



УДК 619:602.9:611.018:636.92

**ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ
КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ КРОЛЯ НА РАННІХ ПАСАЖАХ
КУЛЬТИВУВАННЯ ПРИ ДИСОЦІАЦІЇ КЛІТИННОГО МОНОШАРУ ЗА
ДОПОМОГОЮ ЕТИЛЕНДІАМІНТЕТРАОЦТОВОЇ КИСЛОТИ**

А. Й. МАЗУРКЕВИЧ, доктор ветеринарних наук, професор

М. О. МАЛЮК, кандидат ветеринарних наук, доцент

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Л. Ф. СТАРОДУБ, кандидат сільськогосподарських наук

Інститут розведення і генетики тварин НААН України.

E-mail: nikolai_malyuk@ukr.net

***Анотація.** За допомогою цитогенетичного аналізу встановлено кількісні (анеуплоїдія, поліплоїдія) і структурні порушення хромосом у культурі мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів I–V пасажів. Прояв анеуплоїдних клітин не перевищував спонтанний рівень соматичного мутагенезу, характерного для ссавців. Поліплоїдія клітин першого пасажу не перевищувала спонтанний рівень цієї мінливості, а частка метафазних пластинок із поліплоїдією IV–V пасажів у 1,7 раз вище спонтанної хромосомної мінливості, характерної для ссавців. Результати мікроядерного тесту показали, що у популяціях мезенхімальних стовбурових клітин кроля частота клітин із мікроядром першого пасажу становила 3 ‰, другого і третього — 5 ‰, четвертого і п'ятого — 7 ‰. Різниця кількості двоядерних клітин у популяціях МСК кроля залежно від номера пасажу не спостерігалася.*

***Ключові слова:** мезенхімальні стовбурові клітини, цитогенетичний аналіз, мікроядерний тест, двоядерні клітини, клітини із мікроядром, поліплоїдія, анеуплоїдія*

Культивування *in vitro* мезенхімальних стовбурових клітин проводять не тільки з ціллю збільшення їх кількості, але і для звільнення від клітин іншого фенотипу або ціленаправленого диференціювання у відповідному напрямку.

Однак за культивування *in vitro* можуть з'являтися клітини з аберантним каріотипом, які володіють більш високим рівнем проліферативної активності порівняно з іншими клонами мезенхімальних стовбурових клітин. Хромосомні



зрушення у клітинах, які характеризуються аберантним каріотипом, можуть впливати на схильність до розвитку онкологічних захворювань у тварин-реципієнтів, тим самим являючись прямою причиною злоякісної трансформації [12, 21].

Разом з тим ряд робіт із дослідження каріотипової стабільності МСК в процесі культивування говорять на користь довготривалого культивування до 25 пасажу. Разом з цим не спостерігається розвиток хромосомних відхилень, або відхилень генетичної стабільності клітин навіть після долання ліміту Хейфліка [8, 14, 19].

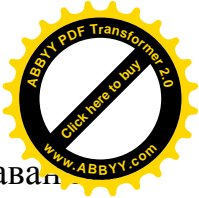
У зв'язку із суперечливими науковими результатами, отриманими рядом авторів, єдиної думки щодо збереження у стовбурових клітин нормального хромосомного набору за пасажування до цього часу не існує [1, 6, 10, 20].

Суперечливість літературних джерел може бути обумовлена декількома причинами. Однією з них являється біологічні властивості МСК, іншою причиною може бути застосування авторами різних методик культивування і пасажування клітин. Так, за довготривалого ензиматичного пасування клітин показано виникнення хромосомних аберацій в культурах МСК, а за механічного пасування аномалій каріотипу в культурах клітин не спостерігається [9, 11, 16, 18].

Отже, проведення цитогенетичного аналізу мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів на ранніх пасажах культивування *in vitro* за пасажування клітинного матеріалу без використання ферментативної дисоціації має науково-практичне значення і є досить актуальним.

Мета дослідження - встановити закономірності хромосомної мінливості мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кроля на ранніх пасажах культивування за дисоціації клітинного матеріалу за допомогою АДТА (етилендіамінтетраоцтової кислоти).

