

УДК 576.53:575.224.23

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА РАЗЛИЧНЫХ ПАССАЖАХ У КРЫС ЛИНИИ WISTAR

Канд. биол. наук Е. А. Омельченко*, В. Е. Кульшин*, Е. С. Зарубенко*,
С. Г. Панибратцева, А. С. Забирник

Харьковская медицинская академия последипломного образования,
*ООО фирма «Вирола»

С целью определения параметров безопасности применения проведено изучение количества хромосомных aberrаций в клетках стромы костного мозга (КСКМ) и определение наличия нестабильности генома на различных пассажах у крыс линии Wistar. В результате исследования было установлено, что с увеличением пассажей количество aberrантных хромосом и геномных нарушений увеличивается. Микросателлитной нестабильности генома обнаружено не было.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ НА РІЗНИХ ПАСАЖАХ У ЩУРІВ ЛІНІЇ WISTAR

Канд. біол. наук О. А. Омельченко*,
В. Е. Кульшин*, О. С. Зарубенко*,
С. Г. Панібратцева, А. С. Забірник

З метою визначення параметрів безпеки застосування проведено дослідження кількості хромосомних aberrаций у клітинах стромы кісткового мозку та вивчення нестабільності генома на різних пассажах у щурів лінії Wistar. У результаті дослідження було виявлено, що зі збільшенням пасажів кількість aberrантных хромосом і геномних порушень збільшується. Микросателітної нестабільності генома виявлено не було.

COMPARATIVE CYTOGENETIC ANALYSIS OF BONE MARROW STROMAL CELLS AT DIFFERENT PASSAGE IN THE WISTAR RAT

E. A. Omelchenko*, V. E. Kulshin,
E. S. Zarubenko*, S. G. Panibrattseva,
A. S. Zabirnik

We have analyzed chromosomal aberrations in bone marrow stromal cells (BMSC), where we detected genomic instability in early and late passages in the rat of Wistar. Cytogenetic analysis of BMSC after each passage (0-6) revealed increasing number of aberrant chromosomes and genomic disorders. Microsatellite genomic instability in 0 and 6 passages wasn't detected by PCR method.

В настоящее время научно-исследовательский интерес многих ученых обращен к проблеме получения, характеристики и дальнейшего применения стволовых клеток (СК) различных видов животных и человека. Возможность СК дифференцироваться в различные типы клеток является чрезвычайно привлекательной для развития биомедицинских технологий. Одним из видов стволовых клеток, вызывающих особый интерес, являются клетки стромы костного мозга (КСКМ), поскольку возможность использовать аутологичные клетки решает проблему гистонесовместимости и иммунного отторжения [7].

Цитогенетическое исследование стволовых клеток — один из важных этапов контроля,

позволяющий определить генетическую стабильность клеточных линий. Недостаточное для терапевтических целей число КСКМ требует их наращивания в культуре (пассирование). Согласно данным ряда исследований, при увеличении объема клеточной массы появляются клетки с нарушениями хромосомного набора, дающие впоследствии аномальные клеточные линии, применение которых в терапии недопустимо, поскольку генетические нарушения могут инициировать злокачественное перерождение [3].

Цель работы — изучение количества хромосомных aberrаций, геномных нарушений и определение нестабильности генома на различных пассажах у крыс линии Wistar.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовались белые крысы (самцы) линии Wistar. В качестве тест-объекта использовались стромальные клетки костного мозга крыс. Все опыты на животных выполнены согласно Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [6].

Перед процедурой получения костного мозга животные декапитировались под легким эфирным наркозом. Костный мозг выделяли из берцовых костей лабораторных крыс, промывая их раствором Хэнкса (Sigma, США). Полученную суспензию костного мозга отмывали и рассеивали по 5–10 млн на культуральный сосуд площадью 25 см² (Nunc, США) в смеси культуральных сред DMEM и F12 (1:1) (Sigma, США) с 10 % фетальной бычьей сывороткой (Sigma, США) и 40 мг/мл гентамицина сульфата (Arterium, Украина). Культивировали при 37°C в атмосфере 5 % CO₂ в CO₂-инкубаторе. Через 24 ч добавляли свежую порцию среды и продолжали культивировать еще 10–12 сут., меняя среду каждые 3 сут. Для посева культуры использовали раствор трипсина и ЭДТА. Первый посев проводили через 7 сут., далее культуру пересеивали каждые 5–7 сут. с исходной плотностью 1,27×10³ клеток/см². После каждого пассажа (0–6) для части культуры КСКМ проводили хромосомный анализ, а оставшиеся клетки пересеивали в другой флакон, для того чтобы провести аналогичный анализ после следующего пассажа (рис. 1).

