

Г.Р. АКОПЯН¹, Н.Л. ГУЛЕЮК¹, В.О. КУШНІРУК²,
Д.О. МИКИТЕНКО³, А.П. ЯЦИШИНА², Л.Л. ЛУКАШ²

¹ ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України», Львів
E-mail: akopyan.h@ihr.lviv.ua

² Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

³ Клініка репродуктивної медицини «Надія», Київ

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ КАРІОТИПУ НОВОЇ ЛІНІЇ КЛІТИН ЛЮДИНИ 4VL В УМОВАХ ТРИВАЛОГО КУЛЬТИВУВАННЯ. ПЛОЇДНІСТЬ ХРОМОСОМНОГО НАБОРУ

*Тривале культивування клітин людини, в тому числі стовбурових, може призвести до істотної трансформації каріотипу та генетичної нестабільності. Метою даної роботи було порівняльне цитогенетичне дослідження каріотипу нової лінії стовбурових клітин людини 4VL на 160-му і 205-му пасажах. При стандартному цитогенетичному дослідженні спостерігали нулісомію або моносомію хромосом 10 і 13, моносомію хромосом 4, 8, 11, 15, 17, 21, X; t(1;11), t(5;15), t(12;15), t(16;21), шість регулярних маркерних хромосом. Модальний клас каріотипу на 160-му і 205-му пасажах становив 42–43 хромосоми. В динаміці пасажування виявили зростання частоти поліплоїдних клітин (з 2,8 до 36 %), зникнення білягаплоїдних клітин (22,1 % на 160-му пасажі) та зменшення рівня передчасного розділення хроматид (з 5 до 1,5 %). Припускаємо стабілізацію каріотипу клітинної лінії 4VL на 205-му пасажі і вважаємо, що для об'єктивної ідентифікації числа хромосом модального класу, хромосомних аномалій і прогнозування напрямку каріотипічної еволюції клітин людини 4VL *in vitro* слід провести додаткові молекулярно-цитогенетичні дослідження.*

Ключові слова: стовбурові клітини, генетична нестабільність, хромосомні аберації, анеуплоїдія, поліплоїдія.

Вступ. Стовбурові клітини (СК) різного походження широко досліджуються на предмет можливості використання в регенеративній медицині [1–4]. Для клінічних випробувань необхідна значна кількість клітинного матеріалу, який отримують шляхом тривалого культивування, проте воно може призвести до виникнення стабільних змін в клітинах, зокрема до істотної трансформації каріотипу та геному в цілому [1–7]. Встановлено, що чим довше культивують стовбурові клітини, тим більше

помилко́к вони накопичують у своєму геномі, включаючи мутації, пов'язані з раком [8]. Наприклад, понад 70 % ембріональних стовбурових клітин миші ставали анеуплоїдними до 25-го пасажу (еквівалент 2 місяці культивування) [9]. При тривалому культивуванні мезенхімальні стовбурові клітини миші, ізольовані як із кісткового мозку, так і з жирової тканини, також зазнавали спонтанної трансформації *in vitro* та проявляли хромосомну нестабільність [10]. Зміни каріотипу виникали при тривалому культивуванні клітин ссавців усіх досліджених типів, у тому числі і стовбурових [11]. Одержані результати свідчать на користь уявлення про те, що адаптація клітин до нових умов існування призводить до перепрограмування клітинного генома, тобто до різкої зміни програм генної експресії, і, як наслідок, до підвищення рівня мутацій і генетичної варіабельності популяцій [12].

Генетичні та епігенетичні зміни геному культивованих *in vitro* клітин призводять до втрати тих властивостей, заради яких клітини підтримувалися у культурі. Потреба накопичення СК у достатній кількості обґрунтовує необхідність проведення спеціальних досліджень, що дадуть можливість підібрати ефективну схему культивування, створити клітинний банк стандартизованих ліній та розробити інформативну систему контролю якості клітин для ефективного і безпечного застосування в клініці. На сьогодні спостерігається брак досліджень стану хромосомного апарату СК в умовах тривалого культивування в залежності від кількості пасажів [6, 7]. Тому метою даної роботи було порівняльне вивчення плоїдності хромосомного набору в клітинах одержаної нами лінії 4VL при тривалому пасажуванні в умовах *in vitro*.

© Г.Р. АКОПЯН, Н.Л. ГУЛЕЮК, В.О. КУШНІРУК,
Д.О. МИКИТЕНКО, А.П. ЯЦИШИНА, Л.Л. ЛУКАШ,
2013

Матеріали і методи. Вихідну клітинну лінію 4BL отримали з периферійної крові здорового донора у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та культивували як стандартну моношарову культуру у середовищі ДМЕМ («Sigma», США) з доданням 10 % ембріональної сироватки теляти («Sigma», США) та антибіотиків пеніциліна (100 ОД/мл) і стрептоміцину (100 мкг/мл). Клітинна лінія успішно пройшла ліміт Хейфліка без будь-яких ознак кризи та старіння культури [13]. Морфологічні ознаки, наявність певних маркерів на поверхневій мембрані клітин і здатність до диференціювання свідчили про те, що їх можна віднести до мезенхімальних стовбурових клітин. Однак незважаючи на моношаровий спосіб культивування, у популяції завжди спостерігали незначну кількість клітин, що росли у суспензії. Культуральні тести з використанням напіврідкої метилцелюлози та агару підтвердили здатність клітин рости без прикріплення до субстрату і навіть формувати колонії та ембріодні тільця, що є характерною ознакою відповідно мультипотентних гемопоетичних СК і плюрипотентних СК [14]. Протягом усього часу спостереження (219 пасажів) більшість клітин 4BL зберігали фібробластоподібну морфологію, чутливість до дії колхіцину та проліферативний потенціал. Нині проводяться більш детальні дослідження з метою характеристики клітин лінії 4BL та її субклонів. В даній роботі досліджувався один із субклонів, позначений нами при подальшому викладенні матеріалу як клітинна лінія 4BL.

Цитогенетичні дослідження клітин лінії 4BL проводили на 160-му та 205-му пасажах культивування *in vitro*. Фіксацію хромосом здійснювали через 24 год після висіву клітин. Після інкубації клітин протягом 2 год у середовищі із колхіцином («Merck», Німеччина) у концентрації 0,5 мкг/мл отримували суспензію клітин, яку обробляли 0,06 М розчином КСІ протягом 50 хв та фіксували хромосоми приготуванням *ex tempore* метанол-оцтовим (3:1) фіксатором [15]. Після трьох змін фіксатора суспензію ядер і хромосом розкрапували на вологі предметні скельця як без випалювання, так і з випалюванням фіксатора для отримання кращого розкиду хромосом.

Препарати метафазних хромосом аналізували із використанням рівномірного забарвлення 4%ним барвником Гімза, диференційного GTG-забарвлення [16] у власній модифікації та диференційного QFH/AsD-забарвлення. Хромосоми вивчали при збільшенні у 1000 разів за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX41, обладнаного системою автоматизованого аналізу «CytoVision 4.01». Аналізували по 200 метафазних пластинок (м.п.) кожного пасажу. Ступінь плоідності клітин та структуру хромосом аналізували на рівні визначення 400–550 бендів на гаплоїдний набір. Для визначення структурних перебудов застосовували міжнародну цитогенетичну номенклатуру ISCN-2009 [17]. Оцінку рівня анеуплоїдії проводили із застосуванням порівняльної геномної гібридизації (arrCGH) з використанням CytoSure Aneuploidy array 15k (Oxford Gene Technology, Product code 020024, Клініка репродуктивної медицини «Надія», Київ). Для цього виділяли ДНК клітин 205-го пасажу за допомогою QIAamp DNA Blood Mini Kit («Qiagen», ОК) та очищали за допомогою QIAquick PCR Purification Kit («Qiagen», ОК). Отриману ДНК (1 мкг) проаналізували відповідно до рекомендацій Oxford Gene Technology на приладі Innopsys Innoscan 710, обладнаному програмним забезпеченням OGT CytoSure Interpret Software 3.3.2.

