ракових клітинних лініях чи лініях клітин, отриманих з використанням генно-інженерних конструкцій.

Матеріали дисертації також можуть бути використані у спецкурсах з молекулярної генетики для студентів біологічних факультетів.

**Особистий внесок здобувача.** Наведені в дисертації результати отримані здобувачем особисто або за безпосередньої участі. Планування роботи, аналіз і обговорення отриманих даних та публікацій до друку здійснено разом із науковим керівником. Автором особисто здійснено культивування клітин лінії 4BL, підбір умов для цитологічного забарвлення, фотографування живих і забарвлених клітин, проведено тест у напіврідкому агарі, адаптовано (модифіковано) методику та проведено диференціювання клітин, побудову та аналіз кривих росту, отримання метафазних пластинок, рутинне забарвлення хромосом та аналіз отриманих даних при рутинному каріотипуванні. Мікроскопічний аналіз каріотипу при рутинному забарвленні проведено спільно з Кочубей Т.М. Диференційне забарвлення хромосом, каріотипування та обговорення отриманих даних, а також результатів FISH-аналізу здійснено спільно з д.мед.н., професором Акоюн Г.Р. та к.б.н. Гулеюк Н.Л. (Інститут спадкової патології Національної академії медичних наук України, м. Львів). Аналіз ДНК з використанням порівняльної геномної гібридизації проведено спільно з д.мед.н., доц. Микитенко Д.О. (Клініка репродуктивної медицини «Надія», Київ). Автором особисто здійснено аналіз масивів генів, що містяться в ділянках, де найчастіше відбуваються дуплікації та делеції. Також автором особисто виділено РНК з тотального лізату клітин на різних пасажах, проведено синтез кДНК. ПЛР в реальному часі здійснено спільно з Некрасовим К.А. (Інститут молекулярної біології і генетики). Дослідження імунофенотипу популяції клітин лінії 4BL методом проточної цитофлуориметрії проведено спільно з к.б.н. Шаблієм В.А. (Інститут клітинної терапії). Результати Вестерн-блот аналізу проаналізовано спільно з к.б.н. Мацевич Л.Л. і к.б.н. Коцаренко К.В. З усіма перерахованими науковцями автор має спільні публікації.

Автор висловлює подяку к.б.н. Шаблію В.А. та Некрасову К.А. за надані реактиви. Автор щиро вдячна усім співавторам за допомогу у розробці стратегії досліджень, обговоренні отриманих результатів, узагальненні та підготовці публікацій до друку.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення роботи доповідались на вітчизняних та зарубіжних конференціях: Матеріали ІХ всеукраїнської наукової

конференції студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих вчених в Україні» (Київ, Україна, 2009), Науково-практична конференція з міжнародною участю «Генетична і регенеративна медицина: проблеми і перспективи» (Київ, Україна, 2010), Міжнародна конференція ESHG – European Society of Human Genetics (Амстердам, Нідерланди, 2011), VI Конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвячена 155-річчю з Дня народження Навашина Сергія Гавриловича (Київ, Україна, 2012), Перший міжнародний мультидисциплінарний симпозіум «Molecular oncology: from Laboratory Bench to Medicine» (Київ, Україна, 2012), 7-ма конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвячена 175-ій річниці з дня народження Данілевського О.Я. (Київ, Україна, 2013), Міжнародна наукова конференція «Conference for Young Scientists» (Київ, Україна, 2015), Міжнародна наукова конференція «Science, technology and innovative technologies in the prosperous epoch of the powerful state» (Ашгабат, Туркменістан, 2015), Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання розвитку біології та екології» (Вінниця, Україна, 2016), Міжнародній науковій конференції «Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy» (Київ, Україна, 2017).

**Публікації.** Основні результати роботи опубліковано у 17 друкованих працях: 9 статтях, серед яких 7 статей у фахових наукових виданнях, та 8 тезах доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини, що має два підрозділи, розділу, присвяченому аналізу та узагальненню отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел, який охоплює 411 найменувань, та додатків. Роботу викладено на 214 сторінках машинописного тексту (комп'ютерний друк), проілюстровано 47 рисунками та 8 таблицями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

### Матеріали та методи досліджень

У роботі використовували нову клітинну лінію 4BL (скорочено від blood line), отриману із лейкомаси периферійної крові здорового дорослого донорау відділі генетики людини ІМБГ НАНУ. Також працювали з клонами клітин даної лінії C11, C12 і C13 ранніх пасажів. Початково клітини лінії 4BL культивували у спеціальному ростовому середовищі на фідері з мітотично інактивованих фібробластів людини, оброблених мітоміцином С в концентрації 10-20 мкг/мл, з додаванням цитокінів LIF, SCF і IL-3 (по 2 нг/мл кожного) і 30% середовища, кондиційованого ембріональними гермінативними клітинами людини (Лукаш та ін., 2011). Згодом відбирали клони клітин, які швидко росли та культивували їх як моношарову культуру у стандартному ростовому середовищі DMEM («Sigma», США) із додаванням 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, та 10 % ембріональної сироватки теляти при 37°C і 5% CO<sub>2</sub>.

*Для морфологічних досліджень* клітини вирощували на малих чашках Петрі



(d=3 см) забарвлювали 1% розчином нейтрального червоного та фотографували на мікроскопі PrimoStar “Carl Zeiss” за допомогою програми Axio Vision.

*Для аналізу ростових властивостей* клітини розсівали на 10 флаконів по 100 тис. клітин на флакон. Далі через кожні 24 год підраховували їхню кількість у лічильній камері Горяєва та будували криві росту.

*Вивчення здатності клітин рости без прикріплення до субстрату.* Застосовували тест у напіврідкому агарі та метилцелюлозі. Попередньо чашки Петрі покривали 0,6% агаром для запобігання прикріпленню клітин до скла. Після застигання нижнього шару, висівали по 100 тис. клітин на чашку (d=9-12см) з напіврідкими середовищами: 1,4% метилцелюлози або 0,3% агару, культивували клітини 7-14 днів та фотографували незабарвлені колонії.

*Для дослідження стовбурового потенціалу* клітинної лінії 4BL перевіряли її здатність диференціюватись в жирову (адипогенний напрям), кісткову (остеогенний напрям) і м'язову (міогенний напрям) тканини. Дослідні клітини вирощували у спеціальних індукційних середовищах, а контрольні клітини - у стандартному ростовому середовищі DMEM. По досягненню конfluентності, клітини промивали PBS, фіксували 80% етанолом та забарвлювали алізариним червоним для виявлення мінералізованого матриксу у випадку остеогенного диференціювання, Нільським червоним для виявлення жирових крапель за допомогою флуоресцентного мікроскопу при адипогенному спрямуванні та проводили PAS-реакцію на виявлення глікогену при диференціюванні у м'язеву тканину.

*Імунофенотипування.* Клітини відмивали в Cell Wash буфері (Becton Dickinson, USA) та інкубували з первинними моноклональними антитілами (0,5 мкг на мільйон клітин) протягом 30 хв. при +4°C. Використовували такі флуорохром-мічені антитіла: анти-CD14 Pacific Blue, анти-CD34 APC, анти-CD45 APC-Cy7, анти-CD73 PE, анти-CD90 FITC, анти-CD105 PerCP-Cy 5.5 (BD, USA). Не зв'язані антитіла відмивали в Cell Wash буфері. Імунофенотипування проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі BD FACS Aria (Becton Dickinson, USA) з використанням програми FACS Diva 6.1.2. Аналізували лише популяцію живих клітин, які забарвлювались барвником 7ADD.

*Цитогенетичний аналіз* метафазних пластинок проводили за загальноприйнятою методикою (Moorhead P.S. 1960, Hungerford D.A. 1965) у власній модифікації, зменшивши час обробки колхциномом у концентрації 0,5-0,3мкг/мл (Merk, Німеччина) до 1-ї год. та збільшивши експозицію в гіпотонічному розчині KCl до 1 год.30хв. Після 3-х змін метанол-оцтового фіксатора (3:1) суспензію клітин розкапували на вологі предметні скельця. Препарати метафазних хромосом аналізували з використанням рутинного та диференційного GTG-забарвлення за методом (Barch M.J. 1997). Хромосоми аналізували з використанням світлового мікроскопу Olympus, обладнаного системою автоматизованого аналізу “CytoVision 4.01”, при збільшенні у 1000 разів на рівні визначення 400–550 бендів на гаплоїдний набір. Аналізували по 100 метафазних пластинок (м.п.), в яких якість диференційного забарвлення дозволяла ідентифікувати хромосоми та їхні структурні перебудови. Для ідентифікації хромосомних аномалій застосовували міжнародну цитогенетичну номенклатуру ISCN-2013.

*FISH-аналіз* проводили на фіксованих препаратах метафазних пластинок. ДНК у препаратах денатурували у формаміді при 72°C 2-5 хв. та гібридизували з флуоресцентно-міченими зондами до хромосом 3, 4, 9, 11, 14, 15, 17, 18, 22, при 37°C мінімум 16 годин. Проводили кілька стадій відмивок для видалення усіх зондів, що не зв'язались з ДНК. Візуалізацію здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

*Порівняльна геномна гібридизація.* Оцінку рівня анеуплоїдії здійснювали з використанням CytoSure Aneuploidy array 15k (Oxford Gene Technology, Product code 020024, клініка репродуктивної медицини «Надія», м. Київ). Для цього виділяли ДНК клітин 120-го, 160-го та 205-го пасажів за допомогою QIAamp DNA Blood Mini Kit («Qiagen», Велика Британія) та очищали за допомогою QIAquick PCR Purification Kit («Qiagen», Велика Британія). Отриману ДНК (1 мкг) гібридизували на CytoSure Aneuploidy array слайді та аналізували відповідно до рекомендацій Oxford Gene Technology на приладі Innopsys Innoscan 710, обладнаному програмним забезпеченням OGT Cyto Sure Interpret Software 3.3.2.

