

16. Nedosjekov, V.V., Polupan, I.M., & Ivanov, M.Ju. Patent 48158 Ukraine, MPK A61K 39/205 (10.03.2010). Sposib oderzhannja antyrabichnoi' giperimunnoi' syrovatky [A method of producing hyperimmune rabies serum] [in Ukrainian].
17. Babkin, M.V., Stegnij, B.T., & Nychyk, S.A. Patent 19403 Ukraine, MPK A61K 39/205 (15.12.2006) Sposib otrymannja antyrabichnoi' giperimunnoi' syrovatky [A method of producing hyperimmune rabies serum] [in Ukrainian].
18. Lakin, G.F. (1990). *Biometrija [Biometry]*. Vysshaja shkola [in Russian].

УДК 576.316: 636.96:611.018

МАЗУРКЕВИЧ А.Й., д-р. вет. наук, проф., e-mail: amaz@nauu.kiev.ua

КОВПАК В.В. канд. вет. наук, e-mail: vitkovpak@mail.ru

КОВПАК О.С., e-mail: alex88-87@yandex.ru

Національний університет біоресурсів і природокористування України

ГУДЗЬ Н.В., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: gudznataly@gmail.com

Інститут ветеринарної медицини НААН

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЩУРІВ НА РІЗНИХ ПАСАЖАХ

Наведені результати цитогенетичного аналізу мезенхімальних стовбурових клітин щурів під час їх культивування in vitro. Дослідження стабільності каріотипу культури клітин проводились з першого по шостий пасаж. Виявлено зміни у генетичному апараті клітин, що проявлялись у вигляді анеуплоїдій, поліплоїдій, а також мікроядер, кількість яких змінювався залежно від пасажу. Кількість клітин з анеуплоїдним набором хромосом становила від 8,9 до 18,9 %, поліплоїдним набором – від 1,1 до 4,4%. Кількість клітин з мікроядрами знаходилась у межах від 0,2 до 1,9 %. Однак, мінливість каріотипу зазначених клітин не перевищувала спонтанного рівня мутацій, характерного для даного виду тварин.

Ключові слова: цитогенетичний аналіз, мікроядерний тест, мезенхімальні стовбурові клітини, пасаж, мутації.

Вступ. Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), відомі також, як стромальні клітини кісткового мозку, є плюрипотентною популяцією стовбурових клітин дорослого організму. Здатність МСК до диференціювання у різноманітні тканинні популяції (остеобласти, хондроцити, адипоцити, міобласти тощо), значно розширює можливості їх використання у регенеративній медицині [1,2]. Окрім того вони мають ряд позитивних якостей: легко виділяються з організму; виділяють широкий спектр біоактивних макромолекул [3]; здатні мігрувати до місця ураження [4] володіють високою проліферативною активністю, що дає змогу збільшувати клітинну масу *in vitro* [5] та гіпоімуногенними властивостями, завдяки чому можуть використовуватися для алогенної трансплантації [3, 6].

Отримані результати доклінічних та клінічних випробувань, свідчать про високу ефективність МСК за використання в якості замісної терапії, у порівнянні з іншими методами лікування. Проте, для клінічного використання

необхідна значна кількість клітинного матеріалу, що можна досягти завдяки тривалому культивуванню клітин в умовах *in vitro*.

Однак постає питання про підтримання генетичної стабільності культури клітин поза організмом. З літературних джерел нами отримано ряд суперечливих даних щодо ризиків неопластичної трансформації клітин *in vitro* [7–11], що і зумовило необхідність подальших досліджень хромосомної стабільності культури МСК у процесі культивування.

Мета роботи: провести цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин щурів на ранніх пасажах.

