

## **ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН МІОКАРДУ ЩУРА НА РАННІХ ПАСАЖАХ**

**О. С. Ковпак**, здобувач

Науковий керівник – А. Й. Мазуркевич, д-р вет. наук,  
професор

Національний університет біоресурсів і  
природокористування України

Наведено результати цитогенетичного аналізу прогеніторних клітин міокарда щура під час їх культивування *in vitro*. Дослідження стабільності каріотипу культури клітин проводили з першого по шостий пасаж. Виявлено зміни у генетичному апараті клітин, що проявлялись у вигляді анеуплоїдій, поліплоїдій, а також мікроядер, кількість яких змінювалась залежно від пасажу. Однак мінливість каріотипу зазначених клітин не перевищувала спонтанного рівня мутацій, характерного для даного виду тварин.

**Ключові слова:** цитогенетичний аналіз, мікроядерний тест, комітовані клітини, міокард.

**Постановка проблеми.** Парадоксально, але один з найважливіших органів – серце, практично не в змозі самостійно відновлювати м'язову масу, яка була втрачена внаслідок ішемії [0]. Патологічні зміни, що розвиваються у міокарді, викликають тяжкі ускладнення, такі як серцева недостатність, аритмії, аневризми, розрив міокарда і т. д.

**Аналіз останніх наукових досліджень та публікацій.** На жаль, сучасна фармакотерапія і хірургічні методи лікування інфаркту міокарда вичерпують свій лікувальний потенціал, тому увага вчених усього світу направлена на можливість використання альтернативних методів лікування, таких як клітинна терапія [2, 3]. В якості агентів клітинної терапії інфаркту використовуються різноманітні типи клітин: мезенхімальні стовбурові, фетальні кардіоміоцити, міобласти поперечно-посмугованої мускулатури, тощо [4-7]. Варто відмітити, що для клітинної кардіоміопластики необхідна значна кількість клітинного матеріалу, а необхідну кількість можна отримати шляхом тривалого культивування клітин в умовах *in vitro*.

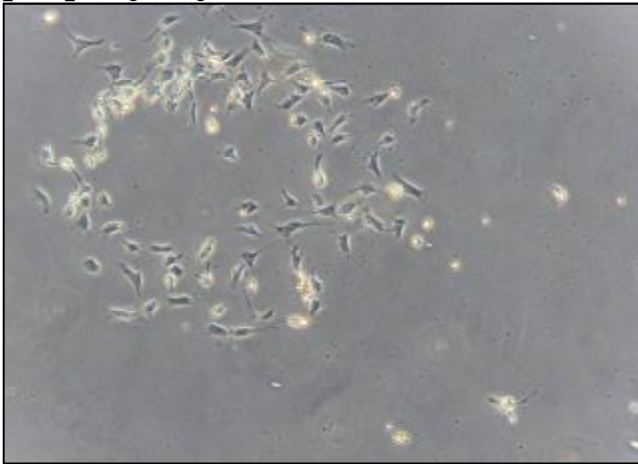
Разом з тим, контроль генетичної стабільності клітинного матеріалу поза організмом є важливим питанням для клітинної

терапії. Опрацьовані дані щодо ризиків неопластичної трансформації клітин *in vitro*, доволі суперечливі [8, 9, 10, 11]. Все це зумовило необхідність подальших досліджень хромосомної стабільності культури прогеніторних клітин міокарда щура у процесі культивування як основної моделі для біологічних досліджень.

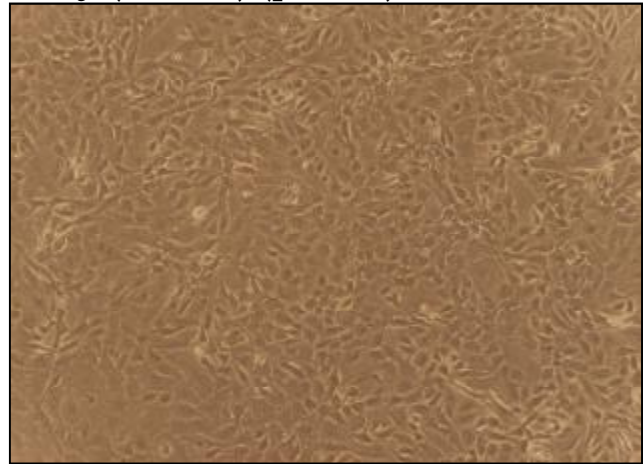
**Мета роботи:** дослідити зміни у каріотипі культури прогеніторних клітин міокарду на ранніх пасажах. Оцінити стабільність отриманої культури.

