

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію **Кушнірук Вероніки Олегівни**  
«Каріотипічна еволюція стовбурових клітин дорослої людини  
нової лінії 4BL при адаптації до умов *in vitro*»,  
представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук  
за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

**Актуальність теми дисертаційної роботи.** Роботу сучасних дослідницьких біологічних та біотехнологічних лабораторій важко уявити без використання іморталізованих клітинних ліній. Проте більшість з них представлена раковими чи штучно іморталізованими клітинними лініями за допомогою методів генної інженерії. Тому виникає потреба створення нових клітинних ліній, отриманих із нормальних тканин дорослої людини без використання чужорідного генетичного матеріалу – і в роботі отримано таку клітинну лінію 4BL із клітин периферійної крові здорового дорослого донора з використанням спеціального середовища, що містить складний комплекс ростових факторів і цитокінів. В процесі адаптації клітинних ліній до умов *in vitro* та тривалого культивування відбуваються суттєві перебудови їхнього каріотипу із зміною регуляції багатьох генів, що впливає на результати досліджень. Відповідно, необхідне ретельне дослідження мінливості каріотипу клітинних ліній в динаміці на різних етапах культивування.

**Метою роботи** дисертанта було дослідження каріотипічної еволюції, молекулярно-генетичних, морфологічних і ростових особливостей нової клітинної лінії 4BL при її адаптації до умов культивування *in vitro*.

**Загальна характеристика роботи.** Дисертація побудована за класичною схемою і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини, що має два підрозділи, розділу, присвяченому аналізу та узагальненню отриманих результатів, висновків і додатків. Список використаних джерел літератури охоплює 411 найменувань. Роботу викладено на 214 сторінках та гарно проілюстровано 47 рисунками та 8 таблицями.

У розділі 1 «Огляд літератури» описано види доступних клітинних ліній, включаючи ракові, штучно імуорталізовані, первинні, різні типи стовбурових та основні способи їх отримання. Другий основний підрозділ присвячено аналізу доступних даних літератури щодо каріотипічної еволюції різних видів клітинних ліній людини і тварин *in vitro* та *in vivo*.

У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» чітко, з достатньою повнотою описано отримання основного об'єкта, клітинної лінії, а також всі використані методи досліджень. У роботі застосовано цілий арсенал методів цитогенетики, молекулярної генетики і клітинної біології: рутинне та диференційне забарвлення хромосом з подальшим каріотипуванням, FISH-аналіз, матричну порівняльну геномну гібридизацію – *array CGH*, виділення РНК, синтез кДНК, ПЛР в реальному часі, Вестерн-блот аналіз, культивування та диференціювання клітин *in vitro*, проточну цитофлуориметрію та інші.

Результати експериментальних досліджень викладені у двох розділах – 3 і 4. Розділ 3 присвячено детальному аналізу морфологічних, імунофенотипічних ростових характеристик та перевірці стовбурового потенціалу клітин лінії 4BL на різних пасажах культивування.

У розділі 4, найбільшому за об'ємом, викладено результати детальних досліджень змін каріотипу та молекулярно-генетичних характеристик популяції клітин лінії 4BL на різних етапах культивування.

У розділі 5 «Аналіз і узагальнення результатів дослідження» автор провела порівняльний аналіз еволюцію каріотипу нової стовбурової лінії клітин людини 4BL із стовбуровими та раковими клітинними лініями і виявила такі закономірності: втрата статевої хромосоми при тривалому культивуванні, а також поліплоїдизацію частини популяції клітин на пізніх пасажах. Особливістю клітинної лінії 4BL є її імуорталізація при походженні із нормальних тканин дорослого донора, унікальний комплекс хромосомних аберацій та збереження біядиплоїдного модального класу (42-43 хромосоми) протягом більше десяти років у культурі. Обговорено всі основні результати роботи, отримані за допомогою різних методів, та виявлено їхнє узгодження

між собою. Автор зазначає можливі сфери застосування нової стовбурової клітинної лінії 4BL як модельного об'єкту: для дослідження процесів адаптації клітин до нових умов мікрооточення, регресивної еволюції, процесів мінливості каріотипу протягом тривалого культивування.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалась в рамках бюджетних наукових тем відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Особливості експресії репаративного ензиму O<sup>6</sup>-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази в умовно нормальних та пухлинних клітинних лініях» (номер державної реєстрації 0108U008526, 2009 – 2013 рр.), та «Регуляція експресії гена репаративного ензиму MGMT під впливом деяких біологічно активних речовин (гормонів, цитокінів, лектинів та ін.) у клітинах ссавців», (№ державної реєстрації 0115U000355, 2014-2018 рр.), а також у двох наукових проектах, одержаних на конкурсній основі: «Альтернативні моделі для тестування клітинних препаратів на онкогенність» (№ державної реєстрації 0114U003877, 2014-2016 рр.), який фінансується відділенням цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при НАН України і «Розробка методу одержання біотехнологічних раневих покриттів для подальшого використання в медицині» (№ Договору 33/2015, 2015-2019 рр., № державної реєстрації 0115 U 001358).

