

УДК 576.31+576.5+57.085.2

СТОВБУРОВИЙ ПОТЕНЦІАЛ НОВОЇ ЛІНІЇ КЛІТИН ЛЮДИНИ 4BL

В.О. КУШНІРУК¹, В.А. ШАБЛІЙ², С.П. ШПИЛЬОВА¹, Т.П. РУБАН¹, О.О. ПІВЕНЬ¹,
Г.С. ЛОБИНЦЕВА², Л.Л. ЛУКАШ¹¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
e-mail: kushniruk_v_o@ukr.net²Інститут клітинної терапії
Україна, 03680, Київ, проспект Космонавта Комарова, 3

При отриманні клітинної лінії дослідників у першу чергу цікавлять такі характеристики як морфологія та імунотип, що дозволяє визначити приналежність клітин до того чи іншого типу та відповідно, окреслити галузі її застосування. **Метою** даної роботи було перевірити стовбуровий потенціал нової лінії клітин людини 4BL, яку отримано з периферійної крові здорового донора та дослідити її імунотип. **Методи.** Застосовували стандартні методи культивування, тест у напіврідкому агарі; стовбуровий потенціал перевіряли диференціюванням у жирову, кісткову і м'язову тканини. Імунотип клітин було проаналізовано на проточному цитофлуориметрі BD FACS Aria. **Результати.** Клітини лінії 4BL формують колонії, подібні до ембріоїдних тіл при вирощуванні у напіврідкому агарі, та здатні диференціюватися в остеогенному, адипогенному та міогенному напрямі при вирощуванні в індукційних середовищах. Понад 90 % популяції клітин лінії 4BL експресують маркери стовбурових клітин CD105 і CD73 та є негативними за маркерами гемопоетичних СК С90, CD45, CD34 і CD14. Також дані клітини не експресують маркер Oct 4. **Висновки.** Нова лінія клітин людини 4BL має стовбуровий потенціал та, ймовірно за все, належить до мультипотентних негемопоетичних стовбурових клітин.

Ключові слова: клітинна лінія, стовбурові клітини, ембріоїдні тільця, диференціювання, цитофлуориметрія.

Вступ. Пильна увага вчених протягом останніх десятирічь прикута до вивчення та застосування стовбурових клітин (СК) [1]. Цей інтерес легко пояснити, оскільки стовбурові клітини визнані одним із трьох основних проривів світу за минуле століття і відкривають небачені досі можливості. В першу чергу СК застосовуються у клінічній практиці для лікування: захворювань системи крові, серцево-судинної системи [2], імунodefіцитних станів після хіміотерапії і опромінення, раку [3], печінки [4], міодистрофій [5] та пошкоджень суглобів і кісток [6], інсульту, паркінсонізму [7], цукрового діабету [8] тощо. Проте цим використанням СК далеко не обмежується. Надзвичайно перспективним напрямком є розробка та тестування лікарських засобів [9, 10], що надає можливість на початкових етапах тестування обійтись без залучення лабораторних тварин та дозволяє економічно оптимізувати дослідження. Однак не все так бездоганно. Робота з ембріональними СК потребує дозволу біоетичної комісії [11], первинні культури, виділені з дорослого організму, незважаючи на стовбуровий потенціал, часто мають обмежений проліферативний потенціал або ростуть досить повільно, що потребує багато часу для напрацювання значної кількості матеріалу.

У нашій лабораторії отримано кілька клітинних ліній: SK-1 із фібробластів шкіри, CB-1 із пуповинної крові, що культивуються понад 50 пасажів, та найперспективніша лінія 4BL, отримана із периферійної крові здорового дорослого донора, яка успішно пододала ліміт Хейфліка та культивується понад 220 пасажів (більше 8 років) [12]. Проте при тривалому культивуванні відбуваються генетичні та епігенетичні зміни, тому клітинна лінія 4BL не пропонується для клінічного використання, проте вона чудово підходить як клітинна модель для тесту-

© В.О. КУШНІРУК, В.А. ШАБЛІЙ, С.П. ШПИЛЬОВА, Т.П. РУБАН, О.О. ПІВЕНЬ, Г.С. ЛОБИНЦЕВА, Л.Л. ЛУКАШ, 2016

вання ліків, нами вже розпочато спільний проект з відділом біомедичної хімії ІМБіГ по розробці та тестуванню можливих модулаторів активності репаративного ензиму MGMT. Клітини лінії 4BL гарно проліферують, тож можливе отримання великої кількості матеріалу, а також є менш вимогливими до складу середовища, що дає переваги над роботою з первинними культурами клітин. Етап становлення клітинної лінії з певними властивостями із гетерогенної популяції первинної культури та адаптація до умов культивування супроводжуються зміною модального числа каріотипу, значними перебудовами цілих хромосом, що тягне за собою зміну експресії численних генів, включаючи онкогени й онкосупресори. Раніше проведені нами дослідження каріотипічної еволюції в динаміці [13, 14] свідчать, що клітинна лінія 4BL вже пройшла етап становлення і нині знаходиться на етапі стабілізації та зберігає біядиплоїдний модальний клас, що робить її перспективною для використання як моделі. Особливості морфології клітинної лінії 4BL (здатність формувати колові асоціації, що нагадують кров'яні острівці), утворення ембріодних тілець у напіврідкому агарі [15], її походження з периферійної крові, а також значний час відтворення без явних ознак кризи та старіння дає підстави передбачити стовбуровий потенціал у цієї популяції клітин. Доведення (чи спростування) наявності стовбурового потенціалу у клітинної лінії 4BL може змістити акценти її використання як модельної клітинної лінії. Тому метою даної роботи стала перевірка наявності стовбурового потенціалу у нової лінії клітин людини 4BL, а також дослідження її поверхневих маркерів за допомогою проточної цитофлуориметрії, що дасть можливість визначити імунотип клітин.

