

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

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

КУШНІРУК ВЕРОНІКА ОЛЕГІВНА

УДК 575.174 + 575.113 + 576.5 + 576.3

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

03.00.22 – молекулярна генетика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ В.О. Кушнірук

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник: **Лукаш Любов Леонідівна**, доктор біологічних наук,
професор

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Кушнірук В.О. Каріотипічна еволюція стовбурових клітин дорослої людини нової лінії 4BL при адаптації до умов *in vitro*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.22 – «Молекулярна генетика». – Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2018 рік.

Переважає більшість робіт по дослідженню еволюції каріотипу проводилась на ракових клітинних лініях, які початково містять хромосомні аберації та характеризуються підвищеною генетичною нестабільністю або на клітинах гризунів, які, значно легше піддаються іморталізації порівняно з клітинами людини. Вивчення процесу каріотипічної еволюції на первинних клітинних культурах, є неможливим, оскільки через певну кількість пасажів через ліміт Хейфліка відбувається старіння та загибель популяції. З метою іморталізації первинних культур людини використовують цілий ряд вірусів або векторні конструкції з геном теломерази hTERT та онкогенів; проте вектори теж можуть становити небезпеку, наприклад, збільшуючи ризик інсерційних мутацій. Таким чином, незважаючи на величезну кількість існуючих клітинних ліній, виникає потреба в нових, особливо таких, що отримані з нормальних тканин дорослого організму без використання чужорідного генетичного матеріалу та є іморталізованими.

У відділі генетики людини ІМБГ НАНУ отримано нову іморталізовану клітинну лінію 4BL (from blood line) із периферійної крові здорового дорослого донора із периферійної крові здорового дорослого донора, використовуючи фідерну підложку та середовище із додаванням рекомбінантних цитокінів LIF, SCF і IL-3 та інших факторів. Жодна з груп науковців не досліджувала еволюцію каріотипу репрограмованих клітин, отриманих з використанням

спеціальних середовищ та білкових ростових факторів. 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*.

Клітинна лінія 4BL успішно подолала ліміт Хейфліка та культивується понад 220 пасажів (більше 10 років) у культурі. Іморталізацію клітинної лінії 4BL доведено експресією гена теломерази на різних пасажах за допомогою кількісної ПЛР в реальному часі. Вперше досліджено морфологічні та ростові властивості нової клітинної лінії 4BL, виявлено наявність двох типів клітин: фібробластоподібні та епітеліоподібні, що може бути пов'язано із пластичністю стовбурових клітин. Відмічено цитоархітектоніку клітин в культурі: вони часто утворюють колові та напівколові асоціації, які характерні для ендотеліальних клітин. За відсутності пересіву при високій щільності клітини формують осередки багат шарового росту, деякі з яких нагадують кров'яні острівці. Визначено здатність даних клітин формувати округлі колонії в напіврідкому агарі. Стовбуровий потенціал клітин лінії 4BL підтверджено їхньою здатністю диференціюватись в адипогенному, остеогенному та міогенному напрямках.

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; також клітини не експресують маркер Oct4, який характерний для ембріональних або злоякісних клітин. Отже, популяція клітин лінії 4BL ймовірно належить до мультипотентних стовбурових негемопоетичних клітин.

Вперше проведено аналіз каріотипу нової стовбурової клітинної лінії 4BL на різних стадіях становлення і стабілізації 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.

Встановлено, що клітинна лінія 4BL зберігає біядиплоїдний модальний клас у 42-43 хромосоми протягом більше 10 років у культурі. Спостерігали поліплоїдизацію частини популяції клітин лінії 4BL на пізніх пасажах (196, 205, 221), що узгоджується з даними літератури: явище поліплоїдизації клітинних ліній при тривалому культивуванні *in vitro* описане в дослідженнях на ембріональних і ракових клітинах миші і людини (Yamaguchi H. 1999, Яцишина 2008, Viganó C. 2018, Walters D.K. 2018).

Вперше визначено основні структурні аберації хромосом: $t(1;11)(q12;p15)$ – 63%, $der(2)(p11\sim12)$ – 46%, $t(5;15)(q10;p10)$ – 23%, $t(12;15)(p10;q10)$ – 10%, $t(16;21)(q13;p11)$ – 5% метафазних пластинок та шість маркерних хромосом, що може стати унікальним штрих-кодом клітинної лінії 4BL. Застосування техніки FISH Cytocell OctoChrom дозволило не лише підтвердити деякі хромосомні перебудови, але до того ж ідентифікувати деякі маркерні хромосоми, які виявились дериватами 4 та 17-ї хромосом.

За допомогою агау CGH виявлено аберації хромосом, основні з яких зберігаються у клітинах від 120-го до 205 пасажу: це 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. У ділянці делеції 4 q24- q35.2 містяться важливі гени правильного проходження мітозу – а у ділянці делеції 13 q12.11 – q 21.2 міститься десять генів-онкосупресорів, з них: LATS2 для формування веретена поділу та відомі BRCA2 та RB1, що може уможливлювати проходження аберантних мітозів в клітинній популяції лінії 4BL. Також нами не виявлено експресію онкосупресора p53 на 127, 144 та 222-му пасажах за допомогою ПЛР.

Селективна перевага збережених хромосомних перебудов може асоціюватись з дуплікацією 2 q31.1 - q33.1, де міститься ген білка SDPR (serum deprivation response) – і нами показано здатність клітин виживати і активно проліферувати у середовищі із зниженою концентрацією сироватки 1% порівняно із стандартними 10%. Також селективну перевагу може надавати підвищення 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). Методом array CGH виявлено, що більшість аберацій є мозаїчними, що підтверджує існування гетерогенних клонів в популяції клітинної лінії 4BL.

Клітинна лінія 4BL адаптувалась до виживання в умовах *in vitro* з притаманними їй морфологією, ростовими властивостями та унікальним комплексом хромосомних перебудов, 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. Нами показано, що додаткове внесення в систему стрес-чинника (висока йонна сила середовища) змінює стабілізуючий добір стандартних умов культивування на рушійний і спричиняє нову хвилю зростання геномної нестабільності, характерний для етапу становлення, та корелює з експресією репаративного ензиму MGMT.

Визначено, що основний етап становлення клітинна лінія 4BL пройшла до 120-го пасажу, про що свідчить збереження пулу значних хромосомних перебудов та біядиплоїдного модального класу на різних пасажах культивування. Проте, на 133-му пасажі, ймовірніше за все, мала місце стадія кризи із значним зростанням – 54% клітин з біягаплоїдним каріотипом. Ця стадія знову змінювалась етапом стабілізації на 160-му пасажі, яка при обробці клітин стрес-чинником змінювалась різким зростанням хромосомної нестабільності, що характерно для етапу становлення. Тому, каріотипічна еволюція клітинної лінії 4BL *in vitro* має хвилеподібний характер.

Клітинна лінія 4BL є зручним об'єктом для вивчення фундаментальних процесів: адаптації стовбурових клітин до нових умов мікрооточення, каріотипічної еволюції протягом тривалого культивування *in vitro*; може

виступати як модель регресивної еволюції та, зважаючи на її тривале підтримання у культурі – понад 10 років – як аналог вікових змін клітин при старінні. Враховуючи джерело походження клітинної лінії 4BL – периферійна кров дорослого здорового донора – вона перспективна в якості відносного контролю при проведенні досліджень (наприклад, при тестуванні лікарських засобів) на ракових чи штучно імуорталізованих клітинних лініях.

Ключові слова: каріотипічна еволюція, клітинна лінія, тривале культивування *in vitro*, мезенхімальні стовбурові клітини, репаративний ензим *MGMT*, теломераза, array CGH, хромосомні аберації, поліплоїдія, білядиплоїдний каріотип.

Список публікацій здобувача:

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.

2. **Кушнірук В.О.**, Шаблій В.А., Шпильова С.П., Рубан Т.П., Півень О.О., Лобинцева Г.С., Лукаш Л.Л. Стівбуровий потенціал нової лінії клітин людини 4BL // Вісник генетиків і селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 27-35.

3. **Кушнірук В.О.**, Акопян Г.Р., Микитенко Д.О., Гулеюк Н.Л., Зукін В.Д., Лукаш Л.Л. Динаміка ультраструктурних аберацій каріотипу стівбурових клітин людини лінії 4BL, виявлених за допомогою array CGH // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т.16. – С. 216 – 221.

4. Акопян Г.Р., Гулеюк Н.Л., **Кушнірук В.О.**, Микитенко Д.О., 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.

5. Macewicz L.L., **Kushniruk V.O.**, Iatsyshyna A.P., Kotsarenko K.V., Lylo V.V., Akopyan G.R., Huleuk N.L., Mykytenko D.O., 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.

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.

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.

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.

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.

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.

11. **Кушнірук В.О.**, Некрасов К.А., Акопян Г.Р., Микитенко Д.О., Лукаш Л.Л. Порівняння експресії генів TERT, P53, і MGMT у стовбурових клітинах 4BL та пухлинних клітинах HEP-2 // *Актуальні питання розвитку біології та екології: мат. міжн. науково-практичної конференції.* – Вінниця, 2016. – С. 250-253.

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.

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.

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.

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.

16. Akopyan H., Huleyuk N., **Kushniruk V.**, Mykytenko D., Iatsyshyna A., Kovaliv I., Zukin V., Lukash L. 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.

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.

SUMMARY

Kushniruk V.O. Karyotype evolution of adult human stem cells of the new 4BL cell line during adaptation to *in vitro* conditions. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.22 – Molecular Genetics. – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The majority of the karyotype evolution investigations were performed on cancer cell lines, which initially have chromosomal aberrations and are characterized by increased genetic instability, or on the rodent cells, which much easier become immortalized comparatively to human cells. Research the processes of the karyotype evolution on the primary cell cultures is impossible since after some number of passages senescence and degradation of the cell population occurred because of the Hayflick limit. With the purpose of immortalization of human primary cell cultures variety of viruses or vectors with telomerase gene and oncogenes are used; however vectors can be dangerous, for example, by elevating the risk of insertion mutations.

Therefore, despite the large number of existing cell lines, there is a demand of the new one, especially those, which have been obtained from normal tissues of adult organism without external genetic material usage and are immortal.

In the department of human genetics of the Institute of molecular biology and genetics of NAS of Ukraine the new human stem cell line 4BL (from blood line) was obtained from peripheral blood of adult healthy donor, using feeder and special medium with recombinant cytokins LIF, SCF and IL-3 and other factors. None of the scientific groups had not researched the karyotype evolution of reprogrammed cells, obtained with special mediums and protein growth factors. The aim of this work was comprehensive research of the karyotype evolution, molecular-genetic, morphological and growth peculiarities of the new cell line 4BL during its adaptation to cultivation *in vitro*.

Cell line 4BL had successfully overcome the Hayflick limit and is cultivated for more than 220 passages (above 10 years) in culture. Its immortalization is proven by telomerase gene expression at different passages by real-time PCR.

For the first time morphological and growth characteristics of new cell line 4BL were investigated and the presence of two types of cells was revealed: fibroblast-like and epithelioid-like, what can be concerned with plasticity of stem cells. We pay attention to the cell cytoarchitectonic in culture: they often formed circle and semi-circle associations, which are characteristic for endothelial cells. With high cell density without passaging they formed multicellular foci, some of them remind blood islets. The abilities of these cells to form rounded colonies in soft agar were determined. Stem potential of the cell line 4BL was confirmed by their differentiation into adipogenic, myogenic and osteogenic directions.

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-, CD45-, CD90; 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.

For the first time, the karyotype analyses of the new stem cell line 4BL were performed at different stages of establishment and stabilization. The comparison with stem and cancer cell lines 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.

It was founded, that cell line 4BL maintains near-diploid modal class in 42-43 chromosomes for more than 10 years in culture. We detected a polyploidization of the part of cell population at the late passages - 196th, 205th and 221st. This is coordinates with literature data: the phenomenon of cell lines polyploidization during long-term cultivation is described on mouse and human embryonic and cancer cell lines (Yamaguchi H. 1999, Iatsyshyna 2008, Viganó C. 2018, Walters D.K. 2018).

We revealed main structural chromosomal rearrangements: t(1;11)(q12;p15) – 63%, der(2)(p11~12) – 46%, t(5;15)(q10;p10) – 23%, t(12;15)(p10;q10) – 10%, t(16;21)(q13;p11) – 5% metaphase plates and six marker chromosomes, what could become a unique bar-code of the cell line 4BL. FISH Cytocell OctoChrom technique application allowed us 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 the 4 and 17 chromosome.

By array CGH we have detected chromosomal aberrations, main of them are maintained in cells from 120th till 205th passage: these are duplications of chromosomes 2, 10, 16 and 19 and deletions of chromosomes 4, 10, 12, 13, 17 and X, whereas new small aberrations were eliminated on the next investigated passage. In the region of the deletion 4 q24-q35.2 important genes of correct mitosis are contained and deletion of the region 13 q12.11 – q 21.2 involved 10 tumor suppressor genes, among them are: LATS2 for mitotic spindle formation and famous BRCA2 and RB1 – altogether this can enable the existence of aberrant mitosis in the cell population 4BL. Also we have not revealed the expression of tumor suppressor gene p53 by real-time PCR.

The selective advantages of the continuously reproduced chromosome aberrations can be associated with the duplication 2 q31.1 - q33.1, where gene SDPR (serum deprivation response) is located – and we showed the ability of cells to survive and to proliferate in the medium with low serum concentration – 1% comparatively to standard 10%. Also selective advantage can provide by the increased genes dosage of intracellular metabolism and mitotic signal pathways (dup19p13.3-p12) and the decreased copy number of the tumor suppressor genes (del 13q12.11-q21.2). As a result the enhanced cells proliferative capacity is accompanied by increased gene dosage of apoptosis inducers (dup2q31.1-q33.1, dup16q12.1q12.2, dup16 q22.1-q24.3). It has been revealed by array CGH, that majority of the aberrations are mosaic, what confirmed the presence of heterogenic clones in the cell population of line 4BL.

Cell line 4BL adapted to cultivation *in vitro* with its character of morphology, growth peculiarities and unique set of chromosomal rearrangements and the effect of stabilizing selection under standard cultivation condition is aimed on maintaining them. During change the condition of cultivation on the cells will act directional selection and those cell clones will survive, which appear to be most adapted to the new living conditions. We show 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 increasing, what is the feature of the establishment stage, and had a positive correlation with MGMT expression.

It was defined that the main establishment stage cell line 4BL passed by the 120th passage, as evidenced by the maintaining of the set of considerable chromosomal rearrangements and near-diploid modal class at different cultivation stages. However, at the 133rd passage, most probably, was the crisis stage with high increasing of near-haploid cells up to 54%. This stage again changed on the stabilization stage at 160th passage, which with the stress-factor treatment was changed into sharp increasing of the chromosomal instability, what is the character of the establishment stage. That's why the karyotype evolution of the cell line 4BL *in vitro* has a wave-like character.

Cell line 4BL is a valuable object for investigation of fundamental processes: adaptation of stem cells to new microenvironment, karyotype evolution during long-time cultivation *in vitro*, and, considering its more than 10 years maintenance in culture – as a model of human cell changes during aging. Taking into account the origin of the 4BL line – peripheral blood of adult healthy donor – it can be used as a relative control for research (for example, during drug testing) on cancer or artificially immortalized cell lines.

Key words: karyotype evolution, cell line, long-term cultivation *in vitro*, mesenchymal stem cells, reparative enzyme *MGMT*, telomerase, array CGH, chromosomal aberrations, polyploidy, near-diploid karyotype.

List of scientific publications published on the topic of the dissertation:

1. Akopyan H.R., **Kushniruk V.O.**, Mykytenko D.O., Huleyuk N.L., Kremenskaya Yu., L.L. Lukash. Chromosomal DNA Balance in Human Stem Cell Line 4BL // Cytology and Genetics. – 2016. – Vol. 50, N. 4. – P. 257–266.
2. **Kushniruk V.O.**, Shabliy V.A., Shpyleva S.P., Ruban T.P., Piven O.O., Lobyntseva G.S., Lukash L.L. Stem potential of the new human cell line 4BL // The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine. – 2016. – Vol. 14, N 1. – P. 27-35. (article in Ukrainian)
3. **Kushniruk V.O.**, Akopyan H.R., Mykytenko D.O., Huleyuk N.L., Zukin V.D., Lukash L.L. The dynamic of ultrastructural karyotype aberrations of the human stem cell line 4BL, revealed by array CGH // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2015. – Vol.16. – P. 216 – 221. (article in Ukrainian)
4. Akopyan H.R., Huleyuk N.L., **Kushniruk V.O.**, Mykytenko D.O., Iatsyshyna A.P., Lukash L.L. Comparative analysis of the karyotype of new human cell line 4BL6 at long-time cultivation: ploidy of the chromosomal set // Cytology and Genetics. – 2013. – Vol. 47, N 5. – P. 305 -317.
5. Macewicz L.L., **Kushniruk V.O.**, Iatsyshyna A.P., Kotsarenko K.V., Lylo V.V., Akopyan G.R., Huleuk N.L., Mykytenko D.O., Lukash L.L. Correlation the level of mutagenesis with expression of reparative enzyme O6-methyluanin-DNA methyltransferase (MGMT) during establishment of cell line in vitro // Biopolymers and cell. – 2013. – Vol. 29, N 6. – P. 485 – 492.
6. **Kushniruk V.O.**, Ruban T.P., Lukash L.L. Morphological and growth properties of new human stem cell line 4BL // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2013. –Vol. 13. – P. 315-319. (article in Ukrainian)
7. **Kushniruk V.O.**, Kochubey T.P., Macewicz L.L., Ruban T.P., Lukash L.L. Karyotype research of the new human cell line 4BL during long-term cultivation in vitro //Achievements and problems of genetics, breeding and biotechnology. – 2012. – Vol. 3. – P. 313 – 318. (article in Ukrainian)

8. Lukash L.L., Iatsyshyna A.P., **Kushniruk V.O.**, Pidpala O.V. Reprogramming of human adult somatic cells // Factors of experimental evolution of organisms. – 2011. – Vol. 11. – P. 493-498. (article in Russian)

9. **Kushniruk V.O.**, Grupuch O.A., Iatsyshyna A.P., Macewicz L.L., Ruban T.P., Lukash L.L. Comparative analysis of aberrant mitosis frequencies in the population of stem cells of different origin // Cardiovascular surgery. – 2009. – Vol. 17. – P. 293 – 296. (article in Ukrainian)

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.

11. **Kushniruk V.O.**, Nekrasov K.A., Akopyan H.R., Mykytenko D.O., Lukash L. L. Comparison of *TERT*, *P53*, and *MGMT* gene expression in stem cells 4BL and cancer cells HEP-2 // Actual issues of biology and ecology development: materials of international scientific and practical conference. - Vinnitsa, 2016. - P. 250-253.

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.

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.

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.

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.

16. Akopyan H., Huleyuk N., **Kushniruk V.**, Mykytenko D., Iatsyshyna A., Kovaliv I., Zukin V., Lukash L. 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.

17. **Kushniruk V.O.**, Iatsyshyna A.P., Ruban T.P., Lukash L.L. Research of the genetic instability in the new human mesenchymal cell lines 4BL2 and 4BL6 and mouse embryonic cells M2 // Materials of IX Ukrainian Scientific Conference of Students and Young Scientists. – Kyiv, 2009. – P. 55 – 57.

ЗМІСТ	16
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1. Отримання нових клітинних ліній	29
1.1.1. Клітинні банки та клітинні лінії: ракові, іморталізовані та первинні	29
1.1.2. Стівбурові клітини людини	31
1.1.3. Індуковані плюрипотентні стівбурові клітини	31
1.2. Закономірності каріотипічної еволюції клітин людини і тварин <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>	35
1.2.1. Мінливість каріотипу ракових та іморталізованих клітин	35
1.2.1.1. Загальні риси каріотипічної еволюції клітин ссавців <i>in vitro</i>	35
1.2.1.2. Маркерні хромосоми і хромосомні аберації, типові для ракових клітин в умовах організму	41
1.2.1.3. Втрата статевих хромосом як найтипівіша ознака каріотипічної мінливості клітин в онтогенезі і при культивуванні	44
1.2.2. Каріотипічні зміни у лініях стівбурових клітин при культивуванні <i>in vitro</i>	47
1.2.2.1. Каріотипічна еволюція ЕСК, ЕГК та МСК в культурі	47
1.2.2.2. Каріотипічні зміни іPSC в процесі перепрограмування та культивування	52
1.2.2.3. Порівняння каріотипічних змін при культивуванні іPSC і ЕСК	54
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	59
2.1. Клітинні лінії та умови культивування	59
2.1.1. Отримання клітинних ліній	59
2.1.2. Кріоконсервація	60
2.2. Обладнання	61
2.3. Морфологічні дослідження та імунофенотипування клітин	61
2.3.1. Рутинні дослідження морфології	61
2.3.2. Дослідження стівбурового потенціалу	62

2.3.3. Проточна цитофлуориметрія	63
2.4. Ростові властивості	64
2.4.1. Криві росту	64
2.4.2. Здатність клітин рости у середовищі, збідненому на ростові фактори	64
2.4.3. Вивчення здатності клітин рости без прикріплення до субстрату	64
2.5. Цитогенетичні методи	65
2.5.1. Рутинне каріотипування	65
2.5.2. G-banding (диференційне забарвлення хромосом)	65
2.5.3. FISH-аналіз	66
2.6. Молекулярно-генетичні методи	66
2.6.1. Порівняльна геномна гібридизація	66
2.6.2. Виділення РНК з тотального лізату клітин	67
2.6.3. Синтез к ДНК	67
2.6.4. ПЛР в реальному часі	67
2.7. Методи роботи з білками	68
2.7.1. Виділення білкових лізатів	68
2.7.2. Визначення концентрації білка за методом Бредфорд	68
2.7.3. Білковий електрофорез	69
2.7.4. Трансфер	69
2.7.5. Вестерн-блот аналіз	69
2.8. Статистичний аналіз	70
РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	71
РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЇ, СТОВБУРОВОГО ПОТЕНЦІАЛУ, ІМУНОФЕНОТИПУ ТА РОСТОВИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ 4BL	71
3.1. Морфологічні властивості клітинної лінії 4BL	71
3.2. Дослідження здатності клітин до багат шарового росту	73
3.3. Дослідження здатності клітин рости без прикріплення до субстрату	75
3.4. Стовбуровий потенціал клітинної лінії 4BL	78
3.5. Імунофенотипування клітин лінії 4BL	81

3.6. Криві росту клітин лінії 4BL	83
3.7. Дослідження здатності клітин рости в середовищі, збідненому ростовими факторами	86
РОЗДІЛ 4. КАРІОТИПІЧНІ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	89
4.1. Рутинне каріотипування	89
4.2. Результати диференційного забарвлення хромосом	94
4.2.1. Структура популяцій клітин лінії 4BL за плоїдністю	94
4.2.2. Кількість хромосом у біядиплоїдних клітинах лінії 4BL	96
4.2.3. Хромосомні аберації в біядиплоїдних клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі	98
4.2.3.1. Характер асоціації хромосомних аберацій	103
4.2.3.2. Маркерні хромосоми	104
4.2.4. Каріотип поліплоїдних клітин лінії 4BL	105
4.3. Ультраструктурні зміни каріотипу, виявлені за допомогою array CGH	108
4.4. Визначення експресії генів <i>TERT</i> , <i>MGMT</i> і <i>p53</i>	135
РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	141
ВИСНОВКИ	164
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	166
ДОДАТОК А	209
ДОДАТОК Б	212
ДОДАТОК В	213
ДОДАТОК Д	214

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ДСК – дорослі стовбурові клітини
- ЕГК – ембріональні гермінативні клітини
- ЕМП – епітеліально-мезенхімальний перехід
- ЕТС – ембріональна теляча сироватка
- ЕСК – ембріональні стовбурові клітини
- ЕФМ – ембріональні фібробласти миші
- МЕП – мезенхімально-епітеліальний перехід
- МСК – мезенхімальні стовбурові клітини
- ММСК – мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини
- м.п. – метафазні пластинки
- СК – стовбурові клітини
- ТФ – транскрипційний фактор
- ХН – хромосомна нестабільність
- ВСС – basal cell carcinoma
- CNVs – copy number variations
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO – dimethyl sulfoxide
- EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid
- HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
- IBMX – 3-Isobutyl-1-methylxanthine
- iPSC – induced pluripotent stem cell
- MGMT – O6-methylguanine DNA-methyltransferase
- PAS – Periodic acid–Schiff staining
- PBS – phosphate buffered saline

ВСТУП

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 [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9] чи клітин гризунів, які, як відомо, значно легше піддаються іморталізації порівняно з клітинами людини [10, 11]. Частина іморталізованих або стабільних ліній клітин людини походить від плюрипотентних ембріональних стовбурових клітин, головною з небажаних властивостей яких є здатність формувати тератоми [12, 13, 14, 15, 16]. Крім того, робота з останніми має біоетичні обмеження [17].

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 [18]. 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 [19, 20]. 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 [21, 22, 23]. Дестабілізацію клітинного геному спричиняють також і самі векторні конструкції [24, 25, 26, 27, 28].

В деяких дослідженнях вивчались процеси і закономірності каріотипічної еволюції іморталізованих клітинних ліній ссавців [29, 30, 31, 10, 11]. 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 O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази [32, 33].

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 та c-Myc [34]. 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 [35, 36, 37, 38, 39].

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 [40].

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 O⁶-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 агау 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 – array 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 за все, 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 білядиплоїдного 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 плоїдності клітин суб-модальних класів при збереженні домінування основного модального класу. Досліджено комплекс хромосомних аберацій клітин лінії 4BL за допомогою методу array 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 Акопян 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. Роботу викладено на 214 сторінках машинописного тексту (комп'ютерний друк), проілюстровано 47 рисунками та 8 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Отримання нових клітинних ліній

1.1.1. Клітинні банки та клітинні лінії: ракові, імуорталізовані та первинні.

Клітинні лінії різного походження широко використовуються у фундаментальних дослідженнях, для цілей клітинної терапії, промислової біотехнології, в експериментальній онкології тощо. На сьогодні жодна біологічна лабораторія не обходиться без використання клітинних ліній, які є зручним об'єктом для дослідження внутрішньоклітинних і молекулярних процесів, розробки та тестування лікарських препаратів, а також виступають як біореактори для продукції широкого спектру речовин.

У найвідоміших клітинних банках світу ATCC та European Cell Culture Collection містяться тисячі первинних культур та постійних клітинних ліній (використовують також терміни встановлені, стабільні та імуорталізовані клітинні лінії). В італійського клітинному банку CLDB – Cell Line Data Base [41], що перевершує відомий американський клітинний банк ATCC, підтримується 1994 лінії, що ведуть походження від 299 патологій, в тому числі від людей з синдромом Дауна, а також 989 клітинних ліній, що походять від 129 видів пухлин [42]. Фактично, усі ці клітинні лінії первинно містять хромосомні аберації, характеризуються підвищеною генетичною нестабільністю, ламкістю хромосом, а також порушеннями функціонування генів, що відповідають за регуляцію клітинного циклу, та генів-онкосупресорів. Слід відзначити, що в клітинних банках практично відсутні імуорталізовані лінії стовбурових клітин дорослої людини, отриманих без спеціальних обробок, із нормальних тканин організму.

Первинні культури клітин, отримані із нормальних тканин, є незручними моделями для науково-дослідної роботи, оскільки вони повільно ростуть та є вимогливими до складу середовища, наявності фідерної підложки, спеціальних субстратів та компонентів. Крім того, важко спрогнозувати, скільки пасажів витримає конкретна культура і коли в ній настане період кризи та припинення проліферації [18, 19]. Це унеможливує використання таких культур в тривалих експериментах і вимагає виділення щоразу нових первинних культур, що є фінансово не вигідним.

Майже всі культури ембріональних клітин мишей розвиваються у постійні клітинні лінії в межах трьох місяців культивування. Спонтанна іморталізація і злоякісна трансформація клітин частіше відбувається у мишей, ніж у щурів, проте може вважатися загальною рисою гризунів [10].

На відміну від культур клітин гризунів практично не можливо отримати постійні лінії клітин людини непухлинного походження шляхом спонтанної трансформації [10, 31]. З метою іморталізації клітин використовують віруси (SV40, Епштейна-Барр, папіломавірусів, аденовірусів), введення векторних конструкцій з геном теломерази hTERT та/або вірусних чи клітинних онкогенів (19). Однак у багатьох дослідженнях показано, що експресія ранніх вірусних генів в іморталізованих клітинах ссавців призводить до одночасної індукції мутацій і підсилення ознак злоякісної трансформації – появи пухлиноутворювальної здатності [21, 22]. Віруси, ймовірно, діють шляхом інгібування активності таких генів як CIP-1/WAF-1/p21, Rb, p53, і p16, що призводить до зниження ефективності репаративних систем, що видаляють пошкодження ДНК, уможливають проходження аберантних мітозів і підвищення загальної частоти мутацій [19].

Таким чином, незважаючи на величезну кількість існуючих клітинних культур, що зберігаються в клітинних банках, виникає потреба в нових, особливо таких, що були б отримані з нормальних тканин дорослого організму та мали б необмежений проліферативний потенціал, тобто, були іморталізованими.

1.1.2. Стовбурові клітини людини

Після відкриття ембріональних стовбурових клітин людини (ЕСК) у 1998 р. [43], увага вчених прикута до вивчення природи та можливостей застосування стовбурових клітин різного типу [44]. Однак робота з ЕСК людини потребує спеціального дозволу біоетичної комісії [45,17]; в першу чергу через їхню здатність утворювати аналоги бластоцист, так звані ембріодні тільця. Також ЕСК здатні утворювати тератоми та тератокарциноми, тому можуть використовуватись у клініці лише після їхнього диференціювання в потрібний тип клітин [13, 46, 47, 14].

Перевагою МСК є відсутність пухлиноутворювальної здатності та етичних обмежень застосування [48, 49, 50, 51]. Мультипотентні СК вже застосовуються у клінічній практиці для лікування різноманітних захворювань: системи крові, серцево-судинної системи [52], імунодефіцитних станів після хіміотерапії і опромінення, раку [53], печінки [54], міодистрофій [55], пошкоджень суглобів і кісток [56], цукрового діабету [57], інсульту та паркінсонізму [58] тощо. Проте цими галузями використання СК далеко не обмежується. Надзвичайно перспективним напрямком є розробка та тестування лікарських засобів [59, 60] з використанням ліній стовбурових клітин, що надає можливість на початкових етапах тестування обійтись без залучення лабораторних тварин та дозволяє економічно оптимізувати дослідження.

Однак первинні культури МСК, виділених із дорослого організму, незважаючи на їх стовбурові властивості, мають обмежений проліферативний потенціал (50-100 поділів): такі клітини ростуть досить повільно, що потребує значного часу для напрацювання необхідної кількості клітинного матеріалу. Також вони є вимогливими до наявності фідеру, складу середовища, вмісту кисню і т.д.

1.1.3. Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини.

Революція в галузі клітинної біології здійснилася після отримання iPSC із дорослих диференційованих соматичних клітин, які за певними ознаками є подібними до ЕСК. У 2006 р. японські науковці Яманака і Такахаші

оприлюднили дані щодо отримання iPSC з фібробластів миші під впливом чотирьох транскрипційних факторів - OCT3/4, KLF4, SOX2, C-MYC [34]. В наступному 2007 році аналогічні дослідження були проведені з використанням дорослих диференційованих клітин людини [61,62]. Останнє десятиріччя відзначено інтенсивним вивченням iPSC та успішними експериментами з індукції плюрипотентності під впливом інших ТФ: NANOG і LIN28 або ж NR5a2, SOX1, ESRRB та GLIS-1 [63, 64]. В результаті доведено принципу можливість одержання iPSC із термінально диференційованих соматичних клітин за допомогою рекомбінантних конструкцій, що містять гени іморталізації і плюрипотентності [64, 65, 66, 67].

Сучасні транскриптомні та морфологічні дослідження, що проводяться з використанням різних протоколів перепрограмування, свідчать про наявність двох етапів індукції плюрипотентності: стохастичного та детермінувального [68]. Перший стохастичний етап характеризується частковим перепрограмуванням соматичних клітин із збереженням залежності від ектопічної, тобто не притаманної у нормі, експресії ТФ екзогенного походження [69], гетерогенністю, морфологічними змінами клітин (зменшення розмірів) та мезенхімально-епітеліальним переходом (МЕП) за участі SOX2 [70, 71], посиленою проліферацією під впливом фосфатидилінозитол-3-кіназних сигнальних шляхів та c-Мус [72, 73, 66], нестабільністю [74, 64, 63]. Вказані особливості пояснюють множинністю молекулярно-епігенетичних шляхів інактивації генів, що відповідають за фенотип соматичної клітини, та дерепресії генів плюрипотентності [66, 75, 76, 77, 78, 79].

Вирішальним чинником, що стимулює перехід частково перепрограмованих соматичних клітин людини до заключної фази, дозрівання, вважається експресія LIN28, який забезпечує деметилування промоторів генів плюрипотентності і реалізацію активуючих модифікацій гістонів [72]. Детермінувальний етап характеризується утворенням стабільних iPSC, які експресують маркери плюрипотентності та демонструють незалежність від

ектопічних ТФ, здатність до самовідновлення й утворення ембріодних тілець [80, 77, 78].

Нагальними проблемами процесу перепрограмування соматичних клітин у культурі залишаються його низька ефективність – 10^{-2} – 10^{-6} клітин, а також гетерогенність отримуваних iPSC [37, 81, 82]. Цікаво, що отримані iPSC відзначаються динамічною регуляцією ретротранспозонів [83, 84], що може призводити до дестабілізації клітинного генома.

Отримані iPSC клітини є генно-модифікованими і, ймовірно, генетично нестабільними та здатними навіть провокувати канцерогенез, наприклад, через реактивацію гена Мус [85, 86]. Крім цього, вектори теж можуть становити генетичну небезпеку: так, ретровіруси хаотично, але постійно вбудовуються в різні ділянки геному, а це може призводити до зсуву рамки зчитування генів. Існують методи видалення векторів після інтеграції, наприклад, за допомогою Cre-рекомбінази, системи piggyBac транспозонів [87], CRISPR/Cas 9, проте можуть залишатися окремі вірусні послідовності, що несе ризик інсерційних мутацій [20].

На сьогоднішній день від векторів намагаються відмовитись, застосовуючи інші підходи: використання неінтегративних векторів, серед яких РНК-вмісні аденовіруси і вірус Сендай [88], епісомні плазмиди на основі вірусу Епштейн-Барра, які реплікуються позахромосомно [89], мініциркулювальні вектори із суперспіралізованою ДНК. Всі вони містять 4 транскрипційні фактори Яманака – Oct4, Sox2, Klf4 і Мус або дещо інший набір – Oct4, Sox2, Nanog і Lin28 [37, 90]. Використовують мРНК метод, що має досить високу ефективність – 1,4% трансформованих клітин порівняно з 10^{-4} для вірусного підходу [36]. Деякі автори доповідають про хімічну індукцію плюрипотентності, проте вона вимагає багатьох кроків та обробок клітин різними речовинами і є незрозумілою в плані механізмів дії [37].

Нині частіше використовують мононуклеарні клітини з периферійної крові. Вони мають характеристики, які дещо наближають їх до iPSC порівняно з фібробластами. Крім того, їхнє отримання є менш травматичним для пацієнта,

а утворення з них колоній iPSC займає 14 днів порівняно з 28-30 днями для фібробластів [91]. Існують протоколи отримання iPSC з периферійної крові в умовах вільних від фідери та сироватки, застосовуючи епісомні вектори [92, 93, 89].

Дослідники порівняли ефективність перепрограмування вихідної лінії фібробластів ВJ, використовуючи три методи: найвищою вона була при використанні мРНК методу (1,89% вихідних клітин), з ретровірусами – 0,2% та епісомною плазмідною – 0,1% клітин. Проте, коли ті ж самі методи були застосовані для перепрограмування 3-х ліній первинних фібробластів від пацієнтів, то отримали протилежні результати: найкращу ефективність спостерігали з епісомною плазмідною, що була у 4 рази вищою, ніж при використанні ретровірусного методу та і у 50 разів вищою, ніж при застосуванні мРНК [94].

У роботі [35] доповідається про отримання індукованих плюрипотентних клітин з фібробластів за допомогою прямої доставки рекомбінантних білків Oct-4, Sox-2, Klf-4 і c-Myc. Незважаючи на те, що отримання перепрограмованих клітин за допомогою білкового методу займає більше часу – 8 тижнів та має меншу ефективність (0,001% вихідних клітин порівняно з 0,01% клітин при застосуванні вірусного протоколу), даний метод дозволяє виключити ризики, пов'язані з використанням вірусів, ДНК та потенційно шкідливих хімічних компонентів [35, 95, 36, 37, 96, 38, 97, 98, 39]. Автори підтвердили експресію маркерів плюрипотентності, здатність до диференціації та формування тератом в організмі імуно-дефіцитних мишей, проте - не проводили цитогенетичного аналізу [35].

Групою авторів [99, 100] було вдосконалено умови для проникнення рекомбінантних білків Oct-4 і Sox-2 через мембрану і показано, що для перепрограмування клітин достатньо лише одного з цих факторів. Це викликало зацікавлення інших дослідників, проте вони сконцентрувались на умовах поліпшення доставки всередину клітини рекомбінантних білків: наприклад, приєднуючи до них пенетруючі пептиди [101, 102, 103, 104], чи

використовуючи наночастинки хітозану [105]. Однак жодна з цих груп не перевіряла каріотип отриманих клітинних ліній.

1.2. Закономірності каріотипічної еволюції клітин людини і тварин *in vitro* та *in vivo*

1.2.1. Мінливість каріотипу ракових та іморталізованих клітин.

1.2.1.1. Загальні риси каріотипічної еволюції клітин ссавців *in vitro*.

Для дослідження еволюційних процесів в популяціях клітин людини і тварин умови *in vitro* є унікальними: вони значно відрізняються від умов організму, починаючи від мікрооточення, і закінчуючи складом поживного середовища та парціальним тиском кисню. Під час тривалого культивування іморталізованих клітин *in vitro* відбувається штучна селекція тих клонів клітин, що швидше проліферують, відповідно, вони часто мають зменшену чутливість до сигналів диференціювання та підвищену стійкість до апоптозу. В процесі адаптації клітинних популяцій до нових умов існування спостерігаються кардинальні зміни всього геному, що супроводжуються не лише зміною епігенетичних міток, а й мутаціями та перебудовами хромосомного апарату клітин [106].

Складний процес перебудови каріотипу клітин при становленні клітинних ліній із відбором клонів, найбільш адаптованих до умов *in vitro*, отримав назву каріотипічна еволюція клітин в культурі. Вперше особливості мінливості каріотипу клітин ссавців при культивуванні описані та узагальнені у монографіях Оленова Ю.М. і Вахтіна Ю.Б. [29, 30]. А в роботах Мамаєвої виявлено важливі закономірності каріотипічної мінливості ссавців у культурі, зокрема наявність двох етапів: становлення та стабілізації клітинних ліній [31]. На етапі становлення відбуваються значні кількісні та структурні перебудови хромосом у клітинах; і клітинна лінія в результаті стає гетерогенною популяцією із присутністю найбільш пристосованих до умов культивування

клонів клітин. Клітинна лінія, яка досягла етапу стабілізації, характеризується значно меншою каріотипічною гетерогенністю клітин: невеликою варіабельністю кількості хромосом і вираженим модальним класом хромосом, збалансованістю каріотипу та іншими ознаками [31].

Стабільність хромосомного матеріалу клітин лінії, яка досягла етапу стабілізації в культурі, відрізняє їх від клітин злоякісних пухлин в організмі. Показано, що моносомія за окремими хромосомами часто є тимчасовим явищем на початку становлення клітинної лінії та замінюється клонами більшої плідності: наприклад, близько тетраплоїдними клонами у клітинних лініях: карциноми легенів людини [107], аденокарциноми товстого кишечника [108], мієломи [109], раку яєчників [110]; клітинами з білятриплоїдним набором хромосом у лініях клітин отриманих із: В-клітинної лімфоми [111], лімфоми Ходжкіна [112], пухлини шлунка [113], карциноми гортані [114], менінгіоми [115], карциноми язика [116]; чи клітинами з приблизно пента- і гексаплоїдний набором в лініях ЕГК миші [117]. Окрім поліплоїдизації клітин із моносомією існують інші способи компенсації клітинами втрати генетичного матеріалу: ампліфікація онкогенів (переважно тус-родини) та екстракопіювання цілих аутосом або їхніх фрагментів [31,118].

Становлення клітинної лінії – це тривалий процес, різні автори наводять різні дані стосовно необхідної кількості пасажів культивування для того, щоб вважати клітинну лінію іморталізованою. Мінімальною називають відмітку у 30 пасажів, що більше характерно для клітинних ліній гризунів, наприклад, у випадку клітинної лінії рабдоміосаркоми [119] та ліній ембріональних фібробластів миші [120]. Каріотипічна еволюція клітинних ліній людини характеризується більш тривалим періодом становлення: необхідною вважається подолання клітинною лінією відмітки у 70 пасажів або культивування не менше року в лабораторії [19]. Каріотипічна еволюція клітинної лінії епітелію молочної залози людини НМТ-3522 тривала до 205 пасажів [121]. Для клітинних ліній, іморталізованих шляхом введення векторних конструкцій чи iPSC клітин, отриманих різними способами, ситуація

дещо спрощена: достатньою умовою визнання лінії іморталізованою вважається підтвердження експресії гена теломерази та/або доведення плюрипотетного статусу клітин [122, 123].

При становленні багатьох клітинних ліній на різних етапах їхньої каріотипічної еволюції утворюються унікальні перебудови та маркерні хромосоми [107, 121]. Постійна присутність спільних маркерів хромосом у клітинах пухлин і ліній, які походять від них та культивуються *in vitro*, наводить на думку, що вони задіяні у підтриманні певного пухлинного фенотипу [124,125], наприклад, у випадку злоякісних меланом людини [109, 126], і аденокарцином миші [127]. У клітинних лініях лабораторних тварин (миші, щура, китайського хом'ячка) також виявлені специфічні хромосомні зміни, які характерні для різноманітних неоплазій та зберігаються або виникають *de novo* при культивуванні клітин [31, 128, 129]. Таким чином, клітинні лінії можуть бути модельними системами для дослідження особливостей злоякісної трансформації клітин.

Однією із особливостей клітинних ліній миші є залучення практично всього геному в неопластичну еволюцію клітин *in vitro* [119, 130]. Наприклад, у гексаплоїдній лінії клітин миші виявлено 50-60 маркерних хромосом [131]. Загальним явищем для клітинних ліній мишей у культурі є мікрохромосоми – акроцентричні хромосоми, які менші за найдрібнішу 19-ту хромосому [124, 132]. С-забарвлення дозволяє виявити в них центромерну ДНК, тож мікрохромосоми можуть бути результатом розривів хромосом неподалік центромер [132]. Типовим для клітинних ліній мишей є утворення так званих робертсонівських транслокацій (РТ) внаслідок центромерного з'єднання двох акроцентричних хромосом [133].

Склалося таке уявлення, що для неопластичної трансформації клітинам людини необхідно набути значно більше генетичних змін, ніж клітинам гризунів. І, можливо, цим пояснюється різниця в прояві їхньої каріотипічної мінливості *in vitro*. Цей факт неодноразово відзначався, проте йому не надавалося чіткого пояснення. У роботі [11] визначено, що для онкогенного

переродження нормальних мишачих фібробластів достатньо порушення двох сигнальних шляхів, p53 і Raf, в той час як для фібробластів людини необхідне порушення шести сигнальних шляхів: p53, pRb, PP2A, регуляції теломерази, Raf, і Ral-GEFs. Виявлено також особливості неопластичної трансформації залежно від типу клітин: для іморталізованих фібробластів людини потрібна активація факторів Raf і Ral-GEFs, ембріональні клітини нирки потребують активації PI3K і Ral-GEFs, а епітеліальні клітини молочної залози - Raf, PI3K, і Ral-GEFs [11].

Дослідження ембріональних фібробластів щурів, спонтанно чи генетично трансформованих, показав, що на ранніх пасажах вони можуть мати як нормальний каріотип, так і набувати різних клональних хромосомних аберацій. А на більш пізніх пасажах інші хромосоми залучаються в нові перебудови. Незважаючи на чисельні хромосомні аномалії, фібробласти залишаються іморталізованими, але не набувають при цьому малігнізованого фенотипу [134].

При трансфекції нормальних фібробластів шкіри HSF4 плазмідною рSV3-нео клітинна культура стала іморталізованою та утворювала пухлини при трансплантації мишам. На ранніх пасажах культивування безпосередньо після іморталізації детектували багато випадкових аберацій, збалансованих перебудов t(2;4), t(2;14), t(3;?), 6p-, i(6p), 8p-, t(14;15), i(15), і t(18;?), стабільних при пасажуванні; і єдиною суттєвою втратою генетичного матеріалу була хромосома Y. Проте аналіз трьох зразків індукованих пухлин виявив більшу частку делецій хромосомного матеріалу, ніж збалансованих хромосомних перебудов. Серед них частими були делеції 6q і хромосом 13, 15, 20 та Y [135]. Отже, напрямок каріотипічної еволюції в значній мірі залежить від мікрооточення.

Доказом не випадкового характеру хромосомних перебудов в клітинах людини є різний розподіл точок розривів хромосом в клітинних лініях різного гістогенезу. Так, при утворенні 98 маркерів в 7 сублініях HeLa пошкоджуються переважно центромерні райони хромосом 1, 3 і 5, рідше – хромосом 7, 9 і 10. Звертає на себе увагу той факт, що хромосоми 8 і 11 фактично не беруть участі

в утворенні маркерів. Сублінія M-HeLa з модальним числом хромосом 49 характеризується появою 32-х маркерних хромосом і 16 унікальних перебудов, що демонструють не випадковий характер розривів хромосом, які виникали переважно в центромерних регіонах 3-ї і 5-ї хромосом [136].

У роботі, проведеній з використанням 73-х зразків базально-клітинної (ВСС) і 3-х зразків сквамозно-клітинної карциноми поряд із зміною морфології клітин в культурі, виявили наступні хромосомні аномалії: +6, +16, dup(2)(q37), del(3)(q13), dup(1)(p31) а також білятриплоїдність в деяких зразках, досліджених одразу. Частими точками розриву хромосом в культурі були: 1p36, 3q13, 9q22, 14p11, 15p11 і Xp11. 38% ВСС мали клональні хромосомні зміни, з них високу долю займали inv(9) і dup(9)(q11q21) як в зразках, приготованих одразу, так і після пасажування в культурі [137].

У роботі [138] повідомляється про нову клітинну лінію SH-2, ізольовану від пацієнта з гострою мієлоїдною лейкемією. Початково вона мала каріотип 45, X, -Y, der(16)t(16;17)(q24;q12), -17, +19. Під час пасажування частка клітин з гіподиплоїдним каріотипом поступово зменшувалась і була замінена клітинами з білятетраплоїдним каріотипом 71-105(86), XX, -Y, -Y, der(16)t(16;17)x2, -17, -17, +19, +19. Клітини SH-2 виявляли такі ж морфологічні, імунофенотипічні і цитогенетичні особливості, як і клітини лейкемії пацієнта, що підтверджує факт збереження унікальних хромосомних перебудов в ракових клітин *in vitro*, які протягом тривалого пасажування піддаються лише незначним змінам.

У дослідженні, проведеному на 5 клітинних лініях, отриманих із саркоми Евінгсона, у 4-х випадках виявляли типову для цієї пухлини транслокацію t(11;22)(q24;q12) [139], що теж доводить підтримання в культурі клітин хромосомних аберацій, характерних для певного виду пухлин, з яких було отримано клітинну лінію.

У роботі [140], проведеній на нейросферах та моношарових культурах, отриманих від пацієнтів з гліомами та медулобластомами, було визначено, що 82,0% чисельних і 82,4% структурних хромосомних аномалій підтримуються в подальшому в їхніх моношарових культурах. Серед цих змін частими були

дуплікації 18 і 7 хромосом і делеції 10/10q (5 із 16 моделей), ізохромосоми 17q розміром 2 MBs, і нова точка розриву 13q14 у 3х зразках гліоми.

При становленні нової лінії JH-3, отриманої із гострої мієлоїдної лейкемії, початковий каріотип містив 46 хромосом та del(7) (p1?3p2?2), але під час культивування каріотип був поступово замінений на 45,XY, з утворенням дицентричної хромосоми dic(4;7)(p11;p11) та нової делеції del(15)(q2?2) [141]. У роботі [142] повідомлено про отримання нової лінії SHI-1, що містить первинну транслокацію t(6;11)(q27;q23) і делецію del(17)(p11). Далі після культивування детектували також дериват 7 хромосоми внаслідок транслокації між 7-ю і 13-ю хромосомами, моносомію 18, а також t(6;11) і del (17)(p11).

У клітинній лінії множинної мієломи MC-B11/14 зберігається t(11;14), яка виявлена у пацієнта [109].

Наведені приклади яскраво ілюструють встановлену закономірність: при становленні клітинних ліній, отриманих з біоматеріалів онкологічних пацієнтів, клітини зберігають первинні типові для пухлин хромосомні аберації, а далі в процесі культивування накопичують інші аномалії, які можуть бути транслокаціями чи делеціями. Слід особливо наголосити на тому, що, як правило, вихідні типові для пухлин хромосомні перебудови при пасажуванні не елімінуються.

У більшості випадків походження маркерних хромосом вважається спонтанним, оскільки фактор індукції залишається невідомим. Проте деякі автори вказують на можливу роль мікоплазменної контамінації клітин в появі великого субтелоцентрика і акроцентриків [143]. Іншими авторами [144] було виявлено появу маркерної хромосоми у 18% м.п. в первинних культурах нирки ембріону людини, трансформованих онкорнавірусом. Накопичилось вже доволі багато відомостей про те, що більшість вірусів в клітинах ссавців спричиняють хромосомні розриви, які в деяких випадках приймають участь у подальших перебудовах та виникненні маркерних хромосом [145, 146, 147]. Для деяких онковірусів показано, що саме експресія ранніх вірусних генів в клітинах

савців є індуктором мутаційного процесу і появою здатності утворювати пухлини [21, 22].

Слід відзначити, що більшість цитогенетичних досліджень проведено з використанням попередньо іморталізованих клітинних ліній, що ускладнює розуміння первинних механізмів індукції каріотипічної еволюції та чіткого відмежування хромосомних перебудов, пов'язаних з адаптацією до умов культивування від ефекту, спричиненого зовнішнім чинником, особливо таким складним як вірус чи вірусний онкоген, який вводиться в клітини тим чи іншим способом.

При дослідженні стадій становлення ліній клітин савців на ранніх пасажах культивування дослідники спостерігали багато випадкових аберацій, але після іморталізації детектували, головним чином, забалансовані перебудови, стабільні при тривалому пасажуванні. Часто при тривалому культивуванні спостерігали поліплоїдизацію: частка клітин з гіподиплоїдним каріотипом поступово зменшувалась і заміщалась клітинами з приблизно триплоїдним чи тетраплоїдним каріотипом.

1.2.1.2. Маркерні хромосоми і хромосомні аберації, типові для ракових клітин в умовах організму. Поєднання сучасної цитології (в т.ч. із залученням імуногістохімії) та цитогенетики є потужним інструментом для диференційної діагностики більшості відомих форм раку, зокрема найчастіше поєднання цих двох методів застосовується для пухлин м'яких тканин, лімфом, мезотеліом, а також пухлин нирок та солідних пухлин. Зручним методичним підходом є застосування морфологічних препаратів для подальшого цитогенетичного дослідження; так, для FISH-методу є можливим використання звичайних цитологічних препаратів клітин, мазків та навіть фіксованих формаліном препаратів [148].

Після відкриття Філадельфійської хромосоми в 1960 році [149], що асоціюється з хронічною мієлоїдною лейкемією - $t(9;22)(q34;q11.2)$, яка характеризується злиттям генів *BCR1-ABL*, було знайдено також додаткові цитогенетичні аномалії, що використовуються не лише для постановки

діагнозу, а й для прогнозу перебігу захворювання та сприятливості терапії [150].

Частка клітин з хромосомними абераціями (ХА) в лімфоцитах периферійної крові є першим генотоксичним маркером, асоційованим з ризиком розвитку раку. В ході спостереження протягом 17-ти років за значними вибірками нордичної та італійської популяцій, була встановлена така закономірність: незалежно від віку, статі та країни з ризиком розвитку раку асоційовані як подвійні розриви ДНК, так і незначні первинні пошкодження, що ведуть до утворення хромосомних і хроматидних аберацій [151].

При використанні С-, G- та Q-технік забарвлення та NOR-Ag у 15 із 7 989 пацієнтів було виявлено маркерні хромосоми, 90% яких було ідентифіковано як ізохромосоми та 60% були дериватами 15-ої хромосоми. Комбінування диференційного забарвлення та FISH-методу дозволяє виявляти маркери у 83% випадків, а в інших - необхідне застосування чутливіших сучасних методів [152].