*Дослідження експресії генів MGMT, p53 і TERT.* З клітин виділяли РНК за допомогою набору Gene Jet RNA Purification Kit (Thermo Scientific) та синтезували кДНК. Як референтні гени були обрані *HMBS* та *Actb*. Для постановки ПЛР використовували 4 зразка: кДНК, отриману із суспензії клітин лінії 4BL 127-го, 144-го і 222-го пасажів, та кДНК із стабільної клітинної лінії карциноми гортані HEP-2 для порівняння. Для вірогідності кожен зразок та ген перевіряли у триплетах. На 1 реакцію брали по 50-100 ng кДНК із синтезованої суміші, використовуючи Eva Green Master Mix.

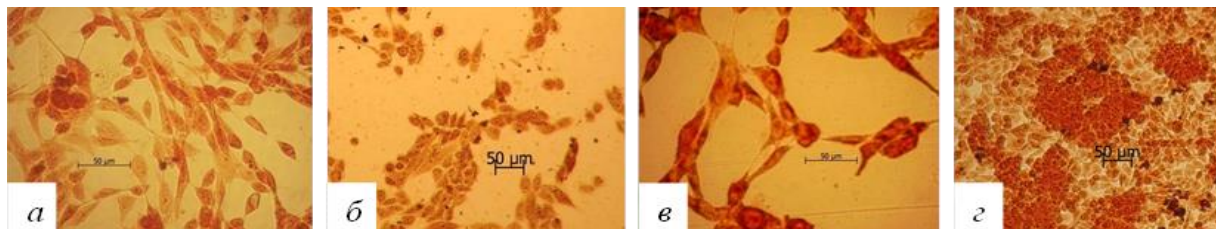
*Для вестерн-блот аналізу* виділяли білок із зразків та вимірювали концентрацію за методом (Bradford M.M. 1976). Білковий екстракт розділяли за допомогою SDS-електрофореза у 12% поліакріламідному гелі та переносили на PVDF-мембрану. Використовували моноклональні антитіла проти MGMT виробництва «Novus Biologicals Littleton, Co» (США) і вторинні видоспецифічні кон'юговані з пероксидазою хрому антитіла виробництва «Jackson Immuno Research» (США). Візуалізацію хемілюмінесцентної реакції здійснювали на приладі ChemiDoc. Контроль рівномірності нанесення білка проводили за допомогою денситометричної оцінки сумарної кількості білка, який був перенесений на мембрану, у програмі Origin Pro 8.5.

### **Результати досліджень та їх обговорення**

В даній роботі нами отримано і досліджено нову клітинну лінію 4BL, що походить від клітин периферійної крові дорослого донора. Лінію отримано з використанням методу репрограмування: культивування на фідері у спеціальному середовищі, що містить комплекс ростових факторів і цитокінів. Клітинна лінія 4BL успішно пододала ліміт Хейфліка без ознак кризи та клітинного старіння і культивується вже понад 220 пасажів (більше 10 років), що дає підстави вважати її іморталізованою. Нас цікавила динаміка змін її каріотипу внаслідок процесів іморталізації та адаптації до нових умов існування. Проте, в першу чергу необхідно було охарактеризувати цю лінію як новий об'єкт: дослідити її морфологічні та

ростові властивості, перевірити стовбуровий потенціал.

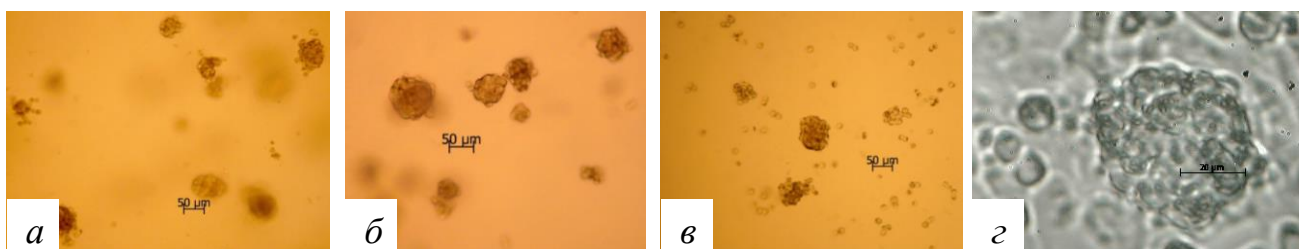
В клітинних популяціях 4BL найбільш виражені два морфологічні типи клітин: витягнуті фібробластоподібні та подібні до трикутників або більш розпластані епітеліоподібні клітини (рис. 1); також наявні круглі клітини, що діляться. При культивуванні клітин даної лінії нашу увагу привернув той факт, що клітини часто формують колові та напівколові асоціації, що характерні для ендотеліальних клітин (DeCicco-Skinner K.L. 2014, Nguyen E.H. 2017) і ця властивість не залежить від тривалості пасажування (рис. 1. б, в).



**Рис. 1.** Морфологія клітин лінії 4BL, забарвлення нейтральним червоним: *a* – 163 пасаж; *б* – 127 пасаж; *в* – 226 пасаж; *г* – ділянки багат шарового росту, 127 пасаж

Виявилось, що при відсутності пересіву, але за вчасної зміни середовища, клітини здатні формувати кільк шарові колонії (рис. 1, г). Цікавим є те, що деякі з них нагадують кровотворні острівці: нижній моношар фібробластоподібних клітин утворює підложку; а на ній формується кільк шаровий бугорок округлої форми, який інколи навіть має отвір всередині. Даний факт, ймовірно за все, вказує на стовбуровий потенціал отриманої з периферійної крові клітинної лінії. Тож для початку ми вирішили перевірити здатність клітин 4BL рости без прикріплення до субстрату у напіврідких середовищах, оскільки відомо, що як плюрипотентні стовбурові клітини, так і мультипотентні кровотворні клітини здатні до колонієутворення у таких умовах.

Виявилось, що клітини лінії 4BL здатні рости без прикріплення до субстрату, формуючи у напіврідкому агарі округлі колонії правильної форми (рис. 2, а-в).

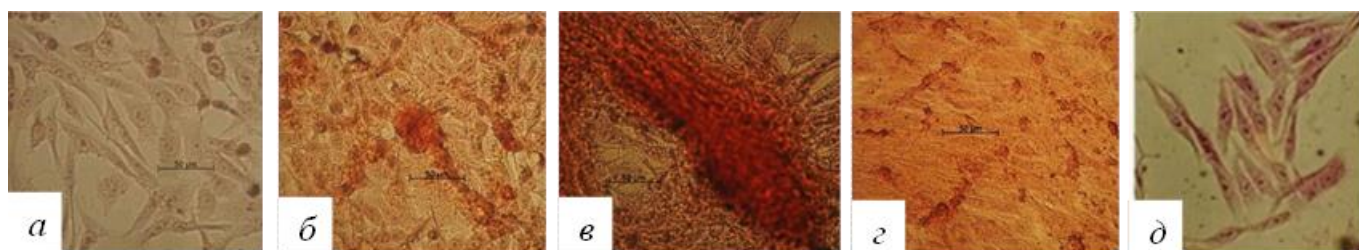


**Рис. 2.** Колонії клітин лінії 4BLу напіврідкому агарі: *a* – 124 пасаж, *б* – 196 пасаж, *в* – 205 пасаж, *г* – формування колоній клітин 4BL при рості на мітотично інактивованому фідері із фібробластів людини

Цікаво, що при вирощуванні клітин 4BL протягом перших пасажів на фідері у спеціальному середовищі з додаванням ростового фактору SCF і цитокінів LIF та IL-3, а також середовища, кондиціонованого ЕГК, вони формували колонії, які

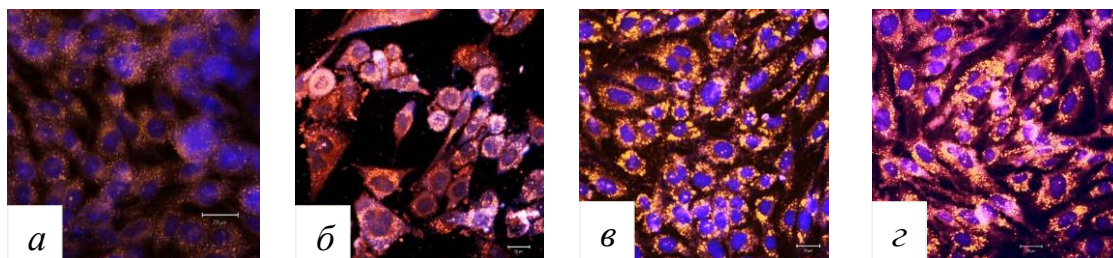
характерні для плюрипотентних стовбурових клітин (рис. 2, г). Однак тестування в напіврідкому агарі є неоднозначним і може вказувати як на наявність стовбурового потенціалу клітинної лінії, так і на її малігнізацію в процесі культивування.

Тому наступним кроком стала перевірка стовбурового потенціалу клітинної лінії 4BL шляхом диференціювання в жирову, кісткову і м'язову тканини. Дослідні клітини вирощували у спеціальних індукційних середовищах, а контрольні - в стандартному середовищі DMEM. Клітини, які спрямовували до диференціювання у кісткову тканину, як і контрольні, забарвлювали 0,5% розчином алізаринового червоного для виявлення мінералізованого кісткового матриксу (рис. 3). Несподіваним було те, що контрольні клітини також забарвлювались, хоча і в меншій мірі. Це свідчить про можливість спонтанного диференціювання клітин лінії 4BL, яке іноді проявляється при щільному контакті клітин між собою після досягнення конfluентності (Фрешни Р.Я. 2010). Показано також здатність клітин 4BL диференціюватись у м'язовому напрямку при культивуванні в спеціальному кардіоміогенному середовищі з додаванням активіну А та bFGF (рис. 3, д).



