

БИОТЕХНОЛОГИЯ ТА ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ

УДК 636.4:636.028: 57.085.23: 575.22

**ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК СВИНЬИ В ВЕТЕРИНАРИИ И
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Щербак Е.В., к. с.-х. н., доцент, ст. н. сотрудник,

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Баглай О.А.,

lykova.a.olga@gmail.com

Новикова О.Ю., Лаврик А.А. ©

ПАО «Фармстандарт – Биолек», г. Харьков

***Аннотация.** Представлен обзор литературы относительно основных источников получения мезенхимальных стволовых клеток (МСК), возможность их дифференцировки в различные типы ткани. Рассмотрены основные критерии идентификации МСК и сферы их применения в ветеринарной медицине, сельскохозяйственной биотехнологии, в частности в свиноводстве. Указаны потенциальные риски использования МСК, в частности – aberrации хромосом в процессе их накопления *in vitro*. Данные риски обуславливают необходимость постоянного цитогенетического контроля МСК в процессе их накопления.*

***Ключевые слова:** мезенхимальные стромальные клетки свиньи, хромосомные aberrации.*

Изучение мультипотентных клеток тканей взрослого организма началось в 60-е годы XX века, когда впервые были выделены две популяции клеток костного мозга — гемопоэтические и мезенхимальные. С тех пор достигнут значительный успех как в изучении фундаментальных свойств и особенностей культивирования данных типов *in vitro*, так и их трансплантации. Небольшие количества клеток, обладающих пластичностью и способных дифференцироваться в различные типы клеток, были обнаружены в тканях многих органов взрослого организма (в базальном слое эпидермиса - стволовые клетки эпидермиса, в криптах кишечника, стволовые клетки кишечника). Такие стволовые клетки называются региональными (соматическими), при повреждении тканей соответствующего органа, находящиеся в нем стволовые клетки мигрируют к зоне повреждения, делятся и диф-

ференцируються, образуя в этом месте новую ткань. Наряду с региональными стволовыми клетками, существует также пул еще менее специализированных мультипотентных клеток, обладающих большей пластичностью, способных мигрировать в организме и образовывать клетки различных типов тканей. Основным депо данных клеток в организме является костный мозг (КМ), также в качестве источника описана жировая ткань [1].

Было показано, что данный тип клеток способен к самоподдержанию и миграции к местам повреждения. [2] Механизмы репаративного действия мезенхимальных стволовых клеток (МСК) могут быть различны: дифференцировка в определенные виды клеток или продуцирование биологически активных протеинов, таких как факторы роста, факторы, прекращающие нежелательный апоптоз и обеспечивающие хемотаксис. Все это создает в месте повреждения анаболический эффект, стимулирует и привлекает в это место дополнительные МСК, которые, в свою очередь, дифференцируются и/или продуцируют дополнительные биологически активные пептиды [3].

Первоначально к популяции мультипотентных клеток, пригодных для использования в регенеративной медицине, относили клетки, обладающие свойством адгезии к пластику и колониальным характером роста. Позже был охарактеризован иммунофенотип данного типа клеток, описаны характерные CD маркеры (экспрессия CD73, CD90, CD 105 и отсутствие экспрессии CD34, CD45, HLA-DR). Данные предыдущих исследований были обобщены и закреплены в качестве критериев идентичности МСК Комитетом по стволовым клеткам Международного общества клеточной терапии на конференции в 2006 году. Данные критерии - это: а) адгезия к пластику и фибробластоподобная морфология, б) характерный иммунофенотип (CD маркеры) и способность дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении [4].