Матеріали та методи досліджень: Експерименти на тваринах були проведені з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року), Загальних етичних експериментів над тваринами», схвалених Національним конгресом з біоетики і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Мезенхімальні стовбурові клітини отримували з кісткового мозку стегнових, великогомілкових та плечових кісток щурів. Одержану клітинну масу культивували у стандартному середовищі: 80% – середовище Ігла модифіковане Дульбекко (DMEM); 20% – фетальна сироватка телят (FBS); 10 мкл/см³ – антибіотика-антимікотика («Sigma», США). Культивування проводили у CO₂ інкубаторі за 37°C та 5% концентрації CO₂, до утворення моношару 90–100%, клітини знімали за стандартною методикою (0,25%-им розчином трипсин/ЕДТА) [12]. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Цитогенетичний аналіз проводили на 30 метафазних пластинках стовбурових клітин щура з кожного пасажу. Дослідження проводили на клітинах першого-шостого пасажів. Для отримання препаратів хромосом використовували модифікацію стандартного цитогенетичного методу [12]. Фіксацію хромосом проводили через 48 годин після посіву клітин. Колхіцин («Sigma», США) додавали у культуральне середовище у кінцевій концентрації 1×10⁻⁷М та інкубували 4 години за температури 37°C. Клітини з чашок знімали 0,25%-им розчином трипсин/ЕДТА. Після центрифугування, до клітинної суспензії, у об'ємі 1 см³, додавали 9 см³ гіпотонічного розчину KCl (0,56%). Фіксацію хромосом проводили 3–4 рази по 10–20 хв у свіжоприготовленому фіксаторі (крижана оцтова кислота : метанол / 1:3). Отримані препарати забарвлювали за допомогою набору для фарбування (лейкодив 200), згідно інструкції. Аналіз метафазних пластинок здійснювали за допомогою мікроскопа Leica DMR (Німеччина), збільшення ×400, ×1000.

У процесі досліджень враховували: кількісні порушення хромосом – анеуплоїдію (А), поліплоїдію (ПП). На цих самих препаратах підраховували кількість двоядерних клітин (ДЯ), клітин з мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (МІ), апоптозні клітини (АП) [13]. Частоту ДЯ, МЯ, МІ, АП вираховували на 500 клітин (%).

Результати досліджень та їх обговорення. Аналіз каріотипу мезенхімальних стовбурових клітин щурів показав, що для них характерні кількісні порушення (анеуплоїдія та поліплоїдія). Результати досліджень зміни кількості хромосомних порушень приведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Результати цитогенетичного аналізу мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку щурів I–VI пасажів, $M \pm m$, $n=3$

№ пасажу	Клітини з нормальним каріотипом, %	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %
I	90,0 \pm 0,0	8,9 \pm 1,3	1,1 \pm 1,2
II	85,7 \pm 1,3*	13,2 \pm 2	1,1 \pm 1,2
III	80,0 \pm 0,0***	18,9 \pm 1,3**	1,1 \pm 1,2
IV	83,3 \pm 2,0*	14,5 \pm 2,6	2,2 \pm 1,3
V	80,0 \pm 0,0***	15,6 \pm 1,3*	4,4 \pm 1,3
VI	77,8 \pm 1,3***	17,8 \pm 1,3**	4,4 \pm 1,3

Примітка: *– $p < 0,05$; **– $p < 0,01$; ***– $p < 0,001$.

Поява анеуплоїдних клітин (рис.1, в) спостерігалась від першого до шостого пасажу у кількості від 8,9% до 18,9%. Цитогенетичну мінливість (анеуплоїдію) в основному становили гіпоплоїдні клітини, каріотип яких дорівнював ($2n=39$, $2n=30$) хромосом. Різниця середніх величин за цією ознакою у популяціях 3, 5, 6 пасажів була достовірною у порівнянні з першим. Варто відзначити, що найвищий рівень анеуплоїдії (18,9%), спостерігали на третьому пасажі, після чого відмічали зниження кількості анеуплоїдних клітин (4 пасаж) та поступове зростання їх кількості з послідовними пасажами. Поясненням отриманих результатів може бути наступне: програмована смерть клітин *in vitro* можливо індукується нагромадженням генетичних помилок або знищенням чутливості клітин до ростових сигналів, в подальшому ініціюючись рядом сигналів і ферментів, що і відмічалось нами на четвертому пасажі (збільшення відсотку клітин у стані апоптозу) (табл. 2) [14]. В той же час отримані нами показники не перевищували спонтанний рівень соматичного мутагенезу, характерного для ссавців [15].