**Рис. 3.** Диференціювання клітин лінії 4BL та її клонів в остеогенному напрямку (а-г) та міогенному напрямках (д). а – клітини 4BL, 129 пасаж, контроль, б – 4BL, дослід, в – 4BL C11, 23 пасаж; г – 4BL C12, 18 пасаж, 400х, забарвлення алізариновим червоним; д – клітини 4BL, PAS-реакція на глікоген, 600х

Для виявлення жирових включень при диференціюванні клітин в адипогенному напрямі забарвлювали їх Нільським червоним (рис. 4). Спостерігали подібну ситуацію, що і з диференціюванням у кісткову тканину: контрольні клітини також накопичували жирові гранули, проте в значно меншій кількості; в даному випадку це може бути нормою, оскільки більшість клітин різних типів мають певні запасні включення.

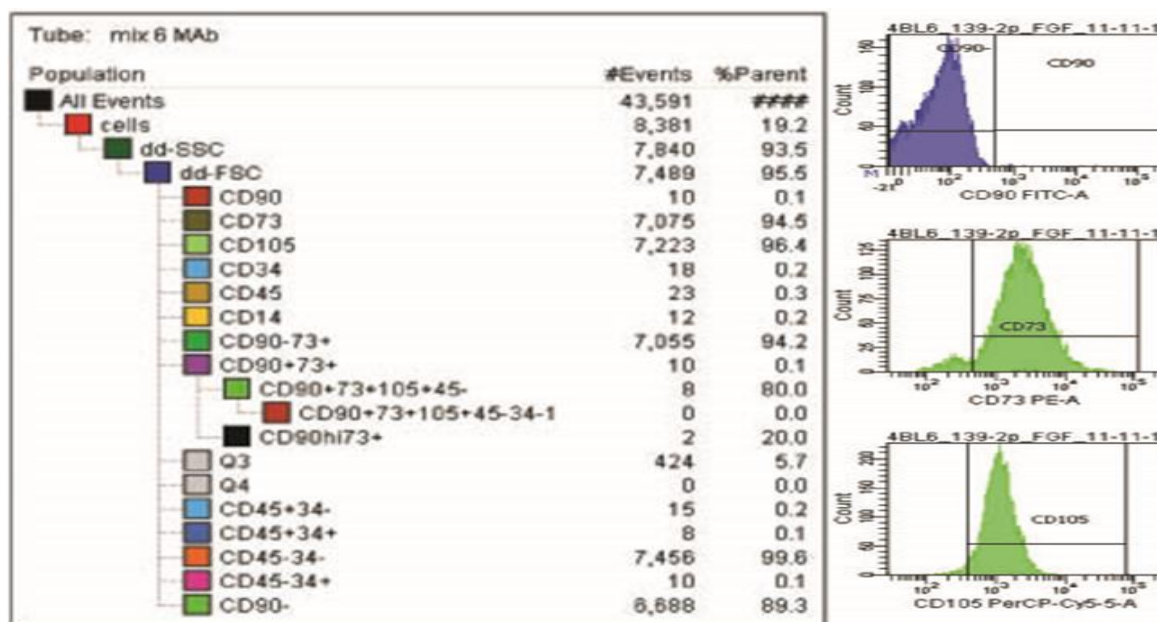


**Рис. 4.** Адипогенне диференціювання клітин лінії 4BL та її клонів, забарвлення Нільським червоним, флуоресцентна мікроскопія. а – 4BL, контроль, б – 4BL, дослід, в – C11, 23 пасаж, дослід, г – C12, 18 пасаж, дослід



Отже, виявлено здатність клітин лінії 4BL диференціюватись в три типи тканин: кісткову, жирову та м'язову, що доводить її стовбуровий потенціал.

Наступним завданням було імунофенотипування популяцій клітин на проточному цитофлуориметрі. Визначено, що клітини лінії 4BL є позитивними за маркерами CD73<sup>+</sup> і CD105<sup>+</sup>, які є характерними для МСК; і водночас вони є негативними за маркером CD90 (рис.5).



**Рис. 5.** Імунофенотипування клітин 129-го пасажу лінії 4BL на проточному цитофлуориметрі BD FACS Aгіа. Справа наведені результати по маркерам CD90<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>CD і 105<sup>+</sup>

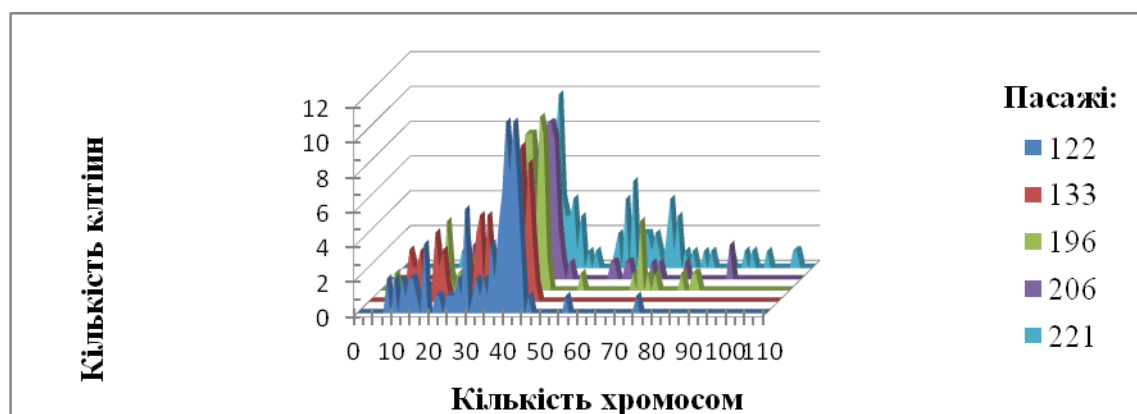
Маркер CD73 використовується як один з маркерів мезенхімальних стовбурових клітин (Ode A. 2013, Chaterjee D. 2014). CD105 є частиною рецепторного комплексу TGF beta (Kays S.K. 2015). Гени CD73 та CD105 розташовані на 6-ій та 9-ій хромосомах відповідно, за якими ми не спостерігали моносомій чи делецій за даними цитогенетичних досліджень. CD 90 або Thy-1 cell surface antigen належить до родини імуноглобулінів і використовується як маркер МСК лімфатичного гемопоетичного спрямування. Отже, клітини лінії 4BL, які є негативними за маркером CD90, можуть належати до некроцитарної фракції МСК. Нині з'являються відомості, що МСК не обов'язково є позитивними за маркером CD90 (Voxall S.A. 2012). У роботі (Shablii V.A. 2014) показано наявність двох популяцій клітин CD90<sup>+</sup> і CD90<sup>-</sup> серед мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин плаценти. Ген CD90 розташований на 11-ій хромосомі, за якою ми часто спостерігали моносомію, а також транслокацію t(1;11)(q12;p15) у 63% випадків (див. далі).

Клітини лінії 4BL є негативними за CD34, CD45 і CD14: відсоток клітин, де виявлено ці маркери, є вкрай низьким: 0,2%, 0,3% і 0,2% відповідно. Цікаво, що в цитогенетичних дослідженнях ми спостерігали транслокації хромосом, в яких містяться гени даних маркерів: t(1;11)(q12;p15)–у 63% метафазних пластинок,

t(5;1)(q10;p10) – 23% м.п. Вказані транслокації не зачіпають самі ділянки генів, проте злиття двох хромосом в одну може порушувати регуляцію транскрипції генів, наприклад, унеможливити взаємодію з необхідними енхансерами, які, як відомо, знаходяться за кілька тисяч пар нуклеотидів від гена. Більшість авторів схиляється до думки, що маркери CD14, CD34 і CD45 є характерними для більш комітованих гемопоетичних клітин, а класичні МСК є негативними за цими маркерами, що ми і спостерігаємо на прикладі популяцій клітин 4BL.

Також за попередніми даними не виявлено експресію Oct 4 – одного з основних маркерів ембріональних стовбурових клітин, який вторинно експресується у ракових СК. А за даними array CGH спостерігається часткова делеція ділянки 12p11.1pter, де розташований ген Nanog, який теж вторинно активується у ракових клітинах. Завдяки array CGH виявлено дуплікації ділянок хромосом з генами, які приймають участь у диференціації клітин у кісткову тканину – FRZB (2 q31.1 - q33.1) та FGFR3 (4p16.1–pter); м'язову тканину - M-cadherin (16q22.1qter) та NODAL, MYOZ1 myozenin 1 (10q22.1q22.2); у підтримці стовбурового потенціалу - MATK, KLF1, GDF15, BST2 bone marrow stromal cell antigen 2 (19 p13.3-p12), а також дуплікацію 16q22.1qter з геном PARD6A, який відіграє важливу роль в асиметричному поділі клітин та в епітеліально-мезенхімальному переході(див. нижче).

У результаті проведених цитогенетичних досліджень виявлено, що більшість клітин мають приблизно диплоїдний каріотип (рис. 6), незважаючи на значну варіабельність кількості хромосом на різних пасажах культивування. Починаючи із 196-го пасажу, з'являється тенденція до виокремлення малих піків в білятриплоїдній області, яка стає більш помітною на 221-му пасажі. Цікаво, що в літературі також описані випадки поліплоїдизації клітин через кілька років пасажування у культурі (Burholt D.R. 1989, Mamaeva S.E.1998, Яцишина А.П. 2008, Soltis P.S. 2015). Автори висловлюють припущення, що існування кількох копій генів дає клітинам змогу підтримувати метаболізм на більш високому рівні, а також по-різному модифікувати експресію генів.