На теперішній момент накопичено величезний масив даних [153] за типовими хромосомними абераціями, які характеризують той чи інший вид раку та широко застосовуються в діагностиці. Наприклад, для гострої мієлоїдної лейкемії є типовими такі хромосомні аберації: del(5q) або моносомія 5-ї хромосоми, t(5;17)(q23;q12), t(6;9)(p23;q34); t(8;21)(q22;q22), t(9;11)(p22;q23); inv(16)(p13;q22), t(16;16)(p13;q22) чи del(16)(q22), та аномалії ділянки 11q23. Рідкісна транслокація t(16;21)(q24;q22) описана в деяких випадках гострої мієлоїдної лейкемії [154]. При В і Т-клітинній неоплазії характерні такі аномалії: +3, del(6q), t(8;14)(q24;q23), del(11)(q22), t(11;14)(q13;q23), t(11;18)(q21;q21), +12, del(13)(q14), t(14;18)(q23;q21), перебудови 14q32 та del(17)(p13) [153, 155].

Для більшості пухлин, особливо, при мієло- і лімфо-проліферативних захворюваннях саме транслокації є типовими хромосомними абераціями, що часто призводять до злиття певних генів [156]. У попередниках В клітин гострої лімфобластної лейкемії часто знаходять три різні транслокації, що

призводять до утворення злиття таких генів: *ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)*, *BCR-ABL1* та *TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)* [157].

Типовою для ліпобластоми є зміна ділянки 8q11-q12, що включає ключовий ген *PLAG1*, і це підтверджено також методами array і FISH. Більш рідкісним захворюванням є міксоїдна ліпосаркома з класичною перебудовою гена *DDIT3* в ділянці 12q13 [158]. У клітинах ліпоми та ліпосаркоми часто виявляють аберації, пов'язані з 12-ою хромосомою: її трисомію або дуплікацію ділянки 12q15-24, в якій містяться: ген *MDM2*, який є інгібітором p53, ген транскрипційного фактору *HMG2*, а також ген циклін-залежної кінази CDK4 [159].

Це стосується також сарком м'яких тканин, які є рідкісною формою пухлин (<1% всіх діагнозів), проте нараховують понад 100 гістологічних підтипів [160]. Наприклад, діагностичним маркером для злоякісної меланоми м'яких частин (світло-клітинної саркоми) є транслокація t(12;22) із злиттям генів *EWS* і *ATF-1* [161].

Зовсім інша ситуація – значна втрата генетичного матеріалу – спостерігається для більшості хромофобних карцином нирок: вони переважно мають екстремально гіподиплоїдний каріотип, що містить 31 – 37 хромосом, з типовими моносоміями 1, 2, 6, 10, 13, 17, та 21 хромосом [153].

У більшості випадків наявні первинні аберації, що роблять внесок у виникнення пухлин, та вторинні зміни, які набуті протягом клональної еволюції [162, 163]. Характерна для пухлин *in vivo* каріотипічна гетерогенність зумовлена також тим, що пухлина може мати не тільки моноклональне, а і поліклональне походження, тобто виникає з каріотипічно різних клонів клітин [164, 165, 166], які під впливом мікрооточення можуть проходити подальшу селекцію з відбором більш пристосованих і, як правило, більш злоякісних клонів.

Ракові геноми є складними, і несуть тисячі генних і хромосомних мутацій, включаючи заміни пар нуклеотидів, інсерції і дуплікації, делеції, транслокації, що зачіпають різні типи генів, в тому числі і регуляторні.

Наприклад, при отриманні сублінії карциноми гортані Her-2, стійкої до хіміопрепаратів, за допомогою генетичних чіпів було виявлено 1210 генів, експресія яких змінювалась порівняно з вихідною лінією. Серед них визначено найімовірніші гени, що асоційовані з резистентністю: *Cyclin D*, *IGF-BP3*, *CASP9*, *CDK4/6* [167].

У недавній роботі [168] було проведено масштабне дослідження CNVs за допомогою Affymetrix SNP 6.0 arrays з бази Cancer Genome Atlas (TCGA), яке включало зразки різних типів раку: 351 зразок мозку, 336 - молочної залози, 342 - товстого кишечника, 370 - нирок та 314 зразків раку яєчників, а також 3 000 контрольних зразків використано для порівняння. В результаті визначено 39 локусів як потенційних кандидатів ризику розвитку раку. Більшість з них знаходилась в некодуючих послідовностях, проте деякі накладались на відомі онкогени, включаючи *RET* - для раку мозку, *ERBB2* - для раку нирок, і *DCC* - для раку яєчників.

Проте для діагностики залишаються актуальними і хромосомні перебудови, деякі з яких є специфічними для певних онкологічних захворювань. Масиви цих даних накопичувались роками. Нині робляться спроби створити каталоги генетичних змін при різних видах раку, проте, на жаль, не зазначається порядок, в якому ці зміни виникали. У роботі [169] автори намагались надати математичне вирішення даної проблеми для ідентифікації хронології виникнення та накопичення хромосомних мутацій, проте даний підхід виявився досить складним, і може викликати суперечності в інтерпретації даних різних дослідників.

1.2.1.3. Втрата статевих хромосом як найтипівіша ознака каріотипічної мінливості клітин в онтогенезі і при культивуванні. Втрату статевих хромосом спостерігають як у пацієнтів похилого віку, так і при гематологічній онкології, а також і при культивуванні клітин.

Втрата статевих хромосом у зразках кісткового мозку була визначена у 5,1% випадків; і в 1,8% випадків вона була єдиною хромосомною аномалією (цікаво відзначити, що при цьому всі пацієнти були чоловіками). Відмічено

кореляцію втрати статевих хромосом із гострою мієлоїдною лейкемією у 9,5% випадків та множинною мієломою - у 13% випадків [170]. Кореляція втрати У хромосоми з онкогематологічними захворюваннями підтверджується також даними інших авторів [171,172].

В одній з останніх робіт [173] наводяться дані про асоціацію втрати У хромосоми з хворобою Альцгеймера. А в статті [174] автори відзначають втрату У хромосоми в периферійній крові пацієнтів з раком товстого кишечника та простати і висловлюють гіпотезу, що саме втрата У хромосоми, а не вік, є важливим прогностичним маркером. Інший автор [175] теж рекомендує застосовувати мозаїчну втрату У хромосоми у периферійній крові як фактор ризику канцерогенезу.

Проте інші автори наводили приклади кореляції втрати статевих хромосом із віком пацієнтів дослідної групи [176, 177]. Показано підвищення частоти нерозходження хромосом із віком, що була більшою, ніж частка клітин з мікроядрами [178]. Цікаво, що нерозходження хромосом вдвічі частіше зустрічалось у жінок.

При аналізі 25 зразків культур хондроцитів за допомогою методів агау CGH і FISH було виявлено варіативну втрату матеріалу У хромосоми [179]. Добре відомо, що дві третини матеріалу У хромосоми представлені гетерохроматином, і загальна кількість генів, локалізованих в цій хромосомі, незначна. Присутні саме ті гени, що відповідають за визначення статі та У-антиген гістосумісності, а також за процеси сперматогенезу [180]. Отже, можна зробити висновок, що для клітин у культурі втрата цих генів не є критичною, і саме тому статева хромосома елімінується.

Здебільшого Х хромосоми в культивованих клітинах деяких тварин теж представлені гетерохроматином, наприклад, довге плече Х-хромосоми китайського хом'ячка [181]. Клітини інших ссавців у культурі також зазнають втрати статевих хромосом: моносомія Х хромосоми була єдиною цитогенетичною аберацією при аналізі В-клітинної лімфоми собаки [182].

Цікаво, що X-моносомія є типовою хромосомною аберацією для гемопоетичних злоякісних пухлин людини [183].

Таким чином, аналіз літератури свідчить про те, що втрата X чи Y хромосоми – закономірне явище в процесі тривалого культивування ліній клітин людини і тварин різного походження, причому це може відбуватись як на ранніх, так і на пізніх пасажах [31, 179, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190].

Слід відзначити, що в першу чергу втрачається неактивна X хромосома [191]. На основі цих даних, можна зробити припущення, що клітини, які втратили X чи Y хромосому з великими блоками гетерохроматину і генами, які не суттєві для життєдіяльності клітин в культурі, можуть отримати проліферативну перевагу порівняно з вихідними клітинами, що мають повний набір статевих хромосом.

Таким чином, у даному підрозділі розглянуто найтипівіші зміни каріотипу, що виникають в умовах організму і при культивуванні іморталізованих клітинних ліній, отриманих із нормальних і ракових тканин ссавців. Закономірності каріотипічної еволюції, встановлені, головним чином, на прикладі клітинних ліній гризунів та ракових і іморталізованих різними методами клітинних ліній людини. Наведені приклади яскраво ілюструють наступне: при становленні клітинних ліній, отриманих з біоматеріалів онкологічних пацієнтів, клітини, як правило, зберігають типові для пухлин хромосомні перебудови, а далі в процесі культивування накопичують вторинні аберації, які можуть бути втратами статевих хромосом, транслокаціями, делеціями та ін. Слід особливо наголосити на тому, що, як правило, вихідні типові для пухлин хромосомні перебудови при пасажуванні клітинних популяцій не елімінуються, а зберігаються. Тож вони, крім злоякісної трансформації, ймовірно, надають адаптивні переваги клітинам, що культивуються. Слід відзначити, що пухлинні клітини мають певну схожість (іморталізація, втрата контактного інгібування, здатність до пухлиноутворення) з плюрипотентними стовбуровими клітинами ембріонального походження, а також iPSC, отриманими методами перепрограмування.

1.2.2. Каріотипічні зміни у лініях стовбурових клітин при культивуванні *in vitro*.

1.2.2.1. Каріотипічна еволюція ЕСК, ЕГК та МСК в культурі.

Незважаючи на сучасні розробки 3-D-носіїв, фідерів та нових компонентів для поживного середовища, умови культивування *in vitro* принципово відрізняються від внутрішнього середовища організму. Тому процес адаптації клітин до спрощених умов існування в культурі впливає на експресію багатьох генів, а це, в свою чергу, ймовірно, призводить до індукції різноманітних мутацій та перебудов геному, тобто до каріотипічної еволюції [192, 193]. На відміну від спонтанної та індукованої вірусами або онкогенами різного походження іморталізації диференційованих клітин в культурі, для ЕСК та ЕГК *a priori* притаманна здатність до необмеженого розмноження *in vitro*. Тож на їх прикладі можна проаналізувати каріотипічну еволюцію, що обумовлена саме пристосуванням до спрощених умов культивування без зовнішньої індукції іморталізованого стану клітин. Тобто дослідити саме те явище, що визначено у працях деяких дослідників як «адаптація культури клітин» [31, 106, 194].

Перше повідомлення про зміну каріотипу ембріональних стовбурових клітин людини (ЕСК) при довготривалому пасажуванні з'явилося в 2004 р. із лабораторії Дж. Томсона, тобто тільки через 6 років після отримання першої постійної лінії ЕСК людини [195]. Колектив дослідників спостерігав дуплікації довгого плеча 17-ї і 12-ї хромосом. Як виявилось, тривале культивування стовбурових клітин *in vitro* призводить до збільшення розмірів клітин, зменшення кількості поділів, скорочення теломер, генетичних та епігенетичних змін [193]. На відміну від ЕСК у МСК, отриманих з пуповинної крові, при культивуванні до 25-го пасажу не спостерігалось змін каріотипу при диференційному забарвленні хромосом [196].

У подальших дослідженнях було підтверджено, що ЕСК і ЕГК чутливі до стресових умов культивування і часто набувають генетичних та епігенетичних змін *in vitro* [192, 195, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205]. Збереження

нормального каріотипу окремих ліній ЕСК спостерігали до 22 пасажу [197]. Однак, чим довше культивували ЕСК, тим більше накопичувалось мутацій, в тому числі таких, що характерні для злоякісного переродження [192]. В роботі [206] понад 70% ЕСК стають анеуплоїдними до 25 пасажу. В інших дослідженнях теж показано аналогічні зміни каріотипу при тривалому культивуванні ЕСК [192, 195, 199, 207]. Тож риси, характерні для каріотипічної еволюції злоякісно трансформованих клітин виявляються лише при тривалому культивуванні.

Слід відзначити, що анеуплоїдія, спричинена тривалим культивуванням ліній ЕСК, відбувалась у специфічних хромосомних локусах. Наприклад, ЕСК миші часто мають трисомію хромосоми 8 [208], а ЕСК людини – трисомії хромосоми 17 і 12 [195]. Набуті каріотипічні зміни, ймовірно, надають ростових переваг *in vitro*, проте вони можуть бути спільною причиною втрати поліпотентного потенціалу стовбуровими клітинами [198]. Зокрема, виявлені різними дослідниками трисомії, пов'язані з тим фактом, що хромосома 8 [209, 210] та хромосома 11 [208, 211] містять гени, які відповідальні за передачу сигналу від фактору LIF [207, 212].

Особливістю культивування ЕСК людини є контамінація більшості клітинних ліній продуктами тваринного походження внаслідок використання мітотично неактивних клітин гризунів як фідерів [19, 203]. Оскільки клітини з чужорідними білками здатні спричиняти імунну відповідь при трансплантації пацієнтам, для практичного використання в клітинній терапії ЕСК вирощують без фідера [213, 214]. Однак у таких спрощених умовах спостерігають зміни копійності окремих хромосом (анеуплоїдію). Так, при аналізі трьох ліній ЕСК показано, що після переведення в умови культивування без фідеру одна з них набувала додаткової хромосоми 12, і частка таких клітин поступово підвищувалась до 89%, а в іншій лінії спостерігалась трисомія 14-ї хромосоми приблизно на однаковому рівні (15-36%) впродовж культивування. А от третя клітинна лінія, яка досить довго (185-ти пасажів) культивувалась на фідері, а потім культивувалась без фідеру протягом 30-ти пасажів, не мала структурних

чи чисельних хромосомних аберацій [215]. Однак останній факт вступає у протиріччя з даними інших авторів. Слід зазначити, що вказані автори [215] в середньому проводили аналіз 20-25 метафазних пластинок, що недостатньо для виявлення аберацій, які є мозаїчними. А більшість клітинних ліній, як відомо, є популяціями гетерогенних клітин.

У роботі [216] при каріотипуванні трьох ліній ЕСК людини (HS364 на 23-му пасажі, HS366 на 40-му пасажі та HS368 на 21-му пасажі) не було виявлено аберацій. Проте при застосуванні матричної порівняльної геномної гібридизації array CGH високої роздільної здатності SNP 6.0 виявлено такі зміни: для лінії HS364 - 9 варіацій по хромосомам 1,4, 8, 12, 14-16, 22 і X із загальним розміром 3.7Mb, для лінії HS366 - 6 аберацій хромосом 3, 8, 11, 14, 17 і X із сумарним розміром 835 kb, а для лінії HS 368 - 10 варіацій по хромосомам 1-3, 8, 9, 13, 16,17,21, X і Y розміром 3Mb. При аналізі тератом, які були сформовані у імунodefіцитних мишах даними клітинами, несподіваним фактом стало те, що клітини, які культивувались *in vivo*, мали навіть ширший спектр мутацій (в середньому, на 30 %), ніж вихідна популяція [216]. На нашу думку, можна запропонувати таке пояснення даного факту: трансплантація культивованих клітин у нове мікрооточення ксеногенного організму стала чинником дизруптивного або рушійного добору, що і призвело до нового витка каріотипічної еволюції. Це дослідження демонструє важливість моніторингу наслідків трансплантації ЕСК в організм та необхідність їхньої попередньої диференціації для усунення здатності утворювати пухлини.

Гени, що в нормі активні під час ембріонального розвитку, проте мало експресуються чи відсутні в дорослих тканинах і вторинно активуються при онкогенезі, отримали назву онко-фетальних [217], серед них відомі Survivin, OCT4, NANOG і SOX2 [12, 218, 219, 220, 221, 222].

Хромосомні аномалії ЕСК, що спостерігаються під час адаптації до умов культивування, нагадують аномалії каріотипу у пухлинах ембріональних гермінативних клітин [223, 224, 225]. Найчастішими спільними абераціями виявились дуплікації хромосоми 12 (часто як ізохромосоми) [226, 227, 228] і

хромосоми 17 [194, 195, 229]. Отже, виникло припущення, що адаптація ЕСК до умов культивування може повторювати напрям злякисної трансформації гермінативних клітин в тератокарциномах [230]. Так, пухлини, які походили від ЕСК зі зміненим каріотипом та адаптованих до умов культури, були менш диференційованими та мали агресивніший фенотип, ніж пухлини, що були отримані з диплоїдних ЕСК, які ще не встигли пройти період адаптації [230, 231, 232].

Для ліній ЕСК, як і для постійних ліній, що розглядались в попередньому підрозділі, характерна втрата статевих хромосом при культивуванні. У популяціях стовбурових клітин ссавців різного походження при тривалому культивуванні часто спостерігали інактивіацію Х хромосоми, мікрделеції та зміни копійності генів [192, 233]. Проте хромосомні аберації та анеуплоїдія, що виникали при адаптації клітин до умов культивування, не завжди асоціювались із їхньою здатністю до онкогенної трансформації [234].

В недавній роботі автори [235], досліджуючи 23 плюрипотентні стовбурові клітинні лінії, визначили два механізми, що відповідальні за неправильну картину інактивіації Х хромосоми: 1) швидка втрата гістону H3 при метилуванні в позиції 27-го лізину, а також 2) втрата експресії транскрипту XIST (X-inactive specific transcript) у культурі. Проте цікаво, що втрата маркерів метилування, відповідальних за інактивіацію Х хромосоми в організмі, не супроводжувалась реактивацією Х хромосоми в культурі. Даний факт автори пояснили тим, що, незважаючи на втрату специфічних маркерів метилування, воно виникало *de novo*.

Найближчими за диференціувальним потенціалом до ЕСК та ЕГК є мультипотентні тканиноспецифічні СК, особливо МСК, але вони принципово відрізняються від перших вираженим процесом старіння, відсутністю іморталізованого стану і здатності утворювати пухлини [48-51, 236-239]. Наприклад, у роботі [240] автори повідомили про стовбурові клітинні лінії, отримані із молочних та постійних зубів, які культивувались більше 60 подвоєнь популяції і зазначили, що клітини зберігали нормальний каріотип і

залишались генетично стабільними, хоча останнє твердження викликає певні сумніви. Автори спостерігали подовження часу подвоєння популяції від 12-50 годин для перших сорока генерацій популяції до 60-90 годин для наступних пізніших пасажів, що свідчить про зниження проліферативної активності і може бути ознакою старіння популяції по мірі досягнення ліміту Хейфліка.

МСК, отримані з кісткового мозку, лише на ранніх пасажах (3-4) були генетично стабільними та зберігали проліферативний потенціал, але вже на 6-7-му пасажах розмножувались повільніше та змінювали морфологію. Було виявлено значну зміну експресії 13 генів та 33 міРНК, і функціональний аналіз показав їхню асоціацію зі старінням [241]. Повідомляється про зростання експресії деацетилази гістонів та кореляцію зниження рівня ацетилювання гістонів H3/H4 та експресії Oct4 в культурі МСК, отриманих із плаценти [242]. Існують відомості про CpG острівці, метилування яких асоційоване зі старінням МСК *in vitro* [243, 244]. Тож при дослідженні стовбурових клітин, в яких не працює програма «імморталізації», каріотипічна еволюція як така, ймовірно, не реалізується, хоча можна спостерігати окремі хромосомні аномалії при розмноженні клітин в умовах культури та організму.

Таким чином, в процесі адаптації до умов *in vitro* нових ліній ембріональних стовбурових і ембріональних гермінативних клітин також спостерігаються значні зміни всього клітинного геному, які характеризуються не лише зміною епігенетичних міток, а й мутаціями різного рівня та перебудовами хромосомного апарату. Незважаючи на більшу стабільність хромосомного апарату на ранніх пасажах і знижений рівень мутагенезу у порівнянні із злоякісно трансформованими та інфікованими клітинами, ЕСК та ЕГК ссавців при культивуванні виявляють схожі риси перебудов хромосомного апарату (втрата статевих хромосом, анеуплоїдія, аберації певних хромосом та ін.). В літературі існують суперечності щодо кількості пасажів культивування, на яких з'являються зміни каріотипу і терміну, протягом якого клітинні лінії залишаються генетично стабільними.

1.2.2.2. Каріотипічні зміни iPSC в процесі перепрограмування та культивування. Робіт, присвячених каріотипічній еволюції iPSC, одержаних введенням рекомбінантних векторних конструкцій, зовсім небагато. А стосовно еволюції каріотипу iPSC, одержаних обробкою білковими комплексами, ми взагалі не знайшли відомостей в доступній літературі. Аналіз цілісності геному iPSC показав як мутації певних нуклеотидів, так і формування аберацій по окремим хромосомам, наприклад, трисомії. Крім того, також спостерігали коливання довжини теломер та зміни мітохондріальної ДНК. Деякі мутації інколи були присутніми в клітинах-засновниках популяції, а деякі були наслідком культивування, однак важливо підкреслити, що значна частина мутаційних пошкоджень виникала саме в процесі двустадійного перепрограмування [25, 245].

Зовсім мало даних стосовно динаміки змін каріотипу на різних стадіях становлення ліній iPSC. У різних дослідженнях вказується, що від 12,5% до 34% iPSC набувають з часом хромосомних аномалій, частота яких зростає в процесі пасажування. При адаптації до умов культури в лініях iPSC виникають не випадкові генетичні зміни, що надають переваги для розмноження. Найчастіше в аберації залучені хромосоми 1, 12, 17 і 20, тобто є схожість з популяціями клітин ЕСК та ЕГК. Вважають, що дослідження еволюції геному iPSC допоможе наблизитись до розуміння багатостадійного процесу онкогенної трансформації клітин [246].

Нині зустрічаються лише поодинокі дані, отримані на iPSC тварин. Так, в iPSC свиней, отриманих за допомогою векторних конструкцій, виявили аберації при пасажуванні: на 15-му пасажі 83% клітин мали нормальний каріотип (38 хромосом), а на 73-му пасажі 87 % клітин мали 39 хромосом в наборі з трисомією 10-ї хромосоми та делецією довгих плечей 6-ї і 9-ї хромосом [247]. Автори також намагались отримати iPSC за допомогою неінтегративного підходу з використанням вірусу Сендай, проте даний метод призводив до великої кількості розривів ДНК під час S фази. У другому підході серед двох

ліній, обраних для аналізу, одна зберігала нормальний каріотип до 65-го пасажу, інша – мала 7% аберантних метафаз вже на 30-му пасажі [247].

Анеуплоїдію часто асоціюють з клітинною трансформацією, проте кілька типів клітин, в тому числі гепатоцити, часто є анеуплоїдними в нормальній тканині печінки в організмі. Автори роботи [248] висунули припущення, що динамічні зміни каріотипу гепатоцитів роблять популяцію генетично різноманітною, і це може сприяти адаптивній відповіді печінки на різні вражаючі чинники. Тому вони перевірили здатність iPSC людини, що мали хромосомні аберації, диференціюватись в гепатоцити. Було отримано лінію iPSC за допомогою трансфекції плазмідною з генами *Oct 4*, *Nanog*, *Lin 28* і *Klf4*. Один із субклонів даної лінії демонстрував значну анеуплоїдію. Цікавим було також те, що більшість клітин даної популяції були тетраплоїдними, проте мали 5 копій хромосом 12-ї пари, а також перебудови 17-хромосоми, які, як вважають, надають переваги для розмноження клітин в культурі. При цьому втрата нормального каріотипу не впливала на здатність клітин диференціюватись в гепатоцити. Ці результати є дійсно важливими для практики, проте - автори не проводили тест на здатність таких клітин індукувати пухлини в організмі імунно-дефіцитних мишей [248].

Для практичного використання є не менш важливим прослідкувати, чи не набули iPSC небажаних генетичних змін ще до процесу перепрограмування. З амніотичних клітин, що містили точкову мутації гену β -гемоглобіну, було отримано лінію iPSC з корегованим геном за допомогою нуклеази з цинковими пальцями та Cre-рекомбінази. Застосовуючи порівняльну геномну гібридизацію та повно-геномне секвенування, було виявлено 7 варіацій копійності генів, 5 малих інсерцій/делецій і 64 заміни нуклеотидів в iPSC до етапу корегування гену та одиночну варіацію копійності генів, 19 інсерцій/делецій і 340 замін нуклеотидів в iPSC, які вже мали корегований ген [249]. Інші автори виявили, що в iPSC багато генів-онкосупресорів є гіперметильованими і, відповідно, неактивними [77]. Ці дані свідчать про необхідність подальших ретельних досліджень змін геному, що супроводжують

процес перепрограмування та ставлять питання стосовно можливості використання таких клітин у клініці.

1.2.2.3. Порівняння каріотипічних змін при культивуванні iPSC і EСК. В цілому ряді робіт автори наголошують на необхідності ретельного моніторингу каріотипу iPSC та EСК, що плануються для застосування в клітинній терапії, за допомогою методів з високою роздільною здатністю – array SNP, з подальшим вивченням еволюції геному з метою вирізнання незначних генетичних змін, якими можна знехтувати, від таких, що здатні провокувати прогресію пухлин [250]. Слід враховувати, що на відміну від EСК, досліджені індуковані плюрипотентні стовбурові клітини є генно-модифікованими, так як отримані перепрограмуванням дорослих диференційованих клітин рекомбінантними векторними конструкціями, які, до того ж, можуть бути індукторами мутагенезу.

Молекулярним підґрунтям іморталізованого стану і здатності EСК і iPSC утворювати пухлини є те, що вони в нормі мають низку характеристик, які асоціюються з раковими клітинами: швидка проліферація, іморталізація, висока активність теломерази, зменшення контактного інгібування та здатність індукувати ангиогенез [12 -14, 16, 232, 251, 252]. Частково це пояснюється тим, що гени Oct4, Sox2, Nanog, які є маркерами EСК, і також використовуються у рекомбінантних конструкціях для перепрограмування нормальних соматичних клітин в iPSC, вторинно активуються у ракових клітинах [218, 219, 221, 222]. До того ж, в iPSC спостерігається виключення генів-онкосупресорів, що може підсилювати пухлиноутворювальну здатність.

При SNP-аналізі 186 ліній індукованих плюрипотентних стовбурових клітин та 119 ліній ембріональних стовбурових клітин було виявлено більшу кількість дуплікацій в EСК, а делецій – в iPSC. При цьому тривалість процесу перепрограмування диференційованих клітин в iPSC асоціювалась із втратою генів-онкосупресорів, а тривалість культивування EСК – із дуплікацією онкогенів. Також спостерігали дуплікації в процесі диференціації стовбурових клітин [253]. Застосовуючи мета-аналіз, який охоплював 66 ліній iPSC та 38

ліній ЕСК, встановлено, що значна кількість клітинних ліній містила хромосомні аберації. Частина з цих аномалій виникла внаслідок адаптації до умов культури, хоча деякі з них могли вже бути наявними у популяціях вихідних клітин.

Слід відзначити, що інколи анеуплоїдія спостерігалась вже на ранніх пасажах іPSC, що пояснюють значним селективним пресингом під час перепрограмування. Аналіз дозволив виявити часту дуплікацію 12-ї хромосоми, що призводить до збільшення дози генів-регуляторів клітинного циклу. Внаслідок активної проліферації іPSC може зменшуватись їхня здатність до диференціації та підвищуватись онкогенність [254].

Інші автори [255], досліджуючи каріотип 2-х ліній іPSC та 3-х ліній ЕСК, виявили, що зі збільшенням кількості пасажів має місце тенденція до зростання частки анеуплоїдних клітин як в популяції ЕСК, так і іPSC: максимальне значення 5,5 % на 67-му пасажі в лінії іPSC C2 та 7,5 % в одній із ліній ЕСК на 103-му пасажі. Частка моносомій хромосом була вищою, ніж трисомій. За допомогою array CGH виявили $\text{amp}(1)(\text{q}21\text{qter})$ в лінії іPSC C3 на 55-му пасажі, а лінія іPSC C2 зберігала нормальний каріотип до 47-пасажу (далі дослідження не проводили). Лінія ESCI4 мала $\text{amp}(1)(\text{q}21\text{q}32)$ на 59-му та 90-му пасажах, але на останньому з'явилась ще й $\text{amp}(1)(\text{p}32\text{p}34.1)$. Додатковий сегмент короткого плеча 2-ї хромосоми на 98-му пасажі був виявлений диференційним забарвленням. Відмічали також значний мозаїцизм усіх клітинних популяцій [255]. Це підтверджує відому думку про те, що клітинній популяції вигідно зберігати генетично різні клони клітин для кращого виживання при зміні умов існування.

Існують дані про трансфер мітохондріальної ДНК до ядра в іPSC, що також спостерігається і в ЕСК. За допомогою гібридизації *in situ* та 2D гелелектрофорезу виявлено, що значна частина акумульованої ДНК є позахромосомною. Цікаво, що в процесі диференціювання рівень мтДНК в ядрі суттєво знижувався, а даний факт може свідчити про новий механізм регуляції статусу клітин [256].

Цікавим фактом з приводу генетичної нестабільності iPSC є їхня більша чутливість до йонізуючої радіації порівняно з ЕСК. Лінія 3FB4-1 індукованих плюрипотентних стовбурових клітин демонструвала меншу здатність до репарації ДНК, ніж вихідна лінія мишачих фібробластів MEF. Повно-геномний сіквенс показав також більше точкових мутацій у 3FB4-1, і вони розповсюджувались на всі хромосоми. Зменшена можливість репарації ДНК може свідчити про радіочутливість iPSC і має бути врахована в клініці [257]. Дослідження, проведене незалежною групою авторів, підтверджує більшу чутливість iPSC до радіації, а також до індуктора мутацій N-метил-N-нітроуридина. Клітини новонароджених і дорослі стромальні клітини не виявили значних морфологічних змін при обробці йонізуючою радіацією (1 Грей) або хімічним агентом MNU (1mM). На відміну від диференційованих клітин, iPSC виявили чутливість до дії радіації, при цьому велика частка клітин втрачала адгезивну здатність [258]. Показано також втрату активності системи ексцизійної репарації неспарених основ протягом культивування ЕСК. Частка мутацій, індукованих йонізуючою радіацією, в ЕСК, адаптованих до умов культури, перевищувала частку мутацій в неадаптованих ЕСК та диференційованих клітинах [257].

Таким чином, аналіз літератури свідчить про те, що при становленні іморталізованих клітинних ліній різного походження (ракові, трансформовані вірусами та онкогенами, ембріональні стовбурові та ембріональні гермінативні стовбурові клітини) виявляються схожі закономірності каріотипічної еволюції: не випадковий характер кількісних і структурних змін хромосом, втрата однієї із статевих хромосом, подібно до тих змін, які спостерігаються в пухлинах *in vivo*. Маркерні хромосоми, типові для певного виду пухлини, зберігаються у клітинних лініях, які від них походять. Як правило, вони забезпечують активну проліферацію, знижену чутливість до сигналів апоптозу, втрату контактного інгібування, тож можуть надавати селективну перевагу клітинам при культивуванні. В той же час значна кількість хромосомних перебудов є

специфічними для конкретних стабільних клітинних ліній, що пояснюється наступним: вихідна популяція клітин із наявними в ній первинними хромосомними абераціями в процесі культивування проходить етап становлення каріотипічної еволюції, напрям якої визначається мікрооточенням з відбором найбільш пристосованих клонів та формуванням вторинних аберацій. Клітинні лінії *in vitro* є гетерогенними популяціями, проте на етапі стабілізації каріотипічної еволюції вони характеризуються наявністю вираженого модального класу чисел хромосом та стабільністю каріотипу в культурі. Існують розбіжності в літературі до якого пасажу культивування клітини в культурі не набувають генетичних змін, що пов'язано як з роздільною здатністю методів, використаних для оцінки, так і з тим, що кожна клітинна лінія є унікальною.

Узагальнюючи літературні дані всіх попередніх підрозділів, можна зробити ще один важливий висновок: каріотипічна еволюція як така має місце лише в популяціях постійних клітинних ліній, тобто для її реалізації необхідне включення і підтримка програми «іморталізації», яка характерна для злоякісних клітин, а в нормі підтримується в плюрипотентних стовбурових клітинах: ЕСК та ЕГК. При цьому, як вже відзначалось, для нормальних диференційованих клітин людини і, навіть для мультипотентних стовбурових клітин людини, на відміну від клітин гризунів, не характерна спонтанна іморталізація в культурі. З метою іморталізації використовують обробку вірусами, векторними системами з генами теломерази, онкогенами та онко-фетальними генами – що призводить до зміни експресії генів, інсерційних мутацій, розривів ДНК з подальшим утворенням хромосомних аберацій – таким чином, стає неможливо відмежувати хромосомні зміни, які виникли внаслідок адаптації клітин до умов культивування від тих, що зумовлені індуктором іморталізації.

Порівняно із злоякісно трансформованими і стовбуровими клітинними лініями ембріонального походження, динаміка змін каріотипу в іPSC, залишається недостатньо дослідженою. Наразі йде процес накопичення експериментальних даних з використанням клітин людини і тварин. Одержані

поодинокі дані свідчать про те, що є схожі не випадкові хромосомні перебудови при тривалому культивуванні ESK та iPSC. При цьому спектр генетичних змін для цих типів плюрипотентних стовбурових клітин дещо відрізняється: в ESK переважають дуплікації онкогенів, а в iPSC – делеції генів-онкосупресорів, що може бути причиною підвищеної онкогенної здатності. Деякі дослідники вважають, що індуковані генетичні зміни в iPSC пов'язані зі значним селективним пресингом факторів перепрограмування.

На сьогодні в доступній літературі відсутні дані стосовно еволюції каріотипу постійних ліній стовбурових клітин дорослої людини, отриманих під впливом композицій ростових факторів і цитокінів. Дослідженню саме цього останнього питання ми і присвятили дану дисертаційну роботу.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Клітинні лінії та умови культивування

2.1.1. Отримання клітинних ліній

У відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України було отримано низку первинних культур та постійних клітинних ліній миші і людини з використанням зразків шкіри людини, периферійної і пуповинної крові здорових донорів та ембріональних клітин миші та людини. Основною метою було отримання іморталізованих ліній клітин людини і відпрацювання умов, що необхідні для цього, при використанні тканин ссавців різного походження. Зразки дорослих і ембріональних тканин люб'язно надані Київським центром термальних опіків і пластичної хірургії при міській лікарні № 2, фірмою «Ембріотек» та Інститутом клітинної терапії. За допомогою стандартних методів із зразків ембріональних та дорослих тканин отримували культури первинних клітин [43], а із зразків крові – лейкомасу. Первинні ембріональні фібробласти культивували з метою отримання спонтанно іморталізованих клітинних ліній, однак всі клітинні популяції виявились переживаючими, і витримували культивування в умовах стандартної моношарової культури не більше 30-50 пасажів. А далі спостерігались старіння і загибель клітин.

Із пуповинної крові, люб'язно наданої Інститутом клітинної терапії, було отримано клітинну лінію СВ-1 (скорочено від Cord Blood), яка культивується вже понад 50 пасажів без ознак кризи та клітинного старіння та є потенційно іморталізованою.

Основний об'єкт дослідження, клітинну лінію 4BL (скорочено від Blood Line) було отримано із периферійної крові анонімного здорового дорослого донора. Лейкомасу первинних клітин, отриманих центрифугуванням з

донорського матеріалу, переносили на фідер із фібробластів дорослої людини лінії A 102, яка люб'язно надана в наше розпорядження професором Мак-Корміком, США. Клітини фідеру були мітотично інактивовані за допомогою мітоміцину С в концентрації 20 мкг/мл. Клітини культури 4BL, поміщених на фідер, культивували в спеціальному ростовому середовищі DMEM з доданням суміші цитокінів LIF, SCF та IL-3 по 2 нг/мл кожного і 30% середовища, кондиціонованого ембріональними гермінативними клітинами людини. Також додавали 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 10% ЕТС (ембріональної телячої сироватки). Протягом перших 5 пасажів клітини 4BL культивували в спеціальному середовищі на фідері. Для подальшого пасажування серед колоній клітин відбирали такі, що швидко росли, та піпеткою обережно переносили їх в умови стандартної моношарової культури без додання рекомбінантних цитокінів і кондиціонованого середовища. Один із клонів дав початок клітинній лінії 4BL, яка успішно пододала ліміт Хейфліка без ознак кризи і зміни морфології та культивується вже понад 220 пасажів.

Окрім оригінальної клітинної лінії 4BL, було отримано її клони C11, C12 та C13 з популяцій клітин ранніх пасажів, які зазнали дії температурного шоку. Дані клони зберігаються в рідкому азоті клітинного банку Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького.

Для порівняння та контролів використовували стандартні клітинні лінії: Нер-2 (карцинома гортані людини), 293 або НЕК-293 (лінія ембріональної нирки людини, трансформована аденовірусом) та U937(гістіоцитна лімфома). Всі клітинні лінії, як стандартні, так і отримані у нашій лабораторії, культивувались в однакових стандартних умовах: середовище DMEM з 10% ЕТС з доданням 100 ОД/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину в герметично закритих скляних флаконах при 37°C або в чашках Петрі чи планшетах при 37°C та 5% CO₂.

2.1.2. Кріоконсервація. Клітини, заморожені у ростовому середовищі DMEM із доданням 10% диметилсульфоксиду (ДМСО) і 45 % ЕТС зберігаються на – 80 ° С для нетривалого використання та у рідкому азоті для

тривалого зберігання в кріобанку Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України.

2.2. Обладнання

При виконанні цієї роботи використано прилади і обладнання таких марок та виробників: термостат ТС-80 (Україна), CO₂ інкубатор IGO-150 "Cell Life", Jouan (Франція), центрифуги ОПН (СРСР), MiniSpin (Eppendorf, Німеччина), Eppendorf 5417R, спектрофотометри Specord та Specoll-11, "Titerteck" (Велика Британія), рН-метр EB-74 (Білорусія), ваги Acculab та ВЛТК-500 (Україна), автоматичні піпетки та дозатори "Labsystems" (Фінляндія), "Gilson" (Франція), камера для горизонтального електрофорезу multiSUB Choice "Cleaver Scientific Ltd" (США), прилад для напівсухого перенесення CSL Semi Dry Mini System "Cleaver Scientific Ltd" (США), джерела струму Stuart Scientific SI50 та MP300-N (MS, США), Molecular Imager Chemi Doc XRS+ Image Lab (Bio-Rad, США), качалка Stuart (Латвія), морозильники «Indesit», холодильники «Днерп-2», «Норд» (Україна), водяна баня (BIOSAN, Литва), ампліфікатор Real-Time CFX96 (Bio-Rad, США), мікроскопи: Primo Star (Carl Zeiss Microscopy, Німеччина), Carl Zeiss Amplitval (НДР), флуоресцентний «Leica DMIL» (Німеччина), оснащений фотоапаратом «Canon Power Shot 640 A» (Японія), мікроскоп JenaVal ("Carl Zeiss", Jena), мікроскоп Olympus BX41, обладнаний системою автоматизованого аналізу "CytoVision 4.01", лазерний проточний цитофлуориметр-сортер BD FACS Aria (Becton Dickinson, USA), слайди CytoSure Aneuploidy array 15k (Oxford Gene Technologies, Велика Британія), флуоресцентний сканер Innoscan 710 (Innopsys, Франція).

2.3. Морфологічні дослідження та імунофенотипування клітин

2.3.1. Рутинні дослідження морфології. За живими клітинами спостерігали за допомогою інвертованого мікроскопу, візуально оцінюючи

кількість клітин, їх форму, наявність контактів клітин між собою, наявність/відсутність сторонніх включень чи бактеріального, грибкового зараження. При підозрі на контамінацію, в тому числі і перехресну з іншими клітинними лініями, даний флакон не використовували в роботі та утилізували.

Для морфологічних досліджень клітини вирощували на малих чашках Петрі (d=3 см) або одразу на предметних скельцях, що поміщали у великі чашки Петрі. При досягненні субконфлуентного (subconfluent) моношару середовище відбирали, клітини промивали двічі-тричі PBS та забарвлювали 1% розчином нейтрального червоного для вітального забарвлення (прижиттєвого). Для фіксації клітини витримували у метанолі протягом 5-7 хв. та забарвлювали 1% розчином метиленового синього. Аналіз препаратів та фотографування здійснювали на мікроскопі Primo Star "Carl Zeiss" за допомогою програми Axio Vision.

2.3.2. Дослідження стовбурового потенціалу. Для перевірки стовбурового потенціалу клітинної лінії 4BL та її клонів досліджували здатність клітин диференціюватись в жирову (адипогенний напрям), кісткову (остеогенний) і м'язову тканини (міогенний напрям). Клітини вирощували на маленьких скельцях, поміщених в 4-х лункові планшети. Контрольні клітини культивували у стандартному поживному середовищі DMEM, а дослідні – в індукційних середовищах (табл. Б.1). Оскільки даний метод був розроблений для первинних клітинних культур, що ростуть значно повільніше, ніж клітини постійної іморталізованої лінії 4BL, що тривалий час підтримується в умовах *in vitro*, ми модифікували даний метод. Клітини були висіяні в кількості 30 тисяч на лунку, та для зменшення стимуляції клітин до активного поділу додавали не 10% сироватки, а 5%, оскільки відомо, що кращу здатність до диференціювання мають більш комітовані клітини, а не ті, що активно діляться. З цією ж метою після досягнення конфлуентності клітини були ще витримані один-два дні для накопичення потрібних продуктів в цитоплазмі, що можна порівняти зі стадією плато клітинного росту. Далі культуральне середовище відбирали, клітини тричі відмивали PBS та фіксували 80% розчином спирту 5-7хв. Для виявлення

диференціювання у кісткову тканину клітини забарвлювали 0,5% розчином алізаринового червоного. Для виявлення адипогенного диференціювання використовували Нільський червоний, що забарвлює жиrowі включення в жовтий колір, а також використовували Hoechst 33342 для фарбування ядер у синій колір. Наявність жирових включень досліджували за допомогою флуоресцентного мікроскопа «Leica DMIL» (Німеччина), оснащеному фотоапаратом «Canon Power Shot 640 A» (Японія).

Для виявлення м'язової тканини використовували PAS-реакцію на глікоген, який забарвлюється реактивом Шиффа у темно-рожевий або вишневий колір. Дослідження клітин за допомогою PAS-реакції на глікоген проведено співробітницею відділу Півень О.О. Препарати фіксували в рідині Шабадаша або за відсутності такої в розчині формаліну. Далі промивали в двох змінах дистилляту та витримували протягом 20 хв. у 0,03 М розчині періодату калію чи натрію у темряві. Тричі промивали дистиллятом, споліскували сірчаною водою та додавали реактив Шиффа і витримували 30-40 хв. у темряві. Тричі промивали сірчаною водою та дистиллятом. Забарвлені клітини фотографували на мікроскопі Primo Star «Carl Zeiss» за допомогою програми AxioVision.

2.3.3. Проточна цитофлуориметрія. Для проведення аналізу суспензію клітини відмивали в Cell Wash буфері (Becton Dickinson, USA) та інкубували з первинними моноклональними антитілами (в робочій концентрації 0,5 мкг на мільйон клітин) протягом 30 хв. при +4°C. Використовували такі флюорохром-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-сортері BD FACS Aria (Becton Dickinson, USA) з використанням програми FACS Diva 6.1.2, аналізуючи одночасно два параметри світлорозсіювання та 6 параметрів флуоресценції. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії

флюорохромів при багатопараметричному аналізі використовували контрольні зразки клітин без внесення антитіл (unstained control), зразки з кожним з антитіл окремо (single stained control) та зразки з комбінацією кількох антитіл без одного (fluorescence minus one control). Для визначення відсотку клітин в популяції, які експресують той чи інший маркер, брали до уваги лише популяцію живих клітин, які забарвлювались барвником 7ADD.

2.4. Ростові властивості

2.4.1. Криві росту. Для аналізу ростових властивостей клітини розсівали на 10 флаконів (об'ємом 10 мл) по 100 тис. клітин на флакон та додавали по 3 мл ростового середовища. Далі через кожні 24 год клітини знімали з поверхні культурального посуду за допомогою суміші розчинів 0,25 % трипсину та 0,02 % ЕДТА (1:3), підраховували їхню кількість у лічильній камері Горяєва і визначали загальну кількість клітин у культуральному флаконі. При закисненні середовища його змінювали на свіже [19]. Для кожного пасажу робили по три повтори та будували загальну криву росту за середніми значеннями.

2.4.2. Здатність клітин рости у середовищі, збідненому на ростові фактори. Клітини, що культивували у звичайних умовах (середовище DMEM з 10 % вмістом сироватки) пересівали на середовище з 5 або 3 % вмістом сироватки для поступової адаптації та згодом на середовище з 1 % вмістом сироватки. Через кілька пасажів клітини забарвлювали 1% розчином метиленового синього для дослідження морфології та фотографували на мікроскопі PrimoStar “Carl Zeiss” за допомогою програми AxioVision.

2.4.3. Вивчення здатності клітин рости без прикріплення до субстрату. Застосовували тест у напіврідкому агарі та метилцелюлозі. Попередньо чашки Петрі для запобігання прикріпленню клітин до скла покривали 0,6% агаром, приготованим в середовищі DMEM з 10% ЕТС. Після застигання нижнього шару, клітини в кількості по 100 тисяч на чашку (d=10см) додавали до попередньо приготованого та охолодженого до 37°C напіврідкого

середовища DMEM з 10% ETC, яке містило 0,3% агару або 1,4% метилцелюлози. Клітини культивували 7-14 днів та фотографували незабарвлені колонії на мікроскопі PrimoStar “Carl Zeiss” за допомогою програми AxioVision. Колонії забарвлювали розчином 0,01% метиленового синього та підраховували за допомогою програми Open CFU [259].

2.5. Цитогенетичні методи

2.5.1. Рутинне каріотипування. Для отримання препаратів хромосом використовували стандартний цитогенетичний метод [260, 19]. Хромосоми фіксували через 24 год після посіву клітин. Колхіцин (“Merk”, Німеччина) додавали у культуральне середовище із розрахунку 0,3-0,5 мкг/мл та інкубували 1 год при 37°C. Зняття клітин із субстрату здійснювали шляхом інкубації протягом кількох хв. при 37°C у розчині трипсин-версену. Для руйнування мембран клітин їх інкубували протягом 50 хв. – 1,5 год. при 37°C у теплому гіпотонічному розчині KCl (0,56 %). Фіксацію хромосом проводили три–чотири рази по 10-20 хв. приготуванням *ex tempore* метанол-оцтовим (3:1) фіксатором. Після 3-х змін фіксатора суспензію ядер і хромосом розкапували на вологі предметні скельця. Отримані препарати хромосом забарвлювали протягом 20-40 хв у 10 %-му розчині барвника Гімза (“Merck”, Німеччина). Аналіз метафазних пластинок здійснювали за допомогою мікроскопу Jenaval (“Carl Zeiss”, Jena), 1000x.

2.5.2. G-banding (диференційне забарвлення хромосом). Препарати метафазних хромосом аналізували із використанням диференційного GTG-забарвлення за [261] та диференційного QFH/AsD-забарвлення. Хромосоми вивчали при збільшенні у 1000 разів із використанням світлового мікроскопу Olympus BX41, обладнаного системою автоматизованого аналізу “CytoVision 4.01”. Аналізували по 200 метафазних пластинок (м.п.) кожного пасажу. Ступінь плідності клітин та структуру хромосом аналізували на рівні визначення 400–550 бендів на гаплоїдний набір. Для визначення структурних

перебудов застосовували міжнародну цитогенетичну номенклатуру ISCN-2013 [262].

2.5.3. FISH аналіз. Флуоресцентну гібридизацію *in situ* проводили на фіксованих препаратах метафазних пластинок. Денатурацію ДНК здійснювали у 70 % розчині формаміду у 2xSSC при 72°C протягом 5 хв. Далі проводили дегідратацію шляхом витримування скелець по черзі у 70%, 85% та 100% етанолі кімнатної температури протягом 2 хв. у кожному та висушували на повітрі до повного випаровування спирту. Гібридизацію ДНК з флуоресцентно міченими зондами проводили при 37°C мінімум 16 годин. Робили кілька стадій відмивок для видалення усіх зондів, що не зв'язались з ДНК. Використовували флуоресцентно мічені зонди до хромосом 3, 4, 9, 11, 14, 15, 17, 18, 22. Проводили візуалізацію за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

2.6. Молекулярно-генетичні методи

2.6.1. Порівняльна геномна гібридизація. Оцінку рівня анеуплоїдії здійснювали із використанням Cyto Sure 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 дослідну клітинну ДНК та контрольну ДНК (Human Male Genomic DNA, Promega, USA) у кількості 1 мкг кожної різали рестриктазами AluI і RsaI (Promega) та випадково мітили ціаніновими барвниками Cy3 та Cy5 за допомогою SytoSure Genomic DNA Labelling Kit (Oxford Gene Technologies, Велика Британія). Конкурентна когібридизація була виконана на слайдах CytoSure Aneuploidy array 15k (Oxford Gene Technologies). Після 24 год гібридизації при 65°C, слайди були промиті буферами Wash 1 і Wash 2 (Aligent, USA), підсушені та скановані відповідно до рекомендацій Oxford Gene Technology на приладі Innoscan 710 (Innopsys, Франція), обладнаного

програмним забезпеченням OGT Cyto Sure Interpret Software 3.3.2. при 5 нм. Аналіз зображень було зроблено з використанням програми CytoSure Analysis Software. Основними критеріями для ідентифікації незбалансованих хромосомних аномалій є відхилення сегменту від ізолінії профайлу на величину $3 \times \text{SD}$ або $\pm 0,3 \log_2\text{-ratio}$ - що є значущим пороговим фактором (threshold factor). Для подальшого аналізу генів, які містилися в ділянках дуплікацій/делецій, сформувавали 5 основних груп генів: онкогени та онкосупресори; гени, що беруть участь в сигнальних каскадах; гени, пов'язані з репарацією, транскрипцією та реплікацією; гени основних метаболічних шляхів та гени апоптозу. Біоінформатичний аналіз даних груп генів було зроблено за допомогою бази даних ncbi [263].

2.6.2. Виділення РНК з тотального лізату клітин. Клітини знімали з поверхні чашки Петрі ($d=12$ см) за допомогою розчину версену та центрифугували при $1\ 000\ g$ 10 хв. Далі до осаду клітин додавали лізуючий буфер з додаванням β -меркаптоетанолу з набору Gene Jet RNA Purification Kit (Thermo Scientific). Подальше виділення проводили колонковим методом згідно рекомендацій фірми-виробника. Елюцію РНК здійснювали за допомогою дейонізованої стерильної води. Вимірювали концентрацію отриманої РНК на нанодропі при 260 нм. Також проводили електрофорез незначної кількості отриманої РНК, змішаної з 2xRNA Loading Dye (Thermo Scientific, США), щоб впевнитись у її цілісності у 1% агарозному гелі. Електрофорез проводили в 1xTAE буфері протягом 1 години при напрузі 60-70 В.

2.6.3. Синтез к ДНК. Отриману РНК в кількості 2 мкг обробляли ДНК-азою при 37°C 30 хв. Додавали протектор РНК EDTA і зупиняли реакцію прогріванням при 65°C 10 хв. Далі синтезували кДНК, використовуючи інгібітор РНК-аз Ribolock, OligoDT в якості праймеру та фермент Revert Aid протягом 30 хв. при 50°C .

2.6.4. ПЛР в реальному часі. Визначали експресію трьох генів: MGMT, що бере участь у репарації алкільного пошкодження ДНК, відомого онкосупресора p53 і гену теломерази TERT. В якості референтних генів були

обрані HMBS та Actb. Для постановки реакції використовували 4 зразка: кДНК, отриману із суспензії клітин лінії 4BL 127-го, 144-го і 222-го пасажів та кДНК із клітинної лінії карциноми гортані HEP-2 для порівняння. Для вірогідності кожен зразок та ген перевіряли у триплетах. На 1 реакцію брали по 50-100 нг кДНК із синтезованої суміші та по 0,5 мкл прямого і зворотного праймерів (5 пмоль), використовували Eva Green Master Mix. ПЛР в реальному часі проводили на ампліфікаторі Real-Time CFX96 (Bio-Rad, США) за наступним протоколом: попереднє прогрівання при 95°C 3 хв.; 95°C – 10с, 60°C – 15с, 72°C – 10с – протягом 39 циклів. Криві плавлення перевіряли від 65°C до 90°C з кроком у 0,5°C. Криві плавлення показали наявність цільового продукту (основний пік) і відсутність сторонніх продуктів.

2.7. Методи роботи з білками

2.7.1. Виділення білкових лізатів. З 4-х чашок Петрі (d=12 см) з клітинами, які досягали $\approx 70\%$ конфлуентності, шкребок знімали клітини у холодному розчині PBS (- 4 °C), тримаючи чашки на льоду, та переносили в епендорф. Центрифугували клітини при 500 об/хв протягом 10 хвилин, надосадову рідину зливали, а осад промивали розчином PBS. Потім центрифугували при 14,2 грм протягом 3-4 хв. Осад гомогенізували у RIPA буфері із додаванням інгібітора протеаз PMSF (Sigma, США). Гомогенат центрифугували при 14,2 грм 3-4 хв, супернатант використовували як сумарний лізат. Зразки піддавали дії ультразвуку тричі по 10 с.

2.7.2. Визначення концентрації білка за методом Бредфорд. Вимірювання кількості білка проводили спектрофотометричним методом при довжині хвилі 595 нм на спектрофотометрі Specoll 11 проти 1 мл розчину Бредфорд і 0,1 мл буфера, у якому був розчинений білок. Калібрувальну криву будували, використовуючи як стандарт розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА) різної концентрації. Будували графік залежності поглинання

A595 від концентрації стандарту. Концентрацію білка визначали по калібрувальній кривій [264].