Матеріали і методи

У роботі використовували нову лінію клітин 4BL, яка отримана із периферійної крові здорово донора. Початково клітини вирощували на фідері мітотично інактивованих фібробластів людини, оброблених мітоміцином С у концентрації 10–20 мкг/мл, та культивували з додаванням цитокінів LIF, SCF і IL-3 по 2 нг/мл кожного і 30 % середовища, кондиційованого ембріональними гермінативними клітинами людини [12]. Згодом відбирали клони клітин, які швидко росли та культивували їх як

моношарову культуру у стандартному середовищі DMEM («Sigma», США) із додаванням 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, та 10 % ембріональної сироватки теляти [16].

Для морфологічних досліджень клітини вирощували на малих чашках Петрі (d=3 см), при досягненні субконфлуентного (subconfluent) моношару середовище відбирали, клітини промивали двічі-тричі PBS та забарвлювали 1 % розчином нейтрального червоного та фотографували на мікроскопі Primo Star «Carl Zeiss» за допомогою програми Axio Vision.

Вивчали здатність клітин рости без прикріплення до субстрату, культивуючи лінію 4BL у напіврідких середовищах: 0,3 % агарі та 1,4 % метилцелюлозі. Для попередження прикріплення клітин до скла, дно посуду покривали 0,6 % агаром.

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

Імунофенотип клітин проаналізовано на проточному цитофлуориметрі BD FACS Aria (BD, USA) з анти-CD34 APC, анти-CD90 FITC, анти-CD45, APC-Cy7, анти-CD73 PE, анти-CD14 Pacific Blue (BD, USA) антитілами.

Результати та обговорення

Клітинна лінія 4BL складається з двох основних морфологічних типів клітин: більш розпластаних епітеліоподібних та більш витягнутих фібробластоподібних клітин, також наявні круглі клітини, що діляться (рис. 1). Детальніше морфологію клітинної лінії 4BL та її отримання розглянуто раніше [12, 15].

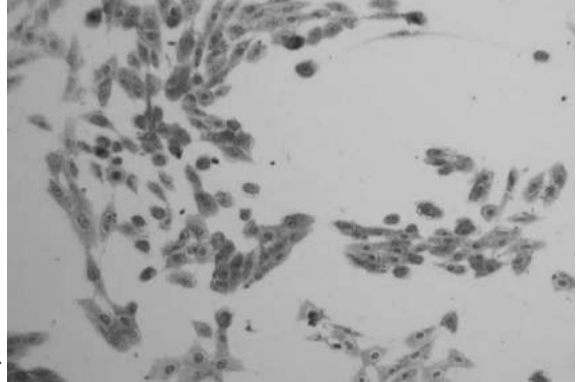
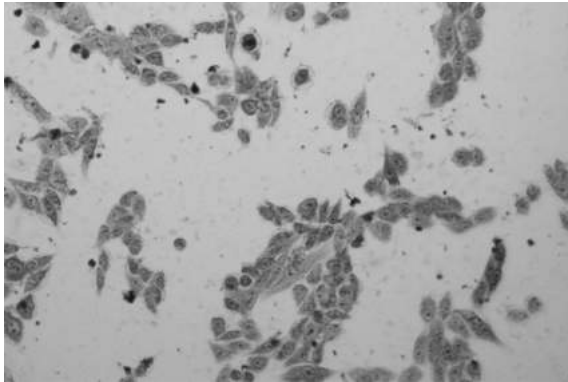


Рис. 1. Морфологія клітин лінії 4BL: а – 127 пасаж, б – 158 пасаж. Забарвлення нейтральним червоним. 150х

При культивуванні клітин даної лінії увагу привернув той факт, що клітини часто формують колові та напівколові асоціації. Також раніше ми вважали, що клітини лінії 4BL не здатні до багат шарового росту, проте виявилось, що при відсутності пересіву, але за вчасної зміни середовища, клітини здатні формувати кільк шарові колонії. Цікавим є те, що вони часто нагадують кровотворні острівки: нижній моношар клітин формує підложку, на якій формується кільк шаровий бугорок округлої форми, який інколи навіть має отвір всередині [15]. Даний факт, ймовірно за все, вказує на стовбуровий потенціал отриманої з периферійної крові клітинної лінії 4BL, тому для початку вирішили перевірити здатність даної лінії рости без прикріплення до субстрату у напіврідких середовищах, оскільки відомо, що плюрипотентні стовбурові клітини та мультипотентні кровотворні клітини здатні рости у суспензії.

Виявили, що клітини лінії 4BL здатні рости без прикріплення до субстрату, формуючи у напіврідкому агарі красиві округлі колонії, що нагадували ембріодні тіла (рис. 2).

