

УДК 576.5:576.224.2

ГЕНЕТИЧНА НЕСТАБІЛЬНІСТЬ КЛІТИН ССАВЦІВ *IN VITRO*

А.П. ЯЦИШИНА

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150
e-mail: a.p.iatsyshyna@imbg.org.ua

Клітинні лінії ссавців, у тому числі й лінії стовбурових клітин людини, набули широкого використання у різноманітних фундаментальних дослідженнях, біотехнології та регенеративній медицині. Мета даного огляду – аналіз літературних даних про нестабільність геному популяцій культивованих *in vitro* клітин ссавців. Показано, що клітинні лінії ссавців, у тому числі і стовбурові, при тривалому культивуванні накопичують генетичні та епігенетичні зміни, що порушує дискусивні питання доцільності використання культивованих клітин у регенеративній медицині та можливих наслідків такої терапії, а також необхідності постійного ретельного тестування клітин тощо.

Ключові слова: клітинні лінії ссавців, стовбурові клітини, генетична нестабільність, епігенетична нестабільність.

Вступ. Культури клітин різного походження активно використовують у багатьох лабораторіях світу як для наукових досліджень, наприклад, у цитології, біохімії, молекулярній та клітинній біології, генетиці, вірусології тощо, так і в біотехнології для промислового отримання корисних речовин для потреб медицини, косметичної та харчової промисловостей (антибіотиків, гормонів, ферментів тощо).

Вибір клітинних ліній як експериментальної моделі для дослідження зумовлений економією часу дослідника та коштів. На сьогодні пріоритет надається розвитку швидших і дешевших методів застосування культур клітин *in vitro*, порівняно із використанням піддослідних тварин. Зокрема, Європейський Союз у сьомій рамковій програмі з досліджень (2007–2013 рр.) виділив 25 млн євро із бюджету 2010 року та оголосив шість партнерських проектів під єдиною темою “Стратегії альтернативного тестування” [1]. Основною метою оголошених конкурсних тематик є повна заміна тварин на клітини *in vitro* в безпечному тестуванні систематичної токсичності, а серед конкурсних тематик є, наприклад, оптимізація наявних і розвиток нових методів функціональної диференціації стовбурових клітин (СК) людини *in vitro* та розробка клітинних пристроїв, які симулюють органи, як альтернативи використання тварин у тестуванні тривалої токсичності хімічних компонентів та ін.

Одна з основних, найчастіше досліджуваних, але до цього часу невирішених проблем – нестабільність геному культивованих *in vitro* клітин. Відомо, що клітини ссавців, у тому числі й стовбурові, при тривалому культивуванні накопичують генетичні та епігенетичні зміни [2–4], при цьому можуть змінюватися їхні характеристики, в тому числі й каріотипічні, що, на жаль, часто призводить до втрати тих властивостей, заради яких їх підтримували у культурі [5].

Оскільки потреби біотехнології та регенеративної медицини зумовлюють необхідність одержання в умовах культивування *in vitro* достатньої кількості клітинного матеріалу, виникає необхідність постійного ретельного тестування отриманих культур, розробки надійних критеріїв чистоти і стабільності клітинних ліній та стандартизації для порівняння даних, у різних лабораторіях [6], а також пошуку характеристик, які можна використовувати для прогнозу клітинної популяційно-генетичної стабільності та напрямку еволюції в умовах *in vitro* [7, 8].

Отримання нових клітинних ліній ссавців і галузі їхнього застосування.

Техніки культури тканин і культури клітин відомі ще з початку ХХ-го століття, однак, уже при перших спробах отримати постійні клітинні лінії виявили, що більшість клітинних культур навіть при постійному перенесенні у свіже живильне середовище мають обмежену тривалість життя і після певної кількості поділів (від 50 до 100) клітини старіють та гинуть [9, 10]. Цей процес, що отримав назву “запрограмованої клітинної смерті”, або феномену Хейфліка, залежить від донора клітин [9]. Наприклад, ембріональні клітини діляться близько 50 разів, клітини новонароджених – не більше 20 – 30, а клітини більш пізнього віку витримують лише декілька поділів [10].

Постійні іморталізовані клітинні лінії можна отримати шляхом спонтанної або індукованої трансформації клітин [5]. Наприклад, клітинні лінії меланом отримують при опроміненні шкіри тварин (мишей) ультрафіолетом та при обробці її етанолом [11], клітинні лінії кератиноцитів гризунів – завдяки трансдукції конструкцій із генами вірусів [12], суспензійні клітинні лінії – при трансформації клітин крові вірусом лейкої Молоні [5, 13], клітинні лінії рабдоміосарком – при внутрішньом'язових ін'єкціях сульфїду нікелю [14]. Спроби от-

римати клітинну лінію із пухлини шляхом тривалого культивування *in vitro* успішні менше, ніж у 10 %. Найчастіше такі лінії отримують із клітин високозлоякісних або метастазних, низькодиференційованих пухлин, як наприклад, лінії множинної мієломи. Практично не можливо отримати клітинні лінії із високодиференційованих клітин доброякісних солідних пухлин [5].

Спонтанно отримати іморталізовані клітинні лінії значно легше із клітинного матеріалу гризунів. Наприклад, із фетусів китайського хом'ячка без будь-якої обробки було отримано постійні клітинні лінії, кожна із яких виявила прояви неопластичного розвитку [15].

СК ізолюють із різноманітних джерел, однак усі вони потребують особливих умов культивування *in vitro* для збереження таких важливих для дослідників властивостей, як наприклад здатності до диференціації в різні типи клітин та нормального каріотипу. Наприклад, ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) отримують із внутрішньоклітинної маси бластоцисти [7, 16], ембріональні гермінативні клітини (ЕГК) – із попередників гонад зародків [17–19], ембріональні клітини тератокарцином – із клітин пухлин гонад зародків [20, 21], дорослі стовбурові клітини – із кісткового мозку, печінки, селезінки та інших тканин дорослого організму [22–24].

Перші постійні клітинні лінії ЕСК миші отримано в 1981 році [16], а ЕСК людини – лише у 1998 [7]. Так само із мишей раніше були отримані перші клітинні лінії ЕГК у 1992 році [17], тоді як клітинні лінії ЕГК людини отримано декількома роками пізніше [18].

Однак незалежно від джерела клітинного матеріалу та способів вирощування *in vitro* клітини ссавців в умовах культивування набувають здатності до необмеженого поділу (іморталізуються) [10, 25] або гинуть.

Клітинні лінії ссавців широко використовують як у різноманітних фундаменталь-

них дослідженнях, так і в біотехнологічному виробництві та медичній практиці. Наприклад, клітинні лінії є зручними модельними системами для вивчення ембріогенезу, генетичних механізмів диференціації клітин, мутагенезу, канцерогенезу тощо [4, 5, 26–28].