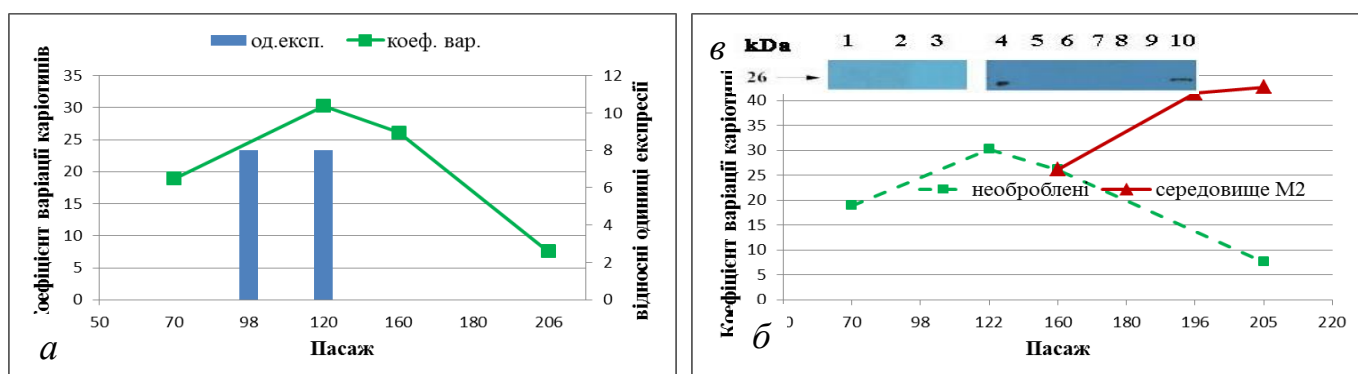


**Рис. 6.** Розподіл кількості хромосом у клітинах лінії 4BL на різних пасажах культивування за даними рутинного каріотипування

Найбільшу кількість гіпоплоїдних клітин – 54% - виявили на 133-му пасажі культивування. Однією з можливих причин значного зростання частки білягаплоїдних клітин є атипічний мітоз з утворенням багатополусного веретена поділу. Причиною такого мітозу часто бувають порушення регуляції мітотичного апарату, в тому числі й репаративних систем.

Враховуючи той факт, що невідрепаровані пошкодження ДНК можуть в подальшому призводити до накопичення генних мутацій і хромосомних аберацій, ми співставили коефіцієнт варіації каріотипів на різних пасажах з експресією MGMT і виявили кореляцію для цих двох показників, яка за Пірсоном була статистично достовірною і становила 0,59 ( $p \leq 0,001$ ). Дані представлені на рис. 7, а. Ймовірно, це становить один із компенсаторних механізмів, активованих дестабілізацією геному та стресовими чинниками, пов'язаними з адаптацією клітин до умов культивування.

З метою перевірки згаданого припущення клітинна лінія 4BL, що знаходилась на початку етапу стабілізації (пасаж 165) була піддана дії дестабілізуючого стресового чинника: культивуванню протягом 24 годин в середовищі M2, що характеризується збільшеною йонною силою (рис. 7, б).

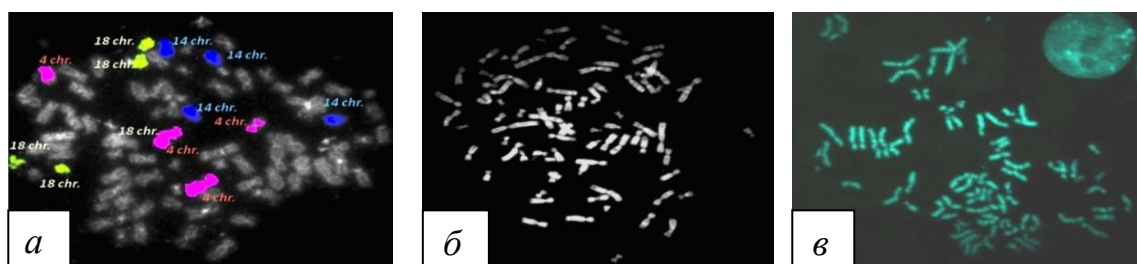


**Рис. 7.** а – коефіцієнт варіації каріотипів і рівень експресії репаративного ензиму MGMT (денситометричний аналіз Вестерн-блот гібридизації по експресії MGMT) на різних стадіях становлення клітинної лінії 4BL. б – повторна індукція генетичної нестабільності клітинної культури 4BL за допомогою модифікованого середовища M2. в - зміна експресії репаративного ензиму MGMT: 1 — контроль, клітини 4BL; 2 — інкубація з M2; 3 — наступний пасаж після інкубації з M2; 4 – позитивний контроль (лінія U937), 5 – контроль до варіанту 6; 6 – 10 діб після обробки M2; 7 – контроль до вар.8; 8 – 15 діб після обробки M2; 9 – контроль до вар.10; 10 – 26 діб після обробки M2

Без дії додаткового стрес-чинника, коефіцієнт варіації каріотипів помітно йде на спад, починаючи із 160-го пасажу. Аналіз рівня експресії MGMT показав, що він був відсутній в момент обробки. Обробка клітин стрес-фактором призвела до повторного зростання геномної нестабільності у клітинній популяції, характерного для етапу становлення. Повторне зростання рівня геномної нестабільності після дії стрес-фактора співпадає із індукцією експресії канонічного MGMT на 26 добу після обробки (рис.7 в), що свідчить про можливу роль репаративного ензиму не лише у

виправленні точкових мутацій, а й у підтримці стабільності геному.

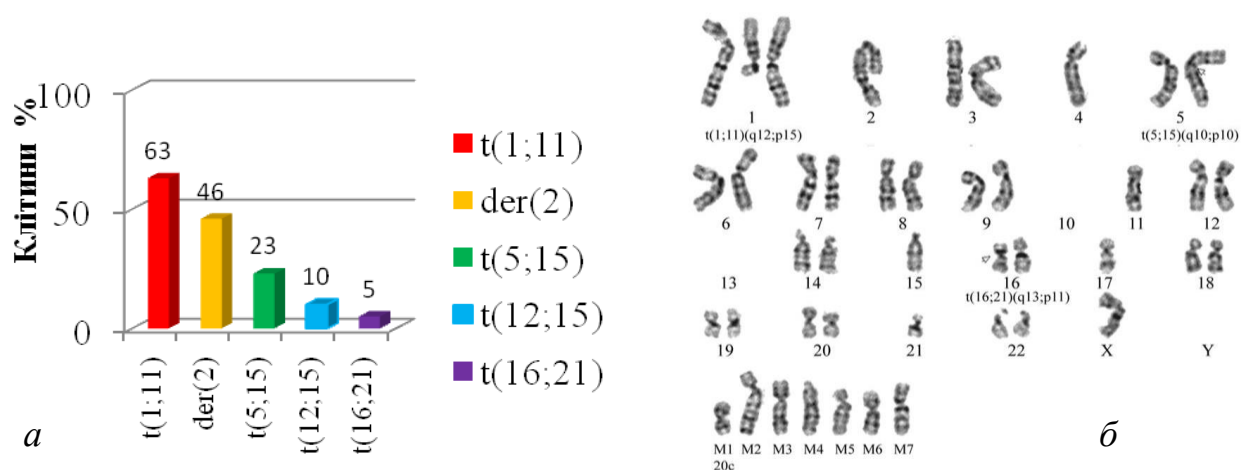
Для дослідження кількісних та структурних змін геному за допомогою диференційного забарвлення хромосом було обрано 160-ий та більш пізній 205-ий пасаж. На обох досліджуваних пасажах найбільш репрезентативним виявився пул клітин із вмістом 41–43 хромосом, серед яких 74,6–76,3 % клітин мали 42 або 43 хромосоми. Це дозволяє вважати клітини із 42–43 хромосомами найвірогіднішим модальним класом каріотипу клітинної лінії 4BL на 160-му і 205-му пасажах культивування. Спостерігали суттєве збільшення частки поліплоїдних клітин (рис. 8 а, б) з 2,8 % до 36 % відповідно ( $\chi^2=33,2$ ,  $P<0,001$ ) при несуттєвій зміні відсотка білядиплоїдних клітин: 67,4 % та 62,5 % відповідно ( $\chi^2=4,9$ ,  $P=0,05$ ). Значною особливістю клітинної популяції лінії 4BL на 205-му пасажі є відсутність білягаплоїдних клітин (14–29 хромосом), які на 160-му пасажі складали  $22,1\pm 3,1$  % метафазних пластинок (м.п.) ( $P=0,001$ ). Виявили редукцію частоти клітин із передчасним розділенням хроматид (рис. 8, в): з 5 % до 1,5 % м.п., що свідчить про зниження рівня хромосомної нестабільності. Відомо, що передчасне розділення хроматид пов'язане з індукцією апоптозу в клітинах з нестабільним геномом.



**Рис. 8.** Приклади поліплоїдії у клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі. *а* – тетраплоїд (FISH Cytocell OctoChrom); *б* – триплоїд (QFH/AcD). 1000х. *в* – передчасне розділення сестринських хроматид

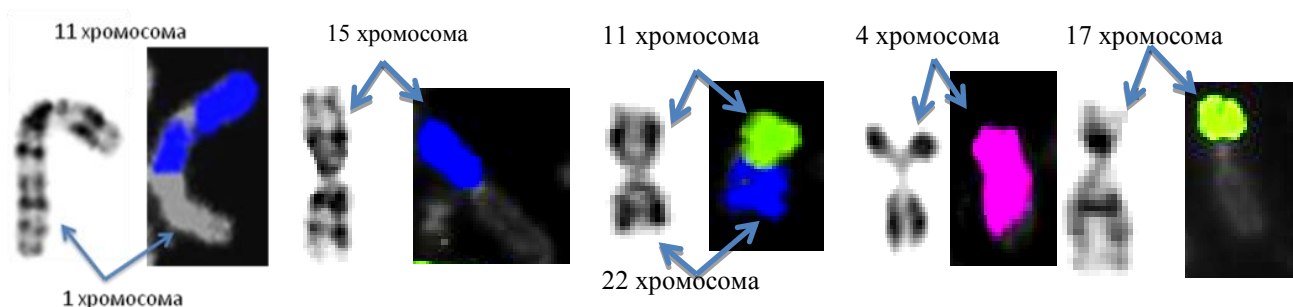
При застосуванні GTG-техніки диференційного забарвлення хромосом на 205-му пасажі виявили регулярні структурні перебудови:  $t(1;11)(q12;p15)$ –63% м.п.,  $del(2)(p11\sim 12)$  – 46% м.п.,  $t(5;15)(q10;p10)$  – 23% м.п.,  $t(12;15)(p10;q10)$  – 10% м.п. та  $t(16;21)(q12.1;p11.1)$  – 5% м.п. (рис. 9 а). Аберації хромосом  $t(5;15)(q10;p10)$  і  $t(16;21)(q13;p11)$  зустрічались виключно в асоціації з  $t(1;11)(q12;p15)$  та/або  $del(2)(p11\sim 12)$ , а випадки асоціації останніх складають 84,8% (39 з 46 м.п.). Жодного разу не спостерігали одночасної наявності в хромосомному наборі  $t(5;15)(q10;p10)$  і  $t(12;15)(p10;q10)$ . Спільними рисами каріотипу для більшості метафазних пластинок виявились моносомія за хромосомою X, відсутність одного або двох гомологів пар хромосом 10 і 13, а також наявність єдиного гомолога з пари хромосом 4, 8, 11, 15, 17 та 21 (рис. 9 б). Важливо зазначити, що «відсутній» гомолог пар хромосом 11, 15 і 21 переважно приймав участь у транслокаціях з іншими хромосомами. Також регулярно спостерігали шість маркерних хромосом, які могли містити генетичний матеріал хромосом, які були визначені як «відсутні» внаслідок моносомій чи нулісомій. Тому з метою ідентифікації даного генетичного матеріалу було застосовано техніку FISH Cytocell OctoChrom.