Перевіряли здатність формувати колонії даного типу також на проміжних пасажах між двома наведеними та більш пізніх – на всіх досліджених пасажах така здатність зберігалась. У напіврідкій метилцелозі (МЦ) клітини лінії 4BL формували колонії значно більшого розміру, утворюючи часто велетенські агрегати (рис. 3), що пов'язано із самою схемою досліду: клітини, які вирощували на чашках із МЦ регулярно підживлювали, в той час як клітини, висіяні на чашки з агаром вирощували як є, не додаючи нові порції середовища.

Тест у напіврідкому агарі є неоднозначним і може вказувати як на наявність стовбурового потенціалу у клітинній лінії, так і на її малігнізацію у процесі культивування, оскільки здатність рости в

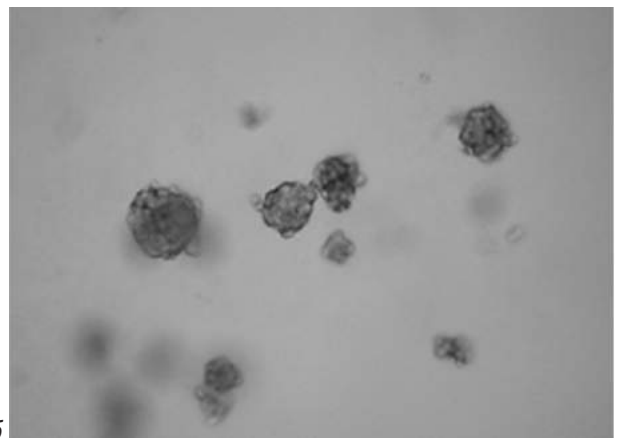
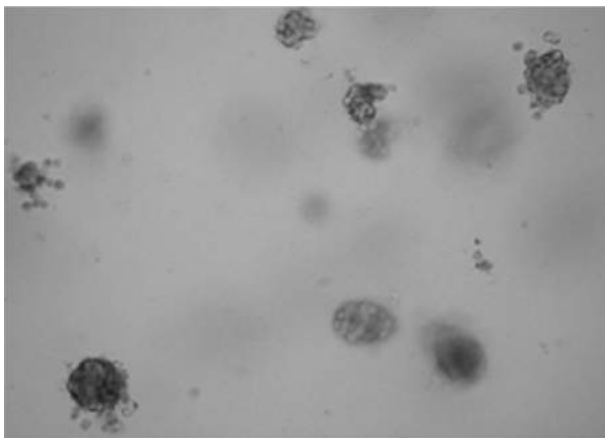


Рис. 2. Колонії клітин лінії 4BL, подібні до ембріодних тіл, що вирости у напіврідкому агарі 0,3 %: а – 124 пасаж, б – 196 пасаж. 150х

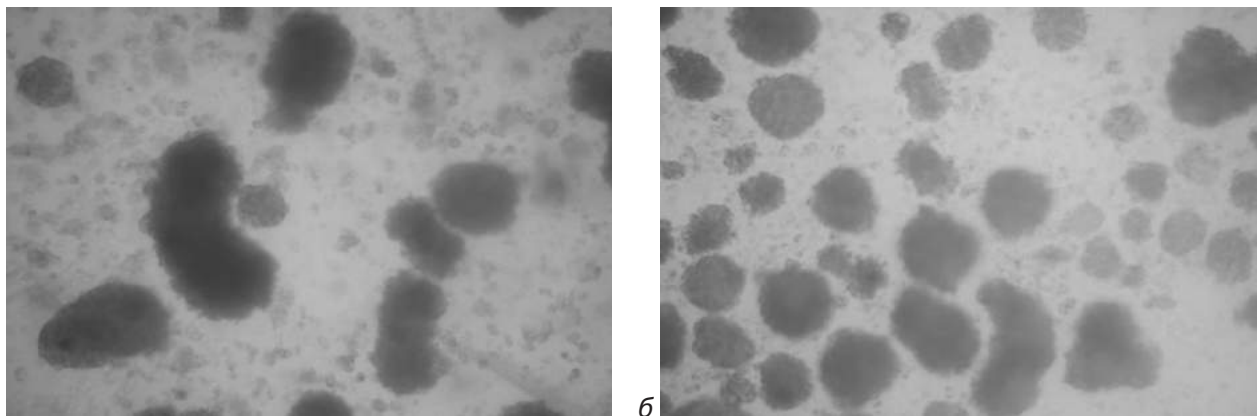


Рис. 3. Величезні колонії клітин лінії 4BL, які виростили у напіврідкому середовищі з метилцелюлозою 1,4 %: а – 124 пасаж, б – 196 пасаж. 150х

напіврідкому середовищі мають як деякі злоякісні клітини [17], так і плюрипотентні стовбурові клітини, а також мультипотентні стовбурові кровотворні клітини [18].

Тому наступним етапом нашої роботи стала перевірка стовбурового потенціалу клітинної лінії 4BL шляхом диференціювання клітин в адипогенному, остеогенному та міогенному напрямках. Дослідні клітини вирощували в спеціальних індукційних середовищах, контрольні – у звичайному середовищі DMEM.

Клітини, які спрямовували до диференціювання у кісткову тканину, а також контрольні забарвлювали 0,5 % розчином алізаринового червоного для виявлення мінералізованого кісткового матриксу (рис. 4). Несподіваним виявилось те, що

контрольні клітини також забарвлювались, проте меншою мірою. Це свідчить про можливість спонтанного диференціювання клітин лінії 4BL та потребу подальшого дослідження.