**Наукова новизна одержаних результатів.** У роботі комплексно досліджено особливості каріотипічної еволюції, молекулярно-генетичних, морфологічних, імунофенотипічних та ростових характеристик нової клітинної лінії 4BL, отриманої із периферійної крові здорового дорослого донора, при адаптації до умов тривалого культивування *in vitro*.

Вперше визначено, що клітинна лінія 4BL складається з двох типів клітин: фібробластоподібні та епітеліоподібні. Відмічено, що клітини формують на поверхні культурального посуду колові та напівколові асоціації, характерні для ендотеліальних клітин. Стовбуровий потенціал лінії 4BL підтверджено диференціацією клітин в три типи тканин: кісткову, жирову,

м'язову. За допомогою проточної цитофлуориметрії вперше визначено імунотип клітин лінії 4BL: CD105+CD73+CD90-CD45-CD34-CD14-, за яким, вони, ймовірно за все, належать до мезенхімальних негемопоетичних стовбурових клітин.

Іморталізацію клітин лінії 4BL доведено експресією теломерази на різних етапах культивування.

В результаті проведеного цитогенетичного аналізу виявлено домінування біядиплоїдного модального класу із каріотипом 42-43 хромосоми протягом більше 10 років культивування клітинної лінії 4BL. Визначено основні структурні аберації хромосом: t(1;11)(q12;p15), der(2)(p11~12), t(5;15)(q10;p10), t(12;15)(p10;q10), t(16;21)(q13;p11) та шість маркерних хромосом, які за даними FISH-аналізу містять деривати 4-ї та 17-ї хромосом, що може стати штрих-кодом клітинної лінії 4BL при її паспортизації.

За допомогою array CGH детектовано ультраструктурні аберації каріотипу: це дуплікації хромосом 2, 10, 16, 19 та делеції хромосом 4, 10, 12, 13, 17, X, які сформувалися до 120-го пасажу і надалі підтримуються популяцією клітин лінії 4BL. Біоінформатично проаналізовано можливу селективну роль генів, які містяться в ділянках даних перебудов. Досліджено, що більшість виявлених перебудов є мозаїчними і клітинна лінія 4BL зберігає певну гетерогенність популяції, що дозволить іншим клонам клітин вижити при зміні умов культивування. Відмічено, що клітинна лінія 4BL адаптувалась до стандартних умов культивування *in vitro* з характерними їй морфологією, ростовими властивостями та комплексом хромосомних перебудов, і дія стабілізуючого добору спрямована на їхнє підтримання. Проте при зміні умов культивування – обробці стрес-фактором на етапі стабілізації каріотипу – відбувається повторне зростання хромосомної нестабільності і добір змінюється на рушійний.

Підсумовуючи результати, отримані за допомогою різних методів, автором висловлено гіпотезу про хвилеподібний характер каріотипічної еволюції.

**Практичне значення одержаних результатів.** У роботі отримано нову стовбурову клітинну лінію 4BL із периферійної крові здорового дорослого донора без використання чужорідного генетичного матеріалу з метою вивчення змін каріотипу клітин при адаптації до умов тривалого культивування *in vitro*. Клітинна лінія 4BL може бути цінним модельним об'єктом для широкого спектру досліджень генетики, молекулярної та клітинної біології, особливо в якості умовно нормального контролю до злоякісних чи іморталізованих методами генної інженерії клітинних ліній. Наукові результати роботи можуть становити інтерес для науково-дослідних установ та бути використані при проведенні лабораторно-практичних робіт і викладанні лекційних курсів з дисциплін «Генетика», «Генетика популяцій» та «Молекулярна біологія клітин» для студентів біологічних факультетів.