Пухлинні клітини, адаптовані до росту як моношарові культури, є цінним матеріалом для досліджень зв'язку малігнізації з аномальним диференціюванням клітин [26], для вивчення закономірностей каріотипічної мінливості клітин в умовах організму та культури, а також для з'ясування ролі та специфічності хромосомних перебудов у пухлинах і постійних клітинних лініях [5, 29–31]. Зокрема, для вивчення передмалігнізованого стану епітелію молочної залози людини широко використовується спонтанно іморталізована клітинна лінія HMT-3522 [30], для вивчення карциноми клітин печінки людини, її прогресії та метастазування – лінія FHCC-98 [32], для вивчення первинних меланом розроблено модель на мишах лінії C3H [11], а для аналізу *in vitro* функцій і чутливості до біохімічних/гормональних факторів особливого типу клітин – Sertoli клітин – одержано ідеальну модель, перманентну Sertoli клітинну лінію миші TM4 [33].

Клітинні лінії у культурі є також зручними модельними системами для вивчення розвитку захворювань, спричинених вірусами, наприклад ролі вірусу Епштейна-Барра у розвитку карциноми носоглотки [34, 35].

Клітини ссавців *in vitro* також використовують для дослідження взаємодії різноманітних клітин між собою, механізмів старіння тканин [36], механізмів імунітету та імунної реакції, імунодефіцитів й імунотолерантності та моделей генетичних захворювань людини [37, 38]. Клітини ссавців використовують при тестуванні нових ліків, зокрема для вивчення фізіологічної реакції на стимулювання лікарськими препаратами, метаболізму ліків тощо [34, 39].

Останнім часом коло галузей застосування культур клітин ссавців значно розширилось, особливо після відкриття СК, їхніх властивостей та перспективи практичного застосування у різноманітних галузях медицини (клітинній та генній терапії) [7, 8, 28, 40–42]. У клінічній практиці СК найчастіше використовують для лікування захворювань системи крові (лейкози, анемії, ферментопатії) [43–45], а також для корекції імунодефіцитних станів після хіміотерапії та опромінення [44, 46, 47].

ЕСК завдяки здатності диференціюватися у будь-який тип клітин знаходять своє застосування при конструюванні органів *in vitro* [48] та впровадження у регенеративну медицину [49–51]. ЕСК є джерелом для цілей трансплантаційної терапії, включаючи печінку, нервову систему, підшлункову залозу, серце та інші органи [36, 40, 41]. Наприклад, СК використовують для лікування пошкоджень шкіри (дермальних опіків), слизових оболонок, хрящів, очей, вух [48, 52–55], а також деяких типів міодистрофій та пошкоджень суглобів і кісток [49, 52, 56, 57]. Їх також використовують для лікування вроджених імунодефіцитних станів, генетичних захворювань людини найрізноманітнішої етіології, гострої печінкової недостатності, цирозу і спадкових метаболічних захворювань печінки [53, 58, 59], а також захворювань органів репродуктивної системи [60]. Особливо важливим є лікування дегенеративних захворювань нервової тканини, інсультів, хвороби Паркінсона [61–63], важких форм протікання інсулінозалежного цукрового діабету [64] та захворювань серцево-судинної системи [65–67]. ЕСК людини також є цінною моделлю для генетичних вивчень передімплантаційних плюрипотентних клітин [68]. Вони також надають можливість моделювати та вивчати *in vitro* самі ранні події нормального гематопоезу та лейкемічної трансформації [69].

Незважаючи на випадки успішної трансплантації СК, у жодному із відомих

досліджень *in vivo* не показано повної реконструкції органу в людини. До того ж, тканинні культури ЕСК дають початок гетерогенній суміші клітинних типів, і для її контролю та обмеження диференціації необхідні подальші детальні дослідження за допомогою біохімічних, культуральних і молекулярно-біологічних методів [27]. Необхідна розробка не лише методів трансплантації ЕСК людини, а й контролю розвитку та функціонування трансплантованих СК [70].

Інша проблема культивованих *in vitro* СК – проблема генетичної стабільності, а небажаний наслідок трансплантації таких клітин в організм – пухлиноутворення. Хоча ЕСК можна підтримувати у культурі понад два роки і більше як іморталізовані клітинні лінії, вирощування цих клітин у культурі є проблематичним, оскільки вони, як і інші клітини *in vitro*, накопичують генетичні та епігенетичні зміни [2–4]. Тому важливим завданням є пошук характеристик, які можна використовувати для прогнозу популяційно-генетичної стабільності та напрямку еволюції СК у культурі.

Обмеження та ризики клінічного використання клітинних ліній. До найбільших ризиків використання культивованих *in vitro* клітин у регенеративній медицині належать імунна реакція та пухлиноутворення. Імунна реакція реципієнта – серйозна перепона для успішної трансплантації СК і отриманих із них тканин. Вважають, що трансплантовані СК менше провокують імунну реакцію, ніж трансплантація всього органу. Деякі типи клітин, наприклад, дендроцити, імунцити й ендотеліоцити несуть більшу кількість антигенів гістосумісності, ніж решта клітин [44]. Усі ці типи клітин є в тканинах цілого органа, вони з'єднують орган з кровообігом і нервовою системою.

ЕСК можна зробити менш реактивними, використовуючи методи генної інже-

нерії для видалення їхніх поверхневих антигенів [71]. Розумного компромісу між реципієнтом і отриманими з ЕСК тканинами, що йому пересаджуються, теоретично можна досягнути з використанням методів терапевтичного клонування за допомогою техніки переносу ядра соматичних клітин в без'ядерний ооцит з метою створення гістосумісних ЕСК. Подібну техніку використовують і в репродуктивному клонуванні при отриманні ембріона, генетично однорідного донора соматичного ядра, який гіпотетично можна імплантувати в донорську матку. Проте такі клітини не можуть бути трансплантовані пацієнтам з генетично обумовленими захворюваннями, оскільки вони будуть нести ту ж саму генетичну інформацію. У будь-якому випадку розуміння того, яким чином попередити відторгнення трансплантованих клітин, є одним із важливих питань регенеративної медицини [36, 50].

Також можливе використання ЕСК із метою досягнення успішнішої трансплантації тканин, зокрема подолання відторгнення. Якщо гемопоетичні СК, отримані із ЕСК людини, успішно трансплантувати в кровеносну систему реципієнта (з обов'язковою імуносупресією), то будь-яка інша імплантована тканина (нирки, підшлункова залоза), індукована із тих самих ЕСК, теоретично не повинна відторгнутися реципієнтом, оскільки імунцити реципієнта будуть сприймати трансплантовані тканини як “свої” [44, 66].