Получение метафазных пластинок производилось по стандартной методике [5]. В качестве блокатора митотического деления использовали раствор колхицина 0,5 мкг/мл, который добавляли непосредственно в культуральные флаконы и инкубировали при температуре 37 °С в течение 2 ч. Для получения клеточной суспензии обрабатывали культуральные

флаконы с культурой клеток раствором трипсина, затем раствором Версена. Препараты окрашивали с помощью набора «Лейкодиф 200» (LDF 200). Анализ препаратов проводили под световым микроскопом PZO WARSZAWA SK 14 24805 с масляной иммерсией при увеличении 100×10.

Подсчитывалось общее количество хромосом (в норме у крыс линии Wistar — 42 хромосомы). Объем исследования составил 400 метафазных пластинок, на каждый пассаж (0–6) исследовано от 43-х до 71-й метафазных пластинок. Учет хромосомных aberrаций проводили согласно общепринятым требованиям [4]. Регистрировали весь спектр aberrаций хромосом (А Хр), которые распознавались в aberrантных клетках (А Кл). В качестве aberrаций хромосомного типа регистрировали дицентрические хромосомы (Диц), указывая на наличие/отсутствие сопутствующих фрагментов (Фр) и свободные ацентрические хромосомные фрагменты (Ац Фр). Среди aberrаций хроматидного типа определяли хроматидные пробылы (Хт Пб) и изохроматидные делеции (Ихт Дел). К геномным нарушениям (ГН) относили неабerrантные и aberrантные полиплоиды (Ппл) и анеуплоиды (Анпл).

Обнаружение микросателлитной нестабильности генома проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Объем исследуемого материала для выделения ДНК — 1 мкл клеточной суспензии. В качестве положительного контроля использовали клеточную культуру, в среду инкубации которой был добавлен известный мутаген — этидий бромид — в концентрации 1 мкг/мл. Выделение ДНК проводили с помощью набора «ДНК-сорб-А» (НИИ эпидемиологии, Москва). ПЦР проводили по стандартной схеме на программируемом термоциклере «Терцик-2» фирмы ДНК. Микросателлитную нестабильность определяли

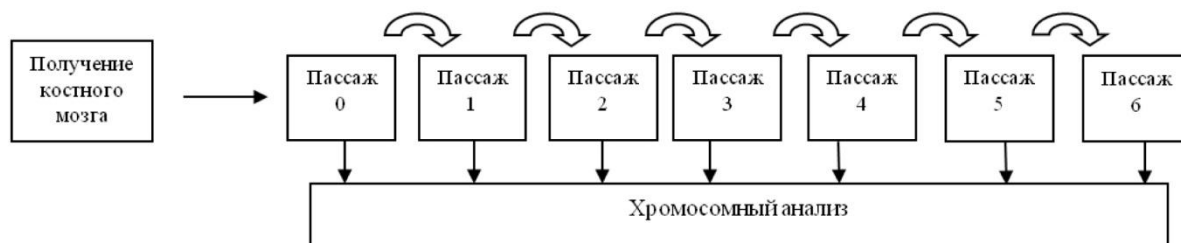


Рис. 1. Дизайн исследования

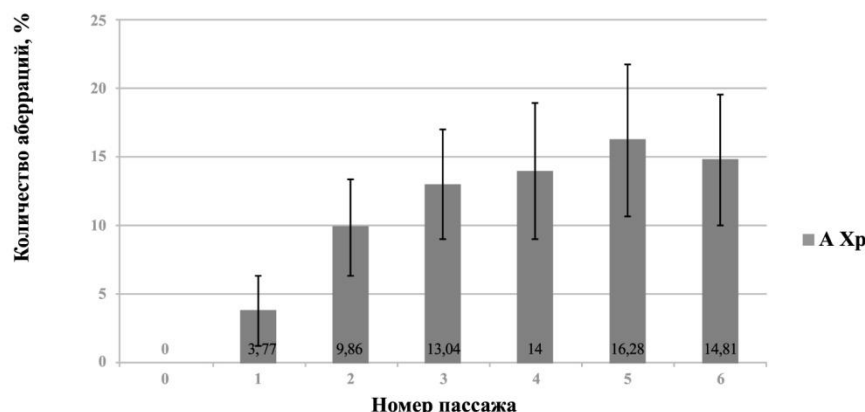


Рис. 2. Сравнение хромосомных аберацій на ранних и поздних стадиях культивирования

с помощью маркеров ВАТ-26: и ВАТ-25: в стандартных условиях, детекцию проводили в агарозном геле.

