



УДК 576.316:636.1:602.9:611.018.46

А.Й. МАЗУРКЕВИЧ, докт. вет. наук, професор

М.О. МАЛЮК, канд. вет. наук, доцент

Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ

Л.Ф. СТАРОДУБ, канд. сільгосп. наук, ст. наук. співробітник

Інститут розведення і генетики тварин НААН України, с. Чубинське Бориспільського району Київської області

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ КОНЯ НА РАННІХ ПАСАЖАХ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO*

Результати цитогенетичного аналізу мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня на третьому і четвертому пасажах культивування вказують на те, що мінливість каріотипу зазначених клітин відповідає спонтанному рівню, характерному для цього виду тварин. Отже, клітини коня на третьому і четвертому пасажах культивування не піддаються спонтанній трансформації, тобто їх можна безпечно використовувати тварині-реципієнту для регенеративної терапії.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) ссавців на сьогодні вважаються найбільш перспективним видом аутогенного й алогенного матеріалу для клітинної терапії. МСК було виділено із різних тканин дорослого організму, які характеризуються високою здатністю до проліферації й адгезії, фібробластоподібною морфологією й утворенням колоній у культурі, легко індукованим диференціюванням в остео-, хондро-, міо- й адипогенному напрямі. У процесі наукових досліджень вивчався імунотиповий профіль МСК. Разом з тим отримання «чистих» популяцій мезенхімальних стовбурових клітин за допомогою одного специфічного маркера поки що залишається нездійсненою мрією [5].

Отже, у вивченні біологічних властивостей МСК існує дуже багато завдань і загадок, відповіді на які будуть знайдені через роки копітких фундаментальних досліджень. Однак уже сьогодні проводяться доклінічні й клінічні дослідження щодо введення цих клітин з метою корекції uszkodжених органів і тканин тваринного організму, особливо опорно-рухового апарату. Питання, які стосуються онкогенної безпеки клітинного матеріалу, залишаються маловивченими, але вкрай актуальними, вони визначають майбутнє регенеративної медицини.

Відомо, що кількість мезенхімальних стовбурових клітин при виділенні з організму недостатня для використання з терапевтичною метою, тому їх введенню тварині-реципієнту передують культивування з метою збільшення кількості та звільнення аспірату від прогеніторних клітин. Разом з тим культивування клітинного матеріалу може спричинити появу клітин із абераційним каріотипом, які селективно домінують у культурі, що призведе до «забруднення» клітинного трансплантата трансформованими або навіть злоякісними клітинами.

Із літературних джерел відомо, що старіння клітин пов'язане з втратою активності теломери і зупинкою клітинного циклу. При культивуванні клітин у відповідний момент неминує настає зупинка клітинного циклу. Разом з тим нещодавно для людських клітин було встановлено феномен спонтанного відхилення від зупинки клітинного циклу. Такі процеси призводять до імортальності клітин і виникнення хромосомних аберацій і канцерогенезу [9].

Важливу інформацію було отримано авторами робіт під час дослідження каріотипової мінливості культури МСК людей на ранніх пасажах. При цьому було встановлено, що МСК людей при культивуванні *in vitro* впродовж декіль-

кох місяців зберігали нормальний каріотип. Здатність утворення пухлин *in vivo* проводили на імунodefіцитних опромінених мишах, яким вводили свіжовиділений клітинний матеріал. При цьому не було встановлено жодних ознак туморогенезу. Разом з тим МСК, які культивувалися протягом 6 місяців, змінювалися морфологічно, а при каріотипуванні більшість клітин мали трисомії й тетраплоїдії. Через 4–6 тижнів після внутрішньовенної трансплантації імунodefіцитним мишам спостерігали розвиток множинних пухлин практично в усіх органах дослідних тварин. Слід відзначити науково обґрунтовані дослідження, які засвідчують, що МСК кісткового мозку людини легко іморталізуються й після 256 подвоєнь дають ріст пухлин *in vivo* у 100 % випадків [11]. Цікаво, що МСК миші також піддаються спонтанній трансформації у культурі й демонструють подібну до людських клітин злоякісність *in vivo* [15].

