Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького
Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj

doi:10.15421/nvlvet7320

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

http://nvlvet.com.ua/

УДК 575:576.3:[616.419+611.018.26]

Порівняльна характеристика генетичної стабільності культур клітин жирової тканини та кісткового мозку щурів на ранніх пасажах

В.В. Ковпак, О.С. Ковпак
kovpak8887@gmail.com

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Полковника Потєхіна, 16, м. Київ, 03041, Україна

З літературних джерел нами отримано ряд суперечливих даних щодо ризиків неопластичної трансформації стовбурових клітин in vitro. На сьогодні як джерела стовбурових клітин дорослих донорів досить добре досліджено кістковий мозок. Альтернативним джерелом отримання клітинного матеріалу є жирова тканина (з якої вони можуть бути отримані за допомогою менш інвазивних методів у більших кількостях). Зважаючи на це, визначення генетичної стабільності саме цих культур клітин є найбільш актуальними на даний час.

Наведено порівняння показників генетичної стабільності культури клітин кісткового мозку та жирової тканини щурів під час їх культивування in vitro. Дослідження проводились з першого до шостого пасажу включно. Зміни у генетичному апараті були виявлені як у культурі клітин кісткового мозку, так і жирової тканини. За використаних нами умов культивування, кількість анеуплоїдій та поліплоїдій змінювалась з кожним пасажем, але не виходила за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців. Цитогенетична оцінка культури показала, що кількість клітин з мікроядрами та двоядерних клітин знаходилася у межах норми впродовж всього періоду дослідження. Найвищий мітотичний індекс визначався на першому пасажі з подальшим зниженням в процесі культивування, що зворотно пропорційно апоптозному індексу.

Отримані дані генетичної стабільності культури клітин, як жирової тканини так і кісткового мозку за всіма досліджуваними показниками знаходяться в межах норми, характерної для ссавців. Це дозволяє подальше дослідження щодо трансплантації з мінімальним ризиком неопластичної трансформації вказаних культур.

Ключові слова: *цитогенетичний аналіз, мікроядерний тест, мітотичний індекс, апоптозний індекс, культура клітин жирової тканини, культура клітин кісткового мозку*

Сравнительная характеристика генетической стабильности культур клеток жировой ткани и костного мозга крыс на ранних пассаж

В.В. Ковпак, О.С. Ковпак
kovpak8887@gmail.com

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Полковника Потехина 16, Киев, 03041, Украина

Из литературных источников нами получен ряд противоречивых данных о рисках неопластическом трансформации стволовых клеток in vitro. Сегодня в качестве источника стволовых клеток взрослых доноров достаточно хорошо исследован костный мозг. Альтернативным источником получения клеточного материала является жировая ткань (из которой они могут быть получены с помощью менее инвазивных методов в больших количествах). Ввиду этого, определение генетической стабильности именно этих культур клеток являются наиболее актуальными в настоящее время.

Приведено сравнение показателей генетической стабильности культуры клеток костного мозга и жировой ткани крыс при их культивирования in vitro. Исследования проводились с первого до шестого пассажа включительно. Изменения в генетическом аппарате были обнаружены как в культуре клеток костного мозга, так и жировой ткани. При использован-

Citation:
Kovpak, V.V., Kovpak, O.S. (2017). Comparative analysis of genetic stability of rat adipose and bone marrow cell cultures on earley passages. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 19(73), 95–100.

ных нами условиях культивирования, количество анеуплоидий и полиплоидий изменялась с каждым пассажем, но не выходила за пределы спонтанного мутагенеза, характерного для млекопитающих. Цитогенетическая оценка культуры показала, что количество клеток с микроядрами и двухъядерных клеток находилась в пределах нормы в течении всего периода исследования. Самый высокий митотический индекс определялся на первом пассаже с последующим снижением в процессе культивирования, что обратно пропорционально апоптозному индексу.