Результати досліджень та їх обговорення. *Структура популяцій клітин лінії 4BL за плоідністю.* 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) становила $67,4 \pm 3,5$ % (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.). Загальний рівень спонтанної хромосомної нестабільності склав $6,0 \pm 1,8$ % (11 м.п.), і поряд із явищем повної фрагментації (2,8 %) включав $3,3 \pm 1,3$ % клітин з хромосомними абераціями хроматидного (однохроматидні розриви) та/або хромосомного типу (парні фрагменти, дицентричні хромосоми) у співвідношенні 1 : 2,5 (табл. 1).

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.), з ПРХ – $1,5 \pm 0,9 \%$ (3 м.п.). Ознаки фрагментації/пульверизації хромосом знайдено в $1 \pm 0,7 \%$ клітин, які мали ознаки ПРХ, хромосомні аберації (хроматидного типу) – у $2 \pm 1 \%$ (4 м.п.), а отже загальний рівень спонтанної хромосомної нестабільності склав $3 \pm 1,2 \%$ (6 м.п.). Якщо на 160-му пасажі співвідношення між біядиплоїдними і поліплоїдними клітинами становило 24 : 1, то на 205-му пасажі – 1,7 : 1. Під час культивування з 160-го по 205-й пасажі відбулися істотні зміни плоідності клітин дослідженої лінії у напрямку збільшення частки поліплоїдних клітин (2,8 і 36 %, відповідно $\chi^2 = 33,2$, $P < 0,001$) при несуттєвій зміні відсотка біядиплоїдних клітин (67,4 та 62,5 % відповідно, $\chi^2 = 4,9$, $P = 0,05$).

Значною особливістю клітинної популяції лінії 4BL на 205-му пасажі є відсутність біягаплоїдних клітин (14–29 хромосом), які на 160-му пасажі склали $22,1 \pm 3,1 \%$ м.п. ($P = 0,001$). Зазначено також 4 гіпердиплоїдні метафазні пластинки із 46–49 хромосомами, які були відсутні на 160-му пасажі, проте їхній внесок виходить за межі 95%-ної ймовірності безпомилкових прогнозів. У порівнянні із 160-м пасажем на 205-му удвічі зменшився загальний рівень спонтанної хромосомної не-

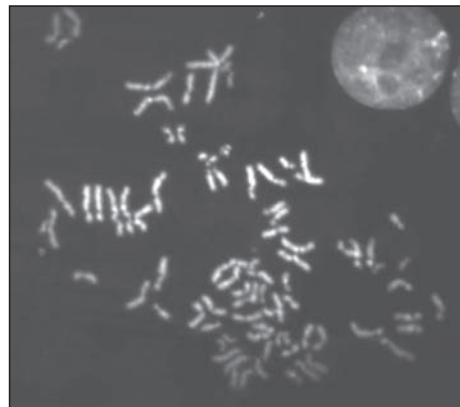


Рис. 1. Передчасне розділення сестринських хроматид у клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі культивування. Забарвлення QFH/ACD. 36. $\times 1000$

стабільності (6 і 3 % відповідно), у тому числі відсоток клітин з фрагментацією хромосом (2,8 і 1 % відповідно) і хромосомними абераціями (3,3 і 2 % відповідно). Отже, при культивуванні від 160-го до 205-го пасажу відбулася суттєва зміна каріотипу клітин лінії 4BL із достовірним збільшенням частки поліплоїдних клітин, зникненням біягаплоїдних клітин та зниженням рівня хромосомної нестабільності. На користь останнього також свідчить редукція частоти клітин із ПРХ (рис. 1) – з 5 до 1,5 % метафазних пластинок. Відомо, що ПРХ пов'язане з індукцією апоптозу в клітинах з нестабільним геномом [18, 19].

Таблиця 1. Структура популяції клітин лінії 4BL на 160-му та 205-му пасажах за плоідністю

Показник	160-й пасаж		205-й пасаж	
	м.п.	%	м.п.	%
Вибірка	181		200	
ПРХ	9	$5 \pm 1,6$	3	$1,5 \pm 0,9$
Біля $2n$ (30–45)	122	$67,4 \pm 3,5$	125	$62,5 \pm 3,4$
Біля n (14–29)	40	$22,1 \pm 3,1$	–	–
Поліплоїдні	5	$2,8 \pm 1,2$	72	$36 \pm 3,4$
3 n	–	–	9	$4,5 \pm 1,5$
4 n	4	$2,2 \pm 1,1$	62	$31,0 \pm 3,3$
5 n	1	$0,6 \pm 0,6$	–	–
6 n	–	–	1	$0,5 \pm 0,5$
Фрагментація	5	$2,8 \pm 1,2$	2	$1 \pm 0,7$
Клітин з абераціями	6	$3,3 \pm 1,3$	4	$2 \pm 1,0$
Аберації хроматидного типу	2	$1,1 \pm 0,8$	–	–
Аберації хромосомного типу	5	$2,8 \pm 1,2$	–	–

Примітка. «–» – не спостерігали.

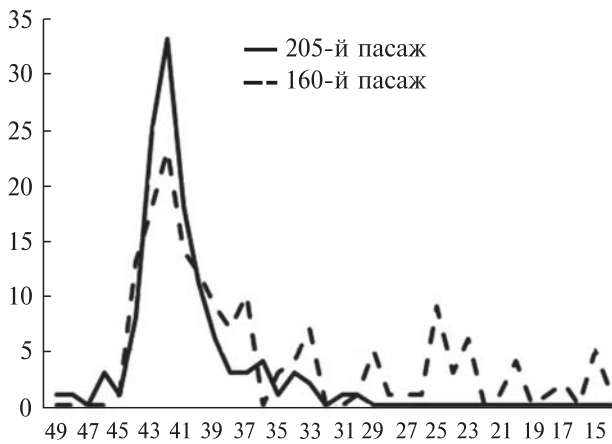


Рис. 2. Розподіл біядиплоїдних клітин лінії 4BL за кількістю хромосом на 160-му і 205-му пасажах культивування: по горизонталі – варіанти кількості хромосом в каріотипі, по вертикалі – кількість зареєстрованих випадків

Таким чином, нами виявлені статистично вірогідні відмінності у плоїдності клітин лінії 4BL при тривалому культивуванні від 160-го до 205-го пасажу, які можуть свідчити про стабілізацію каріотипу клітин цієї лінії.

Кількість хромосом у біядиплоїдних клітинах лінії 4BL культивування. На рис. 2 наведено розподіл клітин за кількістю хромосом у групі біядиплоїдних клітин лінії 4BL на 160-му і 205-му пасажах культивування. Загальна кількість хромосом у наборі коливалася в межах 14–45 і 30–49 відповідно, а відтак однією з найсуттєвіших відмінностей між пасажами виявилась наявність в популяції 160-го пасажу репрезентативного пулу клітин ($22,1 \pm 3,1$ %) з редукованою до біагаплоїдної (14–29) кількістю хромосом, які на 205-му пасажі взагалі не виявлялися (рис. 1, табл. 2). При цьому як на 160-му, так і на 205-му пасажах переважна більшість клітин (54,9 і 80,8 % відповідно) мали 39–44 хромосоми, а серед них найбільш поширеними виявились клітини із 41–43 хромосомами (33,9 і 60,8 % всіх біядиплоїдних метафазних пластинок відповідно). Частка клітин із вмістом 41, 42 або 43 хромосом склала 8,6; 14,2; 11,1 % відповідно на 160-му пасажі та 14,4; 26,4; 20,0 % відповідно на 205-му пасажі. Отже, найбільшу частку біа диплоїдних метафазних пластинок на обох пасажах культивування становили клітини із 42–43 хромосомами.