**Матеріали і методи досліджень.** Експерименти на тваринах були проведені з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року). У досліді використали 9 нелінійних щуренят 12-денного віку.

Евтаназію дослідних тварин здійснювали шляхом декапітації під ефірним наркозом. Серце виймали з грудної порожнини і поміщали в стерильну чашку Петрі, де декілька разів його промивали фосфатно-буферним розчином (“Sigma”, США). Далі серце подрібнювали ножицями на шматочки 1-2мм. Пасажування здійснювали методом експланту з розрахунку 10-15 шматочків на чашку (d=3см) (рис. 1).



*Рис. 1.* Мікрофотографія колонії комітованих стовбурових клітин міокарда *in vitro*, 4 доба культивування. Нативний препарат ок.  $\times 10$ , об.  $\times 5$



*Рис. 2.* Мікрофотографія моношару комітованих стовбурових клітин міокарду, 10 доба культивування(0 пасаж). Нативний препарат. ок.  $\times 10$ , об.  $\times 5$

Культивування проводили у стандартному культуральному середовищі: 80% – середовище Ігла модифіковане Дульбекко (DMEM) (“Sigma”, США); 20% – фетальна сироватка телят (FBS) (“Sigma”, США); 10 мкл/см<sup>3</sup> – антибіотика-антимікотика (“Sigma”, США); у CO<sub>2</sub> інкубаторі за 37°C та 5% концентрації CO<sub>2</sub>, 8 днів до утворення моношару (рис. 2). Клітини знімали за стандартною методикою (розчином 0,25% трипсин/ЕДТА) [12]. Мікроскопічний аналіз і оцінку

культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Молекулярний контроль комітування отриманої культури в кардіоміогенному напрямку здійснювали шляхом виявлення специфічного білка кардіоміоцитів – кардіотропоніну (рис. 3).

Останній виявляли за допомогою моноклональних антитіл, згідно стандартної методики [12]. Аналіз препаратів здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа Leica DMR (Німеччина), збільшення  $\times 400$ ,  $\times 1000$ .

Дослідження проводили на клітинах, отриманих із культури першого-шостого пасажів. Цитогенетичний аналіз проводили на 30 метафазних пластинках прогеніторних клітин міокарда щура з кожного пасажу. Для отримання препаратів хромосом використовували модифікацію стандартного цитогенетичного методу [12]. Отримані препарати забарвлювали за допомогою набору для фарбування (лейкоциф 200), згідно інструкції виробника. Аналіз метафазних пластинок здійснювали за допомогою мікроскопа Leica DMR (Німеччина), збільшення  $\times 400$ ,  $\times 1000$ .

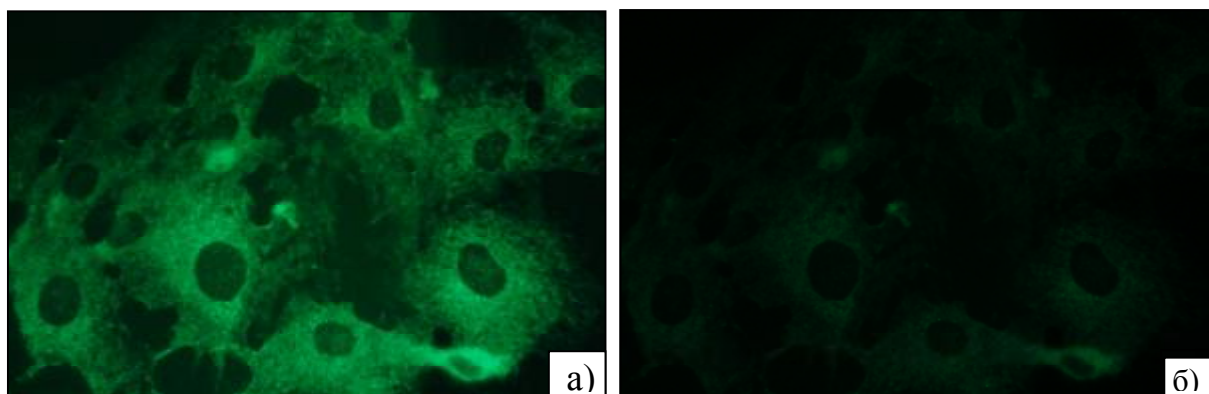


Рис. 3. Флуорисцентна мікроскопія, спрямована на виявлення кардіотропоніну у культурі клітин а) комітовані клітини міокарда; б) МСК (контроль). ок.  $\times 10$ ,