Полученные данные заносились в программу Microsoft Excel, после чего проводили их статистическую обработку.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Генеральной совокупностью данного исследования являлись 400 метафазных пластинок, на каждый пассаж (0–6) исследовано от 43 до 71 метафазных пластинок. Всего было проанализировано 6 пассажей (таблица).

Спектр выявленных нарушений во всех вариантах эксперимента представлен аберациями хромосомного (А Хс) и хроматидного типов (А Хт), а также геномными нарушениями (ГН) — полиплоидными (Ппл) и анеуплоидными (Анпл) клетками. Из абера-

ций хромосомного типа (А Хс) были обнаружены: дицентрики с сопутствующими фрагментами (Диц+Фр) и ацентрические фрагменты (Ац Фр). Из абераций хроматидного типа (А Хт) встречались хроматидные пробелы (GAP и Brake), а также изохроматидные делеции (Ихт Дел). Доминирующими среди абераций были хроматидные (А Хт), в основном хроматидные пробелы (Хт Пб).

При сравнении хромосомных абераций на различных пассажах культивирования (0–6 пассаж) было установлено, что при 0 пассаже общее количество аберрантных хромосом меньше, чем при 6 пассаже (рис. 2). Статистическая значимость возрастания хромосомных аномалий была определена при помощи t-критерия Стьюдента.

Сопоставление собственных результатов с данными литературы показало сходные

Таблица

Цитогенетические показатели в клетках стромы костного мозга (КСКМ) крыс на различных пассажах

Пассаж	Общее к-во клеток	Клетки 2N	А Хс	Цитогенетические нарушения		А Хт	Цитогенетические нарушения			Σ А Хр	ГН	
				Диц+Фр	Ац Фр		GAP	Brake	Ихт Дел		Ппл	Анпл
0	77	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	85	53	0	0	0	2	2	0	0	2	0	0
2	155	71	1	1	0	6	5	0	1	7	3	4
3	101	69	2	1	1	7	4	1	2	9	1	10
4	93	50	2	2	0	5	3	2	0	7	2	18
5	70	43	1	0	1	6	3	0	3	7	0	25
6	90	54	1	1	0	7	5	2	0	8	0	34

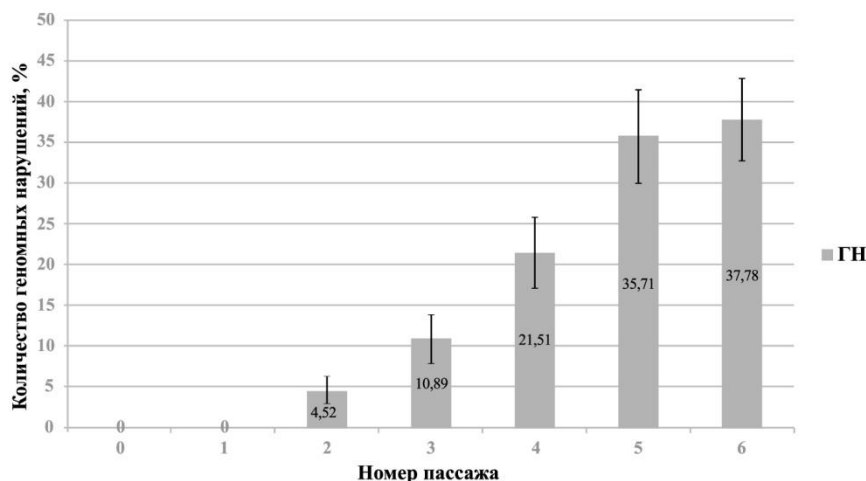


Рис. 3. Сравнение геномных нарушений на ранних и поздних стадиях культивирования

выводы о цитогенетических нарушениях в КСКМ на ранних и поздних стадиях культивирования [1, 2, 8].

Учет цитогенетических показателей по уровню геномных нарушений: поли- и анеуплоидии выявил их полное отсутствие в 0 и 1 пассажах. В результате исследования было отмечено, что с увеличением пассажа количество геномных нарушений увеличивается (рис. 3). Было отмечено, что преобладающим большинством геномных нарушений являлись анеуплоидные клетки.