Таблиця 2. Кількість хромосом у клітинах лінії 4BL з біядиплоїдним 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	$0,8 \pm 0,8$	31	—	—	1	$0,8 \pm 0,8$
48	—	—	1	$0,8 \pm 0,8$	30	1	$0,6 \pm 0,6$	1	$0,8 \pm 0,8$
47	—	—	—	—	29	5	$3,1 \pm 1,4$	—	—
46	—	—	3	$2,4 \pm 1,4$	28	1	$0,6 \pm 0,6$	—	—
45	1	$0,6 \pm 0,6$	1	$0,8 \pm 0,8$	27	1	$0,6 \pm 0,6$	—	—
44	13	$8,0 \pm 2,1$	8	$6,4 \pm 2,2$	26	1	$0,6 \pm 0,6$	—	—
43	18	$11,1 \pm 2,5$	25	$20,0 \pm 3,6$	25	9	$5,6 \pm 1,8$	—	—
42	23	$14,2 \pm 2,8$	33	$26,4 \pm 4,0$	24	3	$1,9 \pm 1,0$	—	—
41	14	$8,6 \pm 2,2$	18	$14,4 \pm 3,2$	23	6	$3,7 \pm 1,5$	—	—
40	12	$7,4 \pm 2,1$	11	$8,8 \pm 2,5$	22	—	—	—	—
39	9	$5,6 \pm 1,8$	6	$4,8 \pm 1,9$	21	1	$0,6 \pm 0,6$	—	—
38	7	$4,3 \pm 1,6$	3	$2,4 \pm 1,4$	20	4	$2,5 \pm 1,2$	—	—
37	10	$6,2 \pm 1,9$	3	$2,4 \pm 1,4$	19	—	—	—	—
36	0	0	4	$3,2 \pm 1,6$	18	1	$0,6 \pm 0,6$	—	—
35	3	$1,9 \pm 1,1$	1	$0,8 \pm 0,8$	17	2	$1,2 \pm 0,9$	—	—
34	4	$2,5 \pm 1,2$	3	$2,4 \pm 1,4$	16	—	—	—	—
33	7	$4,3 \pm 1,6$	2	$1,6 \pm 1,1$	15	5	$3,1 \pm 1,4$	—	—
32	—	—	—	—	14	1	$0,6 \pm 0,6$	—	—

Примітка. «—» – не спостерігали.

В межах 5–8 % коливалась частка клітин із вмістом 39, 40 і 44 хромосом, 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. 1). Лише на 160-му пасажі зазначено вірогідну появу клітин із 37 та 25 хромосомами (6,2 і 5,6 % при 2,4 і 0 % відповідно на 205-му пасажі, $P = 0,05$), тоді як частка клітин із 30–38 та 45–49 хромосомами опинились за межами 95%-ної ймовірності безпомилкових прогнозів (0,6–4,4 % м.п.) (табл. 2). 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 42–43 хромосомами 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 становила 25,3 і 46,4 %, то частка анеуплоїдних клітин – 74,7 і 53,6 % відповідно. В структурі анеуплоїдії зазначено гіпер- і гіподиплоїдію. На 205-му пасажі культивування виявили 1,6 % гіпердиплоїдних клітин з кількістю хромосом 47–49 та відсутність клітин з таким каріотипом на 160-му пасажі. Редукція числа гіподиплоїдних клітин на 205-му пасажі відбулася завдяки зникненню біягаплоїдних клітин із вмістом 14–29 хромосом.

Відомо, що випалювання фіксатора з метою кращого розкиду хромосом підвищує ймовірність їхньої втрати, що могло б сприяти збільшенню частки анеуплоїдних метафазних пластинок. Проте, як показали порівняльні дослідження препаратів хромосом, виготовлених із клітин 160-го пасажу з випалюванням фіксатора та без нього, частка клітин із 14–29 хромосомами залишалася репрезентативною (24,7 та 30,1 % відповідно). Отже, технічні умови приготування препаратів хромосом не можуть бути причиною повної відсутності клітин із вмістом хромосом 14–29 на препаратах 205-го пасажу, а їх зникнення вірогідно відображає

зміни каріотипу клітин лінії 4BL упродовж культивування від 160-го пасажу.

Таким чином, каріотип із вмістом 42–43 хромосом – це найбільш вірогідний модальний клас біядиплоїдного 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 біягаплоїдних клітин.

Хромосомні аберації в біядиплоїдних клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі. Для з'ясування кількісних і структурних змін хромосом клітин даної лінії провели детальний каріотипічний аналіз із використанням диференційного GTG-забарвлення. Щоб нівелювати ефект гіподиплоїдної анеуплоїдії, обмежились аналізом метафазних пластинок із кількістю 41–44 хромосоми, які склали 67 % всіх біядиплоїдних клітин. На рис. 3 наведено каріограму, типову для хромосомних наборів біядиплоїдних клітин лінії 4BL.

Спільними рисами каріотипу для всіх проаналізованих випадків виявились моносомія за хромосомою X, відсутність одного або двох гомологів пар хромосом 10 і 13, а також наявність єдиного гомолога з пари хромосом 4, 8, 11, 15, 17 та 21. Важливо зазначити, що «відсутній» гомолог пар хромосом 11, 15 і 21 переважно брав 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. 3 та 4). Моносомія 4-ї пари поєднувалась із ймовірною $del(4)(q24qter)$. Транслокація $t(5;15)(q10;p10)$ супроводжувалася наявністю деривата з можливим вмістом матеріалу її коротких плеч – $der(5p)$, при цьому транслокації $t(5;15)(q10;p10)$ і $t(12;15)(p10;q10)$ ніколи не виявлялися одночасно в одній клітині. Відсутність пари хромосоми 10 можна пояснити її делецією – $del(10)(q26.11qter)$ і/або утворенням складної транслокації – $der(10)(t(10;16;?)(q22;q24q10;?))$ (рис. 3 та 4).

Незважаючи на наявність обох гомологів 19-ї пари, часто реєстрували маркерну хромосому, ймовірно $der(19)$ (рис. 4). Знаходили також по-