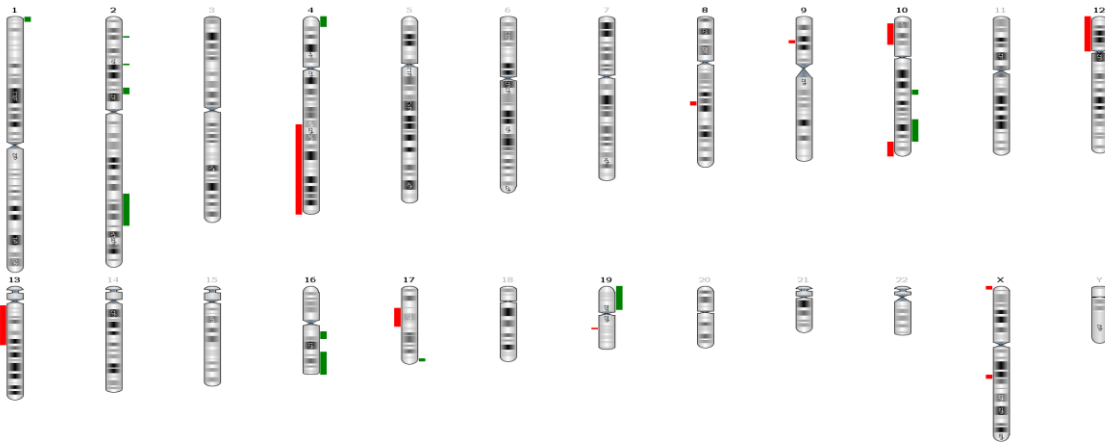
**Рис. 9.** Типові хромосомні аберації, виявлені за допомогою диференційного забарвлення в клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі: *а* – відсоток в популяції, *б* – кариограма типової метафазної пластинки: моносомія хромосом 2, 4, 11, 15, 17, 21, X; нулісомія 10 і 13; t(1;11)(q12;p15); t(5;15)(q10;p10); t(16;21)(q13;p11); сім маркерних хромосом (M1-M7): M1 – der(5p)?, M2 – der(10)t(10;16;?)(q22;q24;q10;?)?, M4 – del(2)(p11~12)?, M6 – del(10)(q26.11qter)?, M3, M5, M7 – не ідентифіковані. Стрілками позначено ділянки окремих перебудов

Застосування молекулярно-цитогенетичної техніки FISH Cytocell Octo Chrom дозволило не лише уточнити природу хромосомних аномалій, ідентифікованих за допомогою GTG-техніки, таких як t(1;11)(q12;p15) і t(12;15)(p10;q10), але до того ж ідентифікувати деякі маркерні хромосоми (рис.10). Так, одна з невеликих метацентричних хромосом, вірогідно, є результатом транслокації 11 і 22 хромосом – t(11;22)(q11;q12), а друга «типу F без гетерохроматину» є делецією довгого плеча 4 хромосоми – del(4)(q24qter), невеликий субметацентрик має матеріал довгих плеч 17 хромосоми – t(17;?)(q12;?).



**Рис. 10.** Ідентифікація структурних перебудов хромосом за допомогою молекулярно-цитогенетичної техніки FISH Cytocell Octo Chrom. четвертої та сімнадцятої пар у клітинах лінії 4BLa) del(4)(q24), б) der(17)t(17;?)(q11.1;?)

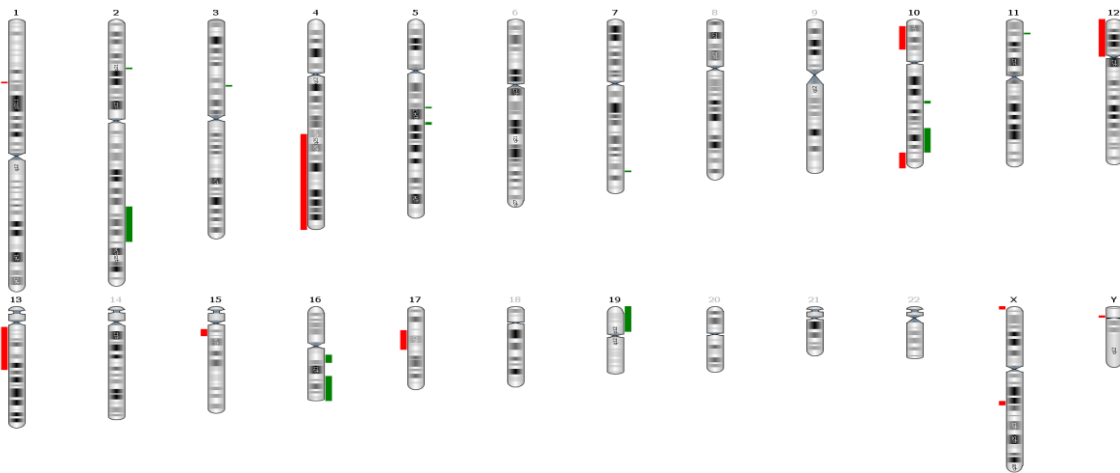
Для більш детального аналізу ультраструктурних патологій кариотипу провели arrayCGH аналіз на 120-му, 160-му та 205-му пасажах (рис. 11).



**Рис. 11.** Ідіограма профайлу array CGH клітин лінії 4BL на 205-му пасажі, зеленим позначено ділянки дуплікацій, а червоним – делецій

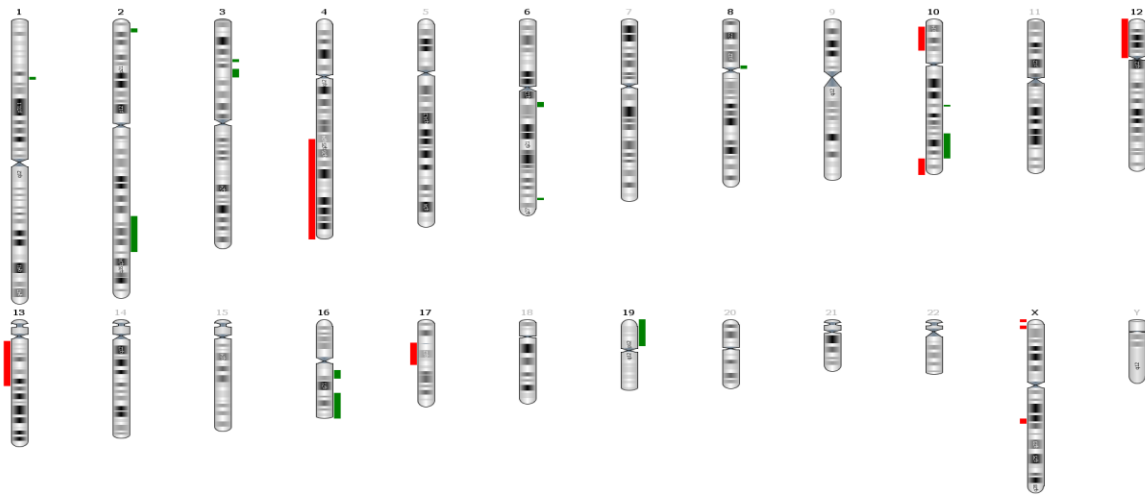
Порівнюючи характер хромосомних аберацій, можна зауважити, що більшість виявлених перебудов з'явилися вже на 120-му пасажі: це дуплікації хромосом 2, 10, 16 і 19 та делеції хромосом 4, 10, 12, 13, 17 і X (рис. 12). Варто відмітити, що більшість виявлених хромосомних аномалій на всіх досліджуваних пасажах має мозаїчний характер, що свідчить про існування в популяції лінії 4BL гетерогенних клонів клітин.

При порівнянні 120-го та 160-го пасажів спостерігається однакова картина аберацій за 4, 10, 12, 13, 16 і 19 хромосомами (рис. 12, 13). При цьому, на 160-му пасажі виявлено нові дуплікації 1, 3, 6 і 8 хромосом та делецію Xp22.32-p22.31, але всі вони не виявлені на момент досягнення культурою 205-го пасажу. Таким чином, можна спостерігати унікальне явище каріотипічної еволюції в динаміці, коли зберігаються основні значні перебудови, а деякі нові, що виникають при культивуванні, в подальшому зникають. Ймовірно, це мутантні клони клітин, які не дають переваг при культивуванні і тому елімінуються до 205-го пасажу.



**Рис. 12.** Ідіограма профайлу arrayCGH клітин лінії 4BL на 120-му пасажі, зеленим позначено ділянки дуплікацій, а червоним – делецій

У ділянці дуплікації 2q31.1-q33.1 міститься багато генів, пов'язаних із структурно-функціональною організацією хроматину та перебігом мітозу, гени апоптозу CASP8, CASP10 та ген білка SDPR, що допомагає клітинам вижити при зниженій концентрації сироватки в середовищі.