Матеріали і методи дослідження. Мезенхімальні стовбурові клітини одержували з аспірату кісткового мозку стегнової кістки кролів [4]. Одержану клітинну масу культивували у стандартному середовищі: DMEM – 80 %,



сироватка ембріонів телят – 20 % (виробництва “Sigma”, США) із додаванням 10 мкл/см³ середовища антибіотика-антимікотика. Культивування проводили у CO₂-інкубаторі за 37 °С та 5 % концентрації CO₂. При цьому МСК осідали, прикріплюючись до поверхні культуральних чашок Петрі і розпластувались. Суспензовану культуру гемопоетичних клітин згодом видаляли, після чого продовжували культивувати лише ті клітини, що мають адгезивні властивості. Після культивування отримували суспензію клітин, використовуючи 0,02 % розчин ЕДТА. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Цитогенетичний скринінг включав аналіз 30 метафазних пластинок стовбурових клітин кроля першого – п’ятого пасажів. Для отримання препаратів хромосом використовували модифікацію стандартного цитогенетичного методу [7, 17]. Фіксацію хромосом проводили через 48 години після посіву клітин. Колхіцин додавали у культуральне середовище із розрахунку 0,05-0,5 мкг/мл та інкубували 1,5-2 години за температури 37 °С. Зняття клітин із чашок Петрі та отримання клітинної суспензії здійснювали шляхом інкубації протягом 1-5 хв за температури 37 °С у 0,02 % розчині ЕДТА. Для руйнування клітин їх інкубували протягом 30 хв за температури 37 °С у теплому гіпотонічному розчині КСІ (0,56%) із розрахунку 1 мл клітинної суспензії до 9 мл гіпотонічного розчину (1:9). Фіксацію хромосом проводили три – чотири рази по 10-20 хв у свіжоприготовленому охолоджену фіксаторі (метанол : крижана оцтова кислота, 3:1). Отримані препарати хромосом забарвлювали протягом 40 хв у 20 %-му розчині барвника Гімза (“Merck”, Німеччина). Аналіз метафазних пластинок здійснювали за допомогою мікроскопа AxioStar plus (Carl Zeiss, Німеччина), збільшення x400 та x1000.

В процесі досліджень враховували: кількісні порушення хромосом – анеуплоїдію (А), поліплоїдію (ПП) та 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, вираховували на 1000 клітин (‰).

Результати досліджень та їх обговорення. Аналіз каріотипу 30 метафазних пластинок популяції мезенхімальних стовбурових клітин I – V пасажу кісткового мозку кролів показав, що для них характерні кількісні порушення (анеуплоїдія та поліплоїдія) та структурні порушення хромосом.

1. Результати цитогенетичного контролю (кількісна і структурна мінливість хромосом) МСК кроля на різних пасажах культивування ($M \pm m$, $n=5$)

№ пасажу	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %	Хромосомні розриви
I	11,1±2,1	5,5±0,9	5,5±1,2
II	12,5±1,9	-	-
III	11,7±1,5	-	-
IV	10,6±2,0	25±2,5***	-
V	12,0±1,5	26±2,0***	-

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

Прояв анеуплоїдних клітин спостерігався від першого до п'ятого пасажу із концентрацією від 10,6 % до 12,5 %. Цитогенетичну мінливість (анеуплоїдію) в основному становили гіпоплоїдні клітини, каріотип яких дорівнював ($2n=39$; $2n=43$) хромосом. Різниця середніх величин за цією ознакою у популяціях клітин I – V пасажу була недостовірною і не перевищувала спонтанний рівень соматичного мутагенезу, характерного для ссавців [5].