Інша проблема використання клітинних ліній СК людини у клітинній практиці пов'язана із ризиком ініціації пухлинної трансформації при трансплантації в організм. Як відомо, СК людини, імплантовані мишам, можуть дати початок пухлинам м'яких тканин. Передбачають, що така відповідь пов'язана з плюрипотентністю недиференційованих клітин *in vivo*, хоча є низка робіт, в яких не виявлено пухлино-

утворення. Однак моніторинг стабільності отриманих ембріональних клітинних ліній необхідний для розуміння впливу тривалого культивування [28], оскільки генетичні дефекти в клітинах можуть також сприяти пухлиноутворенню [72, 73].

Проблема генетичної нестабільності. Уже на початкових етапах розвитку клітинних технологій виявлено обмежену тривалість життя у культурі більшості клітин ссавців [9, 10, 25]. Ті клітини, які пережили кризу старіння та набули необмеженого проліферативного потенціалу [9], часто стають неопластичними через місяці культивування, втрачають контактне інгібування, набувають підвищеної здатності формувати колонії, здатність рости у м'якому агарі та індукувати пухлини в імунodefіцитних мишей [25]. Також виявлено, що клітини, які пережили кризу, переважно анеуплоїдні, мають хромосомні аберації та мутації в багатьох онкосупресорах. Не менш важливий той факт, що анеуплоїдія і/або хромосомні аберації характерні для більшості генетично нестабільних трансформованих клітин [30, 31].

При становленні клітинних ліній відбувається складний процес перебудови каріотипу клітинної популяції із відбором клонів клітин, найадаптованіших до умов культивування, тобто відбувається так звана "каріотипічна еволюція" клітин *in vitro*. Вперше особливості мінливості каріотипу клітинних популяцій тварин у культурі описані та узагальнені у монографіях Оленова і Вахтіна [74–76]. Мамаєвою та її колегами виявлено п'ять закономірностей каріотипічної мінливості клітин ссавців у культурі, а також важливу особливість такої мінливості клітин, зокрема два етапи каріотипічної еволюції: етап становлення та етап стабілізації клітинної лінії [5].

При становленні багатьох клітинних ліній на різних етапах їхньої каріотипічної еволюції утворюються унікальні перебу-

довані, маркерні хромосоми [30, 77–79]. Постійна присутність спільних маркерів хромосом і у пухлинах, і у клітинних лініях, які походять від них, наводить на думку, що вони задіяні у підтриманні певного пухлинного фенотипу [80], як у випадку злоякісних меланом людини [33, 81] або аденокарцином миші [82]. 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 [5, 11, 83]. Таким чином, клітинні лінії є модельними системами для дослідження особливостей злоякісної трансформації клітин.

Виявлено, що СК також чутливі до стресових умов культивування, часто набувають генетичні та епігенетичні зміни *in vitro* [2–4], незважаючи на те, що вони, як вважають, мають спеціальний апарат для підтримання свого реплікативного потенціалу без накопичення аномалій [84]. Так, частота спонтанних мутацій у ЕСК приблизно в 100 разів нижча, ніж у соматичних клітинах [85]. Чим довше СК культивують, тим більше помилок вони накопичують у своєму геномі, включаючи такі мутації, які пов'язані з раком [3]. Наприклад, понад 70 % ЕСК миші стають анеуплоїдними до 25-го пасажу (еквівалент 2 місяці культивування) [86].

Показано, що при тривалому культивуванні мезенхімальні СК миші, ізольовані як із кісткового мозку, так і з жирової тканини, також зазнають спонтанної трансформації *in vitro* та виявляють хромосомну нестабільність [87].

Незважаючи на те, що спостерігали прогресивну втрату нормального каріотипу у культивованих ЕСК миші, тривалий час заперечували той факт, що і ЕСК людини також можуть накопичувати генетичні дефекти *in vitro*. Як не дивно, перше повідомлення про каріотипічні зміни при тривало-

му культивуванні ЕСК людини з'явилося у лабораторії ДЖ. Томсона лише у 2004 році [88], тобто через 6 років після першої публікації про отримання ЕСК людини [7]. У групі Мелтона автори отримали 17 ліній ЕСК та показали збереження нормально-го каріотипу ліній ЕСК на ранніх пасажах (до 22-го), проте на пізніх пасажах (з 29-го по 34-й) спостерігали появу каріотипічних змін [89]. На ранніх пасажах тільки дві лінії мали інверсії, тоді як на пізніх ще у чотирьох лініях з'явилися каріотипічні зміни, трисомія хромосоми 12 та інверсія 2q [89].

У 2005 році опубліковано аналіз генетичної та епігенетичної мінливості 9 постійних ліній ЕСК, взятих із різноманітних лабораторій [3]. Автори дослідили геномну стабільність даних ліній на ранніх (11–29) і пізніх (30–150) пасажах за такими критеріями: плоідність, нуклеотидна послідовність мітохондріальної ДНК (мтДНК) та статус метилування промоторів 14 вибраних генів. У результаті проведеного аналізу 8 із 9 ліній ЕСК людини на пізніх пасажах культивування мали одну або більше геномних змін, які часто спостерігають у пухлинах людини, включаючи зміни в числі копій (45%), нуклеотидної послідовності мтДНК (22%) і метилування промоторів генів (90%) [3]. Тільки одна лінія – SA001 (Cellartis AB), досліджена на 14-му і 60-му пасажах, не мала жодних змін [3]. Автори данної роботи наголошують на необхідності постійного моніторингу генетичних змін ліній ЕСК, культивованих для терапевтичного застосування.

У іншій роботі проаналізовано 15 із 22 ліній ЕСК людини, рекомендованих Національним інститутом здоров'я (NIH) і дозволених для фінансової підтримки з федерального бюджету США. Автори виявили, що тільки 9 із 15 ліній повністю відповідають вимогам до ЕСК людини, проте при тривалому культивуванні початковий диплоїдний каріотип зазнавав змін, тобто всі

лінії були придатні до використання лише на ранніх пасажах [90].

При тривалому культивуванні зміни каріотипу виникали і в інших ЕСК [3, 88, 90, 91], а також ЕГК [2, 17–19, 86, 92, 93].

Ці відкриття поставили гостре питання, чи можна застосовувати в терапії культивовані клітини, оскільки, на жаль, їх не можна зберігати інтактними та щоразу перевіряти на виникнення мутацій перед використанням.

Ще одна проблема пов'язана із контамінацією більшості ЕСК людини клітинами тварин, які використовувалися як ростовий фідер [3]. Оскільки клітини із сторонніми білками здатні спричиняти імунну відповідь при трансплантації пацієнтам, для використання в терапії ЕСК необхідно вирощувати без фідера, проте в таких умовах частіше спостерігають зміни копійності окремих хромосом [3]. Наприклад, показано, що адаптація ЕСК до росту на пластиковій поверхні культурального посуду супроводжується каріотипічними змінами у 100% клітин й популяція адаптованих клітин із каріотипом 47,XX,del(7)(q11.2),+i(12)(p10) виявила зменшення плюрипотентності [94]. Хромосомні зміни при культивуванні ЕСК людини без фідера спостерігали й інші дослідники, зокрема, виявлено трисомії хромосоми 12 та хромосоми 14 у двох із трьох досліджених ліній ЕСК [95].

