

УДК: 575:576.3:[616.419+612.34]

ГЕНЕТИЧНА СТАБІЛЬНІСТЬ КУЛЬТУР КЛІТИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ТА КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ НА РАННІХ ПАСАЖАХ**Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В., Ковпак О. С.**Національний університет біоресурсів і природокористування України,
м. Київ, Україна, e-mail: amazurkevich@mail.ua

Наведено результати порівняння показників генетичної стабільності культури клітин кісткового мозку та підшлункової залози щурів, отриманих в процесі їх культивування *in vitro* з першого до шостого пасажу включно. Зміни у генетичному апараті були виявлені як у культурі клітин кісткового мозку, так і підшлункової залози. За умов культивування, використаних авторами, кількість анеуплоїдій та поліплоїдій змінювалась з кожним пасажом, але не виходила за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців. Цитогенетична оцінка культури показала, що кількість клітин з мікроядрами та двоядерних клітин знаходилася у межах норми впродовж всього періоду дослідження. Найвищий мітотичний індекс визначався на першому пасажі з подальшим зниженням в процесі культивування, що зворотно пропорційно апоптозному індексу.

Методи аналізу показників генетичної стабільності культури клітин підшлункової залози і кісткового мозку на відсутність неопластичної трансформації вказаних культур можна використовувати для оцінки якості і безпечності стовбурових клітин та продуктів клітинних технологій перед трансплантацією їх тваринам-реципієнтам.

Ключові слова: цитогенетичний аналіз, мікроядерний тест, мітотичний індекс, апоптозний індекс, культура клітин кісткового мозку, культура клітин підшлункової залози

Цукровий діабет 1 типу (ЦД1) є одним з найбільш поширених серед аутоімунних захворювань [8]. Картина патогенезу ЦД 1 типу свідчить про активну участь імунних механізмів у порушенні ендокринної функції острівців Лангерганса, що призводить до знищення інсулін-продукуючих клітин [8, 4]. Клітинна терапія – давно не новий метод у лікуванні цукрового діабету [10, 12]. Проте, практичне впровадження клітинної терапії вимагає ретельного експертного аналізу вихідного матеріалу, ретельної деталізації кожного з етапів застосування клітин, відстеження подальшої долі останніх *in vitro* та *in vivo* [1]. У літературі наводяться ряд суперечливих даних щодо ризиків неопластичної трансформації стовбурових клітин *in vitro*. Зважаючи на це, визначення генетичної стабільності саме цих культур клітин є найбільш актуальними на даний час.

З огляду на останнє, порівняння генетичної стабільності різних видів культур клітин (підшлункової залози та кісткового мозку) є актуальним та своєчасним.

Мета роботи: Порівняти генетичну стабільність культури клітин кісткового мозку та підшлункової залози щурів з першого до шостого пасажу.

Матеріали та методи: експерименти проведені з використанням тварин згідно вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року). У досліді використали 5 нелінійних щуренят 12-добового віку.

Клітинну масу для виділення культури клітин кісткового мозку (КККМ) отримували з кісткового мозку стегнових, великогомілкових та плечових кісток щурів за стандартною методикою [6, 9]. Одержану клітинну масу культивували у стандартному середовищі [6], до конфлюентності 90–100 %. Отримання культури клітин підшлункової залози (ККПЗ) здійснювали методом експланту за стандартною методикою [6].

Клітини знімали за стандартною методикою (розчином 0,25 % трипсин/ЕДТА) [6]. Подальше пасажування здійснювалось у розведенні 1:3. Мікроскопічний аналіз і оцінку культур здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Дослідження проводили на клітинах першого-шостого пасажів. Цитогенетичний аналіз проводили на 30 метафазних пластинках культур клітин з кожного пасажу. Для отримання препаратів хромосом використовували модифікацію стандартного цитогенетичного методу [6]. Отримані препарати забарвлювали за допомогою набору для фарбування (Лейкоциф 200), згідно інструкції виробника. Аналіз метафазних пластинок здійснювали за допомогою мікроскопа Leica DMR (Німеччина), збільшення $\times 400$, $\times 1000$.

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 (відсоток клітини в стадії поділу від загальної кількості проаналізованих клітин (МІ) [2], апоптозний індекс (відсоток клітин з ознаками апоптозу від загальної кількості проаналізованих клітин (АІ) [9]. Частоту прояву ДЯ, МЯ та АП вираховували на 500 клітин (%).