Полученные данные генетической стабильности культуры клеток, как жировой ткани, так и костного мозга по всем исследуемым показателям находятся в пределах нормы, характерной для млекопитающих. Это позволяет дальнейшее исследование по трансплантации с минимальным риском неопластической трансформации указанных культур.

Ключевые слова: *цитогенетический анализ, микроядерный тест, митотический индекс, апоптозный индекс, культура клеток жировой ткани, культура клеток костного мозга*

Comparative analysis of genetic stability of rat adipose and bone marrow cell cultures on earley passages

V.V. Kovpak, O.S. Kovpak
kovpak8887@gmail.com

National University of life and environmental sciences of Ukraine,
Polkovnyka Potekhyna Str., 16, Kyiv, 03041, Ukraine

From literary sources, we received a number of controversial data regarding the risks of neoplastic transformation of stem cells in vitro. Inasmuch as today bone marrow has been sufficiently studied as a source of adult donor stem cells, and adipose tissue is an alternative source for obtaining cell material (from which it may be obtained using less invasive methods and in much greater quantity), determination of genetic stability of these particular cell cultures currently is the most relevant issue.

Comparison of genetic stability of rat bone marrow and adipose cell cultures from the first to the sixth passages. Materials and methods: 3 non-linear 4 months old male rats and 9 non-linear 12 days old infant rats were used in the experiment.

Adipose cell culture was obtained from subcutaneous fat using the standardized method in our own modification. Bone marrow cell culture was obtained from the rat femurs, tibiae, and humeri using the standardized method. Obtained cell mass was cultivated in a standard culture medium in a CO_2 incubator at 37 ºC and with 5% CO_2 concentration.

Cytogenetic analysis was carried out on 30 metaphase plates from each passage. Cells from the first to the sixth passage we used in the research. A modification of the standard cytogenetic method was used to obtain chromosome preparations. In the preparations prepared in an aforementioned way, numerical chromosome abnormalities, like aneuploidy, polyploidy, were determined, as well as the number of binucleate cells, micronucleus cells, mitotic and apoptotic indexes.

Here, we provide the comparison of genetic stability indicators for rat bone marrow and adipose cell cultures throughout the in vitro cultivation thereof. Changes in the genetic apparatus were identified in both bone marrow and adipose tissue cell cultures. Karyotype analysis of rat bone marrow and adipose cell cultures showed that, given the conditions that we used for the cultivation, the number of aneuploidies and polyploidies varies from one passage to another; however it does not go beyond the limits of spontaneous mutagenesis typical for mammals. Based on the results of cytogenetic evaluation of the culture, it was determined that the number of cells with micronuclei and the binucleate cell remains within the normal range from the first to the sixth passages. The number of cells with aneuploidy and micronuclei in adipose cell culture on all passages was lower than in bone marrow cell culture; this indicates its higher genetic stability in terms of these indicators. The highest mitotic index was determined on the first passage with its following decrease throughout the cultivation in inverse proportion to apoptotic index.

The obtained data on the genetic stability of both adipose and bone marrow cell cultures are within normal range typical for mammals in terms of all studied indicators. This allows for the following studies relating to the transplantation with minimal risk of neoplastic transformation of the said cultures.

Key words: *cytogenetic analysis, micronucleus test, mitotic index, apoptotic index, adipose tissue cell culture, bone marrow cell culture.*

Вступ

Відкриття стовбурових клітин викликало бурхливу реакцію в науковому світі, а наприкінці XX століття журнал «Science» визнав це нововведення найбільшим відкриттям минулого століття. Сьогодні ж лікувальне застосування неспеціалізованих клітин викликає гарячі суперечки у фахівців і не менш гарячий інтерес громадськості. Зокрема найчастіше постає питання ризику неопластичної трансформації як *in vitro* так і *in vivo*.

