

Список літератури

1. Стівбукові клітини у ветеринарній медицині. Том перший. Експериментальні дослідження з отримання, зберігання і застосування мезенхімальних стівбурових клітин [Текст]: монографія / А. Й. Мазуркевич [та ін.]. – К.: ТОО ЦП «Компринт», 2013. – 269 с.
2. Використання мезенхімальних стівбурових клітин для корекції репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів [Текст]: метод. реком.; затв. Наук.-метод. радою Держ. вет. та фітосанітар. служби України (протокол № 3 від 30.10.2012 р.) / А. Й. Мазуркевич [та ін.]. – К.: Вид. центр НУБіП України, 2012. – 42 с.

**MODERN AND FUTURE USING OF THE CELLULAR TECHNOLOGY
IN THE DOMESTIC VETERINARY MEDICINE**

Mazurkewich A.J.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

These results effective use of autologous, allogeneic and xenogeneic stem cells to restore the structure and function of experimentally damaged skin, cartilage, kidney and liver parenchyma in the laboratory and small animals, as well as the immune compatibility of transplanted MSCs in animals recipient.

Keywords: autologous, allogeneic and xenogeneic mesenchymal stem cells, immune compatibility, regeneration of skin, cartilage parenchyma of the kidney, liver, prospects of cellular technology in veterinary medicine.

УДК 575:602:611.013.8/018:636.1

**ДОСЛІДЖЕННЯ КАРІОТИПУ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТВІБУРОВИХ КЛІТИН ПУПКОВОГО
КАНАТИКУ ЛОШАТ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO***

Мазуркевич А.Й., Малюк М.О.

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
м. Київ, e-mail: amaz@nauu.kiev.ua

Стародуб Л.Ф., Копилов К.В.

Інститут розведення і генетики тварин НААН України, м. Бровари

*Наведені результати цитогенетичного аналізу мезенхімальних стівбурових клітин пупкового канатика лоша залежно від тривалості їх культивування *in vitro*. Встановлено, що при культивуванні МСК із збільшенням числа пасажів, збільшується кількість клітин із зміненним геномом, яке характеризується збільшенням частки метафазних пластинок із анеуплоїдією та наявністю в клітинах тетраплоїдного каріотипу. Також встановлено підвищені межі параметрів мікроядерного тесту. Отримані результати свідчать про необхідність проведення генетичного моніторингу мезенхімальних стівбурових клітин, які використовуються у відновлювальній клітинній терапії.*

Ключові слова: *in vitro*, цитогенетичний аналіз, мікроядерний тести.

Мезенхімальні стівбукові клітини (МСК) – це група недиференційованих клітин, які знаходяться у багатьох тканинах організму тварин і людей, однак найчастіше їх отримують із кісткового мозку та жирової тканини, а також позазародкових тканин (пупковинного канатика, плаценти). Під час культивування *in vitro* стівбукові клітини здатні до активної проліферації, що дає можливість отримувати їх в необхідній кількості, при цьому вони можуть диференціюватися в остеогенному, хондрогенному та адипогенному напрямках [3, 9].

МСК в останні роки стали об'єктом особливої уваги багатьох дослідників. Найбільший інтерес пов'язаний з можливістю використання цих клітин у ветеринарній і гуманній медицині. Вважається, що вони за своїми характеристиками являються самим перспективним біологічним матеріалом для клітинно-регенеративної терапії (КРТ) [9].

Разом з тим, застосування МСК для КРТ повинно визначатися даними щодо їх онкогенної безпеки [2, 19]. Питання онкогенної безпеки стівбурових клітин залишається маловивченим, але вкрай важливим, по суті справи визначаючим розвиток клітинно-регенеративної терапії.

З літературних джерел відомо, що довготривале культивування стівбурових клітин призводить до значних змін геному як на молекулярному, так і на хромосомних рівнях його організації. Так, Maitra та співавтори виявили хромосомні відхилення при довготривалому культивуванні практично у 50 % досліджуваних ліній [16].

Цінна інформація була отримана авторами робіт при дослідженні каріотипової мінливості ліній ЕСК людини під час культивування *in vitro*. Так, під час цитогенетичного аналізу цих клітин були виявлені хромосомні анаомалії: трисомії та моносомії 22, 17 і 18 хромосом [15].