2.7.3. Білковий електрофорез. Білки розділяли у поліакриламідному гелі, що складався з двох частин: верхній шар – концентруючий (1,5 – 2%) та нижній – розділяючий (10-12%) [265]. До досліджуваних зразків додавали 1/4 об'єму буфера для зразків (500 мМ трис-НС1, рН 6,8; 2 % додецилсульфату натрію; 5 % β- меркаптоетанолу; 0,1 % бромфенолового синього). Перед нанесенням в гель зразки денатурували в 10-кратному буфері Лемлі для нанесення з подальшим кип'ятінням протягом 5 хв. Лізати наносили в гель з розрахунку 50-70 мг на лунку. В першу лунку вносили маркер. Як позитивний контроль на MGMT використовували клітинну лінію Нер-2, в якій експресується даний білок. Проводили електрофорез при 70 в перші 5-10 хв., далі – 50 В до потрібного розділення білків.

Після електрофорезу гелі фарбували 0,2% Coomassie brilliant R- 250 в суміші 45% етанол та 10% оцтова кислота упродовж ночі при кімнатній температурі. Надлишок фарби відмивали буфером, що містив 10 % оцтової кислоти та 5% етанолу при перемішуванні до появи чітких білкових зон.

2.7.4. Трансфер. Гель промивали в буфері такого складу: 50 мМ Tris (5,8 г / л), 40 мМ гліцин (2,9 г / л), 0,037 % додецилсульфату натрію (0,37 г / л), 20 % метанолу протягом 10 хв. для напів-вологого переносу. Тим часом готували PVDF (Millipore) мембрану, активуючи її промиванням в метанолі (15 с) і відмиваючи в буфері для переносу (5 хв). Після чого складали «сандвіч» із мембрани, гелю та фільтрувального паперу, просякненого буфером для переносу. Напів-вологий перенос проводили при 150 мА протягом 2 год на приладі Cleaver (Німеччина).

2.7.5. Вестерн-блот аналіз. Мембрану інкубували 1 год у буфері TBST (100 мМ трис, рН 7,5; 100 мМ NaCl; 0,1% Tween-20) із додаванням 5% знежиреного сухого молока для блокування неспецифічного зв'язування. Далі проводили інкубацію з первинними моноклональними антитілами проти MGMT виробництва “Novus Biologicals Littleton, Co” (США) від 2-3 годин до

цілої ночі по мірі виснаження антитіл. Відмивали мембрану тричі розчином розчином TBS + 5 % Tween-20 протягом 10 хв при 4 ° C і постійному помішуванні. Додавали вторинні видоспецифічні кон'юговані з пероксидазою хрому антитіла виробництва "Jackson Immuno Research" (США) на 1,5 – 2 години. Відмивали мембрану тричі розчином розчином TBS + 5 % Tween-20 протягом 10 хв при 4° C і постійному помішуванні. Для детектування специфічного зв'язування вторинних антитіл мембрану інкубували протягом 1 хв. в розчині, який містив 100 мМ трис рН 8,5 та 0,02% 5-аміно-2,3-дигідро-1,4-фталазіндіон (Sigma), 0,004% кумарову кислоту (Sigma) та 9% H₂O₂. Хемілюмінесценцію детектували на приладі Bio-Rad Chemi Doc, змінюючи експозицію від 30 до 300 секунд в залежності від сили сигналу. Контроль рівномірності нанесення білка проводили за допомогою денситометричної оцінки сумарної кількості білка, який був перенесений на мембрану, у програмі OriginPro 8.5.

2.8. Статистичний аналіз

Статистичний аналіз даних виконували за допомогою програм Excel (MS Office 2010), Origin 8.1 і OriginPro 8.5. (OriginLab, США) із використанням Т-теста для незалежних вибірок даних, які відповідали нормальному розподілу. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартної похибки (\pm S.D.) середнього значення. Для розрахунку кореляції між двома показниками використовували коефіцієнт кореляції за Пірсоном. Обробку результатів ПЛР в реальному часі проводили з використанням програмного забезпечення приладу CFX96 (Bio-Rad, США). Аналіз результатів порівняльної геномної гібридизації (array CGH) було зроблено з використанням програм OGT CytoSure Interpret Software 3.3.2. та CytoSure Analysis Software. За критичний рівень достовірності при перевірці статистичних гіпотез приймали * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ та *** $p \leq 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЇ, СТОВБУРОВОГО ПОТЕНЦІАЛУ, ІМУНОФЕНОТИПУ ТА РОСТОВИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ 4BL

3.1. Морфологічні властивості клітинної лінії 4BL

Клітинна лінія 4BL (скорочено від Blood Line), яка була отримана із периферійної крові дорослого здорового донора, початково вирощувалась на фідері із фібробластів людини, які були мітотично інактивовані за допомогою мітоміцину С. Клітини росли у вигляді компактних колоній на фідері, що нагадують колонії плюрипотентних стовбурових клітин (рис. 3.1 а). При постійно додаванні поживного середовища колонії могли рости достатньо довго, досягаючи великих розмірів (рис. 3.1 б).

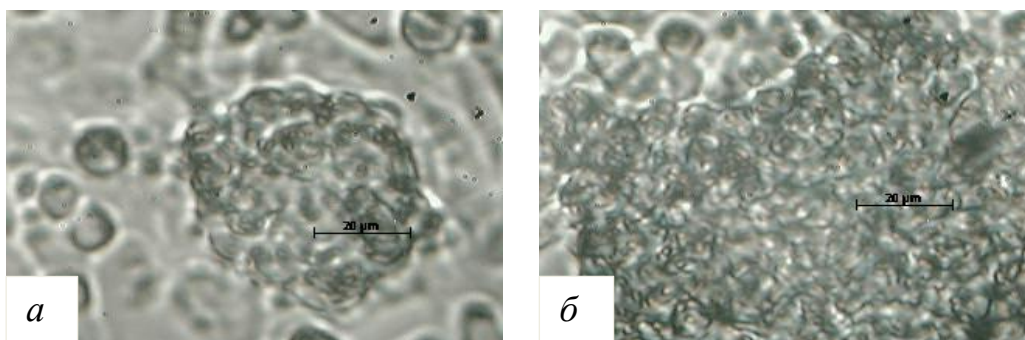


Рис. 3.1. Формування колоній клітин 4BL (а) і збільшення їхнього розміру (б) при рості на мітотично інактивованому фідері із фібробластів людини (незabarвлено, 400x)

Після відбору колоній з гарними ростовими властивостями клітини були переведені в умови стандартної моношарової культури. Нами було проведено кріоконсервування клітинних суспензій на різних пасажах культивування з

метою тривалого зберігання і подальшого дослідження. На пізніх пасажах культивування клітинна лінія, як правило, знаходиться на етапі стабілізації та має вже встановлені характеристики, тому їх було обрано для основних досліджень.

В клітинній лінії 4BL найбільш виражені два морфологічні типи клітин: витягнуті фібробластоподібні, що мають два основних діаметрально розташованих відростка, та подібні до трикутника або більш розпластані епітеліоподібні клітини (рис. 3.2).

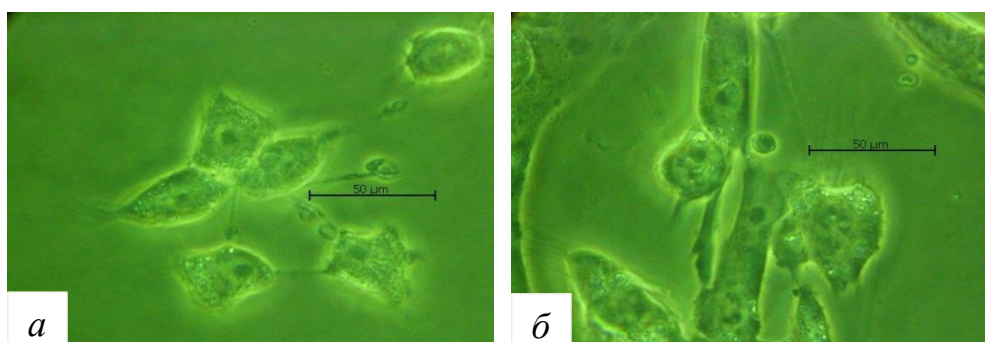


Рис. 3.2. Епітеліоїдні (а) і фібробластоподібні клітини (б) лінії 4BL, незабарвлено. Мікроскоп Carl Zeiss Amplitval із зеленим світлофільтром

Клітини даної лінії мають округле ядро, подекуди спостерігаються багатоядерні клітини та клітини-гіганти, що можуть бути поліплоїдними (рис. 3.3 а). В подальших цитогенетичних дослідженнях ми довели наявність клітин з поліплоїдним геномом в популяції клітин лінії 4BL, в основному, це були три- та тетраплоїди. З невисокою частотою зустрічаються круглі клітини, які відкріпляються від поверхні та переходять у суспензію. Цими клітинами можуть бути клітини, що діляться. Ця думка підтверджується тим фактом, що при перенесенні середовища, що містить такі клітини на новий культуральний посуд, вони прикріплюються до поверхні та дають початок моношаровій культурі, де потім також можуть виявлятися відкріплені клітини. Друге пояснення даного феномену можна надати через можливу наявність стовбурового потенціалу у клітин лінії 4BL. Відомо, що ембріональні та гемопоетичні СК мають здатність рости у суспензії та давати багатошарові

колонії. На рис. 3.3 б у лівому верхньому кутку видно ділянку багат шарового росту.

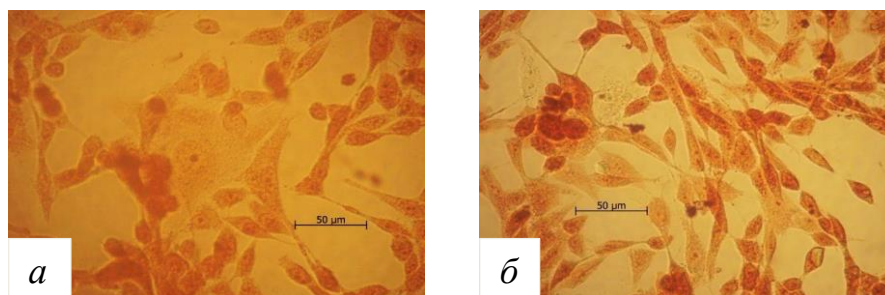


Рис. 3.3. Мікрофотографії (а, б) клітин лінії 4BL 163пасаж, забарвлення нейтральним червоним

Морфологія клітин змінювалася протягом клітинного циклу: більш-менш округлу форму мали клітини, що вступили у проліферацію, витягнену або розпластану форму – зрілі клітини в інтерфазі. Цікавою є характерна гістоархітектоніка клітин в культурі: вони часто утворюють клітинні асоціації, серед яких є типовими колові та напівколові структури, які характерні для ендотеліальних клітин [266, 267] (рис. 3.4).

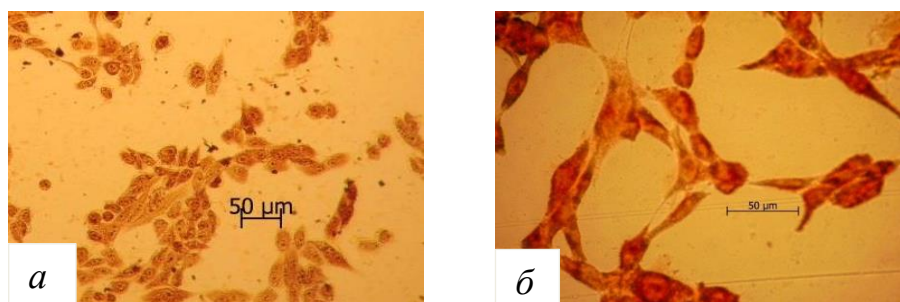


Рис. 3.4. Гістоархітектоніка клітинної лінії 4BL, забарвлення нейтральним червоним. а – 127 пасаж, б – 226 пасаж

3.2. Дослідження здатності клітин до багат шарового росту

При досягненні конфлуентного моношару і відсутності пересіву, але за вчасної зміни середовища клітини здатні формувати осередки кільк шарового росту (рис. 3.5). Цікавим є те, що ділянки багат шарового росту нагадують

кровотворні островки: нижній моношар клітин формує підложку, на якому формується кількшаровий бугорок округлої форми, який інколи навіть має отвір всередині (рис. 3.5 а). Це може опосередковано свідчити про стовбуровий потенціал. Здатність до багатшарового росту не залежала від кількості пасажів.

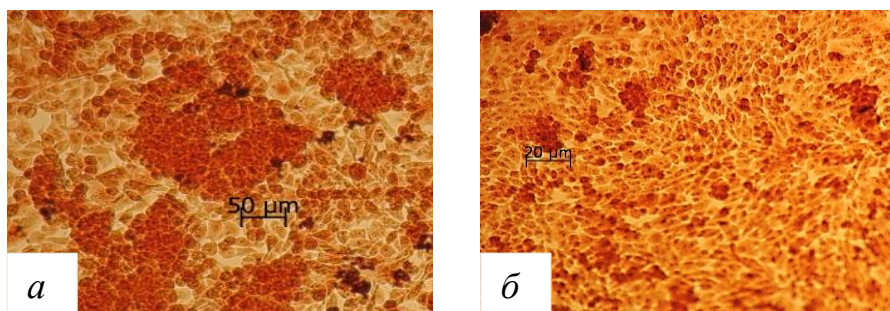


Рис. 3.5. Мікрофотографії конфлуентного моношару з ділянками багатшарового росту клітин лінії 4BL (забарвлення нейтральним червоним): а – 127 пасаж, б – 158 пасаж

Крім клітин оригінальної лінії, досліджували також її клони: С11, С12 та С13, отримані з популяцій клітин ранніх пасажів, які зазнали дії температурного шоку. Загалом, клони та клітинна лінія 4BL мають однакову морфологію, можуть формувати напівколові та колові утворення на поверхні культурального посуду (рис. 3.6 а) та здатні до багатшарового росту після досягнення конфлуентного моношару (рис. 3.6 б).

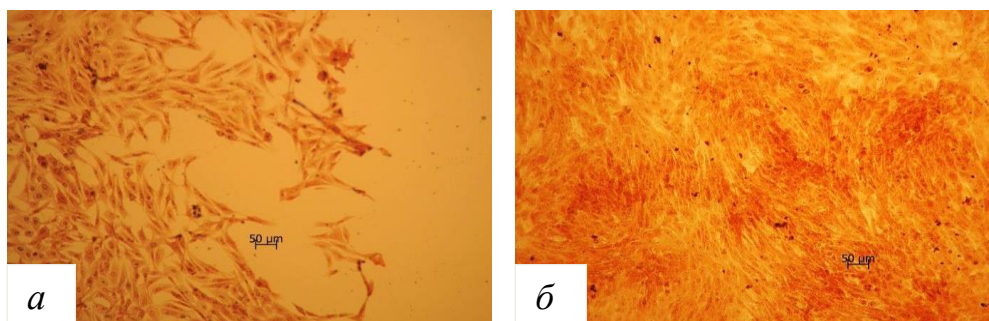


Рис. 3.6. Мікрофотографія клонів лінії 4BL: а – С11, 21-й пасаж, б – ділянки багатшарового росту клітин С13, 16-й пасаж, нейтральний червоний

Проте клони лінії 4BL мають особливість: ми спостерігали формування багат шарових колоній не в напіврідкому середовищі, а на поверхні культурального посуду навіть при звичайному культивуванні (рис. 3.7). Відмінним є те, що це спостерігалось як при високій щільності клітин (рис. 3.7 а), так і при низькій (рис. 3.7 б). Формування багат шарових колоній може бути пов'язано з тим, що клони клітин лінії 4BL зазнали значного стресу, що сприяло трансформації фенотипу. Інше пояснення може полягати в тому, що клони отримані з ранніх пасажів, отже можуть мати потужніший стовбуровий потенціал. Для перевірки даного факту потрібно виконати тест з диференціюванням клітин.

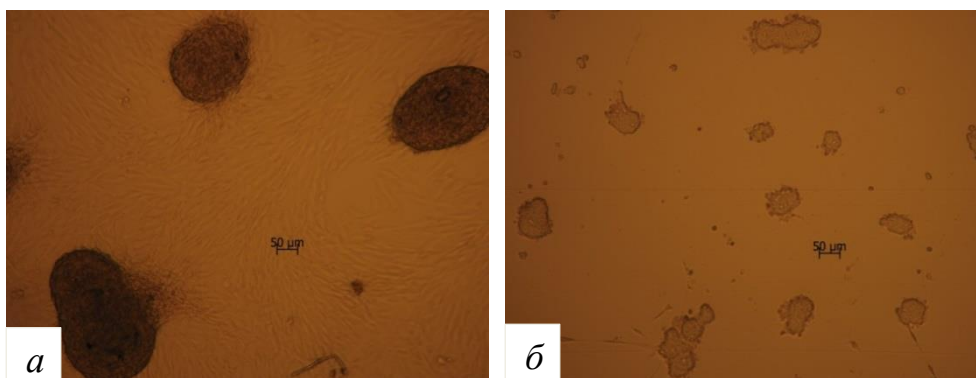


Рис. 3.7. Незабарвлені багат шарові колонії клонів клітин лінії 4BL: *а* – С12, 17-й пасаж, *б* – С13, 17-й пасаж

3.3. Дослідження здатності клітин рости без прикріплення до субстрату

При звичайному моношаровому способі культивування часто спостерігали поодинокі клітини, що відкріпились від поверхні культурального посуду та плавали у суспензії. Дане явище може мати два пояснення: або це клітини, що знаходяться в стадії поділу та неміцно прикріплені до поверхні посуду або це клітини, що мають стовбуровий потенціал, оскільки відомо що кровотворні стовбурові клітини гарно ростуть у суспензії та часто

підтримуються як суспензійні клітинні лінії. Також здатність рости у суспензії демонструють злоякісні клітини через втрату певних факторів адгезії внаслідок зміни експресії генів, а також втрату контактного інгібування.

Ми вирішили перевірити здатність клітин лінії 4BL рости у напіврідких середовищах: 0,3 % агарі та 1,4% метилцелюлозі. Для попередження прикріплення клітин до скла чи пластика культурального посуду його покривали більш густим розчином 0,6% агару.

Клітини даної лінії здатні рости в напіврідких середовищах. У напіврідкому агарі ми часто спостерігали округлі колонії правильної форми (рис. 3.8).

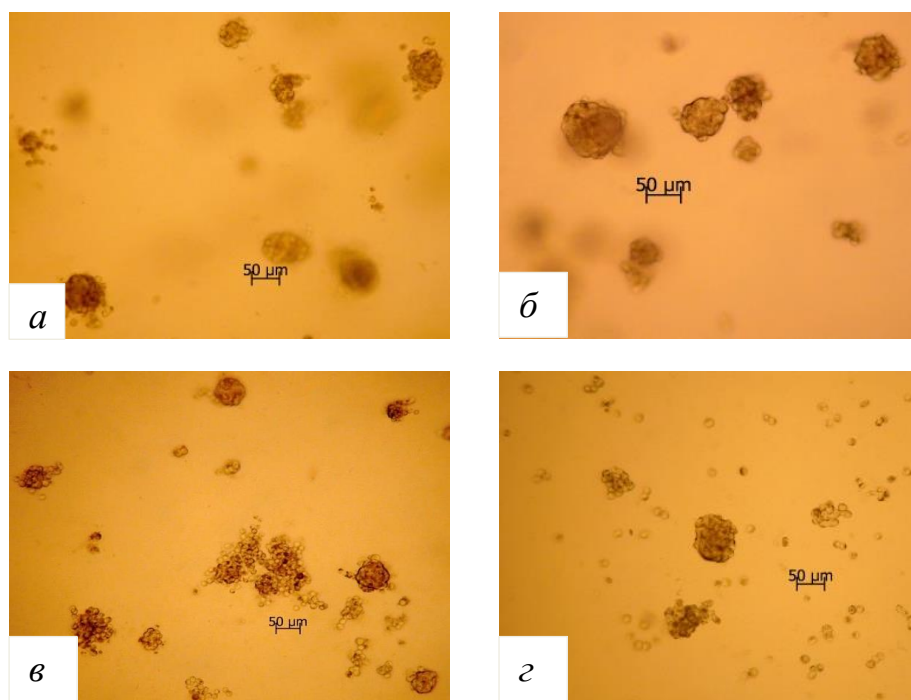


Рис. 3.8. Багатошарові колонії клітин лінії 4BL, що виростили у середовищі з напіврідким агаром: *a* - 124 пасаж; *б* – 196п.; *в* –135 п, *г* – 205 п

У напіврідкій метилцелюлозі клітини лінії 4BL формували як великі округлі колонії, так і величезні конгломерати (рис. 3.9). Більший розмір колоній у метилцелюлозі (МЦ) порівняно з агаром пов'язаний з постановкою досліду: клітини, які вирощували на чашках з МЦ регулярно підживлювали, а до клітин, висіяних на чашки з агаром не додавали нові порції середовища. Найбільшу

кількість колоній та їхній найбільший розмір спостерігали на більш ранньому 124-му пасажі, а найменшу – на більш пізньому 205-му пасажі.

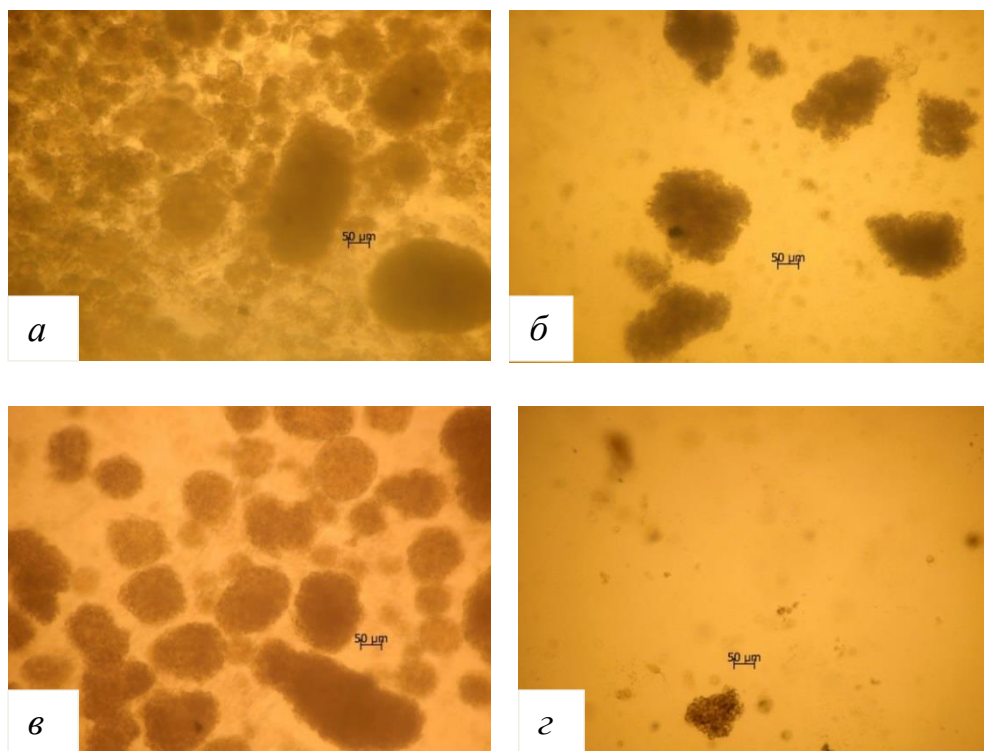


Рис. 3.9. Агрегати клітин лінії 4BL, що виростили у напіврідкому середовищі з метилцелюлозою: *а*- 124 пасаж; *б* – 135 п.; *в* – 196п.; *г* – 205 п.

Відомо, що здатність рости в напіврідкому середовищі мають як деякі злоякісні клітини, так і плюрипотентні стовбурові клітини, а також мультипотентні стовбурові кровотворні клітини. Тест в напіврідкому агарі є неоднозначним і може вказувати як на наявність стовбурового потенціалу у клітинної лінії, так і на її трансформацію в процесі культивування. Тому наступним етапом нашої роботи стала перевірка стовбурового потенціалу клітинної лінії 4BL шляхом диференціювання клітин в адипогенному, остеогенному та міогенному напрямках.

3.4. Стовбуровий потенціал клітинної лінії 4BL

Для дослідження стовбурового потенціалу клітинної лінії 4BL та її клонів C11, C12 і C13 перевіряли здатність клітин диференціюватись в жирову (адипогенний напрям), кісткову (остеогенний) і м'язову тканини (міогенний напрям). Для цього дослідні клітини вирощували в індукційних середовищах, щоб спрямувати диференціацію в потрібному напрямі, а контрольні клітини вирощували в стандартному середовищі DMEM. По досягненню конфлуентності, клітини ще день витримували при вчасній зміні середовища, оскільки диференціація краще проявляється при більш сповільненому рості клітин, та забарвлювали алізариним червоним для виявлення мінералізованого матриксу у випадку остеогенного диференціювання, Нільським червоним для виявлення жирових крапель при адипогенному спрямуванні та проводили PAS-реакцію на виявлення глікогену при диференціюванні у м'язеву тканину. Наявність забарвлених клітин свідчить про можливу здатність їхнього диференціювання в потрібному напрямку (рис. 3.10).

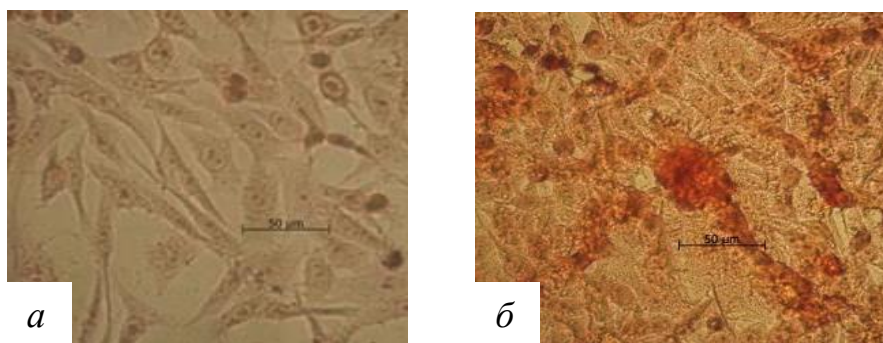


Рис. 3.10. Клітини лінії 4BL 129-го пасажу, забарвлені алізариним червоним, *a* – контроль, *б* – клітини, вирощені в остеогенному індукційному середовищі. 600x

Розвиток забарвлення, але, в значно меншій мірі, спостерігали у клітинах, що вирощувались на звичайному середовищі (рис. 3.11, *a*). Це явище може свідчити про можливість спонтанного диференціювання, яке іноді

проявляється при щільному контакті клітин між собою після досягнення конфлуентності [19].

Подібну картину отриманий для клонів клітинної лінії 4BL (рис. 3.11).

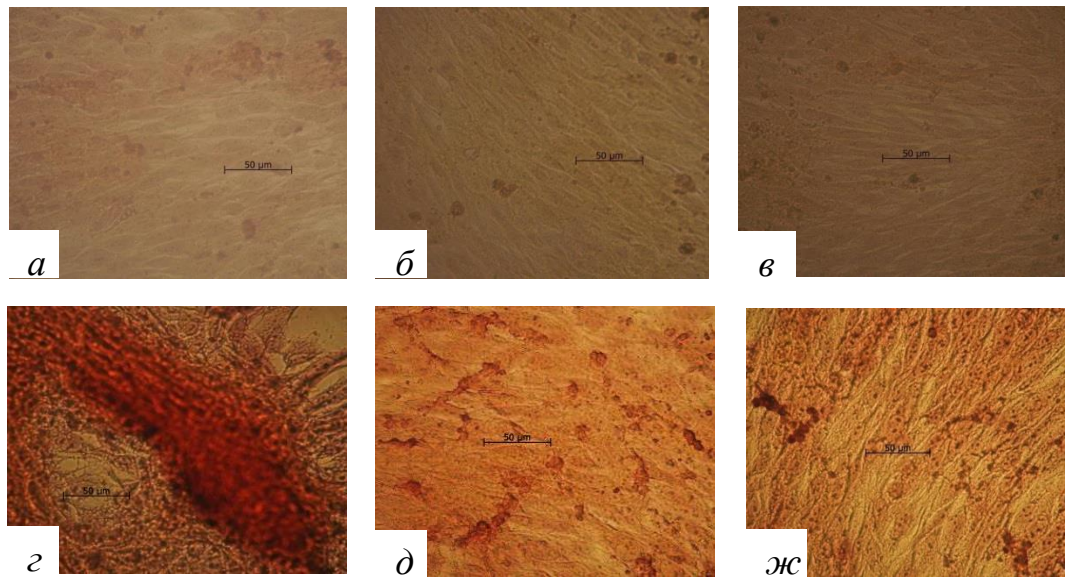


Рис. 3.11. Диференціювання клонів клітин лінії 4BL в остеогенному напрямі: *a, б, в* – контроль, *z, д, ж* – клітини, вирощені в остеогенному індукційному середовищі, забарвлення алізариновим червоним. *a, z* – C11; *б, д,* - C12; *д, ж* – C13

При порівнянні клітин клонального походження між собою можна помітити, що найбільший розвиток забарвлення спостерігався у C11. Найчастіше забарвлювались саме багат шарові ділянки на препаратах, розпластані клітини можуть виступати в ролі підложки – таким чином можливе створення певних зон мікрооточення.

При диференціюванні клітин в адипогенному напрямку спостерігали чітке забарвлення жирових гранул в жовтий колір (рис. 3.12). Помітно, що як клітини лінії 4BL, так і її клони (рис. 3.12, рис. 3.13) легко накопичують жирові включення у цитоплазмі, очевидно, що цей процес забезпечують гени жирового метаболізму. Спостерігали подібну ситуацію, що і з диференціюванням у кісткову тканину: контрольні клітини також накопичували жирові гранули,

проте в значно меншій кількості, це може бути нормою, оскільки більшість клітин різних типів у незначній кількості мають запасні включення.

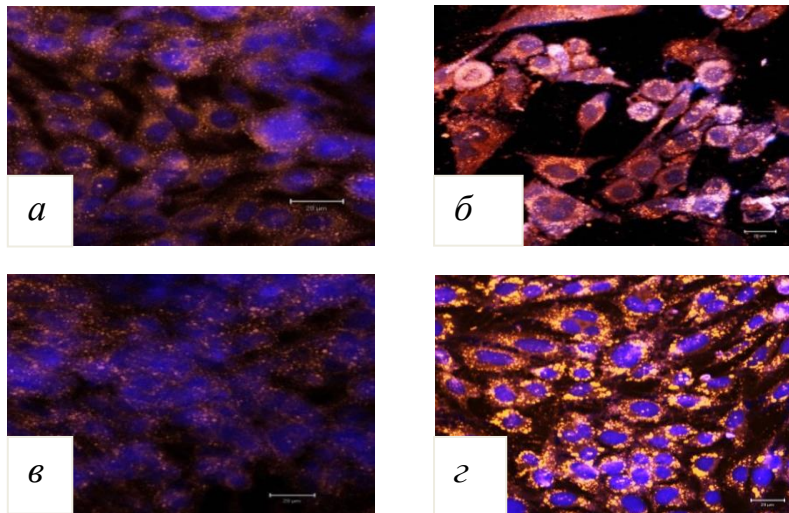


Рис. 3.12. Диференціювання клітин лінії 4BL – *а, б* та клітин С11 – *в, г, в* адипогенному напрямі, флуоресцентна мікроскопія. Жирові гранули забарвлені Нільським червоним в жовтий колір, ядра підфарбовані Ноеchst 33342. *а, в* – контроль, *б, г* – клітини, вирощені в індукційному середовищі

Клітини клонів лінії 4BL теж диференціюються в жирову тканину.

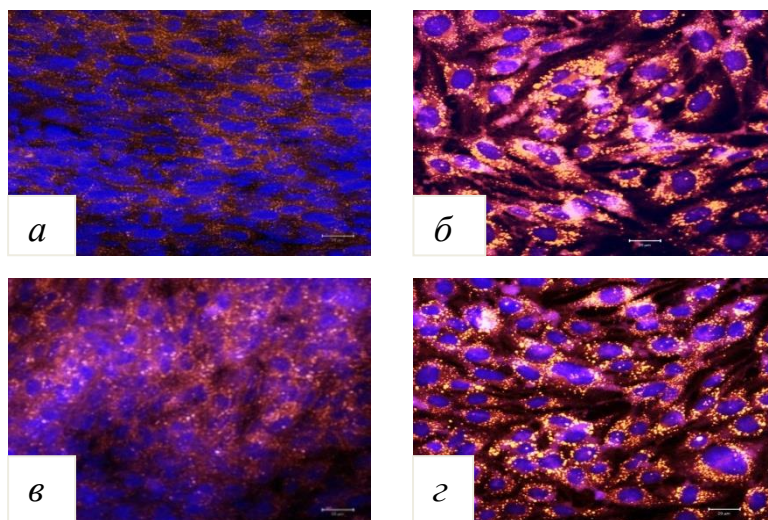


Рис. 3.13. Диференціювання клітин С12 лінії 4BL – *а, б* та клітин С13 – *в, г, в* адипогенному напрямі, флуоресцентна мікроскопія. Жирові гранули забарвлені Нільським червоним в жовтий колір, ядра підфарбовані Ноеchst. *а, в* – контроль, *б, г* – клітини, вирощені в індукційному середовищі

Нами показано здатність клітин 4BL диференціюватись у м'язевому напрямку при культивуванні в спеціальному кардіоміогенному середовищі з додаванням активіну А та bFGF (рис. 3.14).

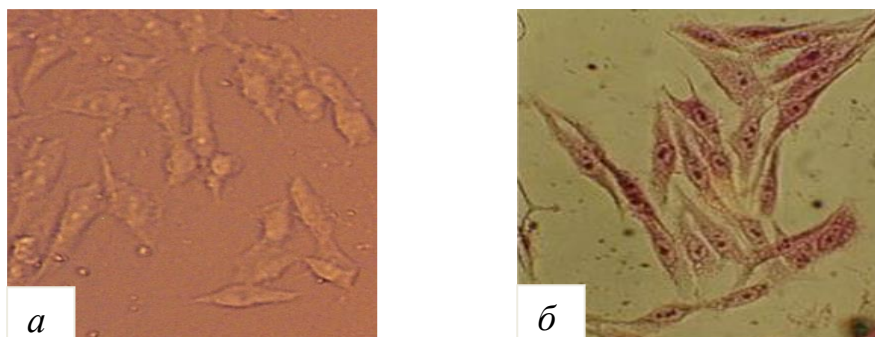


Рис. 3.14. Диференціювання клітин лінії 4BL у напрямку м'язевої тканини. а – контрольні клітини, б –PAS-реакція на глікоген. 600х

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

3.5. Імунофенотипування клітин лінії 4BL

Імунофенотип клітин було проаналізовано на проточному цитофлуориметрі BD FACS Aria (BD, USA), дослідження виконано спільно із співробітниками Інституту клітинної терапії Шаблієм В.А. і Лобинцевою Г.С.

Визначено, що клітини лінії 4BL є позитивними за маркерами CD73+ і CD105+, що є характерними для мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин (ММСК) і є негативними за маркером CD90 (рис. 3.15). Кількість клітин, в яких експресується CD73 склала 94,5%, а CD105 – 96,4%. В той же час, клітини негативні за гемопоетичними маркерами CD34- і CD45-, таким чином, вони не належать до гемопоетичних стовбурових клітин.

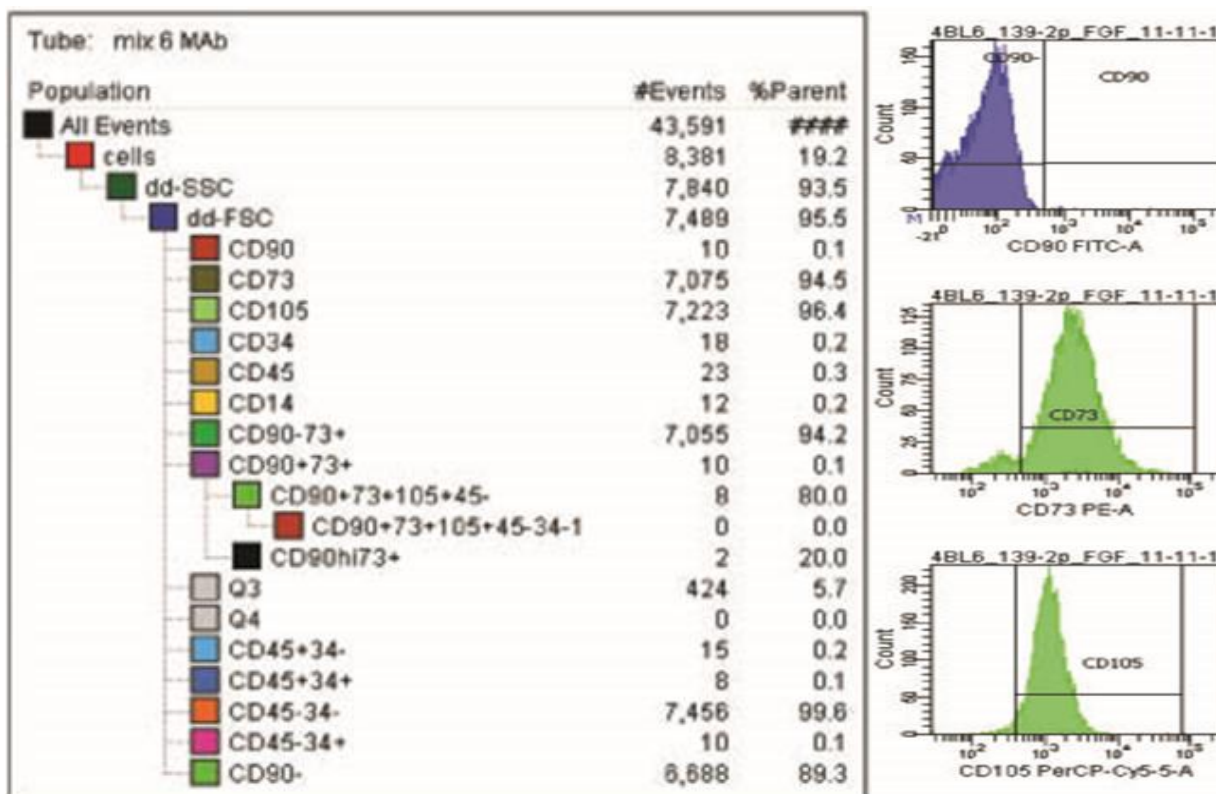


Рис. 3.15. Імунофенотипування клітин лінії 4BL на 139-му пасажі

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 некротовторної фракції МСК. Нині з'являються відомості, що МСК не обов'язково є позитивними за маркером CD90 [268]. У роботі [269] показано наявність двох популяцій клітин CD90+ і CD90- 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 CD90, CD34, CD45 і CD14: відсоток клітин, де виявлено ці маркери є вкрай низьким: 0,1%, 0,2%, 0,3% і 0,2% відповідно. Популяція клітин CD90-CD73+ становила 94,2%, а CD90+CD73+ всього 0,1% клітин, з яких 80% мали CD90+CD73+CD105+CD45- фенотип, а 20% CD90hiCD73+.

Більшість авторів схиляється до думки, що маркери CD14, CD34 і CD45 є характерними для більш диференційованих гемопоетичних клітин і класичні МСК мають бути негативними за цими маркерами, що ми й спостерігаємо на прикладі клітинної популяції лінії 4BL. Експресія обох маркерів CD73 і CD105 дозволяє віднести популяцію клітин лінії 4BL до МСК, що підтверджується їхньою здатністю формувати структури, подібні на кров'яні острівки при багат шаровому рості, колонії, подібні на ембріодні тіла при культивуванні в напіврідких середовищах агарі та метилцелюлозі, а також здатністю диференціюватись в жирову, кісткову та м'язову тканини.

Клітини лінії 4BL негативні за маркером Oct4- (результат ПЛІР аналізу), який характерний для клітин ембріонального та пухлинного походження [219, 221, 222, 270-273]. А за даними array CGH спостерігається часткова делеція ділянки 12p11.1pter, де розташований ген Nanog, який теж вторинно активується у ракових клітинах [218, 219, 221, 222]. Завдяки array CGH виявлено дуплікації хромосом з генами, які приймають участь у диференціації в 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); підтримці стовбурового потенціалу - MATK, KLF1, GDF15, BST2 bone marrow stromal cell antigen 2 (19 p13.3-p12), а також ген PARD6A – приймає роль в асиметричному поділі клітин та в епітеліо-мезенхімальному переході (16q22.1qter) – (див. розділ 4.3).

3.6. Криві росту клітин лінії 4BL

Криві росту клітин лінії 4BL характеризувалась майже повною відсутністю lag-фази на 146-му та 224-му пасажі, клітини одразу переходять до експоненційного росту, коротка lag-фаза спостерігалась на 136-му пасажі, яка тривала одну добу. Перший період експоненційного росту на пасажах 136 і 146 триває три доби, далі йде точка переходу і ріст клітин сповільнюється на добу,

а з четвертої доби починається наступний період експоненційного росту, який на 136-му пасажі продовжується до сьомої доби, а далі йде на спад, а на 146-му триває до п'ятої доби. На 224-му пасажі спостерігається короткий період експоненційного росту, який з третьої доби переходить у стадію плато до п'ятої доби включно, а далі добу триває другий період експоненційного росту, з шостої по сьому добу спостерігається друга фаза плато (рис. 3.16).

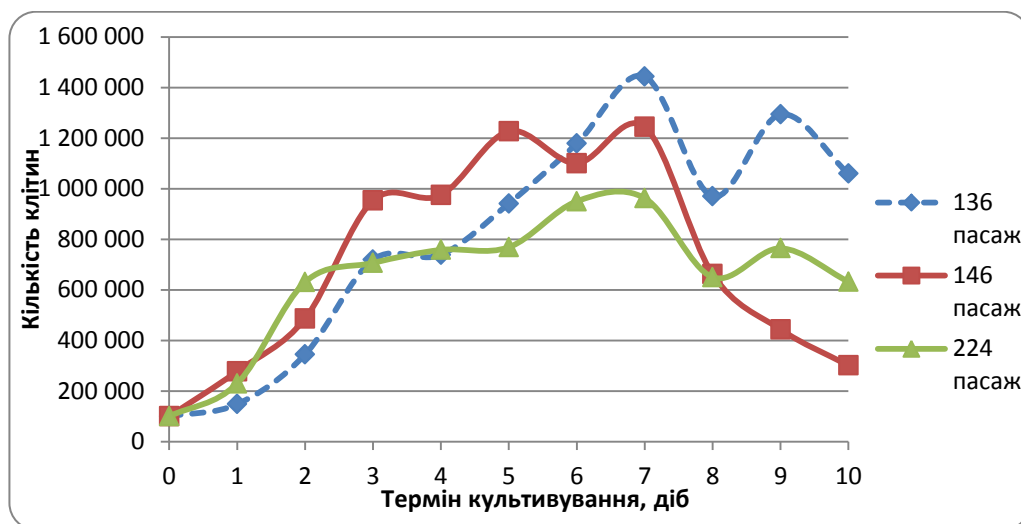


Рис. 3.16. Криві росту клітинної лінії 4BL: 136-й, 146-й та 224-й пасажі

На 138-му пасажі культивування була отримана майже типова S-подібна крива росту (рис. 3.17). Адаптаційний lag-період тривав дві доби, а далі до 6-ї доби відбувався експоненційний ріст, що переходив в стадію плато. На 8-му добу формувалася новий пік чисельності клітин.

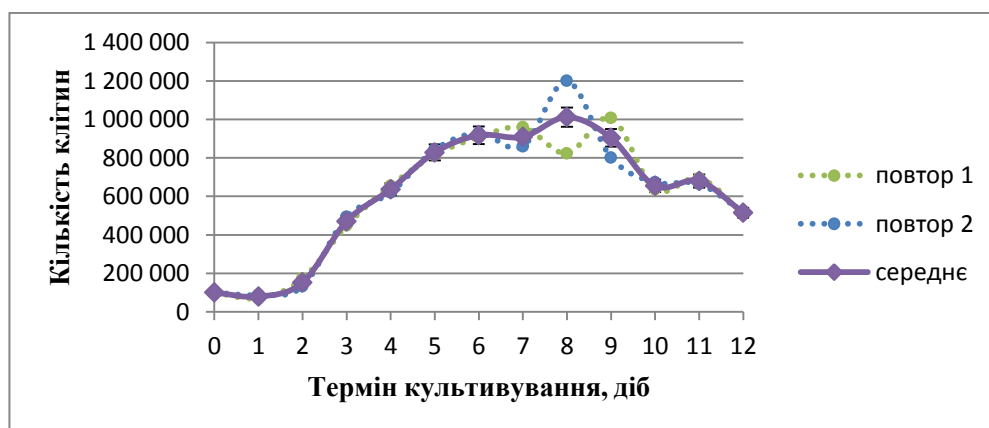


Рис. 3.17. Крива росту клітинної лінії 4BL, 138-ий пасаж

Крива росту, отримана на 204-му пасажі (рис. 3.18), характеризується коротким адаптаційним періодом, що можливо пов'язано з тим, що до отримання такого пізнього пасажу клітини вже багато разів пересівались. Фаза експоненційного росту тривала до 5-ї доби включно, після якої на добу наставала фаза плато, проте, як і на 128-му формувалася новий пік чисельності клітин, після чого крива йшла на спад.

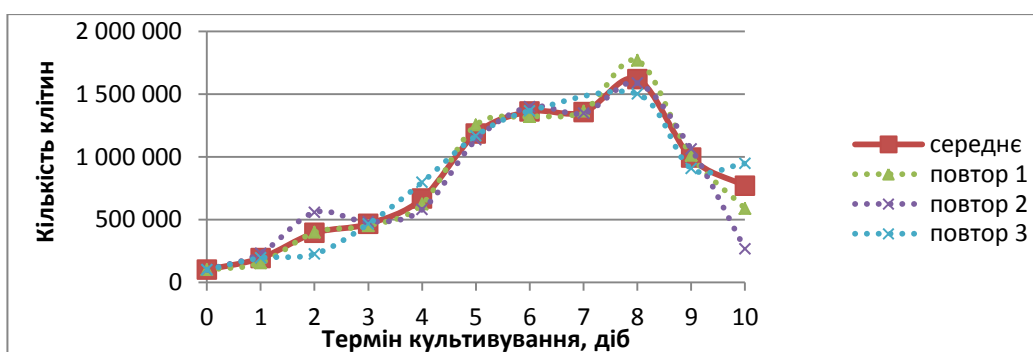


Рис. 3.18. Крива росту клітинної лінії 4BL, 204-ий пасаж

Криві росту клонів лінії 4BL були подібні до кривих росту самої лінії. Цікавою особливістю кривих росту клітинної лінії 4BL є стадія сповільнення росту з формуванням двох піків максимальної чисельності клітин, що нагадує затухаючі коливання фізичних явищ. Поясненням може бути наявність двох морфологічних класів клітин в популяції лінії 4BL: фібробластоподібних і епітелію-подібних. З літератури давно відомо краще виживання саме фібробластних клітин при тривалому культивуванні клітин *in vitro*, що навіть є проблемою при отриманні первинної культури гепатоцитів, оскільки з часом починають переважати фібробласти та ендотеліоцити. Підтвердженням цього припущення є той факт, що на пізніх добах культивування кривої росту (після 7-ї доби) без пересіву відбувається старіння культури і більшість клітин набуває витягнутої фібробластоподібної форми.

3.7. Дослідження здатності клітин рости в середовищі, збідненому ростовими факторами

При паспортизації клітинних ліній обов'язково проводять тестування можливості клітин рости і проліферувати в середовищі з різним вмістом сироватки. Нами було перевірено можливість клітин лінії 4BL рости і розмножуватися в середовищі із 10%, 5%, 3% і 1% сироватки. Клітини легко переходили на режим культивування з 5% сироватки, активно проліферуючи. При переведенні клітин із 10% середовища до 3% значна частина клітин гинула, спостерігалась затримка проліферації на 2-4 доби. При пересіві клітин з середовища з 10% сироватки одразу на 1% ЕТС клітини гинули, проте при поступовому переведенні, що включало проміжні етапи із культивуванням у середовищі з 5% і 3% сироватки, клітини встигали адаптуватись до нових умов і надалі могли виживати і навіть ділитись у середовищі із низьким вмістом сироватки 1%. Для перевірки життєздатності клітин їх забарвлювали трипановим синім (рис. 3.19).

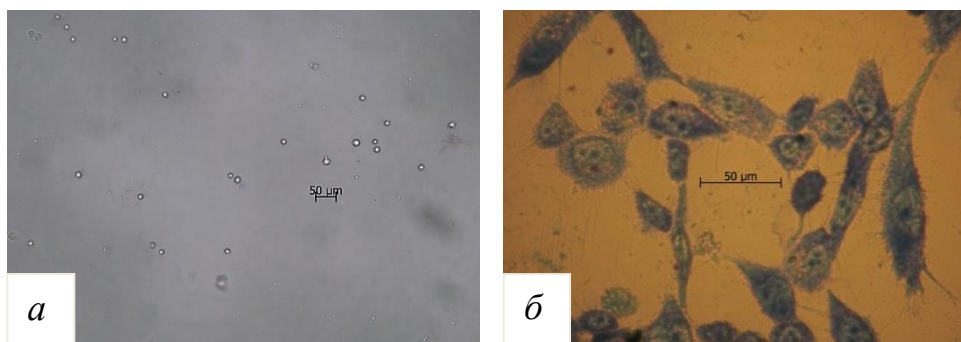


Рис. 3.19. Приклад життєздатності клітин лінії 4BL при вирощуванні в середовищі з 1% сироватки на 225-му пасажі: *а* – живі клітини, зняті розчином трипсину-версену, розвиток забарвлення від трипанового синього не відбувається, *б* – морфологія клітин при забарвленні метиленовим синім

При культивуванні у середовищі з 1% сироватки клітини зберігали типову морфологію: спостерігали епітеліоподібні та фібробластоподібні

клітини, а також незначний відсоток малих круглих клітин (рис. 3.20, а). Крім характерної морфології, клітини також зберігали здатність до формування колових та напівколових структур – на рисунку 3.20 наведено порівняння клітин лінії 4BL 225-го і 226-го пасажів, вирощених в 1% і 10% ЕТС відповідно.

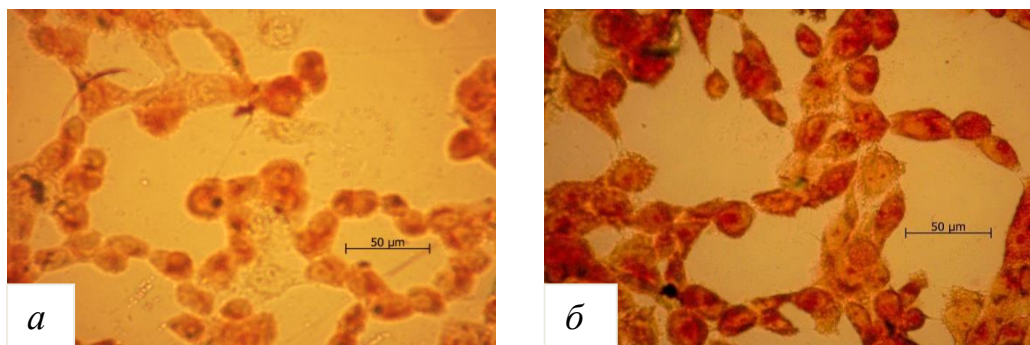


Рис. 3.20. Мікрофотографії клітин лінії 4BL, забарвлення нейтральним червоним, 600х. *а* – клітини 225-го пасажу, вирощені в середовищі з 1% ЕТС, *б* – клітини 226-го пасажу, вирощені в середовищі з 10% ЕТС

Отже, вперше виявлено, клітини лінії 4BL при культивуванні часто формують колові та напівколові асоціації, що характерні для ендотеліальних клітин [266, 267], і ця властивість не залежить ні від тривалості пасажування, ні від вмісту сироватки в середовищі. При багат шаровому рості клітини утворюють формування, що нагадують кров'яні острівки. При вирощуванні у напіврідкому агарі клітини дають початок колоніям, подібним до ембріодних тілець. Стовбуровий потенціал клітин лінії 4BL підтверджено їхньою здатністю диференціюватись в адипогенному, остеогенному та міогенному напрямках. 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; також клітини не експресують маркер Oct4, який характерний для ембріональних або злоякісних клітин. Отже, популяція клітин лінії 4BL ймовірно за все належить до мультипотентних стовбурових негемопоетичних клітин.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **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.

2. 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.

3. **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.

4. **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.

5. **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.

6. **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.

РОЗДІЛ 4

КАРІОТИПІЧНІ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. Рутинне каріотипування

У результаті проведених цитогенетичних досліджень було виявлено домінування клітин з приблизно диплоїдною кількістю хромосом в популяції клітин лінії 4BL на всіх досліджених термінах культивування (рис. 4.1).