Актуальність теми. З літературних джерел нами отримано ряд суперечливих даних щодо ризиків неопластичної трансформації неспеціалізованих клітин *in vitro*. Зокрема, частина дослідників отримала результати у яких культура клітин зазнавала спонтанної імморталізації та непластичної трансформації (Miura et al., 2005; Bersenev, 2005), інші вказують на відсутність генетичних помилок при культивуванні до 2 місяців (Rubio et al., 2005; Mareschi et al., 2006). Існують дані про відсутність неопластичної трансформації *in vivo* навіть при введенні клітин зі зміненим каріотипом (Izadpanah et al., 2008). Проте всі сходяться на тому, що важливу роль відіграють: джерело отримання культури, умови культивування, ензимна обробка тощо (Bersenev, 2005; Foudah et al., 2009; Mazurkevych et al., 2015).

На сьогодні як джерела стовбурових клітин дорослих донорів досить добре досліджено кістковий мозок, проте альтернативним джерелом отримання клітинного матеріалу є жирова тканина, з якої вони можуть бути отримані за допомогою менш інвазивних

методів у значно більших кількостях. Оскільки дані культури клітин найчастіше використовують у дослідженнях, визначення їх генетичної стабільності є найбільш актуальними на даний час.

Мета дослідження: порівняти генетичну стабільність культури клітин кісткового мозку та жирової тканини щурів з першого до шостого пасажу.

Завдання. 1. Отримати культури клітин кісткового мозку та жирової тканини. 2. Дослідити зміни співвідношення кількості клітин з анеуплоїдією, поліплоїдією, мікроядрами та двоядерних клітин з першого до шостого пасажу. 3. Прослідкувати зміни мітотичного та апоптозного індексу у культурі клітин кісткового мозку (КККМ) та культурі клітин жирової тканини (ККЖТ).

Матеріал і методи дослідження

Експерименти на тваринах були проведені з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року). У досліді використали 3-ох самців не лінійних щурів віком 4 місяці та 9 не лінійних щуренят 12-денного віку. Евтаназію дослідних тварин здійснювали шляхом декапітації під ефірним наркозом.

Отримання культури клітин жирової тканини здійснювали з підшкірної жирової клітковини за стандартною методикою (Ian Freshney, 2005; Bunnell et al., 2008; Carswell et al., 2012) у власній модифікації. Культуру клітин кісткового мозку отримували з кісткового мозку стегнових, великогомілкових та плечових кісток щурів за стандартною методикою (Masurkewitsch et al., 2014). Одержану клітинну масу культивували у стандартному середовищі: 80% − DMEM; 20% − FBS; 10 мкл/см^3 − антибіотика-антимікотика («Sigma», США); у CO_2 інкубаторі за 37 ºС та 5% концентрації CO_2 (Masurkewitsch et al., 2014), до конфлюентності 90−100%.

Клітини знімали за стандартною методикою (розчином 0,25% трипсин/ЕДТА) (Masurkewitsch et al., 2014). Подальше пасажування здійснювалось у розведенні 1 : 3. Мікроскопічний аналіз і оцінку культур здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Цитогенетичний аналіз проводили на 30 метафазних пластинках культур клітин з кожного пасажу. Дослідження проводили на клітинах першого-шостого пасажів. Для отримання препаратів хромосом використовували модифікацію стандартного цитогенетичного методу (Masurkewitsch et al., 2014). Отримані препарати забарвлювали за допомогою набору для фарбування (Лейкодиф 200), згідно інструкції виробника. Аналіз метафазних пластинок здійснювали за допомогою мікроскопа Leica DMR (Німеччина), збільшення ×400, ×1000.

У підготовлених вище зазначеним способом препаратах виявляли кількісні порушення хромосом – анеуплоїдію (А), поліплоїдію (ПП), а також підраховували кількість двоядерних клітин (ДЯ), клітин з мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (відсоток клітини в стадії поділу від загальної кількості проаналізованих клітин (МІ) (Kolmakowa et al., 2013), апоптозний індекс (відсоток клітин з ознаками апоптозу від загальної кількості проаналізованих клітин (АІ) (Penaloza et al., 2008). Частоту прояву ДЯ, МЯ та АП вираховували на 500 клітин (%).