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 (МІ), апоптозні клітини (АП) [13]. Частоту виявлених змін – ДЯ, МЯ, МІ, АП вираховували на 500 клітин (%)

**Результати досліджень та їх обговорення.** Для встановлення генетичної стабільності прогеніторних клітин міокарда щура проаналізували хромосомну мінливість клітин з першого до шостого пасажу. Як видно з результатів, представлених у таблиці 1, для досліджуваної культури характерні кількісні порушення набору хромосом (анеуплоїдія

та поліплоїдія). Проте, варто відмітити, що кількість клітин з порушеним каріотипом не перевищувала спонтанного рівня соматичного мутагенезу властивого для ссавців (6-15%) [14].

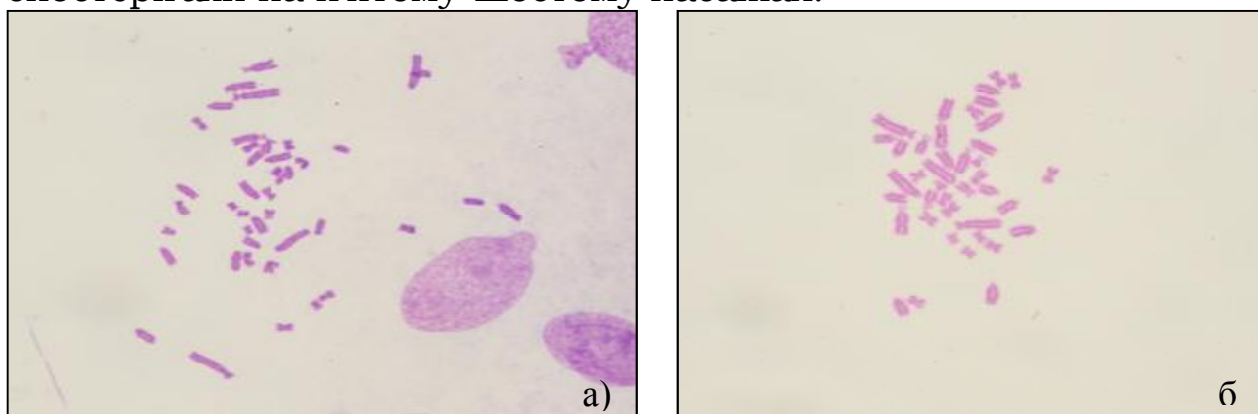
Таблиця 1

**Результати цитогенетичного аналізу прогеніторних клітин міокарду щура I - VI пасажів,  $M \pm m$ ,  $n=3$**

| № пасажу | Клітини з нормальним каріотипом, % | Анеуплоїдія, % | Поліплоїдія, % |
|----------|------------------------------------|----------------|----------------|
| I        | 94,5 ± 1,3                         | 3,3 ± 0,0      | 2,2 ± 1,3      |
| II       | 93,3 ± 0,0                         | 5,6 ± 1,3      | 1,1 ± 1,2      |
| III      | 90,0 ± 0,0***                      | 8,9 ± 1,3*     | 1,1 ± 1,2      |
| IV       | 90,0 ± 0,0***                      | 8,9 ± 1,3*     | 1,1 ± 1,2      |
| V        | 90,0 ± 0,0***                      | 10,0 ± 0,0***  | 0,0 ± 0,0      |
| VI       | 90,0 ± 0,0***                      | 10,0 ± 0,0***  | 0,0 ± 0,0      |

**Примітка:** \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$

Появу клітин з анеуплоїдією (рис. 4, б) відмічали від першого до шостого пасажу у кількості від 3,3 до 10,0%. Зазначимо, що значний відсоток прояву анеуплоїдій склали клітини, каріотип яких дорівнював 38 та 76 хромосом (норма 42). Різниця середніх величин за цією ознакою у популяціях 3-6 пасажів була достовірною у порівнянні з першим пасажем. Варто відзначити, що найвищий рівень анеуплоїдії (10,0%), спостерігали на п'ятому-шостому пасажах.