Окрім цього в літературі описані структурні та чисельні анаомалії хромосомного набору клітин [1]. Цілком ймовірно, що такі зміни геному культивуємих клітин можуть викликати селективну проліферацію (клоноутворення) генетично анаомальних клітин, що може відобразитись на потенціалі диференціювання

цих клітин, а також призвести до активізації стовбурових клітин із онкогенними властивостями, як наслідок цього до малігнізації після їх трансплантації тваринам-реципієнтам.

Проте ряд дослідників притримуються іншої точки зору. Так, група науковців продемонстрували, що довготривале культивування МСК кісткового мозку не призводить до іморталізації клітин і не викликає будь-яких хромосомних порушень, які могли б вказувати на потенційний онкогенний ризик стовбурових клітин [12].

Також, Zhang і співавтори стверджують, що 20-ти добуве культивування МСК не викликає генетичних аномалій, як наслідок, клітини не несуть онкогенного ризику [20].

Дослідження проведені Буруною В. (2007 р) свідчать, що МСК постнатальних і позазародкових тканин людини, в процесі пасування *in vitro* зберігають стабільний диплоїдний каріотип до V пасажу [3]. Інші дослідники, рекомендують використовувати стовбурові клітини не пізніше 6-го пасажу при культивуванні *in vitro* [14].

Отже, біологічна здатність МСК до онкогенної трансформації залишається дискусійною. Саме тому, застосування МСК з терапевтичною метою повинно визначатися даними щодо їх онкогенної безпеки, а цитогенетичні дослідження стовбурових клітин, поряд з іншими параметрами оцінки якості, є одним із важливих етапів контролю, що дозволяє встановити генетичну стабільність культури клітин.

Разом з тим, описані дослідження каріотипової мінливості клітинного матеріалу проводяться на ембріональних та мезенхімальних стовбурових клітинах людей і лабораторних мишей, в той час як подібні дослідження у ветеринарній медицині є поодинокими [13].

Отже, проведення цитогенетичного аналізу мезенхімальних стовбурових клітин тварин і, зокрема, пупкового канатику коней на ранніх пасажах культивування *in vitro* має як теоретичне так і практичне значення і є досить актуальним.

Мета досліджень. Встановити закономірності хромосомної мінливості мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатику коней на ранніх пасажах культивування і провести мікроядерний тест цих клітин.

Матеріали та методи. Цитогенетичне дослідження проводили на культурах мезенхімальних стовбурових клітин пуповини 2–7 пасажів, одержаних від трьох лошат чистокровної верхової породи. У культурі клітин, кожного з досліджених пасажів, було проаналізовано 30 метафазних пластинок, одержаних за допомогою модифікованого стандартного цитогенетичного методу [11, 17]. Фіксацію хромосом проводили через 48 години після посіву клітин. Колхіцин додавали у культуральне середовище із розрахунку 0,05–0,5 мг/мл та інкубували 1,5–2 години за температури 37°C. Зняття клітин із чашок Петрі та отримання клітинної суспензії здійснювали шляхом інкубації протягом 1–5 хв за температури 37 °С у розчині трипсин-версену. Для руйнування клітин їх інкубували протягом 30 хв за температури 37 °С у теплому гіпотонічному розчині KCl (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.

У процесі аналізу 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, АП вираховували на 1000 клітин (%).

Результати досліджень. Результати каріотипової стабільності мезенхімальних стовбурових клітин за проведеним порівняльним аналізом хромосомної мінливості клітин другого, третього, четвертого, п'ятого і сьомого пасажів пуповини лошат наведені в табл. 1 та на рис. 1, 2. Їх порівнювали з рівнем спонтанної хромосомної мінливості лімфоцитів периферійної крові коней та МСК кісткового мозку цих тварин. Результати проведеного мікроядерного тесту цих клітин розміщені в табл. 2.