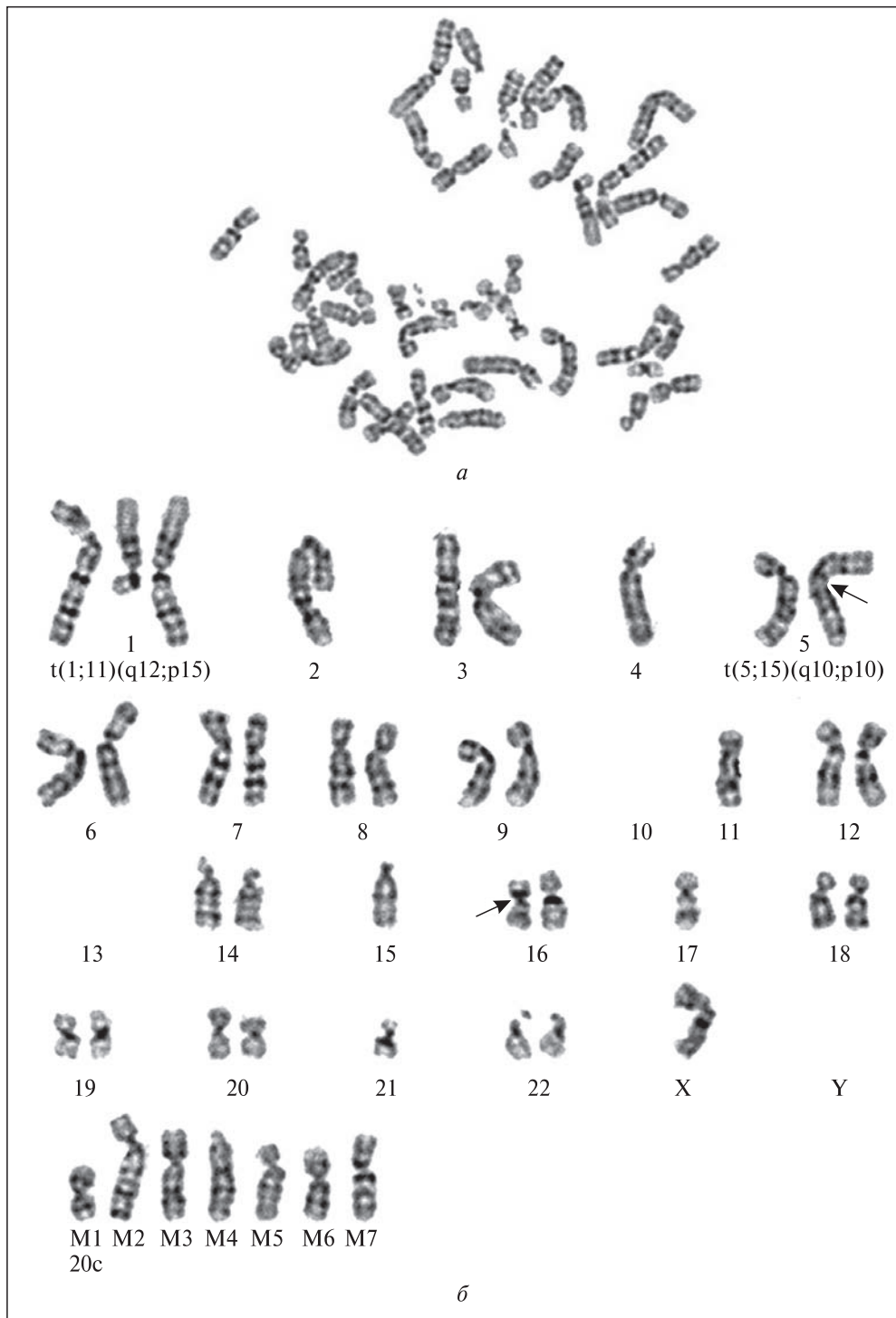


Рис. 3. GTG-аналіз клітин лінії 4BL, 205-й пасаж: *а* – метафазна пластинка; *б* – кариограма. Моносомія хромосом 2, 4, 11, 15, 17, 21, X; нулісомія 10 і 13; $t(1;11)(q12;p15)$; $t(5;15)(q10;p10)$; $t(16;21)(q13;p11)$; сім маркерних хромосом (M1–M7): M1 – $del(5p)?$, M2 – $der(10)t(10;16;?)(q22;q24;q10;?)?$, M4 – $del(2)(p11-12)?$, M6 – $del(10)(q26.11qter)?$, M3, M5, M7 – не ідентифіковані. Стрілками позначено ділянки окремих перебудов

одинокі випадки $t(3;11)(p25;q25)$, $der(8)$ 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 застосовувати техніку FISH та порівняльну геномну гібридизацію (arrCGH-аналіз).

У табл. 3 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 – $t(1;11)(q12;p15)$ – спостерігали у $63 \pm 4,9\%$ метафазних пластинок. Делецію першої хромосоми – $del(1)(q21.1q44)$, яка утворилася внаслідок цієї перебудови, виявили в такій же кількості клітин, що підтверджує збалансованість набору першої пари хромосом. Біль-

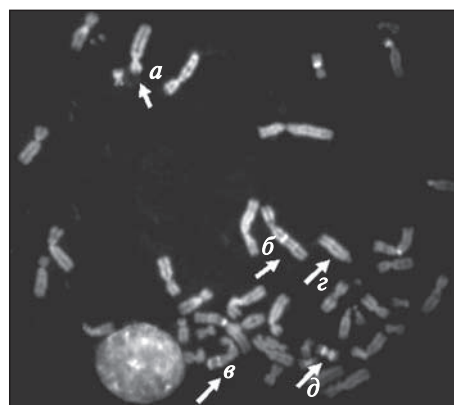


Рис. 4. Типові хромосомні перебудови в клітинах лінії 4BL, 205-й пасаж. Забарвлення QFH/AcD. Стрілками позначені: а – $del(1)(q21.1q44)$, б – $t(1;11)(q12;p15)$, в – $der(10)(t(10;16;?)(q22;q24q10;?))?$, г – $del(2)(p11\sim12)$, д – $der(19)$

шість клітин із $t(1;11)(q12;p15)$ 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.

Таблиця 3. Розподіл хромосомних аберацій у біядиплоїдних клітинах лінії 4BL із різною кількістю хромосом на 205-му пасажі культивування

Кількість хромосом	Диплоїдні клітини		Клітини 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: $t(1;11)(q12;p15)$, $del(2)(p11\sim12)$, $t(5;15)(q10;p10)$, $t(12;15)(p10;q10)$, $t(16;21)(q13;p11)$. «–» – не спостерігали.

Делецію хромосоми 2 – del(2)(p11~12) – виявили у 46 ± 5 % біядиплоїдних і в більшості тетраплоїдних клітин (в двох копіях) (табл. 2). Більшість клітин з del(2)(p11~12) містили 39–44 хромосоми (34 з 46, або 73,9 %), більшість з них – 43 чи 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 $23 \pm 4,2$ % біядиплоїдних клітин (табл. 2). Як і у згаданих випадках, такі клітини переважно містили 39–44 хромосоми (18 з 23, або 78,3 %), більшість з них – 43 чи 42 хромосоми (12 з 18, або 66,7 %) у співвідношенні 2 : 1. Частка t(12;15)(p10;q10) у біядиплоїдних клітинах становила 10 ± 3 %, причому половину всіх випадків зареєстровано в метафазних пластинках з набором 43 або 42 хромосоми у співвідношенні 1 : 1,5 (табл. 3). Слід зазначити, що t(5;15)(q10;p10) і t(12;15)(p10;q10) жодного разу не знайдено в одній клітині одночасно. У $5 \pm 2,2$ % метафазних пластинок встановлено 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).

Дослідили також характер асоціацій хромосомних аберацій у біядиплоїдних клітинах 4BL на 205-му пасажі. У 1 % м.п. не виявили жодної хромосомної аберації. У 14 % клітин зареєстровано вибіркovo 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) спостерігали у 46 % біядиплоїдних клітин, випадки її асоціації з t(1;11)(q12;p15) становили 85,5 % (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 вибіркovo асоціація з del(2)(p11~12), тоді як в решті клітин одночасно зазначали 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 % метафазних пластинок, 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 зареєстровані 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.

Використання порівняльної геномної гібридації для вивчення плоїдності клітин 4BL на 205-му пасажі. При аналізі GTG-зabarвлених метафазних пластинок 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 застосували автоматич-

ний аналіз – мікроеррей-порівняльну геномну гібридизацію, або агCGH (рис. 5).

Результати, отримані за допомогою цього методу, дозволяють візуалізувати лише незбалансовані хромосомні аберації і відображають інтегральні результати аналізу клітинної популяції [20]. Використання агCGH в даному дослідженні дозволило виявити численні хромосомні аберації і втрату гетерозиготності за багатьма локусами (рис. 4, а), а також наявність гетерогенних клітинних клонів із переважною втратою матеріалу хромосом 4, 10, 13, 17 та X (рис. 4, б), що узгоджується з даними класичного цитогенетичного аналізу.