Для виявлення жирових включень при диференціюванні клітин в адипогенному напрямку забарвлювали їх Нільським червоним (рис. 5). Спостерігали подібну ситуацію, що і з диференціюванням у кісткову тканину: контрольні клітини також накопичували жирові гранули, проте в значно меншій кількості, в даному випадку це може бути нормою, оскільки більшість клітин різних типів у незначній кількості мають запасні включення.

Показано здатність клітин 4BL диференціюватись у м'язевому напрямку при культивуванні в

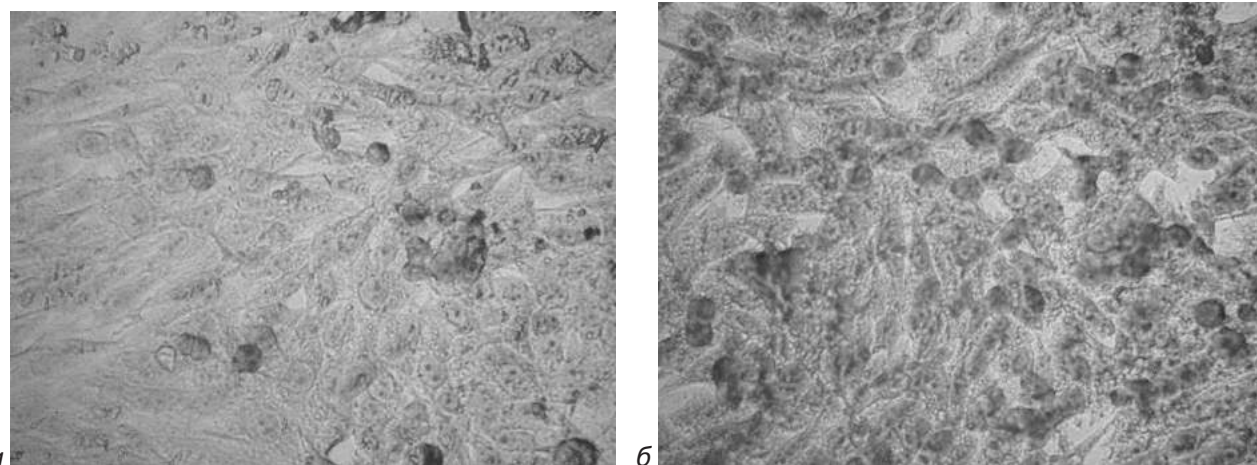


Рис. 4. Диференціювання клітин лінії 4BL 129-го пасажу у кісткову тканину. Червоне забарвлення алізариновим червоним вказує на осередки мінералізованого матриксу: а – контрольні клітини, б – дослідні. 400х

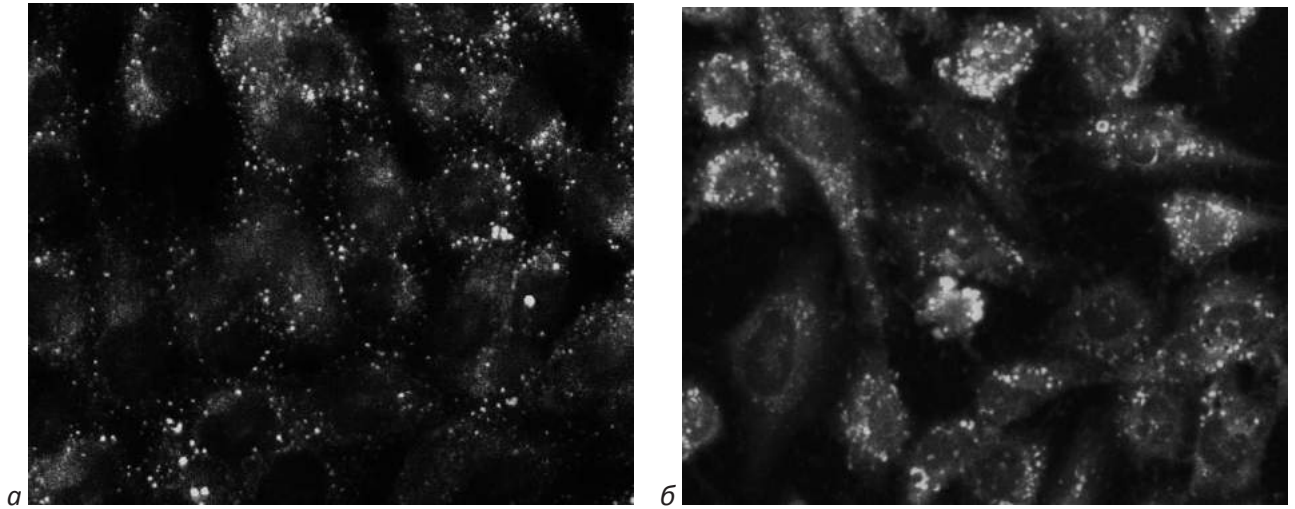


Рис. 5. Диференціювання клітин лінії 4BL 129-го пасажу в адипогенному напрямі, флуоресцентний мікроскоп. Жирові гранули забарвлені Нільським червоним в жовтий колір, ядра підфарбовані Ноехст: *а* – контроль, *б* – дослідні клітини. 1000х

спеціальному кардіоміогенному середовищі з додаванням активіну А та bFGF (рис. 6).