Таблиця 1 – Аналіз каріотипу мезенхімальних стовбурових клітин пуповини коня на 2–7 пасажах

№ пасажу	Кількість метафаз	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %
II	30	16,7±1,0	25±1,2
III	30	23,0±1,2*	27±1,7
IV	30	35,0±1,7***	–
V	30	38,8±1,5***	4,8±0,9***
VII	30	40,6±1,9***	–

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

Одержані результати цитогенетичного дослідження МСК пуповини коня показали, що для цих клітин характерні кількісні порушення хромосомного набору (анеуплоїдія та поліплоїдія). Частка метафазних пластинок із анеуплоїдією у мезенхімальних стовбурових клітинах пуповини коня від другого до сьомого пасажу становила 16,7–40,6 %, що суттєво перевищувала спонтанний рівень хромосомної

мінливості за цією ознакою у лімфоцитах периферійної крові коня (1,98–6,8 %) [5,6], та у мезенхімальних стовбурових клітинах кісткового мозку (1,2–1,4 %) [10]. У популяціях клітин від другого до сьомого пасажу спостерігалось підвищення відсотку анеуплоїдії, що свідчить про зростання, з кожним наступним пасажом, каріотипової нестабільності цих клітин.

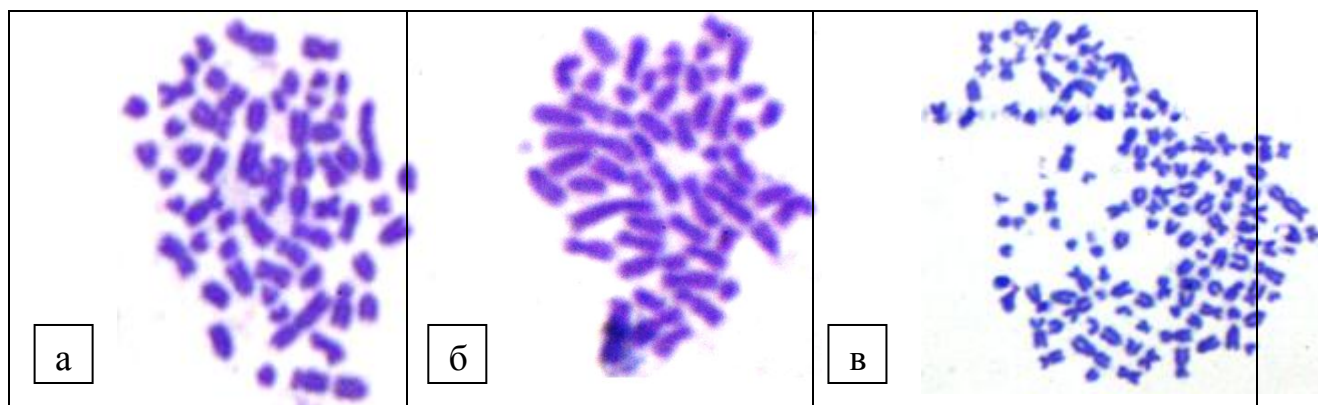


Рис. 1. Каріотип мезенхімальних стовбурових клітин пуповини коня V пасажу: а – норма $2n=64$; б – анеуплоїдія $2n=54$; в – поліплоїдія $4n=128$, $\times 1000$

Досліджені мезенхімальні стовбурові клітини пуповини коня характеризувалися і наявністю тетраплоїдного каріотипу ($4n=128$), який був присутній у популяціях клітин другого, третього та п'ятого пасажів і становив 25, 27 та 4,8 % відповідно. Відсоток поліплоїдних клітин другого і третього пасажу більше ніж у п'ять разів перевищував рівень спонтанної хромосомної мінливості (0,4–4,7 %) за цією ознакою у лімфоцитах периферійної крові коня [6].

Згідно літературних даних, наявність тетраплоїдного каріотипу призводить до зупинки поділу, прискореному клітинному старінню та апоптозу, а зміна кількості генетичного матеріалу при пасуванні може призвести до аномального функціонування геному, що викликає негативний вплив на клітину, навіть до пухлинної трансформації [8].

Структурні порушення хромосом (хромосомні та хроматидні розриви), у досліджуваних популяціях клітин, не спостерігалися.