Кратне збільшення числа хромосом (поліплоїдія) проявилось у популяції клітин I, IV, V пасажів. Поліплоїдія каріотипу клітин першого пасажу становила 5,5 %, що не перевищувала спонтанний рівень (від 6 % до 15 %) цієї мінливості, характерний для ссавців [5]. Частота поліплоїдних клітин IV і V пасажів становила 25 % та 26 %, що у 1,7 рази вище спонтанної хромосомної мінливості за цією ознакою, характерною для ссавців. Поліплоїдні клітини були в основному тетраплоїдні, каріотип яких дорівнював $4n=88$. На даний момент пояснення механізму появи поліплоїдних клітин є гіпотетичним. Більшість вчених пропонує «клітинну спіральну модель» старіння клітин, пояснюючи

механізм утворення багатоядерних і поліплоїдних клітин. Поліплоїди пов'язують із зменшенням мітотичного потенціалу клітини і втратою цитоплазматичної здатності до поділу [15].

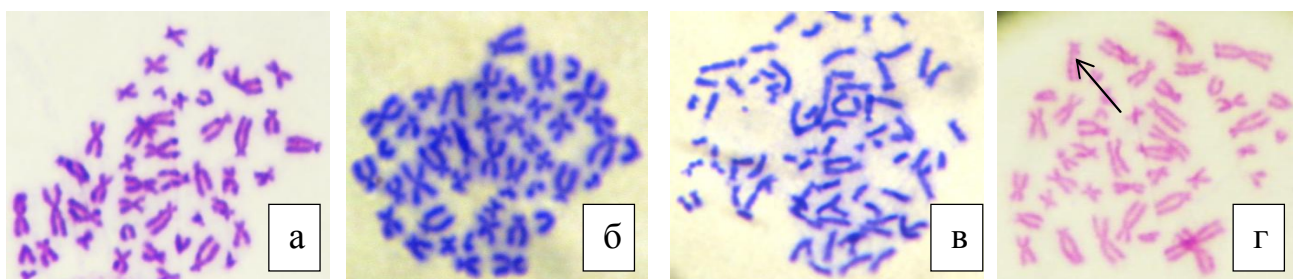


Рис. 1 - Каріотип мезенхімальних стовбурових клітин кроля: а – норма $2n=44$; б - анеуплоїдія $2n=42$; в – поліплоїдія $2n=88$; г – структурні порушення (хромосомний розрив). $\times 1000$

Структурні порушення каріотипу МСК кроля I пасажу проявилися у вигляді хромосомних розривів, концентрація яких дорівнювала 5,5 %, що не перевищувала спонтанний рівень соматичного мутагенезу, характерного для ссавців. В популяціях МСК кроля II - V пасажу структурних порушень хромосом виявлено не було.

Для оцінки дестабілізації каріотипу МСК кроля був проведений мікроядерний тест (табл. 2).

Результати мікроядерного тесту показали, що у популяціях мезенхімальних стовбурових клітин кроля частота клітин із мікроядром знаходилася у межах 3-7 %. Концентрація цих клітин підвищувалася з кожним наступним пасажем. Частота клітин із мікроядром першого пасажу становила 3 %, другого і третього – 5 %, та четвертого і п'ятого – 7 %. Різниця середніх величин за цією ознакою у популяції клітин I та IV, V пасажів була достовірною. Рівень цитогенетичної мінливості (частка клітин з мікроядром) у МСК кроля IV, V пасажів вищий за спонтанну мінливість, характерну для ссавців (при нормі 1,6 % - 5,6 % [22]). Підвищення частки клітин відповідно номеру пасажу може відобразити не стільки інтенсивність виникнення нових соматичних мутацій скільки нагромадження їх у часі [3]. Різниця кількості двоядерних клітин у популяціях МСК кроля залежно від номера пасажу не



спостерігалася. Отже, величина цієї мінливості є видоспецифічною популяції МСК кроля і не залежить від генотоксичного впливу.