Результати досліджень. Результати аналізу каріотипу культур клітин кісткового мозку та підшлункової залози щурів у процесі їх культивування наведено у таблиці 1.

Результати цитогенетичного аналізу, наведені в табл. 1 та на рис. 1, в, свідчать про виникнення у клітинах характерних кількісних змін каріотипу (анеуплоїдія та поліплоїдія), що розвиваються на різних пасажах їх культивування.

Зокрема, хромосомні пластинки з анеуплоїдією відмічали з першого до шостого пасажу у обох досліджуваних культурах. Найнижчий їх відсоток, як у культурі клітин кісткового мозку (8,9 %), так і в підшлункової залози (2,2 %), відмічали

на першому пасажі. Максимальна кількість клітин з некратним набором хромосом у КККМ припадала на третій пасаж (18,9 %), у ККПЗ – на четвертий (16,6 %).

Таблиця 1 – Зміни каріотипу в культурі клітин кісткового мозку та підшлункової залози щурів на I – VI пасажів культивування, $M \pm m$, $n=3$

№ пасажу	Анеуплоїдія, %		Поліплоїдія, %	
	КККМ	ККПЗ	КККМ	ККПЗ
I	8,9±1,3	2,2±1,3	1,1±1,2	0,0±0,0
II	13,2±2	4,4±2	1,1±1,2	1,1±1,3
III	18,9±1,3**	8,9±1,3**	1,1±1,2	5,6±1,3*
IV	14,5±2,6	16,6±2,0**	2,2±1,3	7,8±1,3**
V	15,6±1,3*	12,2±1,3**	4,4±1,3	4,5±2,6
VI	17,8±1,3**	13,3±0,0***	4,4±1,3	4,4±1,3*

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$, порівняно з вихідним станом (перший пасаж)

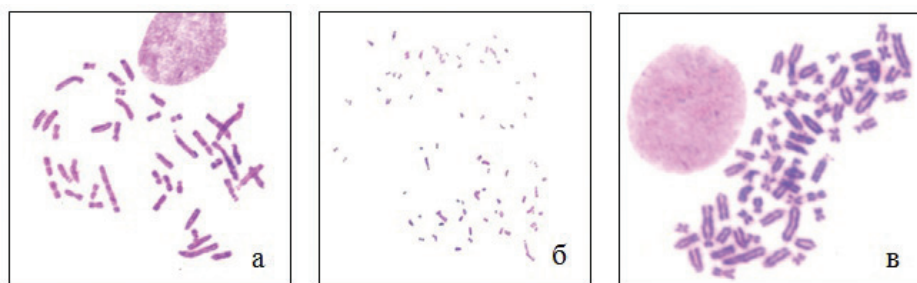


Рис. 1. Мікрофотографії метафазних пластинок клітин щура: а) нормальний каріотип, $n=42$; б) поліплоїдія, $n=84$; в) анеуплоїдія, $n=70$. Забарвлення Лейкоциф 200. 36. $\times 1000$

Разом з тим, кількість клітин з анеуплоїдією у культурі клітин кісткового мозку зменшується на четвертому пасажі (14,5 %), у той час як у культурі клітин підшлункової залози – на п'ятому (12,2 %). На четвертому пасажі відмічається пік апоптозу у досліджуваних культурах (0,7 % та 0,5 % відповідно).

Метафазні пластинки з кратним збільшенням числа хромосом (рис. 1, б) виявляли у культурі клітин кісткового мозку з I-го (1,1 %) до VI-го (4,4 %) пасажу, підшлункової залози – з II-го (1,1 %) до VI-го (4,4 %) (табл. 1).

Для додаткової оцінки цитогенетичних змін культури клітин кісткового мозку та підшлункової залози був проведений мікроядерний тест (табл. 2).