Отже, виявлено здатність клітин лінії 4BL диференціюватись в три типи тканин: кісткову, жирову та м'язеву, що доводить стовбуровий потенціал даної клітинної лінії. Але постає питання: які особливості надають популяції клітин лінії 4BL такі можливості? Тому вирішили дослідити імунотип цієї популяції клітин на проточному цитофлуориметрі BD FACS Aria, використовуючи в першу чергу анти-

тіла до тих білків клітинної поверхні, які загально-визнані як маркери СК.

Визначено, що клітини лінії 4BL є позитивними за маркерами CD73+ і CD105+, що є характерними для мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) і є негативними за маркером CD90 (рис. 7).

У той же час, клітини негативні за гемопоетичними маркерами CD34- і CD45-, таким чином, вони не належать до гемопоетичних стовбурових клітин. Також клітини лінії 4BL є негативними за мар-

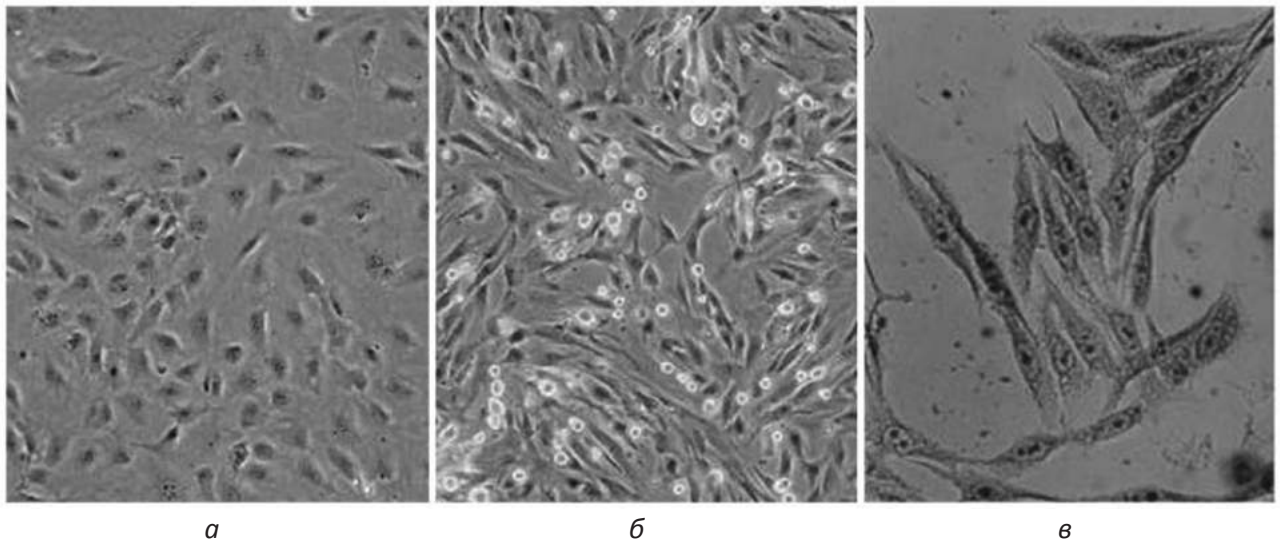


Рис. 6. Диференціювання клітин лінії 4BL у напрямку м'язевої тканини: *а* – фібробласти лінії 3ТЗ, 150х; *б* – міобласти лінії СЗН, незабарвлено, 150х; *в* – клітинна лінія 4BL, 600х, PAS-реакція на глікоген