**Рис. 13.** Ідіограма профайлу array CGH клітин лінії 4BL на 160-му пасажі, зеленим позначено ділянки дуплікацій, а червоним – делецій

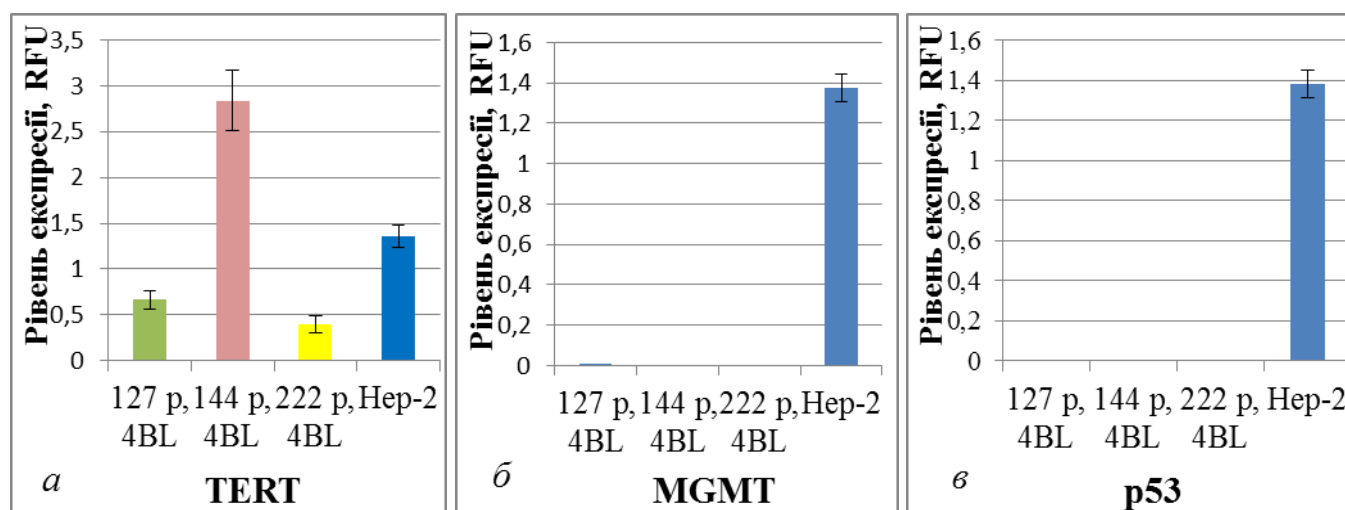
У ділянці делеції 4q24-q35.2 містяться гени апоптозу CASP3 і CASP6, ген цикліну A2 та CENPU50, які створюють платформу для асоціації кінетохорів під час мітозу, ген MAD2L1 – запобігає початку анафази до моменту фіксації на веретені всіх хромосом набору. Подібну функцію виконує ген BUB3 (міститься в ділянці del 10q26.11qter), а оскільки обидва гени локалізовані в ділянках делецій, це може бути причиною аберантного перебігу мітозу у клітинах 4BL. Аналізуючи зміни 10 хромосоми, можна очікувати зниження експресії онкосупресора RAS RSU1 та генів репарації DCLRE1C і MGMT. При цьому дупліковано гени апоптозу AIFM2 і CASP7, ген цикліну M1, онкоген WNT8B та онкосупресор MXI1, який негативно регулює експресію MYC. У делеції 12p13.33-p11.1 розташовані гени DPPA3 і NANOG із типовою експресією в ембріональних СК і пухлинах, а також ген цикліну D2. X моносомія мала місце у понад 80% досліджених клітин. Не виключено, що із втратою X хромосоми клітинна лінія позбавляється «зайвого» генетичного матеріалу. Таке явище є характерним для багатьох клітинних ліній.

У ділянці делеції 13 q12.11 – q 21.2 міститься три онкогени та десять генів-онкосупресорів, з них: LATS2 для формування веретена поділу; RGCC, що індукується білком p53 у відповідь на пошкодження ДНК, та відомі онкосупресори BRCA2 та RB1. Отже, без сумніву, саме делеції по 13-ій і 4-ій хромосомах є ключовими в порушенні генетичної стабільності. Дуплікації 16 хромосоми в ділянках q12.1q12.2 і q22.1-q24.3 містять гени, експресія котрих змінюється у відповідь на гіпоксію (SIAN1) та оксидативний стрес (OSGIN1) та є індукторами апоптозу. Підвищена копійність гену ACD, що захищає теломери, NKD1–негативного регулятора Wnt і β-катенінового сигнального шляху та IL17C, що стимулює вивільнення фактору некрозу пухлин α і IL1β. Делецію за 17 хромосоною

можна назвати «умовно нейтральною», оскільки делетовано приблизно рівну кількість онкогенів та онкосупресорів.

У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12 містяться: відомий онкоген JUND та онкосупресори APC2 і GADD45B, ген апоптозу CASP14, велика кількість генів, що відповідають за правильну організацію й функціонування веретена поділу: MISP, SYCE2, HAUS8, MAU2, MAST1; мітоген-активуючі кінази MAP2K2 і 7 та активатор цитокінезу DOCK6, ген встановлення і регуляції тканинспецифічного метилування цитозинових залишків DNMT1. Збільшено дозу генів, пов'язаних з внутрішньоклітинним метаболізмом: гени регуляції екзо- і ендоцитозних шляхів, гени білків родини цитохромів P450 та дихального ланцюга, ген найбільшої субодиниці РНК-полімерази II POLR2E, ген ініціації трансляції EIF3G та ген PIN1, що відповідає за правильне згортання білків. До речі, саме по dup19 p13.3-p12 спостерігається тетрасомія, більшість інших виявлених дуплікацій є частковими, неповними. Очевидним є те, що дуплікація по 19 хромосомі, яка містить значну кількість генів, залучених до структурної організації хроматину, процесів транскрипції, активації проліферації, є корисною, так як забезпечує клітинний метаболізм на високому рівні та може надавати селективну перевагу клітинам, які її мають.

Зважаючи на виявлені аберації, з метою перевірки активності точки контролю клітинного циклу ми вирішили дослідити експресію відомого онкосупресора p53 та ензиму MGMT як однієї з важливих ланок систем репарації на різних стадіях культивування клітинної лінії 4BL. Оскільки дана клітинна лінія успішно пододала ліміт Хейфліка без ознак кризи, ми вирішили визначити експресію гена теломерази *hTERT*. Дослідження проводили на більш ранніх 127-му та 144-му пасажах та найпізнішому з наявних 222-му. Як позитивний контроль було обрано імуорталізовану клітинну лінію карциноми гортані Нер-2 (рис. 14).



**Рис. 14.** Результати ПЛР у реальному часі: у клітинній лінії 4BL не виявлено експресію гена *MGMT* (а) та *p53* (б) на 127-му, 144-му та 222-му пасажах порівняно з клітинною лінією Нер-2; в – виявлено експресію гена теломерази у клітинах лінії 4BL на всіх досліджуваних пасажах

У клітинах досліджених пасажів не виявили експресію гена репаративного ензиму MGMT (рис. 14, а). Це підтверджується значно більшою чутливістю цих клітин до алкілувальних сполук порівняно з клітинами Нер-2 (Коцаренко Е.В. 2015). Факт відсутності експресії гена *MGMT* пояснюється частою моносомією та нулісомією 10-ї хромосоми та частковою делецією ділянки 10q26.11-q26.3. Як на ранніх, так і на пізніх пасажах культивування лінії 4BL не виявили експресію гена «охоронця геному» *p53* (рис. 14, б), що уможлиблює проходження аберантних мітозів в популяції клітин 4BL та наявність клітин з тривало відтворюваними хромосомними абераціями та клітин з різною плоідністю хромосомного набору. Відсутність експресії гена *p53* частково пояснюється частою моносомією 17-ї хромосоми при цитогенетичному аналізі. Проте, незважаючи на даний факт, клітинна лінія 4BL зберігає біядиплоїдний модальний клас хромосом при тривалому культивуванні, що передбачає залучення інших механізмів підтримання відносної стабільності геному.

На всіх досліджених пасажах клітин лінії 4BL виявили експресію гена теломерази, що є однією з ознак стовбурових клітин та підтверджує іморталізацію лінії (рис. 14, в). Експресія *TERT* у клітинах лінії 4BL на 127-му пасажі та найпізнішому з наявних 222-му відбувається на нижчому рівні, ніж у раковій лінії Нер-2. Найактивніша експресія *TERT* спостерігається на середньому 144-му пасажі клітин 4BL. Зважаючи на зниження експресії теломерази на пізніх пасажах, можливе подальше використання клітин лінії 4BL, які підтримуються у культурі понад 10 років, як аналог вікових змін клітин людини при старінні.

Клітинна лінія 4BL адаптувалась до виживання в умовах *in vitro* з притаманними їй морфологією, ростовими властивостями та хромосомними перебудовами, і дія стабілізуючого добору в стандартних умовах культивування спрямована на їхнє підтримання. При зміні умов середовища на клітини діятиме рушійний добір і виживатимуть ті клони клітин, які виявляться найбільш адаптованими до нових умов існування.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше проведено порівняльний аналіз каріотипу нової стовбурової лінії клітин людини 4BL на стадіях становлення та стабілізації *in vitro* із стовбуровими та раковими клітинними лініями і встановлено такі закономірності: втрата статевої хромосоми протягом тривалого культивування і не випадковий характер хромосомних аберацій, що подібно до умов в організмі. Спостерігали поліплоїдизацію частини популяції клітин лінії 4BL на пізніх пасажах, що притаманно клітинним лініям гризунів та частині ракових клітинних ліній людини. Відмінною рисою клітинної лінії 4BL є унікальний комплекс структурних перебудов хромосом, незважаючи на які спостерігається збереження біядиплоїдного модального класу (42-43 хромосоми) протягом більше десяти років у культурі.

1. В клітинних популяціях лінії 4BL та її клонів найбільш виражені два морфологічні типи клітин: фібробластоподібні та епітеліоподібні клітини.