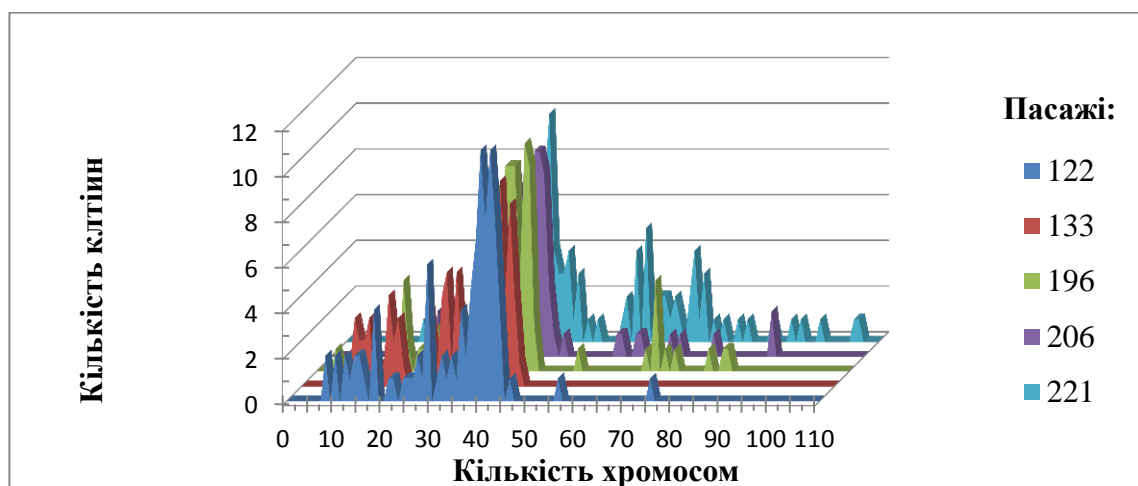


Рис. 4.1. Розподіл кількості хромосом у клітинах лінії 4BL на різних пасажах культивування за даними рутинного каріотипування

Клітинній лінії 4BL притаманне значне переважання гіпоплоїдів над гіперплоїдами на всіх досліджуваних пасажах культивування, окрім 221-го, де частота гіпо- та гіперплоїдів приблизно однакова (табл. 4.1). Клітини з високоплоїдними хромосомними наборами в популяціях досліджуваної клітинної лінії майже не спостерігалися (табл. 4.2). При цьому тенденції каріотипічної еволюції досліджуваної культури виглядають наступним чином. Спочатку розподіл носить виразно асиметричний характер з переважанням гіпоплоїдних варіантів – але на 196 пасажі з'являється тенденція до виокремлення двох піків: більш вираженого – в навколодиплоїдній області; та

менш вираженого – в навколо триплоїдній (рис. 4.2). На 221 пасажі ця тенденція стає ще більш помітною.

Таблиця 4.1

Розподіл клітин за плоїдністю каріотипу

пасаж	122	133	196	206	221
вибірка, м.п.	100	100	103	100	101
гіпоплоїди	97±1,71	98±1,41	89,32±3,06	88±4,42	47,52±4,99
46 хромосом	1±1	0	0	1±1	3,96±1,95
гіперплоїди	2±1,41	2±1,41	10,68±3,06	11±3,32	48,51±5

Таблиця 4.2

Розподіл частот каріотипів за плоїдністю на різних стадіях становлення лінії

пасаж	122	133	196	206	221
плоїдність					
≈n	36±4,82	54±5,01	26,21±4,35	20±4,02	6,93±2,54
≈2n	63±4,82	44±4,9	66,67±5,37	70±4,61	51,49±5
≈3n	1±1	-	6,80±2,49	7±2,56	32,67±4,69
≈4n	-	-	2,91±1,66	2 ±1,41	5,94±2,36
≈5n	-	-	-	-	1,98±1,39
≈6n	-	1±1	-	-	0,99±0,99
≈12n	-	1±1	-	-	-
≈16n	-	-	-	1 ±1	-

Це нашоє на думку про виокремлення нового суб-модального класу хромосом у навколотриплоїдній ділянці як новий виток каріотипічної еволюції клітинної лінії 4BL в процесі тривалого культивування. У літературі давно

відмічено явище поліплоїдизації клітинних ліній на пізніх пасажах після кількох років у культурі [107 – 112, 116, 117].

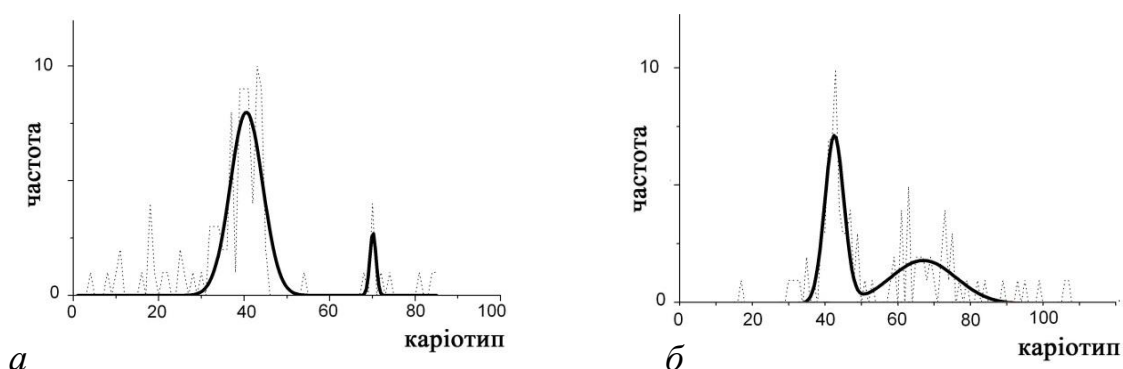


Рис. 4.2. Розподіл клітин за кількістю хромосом на 196-му (а) та 221-му (б) пасажах

Найбільшу кількість гіпоплоїдних клітин спостерігали на 133-му та 122-му пасажах: $98 \pm 1,41$ та $97 \pm 1,71$ відповідно, а найменшу на 221 пасажі - $47,52 \pm 4,99$ (таб. 4.2). Серед гіпоплоїдів найбільшу частку склали клітини з білядиплоїдним набором хромосом на всіх досліджуваних пасажах, окрім 133-го, де переважали білягаплоїдні клітини (54% проти 44% білядиплоїдних клітин). Однією з можливих версій значного зростання частки білягаплоїдних клітин є атипічний мітоз з утворенням багатополюсного веретена поділу. Причиною такого мітозу часто буває порушення роботи регуляції мітотичного апарату, в тому числі й репаративних систем.

Враховуючи той факт, що невідрепаровані мутації можуть в подальшому призводити до накопичення хромосомних аберацій, ми вирішили співставити коефіцієнт варіації каріотипів на різних пасажах з експресією репаративного ензиму MGMT. На рис. 4.3, а наведено дані порівняння коефіцієнту варіації за частотою каріотипів та рівня експресії MGMT на стадії структурної нестабільності при становленні клітинної лінії 4BL. Обчислений коефіцієнт кореляції за Пірсоном для цих двох показників становив $0,59$ ($p \leq 0,001$), тобто кореляція статистично достовірна.

Ймовірно, це становить один із компенсаторних механізмів, активованих дестабілізацією геному та стресовими чинниками, пов'язаними з адаптацією клітин до умов культивування. Таке припущення підтверджується даними роботи [274], в якій показано ключову роль *MGMT* у виживанні клітинної популяції в умовах стресу та під впливом мутагенів із різним механізмом пошкоджуючого впливу.

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. 4.3, б).

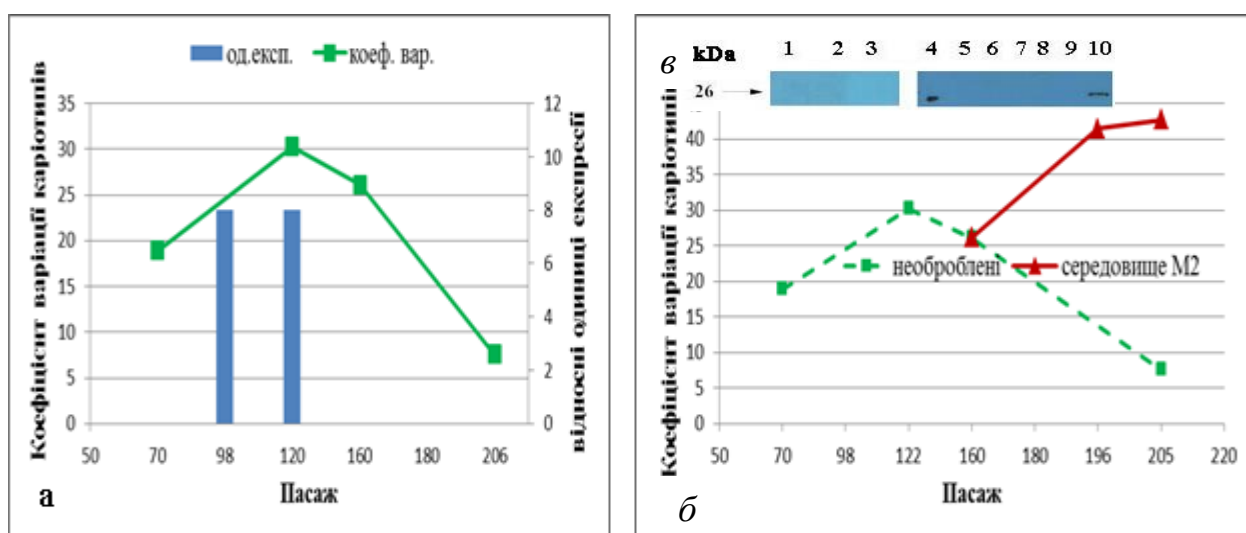


Рис. 4.3. *а* – коефіцієнт варіації каріотипів і рівень експресії репаративного ензиму *MGMT* (денситометричний аналіз Вестерн-блот гібридизації по експресії *MGMT*) на різних стадіях становлення клітинної лінії 4BL. *б* – повторна індукція генетичної нестабільності клітин лінії 4BL за допомогою модифікованого 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 стрес-чинника, коефіцієнт варіації каріотипів 160-му пасажі помітно йде на спад. Проте після впливу середовища з високою іонною силою, відбувається порушення встановленої адаптації клітин до умов культури *in vitro*, спостерігається різке зростання кривої з формуванням нового піку, вищого за попередній. Тобто, підтримуючий стабілізуючий добір в культурі змінюється на рушійний. Таким чином, за результатами цитогенетичного аналізу, обробка клітин стрес-фактором, ймовірно, призвела до повторного переходу клітинної популяції в стан структурної нестабільності. 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. 4.3, в), що свідчить про можливу роль репаративного ензиму не лише у виправленні точкових мутацій, а й у підтримці стабільності геному.

Експресія гена *MGMT* на рівні білка також позитивно корелює (статистично достовірний ефект) із проявом геномної нестабільності у процесі спонтанної іморталізації та становлення клітинних ліній, ембріональних гермінативних клітин миші. У процесі еволюції клітинних ліній стадія структурної нестабільності змінюється стадією стабілізації, з формуванням переважаючого модального класу з певним числом хромосом. На стадії стабілізації клітинних популяцій спостерігали зниження рівня експресії MGMT до повного його зникнення.

В процесі тривалого культивування клітинної лінії 4BL відбувається каріотипічна еволюція, яка має хвилеподібний характер. Адаптація клітин до умов культивування *in vitro*, які значно відрізняються від умов організму, супроводжується індукованим мутаційним процесом, пов'язаним із періодом структурної нестабільності геному. Найбільш ймовірно стадія кризи відбувається близько 133-го пасажу, де спостерігається найбільша кількість клітин з білягаплоїдним каріотипом. Надалі етап становлення клітинної лінії

4BL змінюється етапом стабілізації каріотипу. Внаслідок еволюційних процесів, що мають місце в даній культурі, спостерігається формування біядиплоїдного модального класу, та тенденції до виокремлення незначного пулу поліплоїдних клітин на пізніх пасажах культивування (196 та 221), що також описано в літературі. Переважання клітин з біядиплоїдним каріотипом робить виділену нами культуру клітин 4BL перспективною з точки зору застосування в якості модельної системи *in vitro*. У зв'язку з цим нами розпочаті більш детальні дослідження хромосомних змін, що відбуваються в даній культурі.

4.2. Результати диференційного забарвлення хромосом

4.2.1. Структура популяції клітин лінії 4BL за плоїдністю. Для диференційного забарвлення хромосом використовували метафазні пластинки клітин лінії 4BL, отримані на 160-му та 205-му пасажах. У популяції клітин лінії 4BL на 160-му пасажі культивування проаналізували 200 м.п., з них 181 були належної якості для детального аналізу. Частка біядиплоїдних клітин (30–45 хромосом) склала $67,4 \pm 3,5$ % (122 із 181 м.п.), біягаплоїдних (14–29 хромосом) – $22,1 \pm 3,1$ % (40 м.п.), поліплоїдних – $2,8 \pm 1,2$ % (5 м.п.), з передчасним розділенням хроматид (ПРХ) – $5,0 \pm 1,6$ (9 м.п.), з фрагментацією хромосомного набору – $2,8 \pm 1,2$ % (5 м.п.) – таблиця 4.3. Загальний рівень спонтанної хромосомної нестабільності склав 3,9% (7 м.п.), і поряд із явищем повної фрагментації хромосом (2,8%), включав 1,1% клітин з хроматидними розривами.

На 205-му пасажі культивування клітин лінії 4BL проаналізовано 200 м.п. Частка біядиплоїдних клітин (30–49 хромосом) становила $62,5 \pm 3,4$ % (125 із 200 м.п.); поліплоїдних – $36 \pm 3,4$ % (72 м.п.); м.п. з ПРХ – $1,5 \pm 0,9$ % (3 м.п.). Загальний рівень спонтанної хромосомної нестабільності склав 1% - клітини з ознаками фрагментації/пульверизації хромосом. Також порівняно із 160-м пасажем, на 205-му не знайдено клітин з хроматидними розривами.

Якщо на 160-му пасажі співвідношення між біядиплоїдними і поліплоїдними клітинами становило 24:1, то на 205-му пасажі воно складало 1,7:1. Отже, під час культивування з 160-го по 205-й пасажі відбулися суттєві зміни плоїдності клітин дослідженої лінії у напрямку збільшення частки поліплоїдних клітин з 2,8 % до 36 % відповідно ($\chi^2=33,2$, $P<0,001$) при несуттєвій зміні відсотка біядиплоїдних клітин : 67,4 % та 62,5 % відповідно, ($\chi^2=4,9$, $P=0,05$).

Таблиця 4.3

**Дані каріотипування популяцій клітин лінії 4BL на 160-му та 205-му
пасажах**

	160 пасаж		205 пасаж	
	м.п.	відсотки	м.п.	відсотки
вибірка	181		200	
ПРХ	9	5±1,6	3	1,5±0,9
біля 2 n (30–45)	122	67,4±3,5	125	62,5±3,4
біля n (14–29)	40	22,1±3,1	-	-
поліплоїдні	5	2,8 ±1,2	72	36±3,4
3 n	-	-	9	4,5±1,5
4 n	4	2,2±1,1	62	31,0±3,3
5 n	1	0,6±0,6	-	-
6 n	-	-	1	0,5±0,5
фрагментація хромосом	5	2,8±1,2	2	1±0,7
хроматидні розриви	2	1,1±0,8	-	-

Примітка. «-» - не спостерігали

Значною особливістю клітинної популяції лінії 4BL на 205-му пасажі є відсутність біягаплоїдних клітин, які на 160-му пасажі склали 22,1±3,1 % м.п. ($P=0,001$). Отже, при культивуванні від 160-го до 205-го пасажу відбулася суттєва зміна каріотипу клітин лінії 4BL із зникненням біягаплоїдних клітин

та достовірним збільшенням частки поліплоїдних клітин. Як відомо, клітини з білягаплоїдним набором хромосом є анеуплоїдними. Анеуплоїдія сама по собі є промотором хромосомної нестабільності.

У порівнянні із 160-м пасажем, на 205-му знизився загальний рівень спонтанної хромосомної нестабільності (3,9% і 1%, відповідно), у тому числі відсоток клітин з фрагментацією хромосом (2,8% і 1% відповідно), також на 205-му пасажі не виявлено клітин з хроматидними розривами. Таким чином, дані факти можуть свідчити про стабілізацію каріотипу клітин лінії 4BL на пізньому 205-му пасажі. На користь останнього також свідчить редукція частоти клітин із ПРХ (рис. 4.4): з 5 % до 1,5 %. Відомо, що ПРХ пов'язане з індукцією апоптозу в клітинах з нестабільним геномом [275, 276].

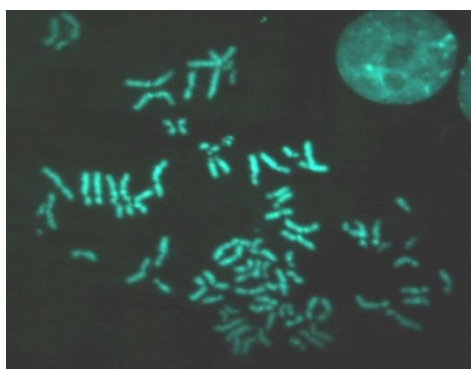


Рис. 4.4. Передчасне розділення сестринських хроматид у клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі культивування. Забарвлення QF1/AscD. Збільшення $\times 1000$

4.2.2. Кількість хромосом у біядиплоїдних клітинах лінії 4BL

На рис. 4.8 наведено розподіл клітин за кількістю хромосом у групі гіпота біядиплоїдних клітин лінії 4BL на 160-му і 205-му пасажах культивування. Однією з найсуттєвіших відмінностей між пасажами виявилась наявність в популяції 160-го пасажу репрезентативного пулу клітин ($22,1 \pm 3,1$ %) з редукованою до білягаплоїдної кількістю хромосом, які на 205-му пасажі взагалі не виявлялися (рис. 4.5, табл. 4.3). При цьому, як на 160-му, так і на 205-му пасажі, переважна більшість клітин (54,9 % і 80,8 % відповідно) мали 39–44 хромосоми, а серед них найбільш поширеними виявились клітини із кількістю

41–43 хромосоми (33,9 % і 60,8 % всіх біядиплоїдних м.п. відповідно). Частка клітин із вмістом 41, 42 або 43 хромосом склала 8,6 %, 14,2 % і 11,1 % відповідно на 160-му пасажі та 14,4 %, 26,4 % і 20,0 % відповідно на 205-му пасажі. Отже, найбільшу частку біядиплоїдних м.п. на обох пасажах культивування склали клітини із кількістю 42–43 хромосоми (рис. 4.5). В межах 5–8 % коливалась частка клітин із вмістом 39, 40 і 44 хромосоми, яка була майже однаковою на 160-му і 205-му пасажах: 5,6 %, 7,4 %, 8 % та 4,8%, 8,8 %, 6,4 % відповідно (табл. В.1 в Додатку В).

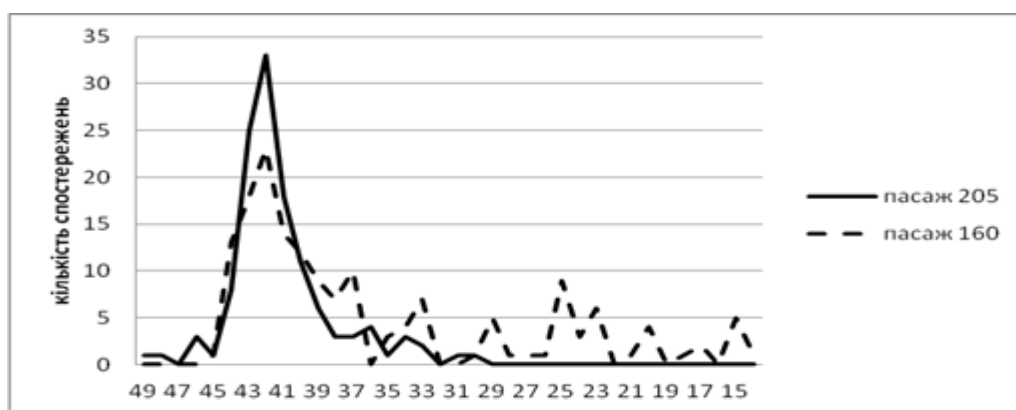


Рис. 4.5. Розподіл клітин лінії 4BL за кількістю хромосом на 160-му і 205-му пасажах культивування. По вісі абсцис –кількість хромосом, по вісі ординат – кількість зареєстрованих випадків.

Лише на 160-му пасажі відмічено вірогідну появу клітин із кількістю 37 та 25 хромосом (6,2 % і 5,6 % при 2,4 % і 0 % відповідно на 205-му пасажі, $P=0,05$), тоді як частка клітин із кількістю 30–38 та 45–49 хромосом опинились за межами 95 % ймовірності безпомилкових прогнозів (0,6–4,4 % м.п.) (табл. В.1.). Отже, 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 у співвідношенні 1,3 : 1. Це дозволяє вважати клітини із кількістю 42–43 хромосоми найвірогіднішим модальним класом каріотипу клітинної лінії 4BL на 160-му і 205-му пасажах культивування. Порівняно низька частка інших класів біядиплоїдних клітин робить сумнівною

наявність додаткового модального клону і дозволяє їх трактувати як клітини з анеуплоїдним каріотипом.

Оскільки частка клітин вірогідного модального класу (42–43 хромосоми) на 160-му і 205-му пасажах культивування склала 25,3 % і 46,4 %, то частка анеуплоїдних клітин склала 74,7 % і 53,6 %, відповідно. В структурі анеуплоїдії відмічено гіпер- і гіподиплоїдію. Редукція числа гіподиплоїдних клітин на 205 пасажі відбулася завдяки зникненню білягаплоїдних клітин.

Відомо, що випалювання фіксатору з метою кращого розкиду хромосом збільшує ймовірність їхньої втрати, що могло б сприяти збільшенню частки анеуплоїдних м.п. Проте, як показали порівняльні дослідження препаратів хромосом, виготовлених із клітин 160-го пасажу з випалюванням фіксатору та без нього, частка клітин із вмістом 14–29 хромосом залишалася репрезентативною (24,7 % та 30,1 % відповідно). Отже, технічні умови приготування препаратів хромосом не можуть бути причиною повної відсутності білягаплоїдних клітин на препаратах 205-го пасажу, а їх зникнення вірогідно відображає зміни каріотипу клітин лінії 4BL упродовж культивування від 160 пасажу.

Таким чином, каріотип із кількістю 42-43 хромосоми – це найбільш вірогідний модальний клас білядиплоїдного клону клітин 4BL на 160-му пасажі, який продовжує відтворюватися на 205-му пасажі. Типовою ознакою клітин 4BL на обох досліджених пасажах культивування є високий рівень гіподиплоїдної анеуплоїдії, який демонструє тенденцію до зменшення на 205-му пасажі за рахунок зникнення білягаплоїдних клітин.

4.2.3. Хромосомні аберації в білядиплоїдних клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі

Для з'ясування кількісних і структурних змін хромосом клітин даної лінії провели детальний каріотипічний аналіз з використанням диференційного GTG-зabarвлення. Для того, щоб нівелювати ефект гіподиплоїдної анеуплоїдії, обмежились аналізом м.п. із кількістю 41–44 хромосоми, які склали 67 % всіх

біядиплоїдних клітин на 205-му пасажі. На рисунку 4.6 наведено приклади найбільш типових хромосомних наборів в даних метафазних пластинках.

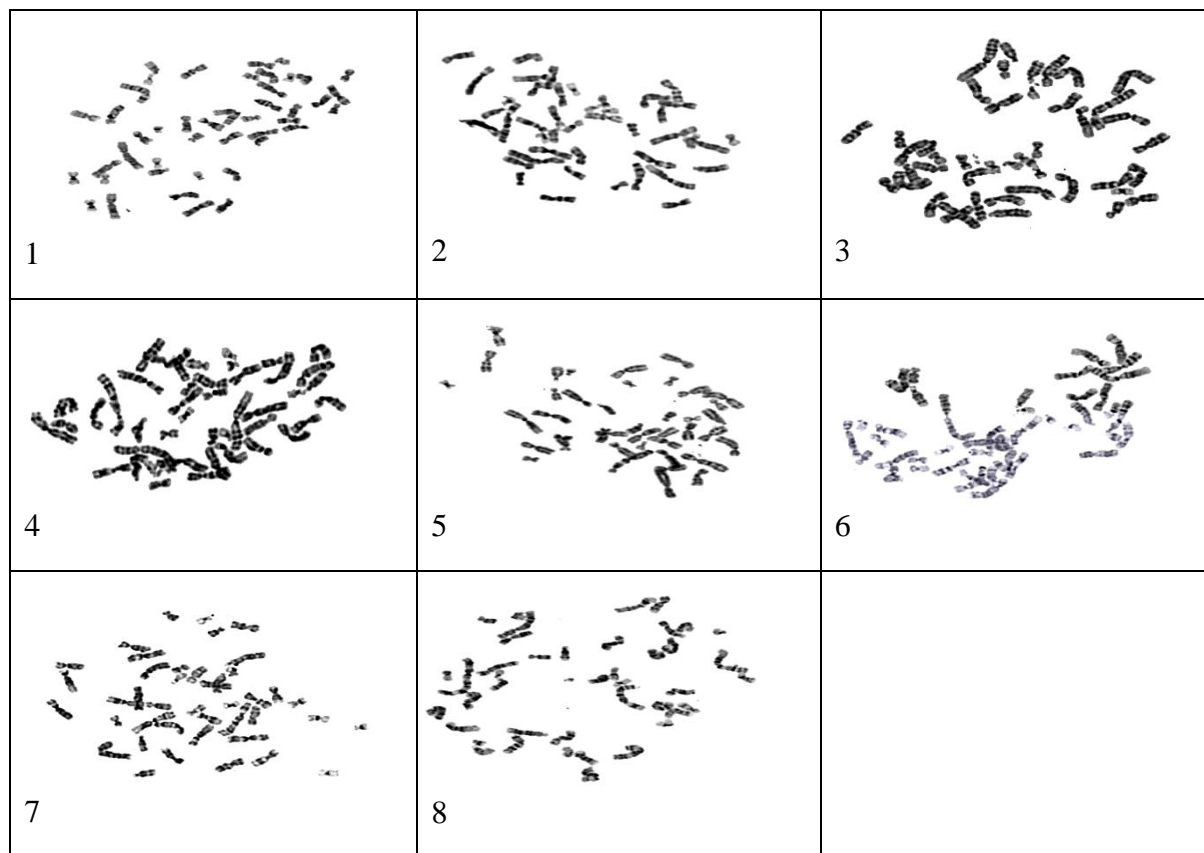


Рис. 4.6. Варіанти хромосомного набору в клітинах 4BL із кількістю 41–44 хромосом на 205 пасажі: 1 – 44,X, нулісомія 16, моносомія 4, 10, 11, 13, 17, 21, X, t(1;11); der(2), t(5;15), t(15;21), 6 маркерів-дериватів; 2 – 43,X, нулісомія 13, моносомія 4, 6, 10, 11, 15, 17, 19, 21, X; t(1;11), der(2), t(5;15), t(16;21), 6 маркерів-дериватів; 3 – 43,X, нулісомія 10 і 13, моносомія 4, 11, 15, 17, 21, X; t(1;11), der(2), t(5;15), t(16;21), 6 маркерів-дериватів; 4 – 43,X, нулісомія 13, моносомія 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, X; t(1;11), der(2), t(12;15), t(16;21), 6 маркерів-дериватів; 5 – 42,X, нулісомія 10 і 13, моносомія 4, 8, 11, 15, 17, 21, X; t(1;11), der(2), t(12;15), t(16;21), 6 маркерів-дериватів; 6 – 42,X, нулісомія 8 і 13, моносомія 4, 10, 11, 15, 17, 21, X; t(1;11), der(2), t(12;15), t(16;21), 6 маркерів-дериватів; 7 – 41, X, нулісомія 5 і 13, моносомія 10, 14, 15, 17, 21, X; t(1;11), der(2), t(12;15), t(16;21), 6 маркерів-дериватів; 8 – (2) 41,X, нулісомія 11 і 13, моносомія 4, 8, 10, 15, 17, 21, X; t(1;11), der(2), t(3;11), t(12;15), t(16;21), 6 маркерів-дериватів

Результати проведеного аналізу вказують на варіабельність складу хромосом навіть в тих клітинах, які містять їх однакову кількість. Спільними рисами каріотипу для всіх проаналізованих випадків виявились моносомія за хромосомою X, відсутність одного або двох гомологів пар хромосом 10 і 13, а також моносомія хромосом 4, 8, 11, 15, 17 та 21. Важливо зазначити, що «відсутній» гомолог пар хромосом 11, 15 і 21 переважно приймав участь у транслокаціях з хромосомами 1, 5, 12 або 16: $t(1;11)(q12;p15)$, $t(5;15)(q10;p10)$; $t(12;15)(p10;q10)$, $t(16;21)(q13;p11)$. У 2-й парі хромосом часто виявляли нормальний гомолог і $del(2)(p11\sim12)$ (рис. 4.7, 4.8).

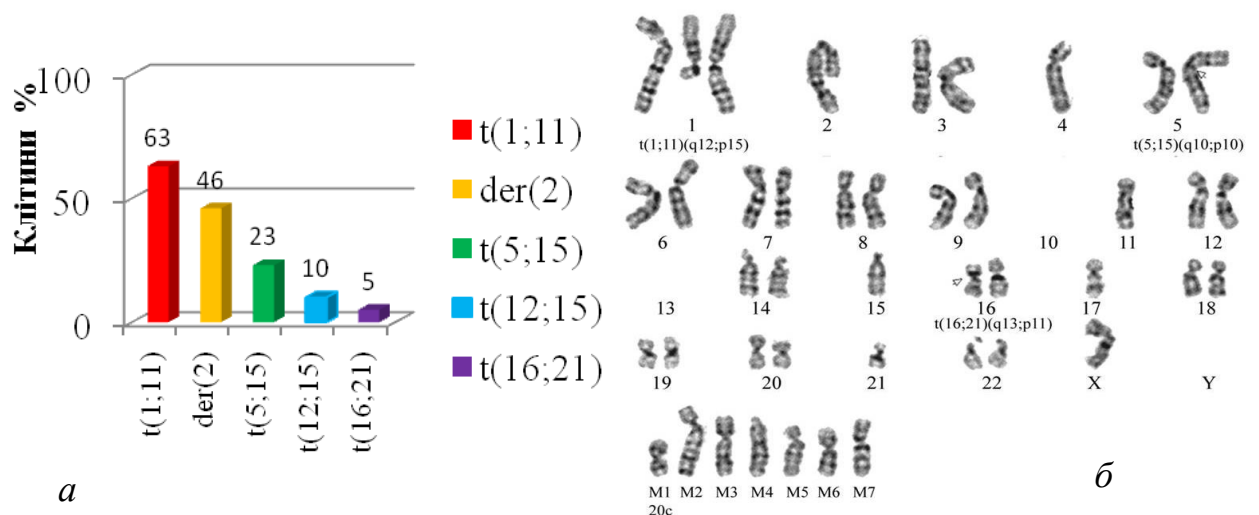


Рис. 4.7. Типові хромосомні абертації, виявлені за допомогою диференційного забарвлення в клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі: *а* – відсоток в популяції, *б* – каріограма типової метафазної пластинки: каріотип 43, X; моносомія хромосом 2, 4, 11, 15, 17, 21, X; нулісомія 10 і 13; $t(1;11)(q12;p15)$; $t(5;15)(q10;p10)$; $t(16;21)(q13;p11)$; сім маркерних хромосом (M1-M7): M1 – $der(5p)?$, M2 – $der(10)t(10;16;?)(q22;q24;q10;?)?$, M4 – $del(2)(p11\sim12)?$, M6 – $del(10)(q26.11qter)?$, M3, M5, M7 – не ідентифіковані. Стрілками позначено ділянки окремих перебудов

Моносомія 4-тої пари поєднувалась із ймовірною $\text{del}(4)(\text{q}24\text{qter})$. Транслокація $\text{t}(5;15)(\text{q}10;\text{p}10)$ супроводжувалася наявністю деривата з можливим вмістом матеріалу її коротких плеч – $\text{der}(5\text{p})$. При цьому, транслокації $\text{t}(5;15)(\text{q}10;\text{p}10)$ і $\text{t}(12;15)(\text{p}10;\text{q}10)$ ніколи не виявляли одночасно в одній клітині. Відсутність пари хромосоми 10 можна пояснити її делецією – $\text{del}(10)(\text{q}26.11\text{qter})$ і/або утворенням складної транслокації – $\text{der}(10)(\text{t}(10;16;?)(\text{q}22;\text{q}24\text{q}10;?))$ (рис. 4.8, рис. 4.9, в). У всіх наведених метафазних пластинках виявлено 6 маркерних хромосом, які вірогідно містять матеріал хромосом 4, 5, 6, 8, 10, 13, 17, X, за якими часто спостерігається моносомія.

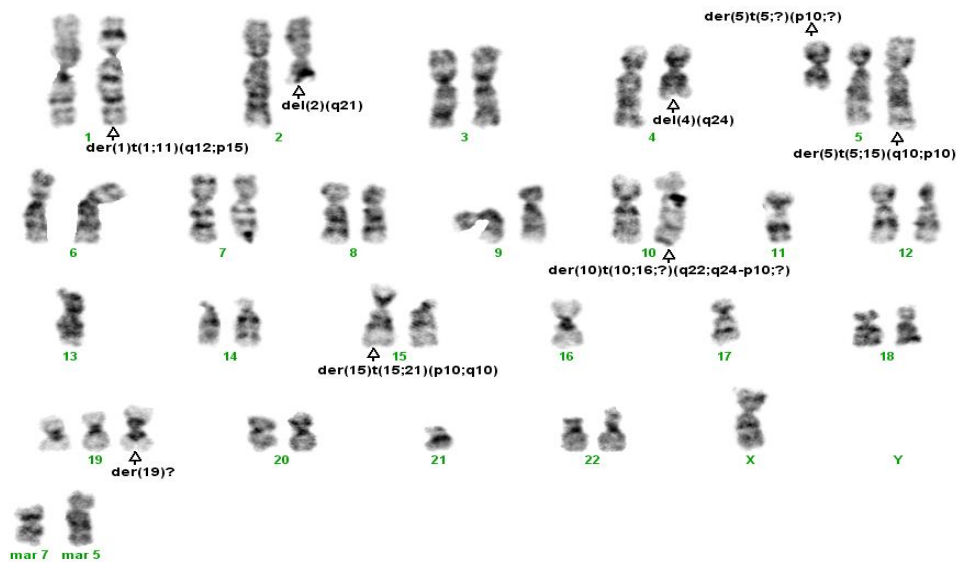


Рис. 4.8. GTG-аналіз клітин лінії 4BL, 205-й пасаж. Каріотип 44, X, моносомія хромосом 11, 13, 16, 17, 21, X; $\text{der}(1)\text{t}(1;11)(\text{q}12;\text{p}15)$; $\text{del}(2)(\text{q}21)$; $\text{del}(4)(\text{q}24)$; $\text{der}(5)\text{t}(5;?)(\text{p}10;?)$; $\text{der}(5)\text{t}(5;15)(\text{q}10;\text{p}10)$; $\text{der}(10)\text{t}(10;16;?)(\text{q}22;\text{q}24\text{-p}10;?)$; $\text{der}(15)\text{t}(15;21)(\text{p}10;\text{q}10)$; $\text{der}(19)?$; дві маркерні хромосоми. Стрілками позначені хромосоми, які зазнали перебудов

Незважаючи на наявність обох гомологів 19-тої пари, часто реєстрували маркерну хромосому, ймовірно $\text{der}(19)$ (рис. 4.9, д). Також, знаходили поодинокі випадки $\text{t}(3;11)(\text{p}25;\text{q}25)$, $\text{der}(8)$ і чотири неідентифіковані нами маркерні хромосоми з можливим вмістом генетичного матеріалу хромосом 4, 6,

13, 15 і 17. Отримані дані свідчать, що класичний GTG-аналіз на рівні 400–500 бендів є недостатнім для об'єктивного визначення більшості хромосомних перебудов, які відбулися в клітинній лінії 4BL (205-й пасаж). Із цією метою слід застосувати техніку FISH та порівняльну геномну гібридизацію (array CGH аналіз).

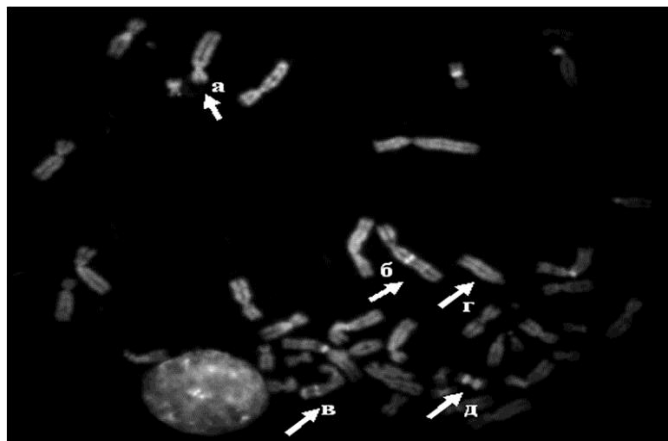


Рис. 4.9. Типові хромосомні перебудови в клітинах лінії 4BL, 205-й пасаж. Забарвлення QFH/AsD. Стрілками позначені: а – $\text{del}(1)(\text{q}21.1\text{q}44)$, б – $\text{t}(1;11)(\text{q}12;\text{p}15)$, в – $\text{der}(10)(\text{t}(10;16;?)(\text{q}22;\text{q}24\text{q}10;?)?)$, г – $\text{del}(2)(\text{p}11\sim 12)$, д – $\text{der}(19)$

У (табл. Д.1 в Додатку Д) наведено результати визначення частки виявлених хромосомних аберацій каріотипу клітин лінії 4BL на 205-му пасажі та проаналізовано їх розподіл у 100 м.п. в залежності від кількості хромосом в біядиплоїдних клітинах. Транслокацію між хромосомами 1 і 11 – $\text{t}(1;11)(\text{q}12;\text{p}15)$ – спостерігали у 63% м.п. Делецію першої хромосоми – $\text{del}(1)(\text{q}21.1\text{q}44)$, яка утворилася внаслідок даної перебудови, виявили в такій же кількості клітин, що підтверджує збалансованість набору першої пари хромосом. Більшість клітин із $\text{t}(1;11)(\text{q}12;\text{p}15)$ мали 39–44 хромосоми (50 з 63 або 79,4 %), а серед них переважали клітини із кількістю хромосом 43 або 42 (31 з 50 або 62 %) у співвідношенні 1,5 : 1.

Делецію хромосоми 2 – $\text{del}(2)(\text{p}11\sim 12)$ – виявили у 46% біядиплоїдних і в більшості тетраплоїдних клітин (в двох копіях). Більшість клітин з

del(2)(p11~12) містили 39–44 хромосоми (34 з 46 або 73,9 %), більшість з них – 43 або 42 хромосоми (18 з 34 або 52,9 %) у співвідношенні 1,5 : 1.

Транслокацію між хромосомами 5 і 15 – t(5;15)(q10;p10) – спостерігали у 23% білядиплоїдних клітин (табл. Д.1 в Додатку Д). Як і у вищезгаданих випадках, такі клітини переважно містили 39–44 хромосоми (18 з 23 або 78,3 %), більшість з них – 43 або 42 хромосоми (12 з 18 або 66,7 %) у співвідношенні 2 : 1. Частка t(12;15)(p10;q10) у білядиплоїдних клітинах становила 10%, причому половину всіх випадків зареєстровано у м.п. з набором 43 або 42 хромосоми у співвідношенні 1 : 1,5 (табл. Д.1 в Додатку Д). Слід зазначити, що t(5;15)(q10;p10) і t(12;15)(p10;q10) жодного разу не зареєстровано в одній клітині одночасно. У 5% м.п. знайдено транслокацію між хромосомами 16 і 21 – t(16;21)(q13;p11), причому три з таких клітин мали 42 хромосоми в каріотипі (1 – 43, 1 – 39 хромосом).

4.2.3.1. Характер асоціації хромосомних аберацій. Ми також дослідили характер асоціацій виявлених хромосомних аберацій у білядиплоїдних клітинах 4BL на 205-му пасажі. У 1 % м.п. не виявили жодної хромосомної аберації. У 14 % клітинах зареєстровано вибіркочу присутність t(1;11)(q12;p15), у 5 % – del(2)(p11~12), у 39 м.п. вони виявлялися одночасно. Беручи до уваги, що del(2)(p11~12) зареєстровано у 46 білядиплоїдних клітин, випадки її асоціації з t(1;11)(q12;p15) складають 84,8% (39 з 46 м.п.).

Такі аберації хромосом як 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)(p11~12). Так, t(5;15)(q10;p10) у 9 з 23 виявлених випадків поєднувалась з t(1;11)(q12;p15), в 1-му – лише з del(2)(p11~12), у 13 – з обома згаданими хромосомними абераціями. З п'яти виявлених випадків t(16;21)(q13;p11) лише в одному спостерігалась її вибіркоча асоціація з del(2)(p11~12), тоді як в решті клітин одночасно відмічали присутність t(1;11)(q12;p15), del(2)(p11~12) та t(5;15)(q10;p10). Лише в одному з десяти виявлених випадків t(12;15)(p10;q10) вона зустрічалась ізольовано, тоді як в дев'яти випадках одночасно виявлялась

t(1;11)(q12;p15). Жодного разу не спостерігали одночасної наявності в хромосомному наборі t(5;15)(q10;p10) і t(12;15)(p10;q10).

Таким чином, у клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі найпоширенішими хромосомними абераціями були t(1;11)(q12;p15) і del(2)(p11~12), частка яких становила 63 % і 46 % досліджених м.п., відповідно, з однаковим розподілом кількості хромосом у каріотипі. Більшість біядиплоїдних клітин, в яких виявлялися t(1;11)(q12;p15) та/або del(2)(p11~12) мали 39–44 хромосоми (79,4 % і 73,9 % м.п. відповідно), а переважна більшість з них (62 % і 53 % відповідно) – 43 або 42 хромосоми. Третє місце за поширеністю займала t(5;15)(q10;p10), яку спостерігали у 23 % біядиплоїдних клітин, з яких 78,3 % містили 39–44 хромосоми, з них переважна більшість (66,7 %) – 43 або 42 хромосоми. Найменш репрезентативними хромосомними абераціями були t(12;15)(p10;q10) і t(16;21)(q13;p11), які виявляли у 10 % і 5 % біядиплоїдних клітин, відповідно, причому більшість з них мали 42–43 хромосоми в каріотипі. Отже, всі визначені нами аберації клітинної лінії 4BL на 205-му пасажі переважно виявлялись в біядиплоїдних клітинах із набором 43 або 42 хромосоми. Варто зазначити, що співвідношення за кількістю реєстрації хромосомних аберацій переважало у клітинах з набором 43 хромосоми (1,5–2 : 1), а відсоток виявлених у них хромосомних перебудов був принаймні на 37 % вищий, ніж у клітинах з набором 42 хромосоми. Отже, окреслюючи кількість хромосом у каріотипі як 42–43, ми припускаємо можливість, що утворення набору із 42 хромосом може бути ефектом гіподиплоїдної анеуплоїдії, а 43 хромосоми більш вірогідно відповідають модальному класу клітинної лінії 4BL на 205-му пасажі.

4.2.3.2. Маркерні хромосоми. В клітинах 4BL на 160 пасажі було виявлено стабільну присутність довгої акроцентричної хромосоми типу Dq+, яка зустрічалась майже в 90% досліджених м.п. Подібну хромосому виявлено на 205 пасажі, і за допомогою диференційного забарвлення ідентифіковано як дериват хромосоми 2 пари з високою делецією коротких плеч – t(2;?)(q11;?). Поряд із del(2)(p11), не випадково часто реєструвалися ще 3 маркери:

субметацентрик «типу С», метацентрик «типу F з гетерохроматином», подібний на 19, а також метацентрик «типу F без гетерохроматину». Поряд з ними зустрічались й інші маркерні хромосоми (загалом, 4–5 на хромосомний набір). Згадані маркерні хромосоми є вірогідно результатом складних перебудов із залученням декількох хромосом, а їх ідентифікація потребує застосування багатоколірного FISH аналізу.

При каріотипуванні регулярно реєстрували моносомію четвертої, одинадцятої, п'ятнадцятої і сімнадцятої пар хромосом (рис. 4.6, 4.7). Застосування молекулярно-цитогенетичної техніки FISH Cytocell OctoChrom 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. 4.10). 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 – $t(17;?)(q12;?)$.

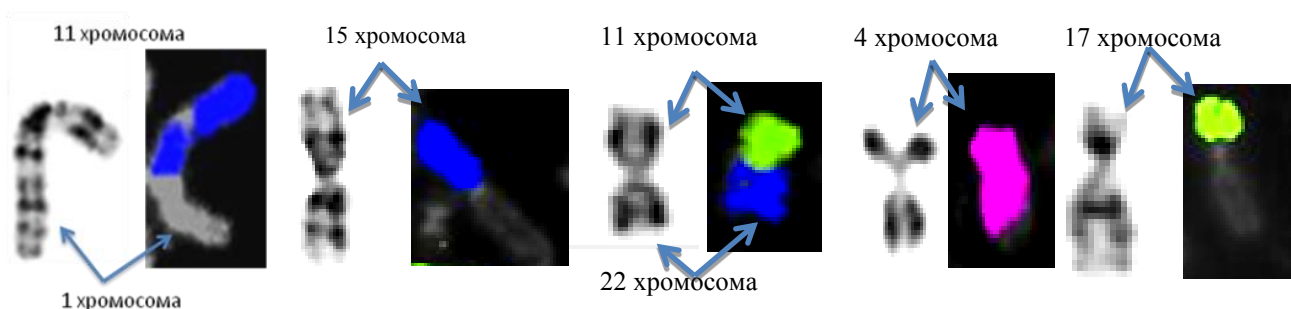


Рис. 4.10. Ідентифікація хромосомних аномалій за допомогою молекулярно-цитогенетичної техніки FISH Cytocell OctoChrom

4.2.4. Каріотип поліплоїдних клітин лінії 4BL

Оскільки у клітинах лінії 4BL спостерігали значне зростання рівня поліплоїдії з 2,8% м.п. на 160-му пасажі до 36 % м.п. на 205-му пасажі, постало питання, чи змінилася структура розподілу поліплоїдних клітин із різним каріотипом у популяціях досліджених пасажів. Серед виявлених поліплоїдних

клітин домінували білятетраплоїди: 78,6% і 86,1 % на 160-му та 205-му пасажі, відповідно (рис. 4.11, а). В структурі тетраплоїдії на 205-му пасажі виявили 82,3% (51 з 62 м.п.) з набором 80-85 хромосом, 14,5 % (9 м.п.) гіпотетраплоїдів з редукцією числа хромосом до 72–78 та 3,2 % (2 м.п. – табл. 4.3) тетраплоїдів із кількістю хромосом 95–96. Поряд із чотирма тетраплоїдами, на 160-му пасажі також зареєстровано один випадок біляпентаплоїдії, а на 205-му – єдиний білягексаплоїд і 12,5 % (9 з 72 м.п.) білятриплоїдних клітин, яких не спостерігали на 160-му пасажі (рис. 4.11, б). Отже, явище тетраплоїдії домінує в структурі поліплоїдії на обох досліджених пасажах, а відмінності у його проявах стосуються вірогідного зростання частки тетраплоїдії та появи пулу триплоїдних клітин на 205-му пасажі культивування. Отримані результати узгоджуються з даними наших попередніх досліджень нових клітинних ліній ембріональних гермінативних клітин миші, які характеризувались каріотипічною гетерогенністю на різних пасажах культивування із домінуванням клітин високої плоїдності, зокрема, біляпента- і білягексаплоїдів [117]. Для однієї із клітинних ліній миші показано тривалий етап становлення (понад 140 пасажів), подібно як це мало місце у клітинах лінії 4BL людини.

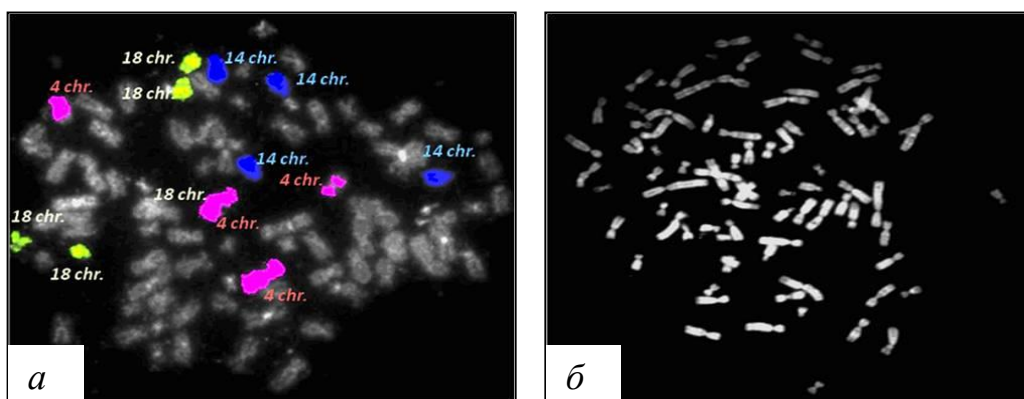


Рис. 4.11. Приклади поліплоїдії у клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі: *а* – тетраплоїд (техніка FISH Cytocell OctoChrom); *б* – триплоїд (забарвлення QFН/AsD). Позначення: chr – хромосома. Збільшення 1000х

Таким чином, механізми каріотипічної еволюції клітин лінії 4BL людини потребують подальших досліджень на засадах сучасної геноміки і протеоміки. Визначені в даному дослідженні числові і структурні аномалії хромосом в

комплексі з попередніми результатами аналізу array CGH дозволяють припустити чисельні події втрати гетерозиготності, які могли б ініціювати розвиток поліплоїдії і супутні процеси деполіплоїдизації. Наступний етап досліджень буде присвячено поглибленому аналізу генів, локалізованих в ділянках хромосомних перебудов, в контексті відомих механізмів трансформації каріотипу.

Спільними рисами каріотипу клітин 4BL на 160-му і 205-му пасажах виявились модальний клас чисел хромосом (42–43) і високий рівень гіподиплоїдної анеуплоїдії, який демонстрував тенденцію до зменшення на 205-му пасажі за рахунок зникнення біягаплоїдних клітин. Частка поліплоїдних клітин в динаміці культивування зростає з 2,8 % до 36 %. Визначено типові числові і структурні хромосомні аберації, які потребують уточнення за допомогою молекулярно-цитогенетичного аналізу. Клітинна лінія 4BL може бути моделлю для подальших досліджень процесів адаптації стовбурових клітин людини до умов культивування, а також для визначення напрямків і механізмів каріотипічної еволюції в умовах *in vitro*.

4.3. Ультраструктурні зміни каріотипу, виявлені за допомогою array CGH

Як було зазначено вище, при аналізі GTG-забарвлених метафазних пластин на рівні 400–500 бендів, не у всіх випадках вдається визначити походження маркерних хромосом, які виникають внаслідок складних перебудов. Тому, з метою диференціації кількісних змін (втрати або надлишку) матеріалу певної хромосоми від його наявності в похідних або маркерних хромосомах було застосовано автоматичний аналіз – мікроаррей-порівняльну геномну гібридизацію або arrCGH. Метод arrCGH володіє кращою роздільною здатністю та дозволяє провести одночасно скринінг усього геному [277-279]. Проте варто пам'ятати, що результати, отримані за допомогою цього методу, дозволяють візуалізувати лише незбалансовані хромосомні аберації і

відображають інтегральні результати аналізу клітинної популяції [278, 280]. Таким чином, саме застосування сукупності методів дозволяє досягти найкращих результатів.

Відомо, що в процесі каріотипічної еволюції клітини проходять два етапи: стадію становлення, що характеризується значними хромосомними змінами і генетичною нестабільністю, та стадію стабілізації. В даній роботі проведено порівняльний аналіз 205-го пасажу, на якому клітинна лінія 4BL вже знаходиться на стадії стабілізації, та більш ранніх 120-го і 160-го пасажів. Відмічена при каріотипуванні анеуплоїдія хромосом 4, 10, 13, 17 була підтверджена методом aCGH на рівні ідентифікації часткових моносомій (рис. 4.12).

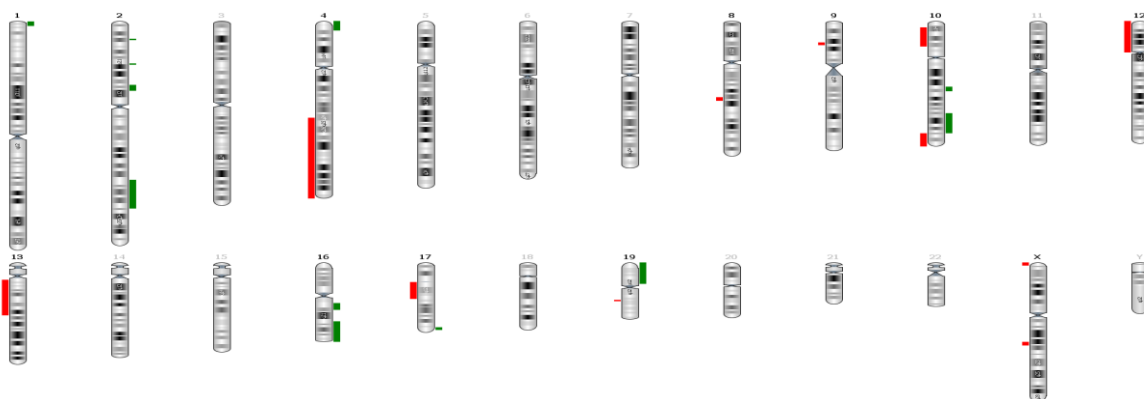


Рис. 4.12. Ідіограма профайлу array CGH клітин лінії 4BL на 205-му пасажі. Зліва червоним вказано делеції, а справа зеленим – дуплікації

Порівнюючи структуру хромосомних аберацій на пізньому 205-му та більш ранніх 120-му та 160-му пасажах, можна зауважити, що більшість виявлених перебудов з'явилися вже на 120-му пасажі (рис. 4.13).