Применение в медицине и ветеринарии. Современные возможности практического использования МСК в клинической практике обусловлены их широким дифференцировочным потенциалом. Сегодня показано, что пул МСК неоднороден, он содержит как мультипотентные клетки, так и прогениторные клетки-предшественники, комитированные в разной степени. Рядом авторов было показано, что МСК, выделенные из КМ, способны при определенных условиях подвергаться дифференцировке в клетки тканей, имеющих мезодермальное происхождение [5, 6]. Изначально была показана способность МСК к дифференциации в клетки костной, хрящевой, гладкой, поперечно-полосатой и сердечной мышечных тканей, - данные пути дифференциации соответствуют естественным переходам клеток мезенхимального ряда. Позднее были показаны также возможности индукции МСК в нейроны, адипоциты, клетки щитовидной и поджелудочной

желез, имеющих не мезодермальное происхождение, что свидетельствует в пользу сохранения более широкого дифференцировочного потенциала ряда клеток, сохраняющихся во взрослом организме [5, 7, 8].

На основе данных свойств МСК нашли применение в различных областях медицины человека и ветеринарной медицины: накоплен опыт успешного применения МСК при лечении инфаркта миокарда, кардиомиопатии, сахарного диабета, печеночной недостаточности, различных нейродегенеративных заболеваниях, травмах, иммунопатологических состояниях. Кроме того, МСК могут быть использованы для лечения последствий ожогов различной локализации и этиологии, келоидных и гипертрофических рубцов, заживления трофических язв, ишемии нижних конечностей, токсических гепатитов, а также в травматологии и челюстно-лицевой хирургии [5, 8, 9]. В ряде исследований показано иммуносупрессорное действие МСК, что обусловило применение их для лечения иммунопатологических состояний, как тяжелых - «реакция трансплантат против хозяина» и рассеянный склероз, так и таких часто встречающихся, как аллергические реакции различной этиологии и тяжести. Известно, что МСК способны оказывать подавляющее действие на функциональную активность Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток и естественных киллеров, причем эта система работает по принципу обратных связей.

Наряду с изучением культур МСК человека, были выделены и описаны МСК других видов животных (крысы, мыши, кролика, собаки, кошки) [10, 11, 12].

Также имеются сообщения зарубежных авторов о выделении мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) из КМ крупного рогатого скота [13, 6, 15]. Проводятся исследования по выделению ММСК из КМ свиней [16, 17], из КМ лошадей [18], из КМ овец [19].

На сегодняшний день, для домашних животных разработаны и внедрены в клиническую практику регенеративные методики, основанные на применении изолированных аутологичных и аллогенных МСК. В мире существует ряд клиник, специализирующихся на оказании услуг по трансплантации аутологичных клеток костного мозга и жировой ткани домашним животным: собакам, кошкам и лошадям. Спектр патологий, при которых назначается подобная терапия, очень широк – это дегенеративные, воспалительные, травматические поражения внутренних органов, кожи и опрото-двигательного аппарата, а также поддерживающая терапия возрастных животных [3].

В связи с разработкой протоколов эффективного выделения, быстрого накопления биомассы МСК и их направленной индукции, возможно дальнейшее расширение сферы их применения, в частности, в ветеринарной медицине продуктивных животных, сельскохозяйственной и пищевой