**Рис. 4. Мікрофотографії метафазних пластинок культури прогеніторних клітин міокарду (1 пасаж), забарвлення Лейкоциф 200, збільшення ок.  $\times 100$ : а) нормальний каріотип,  $n=42$ ; б) анеуплоїдія,  $n=40$ .  $\times 1000$**

Вказані зміни можуть бути пояснені тим, що, очевидно, в процесі культивування клітинної маси *in vitro* в культурі індукується нагромадження генетичних помилок, що і призводить до збільшення кількості клітин з генетичними аномаліями з кожним пасажем [15].

Кратне збільшення числа хромосом (поліплоїдія) відмічали у популяції клітин з першого по четвертий пасаж. Починаючи з другого пасажу спостерігали тенденцію до зменшення даної геномної мутації до 0,0%. Отриманий нами результат поліплоїдій був нижчим від рівня характерного для спонтанної хромосомної мінливості у ссавців (6-15%) [14,15].

Одночасно нами був проведений мікроядерний тест для оцінки цитогенетичних змін прогеніторних клітин міокарда щурів. Його результати наведені в табл. 2 та на Рис. 5.

Таблиця 2

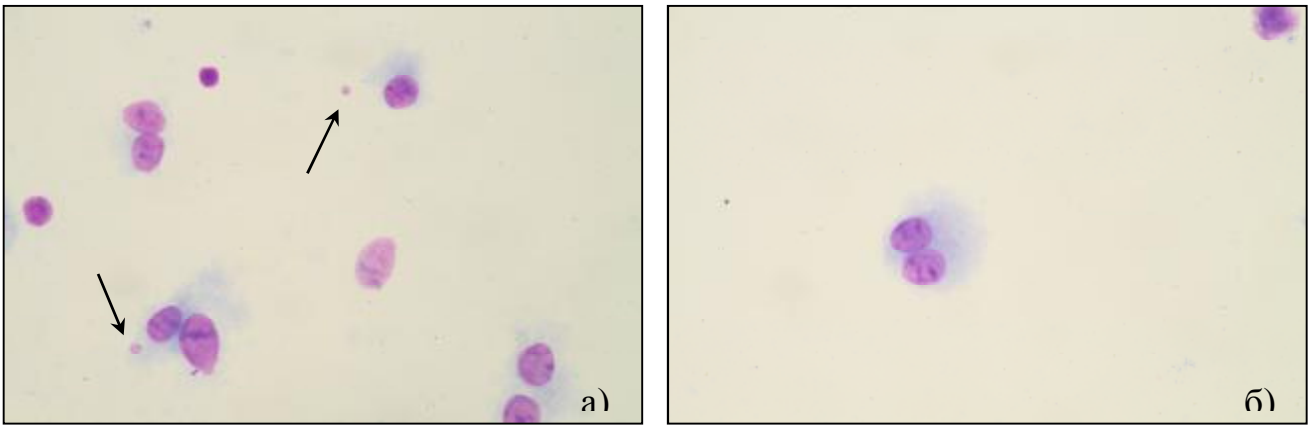
**Результати мікроядерного тесту прогеніторних клітин міокарда щура на ранніх пасажах культивування,  $M \pm m$ , n=3**

| № пасажу | Клітини з нормальним ядром, % | Клітини з мікроядрами, % | Двоядерні клітини, % | Апоптоз, % | Мітотичний індекс, % |
|----------|-------------------------------|--------------------------|----------------------|------------|----------------------|
| I        | 99,6 ± 0,0                    | 0,1 ± 0,1                | 0,3 ± 0,1            | 0,0 ± 0,0  | 3,7 ± 0,1            |
| II       | 99,6 ± 0,0                    | 0,1 ± 0,1                | 0,3 ± 0,1            | 0,0 ± 0,0  | 3,4 ± 0,1            |
| III      | 99,4 ± 0,0***                 | 0,3 ± 0,1                | 0,3 ± 0,1            | 0,0 ± 0,0  | 3,0 ± 0,1**          |
| IV       | 99,4 ± 0,0***                 | 0,3 ± 0,1                | 0,3 ± 0,1            | 0,0 ± 0,0  | 2,1 ± 0,1***         |
| V        | 99,4 ± 0,1***                 | 0,3 ± 0,1                | 0,3 ± 0,1            | 0,0 ± 0,0  | 1,5 ± 0,1***         |
| VI       | 99,4 ± 0,1***                 | 0,3 ± 0,1                | 0,3 ± 0,1            | 0,0 ± 0,0  | 1,4 ± 0,1***         |

**Примітка:** \*- P < 0,05; \*\*- P < 0,01; \*\*\*- P < 0,001.

Як відомо, мікроядра утворюються в результаті нерозходження чи відставання у часі розходження хромосом до полюсів клітини, що призводить до порушення веретена поділу. До складу мікроядра (рис. 5,а) можуть входити, як окремі цілі хромосоми, так і їх фрагменти. Вони є патологічною структурою, і їх утворення пов'язано з хромосомною нестабільністю[13,14].