**Теоретичне значення результатів досліджень.** Результати комплексних досліджень суттєво розширюють і доповнюють існуючі уявлення стосовно еволюції каріотипу соматичних клітин людини при адаптації до нових умов існування *in vitro*. Вперше на прикладі нової клітинної лінії 4BL продемонстровано особливості каріотипічних, молекулярно-генетичних, морфологічних і ростових характеристик, що притаманні стовбуровим клітинам дорослої людини, які отримані шляхом репрограмування дорослих соматичних клітин без використання чужорідного генетичного матеріалу. Показано, що додаткове внесення в клітинну культуру стрес-чинника (висока йонна сила середовища) змінює стабілізуючий добір стандартних умов культивування на рушійний і спричиняє нову хвилю зростання геномної нестабільності. Автором запропоновано гіпотезу хвилеподібної каріотипічної еволюції.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Дисертант опрацювала величезний масив літератури – 411 джерел, що дало змогу поставити невирішені питання та сформулювати мету роботи, а в подальшому порівняти отримані експериментальні дані з даними літератури.

Для вирішення поставлених завдань автор використовує сучасні і класичні методи молекулярної генетики, цитогенетики та цитології: порівняльна геномна гібридизація array CGH, FISH-аналіз, G-banding з каріотипуванням хромосом, виділення РНК, синтез кДНК, ПЛР в реальному часі, Вестерн-блот аналіз, культивування та диференціювання клітин *in vitro*, імунофенотипування та інші. Важливо, що отримані експериментальні дані, отримані одним методом, не лише доповнюються іншим, але й узгоджуються з ним. Наприклад, при цитогенетичному аналізі регулярно детектували шість маркерних хромосом та моносомію за хромосомою X, відсутність одного або двох гомологів пар хромосом 10 і 13, а також моносомію хромосом 4, 8, 11, 15, 17 та 21. Виявилось, що «відсутній» гомолог пар хромосом 11, 15 і 21 переважно приймав участь у транслокаціях:  $t(1;11)(q12;p15)$ ,  $t(5;15)(q10;p10)$ ;  $t(12;15)(p10;q10)$ ,  $t(16;21)(q13;p11)$ . Маркерні хромосоми, вірогідно, були результатом складних перебудов та містили генетичних матеріал інших хромосом, за якими спостерігали моносомію. Це підтвердилось при використанні FISH-аналізу: одна з невеликих метацентричних хромосом без гетерохроматину була делецією довгого плеча 4 хромосоми –  $del(4)(q24qter)$ , невеликий субметацентрик має матеріал довгих плеч 17 хромосоми –  $t(17;?)(q12;?)$ . В свою чергу, це підтверджується результатами array CGH: при використанні цього методу детектували велику делецію довгого плеча 4-ї хромосоми та делецію довгого плеча 17-ї хромосоми.

Достовірність результатів досліджень підтверджується відповідною статистичною обробкою. Варто зазначити, що в залежності від типу даних, автор використовує різні статичні показники: стандартну похибку середнього значення, Т-тест для незалежних вибірок даних, хі-квадрат, коефіцієнт кореляції Пірсона тощо. Висновки роботи сформульовано відповідно до отриманих експериментальних результатів.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.** Матеріали дисертації опубліковано у 17 наукових працях: 9 статтях, серед яких 7 статей у фахових рецензованих виданнях та 8 тезах

доповідей міжнародних та вітчизняних конференцій. Наукові праці дисертанта містять основні наукові результати та висновки дисертаційної роботи. Основні положення дисертації знайшли логічне і обґрунтоване викладення в авторефераті.

Зауважень принципового характеру в мене немає. Серед незначних недоліків можна відмітити дрібні недоліки друкування, які при ретельному відношенні автора до оформлення роботи все ж таки зустрічаються.

Для дискусії та уточнення окремих положень, висунутих автором, хотілось би почути думку дисертанта з приводу хвилеподібного характеру каріотипічної еволюції та які фактори мали найбільше значення для формування основних властивостей клітинної лінії 4BL?

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.**

Вважаю, що за актуальністю, науковим значенням, обсягом та рівнем виконаних досліджень, практичною цінністю, рецензована дисертаційна робота «Каріотипічна еволюція стовбурових клітин дорослої людини нової лінії 4BL при адаптації до умов *in vitro*», є завершеною науковою працею, яка виконана на сучасному науково-методичному рівні, та цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Кушнірук Вероніка Олегівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент:

доцент кафедри медичної та лабораторної генетики

Національної медичної академії

післядипломної освіти імені П.Л. Шупика

кандидат біол. наук, доцент



С. В. Подольська  
 С. В. Подольська  
 12.10.2018