При порівнянні 120-го та 160-го пасажів спостерігається однакова картина аберацій за 4, 10, 12, 13, 16 і 19 хромосомами (рис. 4.13, рис. 4.14). При цьому, на 160-му пасажі виявлено нові дуплікації 1, 3, 6 і 8 хромосом (1p32.3, 3p22.3і 3p21.33-p21.31, 6q13-q14.1, 6q25.2-q25.3, 8p11.21-p11.1) та делецію Хр22.32-p22.31, але всі вони не виявлені на момент досягнення культурою 205-

го пасажу. На 120-му пасажі є мінорні аберації, які вже не виявляються на 160-му та 205-му пасажах: del 1p32.2 та дуплікації 5q14.1, 5q15, 7q34, 11p15.2, 15q11.2-q13.1.

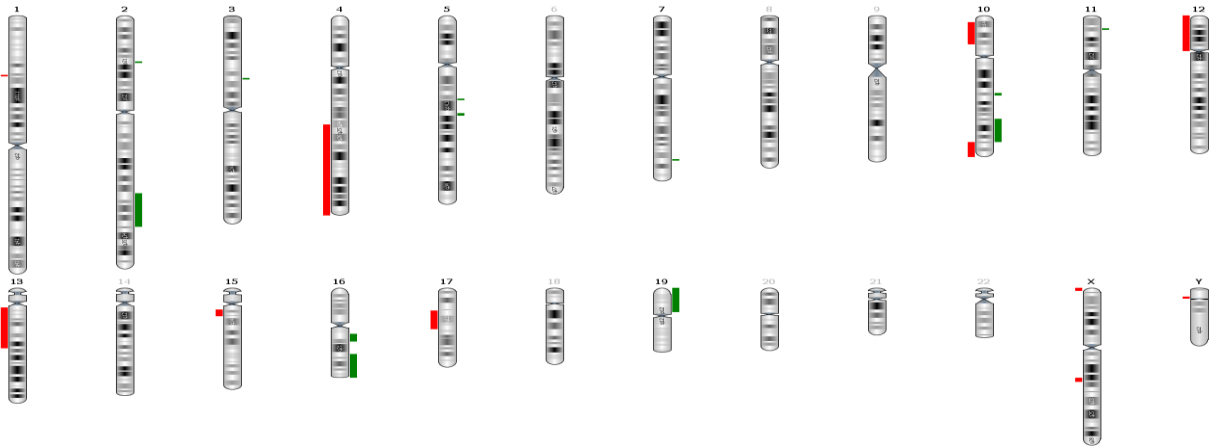


Рис. 4.13. Ідіограма профайлу arraу CGH клітин лінії 4BL на 120-му пасажі. Зліва червоним вказано делеції, а справа зеленим – дуплікації

Варто відмітити, що більшість виявлених хромосомних аномалій на всіх досліджуваних пасажах є мозаїчними, що свідчить про існування в популяції лінії 4BL гетерогенних клонів клітин.

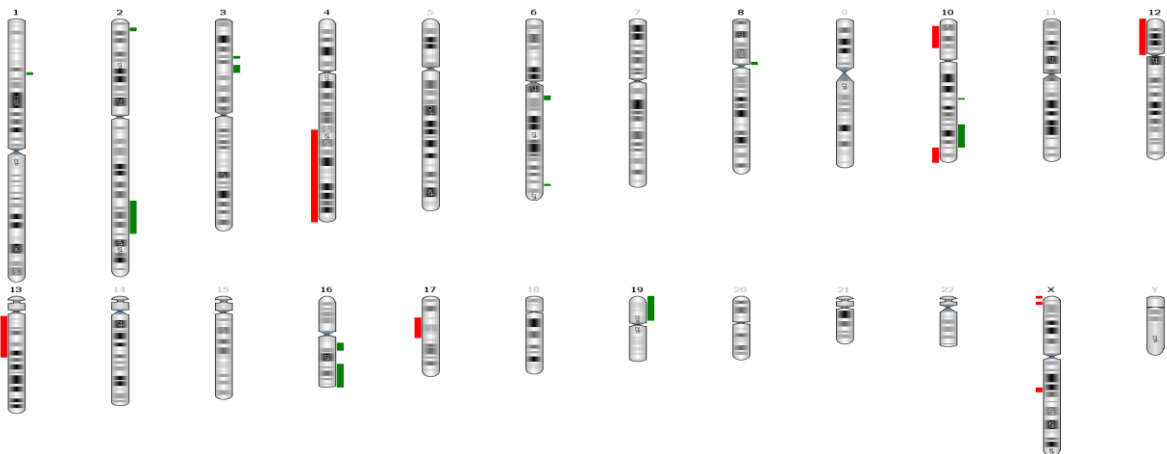


Рис. 4.14. Ідіограма профайлу arraу CGH клітин лінії 4BL на 160-му пасажі. Зліва червоним вказано делеції, а справа зеленим – дуплікації

Оскільки ДНК аналіз передбачає дослідження сумарної фракції ДНК, отриманої з культивованих клітин, а не генетичного матеріалу окремих клітин, то явище культурального мозаїцизму має бути враховане при інтерпретації даних. Однак, можливості порівняльної геномної гібридизації не дозволяють провести абсолютну оцінку величини цього явища. Підтверджено, що аберації, які виявляються на 160-му пасажі *de novo*, зникають в подальшому. Ймовірно, це мутантні клони клітин, які не дають переваг при культивуванні і тому елімінуються до 205-го пасажу.

На основі отриманих даних можна зробити висновок, що основні перебудови генетичного матеріалу відбулись до 120-го пасажу, що свідчить про те, що клітинна лінія 4BL пройшла основний етап становлення до цього часу. Проте це не значить, що еволюція каріотипу зупинилась: зміни відбуваються і далі, але вони не настільки значні. Так, на 205-му пасажі з'являються нові аберації, не притаманні для попередніх етапів культивування клітинної лінії 4BL, а саме: дуплікації окремих ділянок 1, 4, 17 хромосом та делеції по 8, 9 та 19 хромосомам (розмір найбільшої трохі перевищує 4 Mb) (рис. 4.12). Спостерігали цікаву ситуацію по 2 хромосомі: в усіх трьох проаналізованих нпасажах виявили найбільшу з дуплікацій – 2q31.1-q33.1; а на 120-му та 205-му пасажах детектували *dup2p21*, яка не визначалася на 160-му пасажі. В якості пояснення ми припускаємо, що у такий спосіб відбирається оптимальна комбінація генів, локалізованих в даній хромосомі: залишається значна дуплікація та відбувається селекція більш малих. Також це може бути свідченням складних еволюційних процесів, що відбулися в другій хромосомі, внаслідок чого частина набутого генетичного матеріалу опинилася у складі деривату, а решта, вірогідно, увійшла до складу інших маркерних хромосом. Ознаками стадії стабільності клітинної лінії 4BL безумовно можна вважати перебудови, які спостерігалися від 120-го і до 205 пасажу, а саме: дуплікації хромосом 2, 10, 16 і 19 та делеції 4, 10, 12, 13, 17 і X.

Найбільш регулярно при застосуванні класичного цитогенетичного аналізу спостерігалась X-моносомія, яка реєструвалася методом порівняльної

геномної гібридизації у понад ніж 80% клітин 4BL на 205 пасажі (mos 45,X [$>80\%$]/46,XX [$<20\%$]). Випадки інших анеуплоїдій виявились, за даними arrCGH, значно менш поширеними, проте достатньо репрезентативними, щоб припустити клональну гетерогенність клітинної лінії 4BL на 205 пасажі. Ідентифікація структурних перебудов певним чином змінила наші уявлення про анеуплоїдію в культурі 4BL на 205 пасажі. Завдяки тому, що особливості структурної організації хромосом в клітинах лінії 4 BL досліджено з використанням методів класичного диференційного забарвлення (GTG, QFH/AcD), техніки FISH («Cytocell OctoChrom») і порівняльної геномної гібридизації (arrCGH), виявлено, що деякі хромосоми, визначені як «відсутні» увійшли до складу транслокацій або маркерів. Регулярне відтворення комплексних хромосомних аберацій на різних пасажах культивування свідчить про те, що вони можуть надавати селективну перевагу клітинам. Нами було зроблена спроба проаналізувати за допомогою бази даних псбі гени, що містяться в ділянках цих перебудов. Для аналізу ми обрали найпізніший з досліджених пасажів – 205-ий, оскільки за даними цитогенетичного аналізу, клітинна лінія 4BL перебуває на ньому на стадії стабілізації. На рисунку 4.15 подано загальний вигляд array CGH аналізу клітин лінії 4BL на 205-му пасажі по всім хромосомам.

Переважну втрату генетичного матеріалу при одночасних незначних дуплікаціях ДНК виявили у хромосомах 4 і 17. Вибіркову втрату значної кількості генетичного матеріалу спостерігали у хромосомах 12 і 13, незначної – 8, 9 і X (рис. 4.15). Вибіркові значні дуплікації ДНК визначено у хромосомах 2, 16, 19, незначні – у хромосомі 1. В десятій хромосомній парі спостерігали великі делецію і дуплікацію практично однакових за розміром.

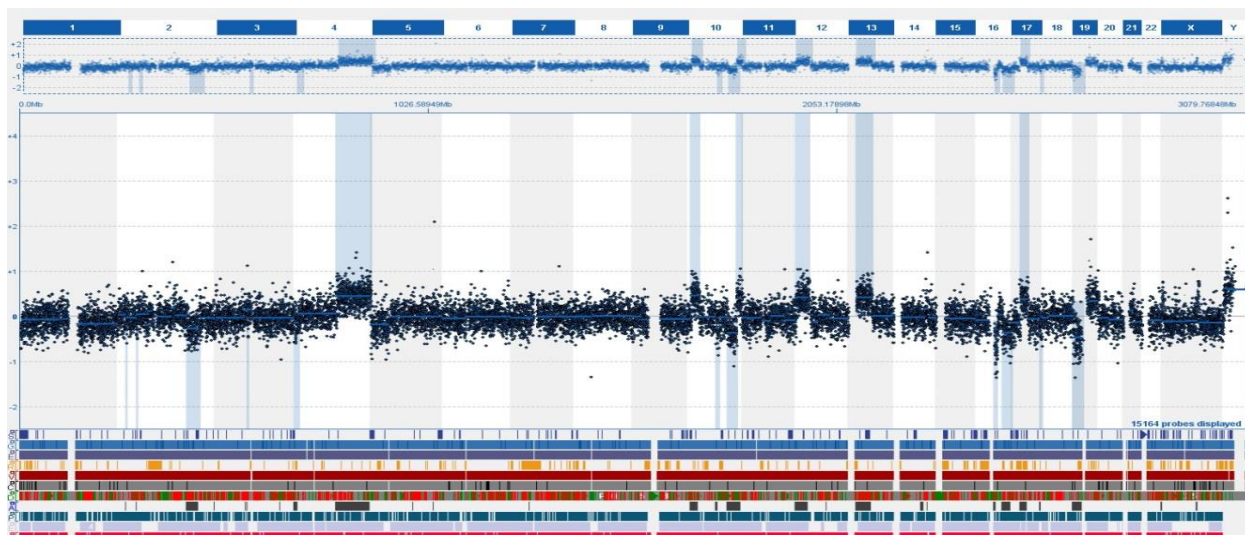


Рис. 4.15. ДНК-діагностика структурних хромосомних аберацій і анеуплоїдії у клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі методом порівняльної геномної гібридизації (OGT CytoSure Interpret Software / CytoSure Aneuploidy array 15K). Симетрична локалізація сегментів гомологічних хромосом вказує на збереження балансу ДНК. Відмінність між гомологічними хромосомами (із зсувом сегментів до низу вказує на наявність дуплікації, зсув вгору – делеції/метилування)

Група А

Хромосома 1. При застосуванні диференційного забарвлення хромосом практично в усіх клітинах знаходили єдину хромосому першої пари з нормальною структурою і два деривати із вмістом генетичного матеріалу 1 хромосоми. Один з дериватів являв собою продукт транслокації короткого плеча 11 хромосоми на довге плече 1 хромосоми: $t(1;11)(q12;p15)$ (рис. 4.7, 4.8). Другий дериват – це фрагмент короткого і частини довгого плеча 1 хромосоми, який залишився після утворення вище згаданої транслокації – $del(1)(q21.1q44?)$ (рис.4.9. а). За даними aTCGH, незважаючи на виразні просторові зміни одного з гомологів, баланс генетичного матеріалу першої хромосомної пари виявився практично збережений, за винятком дрібних структурних змін короткого плеча:

субтеломерної дуплікації ділянки (1)(p36.32pter) і делеції в ділянці (1)(p21.1p21.2) (рис. 4.16).

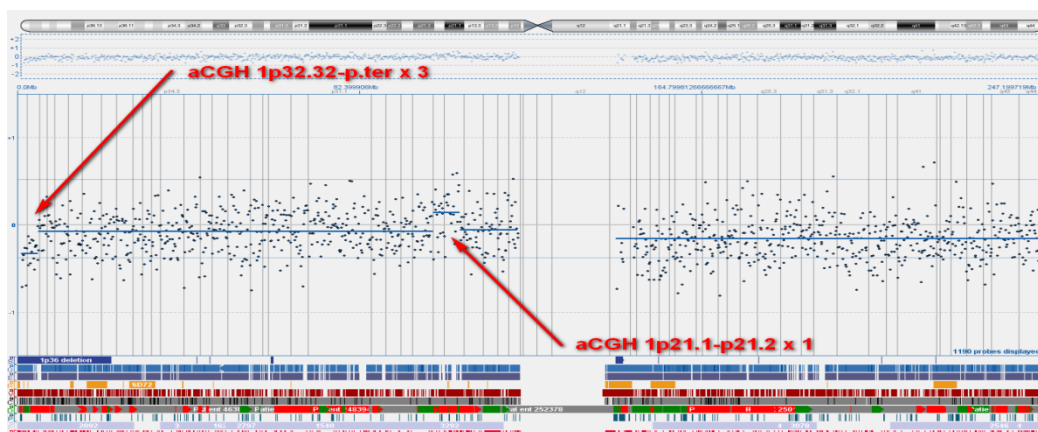


Рис. 4.16. Хромосома 1. Порівняльна геномна гібридизація. Дуплікація ділянки p36.32pter, делеція ділянки p21.1p21.2

У ділянці дуплікації (1)(p36.32pter) розташовані два онкогена, з них SKI v-ski sarcoma viral oncogene homolog та п'ять генів онкосупресорів: tumor necrosis factor receptor superfamily: TNFRSF member 4, 14, 18; TPRG1L та TP73. Більша кількість онкосупресорів дає клітинам змогу еліминувати клітини, які стали на шлях злоякісної трансформації. В даній ділянці розташовані також гени: MXRA8 – matrix-remodelling associated 8, MMP23B matrix metalloproteinase 23B, а також ген NAD kinase, що дозволяє підтримувати енергетичний метаболізм. У ділянці дуплікації (1)(p36.32pter) містяться гени, білки яких залучені у сигнальних системах клітини: AURKAIP1 – aurora kinase A interacting protein, CCNL2 cyclin L2, CDK11A cyclin-dependent kinase 11A, яка також приймає участь в апоптозі, PRKCZ protein kinase C, zeta; PLCH2 phospholipase C, eta 2, а також ген, залучений в апоптозі - DFFB DNA fragmentation factor, 40kDa - ДНК-аза, яка індукується каспазами.

Хромосома 2. В переважній більшості клітин реєстрували моносомію хромосоми другої пари та її нормальний гомолог. Перший гомолог виявився дериватом з високою делецією коротких плеч – $del(2)(p11\sim12)$ – за даними GTG, який спочатку був розцінений як маркер Dq+. За даними aCGH виявлено перебудови 2 хромосоми у вигляді трьох дуплікацій: одна з них – дуплікація субтеломерної ділянки довгого плеча 2q31.1q33.1 розміром 30,682 Mb (у 50–70% клітин), дві інші – дуплікації короткого плеча (2p24.1 і 2p21) розміром 0,60 та 0,71 Mb відповідно. Залишаються сумніви відносно ймовірних структурних перебудов 2 хромосоми (делеції/дуплікації на межі чутливості методу) в ділянках в ділянках 2p13.3, 2p12, 2p11.2 і 2q22.1 (рис. 4.17).

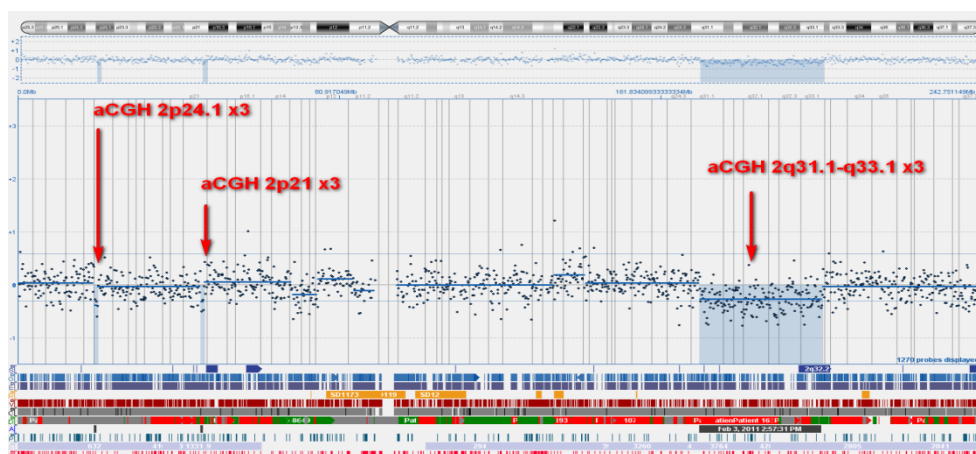


Рис. 4.17. Хромосома 2. Порівняльна геномна гібридизація. Дуплікація ділянок p24.1, p21, q31.1q33.1. Ймовірна дуплікація в ділянках p13.3, p11.2, p12, ймовірна делеція q22.1

У ділянці дуплікації 2 p21 міститься ген PRKCE protein kinase C, epsilon та ген EPAS1 endothelial PAS domain protein 1, залучений в індукцію експресії генів, що вмикаються при зниженому рівні кисню.

У ділянці можливої дуплікації 2 p 13.3 – p12 розташовані наступні гени: онкоген ANTXR1, онкосупресор MXD1, PAIP2B – інгібітор трансляції; TET3 tet methylcytosine dioxygenase 3 – метилування ДНК, DQX1 – АТФ-залежна РНК хеліказа, M1AP – meiosis 1 associated protein; POLE4 polymerase (DNA-directed),

epsilon 4 – ДНК транскрипція, реплікація і упакування. У даній ділянці містяться гени сигналіну: TGFA, EGR4 early growth response 4; TPRKB – p53-related protein kinase-binding protein; DUSP11 dual specificity phosphatase 11 – негативний регулятор MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38, які є мітогенними активаторами; STAMBIP - cytokine-mediated signaling for MYC induction and cell cycle progression; DOK1 (downstream of tyrosine kinase 1); гени апоптозу HTRA2 HtrA serine peptidase 2 і TIA1; а також маркери різних тканин: ACTG2 actin, gamma 2, smooth muscle, enteric; NAT8 N-acetyltransferase 8 – специфічно експресується в нирках і печінці; SEMA4F (semaphorin) – розвиток нервової системи та ген білку DCTN1, що відповідає за транспорт органел та везикул в клітині. Цікавим є також ген SLC4A5 (sodium bicarbonate cotransporter), що забезпечує транспорт натрій бікарбонату, який використовується для регулювання рН в культурі клітин. Отже, дана дуплікація є нейтральною для клітинної популяції в плані трансформації та проліферації, оскільки наявні як гени, що її стимулюють, так і гени, що негативно регулюють мітогенні сигнали, а також наявні гени апоптозу. Проте ця дуплікація може надавати селективну перевагу клітинам у культурі завдяки гену SLC4A5.

У ділянці дуплікації великого плеча 2 q31.1 - q33.1 містяться гени, задіяні у сигнальних шляхах: TLK1 – участь в організації хроматину; ZAK – бере участь у точці контролю клітинного циклу, має проапоптичну активність; PDE11A phosphodiesterase 11A – каталізує гідроліз цАМФ та цГМФ; PDE1A, calmodulin-dependent; PRKRA protein kinase, активується інтерфероном у відповідь на дволанцюгову РНК вірусів; PPP1R1C protein phosphatase 1; STAT1 signal transducer and activator of transcription 1, STAT4, PLCL1 – phospholipase C-like 1. Гени білків, пов'язані з хроматином та клітинним поділом: NAT1 histone acetyltransferase 1; NUP35 nucleoporin; PMS1 postmeiotic segregation increased 1 – залучена в репарацію неправильно спарених основ; NABP1 nucleic acid binding protein 1 – грає роль в процесах реплікації, рекомбінації, детекції загрози та репарації; ген точки початку реплікації - ORC2 origin recognition complex; транскрипційні фактори: GTF3C3 general transcription factor III C; SP3 –

може виступати як стимулятором, так і репресором транскрипції; ATF2 activating transcription factor; HOXD 1, 3, 4, 13 (homeobox) – залучені у морфогенезі; NFE2L2 nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 – активується у відповідь на пошкодження та запалення. Маркери диференціювання: NEUROD1; FRZB frizzled-related protein –регулятор розвитку кісткової тканини; CHN1 chimerin 1 - експресується в нейронах; TTN titin; COL3A1 collagen, type III, alpha 1; COL5A2 collagen, type V, alpha 2. Важливі ферменти: ATP5G3 ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C3; PPIL3 peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 3 – фолдінг олігопептидів; NDUFB3 NADH dehydrogenase (ubiquinone); а також ген білку, що активується на знижений вміст сироватки - SDPR serum deprivation response. У даній ділянці містяться ключові гени апоптозу: CFLAR CASP8 and FADD-like apoptosis regulator; CASP10 caspase 10, CASP8 caspase 8. Отже, дана дуплікація є надзвичайно корисною для популяції клітин лінії 4BL, оскільки в даній ділянці містяться гени репарації, важливих ферментів, ген білку, що дозволяє вижити клітинам в умовах зниженого вмісту сироватки в середовищі, ключові гени апоптозу, що дозволяє вилучати з популяції потенційно злоякісні клітини.

Хромосома 3. Хромосоми 3 пари переважно зберігали нормальне число і конституцію за виключенням спорадичного випадку транслокації з 11 хромосомою: t(3;11)(p25;q25). За даними arrCGH, єдине ймовірне порушення балансу ДНК третьої хромосоми пов'язане з дуплікацією дрібної ділянки короткого плеча 3p12.2 розміром лише 0,743 Mb, що перебуває на межі чутливості методу.

Таким чином, генетичний матеріал хромосом групи А виявився практично збережений, проте змінилася його просторова організація: одна з хромосом першої пари утворила транслокацію з 11 хромосомою – t(1;11)(q12;p15), один з гомологів другої пари зазнав втрати короткого плеча – del(2)(p11~12) з утворенням деривату; майже не зазнали структурних змін обидва гомологи 3 пари і по одній хромосомі 1 та 2 пар. Серед вірогідних структурних відмінностей хромосом групи А слід відзначити виявлену за

допомогою aCGH велику дуплікацію субтеломерної ділянки довгого плеча другої хромосоми $\text{dup } 2\text{q}31.1\text{--q}33.1$, а також порівняно невеликі аберації в ділянках $\text{dup } 1\text{p}36.32\text{pter}$, $\text{del } 1\text{p}21.1\text{p}21.2$, $\text{dup } 2\text{p}24.1$, $\text{dup } 2\text{p}21$ і $\text{dup } 3\text{p}12.2$.

Група В

При цитогенетичному аналізі регулярно реєстрували моносомію за 4 парю та наявність обох гомологів 5 пари, серед яких один відносно часто був залучений у транслокацію з 15 хромосомою – $\text{t}(5;15)(\text{q}10;\text{q}10)$. Як результат, в клітинах 4BL на 205 пасажі звичайно виявляли по 1 нормальному гомологу 4 і 5 хромосомних пар. Результати aCGH підтвердили втрату більшістю клітин (mos 70-90%) великої ділянки довгого плеча однієї з хромосом 4 пари – $\text{del}(4)(\text{q}24\text{qter})$ (86 Mb) (рис. 3). У 30–50% клітин виявлено дуплікацію матеріалу короткого плеча 4 хромосоми в ділянці pter p16.1 (9,97 Mb) (рис. 4.18). Баланс генетичного матеріалу 5 хромосомної пари виявився збережений.

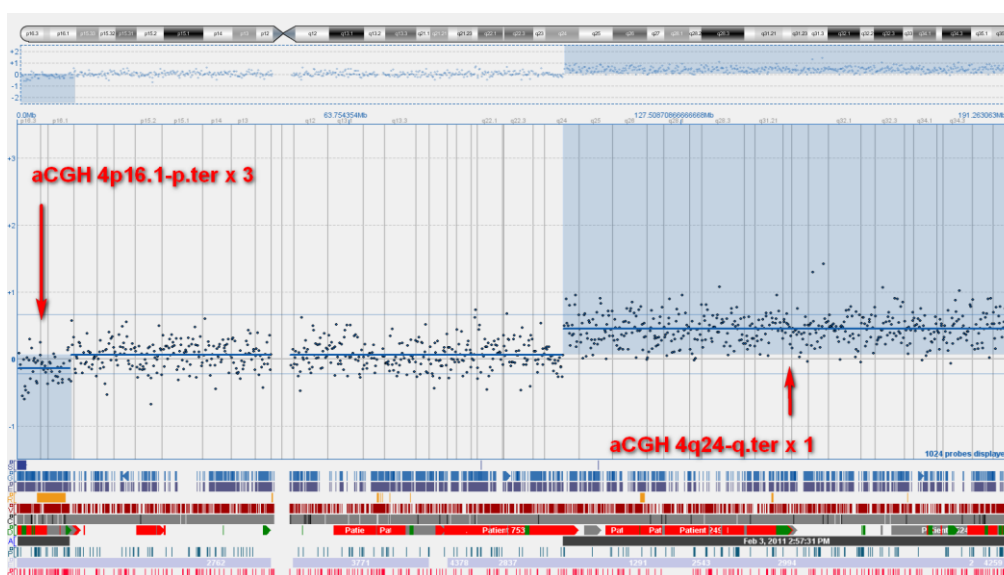


Рис. 4.18. Хромосома 4. Порівняльна геномна гібридизація. Дуплікація ділянки $4\text{p}16.1\text{--pter}$, делеція ділянки $4\text{q}24\text{--qter}$

У ділянці дуплікації $4\text{p}16.1\text{--pter}$ містяться гени: онкосупресори GAK cyclin G associated kinase - є прямою транскрипційною мішенню p53; MAD4 dimerization protein 4 – входить до складу комплексу, що репресує

транскрипцію; MSX1 – інгібує ріст пухлин. Гени сигнальних каскадів: PDE6B phosphodiesterase 6B – швидкий гідроліз цГМФ та гіперполяризація клітини; DGKQ diacylglycerol kinase, theta; FGFR1, FGFR3 fibroblast growth factor receptor 3 – розвиток кісток; TNIP2 – залучений в активацію ERK і MAPKK; GRK4 – ініціює деактивацію G-білків; STX18 – syntaxin 18 – інгібітор клітинного росту; JAKMIP1 – janus kinase and microtubule interacting protein 1 - marlin1; PPP2R2C protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma – контроль клітинного росту та поділу; MRFAP1 – асоційований з онкосупресором Rb.

У ділянці делеції 4 q24- q35.2 містяться важливі гени сигналіngu: PLA2G12A phospholipase A2; CAMK2D; PDE5A phosphodiesterase 5A, cGMP-specific та GUCY1A3 guanylate cyclase 1, які відповідають за розщеплення цГМФ, і відповідно, припинення ним опосередкованого сигналу; GUCY1B3 – головний рецептор до оксиду азоту NO; інгібітор протеїнкінази C і фосфоліпази A2 - ANXA5 annexin A5; CCNA2 cyclin A2 - активує CDK2 кіназу, і таким чином, стимулює G1/S і G2/M перехід клітинного циклу; NEK1 NIMA-related kinase 1; FGF2 fibroblast growth factor 2; EGF epidermal growth factor; ING2 inhibitor of growth family, бере участь у процесах репарації та апоптозу; INPP4B inositol polyphosphate-4-phosphatase; GAB1 - опосередковує відповідь на клітинні сигнали росту, трансформації та апоптозу; HHIP hedgehog interacting protein; SMAD1 передача сигналу від BMP; SH3D19 – бере участь у супресії RAS-індукованої трансформації; RAPGEF2 Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2 – зв'язок між мембранними рецепторами та активацією RAS; IRF2 - активатор інтерферонів α і β ; IL2; IL15 interleukin 15 індукує активацію JAK кінази, а також фосфорилування та активацію транскрипційних активаторів STAT3, 5 і 6 та запобігає апоптозу. У ділянці делеції 4 q24- q35.2 містяться гени апоптозу: FNIP2 – folliculin interacting protein 2 - індукується Об-метил-гуаніном; CASP3 caspase 3, активує каспази 6, 7 і 9, і може бути сама активована каспазами 8, 9 і 10; CASP6 caspase 6. Онкоген TDO2 tryptophan 2,3-dioxygenase - супресія протипухлинної відповіді. Гени, пов'язані з хроматином та проходженням мітозу: SMARCA5 –компонент хроматин-моделюючого

комплексу та енхансер транскрипції II класу генів; MAD2L1 – компонент точки контролю мітозу у метафазі, що запобігає анафазі, поки всі хромосоми не будуть правильно приєднані до веретена поділу; PLK4 polo-like kinase 4 – регулює дуплікацію центріолей протягом клітинного циклу; MND1 meiotic nuclear divisions 1 - стимулює рекомбіназну активність of RAD51 and DMC1; MAP9 microtubule-associated protein 9 є необхідним для роботи веретена поділу та цитокінезу; CEP44 -centrosomal protein 44kDa; NEIL3 - ініціює перший етап ексцизійної репарації, розрізаючи основи, пошкоджені вільними радикалами; CENPU50 – платформа, на якій відбувається асоціація кінетохорів під час мітозу. Делеція 4 q24- q35.2 містить важливі гени, залучені у роботу веретена поділу та точки контролю контролю мітозу, тож є однією з ймовірних причин аберантних мітозів у частині клітинної популяції лінії 4BL.

Група С

На 205 пасажі вдалося виявити чисельні кількісні і структурні перебудови хромосом групи С. За даними цитогенетичного аналізу і arrCGH, відносною стабільністю числа, конституції і балансу ДНК відзначились лише хромосоми 6, 7, 8 і 9 пар. Певний виняток склали випадки моносомії 6 і 8, а також дрібні структурні зміни 8 і 9 хромосом в ділянках del 8q21.13q21.2 і del 9p21 (на межі чутливості методу). В переважній більшості досліджених клітин (>80%) мала місце моносомія за X хромосоною, структура якої була збалансованою. Щодо інших хромосом групи С, моносомія найчастіше спостерігалась у випадках 10 і 11 пар. 10 пара хромосом часто демонструвала нулісомію або наявність одного з гомологів у вигляді деривату в складі транслокації з хромосоною 16 і іншою, невідомою хромосоною – t(10;16;?)(q22;q24p10;?), але на нашу думку, цей додатковий генетичний матеріал переважно увійшов до складу не ідентифікованих маркерних хромосом. Результати arrCGH засвідчили суттєві структурні зміни хромосом 10 пари: в усіх клітинах визначено втрату великої ділянки короткого плеча – del(10)(p12.1p14) (20,07 Mb), а також дуплікацію аналогічної за розміром ділянки довгого плеча – dup(10)(q24.2q26.11) (21,07

Mb) (рис. 4.19). В 70% клітин зустрічалася велика делеція довгого плеча – del(10)(q26.11qter) (13,95 Mb), у 50% клітин – дуплікація ділянки dup 10q22.1q22.2 довгого плеча 10 хромосоми (4,75 Mb).

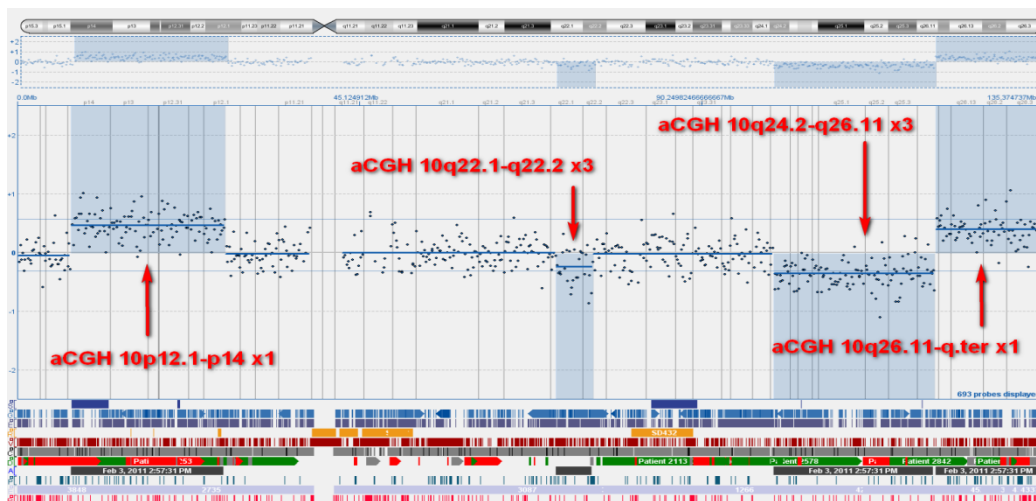


Рис. 4.19. Хромосома 10. Порівняльна геномна гібридизація. Делеція ділянок p12.1p14 і q26.11qter, дуплікація ділянок q22.1q22.2 і q24.2q26.11

У ділянці делеції 10 (p14p12.1) містяться п'ять онкогенів, з них MLLT10 myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia, PLXDC2 –ендотеліальний маркер пухлин; та 3 гена онкосупресора: ITIH5 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 5, ITIH2 і RSU1 Ras suppressor protein [281], а також ген репарації DCLRE1C DNA cross-link repair 1C та фактор транскрипції TAF3, який також діє як антиапоптичний фактор [282]. В даній ділянці знаходяться також гени сигналіngu: CDC123 cell division cycle 123, CAMK1D; STAM - downstream signaling of cytokine receptors і PIP4K2A – phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II.

У ділянці дуплікації 10q22.1q22.2 містяться гени сигналіngu PLA2G12B phospholipase A2, group XIIIB, PPP3CB protein phosphatase 3, catalytic subunit, CAMK2G calcium/calmodulin-dependent protein kinase II та ADK adenosine kinase; ген апоптозу AIFM2 apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 2; гени, можуть виступати в якості клітинних маркерів: NEUROG3, COL13A1

collagen, type XIII, alpha 1, NPFFR1 – neuropeptide FF receptor 1, NODAL – необхідний для формування мезодерми, MYOZ1 myozenin 1 та VCL vinculin.

У ділянці дуплікації (10)(q24.2q26.11) розташовані: шість онкогенів, з них HPSE2 heparanase 2, PKD2L1 polycystic kidney disease 2-like 1, WNT8B і та три онкосупресора, з них MXI1 MAX interactor 1 що негативно регулює експресію MYC; гени апоптозу PDCD11 programmed cell death 11 та CASP7 caspase 7; ген CWF19L1 cell cycle control, ген полімерази, що приймає участь в репарації POLL polymerase (DNA directed), lambda; фактор транскрипції TAF5, ген цикліну CNM1 cyclin M1.

У ділянці делеції (10)(q26.11qter) знаходяться гени: BUB3 mitotic checkpoint protein [283], три онкогена TACC2, MMP21 matrix metalloproteinase 21c, GLRX3, два онкосупресора WDR11 WD, DMBT1, та ген BCCIP, що є важливим партнером BRCA2 [284], ген репарації MGMT O-6-methylguanine-DNA methyltransferase. Нами виявлено позитивну кореляцію між експресією MGMT на рівні білка із проявом геномної нестабільності у процесі становлення клітинних ліній ЕГК миші та клітин людини лінії 4BL. На пізніх пасажах, що відповідають етапу стабілізації, експресія MGMT зникає. Проте при обробці клітин стрес-чинником, що призводить до повторного зростання геномної нестабільності, через кілька пасажів експресія MGMT відновлюється [285].

Моносомія за 11 парою хромосом виявилась умовною, оскільки «відсутній» гомолог практично завжди знаходили в транслокації з 1 хромосомою – t(1;11)q12;p15), а результати arrCGH засвідчили повну збереженість генетичного матеріалу 11 пари. Що ж стосується 12 пари хромосом, регулярно виявлялися 2 гомологи, проте один часто у транслокації з 15 хромосомою: t(12;15)(p10;q10) (рис. 4.6). За допомогою arrayCGH виявили делецію майже всього короткого плеча одного гомолога 12-ї хромосоми – 12p11.1pter розміром 33,77 Mb (рис. 4.20), можливо як результат утворення транслокації з 15 хромосомою. Це дозволяє припустити часткову моносомію 12 в каріотипі клітин 4BL на 205 пасажі.

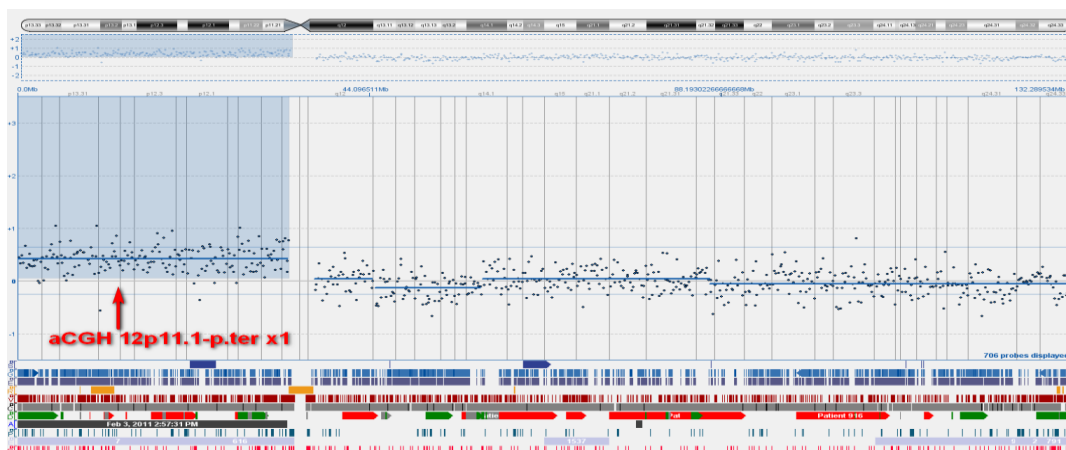


Рис. 4.20. Хромосома 12. Порівняльна геномна гібридизація. Делеція ділянки p11.1pter

У ділянці делеції 12p11.1pter розташовано п'ять онкогенів, з них WNT5B wingless-type, MLF2 – myeloid leukemia factor 2, KRAS v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog та 5 онкосупресорів: TNFRSF1A tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A; ING4 inhibitor of growth family, RERG RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor; PTPRO protein tyrosine phosphatase, receptor type, O; RASSF8 Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member [286, 287]. Делетовано й кілька генів смакових рецепторів TAS2R 7-10, генів лектинів CLEC, які беруть участь в імунній відповіді та маркерів CD4, CD163, CD69, CD27. У ділянці делеції 12p11.1pter містяться гени, задіяні у сигнальних системах: FGF6 fibroblast growth factor, EPS8, GDF3, STK38L – serine/threonine kinase 38 like, DYRK4 dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase, яка приймає участь у клітинній проліферації та DUSP16 dual specificity phosphatase, SPSB2 splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 2 – супресор сигналів від цитокінів, RTPN6 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6 яка переважно експресується в гемопоетичних клітинах, фактори плюрипотентності DPPA3, також відомий як STELLA [288], NANOG Nanog homeobox [289]; CDKN1B cyclin-dependent kinase inhibitor 1B [290] – його деградація необхідна для переходу клітин зі стану спокою до проліферації; транскрипційний активатор, залучений до клітинної проліферації

FOXM1 forkhead box M1; ген CCND2 cyclin D2 як регуляторна субодиниця CDK4 чи CDK6, його активність необхідна для переходу клітинного циклу від G1 до S фази, його висока експресія спостерігається в пухлинах яєчників, яєчок та молочної залози [291], в клітинній лінії 4BL він навпаки, частково делетований. Отже, на прикладі генів, що входять до складу часткової делеції 12p11.1pter не можна стверджувати, що клітинна лінія 4BL стала на шлях злоякісної трансформації: майже однакова кількість онкогенів та онкосупресорів, що міститься в цій ділянці, кілька делетованих факторів росту та кіназ і фосфатаз, які також відносяться до групи онкогенів та делетований ген цикліну D2 свідчать на користь збереження клітинною лінією 4BL не злоякісного стану, хоча дане питання залишається відкритим.

Хромосома X. При аналізі диференційно забарвлених препаратів хромосом часто спостерігали моносомію за X хромосомою. Методом порівняльної геномної гібридизації моносомію X хромосоми виявлено у понад 80% клітин 4BL на 205 пасажі (mos 45,X [$>80\%$]/46,XX [$<20\%$]). Також виявлено три делеції X p22.33, X q21.31 і X q21.31-21.32 (рис. 4.12). У ділянці del X p22.33 локалізовані гени PPP2R3B protein phosphatase 2, regulatory subunit B", beta; CRLF2 cytokine receptor-like factor 2; маркер CD99, ARSH arylsulfatase family, member H, F and E - ферменти, потрібні для правильної організації кісткового і хрящового матриксу. У часткових делеціях по хромосомі X не залучені гени, які життєво необхідні клітинам.

Отже, на момент досягнення клітинами 4BL 205 пасажу, в групі C відбулася редукція однієї статевої хромосоми (X моносомія), практично не зазнали змін хромосоми 6, 7, 8, 9 пар і зберігся генетичний матеріал 11 пари (один з гомологів транслокований на першу хромосому), присутні 2 гомолога 12 пари, проте поширена моно- або нулісомія 10 пари хромосом. 10 і 12 хромосоми зазнали найбільших змін з доведеною array CGH втратою генетичного матеріалу.

центросомі під час інтерфази та метафази, взаємодіє з білком aurora-A і ajuba, потрібен для акумулювання гамма-тубуліну та формування веретена поділу. Гени апоптозу: TNFRSF19 – індукція апоптозу по каспазо-залежному шляху; TNFSF11 - ключовий фактор диференціації остеокластів та активації антиапоптичної кінази АКТ/ПКВ.

У даному регіоні розміщені важливі гени сигналіngu: FGF9 fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor); CDK8 cyclin-dependent kinase 8 - фосфорилує найбільшу субодиницю РНК-полімерази II [294]; DCLK1 doublecortin-like kinase – регулює полімеризацію мікротрубочок; CCNA1 cyclin A1 - взаємодіє з CDK2 та CDC2 kinases, регулює поділ клітини [295]; SMAD9 - передає сигнал від BMP і взаємодіє з SMAD4; RGCC regulator of cell cycle – індукується p53 і відповідає на пошкодження ДНК, локалізований в цитоплазмі під час інтерфази та в центросомах під час мітозу; DGKH – регулює концентрацію ДАГ та фосфатидної кислоти; NEK5 – NIMA-related kinase 5 і 3с; STARD13 – регулює реорганізацію цитоскелету, клітинну проліферацію та рухливість, діє як онкосупресор в клітинах гепатоми; IL17D - стимулює продукцію інших цитокінів, в тому числі IL6, IL8; WASF3 – компонент комплексу, що зв'язує кіназні рецептори і залучені у зміні форми клітини, рухливості клітин. У ділянці делеції 13 q12.11 – q 21.2 містяться гени білків та ферментів: ATP12A ATPase, H⁺/K⁺ transporting, nongastric, alpha polypeptide; POLR1D polymerase (RNA) I polypeptide D, KCNRG potassium channel regulator.

Отже, значна кількість важливих онкосупресорів, які містяться в ділянці делеції 13 q12.11 – q 21.2 уможлиблює проходження аберантних мітозів в клітинах лінії 4BL, і відповідно, наявність значної кількості хромосомних аберацій та домінування анеуплоїдних клітин в популяції.

Моносомія за 15 парою хромосом виявилась умовною, оскільки «відсутній» гомолог часто знаходили в транслокації з 5 хромосомою – t(5;15)(q10;p10) або 12 хромосомою – t(12;15)(p10;q10) і, спорадично, із 21 хромосомою – t(15;21)(q10;q10).

Група E

В групі E при цитогенетичному аналізі переважно виявляли два гомологи 16 пари, моносомію за 17 хромосомою і нормальний комплект 18 пари. Один з гомологів 16 пари часом вступав у транслокацію з 21 хромосомою: $t(16;21)(q13;p11)$. 16 пара хромосом зазнала суттєвих змін із набуттям додаткового матеріалу: замість 2-х виявлено 4 копії ділянки 16q12.1q12.2 довгого плеча (6,14 Mb) і 3 копії іншої, значно більшої ділянки довгого плеча – 16q22.1qter (22,52 Mb) (рис. 4.22).

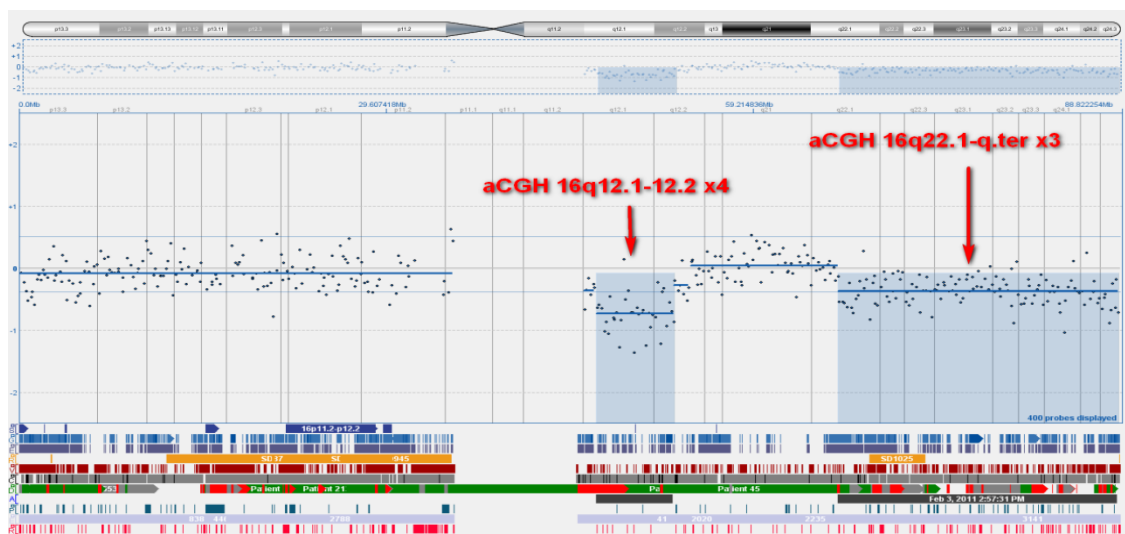


Рис. 4.22. Хромосома 16. Порівняльна геномна гібридизація. Дуплікації ділянок 16q12.1q12.2 і 16q22.1qter

У ділянці дуплікації 16q12.1q12.2 знаходяться гени сигналінгу: CNEP1R1 – CTD nuclear envelope phosphatase 1 regulatory subunit 1; ADCY7 adenylate cyclase; SALL1 sal-like 1 – транскрипційний репресор, NKD1 naked cuticle homolog 1 – негативний регулятор Wnt і β -катенінового сигнального шляху; BRD7 - компонент SWI/SNF хроматин моделюючого комплексу, необхідний для p53-залежного онкген-індукованого апоптозу, ген SIAH1 shah E3 ubiquitin protein ligase 1, що регулює клітинну відповідь на гіпоксію і є індуктором апоптозу. Дана дуплікація є корисною, оскільки дозволяє елімінувати клітини, які в подальшому можуть призвести до злякисного росту, за рахунок

збільшення кількості генів, залучених в апоптозі, а також негативних регуляторів транскрипції і Wnt і β -катенінового сигнального шляху.

У ділянці дуплікації 16q22.1qter розташовані гени: фактор TAF1C TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I; онкоген BCAR1 breast cancer anti-estrogen resistance 1 та онкосупресори: MTSS1L – metastasis suppressor 1-like, WWOX WW domain containing oxidoreductase – медіатор фактору некрозу пухлин α , індукує апоптоз [296], WFDC1 WAP four-disulfide core – інгібітор росту, IL17C – стимулятор вивільнення фактору некрозу пухлин α і $\text{IL1}\beta$. У даній ділянці містяться гени, що відповідають за формування мезодерми: TRAPPC2L – гемопоетичні стовбурові / прогеніторні клітини; PARD6A par-6 partitioning defective 6 homolog alpha – асиметричний поділ клітин, приймає роль в епітеліо-мезенхімальному переході [297]; FOXC2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1); CDH13 cadherin 13, N-cadherin (heart) захищає ендотеліальні клітини від апоптозу у зв'язку з оксидативним стресом; cadherin 15, type 1, M-cadherin (myotubule) – може бути тригером для термінальної диференціації в м'язову тканину (нами доведена здатність клітинної лінії 4BL диференціюватись в м'язову тканину). Знаходяться в цій ділянці й важливі гени сигналіну: NUDT7 nudix елімінує токсичні метаболіти нуклеотидів та регулює їх концентрацію, PLCG2 phospholipase C, gamma 2; CDK10 cyclin-dependent kinase 10. Гени, що пов'язані з хроматином: ACD adrenocortical dysplasia homolog (mouse) - захищає теломери, TERF2 telomeric repeat binding factor 2 - наявний у метафазі, CENPT, CENPN centromere protein N - приєднується до кінетохору під час S та G2 фази і рекрутує інші білки до центромери, MPHOSPH6 – M-phase phosphoprotein 6. Гени апоптозу: CLEC18A та OSGIN1 oxidative stress induced growth inhibitor 1(also known as OKL38) - експресія цього гену індукується пошкодженням ДНК та регулюється p53, даний ген викликає вивільнення цитохрому c з мітохондрій [298]. Залучені також важливі гени клітинного метаболізму. Отже, дуплікація 16q22.1qter є надзвичайно корисною для підтримки генетичної стабільності клітин лінії 4BL

завдяки великій кількості генів онкосупресорів, генів, що контролюють мітоз та захищають теломери та генам апоптозу.

Значні структурні зміни відбулись у 17 хромосомі, яка набула невелику ділянку довгого плеча – dup(17)(q25.3) (2,49 Мб), проте втратила його значну частину – del(17)(q11.1q21.31) (18,03 Мб) (рис. 4.23). Структурні зміни 17 хромосоми могли б пояснювати регулярні випадки її моносомії, оскільки результативний дериват може втрачатись, або трактуватись як маркерна хромосома.



Рис. 4.23. Хромосома 17. Порівняльна геномна гібридизація. Делеція ділянки q11.1 - q21.31, дуплікація ділянки q25.3

У ділянці делеції 17 q11.1q21.31 міститься 11 онкогенів, серед них UTP6 – carcinoma-associated antigen 66; SUZ12, RDM1 RAD52 motif 1 - резистентність до цисплатину [299], MLLT6 – myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia, LASP1 – рак крові, молочної залози, товстого кишечника, PLXDC1 – ендотеліальних маркер пухлин 3, ERBB2 v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, та 9 онкосупресорів: KSR1 – kinase suppressor of ras 1; TNFAIP1 tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1; TP53I13 – tumor protein p53 inducible protein 13 (also known as DSCP1) [300]; CRLF3 cytokine receptor-like factor 3 – негативний регулятор переходу клітинного циклу з G0 до G1 фази;

CCL7 chemokine (C-C motif) ligand 7 та 8 – не є класичними онкосупресорами, проте приваблюють макрофагів до місця пухлин, PCGF2 polycomb group ring finger 2, NKIRAS2 – NFκB inhibitor interacting Ras-like 2, NF1 neurofibromin 1 negative regulator of the ras signal; отже, «шкідливих» генів делетовано трохи більше. У цій ділянці знаходяться один проапоптичний TIAF1 [301] та один антиапоптичний фактор AATF. Залучені й у цій частковій делеції фактор транскрипції TAF15 TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein та фактор ініціації трансляції EIF1 – eukaryotic translation initiation factor; гени сигналіngu: CDK5R1 cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35); CDK12 cyclin-dependent kinase 12; CDC6; DUSP14 dual specificity phosphatase 14; PIP4K2B phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, beta; RARA retinoic acid receptor; SOCS7 – suppressor of cytokine signaling 7; STAT5B signal transducer and activator of transcription 5B. Отже, делецію по 17 хромосомі можна назвати умовно нейтральною, оскільки делетовано приблизно рівну кількість онкогенів та онкосупресорів.

Група F

При каріотипуванні в групі F переважно виявляли обидва гомологи 19 і 20 хромосомних пар. Результати array CGH свідчать про збереження балансу ДНК 20 пари. Виявлено тетрасомію за великою ділянкою короткого плеча 19 хромосоми dup19p12pter (23,65 Mb) й дрібну делецію 19p13.2 (рис.4.24).

У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12 розташовані онкогени: MUM1 – melanoma associated antigen (mutated) 1; MLLT1 myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia, ELAVL1 – підвищена експресія у багатьох видах раку; JUND proto-oncogene – компонент транскрипційного комплексу AP1 та онкосупресори: APC2 – adenomatosis polyposis coli 2 [302]; STK11 serine/threonine kinase 11 (also known as LKB1) - в тому числі регулює полярність клітини [303], REEP6; ген апоптозу та онкосупресор GADD45B growth arrest and DNA-damage-inducible, beta – відповідь на стрес через активацію p38/JNK шляху [304]; ANGPTL4 angiopoietin-like 4 – запобігає метастазуванню,

інгібуючи васкуляризацію і інвазію пухлинних клітин; TNFAIP8L1 і TNFSF9, TNFSF14 – стимулює проліферацію Т-клітин та є тригером апоптозу пухлинних клітин.