Результати, наведені у таблиці 2, свідчать про наявність мікроядер на всіх пасажах. Причому, з третього пасажу, спостерігали збільшення їх кількості. Проте, відсоток клітин з мікроядрами знаходився в межах норми для ссавців (1,6-5,6%) [15,16].



*Рис. 5. Мікрофотографії клітин зі змінами у ядрі (4 пасаж), забарвлення Лейкоциф 200, збільшення ок.  $\times 10$ , об.  $\times 100$ : а) клітини з мікроядром; б) двоядерна клітина.  $\times 1000$*

Нами відмічено також наявність двоядерних клітин (рис. 5, б) у культурі прогеніторних клітин міокарда щура з першого до шостого пасажу. Двоядерність у культурі прогеніторних клітин міокарда може пояснюватися морфологічними особливостями даної культури. Під час культивування частина клітин проходить остаточні етапи диференціації з перетворенням на зрілі клітини – кардіоміоцити, однією з особливостей яких є багатоядерність. Однак, їх кількість не змінювалася впродовж пасажування та не перевищувала спонтанної мутації, характерної для ссавців (5,4%) [15, 16].

Під час дослідження відмічали поступове зниження мітотичного індексу з першого (3,7%) до шостого (1,4%) пасажу. Норма для ссавців становить 2,9-4,1% [15, 17].

### **Висновки.**

1. Аналіз каріотипу прогеніторних клітин міокарда щура показав, що за використаних нами умов їх культивування кількість анеуплоїдій (3,3-10,0%) та поліплоїдій (2,2-0,0%) змінюється з пасажами, але не виходить за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців.

2. За результатами цитогенетичної оцінки культури встановлено, що кількість клітин з мікроядрами (0,1-0,3%) та двоядерних клітин (0,3%) знаходиться у межах норми (1-6 пасаж).

3. Клітин у стані апоптозу під час дослідження виявлено не було.

4. Мітотичний індекс знижується з 3,7 до 1,4% з першого до шостого пасажу відповідно.



## Список використаних джерел:

1. Romyantsev P. P. Ultrastructural reorganizational, DNA synthesis, and mitotic division of myocytes in atria of rats with left ventricle infarction // *Virchows Arch.* – 1974. – Vol. 15. – P. 357-378.
2. Smits P. C., van Geuns R. J., Poldermans D., Bountiukos M., Onderwater E. E., Lee C. H., Maat A. P., Seruys P. W. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up // *J Am Coll Cardiol.* – 2003. – Vol. 42. – P. 2063-2069.
3. Hill J. M., Syed M. A., Arai A. E., Powell T. M., Paul J. D., Zalos G., Read E. J., Khuu H., Leitman S. F., Horne M. K., Csako G., Dunbar C. E., Cannon R. O., Outcomes of granulocyte colony-stimulating factor administration to patients with severe coronary artery disease // *Circulation.* – 2004. – Vol. 110 (suppl III). – P. 352.
4. Atkins B. Z., Hueman M. T., Meuchel J. M., Cottman M. J., Hutcheson K. A., Taylor D. A. Myogenic cell transplantation improves in vivo regional performance in infarcted rabbit myocardium // *J Heart Lung Transpl.* – 1999. – Vol. 18, №12. – P. 1173-1180.
5. Watanabe E., Smith D. M., Delcaprio J. B., Sun J., Smart F. W., Van Meter C. H., Claycomb W. C. Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model // *Cell Transplant.* – 1998. – Vol. 7, №3. – P. 239-246.
6. Kawamoto A., Tkebuchava T., Yamaguchi J., Nishimura H., Yoon Y. S., Milliken C., Uchida S., Masuo O., Iwaguro H., Ma H., Hanley A., Silver M., Kearney M., Losordo D. W., Isner J. M., Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia // *Circulation.* – 2003. – Vol. 107, №3 – P. 461-468.
7. Leobon B., Garcin I., Menasche P., Vilquin J. T., Audinat E., Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2003. – Vol. 100, №13. – P. 7808-7811.
8. Izadpanah R. et al. Long-term *In vitro* Expansion Alters the Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells / Izadpanah R., Kaushal D., Kriedt C., Tsien F., et al. // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, №11. – P. 4229-4238.
9. Mareschi K. et al. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow / Mareschi K., Ferrero I., Rustichelli D., Aschero S. et al. // *J. Cell. Biochem.* – 2006. – Vol. 97, № 4. – P. 744-754.
10. Miura M. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. / M. Miura, Y. Miura, N. M. Padilla Nash et al // *Stem. Cells.* – 2005. – Vol. 24. – P. 1095-1103.
11. Rubio D. Spontaneous human stem cell transformation. / D. Rubio, J. GarciaCastro, M. C. Martin et al. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 3035-3039.
12. Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В., Данілов В. Б. Клітинні технології у ветеринарній медицині // Навчальний посібник –