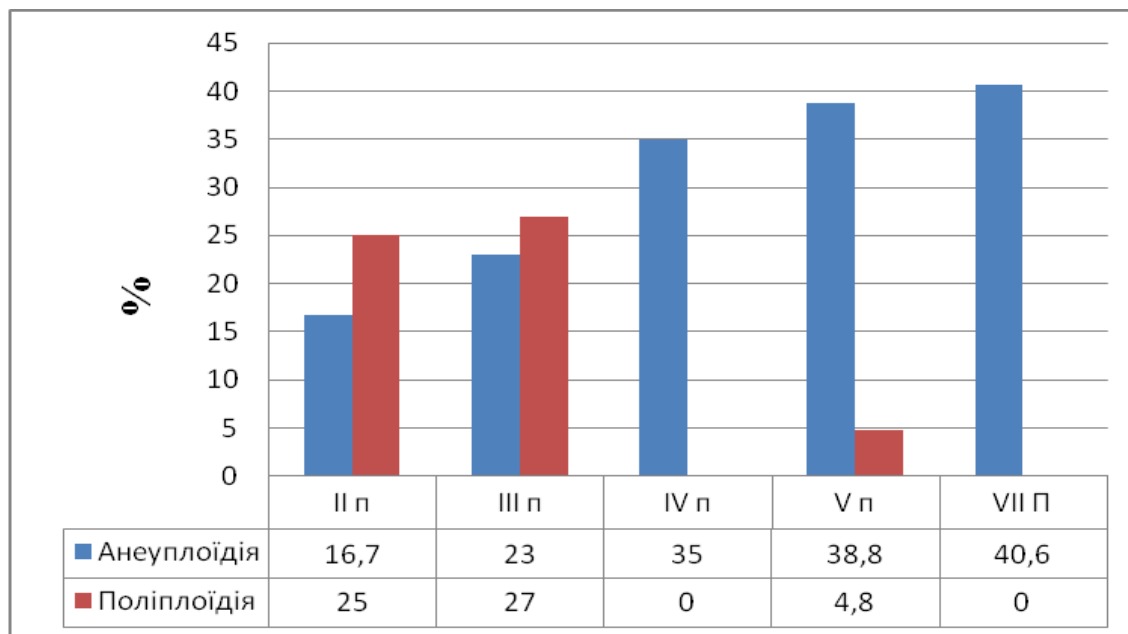


Рис. 2. Кількісні порушення хромосомного набору стовбурових клітин пупкового канатику лоша на ранніх пасажах культивування

Результати мікроядерного тесту вказують на те, що частота клітин із мікроядрами, починаючи з третього до сьомого пасажу, вища у 2–5 разів відносно спонтанного рівня частоти лімфоцитів із мікроядром (1,53 ‰) у периферійній крові коня [5]. За даними літератури підвищена частота клітин із мікроядрами добре узгоджується із знайденою у них підвищеною частотою анеуплоїдії [4, 18].

Таблиця 2 – Мікроядерний тест мезенхімальних стовбурових клітин пуповини коня

№ пасажу	Клітини із мікроядром, ‰	Двоядерні клітини, ‰	Мітотичний індекс, ‰	Апоптоз, ‰
II	1,3±0,23	3,7±0,75	4,0±0,5	–
III	4,0±0,39**	1,0±0,3*	6,0±0,7	–
IV	3±0,9	2±0,6	4±1,0	–
V	5,7±1,1**	2,3±0,5	2,7±0,5	0,7±0,2
VII	8±1,2***	0,3±0,2**	6±0,9	1,3±0,4

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

Частота двоядерних мезенхімальних стовбурових клітин пуповини на другому, четвертому та п'ятому пасажах перевищувала межі параметрів, які характерні для клітин ссавців за спонтанного соматичного мутагенезу (1,13 ‰) [5]. Ці результати підтверджують дестабілізацію каріотипу клітин у дослідженій культурі. Мітотична активність МСК пуповини була теж підвищена, а рівень апоптозних клітин на п'ятому та сьомому пасажах не перевищував параметрів (1,57 ‰), характерних для цього виду[5].

Висновки. 1. Аналіз каріотипу мезенхімальних стовбурових клітин пуповини лоша отриманих на 2 – 7 пасажах показав, що частка метафазних пластинок із анеуплоїдією становила 16,7–40,6 %.

2. Досліджені мезенхімальні стовбурові клітини пуповини коня характеризувалися наявністю тетраплоїдного каріотипу ($4n=128$) в межах 4,8–27 %.

3. Встановлено підвищені межі параметрів мікроядерного тесту МСК пуповини, у порівнянні з клітинами ссавців за спонтанного соматичного мутагенезу.