Також виявлено, що анеуплоїдія, спричинена тривалим культивуванням ліній ЕСК, відбувається у специфічних хромосомних локусах. Наприклад, ЕСК миші часто мають трисомію хромосоми 8 [96], ЕСК людини – трисомії хромосом 12 і 17 [88], також описані випадки трисомії хромосом 20, 13, і 14 [97–100].

Досить часто при тривалому культивуванні спостерігають зміну хромосоми X, у тому числі її елімінацію. Можлива також поява ізохромосом як результат нерозход-

ження хромосом у мітозі, виникнення відповідної трисомії і подальшого зменшення копій до двох. Таким чином відбувається втрата гетерозиготності [4, 5, 70, 88, 89].

Набуті каріотипічні зміни, ймовірно, надають ростових переваг *in vitro*, проте є спільною причиною втрати поліпотентного потенціалу СК [2]. Зокрема, виявлені багатьма дослідниками трисомії пов'язані із тим фактом, що хромосома 8 [101, 102] та хромосома 11 [91, 103, 104] містять гени, які відповідальні за передачу сигналу від ростового фактора LIF (фактор інгібування лейкемії), який використовують для підтримання недиференційованого стану ЕСК миші *in vitro* [4, 105, 106]. Зазначають, також, що на вказаних хромосомах локалізовані гени, які контролюють нормальне проходження мітозу [107, 108]. Тобто, добір клітин із селективною перевагою може призвести до появи подальших змін каріотипу внаслідок порушення мітозу [4]. Також показано, що набуті геномні зміни можуть не лише забезпечувати селективну перевагу клітин у культурі, а й бути пов'язаними із онкогенною трансформацією, як наприклад виявлена у чотирьох із п'яти ліній ЕСК людини різного походження ампліфікація фрагмента хромосоми 20 (20q11.21), який охоплює приблизно 23 гени [109].

Показано також, що адаптація ЕСК людини до умов культивування супроводжується й епігенетичними змінами. Зокрема, аналізуючи профілі метилування ДНК понад 2000 геномних локусів у шести незалежно отриманих лініях ЕСК виявлено міжлінійну епігенетичну відстань та стійке успадкування індукованих культивуванням змін (82,3–87,5 %), а також появу додаткової епігенетичної нестабільності, спричиненої безсироватковим культивуванням [110]. 80,5 % спільних нестабільних локусів, виявлених в ЕСК, раніше були асоційовані із фенотипом пухлин [110].

Аналіз епігенетичної стабільності та експресії імпринтованих генів у 46 індивідуальних клітинних ліній як частини Міжнародної ініціативи стовбурових клітин виявив, що майже всі лінії ЕСК людини мали істотний ступінь епігенетичної стабільності, незважаючи на різниці в їхньому походженні та умовах культивування [111, 112]. Проте показано деякі варіації алельноспецифічної експресії імпринтованих генів у деяких проаналізованих лініях [111]. Зміни в експресії деяких імпринтованих генів також спостерігали, аналізуючи 59 клітинних ліній ЕСК людини із 17 лабораторій світу [112].

Узагальнення даних деяких повідомлень про виявлені зміни в ЕСК людини, які виникають при їхньому тривалому культивуванні *in vitro*, наведено в таблиці.

Висновки

Таким чином, клітинні лінії ссавців різного походження знайшли своє місце у найрізноманітніших дослідженнях сучасної науки, а також у біотехнології та медицині. Наприклад, клітини *in vitro* є цінними модельними системами для вивчення ембріогенезу, диференціації клітин, мутагенезу, канцерогенезу, вірусних інфекцій, для тестування нових лікарських або косметичних препаратів тощо [4, 5, 26–28, 35, 39].

Після відкриття СК, особливо ЕСК, їхніх властивостей та перспективи практичного застосування у різноманітних галузях медицини коло галузей застосування культур клітин ссавців значно розширилось [7, 8, 28, 40–42]. У клінічній практиці СК знайшли своє успішне використання при корекції імунodefіцитних станів після хіміотерапії та опромінення [44, 46, 47] та при лікуванні захворювань системи крові [43–45]. ЕСК завдяки здатності диференціюватися у будь-який тип клітин знаходять своє застосування у регенеративній

Таблиця. Деякі повідомлення про зміни ЕСК людини за тривалого культивування *in vitro*

Рік публікації	Проведений аналіз	Кількість досліджених ліній	Виявлені зміни, мутації	Джерело літератури
2004	Каріотипічний аналіз	5	Трисомія хромосоми 17 у трьох незалежних клітинних лініях ЕСК людини. Інотді спостерігали трисомію хромосоми 12. Поява хромосомних аберацій при тривалому культивуванні досліджених ліній ЕСК.	[88]
2004	Каріотипічний аналіз	17	На ранніх пасажах тільки 2 лінії мали інверсії, тоді як на пізніх (з 29-го) ще в 4 лініях спостерігали появу каріотипічних змін, трисомію хромосоми 12 та інверсії 2.	[89]
2005	Детальний генетичний і епігенетичний аналіз	9 (із різних лабораторій)	8 із 9 ліній ЕСК людини на пізніх пасажах (з 30-го) мали одну або більше змін у геномі, які зазвичай виявляють у пухлинах людини. Серед них зміни копій хромосом (45%), нуклеотидної послідовності мітохондріальної ДНК (22%) і метилювання промоторів (90%).	[3]
2006	Каріотипічний аналіз	15 (схвалених NIH)	При тривалому культивуванні спостерігали зміни каріотипу (трисомії хромосоми 17 та хромосомні аберації).	[90]
2007	Аналіз епігенетичної стабільності та експресії імпринтованих генів	46 (Міжнародна ініціатива стовбурових клітин)	Варіації алельно-специфічної експресії імпринтованих генів.	[111]
2007	Характеристика ліній ЕСК людини та аналіз експресії імпринтованих генів	59 (із 17 лабораторій світу)	Зміни в експресії деяких імпринтованих генів.	[112]
2007	Аналіз профілів метилювання ДНК понад 2000 геномних локусів	6	Міжлінійна епігенетична відстань. Стійке успадкування індукованих культивуванням змін (82.3–87.5%). Додаткова епігенетична нестабільність, спричинена безсириватковим культивуванням. 80.5% нестабільних локусів асоційовані із фенотипом пухлин.	[110]
2008	Молекулярний цитогенетичний аналіз	3	Хромосомні зміни при культивуванні без фідера двох ліній. Трисомії хромосоми 12 та хромосоми 14.	[95]

медицині та трансплантології [36, 40, 41, 49–51].