Кратне збільшення числа хромосом (поліплоїдія) також проявилось у популяції клітин з першого по шостий пасаж (рис.1, б). Поліплоїдії можуть спричинятися відхиленням від нормального ходу мітозу, а також внаслідок злиття двох клітин, що більш характерно для культур клітин [16]. З I по III пасаж відмічали стабільну кількість поліплоїдій – 1,1%. Починаючи з четвертого пасажу спостерігали тенденцію до збільшення даної геномної мутації 4,4%. Проте, отриманий нами результат був нижчим спонтанної хромосомної мінливості для ссавців (6–15%) [15,17].

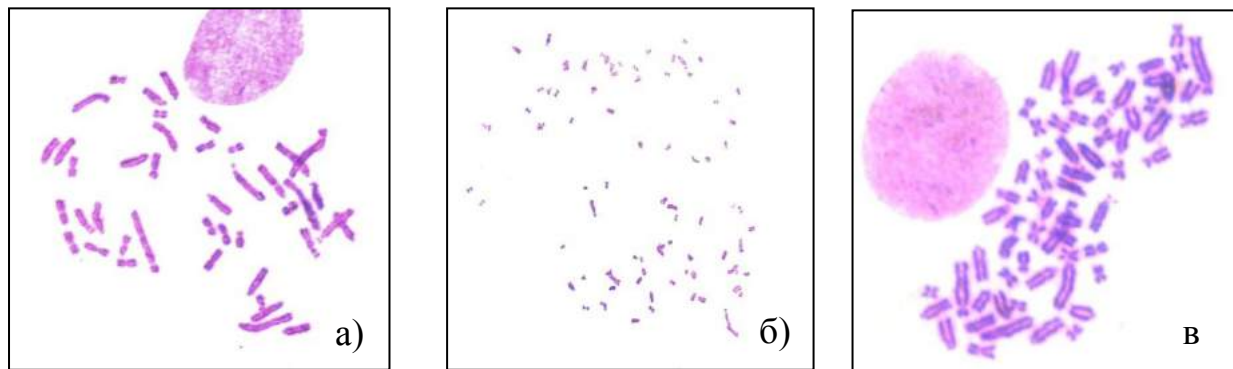


Рис. 1. Метафазні пластинки щура: а) нормальний каріотип, n=42; б) поліплоїдія, n=84; в) анеуплоїдія, n=70 (×1000).

Для оцінки цитогенетичних змін МСК щурів був проведений мікроядерний тест (табл. 2).

Таблиця 2

**Результати мікроядерного тесту МСК щурів на ранніх
пасажах культивування, $M \pm m$, n=4**

№ пасажу	Клітини з нормальним ядром, %	Клітини з мікроядрами, %	Двоядерні клітини, %	Апоптоз, %	Мітотичний індекс, %
I	99,2 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,1	4,1 ± 0,2
II	98,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,1 ± 0,1	3,8 ± 0,1
III	97,2 ± 0,3	1,2 ± 0,1**	1,3 ± 0,1**	0,3 ± 0,1	3,7 ± 0,1
IV	96,3 ± 0,4**	1,4 ± 0,2**	1,6 ± 0,1**	0,7 ± 0,2**	2,7 ± 0,3**
V	95,9 ± 0,4***	1,7 ± 0,1***	1,8 ± 0,1**	0,5 ± 0,1*	3,3 ± 0,1**
VI	95,6 ± 0,2**	1,9 ± 0,1***	2,0 ± 0,1**	0,5 ± 0,1*	3,5 ± 0,1*

Примітка: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Мікроядра – це округлі хроматинові утворення, які виявляються у цитоплазмі клітин в період інтерфази (рис. 2, а). Вони є патологічною структурою, і їх утворення пов'язано з хромосомною нестабільністю. В склад мікроядра можуть входити, як окремі цілі хромосоми, так і їх фрагменти. Мікроядра утворюються в результаті не розходження чи відставання в розходженні хромосом до полюсів клітини, що призводить до порушення веретена поділу [13, 16].

В результаті досліджень культури МСК були виявлені мікроядра на всіх пасажах. При чому, з кожним наступним пасажом, спостерігали достовірне збільшення їх кількості (табл. 2). Однак, відсоток клітин з мікроядрами знаходився в межах норми для ссавців (1,6–5,6%) [17, 18].