4. Отримані дані щодо кількісних порушень хромосом у культивуємих МСК пупкового канатика вказують на необхідність проведення ретельного генетичного моніторингу цих клітин у випадку використання їх для клітинної терапії.

Список літератури

1. Бочков Н.П. Хромосомная изменчивость мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека/ Н.П. Бочков, Е.С. Воронина, Н.В. Косякова // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2007. – №1 – С. 11-16.
2. Бочков Н.П. Цитогенетика стволовых клеток человека /Н.П. Бочков, В.А. Никитина // Молекулярная медицина. – 2008. – №3. – С.40-47.
3. Бурунова В.В. Проблемы стандартизации при получения клеточных культур мезенхимального происхождения: экспериментальный и теоретический анализ. Автор. дис. канд. биол. наук. / Бурунова В. В. // - Москва. – 2011. – С. 27
4. Глазко Т. Т. Частоты встречаемости цитогенетических аномалий в клетках крови крупного рогатого скота разных направлений продуктивности при действии низких доз ионизирующего излучения / Т. Т. Глазко, С. Е. Дубицкий, Г. Ю. Косовский // Сельскохозяйственная биология. – 2007. – №6. – С. 58-62.
5. Джус П. П. Видоспецифічність дестабілізації каріотипів сільськогосподарських тварин за радіаційного та інфекційного впливу: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.15 «Генетика» / П. П. Джус. – К.– 2012. – С. 20
6. Дзіцюк В. В. Хромосомний поліморфізм окремих видів і порід сільськогосподарських тварин : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора с/г наук : спец. 03.00.15 « Генетика» / В. В. Дзіцюк. – Чубинське. – 2009. – С. 30
7. Ковач М. Ортопедические заболевания лошадей. Современные методы диагностики и лечения/ М. Ковач // Москва, Королевский издательский дом. – 2013. – С. 610
8. Омельченко Д. О. Генетическая характеристика спонтанно трансформированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека: дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.02.07 /Омельченко Денис Олегович. – М. – 2014. – С.150
9. Петренко А.Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения /А. Ю. Петренко, Ю.А. Хунов, Э. Н. Иванов// Луганск, Прес-експресс. – 2011. – С.367
10. Цитогенетичний контроль мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня на ранніх пасажах культивування *in vitro* /А. Й.Мазуркевич, М. О. Малюк, Л.Ф. Стародуб // Ветеринарна медицина. – К., 2014. – №6 (220). – С. 32 – 34.
11. Barch M.J. Cytogenetics laboratory manual / Barch M.J., Knutsen T., Spurbeck J.L. et. al. // – Lippincot – Raven. – 1997. – P.668
12. Bernardo M.E. et al. 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. –2007. – Vol. 67. № 19. – P. 9142–9149.
13. Eder Zucconi. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – A Novel Source for Cell Therapy Studies/ Eder Zucconi., Natassia M. Vieira., Daniela F. Bueno et. al.// Stem cells and development. – 2010. –Vol. 19. – № 3. – P. 395–402.
14. Lange C. et al. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine // J. Cell. Physiol. – 2007. – Vol. 213. – № 1. – P. 18–26.
15. Lefort N. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20qll.21/ N. Lefort, M. Feyeuxl, C. Bas, et. al. // Nature Biotechnology. – 2008. Vol. 26. – P. 1364 -1366.
16. Mairta A. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells./ A. Mairta, D.E. Arking, N. Shivapurkar, et. al. // Nature Genetics. – 2005. – Vol. 37. – P. 1099-1103.
17. Migliore L. Relati on ship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring studu / Migliore L., Colognato R., Naccarati A. et.al. // Mutagenesis. – 2006. – Vol. 21 (2). – P. 149-152.
18. Rubio D. Spontaneous human adult stem cell transformation./ D. Rubio, J. Garcia-Castro, M.C. Martin, et. al. // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65 (8). – P. 3035-3039.
19. Zhang Z. X. Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro./ Z.X. Zhang, L.X. Guan, K. Zhang, et. al. // Cell Biol. Int. – 2007. –Vol.31. – №6. – P. 645-648.

INVESTIGATION OF KARYOTYPE OF FOALS UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS DURING CULTIVATION *IN VITRO*

Mazurkevych A.I., Maliuk M.O.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev

Starodub L.F., Kopilov K.V.