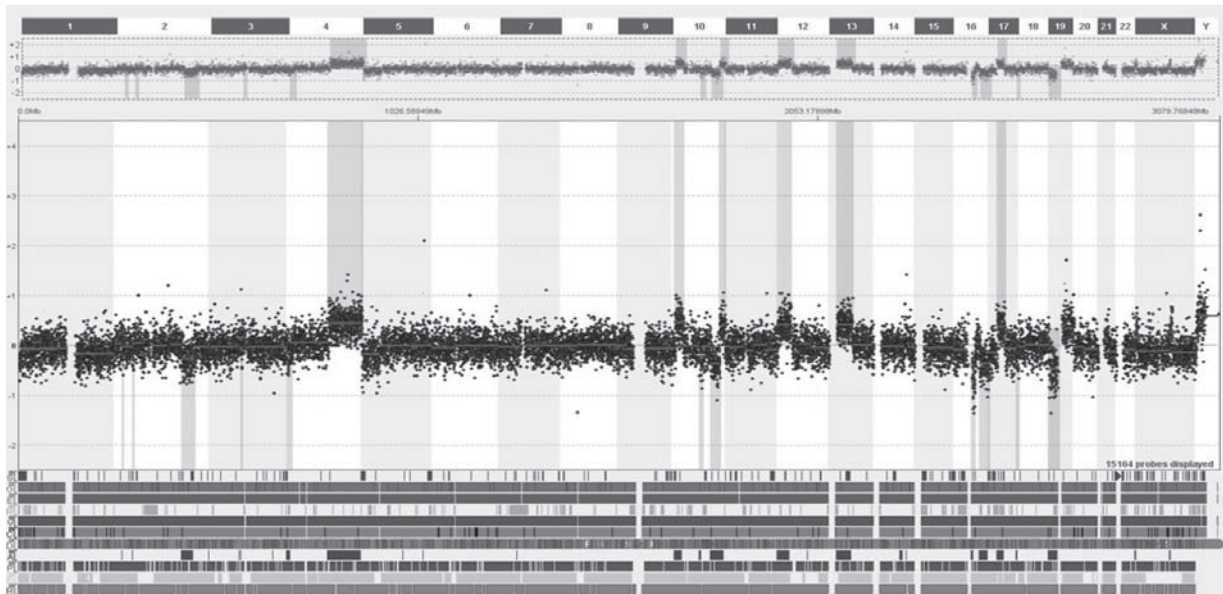
При використанні класичного цитогенетичного аналізу практично в усіх проаналізованих клітинах спостерігали X-моносомію. За даними порівняльної геномної гібридизації, вона має місце у понад 80 % досліджених клітин (mos 45,X [$> 80\%$] / 46,XX [$< 20\%$]). Анеуплоїдія інших хромосом (4, 10, 13, 17), що виявлена нами при каріотипуванні (рис. 3), підтверджена методом агCGH на рівні ідентифікації часткових моно- і трисомій (рис. 5, а). Добре відомо, що роздільна здатність агCGH істотно залежить від розміру пулу клітин з досліджуваною хромосомною аномалією, і це ускладнює проведення діагностики у випадках мозаїчного клону розміром менше 50 % клітин. Як було встановлено, вірогідний модальний клон клітинної лінії 4BL на 205-му пасажі налічує 42 або 43 хромосоми, а їх сумарний відсоток становить 46,4 % клітин. Це дозволяє припустити, що підставою відмінностей в результатах аналізу анеуплоїдії хромосом 4, 10, 13 і 17 за даними стандартного каріотипування і агCGH є виразна клональна гетерогенність клітинної лінії 4BL на 205-му пасажі. Варто зазначити, що структурні хромосомні перебудови, особливо деривати «відсутніх» хромосом, ступінь збалансованості виявлених транслокацій, ймовірна втрата гетерозиготності гомологічних хромосом потребують більш детального аналізу.

Оскільки положення на діаграмі кожної окремої хромосоми (рис. 5, б) визначається балансом ДНК, зсув сегмента може означати як втрату або набуття генетичного матеріалу (часткова або повна моносомія чи трисомія), так і результативний баланс ДНК хромосоми, яка зазнала декількох складних перебудов [20].

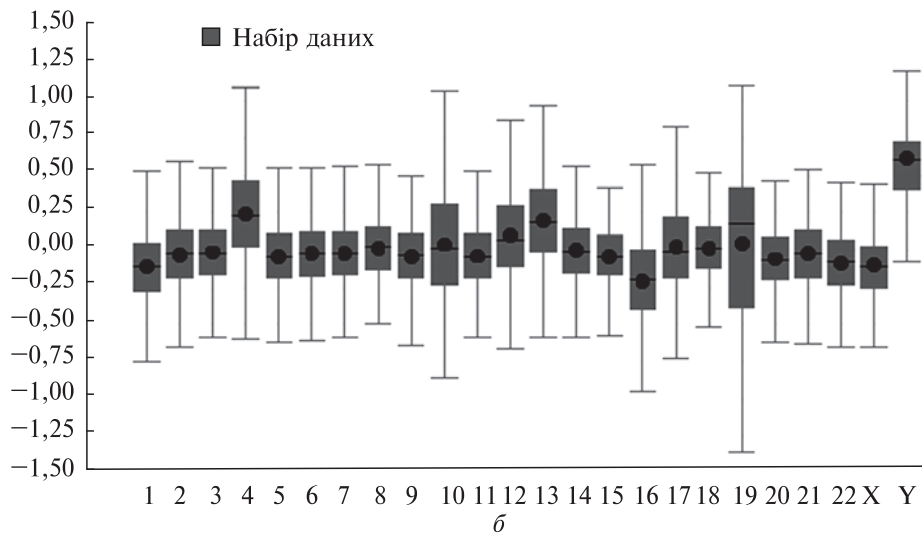
У такому випадку кінцевий результат визначається балансом ДНК найбільш зміненого сегмента хромосоми. Використання із цією метою класичного GTG-аналізу на рівні 400–500 бендів є недостатнім, тому варто застосовувати техніку FISH та агCGH.

Каріотип поліплоїдних клітин лінії 4BL. Оскільки у клітинах лінії 4BL спостерігали значне зростання рівня поліплоїдії з 2,8 % метафазних пластинок на 160-му пасажі до 36 % метафазних пластинок на 205-му пасажі, постало питання, чи змінилася структура розподілу поліплоїдних клітин із різним каріотипом у популяціях досліджених пасажів. Серед виявлених поліплоїдних клітин домінували біятетраплоїди: 80 і 86,1 % на 160-му та 205-му пасажі відповідно (рис. 6, а). В структурі тетраплоїдії на 205-му пасажі виявили 82,3 % (51 з 62) метафазних пластинок з набором 80–85 хромосом, 14,5 % (9) гіпотетраплоїдів з редукцією числа хромосом до 72–78 та 3,2 % (2) гіпертетраплоїдів із кількістю хромосом 95–96. На 160-му пасажі поряд із чотирма тетраплоїдами зареєстровано також один випадок біяпентаплоїдії, а на 205-му – єдиний біягексаплоїд і 12,5 % (9 з 72) біятриплоїдних клітин, які не зустрічалися на 160-му пасажі (рис. 6, 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 плоідності, зокрема біяпента- і біягексаплоїдів [21]. Для однієї із клітинних ліній миші показано тривалий етап становлення (понад 140 пасажів) [22], подібно як це мало місце у клітинах лінії 4BL людини.

Поліплоїдія характерна як для культивованих клітин, так і для клітин *in vivo*, що виконують значне функціональне навантаження, наприклад, гепатоцити, кардіоміоцити, м'язові клітини, мегакаріоцити, остеокласти, хондрокласти, клітини поверхневого епітелію плаценти



а



б

Рис. 5. 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): *а* – баланс ДНК кожної пари хромосом. Симетрична локалізація сегментів гомологічних хромосом вказує на збереження балансу ДНК, відмінність між гомологічними хромосомами (із зсувом сегментів до низу або вгору) – на наявність трисомії/моносомії; *б* – нормований розподіл хромосом залежно від ступеня анеуплоїдії. Розташування сегмента на нульовій відмітці означає збереження балансу ДНК, зсув сегмента донизу свідчить про наявність додаткового генетичного матеріалу, зсув вгору – про втрату генетичного матеріалу; по вертикалі – нормалізоване співвідношення \log , по горизонталі – хромосома

тощо. Перевагою поліплоїдії в диференційованих тканинах може бути «запас міцності» множинних копій генів в умовах підвищеного ризику виникнення інактивуючих мутацій (на-

приклад, під впливом ксенобіотиків) [23]. Аналогічний механізм може зумовлювати особливості клітинного циклу пухлинних клітин, які можуть бути визнані зразками життєздатності.