Результати та їх обговорення

Аналіз каріотипу культур клітин кісткового мозку та жирової тканини щурів, у процесі їх культивування, показав, що для них характерні кількісні порушення (анеуплоїдія та поліплоїдія), результати досліджень приведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Результати цитогенетичного аналізу культур клітин кісткового мозку та жирової тканини щурів I – VI пасажів, M ± m, n = 3

№ пасажу	Анеуплоїдія, %		Поліплоїдія, %	
	КККМ	ККЖТ	КККМ	ККЖТ
I	8,9 ± 1,3	4,4 ± 1,3	1,1 ± 1,2	5,6 ± 1,3
II	13,2 ± 2,0	4,4 ± 1,3	1,1 ± 1,2	3,3 ± 2,0
III	18,9 ± 1,3**	5,6 ± 1,3	1,1 ± 1,2	0,0 ± 0,0*
IV	14,5 ± 2,6	5,6 ± 1,3	2,2 ± 1,3	0,0 ± 0,0*
V	15,6 ± 1,3*	6,7 ± 0,0	4,4 ± 1,3	0,0 ± 0,0*
VI	17,8 ± 1,3**	12,2 ± 1,3*	4,4 ± 1,3	0,0 ± 0,0*

Примітка: * − P < 0,05; ** − P < 0,01; *** − P < 0,001, порівняно з контролем (контролем виступав перший пасаж)

Хромосомні пластинки з анеуплоїдією відмічали з першого до шостого пасажу у обох досліджуваних культурах (табл. 1.) (рис.1, б). Найнижчий їх відсоток, як у культурі клітин кісткового мозку (8,9%), так і в жировій тканині (4,4%), відмічали на першому пасажі. Максимальна кількість клітин з некратним набором хромосом у КККМ припадала на третій пасаж (18,9%), у ККЖТ – на шостий (12,2%). Процеси описані вище можна пояснити тим, що у процесі культивування кількість клітин з неправильним набором хромосом збільшується за рахунок їх неконтрольованого поділу. Варто відмітити, що на четвертому пасажі у культурі клітин кісткового мозку кількість клітин з анеуплоїдією зменшується (14,5%), на цьому ж пасажі відмічається пік апоптозу у досліджуваній культурі (0,7%), подібні зміни спостерігали і у ККЖТ. Описаний процес можна пояснити тим, що на 3-му пасажі у КККМ та 6-му у ККЖТ помилки, що накопичились генетичному апараті клітин, активують каскад реакцій відомий як «апоптоз зсередини» (Muschkambarow and Kusnezow, 2013), що підтверджується даними отриманими нами у попередніх дослідженнях:

збільшенням CD 95 (білок, що ініціює запрограмовану клітинну загибель) (Mazurkevych et al., 2016) та клітин у стані апоптозу (табл. 3). Слід відмітити, що кількість клітин з анеуплоїдією у культурі клітин жирової тканини був нижчий на всіх пасажах ніж у культурі клітин кісткового мозку, що свідчить про її більшу генетичну стабільність за даним показником.