К. :КОМПРИНТ – 2014. – 132с.

13. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей: метод. рекомендации / сост. : Т. С. Колмакова, С. Н. Белик, Е. В. Моргуль, А. В. Севрюков. – Ростов на Дону : РостГМУ, 2013. – 31 с.

14. Ковалева О. А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика. – Киев, 2008. – № 1, – С. 58-72.

15. Микроядерный тест как метод определения сезонной изменчивости цитогенетических показателей у млекопитающих / О. Ковалёва, Н. Кобозева, Е. Бурдо, Т. Глазко // Рарітетна теріофауна та її охорона. Праці Теріологічної школи. – Луганськ, 2008. – №9, – С. 266-269.

16. Xikum X. Observations on micronuclei germ cells / X. Xikum, S. Liming. // Zool. Res. – 1990. – Y. 11. - №4. – P. 343.

17. Эрнст Л. К. Мониторинг генетических болезней животных в системе крупномасштабной селекции / Л. К. Эрнст, А. И. Жигачев – М. : Россельхозакадемия, 2006. – 382с.

**О. С. Ковпак. Цитогенетический анализ прогениторных клеток миокарда крысы на ранних пассажах.**

*Приведены результаты цитогенетического анализа прогениторных клеток миокарда крысы во время их культивирования in vitro. Исследование стабильности кариотипа культуры клеток проводили с первого по шестой пассаж. Выявлены изменения в генетическом аппарате клеток, которые проявлялись в виде анеуплоидий, полиплоидий, а также микроядер, количество которых менялась в зависимости от пассажа. Однако изменчивость кариотипа указанных клеток не превышала спонтанного уровня мутаций, характерного для данного вида животных.*

**Ключевые слова:** цитогенетический анализ, микроядерный тест, прогениторные клетки, миокард.

**О. Ковпак. Cytogenetic analysis of myocardial progenitor cells of rats at early passages.**

*Introduction. Despite significant advances in modern medicine treatment of myocardial infarction neither conservative nor operative methods do not give the desired result. A promising method of treatment of heart pathologies is the using of cellular technology.*

*Progenitor stem cells are poorly expressed complexes of major histocompatibility antigens which reduce likelihood after transplantation complications. In order to use myocardial progenitor cells for clinical purposes the significant quantity of cells is needed, that can be achieved only by long-standing in vitro cultivation. Literature data analysis doesn't give an unambiguous answer regarding genetic stability of myocardial progenitor cells during their in vitro cultivation, which necessitated further research.*

*Goal of the work. Performing of cytogenetic analysis of myocardial progenitor cells of rats at early passages.*



Materials and methods. Myocardial progenitor cells of rats of the first to the sixth passages were used in this research. The cytogenetic analysis was performed on 30 metaphase plates of rat's stem cells from every passage. Slides were obtained through modification of standard cytogenetic method. In the course of the research we considered: quantitative abnormalities of chromosomes – aneuploidy, polyploidy. The same preparations were used to calculate the quantity of binuclear cells, cells with micronuclei, mitotic index, apoptotic cells (frequency was calculated for 500 cells (%)).

Results of research and discussion. Presented the results of cytogenetic analysis of myocardial progenitor cells of rats during in vitro culture. We found alterations in genetic apparatus of cells, that occurred in the form of aneuploidy, polyploidy as well as micronuclei, the amount of which varied depending on the passage. However, the variability of karyotype of the mentioned cells didn't exceed self-existing level of mutations, specific to this animal species.

**Key words:** cytogenetic analysis, micronucleus test, progenitor cells, myocardium.