Таблиця 2 – Показники мікроядерного тесту в культурі клітин кісткового мозку та підшлункової залози щурів на ранніх пасажах культивування, $M \pm m$, $n=3$

№ пасажу	Клітини з мікроядрами, %		Двоядерні клітини, %	
	КККМ	ККПЗ	КККМ	ККПЗ
I	0,2±0,1	0,1±0,1	0,5±0,2	0,1±0,1
II	0,3±0,1	0,3±0,1	0,9±0,1	0,3±0,1
III	1,2±0,1**	0,5±0,1*	1,3±0,1**	0,5±0,1*
IV	1,4±0,2**	0,7±0,2*	1,6±0,1**	0,8±0,1**
V	1,7±0,1***	0,5±0,1*	1,8±0,1**	0,8±0,0***
VI	1,9±0,1***	0,7±0,1**	2,0±0,1**	0,8±0,1***

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$, порівняно з вихідним станом (перший пасаж)

Показники, наведені в табл. 2, свідчать про те, що клітини з мікроядрами виявлялись на всіх пасажах, як у КККМ, так і у ККПЗ. Збільшення кількості МЯ у культурах клітин відбувалось з кожним пасажом, причому у культурі клітин кісткового мозку воно було більш інтенсивним, ніж у культурі клітин підшлункової залози.

Дослідження показників мітотичної активності та апоптозу в культурах клітин показало зворотну закономірність апоптозного та мітотичного індексів, як у КККМ, так і ККПЗ (табл. 3). Зокрема, найменший відсоток клітин у стані апоптозу відмічався на першому пасажі як у культурі клітин кісткового мозку (0,1 %), так і культурі клітин підшлункової залози (0,1 %). У той же час мітотичний індекс був найвищим на протязі всього періоду дослідження (4,1 % та 2,7 % відповідно). Максимальний індекс апоптозу у КККМ відмічали на 4 пасажі (0,7 %) за мінімального мітотичного індексу (2,7 %), подібна закономірність прослідковувалась і у ККПЗ (0,5 %; 1,7 % відповідно).

Таблиця 3– Показник мітотичної активності та апоптозу КККМ і ККПЗ на ранніх пасажах культивування, $M \pm m$, $n=3$

№ пасажу	Індекс апоптозу, %		Мітотичний індекс, %	
	КККМ	ККПЗ	КККМ	ККПЗ
I	0,1±0,1	0,1±0,1	4,1±0,2	2,7±0,1
II	0,1±0,1	0,1±0,1	3,8±0,1	2,1±0,1**
III	0,3±0,1	0,1±0,1	3,7±0,1	1,5±0,1***
IV	0,7±0,2**	0,5±0,1*	2,7±0,3**	1,7±0,1***
V	0,5±0,1*	0,2±0,1	3,3±0,1**	1,4±0,0***
VI	0,5±0,1*	0,1±0,1	3,5±0,1*	2,0±0,1**

Примітка: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$, порівняно з вихідним станом (перший пасаж)

Таким чином, отримані результати свідчать про збереження в культивованих клітинах генетичної стабільності на протязі шести пасажів культивування досліджуваних культур клітин, на що вказують всі наведені досліджувані показники знаходяться в межах норми, характерної для ссавців, що узгоджується з даними літературних джерел [3, 5, 7, 13].

Отримані результати, гарантуючи мінімальний ризик неопластичної трансформації вказаних культур *in vivo*, відкривають нові можливості для подальших досліджень властивостей стовбурових клітин і безпечного їх використання у клітинній регенеративній ветеринарній медицині.

Висновки. 1. Аналіз каріотипу культур клітин кісткового мозку та підшлункової залози щурів показав, що за використаних нами умов їх культивування, кількість анеуплоїдій та поліплоїдій змінюється з кожним пасажом, але не виходить за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців.

2. За результатами цитогенетичної оцінки культури встановлено, що кількість клітин з мікроядрами та двоядерних клітин знаходиться у межах норми з першого до шостого пасажу.

3. Кількість клітин з анеуплоїдією та мікроядрами у культурі клітин підшлункової залози був нижчий на всіх пасажах порівняно з культурою клітин кісткового мозку, що свідчить про її більшу генетичну стабільність за даними показниками.

4. Найвищий мітотичний індекс визначається на першому пасажі з подальшим зниженням в процесі культивування, що зворотно пропорційно апоптозному індексу.

5. Аналіз генетичної стабільності може бути використаний як метод контролю якості та безпечності стовбурових клітин, а також продуктів клітинних технологій перед їх трансплантацією тваринам-реципієнтам.