биотехнологии. Огромный ущерб сельскому хозяйству наносят инфекции сельскохозяйственных животных, вызванные вирусами: парагриппа, лейкоза крупного рогатого скота, инфекционного ринотрахеита, диареи, трансмиссивного гастроэнтерита свиней, африканской чумы, ринопневмонии лошадей и другие. Особую опасность представляют инфекции, которые передаются от животного к человеку. Для борьбы с ними необходимо производить антигены, диагностические препараты, вакцины. Однако в биотехнологии промышленного производства до сих пор остается острая необходимость в разработке эффективных способов культивирования и наращивания патогенов *in vitro* на чувствительных биологических объектах. В связи с этим, вопросы изучения развития инфекционных процессов в культуре клеток имеют огромное значение для исследований, связанных с безопасностью сельскохозяйственных животных и человека. Следует заметить, что отсутствие адекватных модельных клеточных систем существенно сдерживает данные исследования. Известно, что для многих вирусов, например коронавирусы, существует ряд проблем, связанных с отсутствием культур клеток, эффективно обеспечивающих их размножение *in vitro*. Перевиваемые культуры клеток, которые используются в этих целях, как правило, иммортализируются, и в результате длительного культивирования теряют свою тканевую и видовую специфичность. Диплоидные культуры клеток, полученные из тканей и органов млекопитающих, сохраняют свою видовую и тканевую специфичность, однако имеют ограниченный период пролиферации *in vitro* вследствие старения (не могут *in vitro* преодолеть более 50 цитогенераций). В связи с этим использование для этих целей стволовых клеток (СК), выделенных из тканей и органов взрослой особи, является актуальным. Особенно перспективными в данном направлении являются ММСК. Получение новых культур стволовых клеток позволит определить чувствительность ММСК к вирусной инфекции и изучить развитие инфекции в МСК, индуцированных к дифференцировке в клетки заданной ткани. Выделенная культура клеток может представлять удобную модельную систему для изучения инфекций *in vitro* в дифференцированных и стволовых клетках. Получение культур стволовых клеток с уникальными характеристиками будет способствовать созданию технологических предпосылок для получения искусственных биологических тканей с заданными свойствами *in vitro*. Культура МСК представляет собой перспективный материал для получения трехмерных тканевых трансплантатов и их тестирования в организме животного [14].

Применение в свиноводстве. Применение клеточных технологий, основанных на МСК, в практике свиноводства пока развито недостаточно, однако имеет свои перспективы. В ряде работ по изучению МСК свиньи продемонстрирована возможность выделения клеток, соответствующих

критериям МСК (адгезия к пластику, фибробластоподобная форма клеток на протяжении нескольких пассажей, способность к дифференцировке *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондробласты). Были разработаны протоколы для выделения МСК из костного мозга и жировой ткани свиней и продемонстрирована дифференцировка в различные мезенхимальные клетки ткани [16, 20].

Для индукции адипогенной и остеогенной дифференцировки МСК свиньи культивировали в средах, содержащих специфичные факторы, стимулирующие адипо- и остеогенез, соответственно. При культивировании в остеогенной среде большинство клеток были позитивны по окрашиванию на щелочную фосфатазу, которая является ранним маркером остеогенеза. Также дифференциация по остеогенной линии сопровождается отложением кальция. При индукции адипогенной дифференцировки наблюдалось резкое изменение формы клеток из фибробластоподобных клеток в сферическую форму (Грегуар и соавт. 1998), накопление нейтральных внутриклеточных липидов, которые позитивно окрашивались раствором Oil Red O. [21]

Кроме того, результаты ПЦР и вестерн-блоттинга показывали, что индуцированные клетки экспрессировали адипогенные маркерные гены (PPAR- γ , C/EBP- α , perilipin, aP2) мРНК или белки (такие PPAR- γ , perilipin, aP2). Также, мск-км свиньи были индуцированы в миоциты в миогенной среде с добавлением 5-азациитидина, основного фактора роста фибробластов, экстракта эмбриона цыпленка и лошадиной сыворотки. Были найдены в индуцированных клетках миогенные маркерные гены (Myf5, десмин) мРНК или белков (Myf5, MyoD, myogenin, десмин). Кроме того, эти данные подтвердили результаты иммунофлюоресценции, при котором окрашивание миогенных маркеров (Myf5, MyoD, myogenin, desmin, S-MyHC) белков было положительными в индуцированных клетках [17, 20].