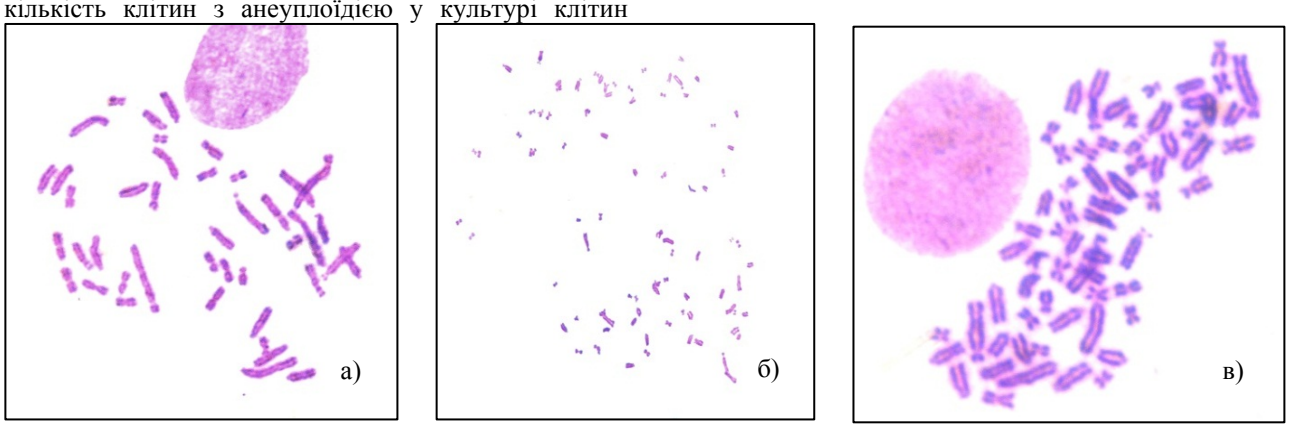

Рис 1. Мікрофотографії метафазних пластинок клітин щура: а) нормальний каріотип, n = 42; б) поліплоїдія, n = 84; в) анеуплоїдія, n = 70. Забарвлення Лейкодиф 200. Зб. ×1000

Метафазні пластинки з кратним збільшенням числа хромосом (рис.1, в.) виявляли у культурі клітин кісткового мозку з I-го (1,1%) до VI-го (4,4%) пасажу, жирової тканини – з I-го (5,6%) до II-го (3,3%) (табл. 1). На даний час остаточний механізм появи поліплоїдій не визначений. Проте існує ряд гіпотез: відхилення від нормального ходу мітозу, внаслідок злиття двох клітин (більш характерно саме для культур клітин) (Kovaljova, 2008), сповільненням чи прискоренням мітозу (Matsyara, 1980). Прослідковуючи закономірність появи поліплоїдій та двоядерних клітин можна зробити висновок, що механізм їх появи у КККМ та ККЖТ різний. У культурі клітин жирової тканини максимальну кількість клітин з кратним збільшенням хромосом (5,6%) та двоядерних клітин (2,9%) відмічали на першому пасажі, у той час як у культурі клітин кісткового мозку спостерігали зворотну закономірність: найвищий рівень поліплоїдій (4,4%) та двоядерних клітин (2,0%) на шостому пасажі (табл. 2). Описані явища можуть бути пояснені тим, що у ККЖТ наявність поліплоїдій зумовлено швидким мітозом (мітотичний індекс 4,3%), у той час як у КККМ – внаслідок злиття клітин впродовж тривалого культивування та відхиленням від нормального ходу мітозу.

Для додаткової оцінки цитогенетичних змін культури клітин кісткового мозку та жирової тканини був проведений мікроядерний тест (табл. 2, рис. 2).

Таблиця 2

Результати мікроядерного тесту культур клітин кісткового мозку та жирової тканини щурів на ранніх пасажах культивування, M ± m, n = 3

№ пасажу	Клітини з мікроядрами, %		Двоядерні клітини,%	
	КККМ	ККЖТ	КККМ	ККЖТ
I	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,2	2,9 ± 0,2
II	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	2,5 ± 0,3
III	1,2 ± 0,1**	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1**	1,9 ± 0,1**
IV	1,4 ± 0,2**	0,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1**	1,7 ± 0,1**
V	1,7 ± 0,1***	0,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1**	1,4 ± 0,1**
VI	1,9 ± 0,1***	1,0 ± 0,1**	2,0 ± 0,1**	1,1 ± 0,1**

Примітка: *– P < 0,05; **– P < 0,01; ***– P < 0,001, порівняно з контролем (контролем виступав перший пасаж)

Під час дослідження клітини з мікроядрами виявляли на всіх пасажах, як у КККМ, так і в ККЖТ (рис. 2, а) (табл. 2). Спостерігали збільшення кількості МЯ у культурах клітин з пасажами, при чому у кісткового мозку воно було більш інтенсивним ніж у культурі клітин жирової тканини.