Список літератури

1. Бродский И.Б. Применение мезенхимальных стволовых клеток для восстановления структуры и функции поврежденных тканей и органов / И.Б. Бродский, С.А. Брянцева, О.Н. Жаппарова [и др.] // Эфферент. и физ.-хим. мед., 2011. – № 1. – С. 4-10.
2. 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: Изд-во РостГМУ, 2013. – 31 с.
3. Ковалёва О. Микроядерный тест как метод определения сезонной изменчивости цитогенетических показателей у млекопитающих / О. Ковалёва, Н. Кобозева, Е. Бурдо, Т.Г. Глазко // Раритетна теріофауна та її охорона. Праці Теріологічної школи. – Луганськ. – 2008. – №9, – С. 266-269.
4. Коновалова О.О. Ремоделирование жировой ткани при экспериментальном сахарном диабете / О.О. Коновалова, О.М. Камишний // Запорыжський медичний журнал, 2013. – №4 (79). – 95-98ст.
5. Мазуркевич А.Й. Каріотиповий аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів за різних методів дисоціації клітинного моношару на ранніх пасажах культивування *in vitro* / Мазуркевич А.Й., Малюк М. О., Стародуб Л. Ф., Данілов В.Б.// Науковий вісник НУБіП України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. – 2015. – Вип.227.

6. Мазуркевич А.Й., Ковпак В.В., Данілов В.Б. Клітинні технології у ветеринарній медицині. – К.: КОМПРИНТ, 2014. – 132с.
7. Эрнст Л. К. Мониторинг генетических болезней животных в системе крупномасштабной селекции / Л. К. Эрнст, А. И. Жигачев – М: Россельхозакадемия, 2006. – 382с.
8. Culina S. Insulin and type 1 diabetes: immune connections / S. Culina, V. Brezar, R. Mallone // European Journal of Endocrinology, 2013. - №168. – P.19-21.
9. Ian Freshney R. Culture of animal cells: a manual of basic technique / R. Ian Freshney. – [5th ed.] - USA: John Wiley & Sons, 2005. – 642p.
10. Kemp C. Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats / C.Kemp, M.Knight, D.Scharp, et al. // Diabetologia, - № 9. – P.486—491.
11. Penalzoza C. Cell death in mammalian development / Penalzoza C., Orlanski S., Ye Y., Entezari-Zaher T., et al. // Curr. Pharm. Des., 2008. - №14,2. – P.184-196.
12. Reckard C. 1973. Transplantation of isolated pancreatic islets across strong and weak histocompatibility barriers / Reckard C., Barket C. // Transplant. Proc., 1973. – № 5. – P.761—763.
13. Xikum X. Observations on micronuclei germ cells / X. Xikum, S. Liming. // Zool. Res. – 1990. – Y. 11. - №4. – P.343.

**GENETIC STABILITY OF CELLS OF CELLS OF PANCREAS
AND BONE MARROW OF RATS AT EARLY PASSENGERS**

Mazurkevich A. I., Kovpak V. V., Kovpak A. S.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Compare the genetic stability of the culture of bone marrow cells and pancreas of rats from the first to the sixth passage to establish their quality and safety.

Material and methods: experimental using laboratory animals and their cellular material from the bone marrow; comparative, analytical, statistical.

Results. Comparison of the genetic stability of bone marrow and pancreas cultures of rats obtained in the process of their in vitro culture from the first through the sixth passage inclusive showed the presence of changes in the genetic apparatus both in the culture of bone marrow cells and in the pancreas. Under the conditions of cultivation used by the authors, the number of aneuploidy and polyploidy changed with each passage, but did not go beyond the limits of spontaneous mutagenesis characteristic of mammals.

Conclusions: 1. Analysis of the karyotype of cultures of bone marrow cells and pancreas of rats showed that the number of aneuploidies and polyploids varies with each passage, but does not go beyond the limits of spontaneous mutagenesis typical for mammals, due to the conditions of their cultivation used by the authors.

2. Based on the results of the cytogenetic evaluation of culture, it has been established that the number of cells from the microkernel and the binuclear cells is within the limits of the norm from the first to the sixth passage.

3. The number of cells with aneuploidy and micronuclei in the culture of pancreatic cells was lower in all passages than in the culture of bone marrow cells, which indicates its great genetic stability according to these indices.

4. The highest mitotic index is determined at the first passage, followed by a decrease in the mitotic index during the cultivation, which is inversely proportional to the apoptosis index.

5. Analysis of genetic stability can be used as a method for quality control and safety of stem cells and products of cellular technologies before their transplantation to recipient animals.

Keywords: *cytogenetic analysis, micronuclear test, mitotic index, apoptotic index, culture of bone marrow cells, culture of pancreatic cells*