Основной сферой исследования МСК свиней в настоящее время является использование их в репродуктивной ветеринарной медицине. Существует ряд публикаций, в которых активно используют МСК, выделенные из костного мозга, жировой ткани и периферической крови свиней. Ядра МСК, культивируемых *in vitro* в течение 2-3 пассажей, были перенесены в энуклеированные свиные яйцеклетки. В качестве варианта сравнения использовались яйцеклетки с перенесенными ядрами соматических эпидермальных клеток. В результате было показано, что длительность деления исследуемых культур существенно не увеличивалась по сравнению с контролем, однако количество эмбрионов, прошедших путь дробления до стадии бластоцисты, возрастало в два раза. Полученные данные свидетельствуют о повышении эффективности соматического клонирования при использовании МСК в качестве клетки-донора ядра по сравнению с ядрами

дифференцированных клеток [15, 16, 22, 23, 24]. Также важным результатом данного исследования является описание технологии получения МСК из периферической крови животных – доноров, что расширяет возможность работы с аутологичным материалом и упрощает его забор [25]. Еще одним перспективным направлением использования МСК свиней, является их использование в тканевой инженерии с последующей трансплантацией человеку.

В исследовании Schubert et al. использовали нокаутированных по этому гену свиней (Gal-KO) с целью оценить пригодность их МСК для тканевой инженерии. В частности, анализировали иммуномодулирующие характеристики МСК, их способность к остеогенной дифференцировке и их иммуногенность. Сравнивали также кинетику пролиферации и остеогенной дифференцировки человеческих и свиных МСК жировой ткани, а также их способность к формированию костной ткани *in vivo*. Кроме того, сравнивали гуморальную иммунную реакцию на свиные МСК Gal+ и МСК Gal-KO и иммуномодулирующие свойства этих клеток *in vitro*. Реакции иммунного отторжения ксенографтов на основе свиных МСК, вступивших в остеогенную дифференцировку, оценивали на модели иммунокомпетентных грызунов. Было установлено, что размножение и дифференцировка МСК и формирование костной ткани происходит значительно быстрее при использовании свиных клеток, чем человеческих [26].

Исследование рисков. Таким образом, можно выделить ряд обязательных этапов, которые клетки, выделенные из организма непосредственно, должны проходить для их подготовки к трансплантации – это селекция по адгезии к пластику, иммунофенотипирование, культивирование *in vitro* для накопления необходимого реципиенту количества клеток. Согласно данным ряда исследований, при увеличении объема клеточной массы методом пассирования в культуре, происходит рост относительного числа клеток с абберациями и анеуплоидиями, дающие в последствии аномальные клеточные линии, которые, в свою очередь, могут обуславливать предрасположенность к развитию онкологических заболеваний или являться прямой причиной злокачественной трансформации. Однако изменение кариотипа МСК при пассировании было установлено не всеми авторами. Таким образом, вопрос об изменениях кариотипа ММСК в культуре остается открытым. С учетом закономерности хромосомной нестабильности и ее значимости в онкогенезе, очевидна необходимость выявления клеточных линий, несущих хромосомные перестройки, и исключения их из дальнейшего использования в терапии [27].

Среди аномалий кариотипа ММСК – одни авторы обнаруживают анеуплоидию – отличное от нормального число хромосом, другие – выявляют структурные абберации хромосом. Также исследователи отмечают

сочетанные аномалии, при которых идентифицируют как анеуплоидный хромосомный набор, так и структурно перестроенные хромосомы [28]. Выделяют несколько факторов, влияющих на изменения кариотипа МСК *in vitro* – это биологические свойства стволовых клеток, особенности условий культивирования и индивидуальные свойства генома донора клеток, предрасполагающие к появлению хромосомных aberrаций.

В работах по изучению стабильности генома трансгенных свиней, было продемонстрировано, что в ряде случаев трансгенез сопровождается хромосомными перестройками. Кариотип у всех обследованных трансгенных свиней в большинстве клеток содержал 38 хромосом, однако часть клеток несли различные aberrации, большинство которых связаны с хроматидными разрывами и транслокациями различных хромосом. Это исследование подтвердило, что интеграция экзогена в геном организма-хозяина оказывает дестабилизирующее влияние на хромосомный набор, что необходимо учитывать при сохранении и размножении трансгенных животных [29, 30].