Также проводилось исследование по выявлению геномных повреждений. Повышенная

частота мутаций микросателлитных локусов (микросателлитная нестабильность) выявляется при онкологических заболеваниях и является индикатором дефектов генов системы мисмэтч-репарации ДНК, и проявляется как накопление аллелей с измененной длиной коротких повторов ДНК. Для тестирования микросателлитной нестабильности высокого уровня (MSI-H) использовались мононуклеотидные маркеры BAT25 и BAT26. При сравнении полученных результатов (0 пассаж, маркер BAT26) с положительным контролем, несущим микросателлитную нестабильность по данному

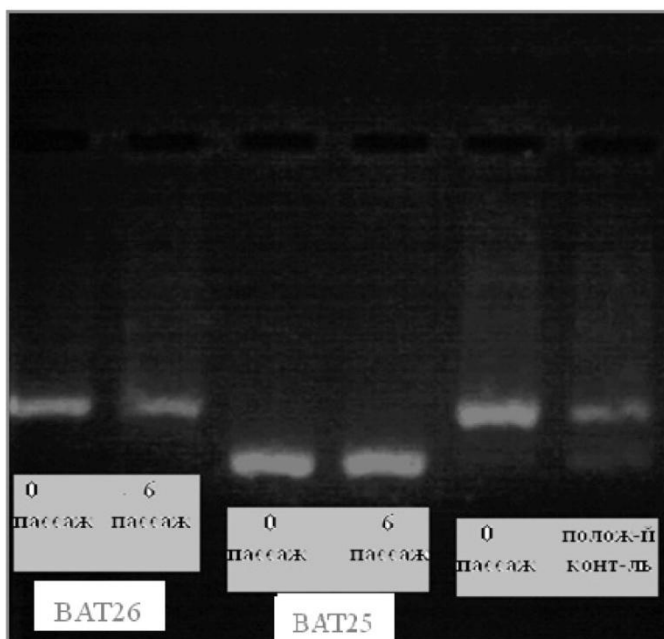


Рис. 4. Микросателлитная нестабильность генома в КСКМ

маркеру, наблюдается различие в ПЦР продуктах, что в свою очередь свидетельствует об отсутствии нестабильности в исследуемом пассаже. В то же время, сходство между ПЦР продуктами в 0 и 6 пассажах при использовании обоих маркеров (BAT25, BAT26) свидетельствует об отсутствии возникновения микросателлитной нестабильности с увеличением времени культивирования (рис. 4).

Очевидно, что для выявления геномной нестабильности необходимо увеличить количество пассажей.

ВЫВОДЫ

1. При сравнении цитогенетических показателей на ранних и поздних стадиях культивирования (0–6 пассаж) было установлено, что с увеличением пассажа количество aberrантных хромосом увеличивается.
2. При учете геномных нарушений: поли- и моноплоидии на ранних и поздних стадиях культивирования (0–6 пассаж) было выявлено, что с увеличением пассажа количество геномных нарушений также увеличивается. Было отмечено, что преобладающим большинством геномных нарушений являлись моноплоидные клетки.
3. В результате исследования микросателлитной нестабильности генома обнаружено не было.
4. Возникновение аномалий кариотипа в культурах КСКМ является серьезным препятствием для их применения в медицине из-за высокого риска появления нежелательных побочных эффектов. Поэтому перспективным для клеточных технологий является использование стволовых клеток только ранних пассажей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бочков Н. П. Цитогенетический контроль безопасности стволовых клеток / Н. П. Бочков // Тезисы докладов британско-российского совещания в сотрудничестве с Европейской комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества». — М.: РАМН, 2007. — 100 с.
2. Глазко Т. Т. Преемственность цитогенетических характеристик в пассажах эмбриональной герминативной клеточной линии мыши G1 / Т. Т. Глазко, А. П. Яцышина, О. В. Пидпала [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2007. — Т. 2, № 3. — С. 47–50.
3. Bochkov N. P. Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells / N. P. Bochkov, E. S. Voronina, N. V. Kosyakova [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. — 2007. — 143. — P. 122–126.
4. Carrano A. V. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques / A. V. Carrano, A. T. Natarajan // Mutat. Res. — 1988. — V. 204. — P. 379–406.
5. IAEA Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment. STI/PUB/10/260. // Technical Report Series № 260. — 1986. — P. 69.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. — (ets no. 123) and (ets no. 170). — 2 December 2005. — Strasbourg, 18.III.1986.
7. Kim Dohoon. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins / Kim Dohoon, Kim Chun-Hyung, Moon Jung-II [et al.] // Stem Cell. — 2009. — V. 4. — № 6. — P. 472–476.
8. Tolar J. Sarcoma Derived from Cultured Mesenchymal Stem Cells / J. Tolar, A. J. Nauta, M. J. Osborn [et al.] // Stem Cell. — 2007. — № 25. — P. 371–379.