Біологічна здатність МСК до онкогенної трансформації залишається дискусійною. Так, Kassem і співавт. науково підтверджують, що при тривалому пасажуванні МСК, виділених із кісткового мозку людини, ознак іморталізації після 40 подвоєнь клітинного матеріалу не виявлено [17].

Детальні цитогенетичні дослідження, проведені окремими дослідниками, свідчать про високий рівень анеуплоїдії в людських культурах МСК кісткового мозку і жирової тканини на ранніх і пізніх пасажах, що вказує на необхідність проведення ретельного генетичного моніторингу цих клітин у разі використання їх для клітинної терапії [2, 3].

© А.Й. Мазуркевич, М.О. Малюк, Л.Ф. Стародуб, 2014



Отже, застосування МСК з терапевтичною метою має визначитися даними щодо їх онкогенної безпеки, а цитогенетичні дослідження стовбурових клітин, поряд з іншими параметрами оцінки якості, є одним з важливих етапів контролю, що дозволяє встановити генетичну стабільність культури клітин.

Разом з тим описані дослідження каріотипової мінливості клітинного матеріалу проводяться на ембріональних і мезенхімальних стовбурових клітинах людей і лабораторних мишей. Однак протоколів досліджень, які стосуються кролів, котів, собак і коней, у доступній літературі не виявлено.

Отже, цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин тварин має як теоретичне, так і практичне значення. При цьому вивчення стабільності каріотипу МСК кісткового мозку коней під час культивування *in vitro* на ранніх пасажах є своєчасним і актуальним завданням.

Мета роботи – встановити закономірності хромосомної мінливості мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня на ранніх пасажах культивування.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Цитогенетичний скринінг включав аналіз 30 метафазних пластинок стовбурових клітин коня третього й четвертого пасажу. Для отримання препаратів хромосом використовували модифікацію стандартного цитогенетичного методу [6, 12]. Фіксацію хромосом проводили через 48 год після посіву клітин. Колхидин додавали у культуральне середовище із розрахунку 0,05–0,5 мкг/мл та інкубували 1,5–2 год за температури 37°C. Клітини знімали з чашок Петрі й отримували клітинну суспензію шляхом інкубації впродовж 1–5 хв за температури 37°C у розчині трипсин-версену. Для руйнування клітин їх інкубували протягом 30 хв за температури 37°C у теплому гіпотонічному розчині KCl (0,56%) із розрахунку 1 мл клітинної суспензії на 9 мл гіпотонічного розчину (1:9). Фіксацію хромосом проводили три-чотири рази по 10–20 хв у свіжо-

приготовленому охолоджену фіксаторі (метанол:крижана оцтова кислота, 3:1). Отримані препарати хромосом забарвлювали протягом 40 хв у 20% розчині барвника Гімзи («Merck», Німеччина). Аналіз метафазних пластинок здійснювали за допомогою мікроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Німеччина), збільшення $\times 400$ і $\times 1000$.

У процесі досліджень враховували: кількісні порушення хромосом – анеуплоїдію (А), поліплоїдію (ПП) і структурні аберації – розриви хромосом (ХР) і хроматид (ХМ). На цих самих препаратах провели мікроядерний тест: підраховували кількість двоядерних (ДЯ) клітин, клітин із мікроядром (МЯ), мітотичний індекс (МІ), апоптозні клітини (АП). Частоту ДЯ, МЯ, МІ, АП враховували на 1000 клітин (%).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для встановлення каріотипової стабільності мезенхімальних стовбурових клітин проаналізували хромосомну мінливість клітин третього й четвертого пасажу (див. таблицю) порівняно

Таблиця – Аналіз каріотипу мезенхімальних стовбурових клітин третього й четвертого пасажу

№ пасажу	Кількість метафаз, n	Анеуплоїдія, %	Клітини із мікроядром, %	Двоядерні клітини, %	Мітотичний індекс, %	Апоптоз, %
Третій	30	1,4	1,3	1	3,0	1
Четвертий	30	1,2	0,8	1,5	3,3	1

з рівнем спонтанної хромосомної мінливості лімфоцитів периферійної крові коня.