Литература

1. Повещенко О.В. Способы выделения и условия культивирования мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека, полученной из различных источников / О.В. Повещенко, А.П. Колесников, И.И. Ким // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – № 5. – С. 90–95.
2. Conget P.A. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells / P.A. Conget, J.J. Minguell // *J Cell Physiol.* – 1999. – V. 181. – P. 67–73.
3. Калиновский А.А. Актуальные проблемы применения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в современной ветеринарной медицине [Электронный ресурс] / А.А. Калиновский // *Ветеринария Кубани.* – 2011. – №3. – Режим доступа к журн.: http://vetkuban.com/num3_11-12.html.
4. Dominici M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C. Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, E.M. Horwitz // *Cytotherapy.* – 2006. – V 8, Issue 4. – P. 315–317.
5. Савченкова И.П. Дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, выделенных из костного мозга и подкожно-жировой клетчатки человека, в клетки костной ткани / И.П. Савченкова, М.С. Ростовская, Н.И. Чупикова, С.З. Шарифуллина, А.С. Тепляшин // *Цитология.* – 2008. – Т.50 (10). – С. 855–860.
6. Bosnakovski D. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells / D. Bosnakovski, M. Mizuno, G. Kim, S.

Takagi, M. Okumura, T. Fujinaga // Cell Tissue Res. – 2005. – V. 319 (2). – P. 243–253.

7. Петренко Ю.А. Выбор условий индукции дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в инсулинпродуцирующие клетки *in vitro*. / Ю.А. Петренко, С.П. Мазур, В.П. Грищук // Гены и клетки. – 2011. – № 1. – Т.6.– С. 73–79.

8. Тепляшин А.С. Характеристика мезенхимальных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга и жировой ткани / А.С. Тепляшин, С.В. Коржикова, С.З. Шарифуллина, Н.И. Чупикова, М.С. Ростовская, И.П. Савченкова // Цитология. – 2005. – Т.47 (2). – С.130–135.

9. Pittenger M.F. Multilineage Potential of adult human mesenchymal stem cells / M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak // Science. – 1999. – V.284. – P.143–147.

10. Csaki C. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. / C. Csaki, U. Matis, A. Mobasheri, H. Ye, M. Shakibaei // Histochem Cell Biol. – 2007. – P. 507–520.

11. Закирова Е.Ю. Использование мезенхимальных стромальных клеток для лечения посттравматических язв роговицы у кошек. // Е.Ю. Закирова, А.Н. Валеева, Р.Р. Файзуллина, Р.Ф. Ахметшин, Л.В. Нефедовская, А.А. Ризванов // Гены & Клетки. – 2015. – Т. X, №3. – С. 49–55.

12. Пошелок Д.М. Особенности колониеобразования мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крыс после гипотермии [Электронный ресурс] / Д.М. Пошелок, С.В. Малышкина, О.А. Никольченко // Universum: Медицина и фармакология – электрон. научн. журн. – 2014 – № 10 (11). – Режим доступа к журн.: [https://docs.google.com/viewer?url=http://7universum.com/pdf/med/10\(11\)/Poshelok.pdf](https://docs.google.com/viewer?url=http://7universum.com/pdf/med/10(11)/Poshelok.pdf).

13. Bosnakovski D. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system / D. Bosnakovski, M. Mizuno, G. Kim, T. Ishiguro, M. Okumura, T. Iwanaga, T. Kadosawa, T. Fujinaga // Experimental Hematology. – 2004. – V. 32. – P. 502–509.

14. Викторова Е.В. Чувствительность мультипотентных мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота, к вирусам *in vitro* / Е.В. Викторова, А.Ф. Шуляк, М.И. Гулюкин, И.П. Савченкова // Ветеринарная медицина. – 2012. – В. 96. – С. 82–84.