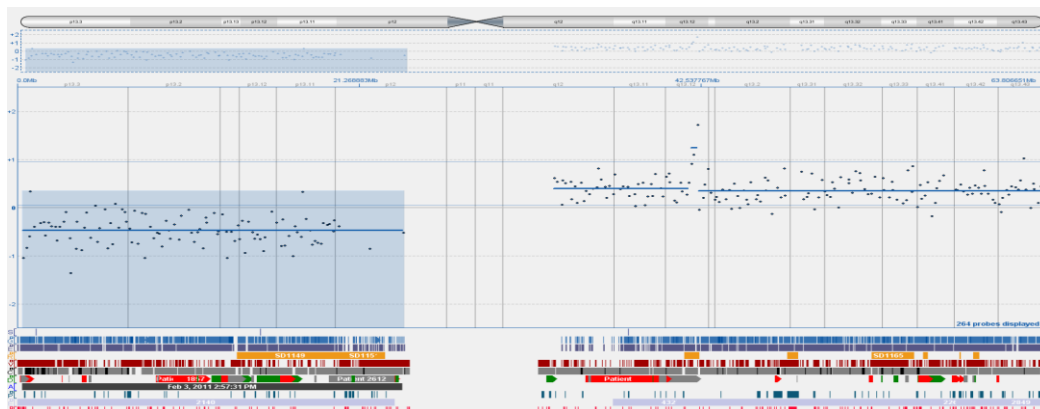


Рис. 4.24. Хромосома 19. Порівняльна геномна гібридизація. Подвійна дуплікація ділянки p13.3-p12 (x4), del19p13.2

У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12 містяться гени апоптозу: DAPK3 death-associated protein kinase 3; ACER1 alkaline ceramidase 1 - може бути тригером антимітогенних сигналів і індукувати апоптоз та вже згаданий GADD45B, CASP14 caspase 14 – активується каспазами 8 і 10 *in vitro*, і anti-Fas agonist антитілами або TNF-related apoptosis inducing ligand *in vivo*.

У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12 містяться важливі гени сигналіngu: CDC34 cell division cycle – потрібен для переходу із G1 фази до ініціації реплікації ДНК; FGF22 fibroblast growth factor 22 - володіє широкою мітогенною активністю, KISS1R – G-білковий рецептор, що зв'язує метастатин, який кодується геном KISS1, що пригнічує метастази [305]; WDR18 - прогрес клітинного циклу, передача сигналів, апоптоз та регуляція генів; MKNK2 MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2; AMH; DIRAS1 GTP-binding RAS-like 1; PIP5K1C phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, gamma - роль в ендоцитозі та клітинній міграції; PIAS4 – protein inhibitor of activated STAT, 4; MAP2K2 mitogen-activated protein kinase kinase 2 – активує MAPK1/ERK2 і MAPK2/ERK3 [306]; PTPRS protein tyrosine phosphatase, receptor type, S -

взаємодія між клітинами; ARHGEF18 Rcho/Rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 18 – реорганізація цитоскелету, клітинний ріст та рухливість, регуляція транскрипції генів; MAP2K7 mitogen-activated protein kinase kinase 7 - activates MAPK8/JNK1 and MAPK9/JNK2 [307]; RAB11B (член родини RAS онкогенів) – критична роль у регуляції екзо- і ендоцитозних шляхів; TYK2 tyrosine kinase; CDC37 cell division cycle 37 – формує комплекс з Hsp90 [308] і протеїнкіназами CDK4, CDK6, SRC, RAF-1, МОК [309]; PDE4A phosphodiesterase 4A, cAMP-specific; S1PR5 sphingosine-1-phosphate receptor – його ліганд S1P регулює клітинну проліферацію, апоптоз, рухливість клітини; CDKN2D cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19), EPOR erythropoietin receptor – активує Jak2 тирозин кіназу, що активує такі шляхи: Ras/MAP kinase, phosphatidylinositol 3-kinase and STAT transcription factors; NACC1 nucleus accumbens associated 1 – транскрипційний репресор, в тому числі Gadd45GIP1, таким чином, грає роль у прогресії багатьох видів раку; роль у підтримці плюрипотентності стовбурових клітин [310]; DAND5 – BMP antagonist; NOTCH3 – ключова роль у розвитку нервової системи; BABAM1 BRISC and BRCA1 A complex member 1; JAK3 Janus kinase 3 – залучена у передачу цитокін-опосередкованого сигналу; PIK3R2 phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta) – фосфорилує фосфатидил-інозитол, створюючи вторинні месенджери; PDE4C phosphodiesterase 4C, cAMP-specific.

У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12 знаходяться гени мітозу та хроматину: MISP – mitotic spindle positioning; FSD1 fibronectin type III and SPRY domain containing 1 – може бути залучений в стабільність і організацію мікротрубочок під час цитокінезу; SPC24; NDC80 kinetochore complex component; SYCE2 synaptonemal complex central element protein, AKAP8 A kinase (PKA) anchor protein 8 - приєднується до RII alpha subunit of PKA і може грати роль у конденсації хромосом під час мітозу; HAUS8 – залучений у формування мікротрубочок у веретені поділу; MAU2 sister chromatid cohesion factor; MAST1 microtubule associated serine/threonine kinase 1; DOCK6 dedicator of cytokinesis 6.

Гени, залучені у регуляцію структури хроматину: HMG20B – high mobility group 20B; SMARCA4; CHAF1A chromatin assembly factor 1; UHRF1 ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 - роль у p53-залежній контрольній точці мітозу [311]; ASF1B anti-silencing function 1B histone chaperone - ключова роль у модуляції нуклеосомної структури хроматину.

Гени, пов'язані з транскрипцією та регуляцією експресії генів: POLR2E polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E, 25kDa – найбільша субодиниця РНК-полімерази II; SNAPC2 small nuclear RNA activating complex, polypeptide 2; RNASEH2A ribonuclease H2, subunit A – видалення РНК-праймерів у фрагментах Оказакі; SSBP4 single stranded DNA binding protein 4; ELL elongation factor RNA polymerase II;

Ген репарації RAD23A – залучений в ексцизійній репарації, а також гени метилування DNMT1 – DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1 - встановлення і регуляція тканин-специфічної картини метилування цитозинових залишків; MBD3 methyl-CpG binding domain protein; DOT1L DOT1-like histone H3K79 methyltransferase; CARM1 – coactivator-associated arginine methyltransferase 1 – регуляція експресії генів, функціонує специфічно на гістонах; та гени сплайсингу.

У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12 містяться гени диференціювання у м'язову і нервову системи, а також велика кількість генів, що пов'язані з імунною системою, серед останніх ICAM1 intercellular adhesion molecule 1- експресія в ендотелії і клітинах імунної системи; CD97 – роль у клітинній адгезії, активації міграції лейкоцитів, а також прогресії кількох типів раку; CD312 – переважно в мієлодних клітинах; HSH2D hematopoietic SH2 domain containing – мішень розпізнавання антигену Т-клітинним рецепторами; PGLYRP2 peptidoglycan recognition protein 2.

Гени стовбурового потенціалу, серед них MATK megakaryocyte-associated tyrosine kinase - передача сигналу в гемопоетичних клітинах; KLF1 Kruppel-like factor 1 (erythroid); GDF15 growth differentiation factor 15; BST2 bone marrow stromal cell antigen 2 - role in pre-B-cell growth; та інші

маркери: TJP3 tight junction protein 3; COL5A3 collagen, type V, alpha 3; FBN3 fibrillin 3 –позаклітинний матрикс; CD320 – зв’язує коболамін; FDX1L – ferredoxin 1-like; ADAMTS10 metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 10 – роль у розвитку шкіри, кристалика і серця; COMP cartilage oligomeric matrix protein; NCAN neurocan – фондроїтин-сульфат протеоглікан; HAPLN4 hyaluronan and proteoglycan link protein; CALR calreticulin – головний Ca^{2+} зв’язуючий білок. Гени, що асоційовані з мікротрубочками: MAP1S microtubule-associated protein 1S; MAST3 microtubule associated serine/threonine kinase 3; DNM2 dynamin 2; HOOK2.

У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12 розташовані гени ферментів: NDUFA7 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 7 та 1 beta subcomplex, 7; PRDX2 peroxiredoxin 2 antioxidant enzyme; CYP4F cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 22, 8, 3, 12, 2,11; ISYNA1 inositol-3-phosphate synthase 1; NDUFA13 (also known as GRIM) – передає електрони з NADH до дихального ланцюга, зв’язує STAT3, може функціонувати як онкосупресор [312]. Гени, пов’язані з трансляцією та фолдінгом білків: EIF3G eukaryotic translation initiation factor 3, subunit G; PIN1 peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1.

Дуплікація по 19 хромосомі забезпечує клітинний метаболізм на високому рівні, тут міститься значна кількість генів організації структури хроматину, процесів транскрипції, активації проліферації, що надає селективну перевагу клітинам, які її містять. До речі, саме по dup19 p13.3-p12 спостерігається тетрасомія, більшість інших виявлених дуплікацій є частковими, неповними. При каріотипуванні часто реєстрували маркерну хромосому, подібну на 19-ту. Не виключена можливість трисомії 19, проте один з гомологів, ідентифікований як 19, може бути лише дериватом, що виник в результаті складної перебудови 19 і інших хромосом. Отже, питання повноцінної ідентифікації хромосом 19 пари залишається відкритим і потребує застосування FISH аналізу.

Група G

При цитогенетичному аналізі знаходили одну хромосому 21 пари і переважно два гомологи 22 пари хромосом. Моносомія за 21 парою хромосом виявилась умовною, оскільки «відсутній» гомолог знаходили в транслокації з 16 хромосомою – $t(16;21)(q13;p11)$ і, спорадично, з 15 хромосомою – $t(15;21)(q10;q10)$. За даними *arrCGH* хромосоми групи G відзначились збереженням генетичного матеріалу.

При використанні *arrayCGH* та дослідженню хромосом груп C, D, E, F та G були виявлені делеції та дуплікації по різних хромосомам. Варто відмітити, що випадки дуплікацій та делецій мають частковий, а інколи мозаїчний характер, що підтверджує існування в популяції клітин лінії 4BL гетерогенних клонів. У кожній з цих аберацій містяться важливі гени сигнальних та метаболічних систем клітини, гени, білки яких модулюють активність хроматину, беруть участь у формування веретена поділу, контролюють проходження мітозу; гени апоптозу, онкогени та онкосупресори. Адаптація клітин до умов культивування *in vitro* супроводжується стадією кризи, для якої характерне різке зростання геномної нестабільності та інтенсивна селекція в клітинній популяції найбільш пристосованих клонів клітин, що пояснює гетерогенність клітинної популяції лінії 4BL, які продовжують відтворюватись і на стадії стабілізації. У процесі подальшої еволюції клітинних ліній стадія становлення змінюється стадією стабілізації, з формуванням переважаючого модального класу з певним числом хромосом, що власне, й спостерігається на дослідженому 205-му пасажі.

Основні перебудови генетичного матеріалу клітинної лінії 4BL відбулись до 120-го пасажу. Ознаками стабільності 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. Селективна перевага збережених хромосомних перебудов може асоціюватись із підвищенням дози генів 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 супроводжується збільшенням дози генів-індукторів апоптозу (dup2q31.1-q33.1, dup16q12.1q12.2, dup16q22.1-q24.3). Все це відображає еволюцію каріотипу клітинної лінії 4BL протягом тривалого культивування та засвідчує ефект регулярних хромосомних перебудов при досягненні етапу стабілізації.

4.4. Визначення експресії генів *TERT*, *MGMT* і *p53*

Клітинна лінія 4BL успішно пододала ліміт Хейфліка без стадії кризи в культурі (що супроводжується старінням і загибеллю більшої частини популяції) і культивується вже більше 10 років. Поставало питання завдяки чому відбувся процес іморталізації і продовжується тривала проліферація. З цією метою ми вирішили перевірити експресію гена теломерази *hTERT*. Як позитивний контроль було обрано іморталізовану клітинну лінію карциноми гортані Нер-2. Дослідження проводили на більш ранніх 127-му та 144-му пасажах та найпізнішому з наявних 222-му.

У попередніх цитогенетичних дослідженнях на пізньому 205-му пасажі було виявлено хромосомні аберації: t(1;11)(q12;p15), del(2)(p11~12), t(5;15)(q10;p10), t(12;15)(p10;q10), t(16;21)(q13;p11) та шість регулярних маркерних хромосом, що складає унікальний паспорт клітинної лінії 4BL. При застосуванні агау CGH були виявлені делеції та дуплікації різних хромосом. Тому з метою перевірки активності точки контролю клітинного циклу ми вирішили дослідити на різних стадіях культивування експресію відомого онкосупресора p53 та ензиму MGMT як однієї з ланок систем репарації. В якості позитивного контролю життєздатності клітин було обрано два гени домашнього господарства – *Actb* і *HMBS* (актин β і третій фермент біосинтетичного шляху продукції гема).

При проведенні ПЛР аналізу в стовбурових клітинах лінії 4BL та пухлинних клітинах лінії Нер-2 виявили експресію генів «домашнього господарювання» *Actb* та *HMBS* на рівні транскрипції, на більш ранніх стадіях культивування лінії 4BL (127-ий пасаж) експресія була вищою, ніж на пізньому пасажі (222-ий пасаж). В лінії Нер-2 детектували експресію усіх досліджуваних генів – *p53*, *MGMT* і *hTERT* (рис. 4.25, рис. 4.26).

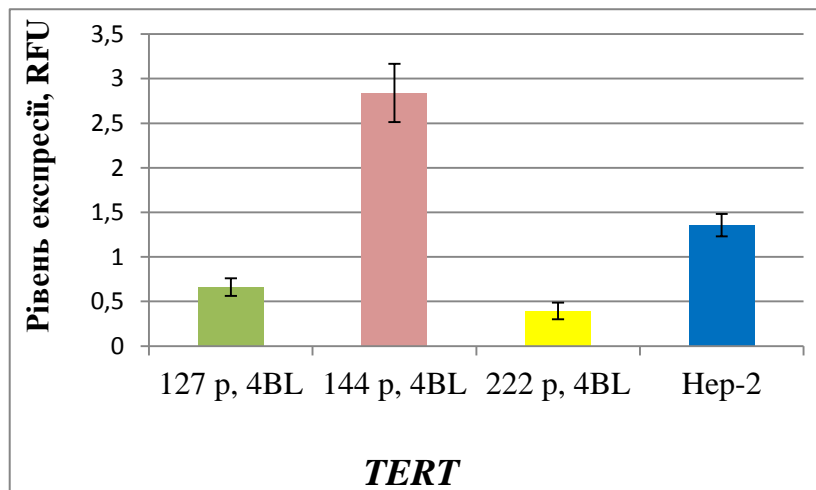


Рис. 4.25. Результати ПЛР у реальному часі: у клітинах стовбурової лінії 4BL виявлено експресію гена теломерази в на 127-му, 144-му та 222-му пасажах; також ген *TERT* експресується у клітинах пухлинної лінії Нер-2

На всіх досліджених пасажах клітин лінії 4BL виявили експресію гена теломерази (рис. 4.25), що є однією з ознак стовбурових клітин та підтверджує іморталізацію лінії. 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. В результаті проведених нами досліджень по диференціюванню клітин лінії 4BL в адипогенному та остеогенному напрямках, доведено її стовбуровий

потенціал. Ці дані узгоджуються з виявленою експресією теломерази, оскільки відомо, що цей фермент активний в стовбурових клітинах.

На досліджених пасажах (127, 144 та 222) клітин лінії 4BL не виявлено експресії гена *MGMT* – O⁶-метилгуанін-ДНК-метил трансферази на рівні мРНК (рис. 4.26). Це підтверджується значно більшою чутливістю цих клітин до алкілувальних сполук порівняно з клітинами Нер-2 [313].

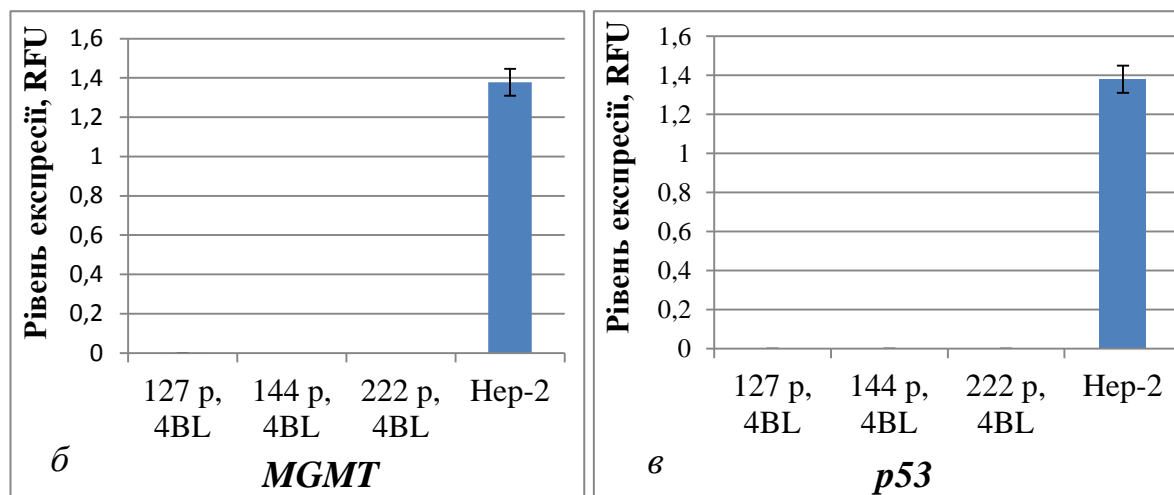


Рис. 4.26. Результати ПЛР у реальному часі: у клітинній лінії 4BL не виявлено експресію гена *MGMT* (а) та *p53* (б) на 127-му, 144-му та 222-му пасажах порівняно з клітинною лінією Нер-2

Факт відсутності експресії гена *MGMT* пояснюється частою моносомією та нулісомією 10-ї хромосоми, що спостерігали при цитогенетичному дослідженні та частковою делецією (мозаїчний характер) ділянки 10q26.11-q26.3, в якій міститься ген *MGMT*, що виявляли при проведенні агау CGH. За даними вестерн-блот аналізу виявляли експресію білка *MGMT* на 98-му та 120-му пасажах [285], що корелювало з більшим коефіцієнтом варіації за частотою каріотипів на даних пасажах, а 98-ий пасаж ще відповідав стадії становлення клітинної лінії. Вже не виявляли експресію білка *MGMT* в клітинах лінії 4BL після 130-го пасажу [313]. Результати дослідження рівня метилювання промотору, проведеного співробітницею відділу Яцишиною в лабораторії професора Кайна (Німеччина) свідчать про те, що в популяції клітин лінії 4BL

на різних пасажах виявляється як метильована, так і неметильована алель [285]. Отже, сумарні результати цитогенетичного дослідження, результатів array CGH та статусу метилування промотора пояснюють можливу відсутність експресії гена та білка MGMT в клітинах лінії 4BL на певних етапах культивування та демонструють складність механізмів регуляції експресії даного гена. Експресія гена *MGMT* корелює з етапом становлення в культурі, а також етапом індукції хромосомної нестабільності внаслідок обробки клітин стрес-чинником, що свідчить про можливу індукцибельність його експресії. Нами показано, що повторне зростання рівня геномної нестабільності після дії стрес-фактора співпадає із індукцією експресії канонічного білка MGMT на 26 добу після обробки (рис. 4.3, в), що свідчить про можливу роль репаративного ензиму не лише у виправленні точкових мутацій, а й у підтримці стабільності геному.

Як на ранніх, так і на пізніх пасажах культивування лінії 4BL не виявили експресію гена «охоронця геному» *p53*, що уможлиблює проходження аберантних мітозів в популяції клітин 4BL та наявність клітин з тривало відтворюваними хромосомними абераціями та клітин з різною плоїдністю хромосомного набору. Відсутність експресії гена *p53* частково пояснюється частою моносомією 17-ї хромосоми, де він розташований, за даними цитогенетичного аналізу. 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.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **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.

2. Macewicz L.L., **Kushniruk V.O.**, Iatsyshyna A.P., Kotsarenko K.V., Lylo V.V., Akopyan G.R., Huleuk N.L., Mykytenko D.O., 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.

3. Акоюян Г.Р., Гулеюк Н.Л., **Кушнірук В.О.**, Микитенко Д.О, Яцишина А.П., Лукаш Л.Л. Порівняльний аналіз каріотипу нової лінії клітин людини 4BL в умовах тривалого культивування. I. Плоідність хромосомного набору // *Цитологія і генетика.* – 2013. – Т. 47, № 5. – С. 55 – 69.

4. **Кушнірук В.О.**, Акоюян 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 агау CGH // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* – 2015. – Т.16. – С. 216 – 221.

5. Акоюян 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.

6. **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.

7. **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 студентів та молодих науковців.* – К., 2009. – С. 55 – 57.

8. Akopyan H., Huleyuk N., **Kushniruk V.**, Mykytenko D., Iatsyshyna A., Kovaliv I., Zukin V., Lukash L. 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.

9. **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.

10. **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.

11. **Кушнірук В.О.**, Некрасов К.А., Акопян Г.Р., Микитенко Д.О., Лукаш Л.Л. Порівняння експресії генів TERT, P53, і MGMT у стовбурових клітинах 4BL та пухлинних клітинах HEP-2 // Актуальні питання розвитку біології та екології: мат. міжн. науково-практичної конференції. – Вінниця, 2016. – С. 250-253.

12. **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.

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

З величезної кількості постійних (іморталізованих) клітинних ліній, які підтримуються в різних лабораторіях світу, більшість мають пухлинне походження і, відповідно, початково містять хромосомні аберації чи порушення регулювання мітозу [4-9], або отримані з ембріональних тканин, робота з якими ускладнюється етичними питаннями [17, 41, 45]. А перепрограмування геному соматичних клітин з метою отримання індукованих плюрипотентних клітин передбачає використання вірусних векторних систем, що можуть призводити до інсерційних мутацій [20, 314, 315]. Тому, незважаючи на величезну кількість існуючих клітинних ліній, виникає потреба в нових іморталізованих клітинних лініях, отриманих із нормальних тканин дорослого організму. Вперше можливість отримання іPS клітин за допомогою факторів білкової природи показано у роботі [35], ефективність даного методу є досить низькою, і деякі автори намагаються його удосконалити [102-105]. 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 даній роботі ми отримали нову стовбурову клітинну лінію 4BL із периферійної крові здорового дорослого донора, використовуючи фідерну підложку і рекомбінантні цитокіни LIF, SCF, IL-3 та 30% середовища, кондиціонованого ЕГК як фактори репрограмування. Лінія 4BL успішно пододала ліміт Хейфліка та культивується вже більше 10-ти років, і за цей час пройшла понад 220 пасажів без ознак клітинного старіння, що дає підстави вважати її потенційно іморталізованою. Нам вдалося підтвердити іморталізацію клітин лінії 4BL експресією гена теломерази за допомогою зворотно-

транскриптажної ПЛР в реальному часі на різних пасажах культивування: 127-му, 144-му та 222-му.

При дослідженні морфології клітин лінії 4BL на різних пасажах виявили два типи клітин: витягнуті фібробластоподібні та більш розпластані епітеліоподібні. Така постійна підтримка у популяціях двох різних морфологічних класів є цікавим феноменом, що, на нашу думку, є одним із можливих проявів пластичності стовбурових клітин та/або явища епітеліально-мезенхімального переходу в культурі [316, 317]. В літературі показано, що індукція ЕМП супроводжується динамічним репрограмуванням епігеному, що залучає зміни в метилуванні ДНК і деякі пост-транскрипційні модифікації гістонів [67, 77].

Нами було відмічено характерну гістоархітектуру клітин в культурі: вони часто утворюють колові та напівколові асоціації (рис. 3.4), що характерні для ендотеліальних клітин [266, 267]. Також при відсутності пересіву, але за вчасної зміни середовища, клітини здатні утворювати кількшарові осередки росту, які нагадують кров'яні острівці, деякі навіть з отвором посередині (рис. 3.5, а). Клітини лінії 4BL на різних пасажах у напіврідкому агарі здатні утворювати багатшарові колонії, які нагадують ембріодні тіла (рис. 3.8). Ці факти опосередковано свідчили про наявність у досліджуваної клітинної лінії стовбурового потенціалу, який підтвердився диференціюванням клітин в адипогенному, остеогенному і міогенному напрямках. Диференціація СК досягається координованим каскадом активованих транскрипційних факторів і епігенетичними модифікаціями, що запускають транскрипцію генів, відповідальних за певну програму подальшого розвитку клітини [318].

В результаті проточної імуноцитофлуориметрії виявлено експресію маркерів CD73 і CD105 в клітинах лінії 4BL (рис. 3.15). Маркер CD73 використовується як один із маркерів мезенхімальних стовбурових клітин, зокрема, маркер їхнього лімфатичного диференціювання [319, 320, 321], а також як регуляторний фактор при osteo/хондрогенній диференціації [322]. Це підтверджено диференціюванням наших клітин в остеогенному напрямку.

CD105 є частиною рецепторного комплексу TGF beta і одним із маркерів мезенхімальних стовбурових клітин, у великій кількості експресується в ендотеліальних клітинах [323]. Враховуючи, що джерелом походження клітинної лінії 4BL була периферійна кров здорового донора, дані клітини цілком можуть бути нащадками ендотеліальних стовбурових клітин.

Популяція клітин лінії 4BL є негативною за CD90, CD34, CD45 та CD14. CD34 є сильно глікозилізованим білком клітинної поверхні, що діє як фактор адгезії, забезпечуючи приєднання стовбурових клітин до матриксу кісткового мозку чи безпосередньо до стромальних клітин [324]. CD34 не є маркером МСК, однак інколи експресується у субпопуляціях МСК, а також у гемопоетичних СК, ендотеліальних клітинах, мастоцитах [325]. CD 45 - початково цей маркер називали «звичайний антиген лейкоцитів» (LCA – leukocyte common antigen), крім того він є критичним регулятором у антигенному рецепторному сигналіngu T і B клітин [326, 327]. CD14 експресується переважно макрофагами, нейтрофілами і дендритними клітинами [328].

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

Клітинна лінія 4BL є негативною за маркером CD 90. CD 90 або Thy-1 (cell surface antigen) належить до родини імуноглобулінів, та використовується

як маркер МСК в основному лімфатичного гемопоетичного спрямування [329, 330]. Отже, клітини лінії 4BL, які є негативними за маркером CD90, можуть належати до некротворної фракції МСК. Зараз з'являються відомості, що МСК не обов'язково повинні бути позитивними за маркером CD90 [268]. У роботі [269] показано наявність двох субпопуляцій клітин CD90+ і CD90- серед мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин плаценти. Авторами статті [331] показано, що зниження експресії CD90 стимулює диференціацію в адипогенному і остеогенному напрямках. Оскільки ми спостерігали спонтанне диференціювання в даних напрямках навіть при вирощуванні клітин в середовищі DMEM без додавання спеціальних індукторів, це може пояснити відсутність експресії маркера CD90+ в популяції клітин лінії 4BL. В досліджах на мишах встановлено, що клітини з високою експресією CD90+ мають кращу здатність до перепрограмування геному, ніж клітини з його низькою експресією [332]. Таким чином, маркер CD90 характерний більше для плюрипотентних клітин. Також не виявлено експресію маркера плюрипотентних клітин Oct-4, який повторно експресується у ракових клітинах [219, 221, 222, 333, 334].

Відомо, що в процесі адаптації та тривалого культивування клітинних ліній в умовах *in vitro* відбуваються зміни їхнього каріотипу, так звана каріотипічна еволюція [30, 31, 106, 335, 336]. Тому наступним кроком в наших дослідженнях був цитогенетичний аналіз клітинних популяцій 4BL в динаміці. Найбільше даних, з якими можна порівняти отримані нами результати, стосуються злоякісно трансформованих клітин і плюрипотентних стовбурових клітин ембріонального походження.

В результаті рутинного каріотипування, проведеного на 122-му, 133-му, 196-му, 206-му та 221-му пасажах, в популяціях клітин лінії 4BL виявлено домінування біядиплоїдного модального класу чисел хромосом. Проте, на пізніх пасажах культивування стали помічати виокремлення нової субпопуляції клітин з триплоїдним набором хромосом і частка таких клітин поступово зростала. Однією з причин утворення клітин з триплоїдним набором хромосом є аномальний поділ клітини, яка перед мітозом в нормі має тетраплоїдний

каріотип, на триплоїдну і гаплоїдну, що відбувається внаслідок порушення системи регуляції мітозу чи через амітоз – прямий поділ клітини [337, 338]. Дана гіпотеза підтверджується існуванням в популяції клітин лінії 4BL на 221-му пасажі пулу клітин з біягаплоїдним набором хромосом в кількості 6,93%. Меншу кількість клітин з біягаплоїдним каріотипом порівняно з біятриплоїдними можна пояснити тим, що гаплоїдні клітини мають знижену життєздатність порівняно з триплоїдними. Менш імовірним, проте можливим, є відтворення триплоїдного каріотипу внаслідок симетричного поділу клітин з гексаплоїдним набором хромосом (0,99% клітин на даному пасажі). Раніше на прикладі чотирьох ліній ембріональних гермінативних клітин миші G1, G4, G6 і G7 нами було показано, що на пізніх пасажах культивування основний модальний клас хромосом складала біяпентаплоїди і біягексаплоїди [117]. Слід відзначити, що в популяціях клітинної лінії 4BL, незважаючи на тривалий термін культивування та появу три- та тетраплоїдних клітин, зберігається біядиплоїдний модальний клас чисел хромосом.

Поліплоїдія характерна як для культивованих клітин, так і для клітин в організмі, які виконують значне функціональне навантаження, як, наприклад, гепатоцити [339], м'язеві клітини, кардіоміоцити [340], мегакаріоцити [341], остеокласти, хондрокласти, клітини хоріону плаценти тощо [342, 343]. Поліплоїдію спостерігають в ембріонах людини у менше ніж 1 % випадків – як правило, такі ембріони гинуть протягом першого семестру [344, 345]. Існують рідкісні випадки мозаїцизму у людини диплоїдних та триплоїдних (рідше тетраплоїдних) клітин, що характеризується значними порушеннями розвитку різних органів [344, 346, 347, 348]. Із 130-ти зигот з триплоїдним каріотипом було отримано лише 4 лінії ЕСК і тільки одну з них – з триплоїдним набором хромосом, інші були диплоїдні, проте автори не досліджували їх після тривалого культивування. Очевидно, що на ранніх пасажах культивування спрацьовують певні механізми захисту стабільності каріотипу людини як видової ознаки [349].

Перевагою поліплоїдії в диференційованих тканинах може бути «запас міцності» множинних копій генів в умовах підвищеного ризику виникнення інактивуючих мутацій (наприклад, під впливом ксенобіотиків, ферментів, окисних радикалів) [342, 350, 351].

Явище поліплоїдизації клітинних ліній при тривалому культивуванні *in vitro* давно відоме і описане в багатьох дослідженнях як на ембріональних, так і на ракових клітинах миші і людини [107-117, 352].

Механізм поліплоїдії в культурі 4BL є окремим питанням, що потребує спеціального дослідження. Одним із них може бути ендоредуплікація хромосомного набору клітини з передчасним розділенням сестринських хроматид (ПРХ), в якій не відбулася p53-залежна індукція апоптозу [275, 353] (рис.5.1). Наприклад, у роботі [354] повідомляється про нову клітинну лінію, що мала місенс і нонсенс мутації p53 та білятриплоїдний каріотип з численними структурними абераціями.



Рис. 5.1. Гіпотетичний механізм утворення поліплоїдних клітин внаслідок ендоредуплікації ПРХ: *a* – ПРХ, *б* – моделювання ендоредуплікації, *в* – тетраплоїдна метафазна пластинка.

Моносомія за хромосомою 17, в коротких плечах якої локалізований ген *TP53*, виявилась типовою рисою каріотипу клітин 4BL на 205-му пасажі, що дозволяє припустити принаймні «половинну» активність p53, внаслідок чого може зростати кількість поліплоїдних клітин. Крім того, нами не виявлено за допомогою ПЛР експресію гена p53 у клітинах 4BL на 127-му, 144-му та 222-

му пасажах, що уможлиблює проходження аберантних мітозів в популяції клітин 4BL. У попередніх дослідженнях ембріональних гермінативних клітин миші нами виявлено дисфункцію контрольної точки мітозу та експресію в гіперплоїдних клітинах p53 дикого типу і мутантного білка p53 зі зниженою функціональною активністю [32]. Наявність клітин із повним ПРХ в культурі 4BL опосередковано свідчить про знижений рівень негативної селекції поліплоїдних клітин шляхом p53-залежної індукції апоптозу. При цьому в даному дослідженні продемонстровано зменшення кількості клітин із ПРХ в динаміці пасажування з 5% до 1,5% м.п. при одночасному зростанні частки поліплоїдних клітин: з 2,8 % до 36 % відповідно. Це свідчить про низьку ймовірність відтворення поліплоїдії в клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі шляхом ендоредуплікації хромосомних наборів з ПРХ.

Згідно сучасних уявлень, спектр імовірних чинників поліплоїдизації є надзвичайно широким і поряд із дисфункцією p53 передбачає порушення регуляції і експресії циклінів та циклін-залежних кіназ [355, 356], убіквітин-лігаз [357, 358], білків-пасажирів хромосом: сурвивін, Аврора А і В кіназ [359-361], білків ядерної оболонки ламінів [362], комплексу APC/C [363], регуляторів контрольної затримки мітозу і цитокінезу [364, 365], мікро-РНК [366] та інше. З огляду на важливість проходження мітотичного циклу, привертає увагу часта нулісомія/моносомія хромосоми 13 у клітинах лінії 4BL, також за даними агау CGH спостерігається значна делеція хромосоми 13, що дає можливість припустити функціонально недостатню продукцію білка ретинобластоми (pRb). Невипадкова втрата однієї копії 13 хромосоми клітинами іморталізованої мезенхімальної лінії UE6E7T-3 призводила до помилкової сегрегації хромосом під час мітозу та анеуплоїдії [367]. У недавній роботі [368] продемонстровано значне зростання частки анеуплоїдних клітин та поліплоїдії при обробці первинних меланоцитів інгібіторами білків p53 і Rb.

Отримані нами дані дозволяють висловити гіпотезу, що на 205-му пасажі клітинної лінії 4BL відтворення модального клону із 42–43 хромосомами відбувається не лише звичайним мітотичним поділом, але й приблизно

симетричним поділом поліплоїдних клітин із каріотипом 80–85 хромосом. Доказом такого припущення було б стабільне відтворення пулу диплоїдних клітин модального клону на фоні зростання рівня поліплоїдії при подальшому ефективному пасажуванні досліджуваної популяції клітинної лінії 4BL.

Явище деполіплоїдизації з подальшим відтворенням біядиплоїдних клітин є відомим і описане в дослідженнях [338, 369-372]. Показано одночасне існування біядиплоїдних та тетраплоїдних клітин в різних зразках первинної нейробластоми, а також в клітинних лініях, отриманих з неї, при підвищеній експресії MYC та втраті функції білками p53-p51 [373]. В роботі [374] доведено індукцію поліплоїдії в пухлинних клітинах HeLa і MDA-MB435 внаслідок радіаційно-індукованої мітотичної катастрофи. Після опромінення згадані поліплоїдні клітини демонстрували мультиполярне розділення хромосом з утворенням невеликих мононуклеарних клітин.

Диплоїдні клітини можуть ставати тетраплоїдними внаслідок різних механізмів, включаючи ендоредуплікацію, злиття клітин, порушення цитокінезу [375]. На клітинах епітелію бронхів та мезотелію показано, що порушення цитокінезу призводить до накопичення двоядерних тетраплоїдних клітин, які в подальшому внаслідок мультиполярних поділів продукують анеуплоїдні клітини. Анеуплоїдні клітини здатні утворюватися внаслідок таких 4-х поділів: мультиполярного мітозу одно- та двоядерних клітин, біполярного мітозу двоядерної чи одноядерної клітини з нерозходженням хромосом та утворенням однієї клітини з моносомією певних хромосом та іншої з тримосомією. Від 70 до 95% анеуплоїдних клітин продукується внаслідок порушення мітозу саме двоядерних тетраплоїдних клітин [372].

Поліплоїдію розглядають в ролі можливого прекурсору анеуплоїдії [376]. При старінні ракових клітин чи під впливом хіміотерапії спостерігається поява великих поліплоїдних клітин: вони не проліферують, але в них продовжується дуплікація ДНК. Далі такі тетраплоїдні клітини дають початок псевдо диплоїдним анеуплоїдним клітинам з чисельними перебудовами хромосом, що асоціюється з агресивною формою канцерогенезу і вважається однією з

вагомих причин неефективності протипухлинної терапії [370, 376-381]). Нещодавно встановлено, що поліплоїдні клітини на шляху деполіплоїдизації, відрізняються рисами, характерними для профазі першого мейозу і експресію окремих мейоз-специфічних генів, зокрема, *SYCP2*, *SYCP3*, *DMC1*, *SPO11*, *REC8*, *STAG3*, *MOS* [374], а поряд з цим ембріональних генів *OCT4*, *NANOG* і *SOX2* [218, 219, 221, 222].

Вважають, що саме активація мейотичної програми індукує в ендоредуплікованих клітинах процес розділення хромосом, наслідком якого є редукція хромосомного набору в дочірніх клітинах. Такий неправильний поділ клітин порівнюють з «мітотично-мейотичною» програмою найпростіших організмів, що припускає активацію цієї архаїчної програми в клітинах ссавців [369]. Особливо зрозумілим це стає на прикладі клітинних ліній, які вирощуються в умовах *in vitro*, де фактично кожна клітина якраз і є окремим найпростішим організмом, а їхня сукупність утворює популяцію.

Досліди, проведені на дріжджах свідчать про те, що тетраплоїди, порівняно з гаплоїдами і диплоїдами, значно швидше адаптуються до нових умов існування. Це пояснюється вищим відсотком корисних мутацій, що потенціуює їх ефект. Якщо є в запасі дуплікований набір хромосом, для тетраплоїдної клітини анеуплоїдія, втрата певних ділянок хромосом чи точкові мутації є не такими загрозливими, як для диплоїда. Отже, клітинна популяція «може експериментувати» з перебудовою власного геному та залишати в подальшому ті мутації, які можуть бути корисними. В результаті, за деяких умов середовища поліплоїдія може прискорювати еволюційну адаптацію [382]. Можливо, подібний ефект ми спостерігаємо на прикладі клітинної лінії 4BL, в якій в процесі адаптації до тривалого культивування на пізніх пасажах з'являється значний відсоток поліплоїдних клітин та зберігаються комплексні хромосомні аберації.

При використанні агау CGH для порівняльного аналізу каріотипу на 120-му, 160-му та 205-му пасажах клітинної лінії 4BL, нами було відмічено майже однакову картину розподілу аберацій: це делеції хромосом 4, 10, 12, 13,

17 і X та дуплікації хромосом 2, 10, 16 і 19. Це дозволяє зробити висновок, що основні еволюційні перебудови каріотипу відбулись до 120-го пасажу, і клітинна лінія 4BL знаходиться на етапі стабілізації. Цікаво відмітити, що на кожному з досліджених пасажів з'являються певні нові мінорні аберації, які, як правило, видаляються на наступному. Таким чином, ми спостерігали унікальне явище каріотипічної еволюції в динаміці, коли зберігаються основні значні перебудови, а деякі нові, що виникають при культивуванні, в подальшому елімінуються. Звертає на себе увагу той факт, що більшість новоутворених перебудов є дуплікаціями; з точки зору генетичної стабільності подвоєння генетичного матеріалу є більш безпечним, ніж його делеції.

За даними array CGH, на час досягнення клітинами 4BL 205-го пасажу жодних змін не зазнали хромосомні пари 3, 5, 6, 7, 11, 14, 15, 18, 20, 21 і 22, які зберегли диплоїдний набір унікальних генів (рис. 4.12, 4.15). По хромосомам 11, 15 та 21 спостерігали моносомію при цитогенетичному дослідженні через участь даних хромосом у транслокаціях. Проте результати array CGH дозволили аргументовано стверджувати: матеріал даних гомологічних хромосом збережений. Але він зазнав структурних перебудов і опинився у складі хромосом-дериватів, що утворилися за їхньою участю: $der(1)t(1;11)(q12;p15)$ і $der(5)t(5;15)(q10;p10)$. При цьому, збалансованість транслокації $t(5;15)(q10;p10)$ досягалась появою регулярної маркерної хромосоми із вмістом матеріалу коротких плечей хромосоми 5: $der(5)t(5;?)(q11.1;?)$ або $i(5p)$ (рис. 4.7, 4.8). Цікаво, що при аналізі майже 8 тисяч пацієнтів іншими авторами у 15 із них було виявлено маркерні хромосоми, 60% з яких також були дериватами 15-ої хромосоми [152]. Отже, маркерні хромосоми не є чимось унікальним для клітинної культури *in vitro*. Особливо часто вони застосовуються для діагностики відомих форм раку. При мієло- і лімфо-проліферативних захворюваннях саме транслокації є типовими хромосомними абераціями [153-157, 160]. А значна втрата генетичного матеріалу спостерігається для більшості хромофобних карцином нирок, типово з моносоміями 1, 2, 6, 10, 13, 17, і 21 хромосом [153]. В нашому дослідженні ми

також часто спостерігали моносомії 10, 13, 17 і 21-ї хромосом, проте карциноми нирок мають екстремально гіподиплоїдний каріотип – 31 – 37 хромосоми, а наша клітинна лінія 4BL зберігає біядиплоїдний модальний клас із 42-43 хромосомами.

Нами був зроблений порівняльний аналіз відомих постійних клітинних ліній, які були отримані із периферійної крові з клітинною лінією 4BL (дані наведені в таблиці 5.1). Найбільший інтерес становлять клітинні лінії, що мають диплоїдний модальний клас чисел хромосом. Лінія 4BL відрізняється тим, що вона отримана із периферійної крові здорового дорослого донора, в той час як інші ведуть походження від лімфом чи лейкемій. Клітинна лінія 4BL вирощується як моношарова культура, що значно полегшує роботу дослідника. Також вона має 6 маркерних хромосом, що може стати унікальним «штрих-кодом» при паспортизації і допоможе легко відрізнити її від інших.

Крім моносомії вищезазначених хромосом, моносомія X хромосоми мала місце у понад 80% досліджених клітин за даними array CGH. Втрата однієї із статевих хромосом є класичною ознакою культивованих клітин *in vitro*, що відмічалось ще Мамаєвою при аналізі багатьох клітинних ліній [31]. Статеві хромосоми містять величезні блоки гетерохроматину і не несуть генів, які є ключовими для життєдіяльності клітин, таким чином, клітини позбуваються від зайвого генетичного матеріалу. Крім того, тривале культивування може бути моделлю вікових змін, оскільки відомо, що при старінні частина клітин теж втрачає статеву хромосому.

При каріотипуванні спостерігали часту делецію 4 хромосоми. Наявність делеції за даними array CGH del(4)(q24) доведено при застосуванні техніки FISH Cytocell Octo Chrom, що дозволило уточнити природу невеликої метацентричної хромосоми «типу F без гетерохроматину», яка, власне, й виявилась наслідком делеції хромосоми 4 (рис. 4.10).

Таблиця 5.1

Порівняльна таблиця постійних клітинних ліній виділених з периферійної крові

клітинна лінія	походження	морфологія	мода-льний клас	варіабе-льність	маркерні хромосоми	полі-плоїди	культура
MT-4	серце і лімфоцити периферійної крові пацієнта з Т-лімфомою	лімфобласто-подібна	83	80-87	-	0,4%	сусп.
CCRF-B	пер. кров, гостра В-лімфобластична лейкемія	лімфобласто-подібна	46	42-47	-	1%	сусп.
Jurkat	Т-лімфобластична лейкемія	лімфобласто-подібна	46-47	41-49	2	-	сусп.
K-562	хронічна мієлогенна лейкемія	еритромієло-бластоїдна	64	55-69	12	3%	сусп.
HL-60	пер. кров проміє-лоцитна лейкемія	лімфобласто-подібна	45	43-47	6	3%	сусп.
MOLT-3	пер. кров Т-лімфо-бластична лейкемія	лімфоїдна	98	-	4	2%	сусп.
MOLT-4	пер. кров Т-лімфо-бластична лейкемія	лімфобласто-подібна	97	77-100	6	2%	сусп.
RPMI-8226	мієлома	лімфобласто-подібна	68-70	57-73	2	-	сусп.
T-1387	гостра лімфобластична лейкемія кіст. м.	лімфобласто-подібна	46	39-47	-	0,2%	сусп.
KG-1	гостра мієлобластична лейкемія кіст. м.	мієлобласто-їдна	46-47	44-49	5	-	сусп.
4BL	пер. кров здорового донора	фібробласто- та епітеліо-подібна	42-43	30-49	6	1–36%	моно-шарова

Примітка. Рожевим виділені клітинні лінії з біядиплоїдним модальним класом.

На нашу думку, збільшення ділянки короткого плеча четвертої хромосоми (дуплікація 4p16.3-p16.1) є більш пізньою подією, аніж делеція, і служить для стабілізації нової маркерної хромосоми del(4)(q24). Це співпадає з

сучасними уявленнями про узгоджене виникнення делецій і дуплікацій при формуванні стабільних структурних аномалій хромосом. Випадок асоціації інтерстиціальної інвертованої дуплікації з термінальною делецією короткого плеча хромосоми вперше описаний у 1976 році [383]. Запропоновані три основні механізми утворення інвертованих дуплікацій з термінальними делеціями. На думку М. Gorinati і співавторів [384], причиною є рекомбінація всередині парацентричної інверсії, яка виникає приблизно у 0.1–0.5% популяції [385]. Згідно другого механізму, підставою для виникнення інвертованих дуплікацій з термінальними делеціями є рекомбінація між LCR (low copy repeats) розміром 10–500 kb та гомологія послідовностей 95% [386, 387]. Третій механізм базується на припущенні, що інвертовані дуплікації з термінальними делеціями виникають з початкових дволанцюгових розривів двох сестринських хроматид [388]. Злиття липких кінців призводить до симетричного об'єднання U-типу з утворенням дицентричної хромосоми, а премітотичний розрив дицентрика дистально від сайту злиття спричиняє утворення моноцентричної хромосоми з термінальною делецією та інвертованою дуплікацією. На думку авторів U-тип обміну є найпоширенішим для багатьох хромосом [388].

У роботі [389] повідомляється про перший випадок утвореної *de novo* inv dup del(4) з частковою дуплікацією 4p і делецією 4q. Дуплікований регіон простягався від 4p15.1 до теломери і мав розмір 29.27 Mb, в той час як розмір термінальної делеції 4q35.1 складав 3.114 Mb. У нашому випадку, у хромосомах четвертої пари клітинної лінії 4BL, також відбулася термінальна дуплікація короткого плеча 4p16.3-p16.1, хоча й меншого розміру (9.966 Mb), проте втрата генетичного матеріалу внаслідок термінальної делеції 4q24-q35.2 виявилася значно більшою – 86.357 Mb. Цікаво, що співвідношення розмірів делеції і дуплікації в обох дослідженнях склало приблизно 1 до 9. В усіх описаних пацієнтів з дуплікацією 4p14-p15 і делецією 4q35 аномалії 4-ї хромосоми утворювались внаслідок перицентричної інверсії, успадкованої від одного з батьків. На думку Е. Tassano і співавторів [389], утворення *de novo* inv dup del(4) нашою хурою на думку, що термінальні делеції і дуплікації можуть

маскувати складні перебудови та реконструювання геному, що, власне, ми й спостерігали при дослідженні каріотипу клітин 4BL на 205-му пасажі.

Якщо дотримуватись гіпотези щодо одночасної появи делеції і дуплікації для стабілізації хромосоми, регулярна моносомія або нулісомія тринадцятої хромосомної пари у клітинах лінії 4BL може бути наслідком великої делеції довгого плеча 13q12.11-q21.2 (39,32Mb - 34,5%) за відсутності одночасних дуплікацій, які могли би стабілізувати нову хромосому як самостійну одиницю. Єдина можливість зберегти залишковий генетичний матеріал тринадцятої хромосоми, а його наявність підтверджено array CGH (рис. 4.12, 4.15), це утворення деривату з іншою хромосомою. Причину відсутності «стабілізуючої» дуплікації у тринадцятій хромосомі можна пов'язати з особливостями генетичного матеріалу її короткого плеча. Воно побудоване із мікросателітної ДНК, а можливість раптових узгоджених змін конститутивного гетерохроматину у відповідь на велику втрату еухроматину представляється доволі низькою [390]. У дослідженні впливу бензолу на хромосоми миші та людини хромосомні розриви спостерігали переважно в районах еухроматину [391], інші автори теж вказують на більшу чутливість еухроматину до пошкоджень [392, 393]. В чисельних описах випадків делеції 13q, яка містить відомий онкосупресор Rb1, не повідомлялося про наявність супутніх дуплікацій в ділянках еухроматину при застосуванні array CGH [394-396]. Ймовірність втрати 13-ої хромосоми збільшується, якщо разом із делецією 13q12.11-q21.2 втрачається центромерна альфойдна ДНК, але це важко довести через нечутливість array CGH до оцінки ДНК гетерохроматину [278]. Збережені структурні елементи хромосоми 13 варто шукати у складі регулярних маркерних хромосом, що узгоджується з даними роботи [397].

При каріотипуванні клітин лінії 4BL спостерігали регулярну моносомію сімнадцятої пари хромосом (рис. 4.6, 4.7). За даними array CGH, значні структурні зміни відбулися в її довгому плечі: делеція великої ділянки 17q11.1-q21.31 (18 Mb) та порівняно незначна дуплікація субтеломерної ділянки 17q25.3 (2,49 Mb) (рис. 4.23). Залишковий матеріал хромосоми 17 або втратився, або,

що більш ймовірно, опинився у складі дериватів маркерних хромосом. Так, застосування молекулярно-цитогенетичної техніки FISH Cytocell Octo Chrom дозволило ідентифікувати матеріал довгих плечей хромосоми 17 у складі невеликого субметацентрика – деривата $der(17)t(17;?)(q11.1;?)$ (рис. 4.10). Отже, виявлено узгодженість моносомії 4, 13 і 17 хромосомних пар при каріотипуванні із значною втратою ними ДНК за результатами array CGH на час досягнення клітинною лінією 4BL 205 пасажу.

Дані літератури [248, 254] вказують на часту дуплікацію 12 хромосоми при культивуванні іPS, що дає селективну перевагу при культивуванні, проте в нашій клітинній лінії 4BL за даними array CGH, ми навпаки спостерігали значну делецію майже половини її довгого плеча (рис.4.12, 4.20), що свідчить про інакші механізми каріотипічної еволюції лінії 4BL порівняно з даними клітинними лініями.

Цікаві результати отримано для другої і десятої хромосомних пар, в яких відтворення моносомії асоціювалося із значними дуплікаціями ДНК за даними array CGH (рис. 4.12, 4.17, 4.19). При стандартному каріотипуванні із застосуванням GTG-зabarвлення препаратів хромосом, у кожній другій диплоїдній та більшості тетраплоїдних клітин реєстрували моносомію другої хромосомної пари за наявності візуально незміненого гомолога (рис. 4.7). За результатами стандартного цитогенетичного аналізу, «втрачену» гомологічну хромосому визначили як дериват довгого плеча – $der(2)(q21)$ (рис.4.8), проте за даними array CGH, в ділянці 2q31.1-q33.1, навпаки, відбулася велика дуплікація (рис.4.17) розміром 30,6 Mb із результативною трикопійністю 257 генів. У роботі [398] описано випадок дуплікації 2q, яка відбулася внаслідок інверсії, асоційованої із виникненням термінальної делеції, проте делеція хромосоми 2 у клітинах 4BL заперечується результатами array CGH. Єдиним можливим поясненням візуальної відсутності частини довгого плеча 2 хромосоми при збереженні відповідного генетичного матеріалу є утворення деривату з іншою хромосомою. Отже, друга хромосомна пара каріотипу клітин 4BL вірогідно містить структурно збережений гомолог та структурно змінений дериват

der(2)t(2;?)(q21;?). Цікаво, що суттєві зміни довгого плеча хромосоми 2, які візуально створювали картину втрати його генетичного матеріалу, супроводжувалися, згідно даних array CGH, утворенням дуплікацій у візуально незміненому короткому плечі: порівняно невеликої (6,2 Mb) в ділянці 2p13.3-p12 та двох дрібних (0,6–0,7 Mb) в ділянках 2p21 і 2p24.1. Для того, щоб ідентифікувати генетичний матеріал довгого плеча хромосоми 2 у складі маркерних хромосом та об'єктивно охарактеризувати зміни в її короткому плечі, слід провести молекулярно-цитогенетичне дослідження із застосуванням багатоколірної FISH.