Отримані результати цитогенетичного аналізу мезенхімальних стовбурових клітин засвідчили, що для них

характерні кількісні порушення каріотипу, зокрема анеуплоїдія, яка становила 1,4 і 1,2% відповідно. Суттєвої різниці між кількісними порушеннями хромосом у досліджуваних клітин на різних пасажах не встановлено. Частка МСК із анеуплоїдією не перевищувала рівня спонтанної хромосомної мінливості (1,98%) за цією ознакою у лімфоцитах периферійної крові коня [4]. Метафазних пластинок з поліплоїдією у мезенхімальних стовбурових клітинах третього та четвертого пасажу виявлено не було. Структурних порушень (хромосомних і хроматидних розривів) у цих клітинах також не виявлено.

Для більш повної оцінки соматичного мутагенезу МСК було проведено мікроядерний тест. Джерелом формування клітин із мікроядрами є хромосомні розриви або дефект веретена поділу клітини, що узгоджується з проявом анеуплоїдії [8, 10]. У МСК коня третього й четвертого пасажу частота клітин із мікроядрами становила 1,3 і 0,8%, що не перевищує спонтанного рівня частоти лімфоцитів із мікро-

ядром (1,53%) у периферійній крові коня [4]. Частота появи клітин із мікроядрами у нормі для ссавців – у межах 1,6–5,6% [7, 18]. Таким чином, частка виявлених клітин із мікроядрами перебуває в межах норми.



Каріотип мезенхімальних стовбурових клітин коня четвертого пасажу:
а – норма, $2n = 64$; б – анеуплоїдія, $2n = 59 \times 1000$



Наявність двоядерних клітин учені пояснюють наслідком старіння *in vivo* та *in vitro* і природним подовженням тривалості цитокінезу [13]. Частота двоядерних мезенхімальних стовбурових клітин третього й четвертого пасажу становила 1 і 1,5% і була в межах параметрів, характерних для ссавців за спонтанного соматичного мутагенезу [4]. Частота двоядерних МСК узгоджувалася прямим пропорційним співвідношенням із частотою мітотичного індексу цих клітин. Рівень апоптозних клітин на третьому й четвертому пасажі у коня не перевищував параметрів (1,57%), характерних для цього виду [4].

Слід зауважити, що підвищеного рівня порушення цілісності цитоплазматичної мембрани у МСК порівняно з лімфоцитами периферійної крові під час одержання препаратів хромосом стандартним модифікованим цитогенетичним методом виявлено не було [6, 12].

ВИСНОВКИ

1. Використання методу цитогенетичного аналізу для дослідження стабільності каріотипу мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку надзвичайно важливе в оцінці біологічної безпеки цих клітин під час подальшого їх використання із терапевтичною метою.

2. Цитогенетичний аналіз дозволяє зробити науково обґрунтований висновок щодо мінливості каріотипу мезенхімальних стовбурових клітин коня, який після третього й четвертого пасажів відповідає спонтанному рівню, характерному для цього виду тварин.