2. Результати мікроядерного тесту МСК кроля на різних пасажах культивування ($M \pm m$, $n=5$)

№ пасажу	Клітини з мікроядром, ‰	Двоядерні клітини, ‰	Мітотичний індекс, ‰	Апоптозні клітини
I	$3 \pm 0,9$	-	$3 \pm 2,1$	-
II	$5 \pm 1,3$	$3 \pm 0,5$	$4 \pm 1,3$	-
III	$5 \pm 1,5$	$3 \pm 0,7$	$4 \pm 2,3$	-
IV	$7 \pm 1,2^*$	$4 \pm 1,2$	$3 \pm 0,8$	-
V	$7 \pm 1,4^*$	$4 \pm 1,8$	$4 \pm 0,5$	$2 \pm 0,3$

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

Мітотичний індекс популяцій МСК кроля I - V пасажів становив 3-4 ‰, що не перевищував рівень спонтанної мінливості (норма 2,9-4,1 ‰) [5]. Також нами було встановлено, що апоптоз клітин спостерігався лише на п'ятому пасажі (2 ‰) і його рівень не перевищував межу спонтанної мінливості.

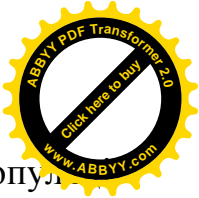
Висновки

1. Цитогенетична мінливість (анеуплоїдія) мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кроля на I – V пасажах не перевищувала спонтанний рівень соматичного мутагенезу, характерного для ссавців.

2. Встановлено, що частота поліплоїдії для мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кроля I-III пасажів відповідає спонтанному рівню, характерному для ссавців.

3. Аналіз каріотипу мезенхімальних стовбурових клітин отриманих на IV – V пасажах показав, що частка метафазних частинок із поліплоїдією у 1,7 рази вище спонтанної хромосомної мінливості за цією ознакою, характерною для ссавців.

4. Частота клітин із мікроядром для мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кроля I-III пасажів знаходилася у межах норми.



5. Кількість двоядерних клітин є видоспеціфічною для популяції мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кроля і не залежить від генотоксичного впливу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бочков Н. П. Хромосомная изменчивость мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека / Н. П.Бочков, Е. С. Воронина, Н. В. Косякова и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2007. – №1. – С. 11 – 15.
2. Виленчик М. М. Молекулярные механизмы старения / М. М. Виленчик // М.: Наука, 1970-168 с.
3. Глазко Т. Т. Мікроядерний тест у великої рогатої худоби / Т. Т.Глазко// Вісник аграрної науки. – 2001. – 39 – С. 45-48.
4. Патент на корисну модель № 86839 «Спосіб прижиттєвого отримання кісткового мозку у дрібних тварин» / А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, С. М. Ткаченко, Ю. О. Харкевич. Опубл. Бюл. № 1 від 10.01.2014
5. Эрнст Л. К. Мониторинг генетических болезней животных в системе крупномасштабной селекции / Л. К. Эрнст, А. И. Жигачев – М., 2006. – 383 с.
6. Baker D.E. et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo/ Baker D.E., Harrison N.J., Maltby E., Smith K. et al. // Nat. Biotechnol. 2007. T. 25. № 2. P. 207–215.
7. Barch M.J. Cytogenetics laboratory manual. / Barch M.J., Knutsen T., Spurbeck J.L. // – Lippincot – Raven. – 1997. – 668 p.
8. 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., Cometa, A. M., // Cancer Res. 2007. T. 67. № 19. С. 9142–9149.
9. Buzzard J.J. et al. Karyotype of human ES cells during extended culture / Buzzard J.J., Gough N.M., Crook J.M. et al. // Nat. Biotechnol. 2004. – T. 22. № 4. – P. 381–382.



10. Caisander G. et al. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged in vitro culture / Caisander G., Park H., Frej K., Lindqvist J., Bergh C., // *Chromosome Res.* 2006. T. 14. № 2. P. 131–137.
11. Cowan C.A. et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts / C. A. Cowan, I. Klimanskaya, J. McMahon et al.// *N. Engl. J. Med.* – 2004. – T. 350. – № 13. – P. 1353–1356.
12. Duesberg P. et al. Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations/ Duesberg P., Li R. // *Cell Cycle.* 2003. T. 2. № 3. C. 202–210.
13. Inzunza J. et al. Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation / Inzunza J., Sahlén S., Holmberg K. et al. // *Mol. Hum. Reprod.* 2004. – T. 10. № 6. – P. 461–466.
14. 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. T. 97. № 4. P. 744–754.
15. Matsyara T. Multinucleation and polyploidization of aging human cells in culture // *Aging phenom. relation. differ. level. organ: Proc. Naito found symp. aging (Tokio, Aug. 27-29, 1978)*- NEW YORK, London, 1980.- P. 31- 38.
16. Mitalipova M.M. et al. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells / Mitalipova M.M., Rao R.R., Hoyer D.M., Johnson J.A. et al.// *Nat. Biotechnol.* 2005. – T. 23. – № 1. – P. 19–20.
17. Moorhead P.S. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. / Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.I. et al // *Exp. Cell Res.* – 1960. – Vol. 20, N 3. – P. 613 – 616.
18. Shiras A. et al. Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma / Shiras A., Chettiar S.T., Shepal V., Rajendran G. et al. // *Stem Cells.* 2007. – T. 25. – № 6. – P. 1478–1489.