Відмічали достовірне підвищення кількості двоядерних клітин (рис. 2, б) у культурі МСК з першого по шостий пасаж, в той же час їх кількість не перевищувала спонтанної мутації характерної для ссавців (5,4%) [17, 18]. Підвищення кількості двоядерних клітин у культурі МСК із збільшенням тривалості культивування, може бути пояснене подовженням клітинного циклу, зокрема цитокінезу.

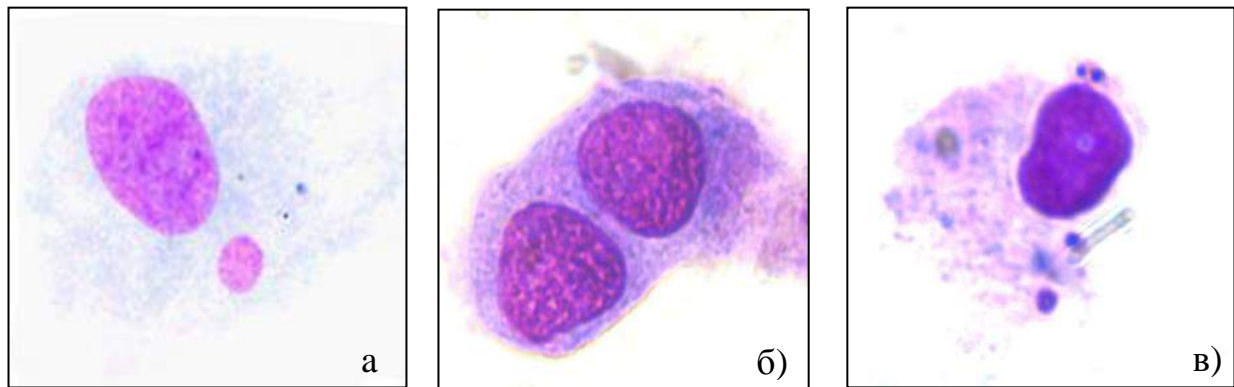


Рис. 2. Мікроядерний тест: а) клітина з мікроядром; б) двоядерна клітина, в) апоптозні тіла ($\times 1000$).

Під час досліджень відмічали зниження мітотичного індексу з першого (4,1%) по четвертий пасаж (2,7%), та його поступове збільшення на п'ятому (3,3%) та шостому (3,5%) пасажах. Норма для ссавців становить 2,9–4,1% [15, 17].

Крім цього, відмічали незначний відсоток клітин у стані апоптозу (рис. 2, в) кількість яких поступово зростала до 4 пасажу (0,7%). На 5–6 пасажах спостерігали зниження кількості клітин у стані апоптозу до 0,5%. Рівень апоптозних клітин знаходився в межах норми.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Аналіз каріотипу культури мезенхімальних стовбурових клітин щурів показав наявність анеуплоїдій (8,9–18,9%) та поліплоїдій (1,1–4,4%), кількість яких змінюється з кожним пасажом, але не виходить за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців.

2. За результатами цитогенетичної оцінки культури МСК з першого до шостого пасажу встановлено, що кількість клітин з мікроядрами (0,2–1,9%), двоядерних клітин (0,5–2,0%) та клітин у стані апоптозу (0,1–0,7%) знаходиться у межах норми.

3. Мітотичний індекс знижується з 4,1% до 2,7% з першого до четвертого пасажу відповідно, після чого поступово зростає до 3,5% (шостий пасаж).

4. Динаміка змін показників, вказаних в пп. 1–3 висновків, свідчить про те, що культура стовбурових клітин щура впродовж перших 6 пасажів залишається генетично стабільною, що має важливе значення для застосування таких клітин у регенеративній медицині.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Eds R.I. Culture of human stem cells / Eds R.I. Freshney, G.N.Stacey, J.M. Auerbach. – Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., USA, 2007. – 343p.
2. Fridenshtein A. Proliferative and differentiation potentials of skeletogenic bone marrow colony-forming cells / A. Fridenshtein, R. Chailakhin // Thitologia, 1986. – № 28. – P. 341–349.
3. Brooke G. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells / Brooke G., Cook M., Blair C. et al // Semin. Cell Dev. Biol., 2007. - №18. – P.846–858.
4. Caplan A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine / Caplan A.I. // J Cell Physiol., 2007. – №213 – P. 341–347.