2. При тривалому культивуванні клітини лінії 4BL часто формують колові та напівколові асоціації, осередки багат шарового росту при високій щільності та округлі колонії при вирощуванні у напіврідкому агарі. Стовбуровий потенціал клітин лінії 4BL підтверджено їхньою здатністю диференціюватись в адипогенному, остеогенному та міогенному напрямках.

3. За результатами проточної цитофлуориметрії, клітини лінії 4BL є позитивними за маркерами стовбурових клітин CD105+ і CD73+ та негативними за маркерами гемопоетичних стовбурових клітин CD90, CD45, CD34 і CD14.

4. Вперше проаналізовано каріотип клітинної лінії 4BL і виявлено домінування модального класу із 42-43 хромосомами в клітині на різних етапах культивування. Частка поліплоїдних клітин із 160-го до 205-го пасажу зросла з 2,8 % до 36 %.

5. Вперше визначено основні структурні аберації хромосом: t(1,11) – 63%, der(2) – 46%, t(5,15) – 23%, t(12,15) – 10%, t(16, 21) – 5% метафазних пластинок та шість маркерних хромосом, які за даними FISH-аналізу містять деривати 4-ї та 17-ї хромосом.

6. Вперше виявлено експресію гена теломерази на 127-му, 144-му і 222-му пасажах культивування та відсутність експресії генів *MGMT* і *p53* на цих же пасажах в клітинах лінії 4BL.

7. Показано повторну індукцію хромосомної нестабільності внаслідок дії стрес-фактора на етапі стабілізації та кореляцію між рівнями хромосомної нестабільності й експресії репаративного ензиму *MGMT*.

8. Ознаками стабільності каріотипу клітинної лінії 4BL можна вважати значні перебудови, що зберігаються у клітинах від 120-го до 205 пасажу: дуплікації хромосом 2, 10, 16 і 19 та делеції хромосом 4, 10, 12, 13, 17 і X, тоді як незначні за розміром нові аберації елімінуються на наступному дослідженому пасажі.

9. Селективна перевага збережених хромосомних перебудов, ймовірно, асоціюється з підвищенням дози генів внутрішньоклітинного метаболізму та мітотичних сигнальних каскадів (dup19p13.3-p12) на фоні зниження копійності супресорів пухлинного росту (del 13q12.11-q21.2). Результативна здатність клітин до підвищення проліферативного потенціалу, ймовірно, супроводжується збільшенням дози генів-індукторів апоптозу (dup2q31.1-q33.1, dup16q12.1q12.2, dup16q22.1-q24.3).

## ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЇ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Акопян Г.Р., Кушнірук В.О., Микитенко Д.О., Гулеюк Н.Л., Кременська Ю., Лукаш Л.Л. Баланс ДНК у хромосомах стовбурових клітин людини лінії 4BL // Цитологія і генетика. – 2016. – Т. 50, № 4. – С. 79-89. (Особистий внесок здобувача: отримано метафазні пластинки для подальшого каріотипування, проведено аналіз делецій та дуплікацій, що виявлені в хромосомах клітинної лінії 4BL та здійснено порівняння з літературними даними).

2. Кушнірук В.О., Шаблій В.А., Шпильова С.П., Рубан Т.П., Півень О.О., Лобинцева Г.С., Лукаш Л.Л. Стовбуровий потенціал нової лінії клітин людини 4BL // Вісник генетиків і селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 27-35. (Особистий внесок здобувача: культуральна робота, тест у напіврідкому агарі, диференціювання клітин в адипогенному та остеогенному напрямках, забарвлення та фотографування клітин, написання статті).

3. Кушнірук В.О., Акоюн Г.Р., Микитенко Д.О., Гулеюк Н.Л., Зукін В.Д., Лукаш Л.Л. Динаміка ультраструктурних аберацій каріотипу стовбурових клітин людини лінії 4BL, виявлених за допомогою array CGH // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т.16. – С. 216 – 221. (Особистий внесок здобувача: культуральна робота, аналіз хромосомних аберацій, виявлених за допомогою array CGH в клітинах лінії 4BL на 120-му, 160-му та 205-му пасажах, біоінформатичний аналіз генів, що входять до їхнього складу та написання статті).

4. Акоюн Г.Р., Гулеюк Н.Л., Кушнірук В.О., Микитенко Д.М., Яцишина А.П., Лукаш Л.Л. Порівняльний аналіз каріотипу нової лінії клітин людини 4BL в умовах тривалого культивування. I. Плоїдність хромосомного набору // Цитологія і генетика. – 2013. – Т. 47, № 5. – С. 55 – 69. (Особистий внесок здобувача: отримання метафазних пластинок для каріотипування, статистична обробка результатів).

5. Macewicz L.L., Kushniruk V.O., Iatsyshyna A.P., Kotsarenko K.V., Lylo V.V., Akopyan G.R., Huleuk N.L., Mykytenko D.M., Lukash L.L. Correlation the level of mutagenesis with expression of reparative enzyme O6-methylguanin-DNA methyltransferase (MGMT) during establishment of cell line *in vitro* // Biopolymers and cell. – 2013. – Vol. 29, N 6. – P. 485 – 492. (Особистий внесок здобувача: отримання препаратів метафазних пластинок клітин лінії 4BL на різних пасажах, статистична обробка результатів каріотипування, аналіз змін каріотипу на стадіях становлення та стабілізації клітин лінії 4BL, аналіз результатів порівняльної геномної гібридизації – array CGH, переклад статті англійською мовою).

6. Кушнірук В.О., Рубан Т.П., Лукаш Л.Л. Морфологічні та ростові особливості нової лінії клітин людини 4BL // Фактори експериментальної еволюції організмів – К: Логос. – 2013. – Т. 13. – С. 315-319. (Особистий внесок здобувача: культуральна робота, привітальне забарвлення клітин нейтральним червоним, мікроскопія та фотографування клітин, отримання та аналіз кривих росту, написання статті).

7. Кушнірук В.О., Кочубей Т.П., Мацевич Л.Л., Рубан Т.П., Лукаш Л.Л. Дослідження каріотипу нової лінії клітин людини 4BL6 при тривалому культивуванні *in vitro* // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – К.: Логос, 2012. – Т. 3. – С. 313 – 318. (Особистий внесок здобувача: отримання метафазних пластинок клітин лінії 4BL на різних етапах культивування, статистичний аналіз змін каріотипу, написання статті).

8. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Кушнірук В.О., Підпала О.В. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К: Логос. – 2011. – С.493-498. (Особистий внесок здобувача: культуральна робота, тест в напіврідкому агарі та метилцелюлозі, фотографування колоній).



9. Кушнірук В.О., Грипич О.А., Яцишина А.П., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Лукаш Л.Л. Порівняльний аналіз частот аберантних мітозів у популяціях стовбурових клітин різного походження // Серцево-судинна хірургія. – К., 2009. – Випуск 17. – С. 293 – 296. (Особистий внесок здобувача: культуральна робота, мікроядерний тест різних клонів клітинної лінії людини 4BL і клітинної лінії миші M12, порівняльний та статистичний аналіз отриманих результатів).

10. Kushniruk V.O., Shabliy V.A., Mykytenko D.O., Lobyntseva G.S., Lukash L.L. Epithelial-mesenchymal transition in human stem cell line 4BL // *Experimental Oncology*. – 2017 (September). – Vol. 39. – P. 246. (Особистий внесок здобувача: культуральна робота, морфологічні дослідження, тест у напіврідкому агарі, аналіз результатів імунофенотипування, аналіз генів за даними array CGH, що можуть бути залучені у диференціювання в різні типи тканин).

11. Кушнірук В.О., Некрасов К.А., Акоюн Г.Р., Микитенко Д.О., Лукаш Л.Л. Порівняння експресії генів TERT, P53, і MGMT у стовбурових клітинах 4BL та пухлинних клітинах Нер-2// Актуальні питання розвитку біології та екології: мат. міжн. науково-практичної конференції. – Вінниця, 2016. – С. 250-253. (Особистий внесок здобувача: культуральна робота, виділення РНК з клітин ліній 4BL на різних пасажах та клітин лінії Нер-2, синтез кДНК, аналіз експресії генів онкосупресори p53, репаративного ензиму MGMT та гену теломерази за допомогою ПЛР у реальному часі та співставлення результатів з даними array CGH).

12. Kushniruk V., Shabliy V., Lobintseva G., Lukash L. Characterization of new human stem cell line 4BL // *Science, technology and innovative technologies in the prosperous epoch of the powerful state, I tom.* – Ashgabat, Turkmenistan, 2015. – P. 195 – 196. (Особистий внесок здобувача: культуральна робота, привітальне забарвлення нейтральним червоним, диференціювання клітин в адипогенному та остеогенному напрямку, мікроскопія та фотографування, аналіз даних проточної цитофлуориметрії).

13. Kushniruk V.O., Akopyan H.R., Mykytenko D.O., Zukin V. D., Lukash L.L. The karyotype analysis of the new human stem cell line 4BL by array CGH // *Conference for Young Scientists*. – Kyiv, 2015. – P. 75. (Особистий внесок здобувача: аналіз даних, отриманих за допомогою arrayCGH та біоінформатичний пошук генів, що входять до складу дуплікацій та делецій).

14. Kushniruk V. O., Shpilevaya S. P., Lukash L. L. Morphological and growth properties of human cell line 4BL and its stem potential // *Materials of VII annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU.* – Biopolym. and cell. – N 29, special issue. – 2013. – P. 11. (Особистий внесок здобувача: культуральна робота, морфологічні дослідження, щодобовий підрахунок кількості клітин на різних пасажах, побудова та аналіз кривих росту, диференціювання в адипогенному та остеогенному напрямках).

15. Kushniruk V.O., Akopyan H.R., Huleuk N.L., Mykytenko D. O., Macewicz L.L., Ruban T.P., Zukin V. D., Lukash L.L. Karyotypic evolution of new human cell line 4BL6 during long-term cultivation in vitro // *The 1st Multidisciplinary Symposium «Molecular oncology: from Laboratory Bench to Medicine».* – 2012. – P.38. (Особистий внесок здобувача: культуральна робота, отримання препаратів метафазних пластинок, аналіз даних каріотипування та array CGH).