СПИСОК

ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. 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.
2. Бочков Н.П. Цитогенетический контроль безопасности стволовых клеток / Н.П. Бочков // Тезисы докладов Британско-российского совещания в сотрудничестве с Европейской Комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества». – М., 2007.
3. Буяновская О.А. Частота анеуплоидии в культурах мезенхимных стволовых клеток человека: автореф. дис. ... канд. мед. наук / О.А. Буяновская. – М., 2010. – 93 с.
4. Джус П.П. Видоспецифічність дестабілізації каріотипів сільськогосподарських тварин за радіаційного та інфекційного впливу: автореф. дис. ... канд. біол. наук: спец. 03.00.15 «Генетика» / П.П. Джус. – К., 2012. – 20 с.
5. Петренко А.Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения / А.Ю. Петренко, Ю.А. Хунов, Э.Н. Иванов. – Луганск: Пресс-экспресс, 2011. – С. 36–39
6. Barch M.J. Cytogenetics laboratory manual / M.J. Barch, T. Knutsen, J.L. Spurbeck. – Lippincott – Raven, 1997. – 668 p.
7. Cea G.F. Induction of micronuclei in mouse bone-marrow cells by the flavonoid 5,3',4'-trihydroxy-3,6,7,8-tetramethoxy-flavone (THTMF) / G.F. Cea, K.F. Etcheberry, F.N. Dulout // Mutat Res. – 1983. – № 119 (3). – P. 339–420.
8. Kovaks G.B. Binucleate cells in a human renal cell carcinoma with 34 chromosomes / G.B. Kovaks, Hoene Sadah E. // Cancer Genet. Cytogenet. – 1988. – Vol. 31. – P. 211–216.
9. Lustig A.J. Crisis intervention: the role of telomerase / A.J. Lustig // PNAS. – 1999. – Vol. 96. – P. 3339–3341.
10. Migliore L. Relation ship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring study / L. Migliore, R. Colognato, A. Naccarati et al. // Mutagenesis. – 2006. – Vol. 21 (2). – P. 149–152.
11. 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.
12. Moorhead P.S. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood / P.S. Moorhead, P.C. Nowell, W.I. Mellman et al. // Exp. Cell Res. – 1960. – Vol. 20. – № 3. – P. 613–616.
13. Pellicer J.A. Binuclear cells in the Ehrlich ascites tumor. Action of 5-fluorouracil / J.A. Pellicer, J. Pertusa, V. Alcobar // Biol. Cell. – 1987. – Vol. 60. – P. 255–258.
14. Romanov S.R. et al. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. / S.R. Romanov, et al. // Nature. – 2001. – Vol. 409. – P. 633–637.
15. Rubio D. Spontaneous human stem cell transformation. / D. Rubio, J. Garcia-Castro, M.C. Martin et al. // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65. – P. 3035–3039.
16. Singh S.K. Identification of human brain tumour initiating cells / S.K. Singh, C. Hawking, Clarke et al. // Nature. – 2004. – Vol. 432. – P. 396–401.
17. Stenderup K. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells / K. Stenderup, J. Justesen, C. Clausen, M. Kassem // Bone. – 2003. – Vol. 33. – P. 919–926.
18. Xikun X. Observations on micronuclei of immature germ cells / X. Xikun, Shi Liming // Zool. Res. – 1990. – Vol. 11. – № 4. – P. 343–348.

Одержано 1.04.2014

Цитогенетический контроль мезенхимальных стволовых клеток костного мозга лошади на ранних пассажах культивирования *in vitro*. А.И. Мазуркевич, Н.А. Малюк, Л.Ф. Стародуб

Результаты цитогенетического анализа мезенхимальных стволовых клеток костного мозга лошади на третьем и четвертом пассажах культивирования указывают на то, что изменчивость каріотипа таких клеток соответствует спонтанному уровню, характерному для данного вида животных. Следовательно, клетки коня на третьем и четвертом пассажах культивирования не поддаются спонтанной трансформации, то есть их можно безопасно использовать животному-реципиенту для регенеративной терапии.

Cytogenetic control of mesenchymal stem cells of the bone marrow in the early passages of the horse culture *in vitro*. A.Y. Mazurkiewicz, M.O. Maljuk, L.F. Starodub

The results of cytogenetic analysis of mesenchymal stem cells in bone marrow horse on the third and fourth passages cultivation indicate that the variability of the karyotype of these cells corresponds to a spontaneous level, typical for this species. Consequently, cells horse on the third and fourth passages cultivation can not be spontaneous transformation, therefore they can be used safely recipient animal for regenerative therapy. ○