Нестабільність геному є однією із проблем культивованих *in vitro* клітин, яку найчастіше спостерігають. Виявлено, що клітини ссавців, у тому числі й стовбурові, при тривалому культивуванні накопичують генетичні та епігенетичні зміни [2–4, 88–90, 110–112], при цьому можуть змінюватися їхні характеристики, в тому числі й ті, заради яких вони підтримувалися у культурі [5].

Ці відкриття поставили дискусивні питання, чи можна застосовувати в терапії культивовані клітини, оскільки, на жаль, їх не можна зберігати інтактними та щоразу перевіряти на виникнення мутацій перед використанням, а також щодо можливих наслідків такої терапії, пошуку характеристик прогнозу генетичної стабільності клітинних популяцій та напрямку еволюції в умовах *in vitro*, розробки надійних критеріїв чистоти та стабільності клітинних ліній, стандартизації даних, а також необхідності постійного ретельного тестування отриманих культур.

Висловлюю щиру подяку к.б.н., с.н.с. Підпалій О.В. за критичний перегляд рукопису.

Перелік літератури

1. http://cordis.europa.eu/home_en.html
2. Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Iwano T., Lee J., Kazuki Y., Inoue K., Miki H., Takehashi M., Toyokuni S., Shinkai Y., Oshimura M., Ishino F., Ogura A., Shinohara T. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture // *Development*. – 2005. – Vol. 132, № 18. – P. 4155–4163.
3. Maitra A., Arking D.E., Shivapurkar N., Ikeda M., Stastny V., Kassaei K., Sui G., Cutler D.J., Liu Y., Brimble S.N., Noaksson K., Hyllner J., Schulz T.C., Zeng X., Freed W.J., Crook J., Abraham S., Colman A., Sartipy P., Matsui S., Carpenter M., Gazdar A.F., Rao M., Chakravarti A. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells // *Nat. Genet.* – 2005. – Vol. 37, № 10. – P. 1099–1103.
4. Никольский Н.Н., Габай И.А., Сомова Н.В. Эмбриональные стволовые клетки человека. Проблемы и перспективы // *Цитология*. – 2007. – Т. 49, № 7. – С. 529–537.
5. Мамаева С.Е. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре // *Цитология*. – 1996. – Т. 38, № 8. – С. 787–814.
6. Колотова Т.Ю., Волянский А. Ю., Кучма М.Ю., Дыбина Н.В., Стегний Б.Т. Нестабильность генома и эпигенетическое наследование эукариот. – Х.: Око, 2007. – 287 с.
7. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. – 1998. – Vol. 282, № 5391. – P. 1145–1147.
8. Rippon H.J., Bishop A.E. Embryonic stem cells // *Cell Prolif.* – 2004. – Vol. 37, № 1. – P. 23–34.
9. Hayflick L. The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation // *Exp Cell Res.* – 1961. – Vol. 23. – P. 14–20.
10. Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология: Пер. с нем. – М.: Мир, 1982. – В 3-х т. – Т. 3. – 344 с.
11. Strickland F.M., Pathak S., Multani A.S., Pelley R.P., Donawho C.K. Molecular characterization of new melanoma cell lines from C3H mice induced by ethanol plus ultraviolet radiation // *Cancer Research*. – 2003. – Vol. 63, № 13. – P. 3503–3510.
12. Reichelt J., Haase I. Establishment of spontaneously immortalized keratinocyte lines from wild-type and mutant mice // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 585. – P. 59–69.
13. Zornig M., Klett C., Lovac H., Hameister H., Winking H., Adolph S., Moroy T. Establishment of permanent wild-mouse cell lines with readily identifiable marker chromosomes // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1995. – Vol. 71, № 1. – P. 37–40.
14. Christie N.T., Sen P., Costa M. Chromosomal alterations in cell lines derived from mouse rhabdomyosarcomas induced by crystalline nickel sulfide // *Biol. Met.* – 1988. – Vol. 1, № 1. – P. 43–50.
15. Kraemer P.M., Travis G.L., Ray F.A., Cram L.S. Spontaneous neoplastic evolution of Chinese hamster cells in culture: multistep progression of phenotype // *Cancer Research*. – 1983. – Vol. 43, № 10. – P. 4822–4827.
16. Evans M.J., Kaufmann M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature*. – 1981. – Vol. 292, № 5819. – P. 154–156.
17. Resnick J.L., Bixler L.S., Cheng L., Donovan P.J. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture // *Nature*. – 1992. – Vol. 359, № 6395. – P. 550–551.