5. Abdallah B.M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives / Abdallah B.M., Kassem M.J. // *Cell Physiol.*, 2009. – № 218. – P. 9–12.
6. Bernardo M.E. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms / Bernardo M.E., Zaffaroni N., Novara F. et al // *Cancer Res.*, 2007. – № 67. – P. 9142–9149.
7. Izadpanah R. 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.
8. Mareschi K. 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.
9. 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.
10. Rubio D. Spontaneous human stem cell transformation. / D.Rubio, J.GarciaCastro, M.C.Martin et al. // *Cancer Res.*, 2005.– Vol. 65.– P. 3035–3039.
11. Берсенев А.В. Изучение спонтанной онкогенетической трансформации мезенхимальных стволовых клеток человека в культуре / А.В. Берсенев // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, 2005.– № 1.– С.14–16.
12. Мазуркевич А.Й., Ковпак В.В., Данілов В.Б. Клітинні технології у ветеринарній медицині // Навчальний посібник – К.: КОМПРИНТ, 2014. – 132 с.
13. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей: метод. рекомендации / Т.С. Колмакова, С.Н. Белик, Е.В. Моргуль, А.В. Севрюков. – Ростов на Дону: Изд-во РостГМУ, 2013. – 31 с.
14. Мушамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология // Учебное пособие для студентов медицинских вузов. – М.:ООО «Медицинское информационное агентство», 2013. – 544с.
15. Эрнст Л.К. Мониторинг генетических болезней животных в системе крупномасштабной селекции / Л.К. Эрнст, А.И. Жигачев – М: Россельхозакадемия, 2006. – 382 с.
16. Ковалева О.А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих / О.А. Ковалева // *Цитология и генетика*. – Киев, 2008. – № 1. – С. 58–72.
17. 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.
18. Xikum X. Observations on micronuclei germ cells / X. Xikum, S. Liming. // *Zool. Res.* 1990. – Y. 11. – №4. – P.343.
19. Aguilar S. Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung / Aguilar S., Nye E., Chan J. et al // *Stem Cells*, 2007. – №25. – P.1586–1594

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРЫС НА РАЗНЫХ ПАССАЖАХ / Мазуркевич А.Й., Ковпак В.В., Ковпак О.С., Гудзь Н.В.

Приведены результаты цитогенетического анализа мезенхимальных стволовых клеток крыс во время их культивирования in vitro. Исследование стабильности кариотипа культуры клеток проводилось с первого по шестой пассаж. Выявлены изменения в генетическом аппарате клеток, которые проявлялись в виде анеуплоидий, полиплоидии, а также микроядер, количество которых изменяется в зависимости от пассажа.

Количество клеток с анеуплоидным набором хромосом составляло от 8,9 до 18,9%, с полиплоидным набором - от 1,1 до 4,4%. Количество клеток с микроядрами находилось в пределах от 0,2 до 1,9%. Однако изменчивость кариотипа указанных клеток не превышала спонтанного уровня мутаций, характерного для данного вида животных.

Ключевые слова: цитогенетический анализ, микроядерный тест, мезенхимальные стволовые клетки, пассаж, мутации.

CYTOGENETIC ANALYSIS OF MESENCHYMAL STEM CELLS OF RATS AT DIFFERENT PASSAGES / Mazurkiewicz A. Y., Kovpak V.V., Kovpak O.S., Gudz N.V.

Introduction. Mesenchymal stem cells (MSC) represent a pluripotent stem cell pool of adult organism and possess a range of positive characteristics that open infinite possibilities of their utilization in case of degenerative processes. In order to use MSC 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 MSC during their in vitro cultivation, which necessitated further research.

Goal of the work. Performing of cytogenetic analysis of mesenchymal stem cells of rats at early passages.

Materials and methods. Mesenchymal stem 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 stem cells of rats 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 mesenchymal stem cells of rats during their 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.

Conclusion and prospects for further research:

1. The karyotype analysis of mesenchymal stem cells culture of rats showed presence of cases of aneuploidy (8.9–18.9%) and polyploidy (1.1–4.4%), number of which changed with every passage but didn't exceed the limits of self-existing mutagenesis specific to mammals.