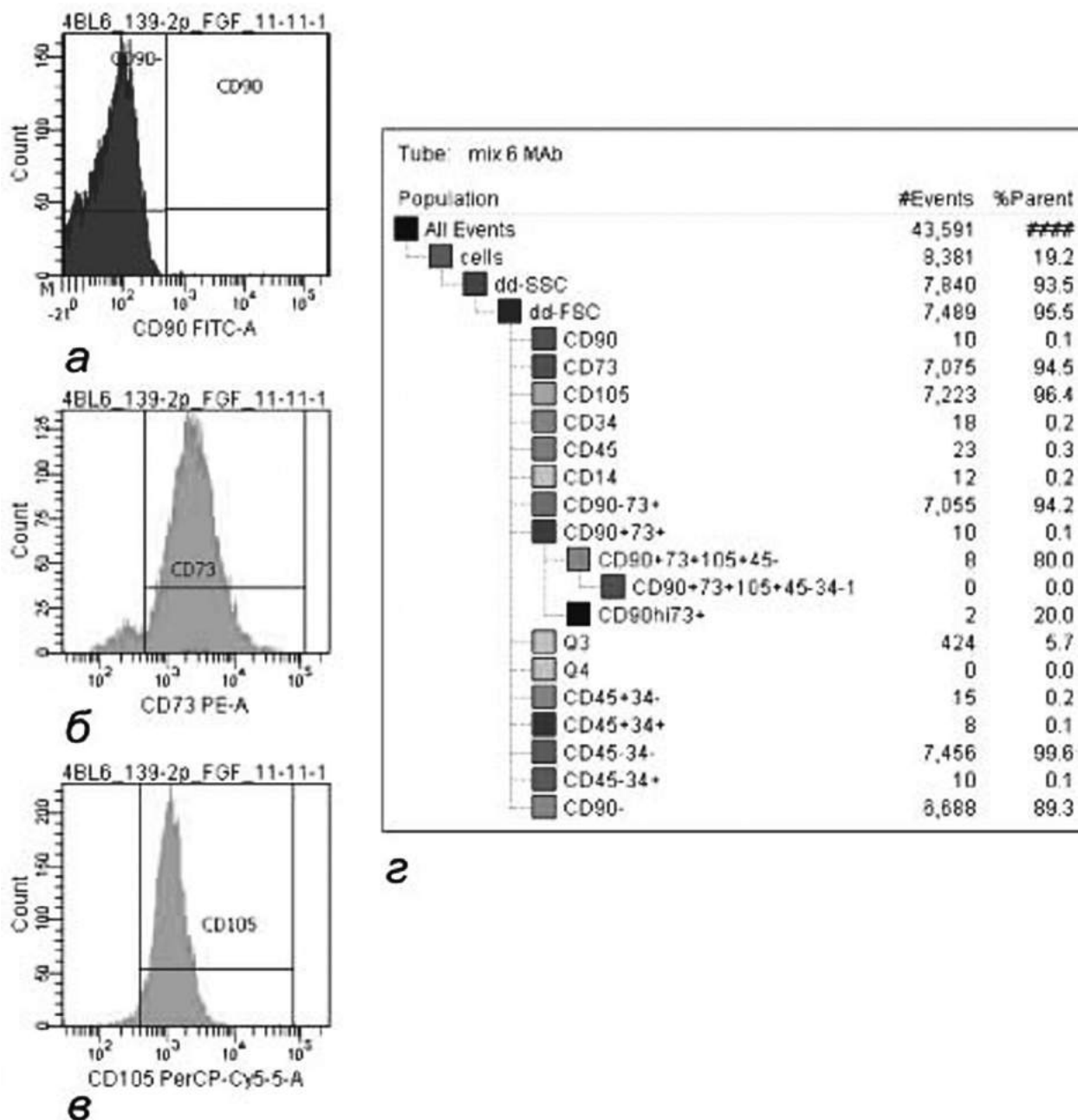


Рис. 7. Розподіл субпопуляцій клітин лінії 4BL на 139 пасажі за маркерами стовбурових клітин: а – CD90, б – CD73, в – CD105, з – загальний імунофенотип клітинної лінії 4BL за маркерами стовбурових і гемопоетичних клітин (CD14, CD34, CD45). Аналіз виконано на проточному цитофлуориметрі BD FACS

кером Oct4-, що є гарною ознакою, оскільки цей білок характерний лише для ЕСК, плюрипотентних СК та заново експресується в ракових клітинах [19, 20].

Розглянемо детальніше популяцію клітин лінії 4BL за маркерами. Кількість клітин, у яких експресується CD73 склала 94,5 %, а CD105 – 96,4 %. Маркер CD73 використовується як один із маркерів ме-

зенхімальних стовбурових клітин, зокрема, їхнього лімфатичного диференціювання [21, 22]. CD105 є одним із маркерів мезенхімальних стовбурових клітин, у великій кількості експресується в ендотеліальних клітинах [23]. Отже, експресія обох маркерів CD73 і CD105 дозволяє віднести популяцію клітин лінії 4BL до МСК, що підтверджується їхньою здатністю формувати структури, подібні на кров'яні острівки при звичайному культивуванні, ембріодні тіла при культивуванні в напіврідких середовищах (агарі та метилцелюлозі), а також здатністю диференціюватися в жирову, кісткову та м'язеву тканини.

Клітини лінії 4BL є негативними за CD90, CD34, CD45 і CD14: відсоток клітин, де виявлено ці маркери є вкрай низьким: 0,1 %, 0,2 %, 0,3 % і 0,2 % відповідно. Популяція клітин CD90-CD73+ становила 94,2 %, а CD90+CD73+ всього 0,1 % клітин, з яких 80 % мали CD90+CD73+CD105+CD45- фенотип, а 20 % CD90hiCD73+.

CD 90 або Thy-1 cell surface antigen належить до родини імуноглобулінів, та використовується як маркер МСК в основному лімфатичного гемопоетичного спрямування [24], отже, клітини лінії 4BL, які є негативними за маркером CD90, можуть належати до некровотворної фракції МСК. Зараз з'являються відомості, що МСК не обов'язково повинні бути позитивними за маркером CD90 [25]. Показано наявність двох популяцій клітин CD90+ і CD90- серед мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин плаценти [26].

У 99,6 % випадків клітини були одночасно негативні за маркерами CD45 і CD34. Клітини з фенотипом CD45+ CD34- становили 0,2 %, позитивні одночасно за двома маркерами (фенотип CD45+ CD34+) – лише 0,1 %, клітини з фенотипом CD45- CD34+ також склали 0,1 %. CD34 експресується у субпопуляції МСК, гемопоетичних СК, ендотеліальних клітинах, мастоцитах [27]. CD 45 є критичним регулятором у антигенному рецепторному сигналіngu T і B клітин, тож початково маркер CD45 називали звичайний антиген лейкоцитів (LCA – leukocyte common antigen) [28]. CD 14 експресується переважно макрофагами, нейтрофілами і дендритними клітинами [29]. Більшість авторів схиляється до думки, що маркери CD14, CD34 і CD45 є характерними для більш комітованих гемопоетичних клітин і класичні МСК мають бути негативними за цими

маркерами, що ми й спостерігаємо на прикладі клітинної популяції лінії 4BL.