15. Colleoni S. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells / S. Colleoni, G. Donofrio, I. Lagutina, R. Duchi, C. Galli, G. Lazzari // Cloning and stem cells. – 2005. – V. 7 (3). – P. 154–166.

16. Bosch P. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells / P. Bosch, S.L. Pratt, S.L. Stice // *Biology of Reproduction*. – 2006. – V. 74 (1). – P. 46-57.

17. Ringe J. Porcine mesenchymal stem cells: induction of distinct mesenchymal cell lineages / J. Ringe, C. Kaps, B. Schmitt, K. Buscher, J. Bartel, H. Smolian, O. Schultz, G.R. Burmester, T. Haupl, M. Sittinger. // *Cell and Tissue Research*. – 2002. – V. 307 (3). – P. 321–327.

18. Smith R.K. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment / R.K. Smith, M. Korda, G.W. Blunn, A.E. Goodship // *Equine veterinary journal*. – 2003. – V. 35 (1). – P. 99–102.

19. Rentsch C. Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds / C. Rentsch, R. Hess, B. Rentsch, A. Hofmann, S. Manthey, D. Scharnweber, A. Biewener, H. Zwipp // *In vitro cellular and developmental biology – animal*. – 2010. – V. 46 (7). – P. 624–634.

20. Du Min-qing. Characterization and Differentiation into Adipocytes and Myocytes of Porcine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells / Du Min-qing, Huang Yue-qin, Lu Nai-Sheng, Shu Gang, Zhu Xiao-tong, Wang Li-na, Gao Ping, Xi Qian-yun, Zhang Yong-liang, Wang Song-bo, Jiang Qing-yan // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2014. – V. 13 (4). – P. 837–848.

21. Qu Cq. Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells / Cq Qu, GH Zhang, LJ Zhang, GS Yang. // *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. – 2007. – 43(2). – P. 95–100.

22. Jin H.F. Enhanced development of porcine embryos cloned from bone marrow mesenchymal stem cells. / H.F. Jin 1, B.M. Kumar, J.G. Kim, H.J. Song, Y.J. Jeong, S.K. Cho, S. Balasubramanian, S.Y. Choe, G.J. Rho // *Int J Dev Biol*. – 2007. – 51 (1). – P. 85–90.

23. Lee S.L. Developmental ability of miniature pig embryos cloned with mesenchymal stem cells. / S.L. Lee 1, E.J. Kang, G.H. Maeng, M.J. Kim, J.K. Park, T.S. Kim, S.H. Hyun, E.S. Lee, G.J. Rho // *J Reprod Dev*. – 2010. – 56 (2). – P. 256–62.

24. Mario A. Pre- and Postimplantation Development of Swine-Cloned Embryos Derived from Fibroblasts and Bone Marrow Cells after Inhibition of Histone Deacetylases / A. Mario Martinez-Diaz, Che Limei, Marcelo Albornoz, Marcelo M. Seneda, Daryn Collis, Ana Rita S. Coutinho, Nayala El-Beirouthi, Denyse Laurin, Xin Zhao, Vilceu Bordignon // *Cellular Reprogramming*. – 2010. – 12 (1). – P. 85–94.

25. Faast R. Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs / R. Faast, S.J.

Harrison, L.F. Beebe, R.J. Ashman, M.B. Nottle // Cloning Stem Cells – 2006. – 8(3). – P. 166–73.

26. Schubert T. Galactosyl-knock-out engineered pig as a xenogenic donor source of adipose MSCs for bone regeneration. / T. Schubert, H. Poilvache, C. Galli, P. Gianello, D. Dufrane // Biomaterials. – 2013. – 34 (13). – P.3 279–89.

27. Borgonovo T. Emergence of clonal chromosomal alterations during the mesenchymal stromal cell cultivation [Електронний ресурс] / T. Borgonovo, M.M. Solarewicz, I.M. Vaz, D. Daga, C.L. Rebelatto, A.C. Senegaglia, E. Ribeiro, I.J. Cavalli, P.S. Brofman // Cytogenet. – 2015. – Режим доступа к журн.: <http://www.pubfacts.com/detail/26628918/Emergence-of-clonal-chromosomal-alterations-during-the-mesenchymal-stromal-cell-cultivation>.