Institute of Animal Breeding and Genetics of NAAS of Ukraine, Brovary

Shown the results of cytogenetic analysis of foals' umbilical cord mesenchymal stem cells depending on the duration of its cultivation in vitro. Found that when cultured MSCs with the increasing number of passages, the number of cells with changed genome are increased, which are characterized by increased proportion of metaphase plates with aneuploidy and the presence of tetraploid cell karyotype. Also found increased limits of micronucleus test parameters. The received results testify the necessity of genetic monitoring of mesenchymal stem cells that are used in recovery cell therapy.

Keywords: in vitro, cytogenetic analysis, genetic monitoring.

УДК 636.2.082.453.5

НОВІ ПІДХОДИ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ НАЦІОНАЛЬНОЇ ХАРКІВСЬКОЇ ТЕХНОЛОГІЇ АСЕПТИЧНОГО ОТРИМАННЯ, КРІОКОНСЕРВУВАННЯ І ВИКОРИСТАННЯ СПЕРМИ БУГАЇВ-ПЛІДНИКІВ

Павленко М.П., Стегній Б.Т., Павленко Л.М., Данілова І.С., Болотін В.І., Павленко В.М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини, м. Харків, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Павленко Б.М.

Інститут тваринництва НААН, м. Харків

У статті наведені дані щодо використання способу кріоконсервації сперми бугаїв із застосуванням концентрованого розріджувача як за Харківською, так і за закордонними технологіями – IMV (Франція) та Nagase (Японія). Відмічені високі біологічні показники сперми після деконсервації, її запліднюючу здатність та водночас підвищення її санітарних показників. Запропонована робота є продовженням комплексу попередніх досліджень відносно способу кріоконсервації генетичних ресурсів, розробці та удосконаленню кріопротективних довозберігаючих середовищ для сперми тварин.

Ключові слова: концентрований кріоконсервант, спосіб кріоконсервації, заплідненість, сперма ВРХ.

Вимоги до санітарної якості сперми плідників за ГОСТом № 27777-88 ставлять на меті профілактику контамінації ендометрія вірус-бактерійними агентами при штучному осіменінні корів глибоко-замороженою спермою бугаїв. Ця проблема набуває особливого значення у зв'язку з інтенсивним впровадженням у виробничу практику новітніх біотехнологій відтворення тварин і широким міжнародним обміном генетичними ресурсами.

Багаточисельними дослідженнями доведено, що сперма плідників, яка оброблена без застосування спеціальних засобів асептики і антисептики, у значній мірі може бути забруднена вірусами і бактеріями [1, 2, 3, 5]. Вони потрапляють у сперму із шкіряного покриву та препуція бугая, нестерильного повітря, посуду, інструментів, приладів, кріопротективних середовищ, рідкого азоту, а також з оточуючого середовища тваринницьких приміщень при штучному осіменінні ВРХ [4, 6, 8]. Застосування інфікованої сперми призводить до виникнення змішаних вірус-бактерійних інфекцій у тварин, які супроводжуються гінекологічними патологіями і проявляються у вигляді ембріональної смертності, абортів, загибелі телят у перші години і дні їх життя та спричиняють післяродові ускладнення, що призводить до безпліддя та яловості корів. У зв'язку з цим, технологія роботи сучасного племінного підприємства повинна забезпечувати відповідний санітарний рівень та високу запліднювальну здатність замороженої сперми, незалежно від терміну її зберігання у рідкому азоті [3].

У світовій практиці розроблені та використовуються Харківська [7], Французька [9] і Німецька [10] технології консервування сперми у герметичних упаковках та Японська [11] у відкритих гранулах. Загальним недоліком усіх без винятку технологій є відсутність гарантованого захисту сперми від контамінації мікроорганізмами при її одержанні, технологічній обробці та використанні для осіменіння корів і телиць.

В основу наших досліджень покладено удосконалення вітчизняної Харківської технології кріоконсервування сперми бугаїв в облицьованих гранулах [7], яка ґрунтується на принципі поточної закритої системи обробки сперми, за якою усі процеси, починаючи з моменту одержання сперми від бугая здійснюються за закритою системою, що забезпечує більш високі показники санітарної якості