19. Soukup T. Mesenchymal stem cells isolated from the human marrow: cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics // Acta Medica (Hradec Kralove). 2006. T. 49. № 1. P. 27–33.
20. Suemori H. et al. Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage / Suemori H., Yasuchika K., Hasegawa K., Fujioka T. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. – T. 345. – № 3. – P. 926–932.
21. Tolar J. et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells / Tolar J, Nauta A.J., Osborn M.J. et al. // Stem Cells. 2007. T. 25. № 2. P. 371–379.
22. Xikum X. Observations on micronuclei germ cells / X. Xikum, S. Liming. Zool. Res. – 1990. – Y. 11. - №4. – P.343.

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРОЛИКОВ
НА РАННИХ ПАССАЖ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРИ
ДИССОЦИАЦИИ КЛЕТОЧНОГО МОНОСЛОЯ С ПОМОЩЬЮ
ЭТИЛЕНДИАМИНТЕТРАУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ
А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, Л. Ф. Стародуб**

Аннотация. С помощью цитогенетического анализа установлено количественные (анеуплоидия, полиплоидия) и структурные нарушения хромосом в культуре стволовых клеток костного мозга кролей I-V пассажей. Наличие анеуплоидных клеток не превышало спонтанный уровень соматического мутагенеза, характерного для млекопитающих. Полиплоидия клеток первого пассажа не превышала спонтанный уровень этой изменчивости, а наличие метафазных пластинок из полиплоидией IV и V пассажей у 1,7 раз выше спонтанной хромосомной изменчивости, характерной для млекопитающих. Результаты микроядерного теста показали, что у популяциях мезенхимальных стволовых клеток кролей частота клеток с микроядром первого пассажа становится 3 %, второго и третьего – 5 %, четвертого и пятого – 7 %. Разница количества двуядерных клеток у популяции МСК кролей зависимо от номера пассажа не наблюдалась.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, цитогенетический анализ, микроядерный тест, двуядерные клетки, клетки с микроядром, полиплоидия, анеуплоидия



CYTOGENETIC ANALYSIS OF RABBIT BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS AT EARLY CULTIVATION PASSAGES UNDER DISSOCIATION MONOLAYER CELL USING ETHYLENEDIAMINETETRAACETIC ACID

A. Mazurkevych, M. Malyuk, L. Starodub

***Abstract.** During the research, we determined the quantitative breach of chromosomes - aneuploidy, polyploidy and structural aberrations of mesenchymal stem cells I- V passage of the bone marrow of rabbits. The manifestation of aneuploid cells did not exceed the level of spontaneous somatic mutagenesis characteristic for mammals. Polyploidy karyotype of first passage cells does not exceed spontaneous level of this variability and frequency of polyploid cells at passages IV and V is 1.7 times higher than spontaneous chromosomal variability for this trait typical for mammals. Micronucleus test results showed that in populations of rabbit mesenchymal stem cells the frequency of cells with micronuclei at first passage was 3 ‰, at second and third - 5 ‰, at fourth and fifth - 7 ‰. The difference in the number of binucleated cell populations of rabbit MSCs depending on the number of passage was not observed.*

***Key words:** mesenchymal stem cells, cytogenetic analysis, micronucleus test, binucleated cells, cells with micronuclei, polyploidy, aneuploidy*