18. Shambloott M.J., Axelman J., Wang S., Bugg E.M., Littlefield J.W., Donovan P.J., Blumenthal P.D., Huggins G.R., Gearhart J.D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95, № 23. – P. 13726–13731.
19. Turnpenny L., Brickwood S., Spalluto C.M., Piper K., Cameron I.T., Wilson D.I., Hanley N.A. Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells // Stem Cells. – 2003. – Vol. 21, № 5. – P. 598–609.
20. Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1981. – Vol. 78, № 12. – P. 7634–7638.
21. Andrews P.W. Human teratocarcinomas // Biochim. Biophys. Acta. – 1988. – Vol. 948, № 1. – P. 17–36.
22. Marshak D.R., Gardner R.L., Gottlieb D. Stem Cell Biology. – Gold Spring Harbor: Laboratory Press, 2002. – 544 p.
23. Лищук В.А., Мосткова Е.В. Стволовые клетки: исследования и практика // Валеология. – 2003. – Т. 45, № 2. – С. 4–16.
24. Малайцев В.В., Богданов И.В., Сухих Г.Т. Современные представления о биологии стволовой клетки // Арх. патологии. – 2002. – Т. 64, № 4. – С. 7–11.
25. Бужиевская Т.И., Лукаш Л.Л., Вавилина И.В., Демидова Г.Г. Использование культуры соматических клеток млекопитающих в молекулярно-генетических исследованиях // Методы молекулярной биологии: Сборник научных трудов / Редкол.: Г.Х. Мацука (отв. ред.) и др. – К.: Наукова думка, 1979. – С. 222–250.
26. Фридлянская И.И., Швембергер И.Н. Получение и характеристика постоянной клеточной линии рабдомиосаркомы мышей С3Н // Цитология. – 1970. – Т. 12, № 6. – С. 798–804.
27. Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y., Trounso A., Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation *in vitro* // Nat. Biotechnol. – 2000. – Vol. 18, № 4. – P. 399–404.
28. Obinata M. The immortalized cell lines with differentiation potentials: their establishment and possible application // Cancer Sci. – 2007. – Vol. 98, № 3. – P. 275–283.
29. Яковлева А.Н., Федорцева Р.Ф., Крылова Т.Н., Фридлянская И.И., Швембергер И.Н. Цитогенетические изменения эксплантированной рабдомиосаркомы мыши при длительном культивировании // Цитология. – 1988. – Т. 30, № 6. – С. 726–731.
30. Nielsen K.V., Madsen M.W., Briand P. *In vitro* karyotype evolution and cytogenetic instability in the non-tumorigenic human breast epithelial cell line HMT-3522 // Cancer Genet. Cytogenet. – 1994. – Vol. 78, № 2. – P. 189–199.
31. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers // Nature. – 1998. – Vol. 396, № 6712. – P. 643–649.
32. Lou C.Y., Feng Y.M., Qian A.R., Li Y., Tang H., Shang P., Chen Z.N. Establishment and characterization of human hepatocellular carcinoma cell line FHCC-98 // World J. Gastroenterol. – 2004. – Vol. 10, № 10. – P. 1462–1465.
33. Guttenbach M., Steinlein C., Engel W., Schmid M. Cytogenetic characterization of the TM4 mouse Sertoli cell line. I. Conventional banding techniques, FISH and SKY // Cytogenet. Cell Genet. – 2001. – Vol. 94, № 1-2. – P. 71–78.
34. Сепреев В.А., Собко Ю.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии. – К.: Урожай, 1990. – 152 с.
35. Kong Q.L., Guan S., Guo B.H., Zeng M.S. Pre-malignant nasopharyngeal epithelial cell models // Chin J Cancer. – 2009. – Vol. 28, № 10. – P. 1012–1015.
36. Донцов В.И., Чернилевский В.Е. Пересадка эмбриональных клеток: новые возможности в биологии и медицине // Профилактика старения. – 2001. – Т. 7, № 4. – С. 31–41.
37. Osawa M., Hanada K., Hamada H., Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low negative hematopoietic stem cell // Science. – 1996. – Vol. 273, № 5272. – P. 242–245.
38. Мануилов Е.С., Арсеньева Е.Л., Хайдарова Н.В., Шугурова И.М., Горностаева С.Н., Иноземцева Л.С., Катруха А.М., Гривенников И.А., Тарантул В.З. Влияние регуляторных генов вируса иммунодефицита человека типа 1 на пролиферацию и дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши // Онтогенез. – 2003. – Т. 34, № 3. – С. 204–210.
39. Donato M.T., Lahoz A., Castell J.V., Gymez-Lechyn M.J. Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies // Curr. Drug Metab. – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 1–11.
40. Wang Sh., Gearhart J.D. Human pluripotent stem cells // Neo Reviews. – 2000. – Vol. 1, № 7. – E132–E136.
41. de Wert G., Mummery C. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy // Hum. Reprod. – 2003. – Vol. 18, № 4. – P. 672–682.
42. Lengerke C., Daley G.Q. Disease models from pluripotent stem cells // Ann. N Y Acad. Sci. – 2009. – Vol. 1176, Issue Hematopoietic Stem Cells VII. – P. 191–196.

43. Richards M., Huibregtse B.A., Caplan A.I., Goulet J.A., Goldstein S.A. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction // *J. Orthop. Res.* – 1999. – Vol. 17, № 6. – P. 900–908.
44. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications // *Stem Cells.* – 2001. – Vol. 19, № 3. – P. 180–192.
45. Keysser G., Müller L., Schendel M., Schmolli H.J. Therapeutic application of mesenchymal stromal cells in autoimmune disease: rationale and initial clinical experience // *Z. Rheumatol.* – 2009. – Vol. 68, № 3. – P. 220, 222–227.
46. Galotto M., Berisso G., Delfino L., Podesta M., Ottaggio L., Dallorso S., Dufour C., Ferrara G.B., Abbondandolo A., Dini G., Bacigalupo A., Cancedda R., Quarto R. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients // *Exp. Hematol.* – 1999. – Vol. 27, № 9. – P. 1460–1466.
47. Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W., Dyhouse S.M., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Lazarus H.M. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy // *J. Clin. Oncol.* – 2000. – Vol. 18, № 2. – P. 307–316.
48. Ahmad I. Stem cells: new opportunities to treat eye diseases // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2001. – Vol. 42, № 12. – P. 2743–2748.
49. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors // *Science.* – 1998. – Vol. 279, № 5356. – P. 1528–1530.
50. Koh C.J., Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2004. – Vol. 15, № 5. – P. 1113–1125.
51. Сухих Г.Т., Спивак Н.Я., Малайцев В.В. Мезенхимальные стволовые и прогениторные клетки: биологические свойства и перспективы использования // *Физиологический журнал.* – 2007. – Т. 53, № 1. – С. 62 – 76.
52. Poliard A., Nifuji A., Lamblin D., Plee E., Forest C., Kellerman O. Controlled conversion of an immortalized mesodermal progenitor cell towards the osteogenic, chondrogenic, or adipogenic pathways // *J. Cell Biol.* – 1995. – Vol. 130, № 6. – P. 1461 – 1472.
53. Ruhnke M., Ungefloren H., Zehle G., Bader M., Kremer B., Fändrich F. Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages // *Stem Cells.* – 2003. – Vol. 21, № 4. – P. 428–436.
54. Косенко О.О., Лукаш Л.Л., Самченко Ю.М., Рубан Т.А., Ульберг З.Р., Галаган Н.П. Штучний еквівалент шкіри на основі кополімерних гідрогелевих мембран з іммобілізованими мезенхімальними стовбуровими клітинами людини // *Біополім. і клітина.* – 2006. – Т. 23, № 6. – С. 446–451.
55. Фісталь Е.Ф., Попандопуло А.Г., Чеглаков Є.В. Порівняльна характеристика способів трансплантації культивованих фетальних фібробластів у лікуванні оплечених з дермальними опіками // *Вісник невідкладної і регенеративної медицини.* – Донецьк, 2008. – Том 9, № 3. – С. 265–267.
56. Kadiyala S., Young R.G., Thiede M.A., Bruder S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro* // *Cell Transplant.* – 1997. – Vol. 6, № 2. – P. 125–134.
57. Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A., Koo W.W., Gordon P.L., Neel M., Sussman M., Orchard P., Marx J.C., Pyeritz R.E., Brenner M.K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta // *Nat. Med.* – 1999. – Vol. 5, № 3. – P. 309–313.
58. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I.L., Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo* // *Nat. Med.* – 2000. – Vol. 6, № 11. – P. 1229–1234.
59. Griffith L.M., Cowan M.J., Kohn D.B., Notalangelo L.D., Puck J.M., Schultz K.R., Buckley R.H., Eapen M., Kamani N.R., O'Reilly R.J., Parkman R., Roifman C.M., Sullivan K.E., Filipovich A.H., Fleisher T.A., Shearer W.T. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for primary immune deficiency diseases: current status and critical needs // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 122, № 6. – P. 1087–1096.
60. Toyooka Y., Tsunekawa N., Akasu R., Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100, № 20. – P. 11457–11462.
61. Clarke D.L., Johansson C.B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlström H., Lendahl U., Frisén J. Generalized potential of adult neural stem cells // *Science.* – 2000. – Vol. 288, № 5471. – P. 1660–1663.
62. Kondo T., Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells // *Science.* – 2000. – Vol. 289, № 5485. – P. 1754–1757.

63. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons // *J. Neurosci. Res.* – 2000. – Vol. 61, № 4. – P. 364–370.
64. Moritoh Y., Yamoto E., Yasui Y., Miyazaki S., Miyazaki J. Analysis of insulin-producing cells during *in vitro* differentiation from feeder-free embryonic stem cells // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52, № 5. – P. 1163–1168.
65. Orlic D., Hill J.M., Arai A.E. Stem cells for myocardial regeneration // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 91, № 12. – P. 1092–1102.
66. Stamm C., Westphal B., Kleine H.D., Petzsch M., Kittner C., Klinge H., Schümichen C., Nienaber C.A., Freund M., Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration // *Lancet.* – 2003. – Vol. 361, № 9351. – P. 45–46.
67. Смирнов В.Н. Стволовые клетки для сердца // *Российские медицинские вести.* – 2007. – Т. 12, № 2. – С. 80–86.
68. Ambartsumyan G., Clark A.T. Aneuploidy and early human embryo development // *Hum. Mol. Genet.* – 2008. – Vol. 17, R1. – P. R10–15.
69. Catalina P., Bueno C., Montes R., Nieto A., Ligerero G., Sanchez L., Jara M., Rasillo A., Orfao A., Cigudosa J., Hovatta O., Greaves M., Menendez P. Genetic stability of human embryonic stem cells: a first-step toward the development of potential hESC-based systems for modeling childhood leukemia // *Leuk. Res.* – 2009. – Vol. 33, № 7. – P. 980–990.
70. Gearhart J. New human embryonic stem-cell-lines – more is better // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 350, № 13. – P. 1275–1276.
71. Henderson J.K., Draper J.S., Baillie H.S., Fisher S., Thomson J.A., Moore H., Andrews P.W. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens // *Stem Cells.* – 2002. – Vol. 20, № 4. – P. 329–337.
72. Rajagopalan H., Lengauer C. Aneuploidy and cancer // *Nature.* – 2004. – Vol. 432, № 7015. – P. 338–341.
73. Kops G.L., Weaver B.A., Cleveland D.W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint // *Nat. Rev. Cancer.* – 2005. – Vol. 5, № 10. – P. 773–85.
74. Оленов Ю.М. Клеточная наследственность, дифференцировка и канцерогенез как проблемы эволюционной генетики. – Л.: Наука, 1967. – 308 с.
75. Оленов Ю.М. Проблемы молекулярной генетики. – Л.: Наука, 1977. – 206 с.
76. Вахтин Ю.Б. Генетическая теория клеточных популяций. – Л.: 1980. – 168 с.
77. Burholt D.R., Shackney S.E., Ketterer D.M., Pollice A.A., Smith C.A., Brown K.A., Giles H.R., Schepart B.S. Karyotypic evolution of a human undifferentiated large cell carcinoma of the lung in tissue culture // *Cancer Res.* – 1989. – Vol. 49, № 12. – P. 3355–3361.
78. Hozier J., Lindquist L., Hurwitz R., LeBien T., Kersey J. Evolution of cultured leukemic cell lines monitored by chromosomal and immunologic analysis // *Int. J. Cancer.* – 1980. – Vol. 26, № 3. – P. 281–284.
79. Nielsen K.V., Briand P. Cytogenetic analysis of *in vitro* karyotype evolution in a cell line established from nonmalignant human mammary epithelium // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 1989. – Vol. 39, № 1. – P. 103–118.
80. 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. – Vol. 142, № 1. – P. 36–45.
81. Balaban G.B., Herlyn M., Clark W.H. Jr., Nowell P.C. Karyotypic evolution in human malignant melanoma // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 1986. – Vol. 19, № 1-2. – P. 113–122.
82. Elliot B.E., Xu W., Mudrik K., Marshall J., Veke-mans 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. – Vol. 4, № 4. – P. 281–289.
83. Tyrkus M., Diglio C.A., Gohle N. Karyotype evolution in a transformed rat cerebral endothelial cell line // *Int. J. Cancer.* – 1983. – Vol. 32, № 4. – P. 485–490.
84. Cairns J. Somatic stem cells and the kinetics of mutagenesis and carcinogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, № 16. – P. 10567–10570.
85. Cervantes R.B., Stringer J.R., Shao C., Tischfield J.A., Stambrook P.J. Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, № 6. – P. 3586–3590.
86. 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. – P. 321–328.
87. 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. – Vol. 11, № 3. – P. 445–452.