За результатами таблиці 1 та 2 прослідковується закономірність до збільшення клітин зі зміненим каріотипом та клітин з мікроядрами. Це можна пояснити тим, що мікроядра утворюються в результаті порушення веретена поділу, що призводить до нерозходження чи відставання в розходженні хромосом до полюсів клітини. До складу мікроядра можуть входити як окремі цілі хромосоми, так і їх фрагменти. Вони є патологічною структурою і їх утворення пов'язано з хромосомною нестабільністю (Kovaljova, 2008; Kolmakowa et al., 2013).

Додатково у культурах клітин досліджували показники мітотичної активності та апоптозу. Нами відмічалась зворотна закономірність апоптозного та мітотичного індексів, як у КККМ, так і ККЖТ. Так, найменший відсоток клітин у стані апоптозу відмічався на першому пасажі як у культурі клітин кісткового мозку (0,1%), так і жирової тканини (0,1%), у той час як мітотичний індекс був найвищим за весь період дослідження (4,1% та 4,3% відповідно).

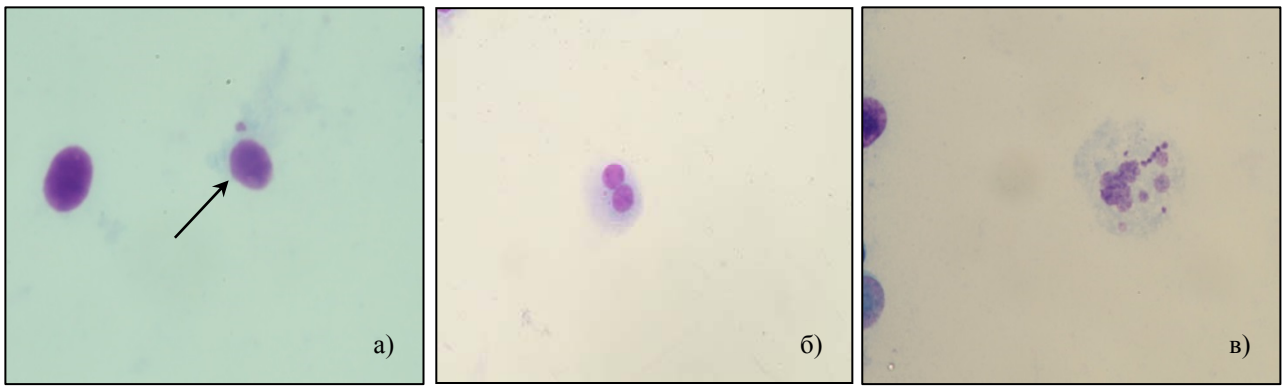

Рис.2. Мікрофотографії клітин культури жирової тканини щура (6 пасаж): а) клітина з мікроядром; б) двоядерна клітина, в) клітина в стані апоптозу). Забарвлення Лейкодиф 200. Зб. ×1000.