Висновки

При культивуванні клітини лінії 4BL часто формують колові та напівколові асоціації, а при багаточаровому рості утворюють формування, що нагадують кров'яні острівки. При вирощуванні у напіврідкому агарі клітини дають початок колоніям, подібним до ембріодних тілець. Стовбуровий потенціал клітин лінії 4BL підтверджено їхньою здатністю диференціюватись в адипогенному, остеогенному та міогенному напрямках. За результатами проточної цитофлуориметрії, клітини лінії 4BL є позитивними за маркерами стовбурових клітин CD105+ і CD73+ та негативними за маркерами гемопоетичних стовбурових клітин CD90, CD45, CD34 і CD14; також клітини не експресують маркер Oct4, який характерний для ембріональних або злоскісних клітин. Отже, популяція клітин лінії 4BL ймовірніше за все належить до мультипотентних стовбурових негемопоетичних клітин.

Перелік літератури

1. Tong Z., Solanki A., Hamilos A. et al. Application of biomaterials to advance induced pluripotent stem cell research and therapy // *EMBO J.* – 2015. – Vol. 34, No. 8. – P. 987–1008.
2. Chen A., Ting S., Seow J., Reuveny S., Oh S. Considerations in designing systems for large scale production of human cardiomyocytes from pluripotent stem cells // *Stem. Cell Res.* – 2014. – Vol. 5, No. 1. – P. 1–12.
3. Ramdasi S., Sarang S., Viswanathan C. Potential of mesenchymal stem cell based application in cancer // *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* – 2015. – Vol. 9, No. 2. – P. 95–103.
4. Hu C., Li L. Two effective routes for removing lineage restriction roadblocks: from somatic cells to hepatocytes // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16, No. 9. – P. 20873–20895.
5. Périé S., Trollet C., Mouly V. et al. Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study // *Mol. Ther.* – 2014. – Vol. 22, No. 1. – P. 219–225.
6. Feng R., Lengner C. Application of stem cell technology in dental regenerative medicine // *Adv. Wound Care (New Rochelle).* – 2013. – Vol. 2, No. 6. – P. 296–305.
7. Han F., Barenberg D., Gao J. et al. Development of stem cell-based therapy for Parkinson's disease // *Transl. Neurodegener.* – 2015. – Vol. 4, No. 16. – P. 1–13.
8. Reznika A., Bruin J.E., Arora P. et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells // *Nat. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 2, No. 11. – P. 1121–1133.
9. Giri S., Bader A. A low-cost, high-quality new drug discovery process using patient-derived induced pluripotent stem cells // *Drug Discov. Today.* – 2015. – Vol. 20, No. 1. – P. 37–49.
10. Khetani S.R., Berger D.R., Ballinger K.R. et al. Microengineered liver tissues for drug testing // *World J. Stem Cells.* – 2015. – Vol. 7, No. 2. – P. 461–469.

11. King N.M., Perrin J. Ethical issues in stem cell research and therapy // *Stem Cell Res. Ther.* – 2014. – Vol. 5, No. 4. – P. 85.
12. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Кушнірук В.О., Підпала О.В. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К: Логос. – 2011. – Т. 11. – С.493–498.
13. Акопян Г.Р., Гулеюк Н.Л., Кушнірук В.О., Микитенко Д.М., Яцишина А.П., Лукаш Л.Л. Порівняльний аналіз каріотипу нової лінії клітин людини 4ВL в умовах тривалого культивування. I. Плоїдність хромосомного набору // *Цитология и генетика.* – 2013. – Т. 47, № 5. – С. 55 – 69.
14. Macewicz L.L., Kushniruk V.O., Iatsyshyna A.P. et al. Correlation the level of mutagenesis with expression of reparative enzyme O6-methylguanin DNA methyltransferase (MGMT) during establishment of cell lines *in vitro* // *Biopolymers and cell.* – 2013. – Vol. 29, No. 6. – P. 485 – 492.
15. Кушнірук В.О., Рубан Т.П., Лукаш Л.Л. Морфологічні та ростові особливості нової лінії клітин людини 4ВL // Фактори експериментальної еволюції організмів – К: Логос. – 2013. – Т. 13. – С. 315–319.
16. Freshney R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications, 6th ed. – New Jersey, USA. – 2010. – 796 p.
17. Hamburger A.W. The human tumor clonogenic assay as a model system in cell biology // *Int. J. Cell Cloning.* – 1987. – Vol. 5, No. 2. – P. 89–107.
18. Amiri F., Halabian R., Salimian M. et al. Induction of multipotency in umbilical cord-derived mesenchymal stem cells cultivated under suspension conditions // *Cell Stress Chaperones.* – 2014. – Vol. 19, No. 5. – P. 657–666.
19. Atlasi Y., Mowla S.J., Ziaee S.A., Bahrami A.R. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer // *Int. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 120, No. 7. – P. 1598–1602.
20. Wang D., Lu P., Zhang H. et al. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients // *Oncotarget.* – 2014. – Vol. 5, No. 21. – P. 10803–10815.
21. Ode A., Schoon J., Kurtz A. et al. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells // *Eur. Cell Mater.* – 2013. – Vol. 25. – P.37–47.
22. Chatterjee D., Tufa D.M., Baehre H. et al. Natural killer cells acquire CD73 expression upon exposure to mesenchymal stem cells // *Blood.* – 2014. – Vol. 123, No. 4. – P. 594–595.
23. Kays S.K., Kaufmann K.B., Abel T. et al. CD105 is a surface marker for receptor-targeted gene transfer into human long-term repopulating hematopoietic stem cells // *Stem Cells Dev.* – 2015. – Vol. 24, No. 6. – P. 714–723.
24. Rege T.A., Hagood J.S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20, No. 8. – P. 1045–1054.
25. Boxall S.A., Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells // *Stem Cells Int.* – 2012. – ID 975871. – 12 p.
26. Shablii V. A., Kuchma M. D., Kyryk V. M. et al. Mesenchymal and trophoblast immunophenotype of multipotent stromal cells from human placenta // *Biopolym. Cell.* – 2014. – Vol. 30, No. 2. – P. 118–121.
27. Kwon S.M., Lee J.H., Lee S.H. et al. Cross talk with hematopoietic cells regulates the endothelial progenitor cell differentiation of CD34 positive cells // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, No. 8. – e106310.
28. Cyster J.G., Healy J.I., Kishihara K. et al. Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45 // *Nature.* – 1996. – Vol. 381, No. 6580. – P. 325–328.
29. Tarzi R.M., Liu J., Schneider S. et al. CD14 expression is increased on monocytes in patients with anti-neutrophil cytoplasm antibody (ANCA)-associated vasculitis and correlates with the expression of ANCA autoantigens // *Clin. Exp. Immunol.* – 2015. – Vol. 181, No. 1. – P. 65–75.