При цитогенетичному дослідженні переважно спостерігали моносомію 10 пари хромосом, яка в диплоїдному стані містила один структурно змінений гомолог (рис. 4.8). Результати array CGH засвідчили гетерогенність змін балансу ДНК, які вірогідно й супроводжували виникнення структурних змін у десятій хромосомній парі. Відбулася втрата великої ділянки 10p14-p12.1 короткого плеча (20,07 Mb) та множинні гетерогенні зміни довгого плеча, а саме: велика дуплікація 10q24.2-q26.11 (21,07 Mb), порівняно незначна дуплікація 10q22.1-q22.2 (4,75Mb) і значна втрата ДНК внаслідок делеції субтеломерної ділянки 10q26.11-q26.3 (14 Mb) (рис.4.19). У літературі описані випадки поєднання термінальної делеції і дуплікацій 10-ї хромосоми [399]. Подібно до вище наведених характеристик генетичного матеріалу хромосоми 10 у клітинах 4BL, описаний клінічний випадок з аналогічними ділянками дуплікації (10q25.3q26.2, 13.1Mb) і делеції (10q26.2q26.3, 5Mb), при чому використання FISH аналізу дозволило встановити, що дуплікований фрагмент знаходиться в інвертованій позиції [400].

Враховуючи чисельні «гарячі точки» в місцях перебудов, цілком можливо, що 10-та хромосома утворила транслокації з іншими хромосомами і привнесла до складу дериватів–маркерних хромосом надлишковий генетичний матеріал двох ділянок довгого плеча (10q24.2-q26.11 і 10q22.1-q22.2). Ймовірність цього підтверджує регулярне виявлення частини довгого плеча хромосоми 10 у складі деривату der(10) t(10;16;?)(q22;q24q10;?), який утворився

внаслідок транслокації між десятою, шістнадцятою і невизначеною хромосомами (рис.4.8; 4.9, в).

Структурні зміни хромосом у клітинах 4BL узгоджуються з гіпотезою щодо скоординованого виникнення делецій і дуплікацій та їх стабілізуючого впливу на трансформовані хромосоми, що дозволяє рекомендувати використання клітинної лінії 4BL для дослідження процесів еволюції каріотипу при адаптації до тривалого культивування.

Виявлені за допомогою array CGH незбалансовані зміни генетичного матеріалу асоціюються із достовірною зміною копійності онкогенів та генів-супресорів пухлинного росту, генів, продукти яких беруть участь в процесах реплікації, репарації, транскрипції, сплайсингу, трансляції, генів проліферації та маркерів диференціювання, апоптозу, сигнальних шляхів та біохімічних каскадів тощо. Тривале відтворення комплексних хромосомних аберацій на різних пасажах культивування може свідчити, що вони надають селективну перевагу клітинам, які їх містять. Загальна кількість генів, змінених внаслідок аберацій – 4 445, з них: 2 085 внаслідок дуплікацій та 2 360 внаслідок делецій (чи метилування, що перекриває доступ гібридизаційним зондам, внаслідок чого певна ділянка хромосоми може не давати сигналу) (табл. 5.2).

У ділянці дуплікації (1)(p36.32pter) розташовані два онкогена та п'ять генів-онкосупресорів, а також деякі гени апоптозу. Цікаво, що ця аберація з'явилась пізніше – її не спостерігали на 120-му та 160-му пасажах, можливо, її виникнення пов'язане з необхідністю кращого видалення мутантних клонів клітин. Також тут дупліковано ген NAD кінази, що дає енергетичну перевагу клітинам, які її містять. А дуплікація 2 p13.3 – p12 може надавати селективну перевагу клітинам завдяки гену SLC4A5, що забезпечує транспорт натрій бікарбонату, який використовується для регулювання рН в культурі клітин.

У ділянці дуплікації 2q31.1-q33.1 міститься багато генів, пов'язаних із структурно-функціональною організацією хроматину та перебігом мітозу, а це дозволяє оптимізувати клітинний поділ. У цій ділянці розташовані ключові гени апоптозу (CASP8, CASP10) для елімінації мутантних клонів, а також ген

білка SDPR, що допомагає клітинам вижити при зниженій концентрації сироватки в середовищі – нами показано таку здатність клітин.

Таблиця 5.2

Загальна кількість генів, змінена в результаті делецій/дуплікацій в клітинній лінії 4BL на 205-му пасажі

хромосома	локалізація	розмір (Mb)	делеція/дуплікація	к-сть генів
1	p36.33-p36.32	4,054	дуплікація	92
2	p24.1	0,601	дуплікація	1
2	p21	0,706	дуплікація	9
2	p13.3-p12	6,259	дуплікація	111
2	q31.1-q33.1	30,682	дуплікація	257
4	p16.3-p16.1	9,966	дуплікація	157
4	q24-q35.2	86,357	делеція	533
8	q21.13-q21.2	3,126	делеція	11
9	p21.3	2,132	делеція	8
10	p14-p12.1	20,065	делеція	202
10	q22.1-q22.2	0,54356	дуплікація	113
10	q24.2-q26.11	21,072	дуплікація	261
10	q26.11-q26.3	14,091	делеція	153
12	p13.33-p11.1	33,769	делеція	413
13	q12.11-q21.2	39,32	делеція	469
16	q12.1	0,781	дуплікація	9
16	q22.1-q24.3	22,342	дуплікація	301
17	q11.1-q21.31	18,027	делеція	515
17	q25.3	2,49	дуплікація	39
19	p13.3-p12	23,646	дуплікація	735
19	q13.12	0,36	делеція	7
X	p22.33	2,895	делеція	29
X	q21.31-q21.32	1,526	делеція	11
X	q21.31	1,899	делеція	9

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. Інший ген, локалізований в даній ділянці – 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 абераційного перебігу мітозу у клітинах 4BL.

Аналізуючи зміни 10 хромосоми, можна очікувати зниження експресії супресора RSU1 та генів репарації DCLRE1C і MGMT. При цьому, у подвійних копіях присутні гени апоптозу AIFM2 і CASP7, ген цикліну M1, онкоген WNT8B та онкосупресор MXI1, який негативно регулює експресію MYC. У зв'язку з делецією 12p13.33-p11.1 в одиничній копії присутні чисельні онкогени та онкосупресори, фактори плюрипотентності DPPA3 і NANOG із типовою експресією в ембріональних СК і пухлинах, а також ген цикліну D2. Хромосома X не втратила разом із делеціями життєво важливі гени. X моносомія виявилась типовою ознакою клітинної лінії 4BL на 205-му пасажі і, за даними arrayCGH, мала місце у понад 80% досліджених клітин (mos 45,X [>80 %] / 46,XX [<20 %]). Не виключено, що із втратою X хромосоми клітинна лінія позбавляється «зайвого» генетичного матеріалу [31].

У ділянці делеції 13 q12.11 – q 21.2 міститься три онкогени та десять генів-онкосупресорів, з них: LATS2 для формування веретена поділу; RGC8, що індукується p53 у відповідь на пошкодження ДНК, та відомі онкосупресори BRCA2 та RB1. Отже, ймовірно, що саме делеція по 13-ій хромосомі є ключовою в порушенні генетичної стабільності. Дуплікації 16 хромосоми в ділянках q12.1q12.2 і q22.1-q24.3, є навпаки, корисними для підтримки генетичної стабільності. Тут містяться гени, експресія котрих змінюється у відповідь на гіпоксію (SIAH1) 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 IL1 β . Делецію за 17 хромосомою можна назвати умовно нейтральною, оскільки делетовано приблизно рівну кількість онкогенів та онкосупресорів. У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12, незважаючи на малий розмір хромосоми, розташована величезна

кількість генів: відомий онкоген JUND та онкосупресори APC2 і GADD45B, ген апоптозу CASP14. Тут локалізовано велику кількість генів, що відповідають за правильну організацію й функціонування веретена поділу: MISP, SYCE2, HAUS8, MAU2, MAST1; мітоген-активуєчікінази MAP2K2 і 7, та активатор цитокінезу DOCK6. У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12 міститься ген встановлення і регуляції тканиноспецифічного 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. Очевидним є те, що дуплікація по 19 хромосомі забезпечує клітинний метаболізм на високому рівні, тут міститься значна кількість генів організації структури хроматину, процесів транскрипції, активації проліферації, що надає селективну перевагу клітинам, які її містять. До речі, саме по dup19 p13.3-p12 спостерігається тетрасомія, більшість інших виявлених дуплікацій є частковими, неповними.

Отже, основні перебудови генетичного матеріалу клітинної лінії 4BL відбулись до 120-го пасажу, тому, ймовірніше за все, що основний етап становлення клітинна лінія 4BL пройшла до цього часу, про що свідчить збереження пулу значних хромосомних перебудов та біядиплоїдного модального класу на різних пасажах культивування. Проте, на 133-му пасажі, ймовірніше за все, мала місце стадія кризи із значним зростанням – 54% клітин з біягаплоїдним каріотипом. Ця стадія знову змінювалась етапом стабілізації на 160-му пасажі, яка при обробці клітин стрес-чинником змінювалась різким зростанням хромосомної нестабільності, що характерно для етапу становлення. На 205-му пасажі клітинна лінія 4BL перебуває на етапі стабілізації. Тому, каріотипічна еволюція в клітинній лінії 4BL має хвилеподібний характер.

Більшість виявлених аберацій є мозаїчними, що підтверджує існування гетерогенних клонів в популяції клітинної лінії 4BL. Ознаками стабільності клітинної лінії 4 BL 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. Селективна перевага збережених хромосомних перебудов може асоціюватися з підвищенням дози генів 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). Все це відображає еволюцію каріотипу клітинної лінії 4 BL протягом тривалого культивування та засвідчує ефект регулярних хромосомних перебудов при досягненні етапу стабілізації.

Багато авторів стверджують про виникнення аберацій *de novo* в клітинних лініях. При повному аналізі геному і транскриптому 20 ліній iPS, які отримані із фібробластів шкіри 7 пацієнтів та їхньому порівнянні з вихідними клітинами, було знайдено 2 «нові» аберації. Проте при застосуванні ПЛР виявлено як мінімум 50% випадків їхньої наявності і у вихідних клітинах на рівні низько-частотного мозаїцизму [401]. Враховуючи, що лінії клітин мають клональне походження, стає зрозумілою вища частка хромосомних аберацій в них через «ефект засновника». Більше того, автори навіть пропонують застосовувати клітинні лінії як можливий інструмент для виявлення низькорівневого мозаїцизму в тканині їхнього походження. Мозаїцизм клітинних ліній iPS підтверджується також у роботі [402]: частина популяції клітин містила маркерну хромосому, а частина – ні. Накопичення значного масиву даних по дослідженню каріотипу клітинних ліній врешті поставило питання про те, а що власне відбувається в організмі. Анеуплоїдія є характерною рисою спонтанних абортів та хромосомних вад народження [403-405], а також спостерігається в більшості типів раку, окрім доброякісних пухлин [153, 406, 407]. Проте анеуплоїдія існує і в нормі. Давно відома анеуплоїдія та поліплоїдія клітин печінки [248, 350, 408]. З'являються нові дані про анеуплоїдію в інших органах. Так, несподівано, високий рівень анеуплоїдії виявили в мозку [409], і її частка

зростала з віком, що свідчить про те що мозок здатен підтримувати свою функцію при наявності високого рівню мозаїчної анеуплоїдності [410].

Гетерогенність популяції щойно отриманих клітин та її зменшення під час тривалого культивування підтверджується також дослідженням профілю метилування [411]. Таким чином, це узгоджується з етапами становлення та стабілізації клітинної лінії.

Неминучість змін каріотипу клітин вищих організмів в культурі відмічає в своєму огляді Кунах В.А.: перенесення клітин в культуру *in vitro* означає припинення їхнього існування як одного з структурних елементів цілісного організму, клітини виходять з-під контролю корелятивних факторів. Суттєво змінюються умови мікрооточення і характер живлення. «Ці зміни, які за своєю силою перевищують межі норми реакції геному клітин, є стресовими і призводять до кардинальної перебудови функцій і метаболізму клітин, значного підвищення рівня геномної і епігеномної мінливості, зміни напрямку і інтенсивності дії клітинного добору, і, як наслідок, до істотних порушень в структурі клітинних популяцій. В результаті популяції культивованих клітин відрізняються від вихідних тканин високим рівнем гетерогенності (поліморфізму) і значними перебудовами геному.» Адаптація клітин до умов культивування є унікальною моделлю глибокої регресивної еволюції біологічної системи від багатоклітинного рівня до одноклітинного [106]. Фактично, одна клітина починає відігравати роль індивідуальної особини в популяції, саме тому клітинні лінії називають популяцією клітин.

Клітинна лінія 4BL адаптувалась до виживання в умовах *in vitro* протягом тривалого часу з притаманними їй 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, що виявляються найбільш адаптованими до нових умов існування. Таке явище було виразно продемонстровано нами на прикладі клітинної лінії 4BL: на етапі стабілізації під впливом стрес-чинника (культивування протягом доби в середовищі з високою йонною силою) повторно індукується перехід клітинної

популяції в стан структурної нестабільності, характерний для етапу становлення.

Таким чином, в даній роботі нами отримано нову іморталізовану клітинну лінію 4BL із периферійної крові дорослого здорового донора та показано можливість підтримки клітин в недиференційованому стані, використовуючи рекомбінантні цитокіни LIF, SCF, IL-3 та 30% середовища, кондиціонованого ембріональними гермінативними клітинами. Доведено її стовбуровий потенціал шляхом диференціювання клітин в адипогенному, остеогенному та міогенному напрямках. За своїм імунофенотипом CD73+CD105+ та CD14-CD34-CD45-CD90- клітини лінії 4BL, ймовірно, належать до мезенхімальних негемопоетичних стовбурових клітин. Наявність двох морфологічних класів клітин: епітеліоподібних та фібробластоподібних, ймовірно, пов'язана із пластичністю стовбурових клітин і може свідчити про мезенхімально-епітеліальний перехід.

Регулярна відтворюваність цілого комплексу хромосомних перебудов свідчить про їхню можливу селективну перевагу та роль в адаптації клітин до умов тривалого відтворення в культурі.

Незважаючи на всі виявлені аберації, клітинна лінія 4BL зберігає білядиплоїдний модальний клас – 42-43 хромосоми протягом тривалого культивування, що робить її перспективною для застосування як модельної системи *in vitro*, наприклад, при тестуванні лікарських засобів на цитотоксичність. Клітинна лінія 4BL є зручним об'єктом для дослідження процесів адаптації клітин до нових умов мікрооточення, процесів мінливості каріотипу протягом тривалого культивування та може виступати як модель регресивної еволюції та вікових змін при старінні.

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 зростає 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*).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Magrath I.T., Pizzo P.A., Whang-Peng J. et al. Characterization of lymphoma-derived cell lines: comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen. I. Physical, cytogenetic, and growth characteristics // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1980. – Vol. 64, N 3. – P. 465-476.
2. Lengauer C., Kinzler S.J., Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancer // *Nature*.-1998.-Vol. 396, N 6712.-P.643-649.
3. Kops G.J., Weaver B.A., Cleveland D.W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint // *Nat. Rev. Cancer.* - 2005. - Vol. 5, N 10. - P.773-785.
4. Wilkens L, Hammer C, Glombitza S, Müller D.E. Hepatocellular and cholangiolar carcinoma-derived cell lines reveal distinct sets of chromosomal imbalances // *Pathobiology.* – 2012. – Vol. 79, N 3. – P. 115-126.
5. Onoda N., Nakamura M., Aomatsu N. et al. Establishment, characterization and comparison of seven authentic anaplastic thyroid cancer cell lines retaining clinical features of the original tumors // *World. J. Surg.* – 2014. – Vol. 38, N 3. – P. 688-695.
6. Lang J., Zhu W., Nokes B. et al. Characterization of a novel radiation-induced sarcoma cell line // *J. Surg. Oncol.* – 2015. – Vol. 111, N 6. – P. 669-682.
7. Степаненко О.А. Вплив терапевтичних хіміопрепаратів і стабільної трансфекції гена CH3L1 на геном та фенотип пухлинних клітин // Автореф. дис. канд. біол. наук. – Київ, 2016. – 26 с.
8. Gebauer F., Wicklein D, Tachezy M. et al. Establishment and Characterization of a Pair of Patient-derived Human Non-small Cell Lung Cancer Cell Lines from a Primary Tumor and Corresponding Lymph Node Metastasis // *Anticancer Res.* – 2016. – Vol. 36, N 4. – P. 1507-1518.
9. Kaseb H.O., Fohrer-Ting H., Lewis D.W., Lagasse E., Gollin S.M. Identification, expansion and characterization of cancer cells with stem cell properties from head and neck squamous cell carcinomas // *Exp. Cell Res.* – 2016. – Vol. 348, N 1. – P. 75-86.

10. Frosina G. Counteracting spontaneous transformation via overexpression of rate limiting DNA base excision repair enzymes // *Carcinogenesis*. – 2001. – Vol. 22, N 9. – P.1335-1341.
11. Rangarajan A., Hong S.J., Gifford A., Weinberg R.A. Species and cell type specific requirements for cellular transformation // *Cancer Cell*. – 2004. – Vol. 6, N 2. – P. 171– 83.
12. Blum B., Bar-Nur O., Golan-Lev T., Benvenisty N. The anti-apoptotic gene survivin contributes to teratoma formation by human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* – 2009. Vol. 27. – P. 281-287.
13. Hentze H., Soong P.L., Wang S.T. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies // *Stem Cell Res.* – 2009. – Vol. 2, N 3. – P. 198-210.
14. Bulic-Jakus F., Katusic Bojanac A., Juric-Lekic G. et al. Teratoma: from spontaneous tumors to the pluripotency/malignancy assay // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* – 2016. – Vol. 5, N 2. – P. 186-209.
15. Gordeeva O., Khaydukov S. Tumorigenic and Differentiation Potentials of Embryonic Stem Cells Depend on TGF β Family Signaling: Lessons from Teratocarcinoma Cells Stimulated to Differentiate with Retinoic Acid // *Stem Cells Int.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 1-14.
16. Lee A.S., Tang C., Hong W.X. Brief Report: External Beam Radiation Therapy for the Treatment of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Teratomas // *Stem Cells*. 2017. – Vol. 35, N 8. – P. 1994-2000.
17. King N.M., Perrin J. Ethical issues in stem cell research and therapy // *Stem Cell Res. Ther.* – 2014. – Vol. 5, N 4. – P. 85.
18. Hayflick L. The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous subcultivation // *Exp. Cell Res.* – 1961. – V.23, – P.14 – 20.
19. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство / пер. 5-го англ. –М.: БИНОМ. – Лаборатория знаний. – 2010. – 691 с.

20. Pertek A., Meier F., Irmeler M. Simple derivation of transgene-free iPS cells by a dual recombinase approach // *Mol. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 56, N 8. – P. 697-713.
21. Лукаш Л.Л. Дестабилизация клеточного генома под влиянием экспрессии ранних регуляторных генов онковирусов // *Цитология и генетика.* – 2002. – Т. 36, № 2. – С. 68-80.
22. Lukash L.L. Regulation of mutagenesis by exogenous biological factors in the eukaryotic cell systems // *Biopolymers and Cell.* – 2013. – V. 29, N 4. – P. 283-294.
23. Speiseder T., Hofmann-Sieber H., Rodríguez E. et al. Efficient Transformation of Primary Human Mesenchymal Stromal Cells by Adenovirus Early Region 1 Oncogenes // *J. Virol.* – 2016. – Vol. 91, N 1. pii: e01782-16.
24. Lin Y.C., Boone M., Meuris L. et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations // *Nat. Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P.4767. doi: 10.1038/ncomms5767.
25. Nguyen H.T., Geens M., Spits C. Genetic and epigenetic instability in human pluripotent stem cells // *Hum Reprod Update.* – 2013. – Vol. 19, N 2. – P. 187-205.
26. Mayshar Y., Ben-David U., Lavon N. et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells// *Cell Stem Cell.* – 2010. – Vol. 7, N 4. – P. 521-531.
27. Peterson S.E., Loring JF. Genomic instability in pluripotent stem cells: implications for clinical applications // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, N 8. – P. 4578-4584.
28. Lamm N., Kerem B. Continuous chromosomal instability in human pluripotent stem cells - the role of DNA replication // *Mol. Cell. Oncol.* – 2016. – Vol. 3, N 4. – e1183743.
29. Оленов Ю.М. Проблемы молекулярной генетики: клетка, онтогенез, рак, эволюция. – Л.: Наука, 1977. – 207 с.

30. Вахтин Ю.Б. Генетическая теория клеточных популяций.– Л.: Наука, 1980.– 168 с.
31. Мамаева С.Е. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре // Цитология.– 1996.– Т.38, № 8.– С.787– 814.
32. Яцишина А.П., Кваша С.М., Підпала О.В., Рубан Т.П., Вагіна І.М., Лукаш Л.Л. Генетична нестабільність ембріональних гермінативних клітин лінії G1 миші та порушення функцій контрольної точки мітозу і p53// *Biopolymeris and Cell.*-2007.-V.23, № 4.-P.338-346.
33. Яцишина А.П., Лило В.В., Підпала О.В., Рубан Т.П., Вагіна І.М., Лукаш Л.Л. Експресія Об-метилгуанін ДНК-метилтрансферази у клітинах спонтанно іморталізованої лінії G1 миші та її субліній G1-OA і G1-T // *Biopolymers and Cell.*-2007.-V.23, № 3.-P.250-254.
34. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell.* – 2006. –Vol. 126, N 4. – P. 663-676.
35. Kim D., Kim C-H., Moon J-I., et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming protein // *Cell Stem Cell.* – 2009. - Vol.4. – P.472-476.
36. Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T. et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA // *Cell Stem Cell.* – 2010. – Vol. 7. – P. 618–630.
37. Zhou Y.Y., Zeng F. Integration-free methods for generating induced pluripotent stem cells // *Genomics Proteomics Bioinformatics.* – 2013. – Vol. 11, N 5. – P. 284-287.
38. Higuchi A., Ling Q.D., Kumar S.S. et al. Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material // *Lab. Invest.* – 2015. – Vol. 95, N 1. – P. 26-42.
39. Ghazizadeh Z., Rassouli H., Fonoudi H. et al. Transient Activation of Reprogramming Transcription Factors Using Protein Transduction Facilitates

Conversion of Human Fibroblasts Toward Cardiomyocyte-Like Cells // *Mol Biotechnol.* – 2017. – Vol. 59, N 6. – P. 207-220.

40. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Кушнирук В.О., Пидпала О.В. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* – К: Логос. – 2011. – С.493-498.

41. <http://bioinformatics.hsanmartino.it/cldb/cldb.php>

42. Romano P., Manniello A., Aresu O. et al. Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human celllines // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol. 37. (Database issue). – P. 925 – 932.

43. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science.* – 1998. – Vol. 282, N 5391. – P. 1145-1147.

44. Tong Z., Solanki A., Hamilos A. et al. Application of biomaterials to advance induced pluripotent stem cell research and therapy // *EMBO J.* – 2015. – Vol. 34, N 8. – P. 987-1008.

45. Hovatta O., Stojkovic M., Nogueira M., Varela-Nieto I. European scientific, ethical, and legal issues on human stem cell research and regenerative medicine // *Stem Cells.* – 2010. – Vol.28. – P. 1005–1007.

46. Wobus A.M. The Janus face of pluripotent stem cells--connection between pluripotency and tumorigenicity // *Bioessays.* – 2010. – Vol. 32, N 11. – P.993-1002.

47. Ben-David U., Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells // *Nat. Rev. Cancer.* – 2011. – Vol. 11, N 4. – P.268-277.

48. Lalu M.M., McIntyre L., Pugliese C. et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (Safe Cell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, N 10. - e47559.

49. Zomer H.D., Vidane A.S., Gonçalves N.N., Ambrósio C.E. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives // *Stem Cells Cloning*. – 2015. – Vol. 8. – P. 125-134.

50. Ogura F., Wakao S., Kuroda Y. et al. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine // *Stem Cells Dev*. – 2014. – Vol. 23, N 7. – P. 717-728.

51. Leow S.N., Luu C.D., Hairul Nizam M.H. et al. Safety and Efficacy of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Therapy for Retinal Degeneration // *PLoS One*. 2015. – Vol. 10, N 6. - e0128973.

52. Chen A., Ting S., Seow J., Reuveny S., Oh S. Considerations in designing systems for large scale production of human cardiomyocytes from pluripotent stem cells // *Stem. Cell Res. Ther*. – 2014. – Vol. 5, N 1. – P. 1 -12.

53. Ramdasi S., Sarang S., Viswanathan C. Potential of Mesenchymal Stem cell based application in Cancer // *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res*. – 2015. – Vol. 9, N 2. – P.95-103.

54. Hu C., Li L. Two Effective Routes for Removing Lineage Restriction Roadblocks: From Somatic Cells to Hepatocytes // *Int. J. Mol. Sci*. – 2015. – Vol 16, N 9. – P. 20873 –20895.

55. Périé S., Trollet C., Mouly V. et al. Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study // *Mol. Ther*. – 2014. – Vol. 22, N 1. – P.219-225.

56. Feng R., Lengner C. Application of Stem Cell Technology in Dental Regenerative Medicine // *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. – 2013. – Vol. 2, N 6. – P.296-305.

57. Rezanian A., Bruin J.E., Arora P. et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells // *Nat. Biotechnol*. – 2014. – Vol. 2, N 11. – P.1121-33.

58. Han F., Baremberg D., Gao J. et al. Development of stem cell-based therapy for Parkinson's disease // *Transl. Neurodegener*. – 2015. – Vol. 4, N 16. – P. 1-13.

59. Giri S., Bader A. A low-cost, high-quality new drug discovery process using patient-derived induced pluripotent stem cells // *Drug Discov. Today.* – 2015. – Vol. 20, N 1. – P. 37-49.
60. Khetani S.R., Berger D.R., Ballinger K.R. et al. Microengineered liver tissues for drug testing // *World J. Stem Cells.* – 2015. – Vol.7, N 2. – P.461-9.
61. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells // *Nature.* – 2007. – Vol. 448, N 7151. – P. 313-317.
62. Wernig M., Meissner A., Foreman R. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state // *Nature.* – 2007. – Vol. 448, N 7151.- P.318-324.
63. Tian Z., Guo F., Biswas S., Deng W. Rationale and Methodology of Reprogramming for Generation of Induced Pluripotent Stem Cells and Induced Neural Progenitor Cells // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17, N 4. –pii: E594.
64. Takahashi K., Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2016. – Vol. 17, N 3. – P. 183-193.
65. Rapti K., Stillitano F., Karakikes I. et al. Effectiveness of gene delivery systems for pluripotent and differentiated cells // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* – 2015. - Vol. 2:14067.
66. Kulcenty K., Wróblewska J., Mazurek S. et al. Molecular mechanisms of induced pluripotency // *Contemp. Oncol. (Pozn).* – 2015. – Vol. 19, N 1. – P. 22–29.
67. Smith Z.D., Sindhu C., Meissner A. Molecular features of cellular reprogramming and development // *Molecular Cell Biology.* 2016. – Vol. 17. – P. 139–154.
68. David L., Polo J.M. Phases of reprogramming // *Stem Cell Res.* – 2014. – Vol. 12, N 3. – P. 754-761.
69. Soufi A., Zaret K.S. Understanding impediments to cellular conversion to pluripotency by assessing the earliest events in ectopic transcription factor binding to the genome // *Cell Cycle.* – 2013. – Vol. 12, N 10. – P. 1487-1491.

70. Samavarchi-Tehrani P., Golipour A., David L. Functional Genomics Reveals a BMP-Driven Mesenchymal-to-Epithelial Transition in the Initiation of Somatic Cell Reprogramming // *Cell Stem Cell*. – 2010. – Vol.7, 64–77.

71. Ye X., Weinberg R.A. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression // *Trends Cell Biol.* – 2015. – Vol. 25, N 11. – P. 675-686.

72. Hawkins K, Joy S, McKay T. Cell signalling pathways underlying induced pluripotent stem cell reprogramming // *World J. Stem Cells*. – 2014. – Vol. 6, N 5. – P. 620-628.

73. Kida Y.S., Kawamura T., Wei Z. et al. ERRs Mediate a Metabolic Switch Required for Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency // *Cell Stem Cell*. – 2015. – Vol. 16, N 5. – P. 547-555.

74. Yamanaka S. A fresh look at iPS cells // *Cell*.- 2009. – Vol. 137.- P. 13-17.

75. Yang C.S., Rana T.M. Learning the molecular mechanisms of the reprogramming factors: let's start from microRNAs // *Mol. Biosyst.* – 2013. – Vol. 9, N 1. – P. 10-17.

76. Chen T., Dent S.Y. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation // *Nat. Rev. Genet.* – 2014. – Vol. 15, N 2. – P. 93-106.

77. van den Hurk M., Kenis G., Bardy C. et al. Transcriptional and epigenetic mechanisms of cellular reprogramming to induced pluripotency // *Epigenomics*. – 2016. – Vol. 8, N 8. – P. 1131-1149.

78. González F., Huangfu D. Mechanisms underlying the formation of induced pluripotent stem cell // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* – 2016. – Vol. 5, N 1. – P. 39-65.

79. Talkhabi M., Zonooz E.R., Baharvand H. Boosters and barriers for direct cardiac reprogramming // *Life Sci.* – 2017. – Vol. 178. – P. 70-86.

80. Wang T., Warren S.T., Jin P. et al. Toward pluripotency by reprogramming: mechanisms and application // *Protein Cell*. – 2013. – Vol. 4, 11. – P. 820-32.

81. Budniatzky I., Gepstein L. Concise Review: Reprogramming Strategies for Cardiovascular Regenerative Medicine: From Induced Pluripotent Stem Cells to Direct Reprogramming // *Stem cells translational medicine*. – 2014. – Vol. 3, N 4. – P. 448—457.

82. Manian K.V., Aalam S.M., Bharathan S.P. et al. Understanding the Molecular Basis of Heterogeneity in Induced Pluripotent Stem Cells // *Cell Reprogram.* – 2015. – Vol. 17, N 6. – P. 427-440.

83. Ohnukia M., Tanabea K., Sutoua K., et al. Dynamic regulation of human endogenous retroviruses mediates factor-induced reprogramming and differentiation potential // *PNAS*. – 2014. – Vol. 111, N 34. – P. 12426–12431.

84. Santoni F.A., Guerra J., Luban J. HERV-H RNA is abundant in human embryonic stem cells and a precise marker for pluripotency // *Retrovirology*. – 2012. – Vol. 9, N 111. doi: 10.1186/1742-4690-9-111.

85. Liu Z., Tang Y., Lü S. et al. The tumourigenicity of iPS cells and their differentiated derivatives // *J. Cell Mol. Med.* – 2013. – Vol. 17, N 6. – P. 782-791.

86. Chestkov I.V., Khomyakova E.A., Vasilieva E.A. et al. Molecular barriers to processes of genetic reprogramming and cell transformation // *Biochemistry (Mosc)*. – 2014. – Vol. 79, N 12. – P. 1297-1307.

87. Martinez-Fernandez A., Nelson T.J., Reyes S. iPS cell-derived cardiogenicity is hindered by sustained integration of reprogramming transgenes // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2014. – Vol. 7, N5. – P. 667-676.

88. Soares F.A., Pedersen R.A., Vallier L. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Sendai Virus // *Methods Mol. Biol.* – 2016. – Vol. 1357. – P. 23-31.

89. Wen W., Zhang J.P., Chen W. Generation of Integration-free Induced Pluripotent Stem Cells from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Episomal Vectors // *J.Vis. Exp.* – 2017. – Vol. 119. doi: 10.3791/55091.

90. Hu K. Vectorology and factor delivery in induced pluripotent stem cell reprogramming // *Stem Cells Dev.* – 2014. – Vol. 23, N 12. – P. 1301-1315.

91. Chou B.K., Mali P., Huang X. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures // *Cell Res.* – 2011. – Vol. 21, N 3. – P. 518-529.

92. Chou B.K., Gu H., Gao Y. et al. A facile method to establish human induced pluripotent stem cells from adult blood cells under feeder-free and xeno-free culture conditions: a clinically compliant approach // *Stem Cells Transl. Med.* – 2015. – Vol. 4, N 4. – P. 320-332.

93. Su R.J., Neises A., Zhang X.B. Generation of iPS Cells from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Episomal Vectors // *Methods Mol.Biol.* – 2016. – Vol. 1357. – P. 57-69.

94. Goh P.A., Caxaria S., Casper C. A systematic evaluation of integration free reprogramming methods for deriving clinically relevant patient specific induced pluripotent stem (iPS) cells // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N 11. – e81622.

95. Page R.L., Ambady S., Holmes W.F. et al. Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes // *Cloning and Stem Cells.* – 2009. – Vol. 11, N 3. – P. 417-426.

96. Gong J., Fields M.A., Moreira E.F. et al. Differentiation of Human Protein-Induced Pluripotent Stem Cells toward a Retinal Pigment Epithelial Cell Fate // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, N 11. - e0143272.

97. Li X.H., Li Q., Jiang L. et al. Generation of Functional Human Cardiac Progenitor Cells by High-Efficiency Protein Transduction // *Stem Cells Transl. Med.* – 2015. – Vol. 4, N 12. – P. 1415-1424.

98. Cha M.Y., Kwon Y.W., Ahn H.S. et al. Protein-Induced Pluripotent Stem Cells Ameliorate Cognitive Dysfunction and Reduce A β Deposition in a Mouse Model of Alzheimer's Disease // *Stem Cells Transl Med.* – 2017. – Vol. 6, N 1. – P. 293-305.

99. Their M., Müntz B., Edenhofer F. Exploring refined conditions for reprogramming cells by recombinant Oct4 protein // *Int. J. Dev. Biol.* – 2010. – Vol. 54, N11-12. – P. 1713-1721.

100. Thier M., Müntz B., Mielke S., Edenhofer F. Cellular reprogramming employing recombinant sox2 protein // *Stem Cells Int.* – 2012. – Vol. 2012:549846.
101. Harreither E., Rydberg H.A., Amand H.L. Characterization of a novel cell penetrating peptide derived from human Oct4 // *Cell Regen (Lond).* – 2014. – Vol. 3, N 1. 2. doi: 10.1186/2045-9769-3-2.
102. Nordin F., Tye G.J., Gaken J. et al. TAT - Fusion Protein of OCT-3/4 and KLF-4: Stable Mixed Population Cell Lines Capable of Delivering Fusion Proteins to Target Cells // *J. Cell Sci. Ther.* – 2014. – Vol. 5, N 2 . – P. 158–170.
103. Lim J., Kim J., Kang J. Partial somatic to stem cell transformations induced by cell-permeable reprogramming factors // *Sci. Rep.* – 2014. – Vol. 4:4361.
104. Wang X.C., Ralf J. OCT4: A penetrant pluripotency inducer // *Cell Regeneration.* – 2014. – Vol. 3, N 6. doi: 10.1186/2045-9769-3-6.
105. Tammam S., Malak P., Correa D. et al. Nuclear delivery of recombinant OCT4 by chitosan nanoparticles for transgene-free generation of protein-induced pluripotent stem cells // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, N 25. – P. 37728-37739.
106. Кунах В.А. Еволюція клітинних популяцій *in vitro*: особливості, рушійні сили, механізми і наслідки // *Biopolymers and Cell.* – 2013. – Vol. 29, N 4. – P. 295– 310.
107. Burholt D.R., Shackney S.E., Ketterer D.M. et al. Karyotypic evolution of a human undifferentiated large cell carcinoma of the lung in tissue culture // *Cancer Res.* – 1989.– V. 49, N 12. – P.3355– 3361.
108. Viganó C., von Schubert C., Ahrné E. et al. Quantitative proteomic and phospho-proteomic comparison of human colon cancer DLD-1 cells differing in ploidy and chromosome stability // *Mol Biol Cell.* – 2018. – Vol. 29, N 9. – P. 1031-1047.
109. Walters D.K., Arendt B.K., Tschumper R.C. Characterization and use of the novel human multiple myeloma cell line MC-B11/14 to study biological consequences of CRISPR-mediated loss of immunoglobulin A heavy chain // *Exp. Hematol.* – 2018. – Vol. 57. – P. 42-49.

110. McCormick A., Earp E., Elliot K. et al. Functional characterisation of a novel ovarian cancer cell line, NUOC-1 // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, N 16. – P. 26832-26844.

111. Yamaguchi H., Inokuchi K., Hanawa H. et al. Establishment of a near-triploid human B-cell lymphoma cell line with t(14;18) and a p53 gene point mutation // *Br. J. Haematol.* – 1999. – Vol. 105, N 3. – P. 764-767.

112. Hayashida M., Daibata M, Tagami E. Establishment and characterization of a novel Hodgkin lymphoma cell line, AM-HLH, carrying the Epstein-Barr virus genome integrated into the host chromosome // *Hematol. Oncol.* – 2017. – Vol. 35, N 4. – P. 567-575.

113. Lima E.M., Rissino J.D., Harada M.L. et al. Conventional cytogenetic characterization of a new cell line, ACP01, established from a primary human gastric tumor // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2004. – Vol. 37, N 12. – P. 1831-1838.

114. Wu C.P., Zhou L., Gong H.L. et al. Establishment and characterization of a novel HPV-negative laryngeal squamous cell carcinoma cell line, FD-LSC-1, with missense and nonsense mutations of TP53 in the DNA-binding domain // *Cancer Lett.* – 2014. – Vol. 342, N 1. – P. 92-103.

115. Michelhaugh S.K., Guastella A.R., Varadarajan K. et al. Development of patient-derived xenograft models from a spontaneously immortal low-grade meningioma cell line, KCI-MENG1 // *J. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 13. – P. 227 - 243.

116. Ribeiro I.P., Rodrigues J.M., Mascarenhas A. et al. Cytogenetic, genomic, and epigenetic characterization of the HSC-3 tongue cell line with lymph node metastasis // *J. Oral. Sci.* – 2018. – Vol. 60, N 1. – P. 70-81.

117. Яцишина А.П. Особливості спонтанної каріотипічної еволюції ембріональних гермінативних клітин миші *in vitro* // Автореф. дис. канд. биол. наук. – К., 2008. – 20 с.

118. Cohen N., Betts D.R., Tavori U. et al. Karyotypic evolution pathways in medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor determined with a combination of

spectral karyotyping, G– banding, and fluorescence in situ hybridization // *Cancer Genet. – Cytogenet.*– 2004.– Vo. 149, N 1.– P. 44– 52.

119. Яковлева А.Н., Федорцева Р.Ф., Крылова Т.Н., Фридлянская И.И., Швембергер И.Н. Цитогенетические изменения эксплантированной рабдомиосаркомы мышцы при длительном культивировании // *Цитология.*– 1988.– Т. 30, № 6.– С. 726– 731.

120. Todaro G.J., Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines // *J. cell Biol.*– 1963.– V.17.– P.299– 313.

121. Nielsen K.V., Madsen M.W., Briand P. *In vitro* karyotype evolution and cytogenetic instability in the non– tumorigenic human epithelial cell line HMT– 3522 // *Cancer Genet. Cytogenet.*– 1994.– V. 78, N 2.– P.189– 199.

122. Buskermolen J.K., Reijnders C.M., Spiekstra S.W. et al. Development of a Full-Thickness Human Gingiva Equivalent Constructed from Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts // *Tissue Eng. Part C. Methods.* – 2016. – Vol. 22, N 8. – P.781-791.

123. Kwack M.H., Yang J.M., Won G.H. et al. Establishment and characterization of five immortalized human scalp dermal papilla cell lines // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2018. – Vol. 496, N 2. – P. 346-351.

124. Fabris V., Lamb C.A., Keck C., Aldaz M.C., Merani S., Lanari C. Karyotypic evolution of four novel mouse mammary carcinoma cell lines. Identification of marker chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization // *Cancer Genet. Cytogenet.*– 2003.– V. 142, N 1.– P. 36– 45.

125. Guttenbach M., Steinlein C., Engel W., Schmid M. Cytogenetic Characterization of the TM4 mouse Sertoli cell line. 1. Conventional banding techniques, FISH and SKY // *Cytogenet. Cell Genet.*– 2001.– V.94, N 1– 2.– P.71– 78.

126. Balaban G.B., Herlyn M., Clark W.H.Jr., Nowell P.C. Karyotypic evolution in human malignant melanoma // *Cancer Genet. Cytogenet.*– 1986.– V. 19, N 1– 2.– P. 113– 122.

127. Elliot B.E., Mudrik K., Marshall J., Vekemans M., Holden J.J. Karyotypic evolution of a murine mammary adenocarcinoma *in vitro* and during progression from primary to metastatic growth *in vivo* // *Genes Chromosomes Cancer*.– 1992.– V. 4, N 4.– P. 281– 289.

128. Strickland F.V., Pathak S., Multani A.S. et al. Molecular characterization of new melanoma cell lines from C3H mice induced by ethanol plus ultraviolet radiation // *Cancer research*.– 2003.– V. 63, N 13.– P. 3503– 3510.

129. Tyrkus M., Diglio C.A., Gohle N. Karyotype evolution in a transformed rat cerebral endothelial cell line // *Int. J. Cancer*.– 1983.– V. 32, N 4.– P.485– 490.

130. Глазко Т. Т., Лавровский В.А., Кондрахин Ю.В. Фенотипическая и хромосомная изменчивость эмбриональных фибробластов мышей разных линий в процессе спонтанной неопластической эволюции // *Экспериментальная онкология*.– 1991.– Т. 13, № 4.– С.29– 53.

131. Nielson K.A. A hexaploid Ehrlich–Lettre mouse ascites tumor line with low sensitivity to colchicine // *Hereditas*.– 1976.– V.83, N 1.– P.105– 122.

132. Christie N.T., Sen P., Costa M. Chromosomal alterations in cell lines derived from mouse rhabdomyosarcomas induced by crystalline nickel sulfide // *Biol. Med*.– 1988.– V. 1,N 1.– P. 43– 50.

133. Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология: Пер. с нем.– М.:Мир, 1982.– В 3– х т.– Т.3.– 344 с.

134. Ярцева Н.М., Федорцева Р.Ф. Особенности изменений кариотипа клеток крысы в процессе их трансформации *in vitro* // *Цитология*. – 2014. – Т. 56, N1. – С. 14–35.

135. Goolsby C.L., Wiley J.E., Steiner M. et al. Karyotype evolution in a simian virus 40– transformed tumorigenic human cell line // *Cancer Genet Cytogenet*. – 1990. – Vol. 50, N 2. – P. 231– 248.

136. Savelyeva L, Mamaeva S. Heterogeneity and balance of chromosomes in human cell line M-HeLa-76: analysis of 100 karyotypes // *Cancer Genet Cytogenet*. – 1987. – Vol. 28, N 2. – P. 311-25.

137. Casalone R., Mazzola D., Righi R. et al. Cytogenetic and interphase FISH analyses of 73 basal cell and three squamous cell carcinomas: different findings in direct preparations and short-term cell cultures // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2000. – Vol.118, N 2. – P. 136-143.

138. Qiu H., Xue Y., Zhang J. et al. Establishment and characterization of a new human acute myelocytic leukemia cell line SH-2 with a loss of Y chromosome, a derivative chromosome 16 resulting from an unbalanced translocation between chromosomes 16 and 17, monosomy 17, trisomy 19, and p53 alteration // *Exp Hematol.* – 2008. – Vol. 36, N 11. – P. 1487-95.

139. Turc-Carel C., Philip I., Berger M.P. et al. Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma // *C. R. Seances. Acad. Sci. III.* – 1983. – Vol. 296, N 23. – P. 1101-1103.

140. Zhao X., Zhao Y.-J., Lin Q. et al. Cytogenetic landscape of paired neurospheres and traditional monolayer cultures in pediatric malignant brain tumors // *Neuro-oncology.* – 2015. – Vol.17, N 7. – P. 965-977.

141. Pan J., Xue Y., Chen S. et al. Establishment and characterization of a new human acute myelomonocytic leukemia cell line JIH-3 // *Leuk Res.* – 2012. – Vol. 36, N 7. – P. 889-894.

142. Chen S.N., Xue Y.Q., Zhang X.G. et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemic cell line, SHI-1, carrying t(6;11)(q27;23) and p53 gene alteration // *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2005. – Vol. 26, N 2. – P.94-99.

143. Медведева М.Н., Саакова Э.О., Водейко Г.М. и др. Цитологическая кариологическая характеристика перевиваемых клеточных линий человеческого происхождения. I. Характеристика превиваемой клеточной линии амниотического происхождения // *Цитология.* – 1972. – Т. 14, № 2. – С. 240-247.

144. Михайлова Г.Р., Перекрест В.В., Демидова С.А. Кариологический анализ клеточных культур почек человека, трансформированных онкорнавирусами // *Вопросы онкогенетики* – Киев: Здоровье, 1974. – С. 87-89.

145. Lukash L.L., Buzhievskaya T.I., Varshaver N.B., Shapiro N.I. Oncogenic adenovirus as mutagen for Chinese hamster cells *in vitro* // *Somatic Cell Genet.* – 1981. – Vol. 7, N 2. – P. 133-146.
146. Бужиевская Т.И. Вирусиндуцированный мутагенез в клетках млекопитающих. – Киев: Наукова думка, 1984. – 136с.
147. Лукаш Л. Л. Вплив екзогенних вірусів і ДНК на спонтанний та індукований мутагенез в соматичних клітинах ссавців [Текст] : автореф. дис... д-ра біол. наук: 03.00.26 / Лукаш Любов Леонідівна; НАН України, Ін-т молекуляр. біології і генетики. - К., 1999. - 34 с.
148. Cin P.D., Qian X., Cibas E.S. The marriage of cytology and cytogenetics // *Cancer cytopathology.* –2013. – Vol. 121, N 6. – P. 279-290.
149. Nowell P., Hungerford D. A minute chromosome in chronic granulocytic leukemia // *Science.* – 1960. – Vol. 132, N 3438. – P. 1488 -1497.
150. Hernández J.M., Granada I., Solé F. From conventional cytogenetics to microarrays. Fifty years of Philadelphia chromosome // *Med. Clin. (Barc).* – 2011. – Vol. 137, N 5. – P. 221-229.
151. Hagmar L., Strömberg U., Bonassi S. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, N 6. – P. 2258-2263.
152. Tavokina L.V., Brovko A.A., Baronova E.V. et al. Efficiency of application of different DNA probes in identifying marker chromosomes // *Biopolym. Cell.* – 2016. – Vol. 32, N 1. – P. 49-53.
153. Keen-Kim D., Nooraie F., Rao P.N. Cytogenetic biomarkers for human cancer // *Front. Biosci.* – 2008. – Vol. 13. – P. 5928-5949.
154. Park I.J., Park J.E., Kim H.J. et al. Acute myeloid leukemia with t(16;21)(q24;q22) and eosinophilia: case report and review of the literature // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2010. – Vol. 196, N 1. – P.105-8.
155. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes // *Blood.* – 2009. – Vol. 114. – P. 937-995.

156. Campbell L.J. Cytogenetics of myeloproliferative neoplasms // *Methods in molecular biology*. – 2011. – Vol.730. – P. 89-98.

157. Hajingabo L.J., Daakour S., Martin M. Predicting interactome network perturbations in human cancer: application to gene fusions in acute lymphoblastic leukemia // *Mol. Biol. Cell*. – 2014. – Vol. 25, N 24. – P. 3973-3985.

158. Dadone B., Refae S., Lemarié-Delaunay C. et al. Molecular cytogenetics of pediatric adipocytic tumors // *Cancer genetics*. – 2015. – Vol. 208, N 10. – P. 469-48.

159. Italiano A., Cardot N., Dupré F. et al. Gains and complex rearrangements of the 12q13-15 chromosomal region in ordinary lipomas: the "missing link" between lipomas and liposarcomas? // *Int. J. Cancer*. – 2007. – Vol. 121, N 2. – P. 308-315.

160. Bridge J.A. The role of cytogenetics and molecular diagnostics in the diagnosis of soft-tissue tumors // *Modern pathology*. – 2014. – Vol. 27, Suppl 1. – P. 80-97.

161. Speleman F., Delattre O., Peter M. et al. Malignant melanoma of the soft parts (clear-cell sarcoma): confirmation of EWS and ATF-1 gene fusion caused by a t(12;22) translocation // *Mod. Pathol*. – 1997. – Vol. 10, N 5. – P. 496-499.

162. Heim S. Cytogenetics in the investigation of haematological disorders // *Baillieres Clin. Haematol*. – 1990. – Vol. 3, N 4. – P. 921-948.

163. Limon J., Mitelman F. Significance of chromosomal abnormalities in solid tumors of humans // *Pol. J. Pathol*. – 1994. – Vol. 45, N 1. – P.1-15.

164. Horten B.C., Basler G.A., Shapiro W.R. Xenograft of human malignant glial tumors into brains of nude mice. A histopathological study // *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. – 1981. – Vol. 40, N 5. – P. 493-511.

165. Heppner G.H. Tumor heterogeneity // *Cancer Res*. –1984. – Vol. 44, N 6. – P. 2259–2265.

166. Stepanenko A., Andreieva S., Korets K. et al. Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells // *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2015. – Vol. 31, N. 4. – P. 209-217.

167. Chen J., Wang J. Establishment of a human laryngeal carcinoma Hep-2/5-Fu cell line and the screening of differentially expressed genes // *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* – 2012. – Vol. 26, N 24. – P. 1130-1133.

168. Park R.W., Kim T.M., Kasif S., Park P.J. Identification of rare germline copy number variations over-represented in five human cancer types // *Mol. Cancer.* – 2015. – Vol.14:25. doi: 10.1186/s12943-015-0292-6.

169. Greenman C.D., Pleasance E.D., Newman S. Estimation of rearrangement phylogeny for cancer genomes // *Genome Res.* – 2012. – Vol. 22, N 2. – P. 346-361.

170. Huh J., Moon H., Chung W.S. Incidence and clinical significance of sex chromosome losses in bone marrow of patients with hematologic diseases // *Korean J. Lab. Med.* – 2007. – Vol. 27, N 1. – P. 56-61.

171. Zhang L.J., Shin E.S., Yu Z.X., Li S.B. Molecular genetic evidence of Y chromosome loss in male patients with hematological disorders // *Chin. Med. J. (Engl).* – 2007. – Vol. 120, N 22. – P.2002-2005.

172. Ganster C., Kampfe D., Jung K. et al. New data shed light on Y-loss-related pathogenesis in myelodysplastic syndromes // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2015. – Vol. 54, N 12. – P.717-724.

173. Dumanski J.P., Lambert J.C., Rasi C. et al. Mosaic Loss of Chromosome Y in Blood Is Associated with Alzheimer Disease // *Am. J. Hum. Genet.* – 2016. – Vol. 98, N 6. – P. 1208-1219.

174. Noveski P., Madjunkova S., Sukarova Stefanovska E. et al. Loss of Y Chromosome in Peripheral Blood of Colorectal and Prostate Cancer Patients // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, N 1. e0146264.

175. Forsberg L.A., Rasi C., Malmqvist N. et al. Mosaic loss of chromosome Y in peripheral blood is associated with shorter survival and higher risk of cancer // *Nat Genet.* – 2014. – Vol. 46, N 6. – P.624-628.

176. Wojda A., Zietkiewicz E., Mossakowska M. et al. Correlation between the level of cytogenetic aberrations in cultured human lymphocytes and the age and gender of donors // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med.Sci.* – 2006. – Vol. 61, N 8. – P. 763-772.

177. Russell L.M., Strike P., Browne C.E., Jacobs P.A. X chromosome loss and ageing // *Cytogenet Genome Res.* – 2007. – Vol. 116, N 3. – P. 181-185.

178. Wojda A., Zietkiewicz E., Witt M. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects // *Mutagenesis.* – 2007. – Vol. 22, N 3. – P. 195-200.

179. Stumm M., Boger E., Gaissmaier C.G. et al. Genomic chondrocyte culture profiling by array-CGH, interphase-FISH and RT-PCR // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2012. – Vol. 20, N 9. – P. 1039-45.

180. Saha C., Polash A.H., Islam M.T., Shafrin F. In silico prediction of structure and functions for some proteins of male-specific region of the human Y chromosome // *Interdiscip Sci.* – 2013. – Vol. 5, N 4. – P. 258-269.

181. Filatov L. V., Mamaeva S. E. Stability of karyotype of two permanent cell lines of the Chinese hamster - CHO-K1 and V-79 // *Tsitologiya.* – 1985. – Vol. 27. – P. 1031-1038.

182. Reimann-Berg N., Murua Escobar H., Kiefer Y. et al. Cytogenetic analysis of CpG-oligonucleotide DSP30 plus Interleukin-2-Stimulated canine B-Cell lymphoma cells reveals the loss of one X Chromosome as the sole abnormality // *Cytogenet Genome Res.* – 2011. – Vol. 135, N 1. – P. 79-82.

183. Chapiro E., Antony-Debre I., Marchay N. Sex chromosome loss may represent a disease-associated clonal population in chronic lymphocytic leukemia // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2014. – Vol. 53, N 3. – P. 240-247.

184. Zakharov A. F., Kakpakova E. S., Egolina N. A. Interrelation of the numerical and structural karyotype variability in the cultured Chinese hamster cells // *Tsitologiy.* – 1966. – Vol. 8 – P. 193 – 201.

185. Quinn L.A., Woods L.K., Merrick S.B., Arabasz N.M., and Moore C.E. Cytogenetic analysis of twelve human malignant melanoma cell lines // *J. Natl. Cancer Insf.* – 1977. – Vol. 59. – P. 301-307.

186. Ohyashiki K., Ohyashiki J. H., Sandberg A. A. Cytogenetic characterization of putative human myeloblastic leukemia cell lines (ML-1, -2, and -3): origin of the cells // *Cancer Res.* – 1986. – Vol. 46. – P. 3642-3647.