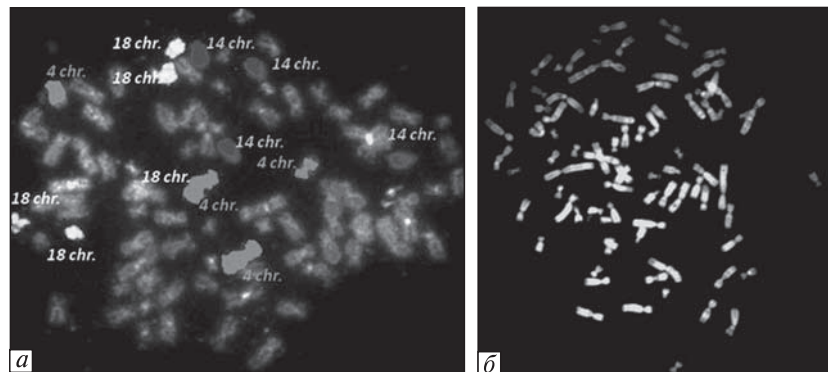


Рис. 6. Приклади поліплоїдії у клітинах лінії 4BL на 205-му пасажі: *a* – тетраплоїд (техніка FISH Cytocell OctoChrom); *б* – триплоїд (забарвлення QFH/AcD). Позначення: chr – хромосома. 36. $\times 1000$

Поліплоїдію спостерігали в бластоцистах людини, отриманих при екстракорпоральному заплідненні [24], в ембріональному диску і трофоектодермі ембріонів великої рогатої худоби (7–8- та 12-денних) [25], в гігантських клітинах трофобласту у ссавців [26]. Хоча й вважають, що поліплоїдія характерна для ранніх стадій ембріогенезу, зростання частоти таких метафаз *in vitro* може бути показником дегенерації і завмирання культури [27]. Якщо в ембріональних лімфоїдних клітинах *ex vivo* частка поліплоїдних (тетраплоїдних) метафаз дорівнювала $0,59 \pm 0,13$ % [28], у короткочасній культурі лімфоцитів периферійної крові коливалася в межах $0,2 \pm 0,4$ % [29], то в культурі ембріональних фібробластів людини вона вже складала $2,45 \pm 0,54$ %, причому зростала із тривалістю культивування [28], а в культурі амніоцитів становила $8,24 \pm 0,99$ % [30].

Механізм поліплоїдії в культурі 4BL залишається невідомим. Одним із них може бути ендоредуплікація хромосомного набору клітини з передчасним розділенням сестринських хроматид (ПРХ), в якій не відбулася р53-залежна індукція апоптозу [18–19, 31–32] (рис. 7). 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 р53, внаслідок чого може зростати кількість поліплоїдних клітин. У попередніх дослідженнях ембріональних гермінативних клітин миші нами виявлено дисфункцію контрольної точки мітозу та експресію в гіперплоїдних клітинах р53 дикого типу і мутантного білка р53 із зниженою функціональною активністю [33, 34].

Наявність клітин із повним ПРХ в культурі 4BL опосередковано свідчить про знижений рівень негативної селекції поліплоїдії шляхом р53-залежної індукції апоптозу [18, 19]. При цьому встановлено зменшення кількості клітин із ПРХ в динаміці пасажування з 5 до 1,5 % метафазних пластинок 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 за допомогою ендоредуплікації хромосомних наборів з ПРХ.

Постає питання пошуку механізмів, які забезпечують високий рівень поліплоїдії на 205-му пасажі при одночасному відтворенні репрезентативного пулу біядиплоїдних клітин. Згідно з сучасними уявленнями спектр ймовірних чинників поліплоїдизації надзвичайно широкий і поряд із дисфункцією р53 передбачає порушення регуляції і експресії циклінів (В, Е), циклін-залежних кіназ, убіквітин-лігаз (APC, CRL), білків-пасажирів хромосом (сурвівін, Аврора-В кіназа), регуляторів контрольної затримки мітозу і цитокінезу та ін. [35–44]. З огляду на важливість проходження мітотичного циклу привертає увагу часта нулісомія/моносомія хромосоми 13 у клітинах лінії 4BL, що дає можливість припустити функціонально недостатню продукцію білка ретинобластоми (pRb). При цьому слід зазначити, що регулярна втрата хромосоми 13 при тривалому культивуванні іморталізованої лінії мезенхімальних клітин людини UE6E7T-3 призводила до біядиплоїдної анеуплоїдії каріотипу, але не до тетраплоїдії [45].

Отримані нами дані дозволяють висловити гіпотезу, що на 205-му пасажі клітинної лінії

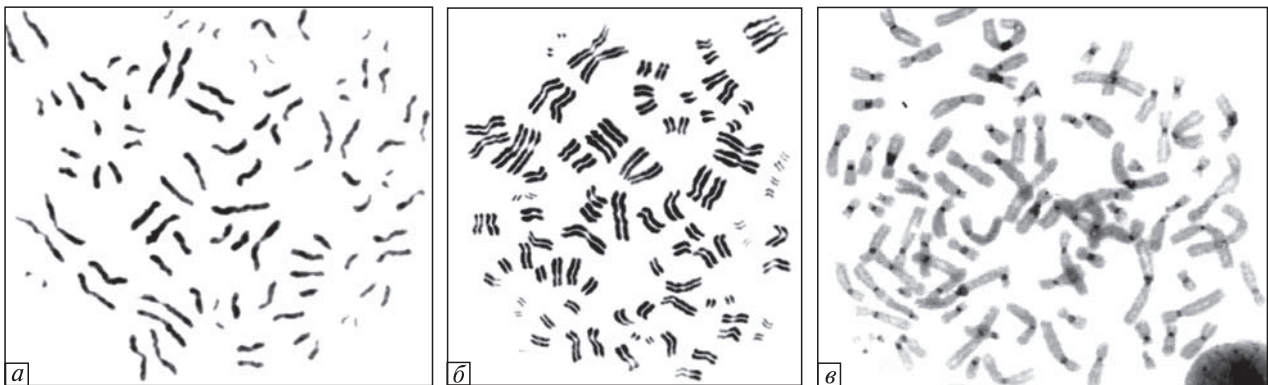


Рис. 7. Гіпотетичний механізм утворення поліплоїдних клітин внаслідок ендоредуплікації ПРХ: а – ПРХ, б – моделювання ендоредуплікації, в – тетраплоїдна метафазна пластинка

4ВL відтворення модального клону з 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 клітинної лінії. Явище деполіплоїдизації з подальшим відтворенням біядиплоїдних клітин є відомим і описане в дослідженнях [46–50]. В одній з останніх робіт [49] доведено індукцію поліплоїдії в пухлинних клітинах HeLa і MDA-MB435 внаслідок радіаційно-індукованої мітотичної катастрофи. В межах п'яти днів після опромінення згадані поліплоїдні клітини демонстрували мультиполярне розділення хромосом з утворенням невеликих мононуклеарних клітин, які за морфологічними характеристиками практично не відрізнялись від неопромінених клітин, зберігали життєздатність і давали потомство упродовж 12 днів. Клітини, які виникли внаслідок деполіплоїдизації, на думку авторів [49] відрізняються за складом геному від звичайних соматичних клітин даної лінії і при цьому набувають переваги в життєздатності та стійкості до впливу генотоксичних чинників. При дослідженні еволюції каріотипу в клітинних лініях миші нами вже було показано, що протилежно спрямовані процеси поліплоїдизації та вторинної диплоїдизації можуть протікати одночасно і по-різному для різних хромосом, а збереження біля-

диплоїдного числа хромосом у спрощених умовах тривалого існування *in vitro* може поєднуватись з набуттям генетичних перебудов порівняно із клітинами вихідної лінії [51, 52].