Представлено В.А. Кунахом
Надійшла 18.01.2016

СТВОЛОВОЙ ПОТЕНЦИАЛ НОВОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА 4BL

В.О. Кушнирук¹, В.А. Шаблій², С.П. Шпилевая¹,
Т.П. Рубан¹, О.А. Пивень¹, Г.С. Лобынцева², Л.Л. Лукаш¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН
Украины
Украина, 03143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150
e-mail: kushniruk_v_o@ukr.net

²Институт клеточной терапии
Украина, 03680, Киев, проспект Космонавта Комарова, 3

При получении клеточной линии исследователей, в первую очередь, интересует морфология и иммунофенотип, что позволяет отнести клетки к тому или иному типу и соответственно, определить отрасли ее использования. **Целью** данной работы было проверить стволочной потенциал новой линии клеток человека 4BL, которая получена из периферийной крови здорового донора и изучить ее иммунофенотип. **Методы.** Использовали стандартные методы культивирования, тест в полужидком агаре. Стволочной потенциал проверяли дифференцировкой в жировую, костную и мышечную ткани. Иммунофенотип клеток проанализировали на проточном цитофлюориметре BD FACS Aria (USA). **Результаты.** Клетки линии 4BL формируют колонии, подобные эмбриоидным телам при выращивании в полужидком агаре и способны дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и миогенном направлении при выращивании в индукционных средах. Более 90 % популяции клеток линии 4BL экспрессируют маркеры стволочных клеток CD105 и CD73 и негативны по маркерам гемопоэтических СК CD90, CD45, CD34 и CD14. Также данные клетки не экспрессируют маркер Oct 4. **Выводы.** Новая линия клеток человека 4BL имеет стволочной потенциал и, вероятнее всего, принадлежит к мультипотентным негемопоэтическим стволочным клеткам.

Ключевые слова: клеточная линия, эмбриоидные тельца, стволочные клетки, дифференцировка, цитофлюориметрия.

STEM POTENTIAL OF THE NEW HUMAN CELL LINE 4BL

V.O. Kushniruk¹, V.A. Shablii², S.P. Shpylevaya¹, T.P. Ruban¹,
O.O. Piven¹, G.S. Lobyntseva², L.L. Lukash¹

¹ Institute of molecular biology and genetics of NAS of
Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 150
e-mail: kushniruk_v_o@ukr.net

² Institute of Cell Therapy
Ukraine, 03680, Kyiv, Kosmonavta Komarova Ave., 3

During development of the new cell line researchers are primarily interested in such characteristics as morphology and immunophenotype, which allows to define a type of cells and accordingly to outline branches of it application. The **aim** of this research was to determine the stem potential of the new cell line 4BL, which was obtained from peripheral blood of healthy donor and to investigate its immunophenotype. **Methods.** The standard cells cultivation and the soft agar test were used. Stem potential was checked by differentiation in the adypogenic, osteogenic and myogenic directions. Immunophenotype of the cells was analyzed by flow cytometry on BD FACS Aria. **Results.** The 4BL cell line form colonies similar to embryoid bodies when growing in the soft agar and reveal a capability to differentiate into adypogenic, osteogenic and myogenic tissues in the induction mediums. Over 90% of the 4BL line cell population express stem cell markers CD105 and C73 and are negative for the hemopoietic cells markers CD90, CD45, C34 and CD14. Also these cells don't express Oct 4. **Conclusions.** The new human stem cell line has stem potential and, the most likely, belongs to non-hemopoietic multipotent stem cells.

Keywords: cell line, embryoid bodies, stem cells, differentiation, flow cytometry.