Таблиця 3

Показник мітотичної активності та апоптозу культури клітин кісткового мозку та жирової тканини щурів на ранніх пасажах культивування, M ± m, n = 3

№ пасажу	Індекс апоптозу, %		Мітотичний індекс, %	
	КККМ	ККЖТ	КККМ	ККЖТ
I	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	4,1 ± 0,2	4,3 ± 0,2
II	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	3,8 ± 0,1	4,1 ± 0,1
III	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	3,7 ± 0,1	3,6 ± 0,1*
IV	0,7 ± 0,2**	0,3 ± 0,1	2,7 ± 0,3**	3,5 ± 0,1*
V	0,5 ± 0,1*	0,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1**	3,4 ± 0,1*
VI	0,5 ± 0,1*	1,4 ± 0,1***	3,5 ± 0,1*	2,0 ± 0,1***

Примітка: * – P < 0,05; ** – P < 0,01; *** – P < 0,001, порівняно з контролем (контролем виступав перший пасаж)

Максимальний апоптозний індекс у КККМ відмічали на 4 пасажі (0,7%) за мінімального мітотичного індексу (2,7%), у ККЖТ подібна закономірність прослідковувалась на 6-му пасажі (1,4%; 2,0% відповідно).

Отримані результати вказують на генетичну стабільність досліджуваних культур клітин, оскільки за всіма досліджуваними показниками знаходяться в межах норми, характерної для ссавців (Xikum and Liming, 1990; Jernct and Zhigatschew, 2006; Kovaljowa et al., 2008; Mazurkevych et al., 2015). Це відкриває нові можливості для подальших досліджень щодо трансплантації, гарантуючи мінімальний ризик неопластичної трансформації вказаних культур *in vivo*.

Висновки

1. Аналіз каріотипу культур клітин кісткового мозку та жирової тканини щурів показав, що за використаних нами умов їх культивування, кількість анеуплоїдій та поліплоїдій змінюється з кожним пасажем, але не виходить за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців.

2. За результатами цитогенетичної оцінки культури встановлено, що кількість клітин з мікроядрами та двоядерних клітин знаходиться у межах норми з першого до шостого пасажу.

3. Кількість клітин з анеуплоїдією та мікроядрами у культурі клітин жирової тканини був нижчий на всіх пасажах ніж у культурі клітин кісткового мозку, що свідчить про її більшу генетичну стабільність за даними показниками.

4. Найвищий мітотичний індекс визначається на першому пасажі з подальшим зниженням в процесі культивування, що зворотно пропорційно апоптозному індексу.

Перспективи подальших досліджень: отримані дані відкривають можливості для вивчення впливу ККЖТ та КККМ на організм реципієнтів, та можливість прогнозування зміни генотипу трансплантованих клітин.

Бібліографічні посилання

Bersenev, A.B. (2005). Izucheniye spontannoy onkogeneticheskoy transformatsii mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok cheloveka v kul'ture [Study of spontaneous oncogenetic transformation of human mesenchymal stem cells in culture] Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya.– Cellular transplantation and tissue engineering. 1, 14–16 (in Russian).

Kolmakowa, T.C., Belik, C.N., Morgul', E.W., Cewrjukow, A.W. (2013). Icpol'sowanie mikrojadernogo tecta dlja ozenki jevvektiwnocti letschenija allergii u detej: metod. rekomendazii. [Using the micronucleus test to assess the effectiveness of the treatment of allergies in children: guidelines]. Roctow na Donu. Isdwo RoctGMU (in Russian).

Kovaljowa, O., Koboseva, N., Burdo, E., Glasko, T. (2008). Mikrojadernyj tect kak metod opredelenija cesonnoj ismentschiwocti zitogenetitscheckich pokasatelej u mlekopetajushich [Micronucleus test as a method of determining the seasonal variability of cytogenetic indices in of mammals]. Raritetna teriovauna

ta її ochorona – Rare fauna and its protection. 9, 266–269 (in Ukrainian).

Kovaljova, O.A. (2008). Zitogenetitscheckie anomalii w comatitscheckich kletkach mlekopitajushich. [Cytogenetic abnormalities in somatic cells at mammalian]. Zitologija i genetika – Cytology and Genetics. 1, 58–72 (in Ukrainian).