Поліплоїдію як прекурсор анеуплоїдії пов'язують з початком онкогенної трансформації [53], при цьому деполіплоїдизація після ендоредуплікації з подальшим вступом до мітозу із відтворенням дочірніх клітин з чисельними змінами хромосом асоціюється з агресивною формою канцерогенезу і вважається однією з вагомих причин неефективності протипухлинної терапії [54]. Нещодавно встановлено, що поліплоїдні клітини на шляху деполіплоїдизації демонструють характеристики профази першого мейозу і експресію окремих мейозспецифічних генів, зокрема, *SYCP2*, *SYCP3*, *DMC1*, *SPO11*, *REC8*, *STAG3*, *MOS* [49], а поряд з цим ембріональних генів *OCT4*, *NANOG* і *SOX2* [50]. Вважають, що саме активація мейотичної програми індукує в ендоредуплікованих клітинах процес розділення хромосом, наслідком якого є редукція хромосомного набору в дочірніх клітинах.

Таким чином, механізми каріотипічної еволюції клітин лінії 4ВL людини потребують подальших досліджень на засадах сучасної геноміки і протеоміки. Визначені в дослідженні числові і структурні аномалії хромосом в комплексі з попередніми результатами аналізу aCGH 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.

Висновки. 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*.

Колектив авторів висловлює щирю подяку д-ру біол. наук Т.В. Кузнецовій (ДУ НДІ акушерства і гінекології ім. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург) та канд. мед. наук В.Д. Зукіну (Клініка репродуктивної медицини «Надія», м. Київ) за допомогу у проведенні цитогенетичних досліджень.

H.R. Akopyan, N.L. Huleyuk, V.O. Kushniruk,
D.O. Mykytenko, A.P. Iatsyshyna, L.L. Lukash

Institute of Hereditary Pathology
of NAMS of Ukraine, Lviv
E-mail: akopyan.h@ihp.lviv.ua
Institute of Molecular Biology and Genetics
of NAS of Ukraine, Kyiv
Clinic of reproductive medicine «Nadiya», Kyiv

COMPARATIVE ANALYSIS OF A NEW HUMAN CELL LINE 4BL KARYOTYPE AT LONG-TERM CULTIVATION. PLOIDY OF CHROMOSOMAL SET

Long-term cultivation of human cells, including stem cells, can lead to substantial transformation of the karyotype and occurrence of genetic instability. The aim of this research was a comparative cytogenetic study of the karyotype of a new human stem cell line 4BL at 160 and 205 passages. The absence of 10 and 13 pairs of chromosomes and the monosomy of chromosomes 4, 8, 10, 11, 13, 15, 17, 21, X were observed; also six regular marker chromosomes were detected. Chromosomes 1, 15 and 21 are involved in translocations t(1;11), t(5;15), t(12;15), t(16;21). Modal class of the karyotype is within 41–43 chromosomes at both 160 and 205 passages. The frequency of polyploid cells have been increased from

2,8 % at 160 passage up to 36 % at 205 passage. Cells with a near-haploid karyotype were not detected at 205 passage (in contrast to 24,6 % at 160 passages) and a decline of the level of premature separation of chromatids was observed. We assume stabilization of karyotype of the cell line 4BL at 205 passage and consider that further research is needed to predict the direction of karyotypic evolution of these cells *in vitro*.

G.P. Akopyan, N.L. Huleyuk, V.O. Kushniruk,
D.O. Mykytenko, A.P. Iatsyshyna, L.L. Lukash

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КАРИОТИПА НОВОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА 4BL В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ. ПЛОИДНОСТЬ ХРОМОСОМНОГО НАБОРА

Длительное культивирование клеток человека, в том числе стволовых, может привести к существенной трансформации каріотипа и возникновению генетической нестабильности. Целью настоящей работы было сравнительное цитогенетическое исследование каріотипа новой клеточной линии стволовых клеток 4BL на 160-м и 205-м пассажах. Наблюдали нуллисомию или моносомию хромосом 10 и 13, моносомию хромосом 4, 8, 11, 15, 17, 21 и X, обнаружили шесть регулярных маркеров-дериватов. Хромосомы 1, 15, 21 вовлечены в транслокации t(1;11), t(5;15), t(12;15), t(16;21). Модальный класс каріотипа как на 160-м, так и на 205-м пассаже составлял 41–43 хромосомы. Обнаружили рост уровня полиплоидных клеток с 2,8 % на 160-м пассаже до 36 % на 205-м пассаже, отсутствие окологаплоидных клеток на 205-м пассаже (24,6 % на 160-м пассаже) и уменьшение уровня преждевременного разделения хроматид с 5 до 1,5 %. Предполагаем стабилизацию каріотипа клеточной линии 4BL на 205-м пассаже, что требует дальнейших исследований для прогнозирования направления каріотипической эволюции *in vitro*.

СПИСОК СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gaebel R., Furlani D., Sorg H. et al. Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration // PLoS One. – 2011. – 6, № 2. – P. e15652.
2. Wagner W., Bork S., Lepperdinger G. et al. How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? // Aging (Albany NY). – 2010. – 2, № 4. – P. 224–230.
3. Peters R., Wolf M.J., van den Broek M. et al. Efficient generation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood in stroma-free liquid culture // PLoS One. – 2010. – 5, № 12. – P. e15689.
4. Wagner W., Ho A.D., Zenke M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells // Tissue Engineer. Part B. – 2010. – 16, № 4. – P. 445–453.