2. According to the results of cytogenetic assessment of culture it was determined that quantity of cells with micronuclei (0.2–1.9%), binucleated cell (0.5–2.0%) and cells in apoptotic (0.1–0.7%) state lied within normal limits.

3. Mitotic index decreased from 4.1% to 2.7% from the first to the fourth passage, respectively, and then gradually increased to 3.5% (sixth passage).

4. Dynamics of the indicators listed in paragraphs 1–3 findings suggests that the culture of stem cells of rat during the first 6 passages is genetically stable, which is important for the use of such cells in regenerative medicine.

Keywords: cytogenetic analysis, micronucleus test, mesenchymal stem cells, passage, mutations.

REFERENCES

1. Freshney, R.I., Stacey, G.N., & Auerbach, J.M. (2007). *Culture of human stem cells*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
2. Fridenshtein, A., & Chailakhin, R. (1986). Proliferative and differentiation potentials of skeletogenic bone marrow colony-forming. *Thitologia*, 28, 341-349.
3. Brooke, G., Cook, M., Blair, C. et al (2007). Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 846-858.
4. Caplan, A.I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 213, 341-347.

5. Abdallah, B.M., & Kassem, M. (2009). The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives. *J. Cell Physiol.* 218, 9-12.
6. Bernardo, M.E., Zaffaroni, N., Novara, F. et al (2007). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res.* 67, 9142-9149.
7. Izadpanah, R., Kaushal, D., Kriedt, C., Tsien, F., et al. (2008). Long-term *In vitro* Expansion Alters the Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Res.* 68:11,4229-4238.
8. 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.
9. Miura, M., Miura, Y., Padilla Nash, N.M. et al. (2005). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem. Cells.* 24, 1095-1103.
10. Rubio, D., Garcia Castro, J., Martin, M.C. et al. (2005). Spontaneous human stem cell transformation. *Cancer Res.* 65, 3035–3039.
11. Bercenew, A.B. (2005). Isutschenie cponantnoj onkogenetitscheckoj trancvormazii mesenchimal'nych ctwolowych kletok tschelowecka w kul'ture [The study of spontaneous oncology genetic transformation of human mesenchymal stem cells in culture]. *Kletotschnaja trancplantologija i tkanewaja inzhenerija – Cellular Transplantation and Tissue Engineering*, 1, 14-16 [in Russian].
12. Masurkewitsch, A.J., Kowpak, W.W., & Danilow, W.B. (2014). *Klitinni tehnologii u weterinarnij medizini. Nawtschal'nij pocibnik. [Cellular technologies in veterinary medicine. Study Guide]*. Kyev : KOMPRINT [in Ukrainian].
13. Kolmakowa, T.C., Belik, C.N., Morgul', E.W., & Cewrjukow, A.W. (2013). *Icpol'sowanie mikrojadernogo tecta dla ozenki jevvektivnosti 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. Isd-wo RoctGMU [in Russian].
14. Muschkambarow, N.N., & Kusnezow, C.L. (2013). *Molekuljarnaja biologija. Utschebnoe pocobie dla ctudentow medizinskich wusow [Molecular biology. Textbook for medical students]*. Moscow : Medizinsckoe informazionnoe agentstwo [in Russian].
15. Jernct L.K., & Zhigatschew A.I. (2006). *Monitoring genetitscheckich bolesnej zhiwotnych w cicteme krupnomacshtabnoj celekzii [Monitoring animal genetic diseases in the system of large-scale selection]*. Moscow: Roccel'chosakademija [in Russian].
16. Kovaljowa, 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].
17. Kovaljowa, O., Koboseva, N., Burdo, E., & Glasko, T. (2008). Mikrojadernyj tect kak metod opredelenija cesonnoj ismentschiwocti zitogenetitscheckich pokasatelej u mlekopitajushich [Micronucleus test as a method of determining the seasonal variability of cytogenetic indices in of mammals]. *Raritetna teriovauna ta ii ochorona – Rare fauna and its protection*, 9, 266-269 [in Ukrainian].
18. Xikum, X., & Liming, S. (1990). Observations on micronuclei germ cells. *Zool. Res.*
19. Aguilar, S., Nye, E., Chan, J. et al (2007). Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. *Stem Cells.* 25, 1586-1594.