28. Inoue K.I. Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells. / K.I. Inoue, S. Noda, N. Ogonuki, H. Miki, S. Inoue, K. Katayama, K. Mekada, H. Miyoshi, A. Ogura // Stem Cells. – 2007. – 25 (5). – P. 1279–1285.

29. Dariolli R. Porcine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Retain Their Proliferative Characteristics, Senescence, Karyotype and Plasticity after Long-Term Cryopreservation [Електронний ресурс] / R. Dariolli, V. Bassaneze, J.S. Nakamuta, S.V. Omae, L.C. Gastalho Campos, J.E. Krieger // Plos One. – 2013. – 9. – Режим доступа к журн.: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067939>.

30. Эрнст Л.К. Цитогенетическая характеристика свиней, трансгенных по гену релизинг-фактора гормона роста человека ММТ1/RHGH mt1/Rhgh / Л.К. Эрнст, Н.А. Волкова, П.М. Кленовицкий, Н.А. Зиновьева, В.А. Багиров, С.С. Данч, Г. Брем // Сельскохозяйственная биология. – 2008. – № 2. – С. 40–46.

**ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ
СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН СВИНІ У ВЕТЕРИНАРІЇ ТА
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ**

Щербак О.В., к. с.-г. н., доцент,

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

Баглай О.А.,

lykova.a.olga@gmail.com

Новікова О.Ю., Лаврик О.А.

ПАТ «Фармстандарт – Біолік», м. Харків

Анотація. Представлено огляд літератури щодо основних джерел отримання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), можливість їх диференціювання в різні типи тканини. Розглянуто основні критерії іденти-

фікації МСК і сфери їх застосування у ветеринарній медицині, сільськогосподарській біотехнології, зокрема у свинарстві. Вказані потенційні ризики використання МСК, зокрема – аберації хромосом в процесі їх накопичення *in vitro*. Дані ризики зумовлюють необхідність постійного цитогенетичного контролю МСК в процесі їх накопичення.

Ключові слова: Мезенхімальні стромальні клітини свині, хромосомні аберації.

**ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК СВИНЬИ В ВЕТЕРИНАРИИ И
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Щербак Е.В., к. с.-г. н., доцент,

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Баглай О.А.,

lykova.a.olga@gmail.com

Новикова О.Ю., Лаврик А.А.

ПАО «Фармстандарт – Биолек», г. Харьков

Аннотация. Современные возможности практического использования мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в клинической практике обусловлены их широким дифференцировочным потенциалом. В мире широко применяется трансплантация аутологичных клеток костного мозга и жировой ткани домашним животным для лечения широкого спектра патологий. Среди них различные дегенеративные, воспалительные, травматические поражения внутренних органов, кожи и опорно-двигательного аппарата. Данный метод используется также в качестве поддерживающей терапии возрастных животных.

Рядом авторов было показано, что МСК, выделенные из костного мозга, способны при определенных условиях подвергаться дифференцировке в клетки тканей, имеющих как мезодермальное происхождение, так и экто- и эндодермальное происхождение, что свидетельствует в пользу сохранения более широкого дифференцировочного потенциала ряда клеток взрослого организма.

Выделенная культура клеток может представлять удобную модельную систему для изучения инфекций *in vitro*, так как в биотехнологии промышленного производства до сих пор остается острая необходимость в разработке эффективных способов культивирования и наращивания патогенов *in vitro* на чувствительных биологических объектах.