5. *Furlani D., Li W., Pittermann E., Klopsch C. et al.* A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart // *Cell Transplant.* – 2009. – **18**, № 3. – P. 319–331.
6. *Kim J., Kang J.W., Park J.H. et al.* Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells // *Arch. Pharm. Res.* – 2009. – **32**, № 1. – P. 117–126.
7. *Bernardo M.E., Zaffaroni N., Novara F. et al.* Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms // *Cancer Res.* – 2007. – **67**, № 19. – P. 9142–9149.
8. *Maitra A., Arking D.E., Shivapurkar N. et al.* Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells // *Nat. Genet.* – 2005. – **37**, № 10. – P. 1099–1103.
9. *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. – **6**. – P. 321–328.
10. *Qin Y., Ji H., Wu Y., Liu H.* Chromosomal instability of murine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in long-term culture and development of cloned embryos // *Cloning Stem Cells.* – 2009. – **11**, № 3. – P. 445–452.
11. *Яцишина А.П.* Генетична нестабільність клітин ссавців *in vitro* // *Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів.* – 2010. – **8**, № 1. – С. 165–178.
12. *Лукаш Л.Л.* Регуляція изменчивости генома соматических клеток млекопитающих под влиянием экзогенных биологических факторов // *Biopolym. Cell.* – 2004. – **20**, № 1/2. – P. 93–105.
13. *Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Кушнірук В.О., Підпала О.В.* Репрограммирование соматических клеток взрослого человека // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* – Київ : Логос, 2011. – С. 493–498.
14. *Фрешни Р.Я.* Культура животных клеток : *Практ. руководство.* – М.: Бином, 2010. – 692 с.
15. *Hungerford D.A.* Leucocytes culture from small incula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // *Stain. Technol.* – 1965. – **10**, № 6. – P. 333–338.
16. *Seabright M.A.* A rapid banding technique for human chromosomes // *Lancet.* – 1971. – **2**. – P. 971–972.
17. *Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J.* *ISCN 2009 : an international system for human cytogenetic nomenclature.* – Basel : Karger, 2009. – 138 p.
18. *Akopyan H., Sirenko A., Sedneva I. et al.* Cytogenetic assay in apoptosis investigations // *Folia Histochem. et Cytobiol.* – 2001. – **39**, Suppl. 2. – P. 158–160.
19. *Yih L.H., Lee T.C.* Induction of C-anaphase and diplo-chromosome through dysregulation of spindle assembly checkpoint by sodium arsenite in human fibroblasts // *Cancer Res.* – 2003. – **63**, № 20. – P. 6680–6688.
20. *Shinawi M., Cheung S.W.* The array CGH and its clinical applications // *Drug Discov. Today.* – 2008. – **13**, № 17/18. – P. 760–770.
21. *Яцишина А.П., Підпала О.В., Кочубей Т.П., Лукаш Л.Л.* Цитогенетичний аналіз спонтанно іморталізованої клітинної лінії миші G1 // *Biopolym. Cell.* – 2006. – **22**, № 4. – P. 299–306.
22. *Глазко Т.Т., Яцишина А.П., Підпала О.В., Лукаш Л.Л.* Преимущество цитогенетических характеристик в пассажах эмбриональной герминативной клеточной линии мыши G1 // *Клет. трансплантология и ткан. инженерия.* – 2007. – **2**, № 3. – С. 47–50.
23. *Lee H.O., Davidson J.M., Duronio R.J.* Endoreplication: polyploidy with purpose // *Genes. Dev.* – 2009. – **23**, № 21. – P. 2461–2477.
24. *Clouston H.J., Herbert M., Fenwic J. et al.* Cytogenetic analysis of human blastocysts // *Pren. Diagn.* – 2002. – **22**, № 12. – P. 1143–1152.
25. *Viuff D., Palsgaard A., Rickords L. et al.* Bovine embryos contain a higher proportion of polyploid cells in the trophectoderm than in the embryonic disc // *Mol. Reprod. Dev.* – 2002. – **62**, № 4. – P. 483–488.
26. *Zybina T.G., Zybina E.V.* Cell reproduction and genome multiplication in the proliferative and invasive trophoblast cell populations of mammalian placenta // *Cell Biol. Int.* – 2005. – **29**, № 12. – P. 1071–1083.
27. *Walen K.N.* The origin of transformed cells studies of spontaneous and induced cell transformation in cell cultures from marsupials, a snail, and human amniocytes // *Cancer Genet. and Cytogenet.* – 2002. – **133**, № 1. – P. 45–54.
28. *Лозинська М.Р., Гнатейко О.З., Гаврилюк Ю.Й.* Рівень спонтанних геномних мутацій в соматичних клітинах ембріонів людини // *Цитология и генетика.* – 1994. – **26**, № 3. – С. 70–74.
29. *Гулеюк Н.Л.* Цитогенетичні особливості у осіб з порушеннями менструальної функції людини // *Цитология и генетика.* – 1994. – **26**, № 3. – С. 75–79.
30. *Гулеюк Н.Л., Заставна Д.В., Безкоровайна Г.М., Акоюн Г.Р.* Ефективність пренатальної діагностики хромосомної патології та цитогенетичні особливості культивованих амніоцитів // *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія.* – 2003. – № 3. – С. 7–14.
31. *Акоюн Г.Р., Сиренко А.Г., Гнатейко О.З. и др.* C-анафаза как цитогенетический маркер апоптоза клеток при остром лимфобластном лейкозе у детей // *Эксперим. онкология.* – 1999. – **21**, № 2. – С. 127–132.
32. *Акоюн Г.Р.* Передчасне розділення хромосом як інформативний маркер хромосомної нестабіль-

- ності в клітинах людини // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – К.: Логос. – 2007. – Т. 1. – С. 390–394.
33. Яцишина А.П., Кваша С.М., Підпала О.В. та ін. Генетична нестабільність ембріональних гермінативних клітин лінії G1 миші та порушення функцій контрольної точки мітозу і p53 // *Bio-polym. Cell.* – 2007. – **23**, № 4. – P. 338–346.
 34. Морзункова А.А., Алмазов В.П., Струнина С.М. и др. Доминантно-негативная инактивация p53: влияние количественных соотношений трансдоминантного ингибитора и его мишеней // *Молекуляр. биология.* – 2003. – **37**, № 1. – С. 112–120.
 35. *Armesilla-Diaz A., Elvira G., Silva A.* p53 regulates the proliferation, differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells // *Exp. Cell Res.* – 2009. – **315**, № 20. – P. 3598–3610.
 36. *Zielke N., Querings S., Rottig C. et al.* The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles // *Genes Dev.* – 2008. – **22**, № 12. – P. 1690–1703.
 37. *Wang Z., Inuzuka H., Fukushima H. et al.* Emerging roles of the FBW7 tumour suppressor in stem cell differentiation // *EMBO Rep.* – 2011. – **13**, № 1. – P. 36–43.
 38. *Chircop M., Malladi C.S., Lian A.T. et al.* Calcineurin activity is required for the completion of cytokinesis // *Cell Mol. Life Sci.* – 2010. – **67**, № 21. – P. 3725–3737.
 39. *Chircop M., Sarcevic B., Larsen M.R. et al.* Phosphorylation of dynamin II at serine-764 is associated with cytokinesis // *Biochim. biophys. acta.* – 2011. – **1813**, № 10. – P. 1689–1699.
 40. *Rosario C.O., Ko M.A., Haffani Y.Z. et al.* Plk4 is required for cytokinesis and maintenance of chromosomal stability // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2010. – **107**, № 15. – P. 6888–6893.
 41. *Boudolf V., Lammens T., Boruc J. et al.* CDKB1;1 forms a functional complex with CYCA2;3 to suppress endocycle onset // *Plant Physiol.* – 2009. – **150**. – P. 1482–1493.
 42. *Lordier L., Chang Y., Jalil A. et al.* Aurora B is dispensable for megakaryocyte polyploidization, but contributes to the endomitotic process // *Blood.* – 2010. – **116**, № 13. – P. 2345–2355.
 43. *Platica M., Ionescu A., Ivan E. et al.* PAR, a protein involved in the cell cycle, is functionally related to chromosomal passenger proteins // *Int. J. Oncol.* – 2011. – **38**, № 3. – P. 777–785.
 44. *AbouAlaiwi W.A., Ratnam S., Booth R.L. et al.* Endothelial cells from humans and mice with polycystic kidney disease are characterized by polyploidy and chromosome segregation defects through survivin down-regulation // *Hum. Mol. Genet.* – 2011. – **20**, № 2. – P. 354–367.
 45. *Takeuchi M., Takeuchi K., Ozawa Y. et al.* Aneuploidy in immortalized human mesenchymal stem cells with non-random loss of chromosome 13 in culture // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* – 2009. – **45**, № 5/6. – P. 290–299.
 46. *Illidge T.M., Cragg M.S., Fringes B. et al.* Polyploid giant cells provide a survival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage // *Cell Biol. Int.* – 2000. – **24**, № 9. – P. 621–633.
 47. *Walen K.H.* Bipolar genome reductional division of human near-senescent, polyploid fibroblast cells // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2007. – **173**, № 1. – P. 43–50.
 48. *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. – **32**, № 9. – P. 1031–1010.
 49. *Ianzini F., Kosmacek E.A., Nelson E.S. et al.* Activation of meiosis-specific genes is associated with depolyploidization of human tumor cells following radiation-induced mitotic catastrophe // *Cancer Res.* – 2009. – **69**, № 6. – P. 2296–2304.
 50. *Salmina K., Jankevics E., Huna A. et al.* Up-regulation of the embryonic self-renewal network through reversible polyploidy in irradiated p53-mutant tumour cells // *Exp Cell Res.* – 2010. – **316**, № 13. – P. 2099–2112.
 51. Яцишина А.П., Глазко Т.Т., Ковалева О.А. и др. Возможные пути диплоидизации полиплоидных герминативных стволовых клеток мышей линии BALB/c // *Цитология и генетика.* – 2006. – **40**, № 6. – С. 44–49.
 52. Лукаш Л.Л. Мутагенез при интеграционных процессах и эволюция ядерного генома // *Bio-polym. Cell.* – 2007. – **23**, № 3. – P. 172–187.
 53. *King RW.* When 2+2=5: the origins and fates of aneuploid and tetraploid cells // *Biochim. biophys. acta.* – 2008. – **1786**, № 1. – P. 4–14.
 54. *Mosieniak G., Sikora E.* Polyploidy: the link between senescence and cancer // *Curr. Pharm. Des.* – 2010. – **16**, № 6. – P. 734–740.

Надійшла 27.07.12