187. Bigner, S. H., Mark J., and Bigner, D. D. Chromosomal progression of malignant human gliomas from biopsy to establishment as permanent lines in vitro // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 1987. – Vol.24. – P. 163-176.

188. Iqbal M.A., Martin A.O., Simpson J.L. Increased sister chromatid exchanges in human cell lines characterized by monosomy X or structural abnormalities of the X chromosome // *Hum Genet.* – 1984. – Vol. 68, N 3. - P. 205-208.

189. Earl J., Rico D., Carrillo-de-Santa-Pau E. et al. The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies // *BMC Genomics.* – 2015. – Vol. 16, N 1. – P. 403 – 441.

190. Sun Z., Prodduturi N., Sun S.Y. et al. Chromosome X genomic and epigenomic aberrations and clinical implications in breast cancer by base resolution profiling // *Epigenomics.* – 2015. – Vol. 7. – P. 1099-1110.

191. Camargo M., Wang N. Cytogenetic evidence for the absence of an inactivated X chromosome in a human female (XX) breast carcinoma cell line // *Hum. Genet.* – 1980. – Vol. 55. – P. 81-85.

192. Maitra A., Arking D.E., Shivapurkar N. et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells // *Nat. Genet.* – 2005. – Vol. 37, № 10. – P.1099 – 1103

193. Redaelli S., Bentivegna A., Foudah D. et al. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of in vitro cultured human bone marrow mesenchymal stem cells // *Stem Cell Res. Ther.* – 2012. – Vol. 3, N 6. – P. 47.

194. Baker D.E., Harrison N.J., Maltby E. et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo // *Nat. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 207-215.

195. Draper J.S., Smith K., Gokhale P. et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 22, № 1. – P. 53 – 54.

196. Chen G., Yue A., Ruan Z. et al. Monitoring the biology stability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during long-term culture in serum-free medium // *Cell Tissue Bank.* – 2014. – Vol. 15, N 4. – P. 513-521.

197. Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J., et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 350, № 13. – P. 1353 – 1356.

198. Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Iwano T. et l. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture // *Development.* – 2005. – Vol. 132, № 18. – P. 4155 - 4163.

199. Ware C.B., Nelson A.M., Blau C.A. A comparison of NIH-approved human ESC lines // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24, № 12. – P. 2677 – 2684.

200. Tang F., Barbacioru C., Bao S. et al. Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis // *Cell Stem Cell.* – 2010. – Vol. 6, N 5. – P. 468-478.

201. Gaztelumendi N., Nogués C. Chromosome instability in mouse embryonic stem cells // *Sci. Rep.* – 2014. – Vol.4 – P. 5324.

202. Lund R.J., Emani M.R., Barbaric I. et al. Karyotypically abnormal human ESCs are sensitive to HDAC inhibitors and show altered regulation of genes linked to cancers and neurological diseases // *Stem Cell Res.* – 2013. – Vol. 11, N 3. – P. 1022-1036.

203. Rebuzzini P., Zuccotti M., Redi C.A., Garagna S. Chromosomal Abnormalities in Embryonic and Somatic Stem Cells // *Cytogenet. Genome Res.* – 2015. – Vol. 147, N 1. – P. 1-9.

204. Zhang M., Cheng L., Jia Y. et al. Aneuploid embryonic stem cells exhibit impaired differentiation and increased neoplastic potential // *EMBO J.* – 2016. – Vol. 35, N 21. – P. 2285-2300.

205. Storchová Z. Too much to differentiate: aneuploidy promotes proliferation and teratoma formation in embryonic stem cells // *EMBO J.* – 2016. – Vol. 35, N 21. – P. 2265-2267.

206. Longo L., Bygrave A., Grosveld F.G., Pandolfi P.P. The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimerism // *Transgenic Res.* – 1997. – Vol.6, N 5. – P.321-328.

207. Никольский Н.Н., Габий И.А., Сомова Н.В. Эмбриональные стволовые клетки человека. Проблемы и перспективы // *Цитология.* – 2007. – Т.49, № 7. – С. 529-537.

208. Liu X., Wu H., Loring J., et al. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission // *Dev. Dyn.* – 1997. – Vol. 209, N 1. – P.85– 91.

209. Park J.I., Yoshida I., Tada T. et al. Trisomy 8 does not affect differentiative potential in a murine partenogenetic embryonic stem cell line // *Jpn. J. Vet. Res.* –1998. – V.46, N 1. – P. 29-35.

210. Глазко Т.Т., Межевикина Л.М., Бойко А.А., Фесенко Е.Е. «Цепная» кариотипическая эволюция эмбриональных стволовых клеток линии R1 *in vitro* // *Цитология.*-2005.-Т.47, № 8.-С.679-685.

211. Raz R., Lee C.K., Cannizzaro L.A. et al. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1999.-V.96, N 6.-P. 2846-2851.

212. Hirano T., Ishihara K., Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors // *Oncogene.*-2000.-V. 19, N 21. - P.2548-2556.

213. Lee M., Kim Y., Ryu J.H. et al. Long-term, feeder-free maintenance of human embryonic stem cells by mussel-inspired adhesive heparin and collagen type I // *Acta Biomater.* – 2016. – Vol. 32. – P. 138-148.

214. Ye J., Bates N. Soteriou D. et al. High quality clinical grade human embryonic stem cell lines derived from fresh discarded embryos // *Stem Cell Res Ther.* – 2017. – Vol. 8, N 1. – P. 128.

215. Catalina P., Montes R., Ligeró G. et al. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability

among hESC lines due to inherent properties? // *Mol. Cancer.* – 2008. – Vol. 7, N 76. doi: 10.1186/1476-4598-7-76.

216. Zucchelli M., Ström S., Holm F., Malmgren H. et al. In vivo differentiated human embryonic stem cells can acquire chromosomal aberrations more frequently than in vitro during the same period // *Stem Cells Dev.* – 2012. – Vol. 21, N 18. – P. 3363-3371.

217. Li C.S., Chen C., Zheng P., Liu Y. Transgenic expression of P1A induced thymic tumor: a role for onco-fetal antigens in tumorigenesis // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5, N 10. – e13439.

218. Deng L, Xiang X, Yang F. Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates esophageal squamous cancer development // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 490, N 2. – P. 161-168.

219. Lee S., Wottrich S., Bonavida B. Crosstalks between Raf-kinase inhibitor protein and cancer stem cell transcription factors (Oct4, KLF4, Sox2, Nanog) // *Tumour Biol.* – 2017. – Vol. 39, N 4. – P. 1010428317692253.

220. Niu N., Mercado-Uribe I., Liu J. Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant cancer cells // *Oncogene.* – 2017. – Vol. 36, N 34. – P. 4887-4900.

221. You L., Guo X., Huang Y. Correlation of Cancer Stem-Cell Markers OCT4, SOX2, and NANOG with Clinicopathological Features and Prognosis in Operative Patients with Rectal Cancer // *Yonsei Med. J.* – 2018. – Vol. 59, N 1. – P. 35-42.

222. van Schaijik B., Davis P.F., Wickremesekera A. et al. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review // *J. Clin. Pathol.* – 2018. – Vol. 71, N 1. – P. 88-91.

223. Almstrup K., Sonne S.B., Hoei-Hansen C.E. et al. From embryonic stem cells to testicular germ cell cancer—should we be concerned? // *Int. J. Androl.* – 2006. – Vol. 29:211-8.

224. Harrison N.J., Baker D., Andrews P.W. Culture adaptation of embryonic stem cells echoes germ cell malignancy // *Int. J. Androl.* – 2007. – Vol. 30. – P. 275-281.
225. Enver T., Soneji S., Joshi C. et al. Cellular differentiation hierarchies in normal and culture-adapted human embryonic stem cells // *Hum. Mol. Genet.* – 2005. – Vol. 14. – P. 3129-3140.
226. Dal Cin P., Drochmans A., Moerman P., Van den Berghe H. Isochromosome 12p in mediastinal germ cell tumor // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 1989. – Vol. 42. – P. 243-251.
227. de Bruin T.W., Slater R.M., Defferrari R. et al. Isochromosome 12p-positive pineal germ cell tumor // *Cancer Res.* – 1994. – Vol. 54. – P. 1542-1544.
228. Kraggerud S.M., Skotheim R.I., Szymanska J. et al. Genome profiles of familial/bilateral and sporadic testicular germ cell tumors // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2002. – Vol. 34. – P. 168-174.
229. Imreh M.P., Gertow K., Cedervall J. et al. *In vitro* culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells // *J. Cell Biochem.* – 2006. – Vol. 99. – P. 508-516.
230. Andrews P.W., Matin M.M., Bahrami A.R. et al. Embryonic stem (es) cells and embryonal carcinoma (ec) cells: Opposite sides of the same coin // *Biochem. Soc. Trans.* – 2005. – Vol. 3. – P. 1526-1530.
231. Yang S., Lin G., Tan Y.Q., Zhou D, Deng LY, Cheng DH, et al. Tumor progression of culture-adapted human embryonic stem cells during long-term culture // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2008. – Vol. 47. – P. 665-679.
232. Blum B., Benvenisty N. The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells // *Cell Cycle.* – 2009. – Vol. 8, N 23. – P. 3822-3380.
233. Werbowetski-Ogilvie T.E., Bosse M., Stewart M. et al. Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression // *Nat. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 91-97.

234. Tarte K., Gaillard J., Lataillade J.J. et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation // *Blood* – 2010. – Vol. 115. – P. 1549-1553.

235. Geens M., Seriola A., Barbe L. et al. Female human pluripotent stem cells rapidly lose X chromosome inactivation marks and progress to a skewed methylation pattern during culture // *Mol. Hum. Reprod.* – 2016. – Vol. 22, N 4. – P. 285-298.

236. Zaim M., Karaman S., Cetin G., Isik S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells // *Ann Hematol.* – 2012. – Vol. 91, N 8. – P. 1175-1186.

237. Guo L., Zhou Y., Wang S., Wu Y. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids // *J. Cell Mol. Med.* – 2014. – Vol. 18, N 10. – P. 2009-2019.

238. Turinetto V., Vitale E., Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17, N 7. - pii: E1164.

239. Lidzbarsky G., Gutman D., Shekhidem H.A. et al. Genomic Instabilities, Cellular Senescence, and Aging: In Vitro, In Vivo and Aging-Like Human Syndromes // *Front Med (Lausanne).* – 2018. – Vol. 5, N 104. – P. 1 -16.

240. Suchánek J., Soukup T., Ivancaková R. et al. Human dental pulp stem cells – isolation and long term cultivation // *Acta Medica (Hradec Kralove).* – 2007. – Vol. 50, N 3. – P. 195-201.

241. Kundrotas G., Gasperskaja E., Slapsyte G. et al. Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, N 10. – P. 10788-10802.

242. Zhu Y., Song X., Han F. et al. Alteration of histone acetylation pattern during long-term serum-free culture conditions of human fetal placental mesenchymal stem cells // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, N 2. – e 0117068.

243. Koch C.M., Jousen S., Schellenberg A., Lin Q, Zenke M, Wagner W. Monitoring of Cellular Senescence by DNA-Methylation at Specific CpG sites // *Aging Cell.* – 2012. – Vol. 11. – P. 366-369.

244. Schellenberg A., Mauen S., Koch C.M. et al. Proof of principle: quality control of therapeutic cell preparations using senescence-associated DNA-methylation changes // *BMC Res. Notes.* – 2014. - Vol. 7, N 254. – P. 1-5.

245. Ronen D., Benvenisty N. Genomic stability in reprogramming // *Curr. Opin. Genet Dev.* – 2012. – Vol. 22, N 5. – P. 444-449.

246. Na J., Baker D., Zhang J., et al. Aneuploidy in pluripotent stem cells and implications for cancerous transformation // *Protein Cell.* – 2014. – Vol. 5, N 8. – P. 569-579.

247. Congras A., Barasc H., Canale-Tabet K. Non-integrative strategy decreases chromosome instability and improves endogenous pluripotency genes reactivation in porcine induced pluripotent-like stem cells // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6, N 27059. doi: 10.1038/srep27059.

248. Noto F.K., Determan M.R., Cai J. et al. Aneuploidy is permissive for hepatocyte-like cell differentiation from human induced pluripotent stem cells // *BMC Res. Notes.* – 2014. – Vol. 7, N 437. doi: 10.1186/1756-0500-7-437.

249. Ma N., Shan Y., Liao B. et al. Factor-induced Reprogramming and Zinc Finger Nuclease-aided Gene Targeting Cause Different Genome Instability in β -Thalassemia Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290, N 19. – P. 12079-12089.

250. Peterson S.E., Loring J.F. Genomic instability in pluripotent stem cells: implications for clinical applications // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, N8. – P. 4578-4584.

251. Bedel A., Beliveau F., Lamrissi-Garcia I. et al. Preventing Pluripotent Cell Teratoma in Regenerative Medicine Applied to Hematology Disorders // *Stem Cells Transl. Med.* – 2017. – Vol. 6, N 2. – P. 382-393.

252. Deng J., Zhang Y., Xie Y. et al. Cell Transplantation for Spinal Cord Injury: Tumorigenicity of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells // *Stem Cells Int.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 1-7.

253. Laurent L.C., Ulitsky I., Slavin I. et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPS Cs during reprogramming and time in culture // *Cell Stem Cell.* – 2011. – Vol. 8, N 1. – P.106-118.

254. Mayshar Y., Ben-David U., Lavon N. et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells// *Cell Stem Cell.* – 2010. – Vol. 7, N 4. – P. 521-531.

255. Dekel-Naftali M., Aviram-GoldringA., LitmanovitchT. Screening of human pluripotent stem cells using CGH and FISH reveals low-grade mosaic aneuploidy and a recurrent amplification of chromosome 1q // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 20, N 12. – P. 1248-1255.

256. Schneider J.S., Cheng X., Zhao Q. et al. Reversible mitochondrial DNA accumulation in nuclei of pluripotent stem cells // *Stem Cells Dev.* – 2014. – Vol. 23, N 22. – P. 2712-2719.

257. Zhang M., Yang C., Liu H., Sun Y. Induced pluripotent stem cells are sensitive to DNA damage // *Genomics Proteomics Bioinformatics.* – 2013. – Vol. 11, N 5. – P. 320-326.

258. Liedtke S., Biebrnick S., Radke T.F. et al. DNA damage response in neonatal and adult stromal cells compared with induced pluripotent stem cells // *Stem Cells Transl. Med.* – 2015. – Vol. 4, N 6. – P. 576-589.

259. Geissmann Q. Open CFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects / Q. Geissmann // *PLoS One.* – 2013. – № 2. – P. e54072.

260. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека. Атлас. – М.: Медицина, 1982. – 263 с.

261. Barch M. J., Knutsen T., Spurbeck J. L. The AGT cytogenetics laboratory manual. Edition, 3rd ed. – Third edition – Lippincott-Raven Publishers. –1997. – 666 pp.
262. Shaff L.G., J. McGowan-Jordan, M. Schmid, S. Karger. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Basel. – 2013. – 140 p.
263. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
264. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal Biochem.* – 1976. – Vol.72. – P.248 – 254.
265. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol.227, N5259. – P.680 – 685.
266. DeCicco-Skinner K.L., Henry G.H., Cataisson C. et. al. Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis // *J. Vis. Exp.* – 2014. – Vol. 91. e51312
267. Nguyen E.H., Daly W.T., Le N.N.T. et al. Versatile synthetic alternatives to Matrigel for vascular toxicity screening and stem cell expansion // *Nat. Biomed Eng.* 2017. – Vol 1. pii: 0096.
268. Boxall S.A., Jones E. Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells // *Stem Cells Int.* – 2012. – N. 975871. – 35 p.
269. Shablii V. A., Kuchma M. D., Kyryk V. M. et al. Mesenchymal and trophoblast immunophenotype of multipotent stromal cells from human placenta // *Biopolym. Cell.* – 2014. – Vol. 30, N 2. – P. 118-121.
270. Atlasi Y., Mowla S.J., Ziaee S.A., Bahrami A.R. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer // *Int. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 120, N 7. – P.1598-1602.
271. Kim B.W., Cho H., Choi C.H. et al. Clinical significance of OCT4 and SOX2 protein expression in cervical cancer // *BMC Cancer.* – 2015. – Vol. 15. – P.1015.

272. Murakami S., Ninomiya W., Sakamoto E et al. SRY and OCT4 Are Required for the Acquisition of Cancer Stem Cell-Like Properties and Are Potential Differentiation Therapy Targets // *Stem Cells*. – 2015. – Vol. 33, N 9. – P. 2652-2663.

273. Villodre E.S., Kipper F.C., Pereira M.B. et al. Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis // *Cancer Treat Rev*. – 2016. – Vol. 51. – P. 1-9.

274. Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W.P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. // *DNA Repair (Amst)*. – 2007. – Vol. 6. - P.1079–1099.

275. Акопян Г. Р. Передчасне розділення хромосом як інформативний маркер хромосомної нестабільності в клітинах людини // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології*. – 2007. – Т. 1. – С.390–394.

276. Yih L.H., Lee T.C. Induction of C-anaphase and diplochromosome through dysregulation of spindle assembly checkpoint by sodium arsenite in human fibroblasts // *Cancer Res*. – 2003. – Vol. 63, N 20. – P. 6680–6688.

277. Riegel M. Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides // *Genet. Mol. Biol.* - 2014. – Vol. 37, N 1. – P.194-209.

278. Evangelidou P., Alexandrou A., Moutafi M., et al. Implementation of high resolution whole genome array CGH in the prenatal clinical setting: advantages, challenges, and review of the literature // *Biomed. Res. Int*. – 2013. – Vol. 34, 6762.

279. Yin A., Lu J., Liu C., et al. A prenatal missed diagnosed case of submicroscopic chromosomal abnormalities by karyotyping: the clinical utility of array-based CGH in prenatal diagnostics // *Mol. Cytogenet*. – 2014. – Vol. 15 . – P. 7- 26.

280. Bi W., Borgan C., Pursley A.N., et al. Comparison of chromosome analysis and chromosomal microarray analysis: What is the value of chromosome analysis in today's genomic array era? // *Genet Med*. – 2013. – Vol. 15. – P.450-457.

281. Tsuda T., Marinetti M.R., Masuelli L., Cutler M.L. The Ras suppressor RSU-1 localizes to 10p13 and its expression in the U251 glioblastoma cell line

correlates with a decrease in growth rate and tumorigenic potential // *Oncogene*. – 1995. – Vol. 11, N 2. – P. 397-403.

282. Berezki O., Ujfaludi Z., Pardi N. et al. TATA binding protein associated factor 3 (TAF3) interacts with p53 and inhibits its function // *BMC Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 9, N 57. – P.1-11.

283. Logarinho E., Resende T., Torres C., Bousbaa H. The human spindle assembly checkpoint protein Bub3 is required for the establishment of efficient kinetochore-microtubule attachments // *Mol. Biol. Cell.* – 2008. – Vol. 19, N 4. – P. 1798-1813.

284. Bonache S., Gutierrez-Enriquez S., Tenés A. et al. Mutation analysis of the BCCIP gene for breast cancer susceptibility in breast/ovarian cancer families // *Gynecol Oncol.* – 2013. – Vol. 131, N 2. – Vol. 460-463.

285. Macewicz L.L., Kushniruk V.O., Iatsyshyna A.P. et al. Correlation the level of mutagenesis with expression of reparative enzyme O6-methylguanin DNA methyltransferase (MGMT) during establishment of cell lines in vitro // *Biopolymers and cell.* – 2013. – Vol. 29, N 6. – P. 485 – 492.

286. Falvella F.S., Manenti G, Spinola M. et al. Identification of RASSF8 as a candidate lung tumor suppressor gene // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25, N 28. – P. 3934-3938.

287. Lock F.E., Underhill-Day N., Dunwell T. et al. The RASSF8 candidate tumor suppressor inhibits cell growth and regulates the Wnt and NF-kappaB signaling pathways // *Oncogene*. – 2010. – Vol. 29, N 30. – P. 4307-4316.

288. Wongtrakoongate P., Jones M., Gokhale P.J., Andrews P.W. STELLA facilitates differentiation of germ cell and endodermal lineages of human embryonic stem cells // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, N 2. - e56893.

289. Li Y., Higashiyama S., Shimakage M. et al. Involvement of NANOG upregulation in malignant progression of human cell // *DNA Cell Biol.* – 2013. – Vol. 32, N 3. – P. 104-110.

290. Ray A., James M.K., Larochelle S. et al. p27Kip1 inhibits cyclin D-cyclin-dependent kinase 4 by two independent modes // *Mol. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 29, N 4. – P. 986-999.
291. Zhang Q., Sakamoto K., Wagner K.U. D-type Cyclins are important downstream effectors of cytokine signaling that regulate the proliferation of normal and neoplastic mammary epithelial cells // *Mol Cell Endocrinol.* – 2014. – Vol. 382, N 1. – P. 583-592.
292. Murphree A.L., Benedict W.F. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis // *Science.* – 1984. – Vol. 223, N 4640. – P. 1028-1033.
293. Yendamuri S., Trapasso F., Calin G.A. ARLTS1 - a novel tumor suppressor gene // *Cancer Lett.* – 2008. – Vol. 264, N 1. – P. 11-20.
294. Aristizabal M.J., Negri G.L., Benschop J.J. et al. High-throughput genetic and gene expression analysis of the RNAPII-CTD reveals unexpected connections to SRB10/CDK8 // *PLoS Genet.* – 2013. – Vol. 9, N 8. - e1003758.
295. De Boer L., Oakes V., Beamish H. et al. Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27, N 31. – P. 4261-4268.
296. Lewandowska U., Zelazowski M., Seta K. et al. WWOX, the tumour suppressor gene affected in multiple cancers // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 60, Suppl. 1. – P. 47-56.
297. Gunaratne A., Thai B.L., Di Guglielmo GM. Atypical protein kinase C phosphorylates Par6 and facilitates transforming growth factor β -induced epithelial-to-mesenchymal transition // *Mol. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 33, N 5. – P. 874-886.
298. Hu J., Yao H., Gan F. et al. Interaction of OKL38 and p53 in regulating mitochondrial structure and function // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, N 8. - e43362.
299. Hamimes S., Arakawa H., Stasiak A.Z. et al. RDM1, a novel RNA recognition motif (RRM)-containing protein involved in the cell response to cisplatin in vertebrates // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, N 10. – P. 9225-9235.
300. Hata T., Ogawa T., Yokoyama T.A. et al. DSCP1, a novel TP53-inducible gene, is upregulated by strong genotoxic stresses and its overexpression

inhibits tumor cell growth in vitro // *Int. J. Oncol.* – 2004. – Vol. 24 , N 3. – P. 513-520.

301. Schultz L., Khera S., Sleve D. et al. TIAF1 and p53 functionally interact in mediating apoptosis and silencing of TIAF1 abolishes nuclear translocation of serine 15-phosphorylated p53 // *DNA Cell Biol.* – 2004. – Vol. 23, N 1. – P. 67-74.

302. Roberts D.M., Pronobis M.I., Poulton J.S. et al. Regulation of Wnt signaling by the tumor suppressor adenomatous polyposis coli does not require the ability to enter the nucleus or a particular cytoplasmic localization // *Mol. Biol. Cell.* – 2012. – Vol. 23, N 11. – P. 2041-2056.

303. Mack H.I., Munger K. The LKB1 tumor suppressor differentially affects anchorage independent growth of HPV positive cervical cancer cell lines // *Virology.* – 2013. – Vol. 446, N 1-2. – P. 9-16.

304. Salvador J.M., Brown-Clay J.D., Fornace A.J. Jr. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis // *Adv. Exp. Med. Biol.* –2013. – Vol. 793. – P. 1-19.

305. Bianco S.D., Kaiser U.B. Molecular biology of the kisspeptin receptor: signaling, function, and mutations // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013. – Vol. 784 . – P. 133-158.

306. Ussar S., Voss T. MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279 , N 42. – P. 43861-43869.

307. Tournier C., Dong C, Turner T.K. et al. MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines // *Genes Dev.* – 2001. – Vol. 15, N 11. – P. 1419-1426.

308. Eckl J.M., Rutz D.A., Haslbeck V. et al. Cdc37 (cell division cycle 37) restricts Hsp90 (heat shock protein 90) motility by interaction with N-terminal and middle domain binding sites // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, N 22. – P. 16032-16042.

309. Gray P.J.Jr., Stevenson M.A., Calderwood S.K. Targeting Cdc37 inhibits multiple signaling pathways and induces growth arrest in prostate cancer cells // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, N 24. – P. 11942-50.

310. Jinawath N., Vasoontara C., Yap K.L. et al. NAC-1, a potential stem cell pluripotency factor, contributes to paclitaxel resistance in ovarian cancer through inactivating Gadd45 pathway // *Oncogene*. – 2000. – Vol. 28, N 18. – P. 1941-1948.

311. Tien A.L., Senbanerjee S., Kulkarni A. et al. UHRF1 depletion causes a G2/M arrest, activation of DNA damage response and apoptosis // *Biochem J*. – 2011. – Vol. 435, N 1. – P. 175-185.

312. Kalvakolanu D.V., Nallar S.C., Kalakonda S. et al. Cytokine-induced tumor suppressors: a GRIM story // *Cytokine*. – 2010. – Vol. 52, N 1-2. – P. 128-142.

313. Коцаренко Е.В., Акуленко О.А., Лыло В.В. и др. Влияние репаративного энзима MGMT и сопутствующего ему белка MARP на цитотоксическое действие алкилирующих соединений в культурах клеток человека // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. - 2015. - Т. 13, № 1. - С. 39-45.

314. Kang X., Yu Q., Huang Y. Effects of Integrating and Non-Integrating Reprogramming Methods on Copy Number Variation and Genomic Stability of Human Induced Pluripotent Stem Cells // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, N 7. – P. e0131128.

315. Wen W., Zhang J.P., Chen W. Generation of Integration-free Induced Pluripotent Stem Cells from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Episomal Vectors // *J. Vis. Exp.* – 2017. – Vol. 119. doi: 10.3791/55091.

316. Ogawa M., LaRue A.C., Mehrotra M. Plasticity of hematopoietic stem cells // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* – 2015. – Vol. 28, N 2-3. – P. 73-80.

317. Sánchez Alvarado A., Yamanaka S. Rethinking differentiation: stem cells, regeneration, and plasticity // *Cell*. – 2014. – Vol. 157, N 1. – P. 110-119.

318. Meyer M.B., Benkusky N.A., Sen B. et al. Epigenetic Plasticity Drives Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 291, 34. – P. 17829-17847.

319. Chatterjee D., Tufa D.M., Baehre H. et al. Natural killer cells acquire CD73 expression upon exposure to mesenchymal stem cells // *Blood*. – 2014. Vol. 123, N 4. – P. 594-5.

320. Bono M.R., Fernández D., Flores-Santibáñez F. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression // *FEBS Lett*. 2015. – Vol. 589, N 22. – P. 3454-3460.

321. de Oliveira Bravo M., Carvalho J.L., Saldanha-Araujo F. Adenosine production: a common path for mesenchymal stem-cell and regulatory T-cell-mediated immunosuppression // *Purinergic Signal*. – 2016. –Vol. 12, N 4. – P. 595-609.

322. Ode A., Schoon J., Kurtz A. et al. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells // *Eur. Cell Mater*. – 2013. – Vol. 25. – P.37-47.

323. Kays S.K., Kaufmann K.B., Abel T. et al. CD105 is a surface marker for receptor-targeted gene transfer into human long-term repopulating hematopoietic stem cells // *Stem Cells Dev*. – 2015. – Vol. 24, N 6. – P. 714-723.

324. Drénou B. Flow cytometry for CD34 determination in hematopoietic grafts // *Hematol. Cell Ther*. – 1996. – Vol. 38, N 6. – P. 505-512.

325. Kwon S.M., Lee J.H., Lee S.H. et al. Cross talk with hematopoietic cells regulates the endothelial progenitor cell differentiation of CD34 positive cells // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, N 8. - e106310.

326. Cyster J.G., Healy J.I., Kishihara K. et al. Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45 // *Nature*. – 1996. – Vol. 381, N 6580. –P. 325-328.

327. Kumar A., Sherlin H.J., Ramani P. et al. Expression of CD 68, CD 45 and human leukocyte antigen-DR in central and peripheral giant cell granuloma, giant cell tumor of long bones, and tuberculous granuloma: An immunohistochemical study // *Indian. J. Dent. Res*. – 2015. – Vol. 26, N 3. – P. 295-303.

328. Tarzi R.M., Liu J., Schneiter S. et al. CD14 expression is increased on monocytes in patients with anti-neutrophil cytoplasm antibody (ANCA)-associated vasculitis and correlates with the expression of ANCA autoantigens // *Clin. Exp. Immunol.* – 2015. – Vol.181, N 1. – P.65-75.

329. Muller-Sieburg C.E., Whitlock C.A., Weissman I.L. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1-lo hematopoietic stem cell // *Cell.* – 1986.- Vol. 44, N 4. – P. 653-662.

330. Rege T.A., Hagood J.S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20, N 8. – P. 1045-1054.

331. Moraes D.A., Sibov T.T., Pavon L.F. et al. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells // *Stem. Cell. Res. Ther.* – 2016. – Vol. 7, N 1. – P. 97.

332. Kawamoto K., Konno M., Nagano H. et al. CD90- (Thy-1-) high selection enhances reprogramming capacity of murine adipose-derived mesenchymal stem cells // *Dis. Markers.* – 2013. –Vol. 35, N 5. – P. 573-579.

333. Liu L., Zhang J., Fang C. et al. OCT4 mediates FSH-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion through the ERK1/2 signaling pathway in epithelial ovarian cancer // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – Vol. 461, N 3. – P. 525-532.

334. Soheili S., Asadi M.H., Farsinejad A. Distinctive expression pattern of OCT4 variants in different types of breast cancer // *Cancer Biomark.* – 2017. – Vol. 18, N 1. – P. 69-76.

335. Rebuzzini P., Zuccotti M., Redi C.A., Garagna S. Achilles' heel of pluripotent stem cells: genetic, genomic and epigenetic variations during prolonged culture // *Cell Mol. Life Sci.* – 2016. – Vol. 73, N 13. – P. 2453-2466.

336. Oh J.H., Kim Y.J, Moon S., etal. Genotype instability during long-term subculture of lymphoblastoid cell lines // *J. Hum. Genet.* – 2013. – Vol. 58, № 1. – P. 16-20.

337. Kuhn E.M., Therman E, Susman B. Amitosis and endocycles in early cultured mouse trophoblast // *Placenta*. – 1991. – Vol. 12, 3. – P. 251-261.
338. Walen K.H. Bipolar genome reductional division of human near-senescent, polyploid fibroblast cells // *Cancer Genet Cytogenet*. – 2007. – Vol. 173, N 1. – P. 43–50.
339. Wang M.J., Chen F., Lau J.T.Y., Hu Y.P. Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes // *Cell Death Dis*. – 2017. – Vol. 8, N 5. e2805.
340. Bergmann O., Zdunek S., Felker A. et al. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart // *Cell*. – 2015. – Vol. 161, N 7. – P. 1566-1575.
341. Mazzi S., Lordier L., Debili N. et al. Megakaryocyte and polyploidization // *Exp. Hematol*. – 2018 – Vol. 57. – P. 1-13.
342. Cross J.C. More of a good thing or less of a bad thing: gene copy number variation in polyploid cells of the placenta // *PLoS Genet*. – 2014. Vol. 10, N 5. – e1004330.
343. Gansburgskii A.N., Yal'tsev A.V. Morphology and Ploidy of Smooth Muscle Cells in Chorionic Arteries under Different Hemodynamic Conditions // *Bull. Exp. Biol Med*. – 2017. – Vol. 162, N 4). – P. 507-509.
344. Toufaily M.H., Roberts D.J., Westgate M.N., Holmes L.B. Triploidy: Variation of Phenotype // *Am. J. Clin. Pathol*. – 2016. – Vol. 145, Vol. 1. – P. 86-95.
345. Segawa T., Kuroda T., Kato K. et al. Cytogenetic analysis of the retained products of conception after missed abortion following blastocyst transfer: a retrospective, large-scale, single-centre study // *Reprod. Biomed Online*. – 2017. – Vol. 34, N 2. – P. 203-210.
346. Natera-De Benito D., Poo P., Gean E. et al. Diploid/triploid mosaicism: a variable but characteristic phenotype // *Rev. Neurol*. – 2014. – Vol. 59, N 4. – P. 158-163.
347. Lalani F.K., Elsner G.L., Lebel R.R., Beg M.B. Gastrointestinal manifestations in diploid/triploid mixoploidy // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. – 2015. – Vol. 60, N 6. – P. 799-801.

348. Edwards M.J., Park J.P., Wurster-Hill D.H., Graham J.M. Jr. Mixoploidy in humans: two surviving cases of diploid-tetraploid mixoploidy and comparison with diploid-triploid mixoploidy // *Am. J. Med. Genet.* – 1994. – Vol. 52, N 3. – P. 324-330.

349. Chen X., Luo Y., Fan Y. et al. Triploid and diploid embryonic stem cell lines derived from tripronuclear human zygotes // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2012. – Vol. 29, N 8. – P. 713-721.

350. Duncan A.W. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver // *Semin Cell Dev. Biol.* – 2013. – Vol. 24, N 4. – P. 347-356.

351. Leslie M. Strength in numbers? // *Science.* – 2014. – Vol. 343, N 6172. – P. 725-727.

352. Бемякова Е.М. Изучение изменений чисел хромосом клеток первичных культур при их длительном культивировании вне организма // *Цитология и генетика.* – 1969. - Т. 3, № 6.- С. 489-491.

353. Zhang N., Ge G., Meyer R. et al. Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2008. – Vol. 5, N 35. – P. 13033-13038.

354. Wu C.P., Zhou L., Gong H.L. et al. Establishment and characterization of a novel HPV-negative laryngeal squamous cell carcinoma cell line, FD-LSC-1, with missense and nonsense mutations of TP53 in the DNA-binding domain // *Cancer Lett.* – 2014. – Vol. 342, N 1. – P. 92-103.

355. Yuan K., O'Farrell P.H. Cyclin B3 is a mitotic cyclin that promotes the metaphase-anaphase transition // *Curr Biol.* – 2015. – Vol. 25, N 6. – P. 811-816.

356. Jahn S.C., Corsino P.E., Davis B.J. et al. Constitutive Cdk2 activity promotes aneuploidy while altering the spindle assembly and tetraploidy checkpoints // *J. Cell Sci.* – 2013. – Vol. 126, N 5. – P. 1207-1217.

357. Balachandran R.S., Heighington C.S., Starostina N.G. et al. The ubiquitin ligase CRL2ZYG11 targets cyclin B1 for degradation in a conserved pathway that facilitates mitotic slippage // *J. Cell Biol.* – 2016. – Vol. 215, N 2. – P. 151-166.

358. Stockum A., Snijders A.P., Maertens G.N. USP11 deubiquitinates RAE1 and plays a key role in bipolar spindle formation // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13, N 1. – P:e0190513.
359. Aboualaiwi W.A., Muntean B.S., Ratnam S. Survivin-induced abnormal ploidy contributes to cystic kidney and aneurysm formation // *Circulation*. – 2014 . – Vol. 29, N 6. – P. 660-672.
360. Duhamel S., Girondel C., Dorn J.F. et al. Deregulated ERK1/2 MAP kinase signaling promotes aneuploidy by a Fbxw7 β -Aurora A pathway // *Cell Cycle*. – 2016. – Vol. 15, N 12. – P. 1631-1642.
361. Afonso O., Figueiredo A.C., Maiato H. Late mitotic functions of Aurora kinases // *Chromosoma*. – 2017. – Vol. 126, N 1. – P. 93-103.
362. Capo-Chichi C.D., Yeasky T.M., Smith E.R., Xu X.X. Nuclear envelope structural defect underlies the main cause of aneuploidy in ovarian carcinogenesis // *BMC Cell Biol*. – 2016. – Vol. 17, N 1. – P. 37.
363. Greil C., Krohs J., Schnerch D. et al. The role of APC/C (Cdh1) in replication stress and origin of genomic instability// *Oncogene*. – 2016. – Vol. 35, N 23. – P. 3062-3070.
364. Manic G., Corradi F., Sistigu A. et al. Molecular Regulation of the Spindle Assembly Checkpoint by Kinases and Phosphatases // *Int. Rev. Cell Mol. Biol*. – 2017. – Vol. 328. – P. 105-161.
365. Chong T., Sarac A., Yao C.Q. et al. Deregulation of the spindle assembly checkpoint is associated with paclitaxel resistance in ovarian cancer // *J. Ovarian Res*. 2018. – Vol. 11, 1. – P. 27.
366. Celton-Morizur S., Desdouets C. Liver physiological polyploidization: MicroRNA-122 a key regulator // *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol*. – 2017. – Vol. 41, N 2. – P.123-125.
367. Takeuchi M., Takeuchi K., Ozawa Y., Kohara A., Mizusawa H. Aneuploidy in immortalized human mesenchymal stem cells with non-random loss of chromosome 13 in culture // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim*. – 2009. – Vol. 45, N 5-6. – P. 290-299.

368. Escandon J., King L., Blobstein R. et al. Aneuploidy and Tetraploidy as Distinct Patterns During Melanomagenesis // *Surg. Technol. Int.* – 2016. – Vol. XXIX. – P. 53-59.

369. Walen K.H. Mitosis is not the only distributor of mutated cells: non-mitotic endopolyploid cells produce reproductive genome-reduced cells// *Cell Biol. Int.* – 2010. – Vol. 34, N 8. – P. 867-872.

370. Puig P.E., Guilly M.N., Bouchot A. et al. Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy // *Cell Biol Int.* – 2008. – Vol. 32, N 9. – P. 1031–1010.

371. Zhang D., Wang Y., Zhang S. Asymmetric cell division in polyploid giant cancer cells and low eukaryotic cells // *Biomed Res. Int.* – 2014. – N 432652. – P. 1-8.

372. Zhang T., Lv L., Huang Y. et al. Chromosome nondisjunction during bipolar mitoses of binucleated intermediates promote aneuploidy formation along with multipolar mitoses rather than chromosome loss in micronuclei induced by asbestos // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, N 7. – P. 11030-11041.

373. Gogolin S., Batra R., Harder N. et al. MYCN-mediated overexpression of mitotic spindle regulatory genes and loss of p53-p21 function jointly support the survival of tetraploid neuroblastoma cells // *Cancer Lett.* – 2013. – Vol. 331, N 1. – P. 35-45.

374. Ianzini F., Kosmacek E.A., Nelson E.S., Napoli E., Erenpreisa J., Kalejs M., Mackey M.A. Activation of meiosis-specific genes is associated with depolyploidization of human tumor cells following radiation-induced mitotic catastrophe // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, N 6. – P. 2296–2304.

375. King R.W. When $2+2=5$: the origins and fates of aneuploid and tetraploid cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1786, N 1. – P. 4-14.

376. Vitale I., Galluzzi L., Senovilla L. et al. Illicit survival of cancer cells during polyploidization and depolyploidization // *Cell Death Differ.* – 2011. – Vol. 18, N 9. – P. 1403-1413.

377. Ganem N.J., Storchova Z., Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2007. – Vol. 17, 2. – P. 157-162.

378. Coward J., Harding A. Size Does Matter: Why Polyploid Tumor Cells are Critical Drug Targets in the War on Cancer // *Front. Oncol.* – 2014. – Vol. 4, N 123.

379. Mosieniak G., Sliwinska M.A., Alster O. et al. Polyploidy Formation in Doxorubicin-Treated Cancer Cells Can Favor Escape from Senescence // *Neoplasia.* – 2015. – Vol. 17, N 12. – P. 882-893.

380. Rohnalter V., Roth K., Finkernagel F. et al. A multi-stage process including transient polyploidization and EMT precedes the emergence of chemoresistant ovarian carcinoma cells with a dedifferentiated and pro-inflammatory secretory phenotype // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, 37. – P. 40005-40025.

381. Zhang S., Zhang D., Yang Z., Zhang X. Tumor Budding, Micropapillary Pattern, and Polyploidy Giant Cancer Cells in Colorectal Cancer: Current Status and Future Prospects // *Stem Cells Int.* – 2016. – Vol. 2016:4810734.

382. Selmecki A.M., Maruvka Y.E., Richmond P.A. et al. Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast // *Nature.* – 2015. – Vol. 519, N 7543. – P. 349-352.

383. Weleber R.G., Verma R.S., Kimberling W.J., et al. Duplication-deficiency of the short arm of chromosome 8 following artificial insemination//*Ann. Genet.* – 1976. – Vol. 19. – P. 241–247.

384. Gorinati M., Caufin D., Minelli A. et al. Inv dup (8) (p21.1–22.1): further case report and a new hypothesis on the origin of the chromosome abnormality // *Clin. Genet.* – 1991. – Vol. 39. – P.55–59.

385. Pettenati M.J., Rao P.N., Phelan M.C. et al. Paracentric inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases //*Am. J. Med. Genet.* – 1995. – Vol. 55. – P. 171–87.

386. Stankiewicz P., Lupski J.R. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders // *Trends. Genet.* – 2002. – Vol. 18. – P. 74–82.

387. Shaffer L.G., Lupski J.R. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans // *Annu. Rev. Genet.* – 2000. – Vol. 34. – P. 297–329.

388. Rowe L.R., Lee J.Y., Rector L., et al. South S.T. U-type exchange is the most frequent mechanism for inverted duplication with terminal deletion rearrangements // *J. Med. Genet.* – 2009. – Vol. 46, N 10. – P. 694-702.

389. Tassano E., Alpigiani M.G., Salvati P., et al. Molecular cytogenetic characterization of the first reported case of an inv dup (4p)(p15.1-pter) with a concomitant 4q35.1-qter deletion and normal parents // *Gene.* – 2012. – Vol. 511, N 2. – P. 338-340.

390. Horvath J.E., Bailey J.A., Locke D.P., Eichler E.E. Lessons from the human genome: transitions between euchromatin and heterochromatin // *Hum. Mol. Genet.* 2001. – Vol. 10, N 20. – P. 2215-23.

391. Eastmond D.A., Schuler M., Frantz C., et al. Characterization and mechanisms of chromosomal alterations induced by benzene in mice and humans // *Res. Rep. Health Eff. Inst.* – 2001. – Vol.103. – P.1-68; discussion 69-80.

392. Lafon-Hughes L., Di Tomaso M.V., Liddle P. et al. Preferential localization of γ H2AX foci in euchromatin of retina rod cells after DNA damage induction // *Chromosome Res.* – 2013. – Vol. 21, N 8. – P. 789-803.

393. DeLoughery Z., Luczak M.W., Ortega-Atienza S., Zhitkovich A. DNA double-strand breaks by Cr(VI) are targeted to euchromatin and cause ATR-dependent phosphorylation of histone H2AX and its ubiquitination // *Toxicol. Sci.* – 2015. – Vol. 143, N 1. – P. 54-63.

394. Rapini N., Lidano R., Pietrosanti S., et al. De novo 13q13.3-21.31 deletion involving RB1 gene in a patient with hemangioendothelioma of the liver // *Italian Journal of Pediatrics.* – 2014. – Vol.40. – P. 1-5.

395. Mitter D., Ullmann R., Muradyan A., et al. Genotype-phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2011. – Vol. 19. – P. 947–958.

396. Thienpont B., Vermeesch J.R., Fryns J.P. 25 Mb deletion of 13q13.3-q21.31 in a patient without retinoblastoma // *Eur. J. Med. Genet.* – 2005. – Vol. 48. – P. 363–366.

397. Bui T. H., Vetro A., Zuffardi O., and Shaffer L.G. Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosome analysis necessary in the post-array CGH era? // *Prenatal. Diagnosis.* – 2011. – Vol. 31, № 3. – P.235–243.

398. Bonaglia M.C., Giorda R., Poggi G., et al. Inverted duplications are recurrent rearrangements always associated with a distal deletion: description of a new case involving 2q // *European Journal of Human Genetics.* – 2000. – Vol. 8. – P. 597–603.

399. Kibe T., Mori Y., Okanishi T., et al. Two concurrent chromosomal aberrations involving interstitial deletion in 1q24.2q25.2 and inverted duplication and deletion in 10q26 in a patient with stroke associated with antithrombin deficiency and a patent foramen ovale // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2011. – Vol. 155A, N 1. – P. 215-220.

400. Xiao B., Ji X., Xing Y., et al. Inverted Duplication and Deletion of 10q25q26 in a Patient without Any Obvious Skeletal Anomalies // *Mol. Syndromol.* – 2012. – Vol. 3. – P.185–189.

401. Abyzov A., Mariani J., Palejev D. et al. Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells // *Nature.* – 2012. – Vol. 492, N 7429. – P. 438-442.

402. Tcw J., Carvalho C.M., Yuan B. et al. Divergent Levels of Marker Chromosomes in hiPSC-Based Model of Psychosis // *Stem Cell Reports.* – 2017. – Vol. 8 , N 3. – P. 519-528.

403. Jia C.W., Wang L., Lan Y.L. et al. Aneuploidy in Early Miscarriage and its Related Factors // *Chin Med. J. (Engl).* – 2015. – Vol. 128, N 20. – P. 2772-2776.

404. Ayed W., Messaoudi I., Belghith Z. et al. Chromosomal abnormalities in 163 Tunisian couples with recurrent miscarriages // *Pan. Afr. Med J.* – 2017. - Vol. 28. – P. 99-112.

405. Chen S., Liu D., Zhang J. et al. A copy number variation genotyping method for aneuploidy detection in spontaneous abortion specimens // *Prenat. Diagn.* – 2017. – Vol. 37, N 2. – P. 176-183.

406. Dürrbaum M., Storchová Z. Consequences of Aneuploidy in Cancer: Transcriptome and Beyond // *Recent Results Cancer Res.* – 2015. – Vol. 200. – P. 195-224.

407. Mandrioli D., Belpoggi F., Silbergeld E.K., Perry M.J. Aneuploidy: a common and early evidence-based biomarker for carcinogens and reproductive toxicants // *Environ Health.* – 2016. – Vol. 15, N 1. – P. 97.

408. Duncan A.W., Hanlon Newell A.E., Smith L. et al. Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes // *Gastroenterology.* – 2012. – Vol. 142, N 1. – P. 25-28.

409. Rosenkrantz J.L., Carbone L. Investigating somatic aneuploidy in the brain: why we need a new model // *Chromosoma.* 2017. – Vol. 126, N 3. – P. 337-350.

410. Andriani G.A., Vijg J., Montagna C. Mechanisms and consequences of aneuploidy and chromosome instability in the aging brain // *Mech. Ageing Dev.* – 2016. – Vol. 6374, N 16. – P. 30028-30038.

411. Tesarova L., Simara P., Stejskal S., Koutna I. The Aberrant DNA Methylation Profile of Human Induced Pluripotent Stem Cells Is Connected to the Reprogramming Process and Is Normalized During In Vitro Culture // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, N 6. - e0157974.

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
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.

2. **Кушнірук В.О.**, Шаблій В.А., Шпильова С.П., Рубан Т.П., Півень О.О., Лобинцева Г.С., Лукаш Л.Л. Стівбуровий потенціал нової лінії клітин людини 4BL // Вісник генетиків і селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 27-35.

3. **Кушнірук В.О.**, Акопян Г.Р., Микитенко Д.О., Гулеюк Н.Л., Зукін В.Д., Лукаш Л.Л. Динаміка ультраструктурних аберацій каріотипу стівбурових клітин людини лінії 4BL, виявлених за допомогою агау CGH // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т.16. – С. 216 – 221.

4. Акопян Г.Р., Гулеюк Н.Л., **Кушнірук В.О.**, Микитенко Д.О., 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.

5. Macewicz L.L., **Kushniruk V.O.**, Iatsyshyna A.P., Kotsarenko K.V., Lylo V.V., Akopyan G.R., Huleuk N.L., Mykytenko D.O., Lukash L.L. Correlation the level of mutagenesis with expression of reparative enzyme O6-methyluanin-DNA methyltransferase (MGMT) during establishment of cell line in vitro // Biopolymers and cell. – 2013. – Vol. 29, N 6. – P. 485 – 492.

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.

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.

8. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., **Кушнирук В.О.**, Підпала О.В. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К: Логос. – 2011. – С.493-498.

9. **Кушнирук 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.

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.

11. **Кушнирук 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 HEP-2 // Актуальні питання розвитку біології та екології: мат. міжн. науково-практичної конференції. – Вінниця, 2016. – С. 250-253.

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.

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.

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.

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.

16. Akopyan H., Huleyuk N., **Kushniruk V.**, Mykytenko D., Iatsyshyna A., Kovaliv I., Zukin V., Lukash L. 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.

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.

ДОДАТОК Б

СКЛАД ІНДУКЦІЙНИХ СЕРЕДОВИЩ

Таблиця Б.1

Адипогенне диференціювання		
речовина	фінальна концентрація	кількість мкл/мл
IBMX	0,5 мМ	44
insulin	10 мкг/мл	20
indometacin	0,2 мМ	4
dexametasone	1мкМ	19,6
ETC	10%→5%*	100→50*
glutamine	2 мМ	10
HEPES	5 мМ	5
Остеогенне диференціювання		
речовина	фінальна концентрація	кількість мкл/мл
dexamethasone	0,1 мкМ	1,9
ascorbate	0,1 мМ	5
beta-glicerophosphate	10 мМ	5
ETC	10%→5%*	100→50*
glutamine	2 мМ	10
HEPES	5 мМ	5
Міогенне диференціювання		
речовина	фінальна концентрація	кількість мкл/мл
активін А	20 нг/мл	20
bFGF	10 нг/мл	10
ETC	10%→5%*	100→50*
glutamine	2 мМ	10
HEPES	5 мМ	5

Примітка. * - модифікація методу. Компоненти для середовищ люб'язно надані Шаблієм В.А., Інститут клітинної терапії.

ДОДАТОК В

Таблиця В.1

Кількість хромосом у клітинах лінії 4ВL з білядиплоїдним та білягаплоїдним каріотипом на 160-му та 205-му пасажах

Кількість хромосом	160-й пасаж		205-й пасаж		Кількість хромосом	160-й пасаж		205-й пасаж	
	Абс. од.	%	Абс. од.	%		Абс. од.	%	Абс. од.	%
49	—	—	1	0,8±0,8	31	—	—	1	0,8±0,8
48	—	—	1	0,8±0,8	30	1	0,6±0,6	1	0,8±0,8
47	—	—	—	-	29	5	3,1±1,4	—	—
46	—	—	3	2,4±1,4	28	1	0,6±0,6	—	—
45	1	0,6±0,6	1	0,8±0,8	27	1	0,6±0,6	—	—
44	13	8,0±2,1	8	6,4±2,2	26	1	0,6±0,6	—	—
43	18	11,1±2,5	25	20,0±3,6	25	9	5,6±1,8	—	—
42	23	14,2±2,8	33	26,4±4,0	24	3	1,9±1,0	—	—
41	14	8,6±2,2	18	14,4±3,2	23	6	3,7±1,5	—	—
40	12	7,4±2,1	11	8,8±2,5	22	—	—	—	—
39	9	5,6±1,8	6	4,8±1,9	21	1	0,6±0,6	—	—
38	7	4,3±1,6	3	2,4±1,4	20	4	2,5±1,2	—	—
37	10	6,2±1,9	3	2,4±1,4	19	—	—	—	—
36	0	0	4	3,2±1,6	18	1	0,6±0,6	—	—
35	3	1,9±1,1	1	0,8±0,8	17	2	1,2±0,9	—	—
34	4	2,5±1,2	3	2,4±1,4	16	—	—	—	—
33	7	4,3±1,6	2	1,6±1,1	15	5	3,1±1,4	—	—
32	—	—	—	—	14	1	0,6±0,6	—	—

Примітка. – не спостерігали.

ДОДАТОК Д

Таблиця Д.1

**Розподіл хромосомних аберацій у біядиплоїдних клітинах лінії 4ВL
на 205-му пасажі культивування**

Кількість хромосом	Кількість диплоїдних клітин		Кількість клітин (%) з хромосомною аберацією				
	Всього	Аналіз	t(1;11)	del(2)	t(5;15)	t(12;15)	t(16;21)
49	1	1	1±1	—	—	—	—
48	1	1	1±1	—	—	1±1	—
46	3	3	1±1	2±1,4	1±1	1±1	—
45	1	1	—	1±1	—	—	—
44	8	6	4±2,0	6±2,4	1±1	1±1	—
43	25	23	19±4,0	11±3,1	8±2,7	2±1,4	1±1
42	33	24	12±3,3	7±2,6	4±2,0	3±1,7	3±1,7
41	18	14	7±2,6	5±2,2	3±1,7	1±1	—
40	11	9	5±2,2	2±1,4	1±1	1±1	—
39	6	4	3 ±1,7	3 ±1,7	1±1	—	1±1
38	3	2	1±1	1±1	—	—	—
37	3	3	2±1,4	1±1	2±1,4	—	—
36	4	3	3 ±1,7	3 ±1,7	1±1	—	—
35	1	1	1±1	1±1	—	—	—
34	3	2	1±1	1±1	—	—	—
33	2	1	—	—	—	—	—
31	1	1	1±1	1±1	1±1	—	—
30	1	1	1±1	1±1	—	—	—
	125	100	63±4,9	46±5,0	23±4,2	10±3,0	5±2,2

Примітки. Розширений запис досліджених хромосомних перебудов: 1 – t(1;11)(q12;p15), 2 – del(2)(p11~12), 3 – t(5;15)(q10;p10), 4 – t(12;15)(p10;q10), 5 – t(16;21)(q13;p11). — не спостерігали.