Согласно данным ряда исследований, при пассировании клеток, происходит рост числа клеток с аберрациями хромосоми анеуплоидией. Данные аномальные клетки при трансплантации могут являться причиной злокачественных трансформаций. Однако изменение кариотипа МСК при пас-

Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини

сировании было установлено не всеми авторами. Таким образом, вопрос об изменениях кариотипа МСК в культуре остается открытым. С учетом закономерности хромосомной нестабильности и ее значимости в онкогенезе, очевидна необходимость выявления клеточных линий, несущих хромосомные перестройки, и исключения их из дальнейшего использования в терапии.

Выделяют несколько факторов, влияющих на изменения кариотипа МСК *in vitro* – это биологические свойства стволовых клеток, особенности условий культивирования и индивидуальные свойства генома донора клеток, предрасполагающие к появлению хромосомных aberrаций

Применение перспективных клеточных технологий, с использованием МСК, в практике свиноводства пока развито недостаточно. В ряде работ по изучению МСК свиньи продемонстрирована возможность выделения клеток, соответствующих критериям МСК (адгезия к пластику, фибробластоподобная форма клеток на протяжении нескольких пассажей, способность к дифференцировке *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондробласты). Были разработаны протоколы для выделения МСК из костного мозга и жировой ткани свиней и продемонстрирована дифференцировка в различные мезенхимальные клетки ткани. Основной сферой исследования МСК свиней в настоящее время является использование их в репродуктивной ветеринарной медицине.

Основываясь на проведенном анализе литературных данных можно свидетельствовать о повышении эффективности соматического клонирования при использовании МСК в качестве клетки-донора ядра по сравнению с ядрами дифференцированных клеток.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки свиньи, хромосомные aberrации.

APPLICATION PROSPECTS PORCINE MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN VETERINARY MEDICINE AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

Sherbak E.V., PhD

Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkov

Baglay O.A., lykova.a.olga@gmail.com

Novikova O.Yu., Lavrik A.A.

PJSC «Pharmstandart – Biolek», Kharkov

Summary. Current possibilities of the practical using of mesenchymal stromal cells (MSC) in clinical practice are caused by their wide differentiation potential. Transplantation of autologous cells from bone marrow and adipose tissue to domestic animals is widely used in the world veterinary practice for the treatment of a wide range of pathologies. Among them are various degenerative,

inflammatory and traumatic injuries of internal organs, skin and musculoskeletal system. Also this method is used for maintenance therapy for aged animals.

Several authors have shown that MSC, isolated from bone marrow have ability to differentiate into the cells of tissues with mesodermal origin, and ecto- and endodermal origin under certain conditions. This argues in favor of reservation of high differentiation potential of a number of adult organism cells.

The derived cell culture can be the convenient model system to study infections in vitro because it is urgent necessity in effective cell culture cultivating still remain in industrial biotechnology. According to several studies, rising up of the cells number with chromosome aberrations and aneuploidy occurs after the passaging cells. The abnormal cells transplantation can lead to malignant tumors. However, the changes in the MSC karyotype during passaging was not established by all authors. Thus, the question about MSC karyotype changes in culture remains open. Taking into account the patterns of chromosomal instability and its importance in oncogenesis, it is necessary to identify cell lines that carry chromosome rearrangements and exclude them from further using in therapy. There are several factors that influence on MSC karyotype changing: stromal cells biological features, cultivating conditions and individual genome characteristics.

The application of advanced cell technologies, using MSC, in practice of pig breeding is not sufficiently developed. In a number of studies on the pig MSC was demonstrated the ability to isolate cells that satisfy MSC criteria (the plastic adhesion, the fibroblast-like cells after several passages, the ability to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts in vitro). The protocols for MSC isolation from pigs bone marrow and adipose tissue were developed, and it was demonstrated the MSC possibility to differentiate into various mesenchymal cells. Currently, pig MSC studies are using in reproductive veterinary medicine.

Basing on conducted analysis of published data it may indicate that the somatic cloning efficiency increasing during using MSC as a cell nuclei donor compared to differentiated cells nuclei.

Key words: mesenchymal stromal cells, chromosomal aberrations.