16. H. Akopyan, N. Huleyuk, V. Kushniruk, D. Mykytenko, A. Iatsyshyna, I. Kovaliv, V. Zukin, L. Lukash. Prominent transformation of karyotype of human mesenchymal stem cells 4BL6 in long-term culture // *European Journal of Human Genetics*. – 2011. – Vol. 19. – P. 144 – 145. (Особистий внесок здобувача: культуральна робота, отримання препаратів метафазних пластинок, статистичний аналіз результатів каріотипування).

17. Кушнірук В.О., Яцишина А.П., Рубан Т.П., Лукаш Л.Л. Дослідження генетичної нестабільності в нових лініях мезенхімальних клітин людини 4BL2 та 4BL6 і ембріональних клітин миші M12 // *Матеріали ІХ всеукраїнської наукової конференції наукової конференції студентів та молодих науковців*. – К., 2009. – С. 55 – 57. (Особистий внесок здобувача: культуральна робота, мікроядерний тест різних клонів клітинної лінії людини 4BL і клітинної лінії миші M12, порівняльний та статистичний аналіз отриманих результатів).

### АНОТАЦІЯ

**Кушнірук В.О. Каріотипічна еволюція стовбурових клітин дорослої людини нової лінії 4BL при адаптації до умов *in vitro*. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2018 рік.

Вперше детально охарактеризовано каріотип нової стовбурової клітинної лінії 4BL на стадіях становлення і стабілізації *in vitro*; проведено порівняння її із стовбуровими та раковими клітинними лініями і встановлено закономірності (втрата статевої хромосоми і не випадковий характер хромосомних аберацій), що спостерігаються і в умовах організму. Відмінною рисою лінії 4BL є унікальний комплекс структурних перебудов хромосом: t(1;11)(q12;p15), der(2)(p11~12), t(5;15)(q10;p10), t(12;15)(p10;q10), t(16;21)(q13;p11), незважаючи на які спостерігається збереження біядиплоїдного модального класу в 42-43 хромосоми протягом більше десяти років у культурі. На пізніх пасажах спостерігали поліплоїдизацію частини клітинної популяції, що притаманно лініям клітин гризунів та деяким лініям ракових клітин людини. Показано, що додаткове внесення в клітинну культуру стрес-чинника (висока йонна сила середовища) змінює стабілізуючий добір на русійний і спричиняє нову хвилю зростання геномної нестабільності, яка позитивно корелює з експресією репаративного ензиму MGMT. Методом агау CGH вперше проаналізовано масиви генів, які входять до складу дуплікацій/делецій і зроблено припущення щодо їхньої можливої селективної переваги. Вперше охарактеризовано морфологічні, ростові та імунофенотипові особливості клітин досліджуваної лінії, які, ймовірно, належать до мультипотентних стовбурових негемопоетичних клітин. Іморталізацію клітинної лінії 4BL підтверджено експресією гена теломерази.

**Ключові слова:** каріотипічна еволюція, клітинна лінія, тривале культивування *in vitro*, мультипотентні стовбурові клітини, репаративний ензим MGMT, теломераза, агау CGH.

## АННОТАЦИЯ

**Кушнирук В.О. Кариотипическая эволюция стволовых клеток взрослого человека новой клеточной линии 4BL при адаптации к условиям *in vitro*. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22 – молекулярная генетика. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2018 год.

Впервые детально охарактеризован кариотип новой стволовой клеточной линии 4BL на стадиях становления и стабилизации *in vitro*; проведено сравнение ее со стволовыми и раковыми клеточными линиями и установлены закономерности (потеря половой хромосомы и неслучайный характер хромосомных aberrаций), которые наблюдаются и в условиях организма. Отличительной чертой линии 4BL является уникальный комплекс структурных перестроек хромосом - t(1;11)(q12;p15), der(2)(p11~12), t(5;15)(q10;p10), t(12;15)(p10;q10), t(16;21)(q13;p11), не смотря на которые сохраняется околодиплоидный модальный класс в 42-43 хромосомы на протяжении более 10 лет в культуре. На поздних пассажах наблюдали полиплоидизацию части клеточной популяции, что свойственно клеточным линиям грызунов и некоторым линиям раковых клеток человека. Показано, что дополнительное внесение в клеточную систему стресс-фактора (высокая ионная сила среды) изменяет стабилизирующий отбор на движущий и вызывает новую волну возрастания геномной нестабильности, которая позитивно коррелирует с экспрессией репаративного энзима MGMT. Методом array CGH впервые проанализированы массивы генов, которые входят в состав дупликаций/делеций, и сделано предположение относительно их возможного селективного преимущества. Впервые охарактеризованы морфологические, ростовые и иммунофенотипические особенности клеток исследуемой линии, которые, вероятно, принадлежат к мультипотентным стволовым негемопоетическим клеткам. Иммуортализация клеточной линии 4BL подтверждается экспрессией гена теломеразы.

**Ключевые слова:** кариотипическая эволюция, клеточная линия, длительное культивирование *in vitro*, мультипотентные стволовые клетки, репаративный энзим MGMT, теломераза, array CGH.

## SUMMARY

**Kushniruk V.O. Karyotype evolution of adult human stem cells of new 4BL cell line during adaptation to *in vitro* conditions. – Manuscript.**

Thesis for a degree of Philosophy Doctor (PhD) in Biology, specialty 03.00.22 – molecular genetics. – Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The majority of available human stable cell lines have cancer or embryonic origin or their immortalizations were achieved by introduction of vectors with some genes. Hence, there is a demand for new human cell lines, especially obtained from normal tissues of adult organism.

In the department of human genetics of Institute of molecular biology and genetics

of NAS of Ukraine the new human stem cell line 4BL was obtained from peripheral blood of adult healthy donor, using feeder and special medium with recombinant cytokins LIF, SCF and IL-3 (Lukash 2011). Karyotype evolution of such cell lines is virtually not investigated. Taking into account that cell lines are valuable objects for various research, regular monitoring of their genome changes is essential for proper data interpretation.

Cell line 4BL had successfully overcome the Hayflick limit and is cultivated for more than 220 passages (above 10 years) in culture. For the first time, its karyotype analyses were performed at different stages of establishment and stabilization. The comparison with stem and cancer cell line was done and the following regularities were revealed: sex chromosome loss during long-term cultivation and non-random character of chromosome aberrations – which is close to changes in organism with age or disease. We detected a polyploidization of the part of cell population at late passages (196<sup>th</sup> -221<sup>st</sup> passages), which is a characteristic of rodent cell lines or some cancer cell lines. The hallmark of the cell line 4BL is six marker chromosomes and the unique complex of chromosomal aberrations: t(1;11)(q12;p15), der(2)(p11~12), t(5;15)(q10;p10), t(12;15)(p10;q10), t(16;21)(q13;p11), despite which the near-diploid modal class in 42-43 chromosome is maintained for more than 10 years in culture.

FISH Cytocell OctoChrom technique application allowed not only to clarify the nature of chromosomal aberrations, detected by G-banding, but also to identify some marker chromosome, which appeared to be derivatives of 4 and 17 chromosome.

We have revealed by array CGH that majority of chromosomal aberrations are mosaic, what confirmed the presence of different clones in the cell population of line 4BL. The feature of karyotype stabilization stage can be considered main chromosomal rearrangements (duplications of chromosomes 2, 10, 16 and 19 and deletions of chromosomes 4, 10, 12, 13, 17 and X), which is maintained in cells from 120<sup>th</sup> till 205<sup>th</sup> passage, whereas small new aberrations were eliminated on the next investigated passage. The selective advantages of the continuously reproduced chromosome aberrations can be associated with the increased genes dose of mitotic signal pathways (dup19p13.3-p12) on the background of the decreased copy number of the tumor suppressor genes (del 13q12.11-q21.2). As a result the enhanced proliferative capacity is accompanied by increased gene dosage of apoptosis inducers (dup2q31.1-q33.1, dup16q12.1q12.2, dup16q22.1-q24.3).

It has been shown that addition of stress factor into the system (high ionic strength of medium) changed the stabilizing selection to the directional one and provoked a new wave of genomic instability growing, what is the feature of establishment stage, and had a positive correlation with MGMT expression.

For the first time we investigated morphological and growth peculiarities of new cell line 4BL. Presence of two cell types – fibroblast-like and epithelioid-like – was revealed. The abilities of these cells to form rounded colonies in soft agar and to differentiate into adipogenic, myogenic and osteogenic directions were determined.

By flow-cytometry results, cell populations of line 4BL are positive for markers of mesenchymal stem cells CD73+ and CD105+, and are negative for hematopoietic stem cell markers CD14-, CD34- and CD45-, also cells are negative for Oct4-, which is typical

for the cells of embryonic or tumor origin. So, cell populations of line 4BL most probably belong to multipotent non-hemopoietic stem cells.

The immortalization of cell line 4BL has been confirmed by telomerase expression at different passages. Cell line 4BL can be recommended as a model object for investigation of fundamental processes: adaptation to long-term cultivation *in vitro*, karyotype evolution under regressive condition, and, considering its more than 10 years maintenance in culture – as a model of human cell changes during aging. It is possible to use this cell line for drugs testing and for development of skin equivalents. Taking into account the origin of the 4BL line – peripheral blood of adult healthy donor – it can be used as a control for research on cancer or artificially immortalized cell lines.

**Key words:** karyotype evolution, cell line, long-term cultivation *in vitro*, multipotent stem cells, reparative enzyme *MGMT*, telomerase, array CGH.





Підписано до друку 19.09.2018 р. Зам. № 980.  
Формат 60х90 1/16. Папір офсетний. Друк – цифровий.  
Наклад 100 прим. Ум. друк. арк. 0,9.  
Друк ЦП «КОМПРИНТ». Свідоцтво ДК №4131 від 04.08.2011 р.  
м. Київ, вул. Предславинська, 28  
528-05-42, 067-209-54-30  
email: komprint@ukr.net