Mazurkevych, A.Y., Malyuk, M.O., Starodub, L.F., Danilov, V.B. (2015). Kariotypovyy analiz mezenkhimal′nykh stovburovykh klityn kistkovoho mozku kroliv za riznykh metodiv dysotsiatsiyi klitynnoho monosharu na rannikh pasazhakh kul′tyvuvannya in vitro [Kariotyp analysis of mesenchimal bone marrow stem cells of rabbits by different methods dissociation of cell monolayers at early cultivation passage in vitro]. Naukovyy visnyk NUBiP Ukrayiny. Seriya: Veterynarna medytsyna, yakist′ i bezpeka produktsiyi tvarynnytstva – Scientific Bulletin NUBIP of Ukraine. Series: Veterinary Medicine, the quality and safety of animal products, 227 (in Ukrainian).

Mazurkevych, A.Y., Kovpak, V.V., Kovpak, O.S. (2016). Fenotypovi ta morfolohichni zminy kul′tury klityn kistkovoho mozku shchuriv v protsesi yikh kul′tyvuvannya [Phenotypic and morphological changes of bone marrow cells culture of rats during cultivation]. Naukovyy visnyk LNUVMBT imeni S.Z.Gzhyts′koho – Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj. 18, 2(66), 126–131 (in Ukrainian).

Masurkewitsch, A.J., Kowpak, W.W., Danilow, W.B. (2014). Klitinni technologiï u weterinarnij medizini. Nawtschal'nij pocibnik. [Cellular technologies in veterinary medicine. Study Guide]. Kyev: KOMPRINT (in Ukrainian).

Muschkambarow, N.N., Kusnezow, C.L. (2013). Molekuljarnaja biologija.Utschebnoe pocobie dlja ctudentow medizinckich wusow [Molecular biology. Textbook for medical students]. Moscow: Medizinckoe invormazionnoe agentctwo (in Russian).

Jernct, L.K., Zhigatschew, A.I. (2006). Monitoring genetitscheckich bolesnej zhiwotnych w cicteme krupnomacschtabnoj celekzii [Monitoring animal genetic diseases in the system of largescale selection]. Moscow: Roccel'chosakademija (in Russian).

Bunnell, B.A., Flaat, M., Gagliardi, Ch. et al. (2008). Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods. 45, 2, 115–120.

Carswell, K.A., Mi-Jeong, Lee, Fried, S.K. (2012). Culture of Isolated Human Adipocytes and Isolated Adipose Tissue. Methods Mol Biol. 806, 203–214.

Foudah, D., Redaelli, S., Donzelli, E. et al. (2009). Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem. Chromosome Res.17(8), 1025–1039.

Ian Freshney, R. (2005). Culture of animal cells: a manual of basic technique [5th ed.]. USA: John Wiley & Sons.

Izadpanah, R., Kaushal, D., Kriedt, C., Tsien, F. et al. (2008). Long-term *In vitro* Expansion Alters the Biology of Adult Mesenchymal Stem. Cancer Res. 68(11), 4229–4238.

Mareschi, K., Ferrero, I., Rustichelli, D., Aschero, S. et al. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. J. Cell. Biochem. 97(4), 744–754.

Matsyara, T. (1980) Multinucleation and polypoloidization of aging human cells in culture. Adv Exp Med Biol. 129, 31–38.

Miura, M., Miura, Y., Padilla, N.M. et al (2005). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenhymal stem cells leads to malignant transformation. Stem. Cells. 24, 1095–1103.

Penaloza, C., Orlanski, S., Entezari-Zaher, T. et al. (2008). Cell death in mammalian development. Curr. Pharm. Des. 14(2), 184–196.

Rubio, D., Garcia Castro, J., Martin, M.C. et al. (2005) Spontaneous human stem cell trans formation. Cancer Res. 65, 3035–3039.

Xikum, X., Liming, S. (1990). Observations on micronuclei germ cells. Zool. Res. 11, 4, 343.

Стаття надійшла до редакції 19.03.2017