88. Draper J.S., Smith K., Gokhale P., Moore H.D., Maltby E., Johnson J., Meisner L., Zwaka T.P., Thomson J.A., Andrews P.W. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 22, № 1. – P. 53–54.
89. Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zuckerman J.P., Wang S., Morton C.C., McMahon A.P., Powers D., Melton D.A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 350, № 13. – P. 1353–1356.
90. 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.
91. Crolla J.A., Brown D., Whittingham D.G. Spontaneous induction of an homologous robertsonian translocation, Rb(11.11) in a murine embryonic stem cell line // *Genet. Res.* – 1990. – Vol. 55, № 2. – P. 107–110.
92. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Підпала О.В., Вагіна І.М., Кочубей Т.П. Одержання нових ліній стовбурових клітин миші і впливу впливу мікрооточення на їхню каріотипічну мінливість *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений. – 2006. – Т. 38, № 2 (присвячений 100-річчю С.М. Гершензона). – С. 144–152.
93. Яцишина А.П., Підпала О.В., Кочубей Т.П., Лукаш Л.Л. Цитогенетичний аналіз спонтанно іморталізованої клітинної лінії G1 миші // Біополімери і клітина. – 2006. – Т. 22, № 4. – С. 299–306.
94. Imreh M.P., Gertow K., Cedervall J., Unger C., Holmberg K., Szöke K., Csöreghe L., Fried G., Dillber S., Blennow E., Ahrlund-Richter L. *In vitro* culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells. // *J. Cell. Biochem.* – 2006. – Vol. 99, № 2. – P. 508–516.
95. Catalina P., Montes R., Ligerio G., Sanchez L., de la Cueva T., Bueno C., Leone P.E., Menendez P. 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. – P. 76.
96. Liu X., Wu H., Loring J., Hormuzdi S., Disteche C.M., Bornstein P., Jaenisch R. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission // *Dev. Dyn.* – 1997. – Vol. 209, № 1. – P. 85–91.
97. Rosler E.S., Fisk G.J., Ares X., Irving J., Miura T., Rao M.S., Carpenter M.K. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions // *Dev. Dyn.* – 2004. – Vol. 229, № 2. – P. 259–274.
98. Heins N., Englund M.C., Sjöblom C., Dahl U., Tønning A., Bergh C., Lindahl A., Hanson C., Semb H. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells // *Stem Cells.* – 2004. – Vol. 22, № 3. – P. 367–376.
99. Caisander G., Park H., Frej K., Lindqvist J., Bergh C., Lundin K., Hanson C. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines prolonged *in vitro* culture // *Cromosome Res.* – 2005. – Vol. 14, № 2. – P. 131–137.
100. Suemori H., Yasuchika K., Hasegawa K., Fujioaka T., Tsuneyoshi N., Nakatsuji N. Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 345, № 3. – P. 926–932.
101. Park J.I., Yoshida I., Tada T., Takagi N., Takahashi Y., Kanagawa H. Trisomy 8 does not affect differentiative potential in a murine parthenogenetic embryonic stem cell line // *Jpn. J. Vet. Res.* – 1998. – Vol. 46, № 1. – P. 29–35.
102. Глазко Т.Т., Межевикина Л.М., Бойко А.А., Фесенко Е.Е. “Цепная” каріотипическая эволюция эмбриональных стволовых клеток линии R1 *in vitro* // Цитология. – 2005. – Т. 47, № 8. – С. 679–685.
103. Iles S.A., Evans E.P. Karyotype analysis of teratocarcinomas and embryoid bodies of C3H mice // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1977. – Vol. 38. – P. 77–91.
104. Raz R., Lee C.K., Cannizzaro L.A., d'Eustachio P., Levy D.E. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96, № 6. – P. 2846–2851.
105. Kishimoto T. Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130 // *Stem Cells.* – 1994. – Vol. 12 (Suppl. 1). – P. 37–44.
106. 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. – Vol. 19, № 21. – P. 2548–2556.
107. Ko M.S., Kitchen J.R., Wang X., Threat T.A., Wang X., Hasegawa A., Sun T., Grahovac M.J., Kargul G.J., Lim M.K., Cui Y., Sano Y., Tanaka T., Liang Y., Mason S., Paonessa P.D., Sauls A.D., DePalma G.E., Sharara R., Rowe L.B., Eppig J., Morrell C., Doi H. Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development // *Development.* – 2000. – Vol. 127, № 8. – P. 1737–1749.
108. Uhlmann F. Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 13, № 6. – P. 754–761.
109. Lefort N., Feyeux M., Bas C., Féraud O., Bence-Griscellis A., Tachdjian G., Peschanski M., Perrier A.L. Human embryonic stem cells reveal re-

- current genomic instability at 20q11.21 // Nat. Biotechnol. – 2008. – Vol. 26, № 12. – P. 1364–1366.
110. Allegrucci C., Wu Y.Z., Thurston A., Denning C.N., Priddle H., Mummery C.L., Wardvan Oostwaard D., Andrews P.W., Stojkovic M., Smith N., Parkin T., Jones M.E., Warren G., Yu L., Brena R.M., Plass C., Young L.E. Restriction landmark genome scanning identifies culture-induced DNA methylation instability in the human embryonic stem cell epigenome // Hum. Mol. Genet. – 2007. – Vol. 16, № 10. – P. 1253–1268.
111. Rugg-Gunn P.J., Ferguson-Smith A.C., Pedersen R.A. Status of genomic imprinting in human embryonic stem cells as revealed by a large cohort of independently derived and maintained lines // Hum. Mol. Genet. – 2007. – Vol. 16, spec. № 2. – P. R243–251.
112. International Stem Cell Initiative, Adewumi O., Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L., Amit M., Andrews P.W., Beighton G., Bello P.A., Benvenisty N., Berry L.S., Bevan S., Blum B., Brookings J., Chen K.G., Choo A.B., Churchill G.A., Corbel M., Damjanov I., Draper J.S., Dvorak P., Emanuelsson K., Fleck R.A., Ford A., Gertow K., Gertsenstein M., Gokhale P.J., Hamilton R.S., Hampl A., Healy L.E., Hovatta O., Hyllner J., Imreh M.P., Itskovitz-Eldor J., Jackson J., Johnson J.L., Jones M., Kee K., King B.L., Knowles B.B., Lako M., Lebrin F., Mallon B.S., Manning D., Mayshar Y., McKay R.D., Michalska A.E., Mikkola M., Mileikovsky M., Minger S.L., Moore H.D., Mummery C.L., Nagy A., Nakatsuji N., O'Brien C.M., Oh S.K., Olsson C., Otonkoski T., Park K.Y., Passier R., Patel H., Patel M., Pedersen R., Pera M.F., Piekarczyk M.S., Pera R.A., Reubinoff B.E., Robins A.J., Rossant J., Rugg-Gunn P., Schulz T.C., Semb H., Sherrer E.S., Siemen H., Stacey G.N., Stojkovic M., Suemori H., Szatkiewicz J., Turetsky T., Tuuri T., van den Brink S., Vintersten K., Vuoristo S., Ward D., Weaver T.A., Young L.A., Zhang W. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative // Nat. Biotechnol. – 2007. – Vol. 25, № 7. – P. 803–816.

Представлено В.А. Кунахом.
Надійшла 11.01.2010.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ *IN VITRO*

А.П. Яцишина

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Украина, 03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150
e-mail: a.p.iatsyshyna@imb.org.ua

Клеточные линии млекопитающих, в том числе и линии стволовых клеток человека, широко ис-

пользуются в различных фундаментальных исследованиях, биотехнологии и регенеративной медицине. Целью данного обзора был анализ литературных данных о нестабильности генома популяций культивированных *in vitro* клеток. Показано, что клеточные линии млекопитающих, в том числе и стволовые, накапливают при длительном культивировании генетические и эпигенетические изменения, что поднимает дискуссионные вопросы о возможности использования культивированных клеток в регенеративной медицине и последствиях такой терапии, о необходимости постоянного тщательного их тестирования и др.

Ключевые слова: клеточные линии млекопитающих, стволовые клетки, генетическая нестабильность, эпигенетическая нестабильность.

GENETIC INSTABILITY OF MAMMALIAN CELLS *IN VITRO*

A.P. Iatsyshyna

Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo Str., 150
e-mail: a.p.iatsyshyna@imb.org.ua

The mammalian cell lines, including lines of human stem cells, are widely used in different fundamental investigations, biotechnology and regenerative medicine. The aim of the given review was the analysis of the research data on genomic instability of *in vitro* cultivated cell populations. The mammalian cell lines, including stem cells, were shown to accumulate the genetic and epigenetic changes during long-term *in vitro* culture that raises debatable questions about expediency of using the cultivated cells in regenerative medicine and possible consequences of such therapy, as well as the necessity for constant careful testing of cells etc.

Key words: mammalian cell lines, stem cells, genetic instability, epigenetic instability.