

УДК 576.316:612.34:636.96



Ковпак В. В., Ковпак О. С.

Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, Україна

e-mail: vitkovpak@mail.ru

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ НА РАННІХ ПАСАЖАХ

РЕЗЮМЕ

Культура клітин, отримана з підшлункової залози, може слугувати джерелом фізіологічно компетентного замітника первинних острівців Лангенгарса при лікуванні цукрового діабету, однак отримати необхідну кількість клітинного матеріалу можна лише за умов тривалого культивування. Тому перед введенням клітин необхідно дослідити ризики неопластичної трансформації клітин *in vitro*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Культуру клітин отримували методом експлантів з підшлункової залози 12-денних нелінійних щурів. Цитогенетичний аналіз проводили для культур з першого по шостий пасажі: підраховували кількість клітин зі зміненим каріотипом, з мікроядрами, двоядерні та в стані апоптозу, розраховували мітотичний індекс.

РЕЗУЛЬТАТИ. Появу анеуплоїдних клітин відмічали на усіх пасажах від 2,2 % (1-й пасаж) до 16,6 % (4-й). Поліплоїдію виявляли у популяції клітин з другого (1,1 %) по шостий пасаж (4,4 %) з максимумом на 4-му пасажі (7,8 %). З другого пасажу спостерігали достовірне збільшення кількості клітин з мікроядрами (0,3 %). Також відмічено достовірне збільшення кількості двоядерних клітин з першого (0,1 %) до шостого пасажу (0,8 %). Виявлено зниження мітотичного індексу з першого (2,7 %) по третій пасажі (1,5 %) та його поступове зростання до шостого (2,0 %) пасажу. Крім цього, було виявлено незначний відсоток клітин у стані апоптозу, кількість яких поступово зростала до 4-го пасажу (0,5 %). На 5-6-му пасажах спостерігали зменшення кількості клітин у стані апоптозу до 0,1 %.

ВИСНОВКИ. В отриманих культурах клітин підшлункової залози щурів виявлено зміни, що проявлялись у вигляді анеуплоїдій, поліплоїдій, а також наявності мікроядер, інтенсивність яких змінювалась залежно від пасажу, але не виходила за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: культура клітин підшлункової залози, цитогенетичний аналіз, мікроядерний тест.

Цукровий діабет (ЦД) першого типу – це хронічне захворювання, яке вражає генетично схильних осіб, у яких інсулін-продукуючі β -клітини острівців Лангерганса підшлункової залози вибірково і незворотно руйнуються в результаті аутоімунної атаки організму [12]. Більш ніж 80 років основний терапевтичний підхід обмежувався лікуванням симптомів ЦД замісною інсулінотерапією. З наукових джерел відомо, що жорстка регуляція рівня глюкози крові при інтенсивній інсулінотерапії призводить до значного підвищення ризику тяжких гіпоглікемічних реакцій, зокрема гіпоглікемічної коми, і не виключається можливість розвитку вторинних деструктивних змін тканин і органів (нефропатія, нейропатія та серцево-судинна патологія) [17,19].

Сучасні дослідження з терапії ЦД спрямовані на пошук засобів, дія яких максимально наближена до фізіологічних умов секреції інсуліну [1]. Досить перспективним методом терапії ЦД є використання трансплантації клітинного матеріалу в якості практично необмеженого джерела фізіологічно компетентного замітника первинних острівців Лангерганса [9, 10].

Отримані результати доклінічних та клінічних випробувань свідчать про високу ефективність використання стовбурових клітин в якості замісної терапії порівняно з іншими методами лікування. Як відомо, для клінічного використання необхідна значна кількість клітинного трансплантату, що можна досягти завдяки тривалому культивуванню клітин в умовах *in vitro*.

Разом з тим важливою умовою отримання високоякісного клітинного матеріалу методом культивування є підтримання генетичної стабільності культури клітин поза організмом. В доступній нам літературі виявлено ряд суперечливих даних щодо ризиків неопластичної трансформації клітин *in vitro* [2, 5, 13-16, 18], що і зумовило необхідність подальших досліджень хромосомної стабільності культури клітин підшлункової залози щурів у процесі культивування як основної моделі для біологічних досліджень.

МЕТА РОБОТИ: встановити зміни у каріотипі культури клітин підшлункової залози щурів на ранніх пасажах та оцінити стабільність отриманої культури.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

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). Для досліджень використали 9 нелінійних щурів 12-денного віку, що утримувались в умовах віварію Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Евтаназія дослідних тварин здійснювалась шляхом декапітації під ефірним наркозом. Підшлункову залозу виймали з черевної порожнини у стерильну чашку Петрі, де її промивали фосфатно-сольовим буферним розчином (*Sigma*, США). Відділяли залозисту частину і подрібнювали її ножицями на шматочки до 1-2 мм, які переносили у чашки Петрі діаметром 3 см з розрахунку 10-15 фрагментів на чашку. Культивування здійснювали у стандартному середовищі, що містило 80 % DMEM (*Sigma*, США); 20 % фетальної сироватки телят (*Sigma*, США); 10 мкл/мл розчину антибіотика-антимікотика (*Sigma*, США), при 37 °C та 5 % концентрації CO₂ протягом 10 днів до утворення моношару. Клітини пасажували за стандартною методикою (0,25 розчин трипсин/EDTA) [6]. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (*Carl Zeiss*, Німеччина).

Цитогенетичний аналіз проводили на 30 метафазних пластинках культури клітин підшлункової залози щура з кожного пасажу (з першого по шостий). Для отримання препаратів хромосом використовували модифікацію стандартного цитогенетичного методу [6]. Фіксацію хромосом проводили через 48 годин після посіву клітин. Колхіцин (*Sigma*, США) додавали у культуральне середовище у кінцевій концентрації 1•10⁻⁷ M та інкубували 4 години при температурі 37 °C. Клітини з чашок знімали стандартним розчином 0,25 % трип-

син/EDTA. Після центрифугування до клітинної суспензії у об'ємі 1 мл додавали 9 мл гіпотонічного 0,56 % розчину KCl. Фіксацію хромосом проводили у свіжоприготовленому фіксаторі (крижана оцтова кислота/метанол – 1:3), 3-4 рази з експозицією 10-20 хв. Отримані препарати забарвлювали за допомогою набору для фарбування Leucodif 200 (*Erba Lachema*, Чехія), згідно інструкції виробника. Аналіз метафазних пластинок здійснювали за допомогою мікроскопа DMR (*Leica*, Німеччина) на збільшенні ×400, ×1000.

У підготовлених вище зазначеним способом препаратах виявляли кількісні порушення хромосом у вигляді анеуплоїдії та поліплоїдії, а також розраховували мітотичний індекс (відсоток клітин в стадії поділу від загальної кількості проаналізованих клітин) [3]. Відносну кількість двоядерних клітин, клітин з мікроядрами та клітин в апоптозі виражали у відсотках на 500 підрахованих клітин. Статистичну обробку даних проводили непараметричним методом за Манном-Уїтні, відмінності показників вважали достовірними при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз каріотипу культури клітин підшлункової залози щурів у процесі їх культивування показав, що для них характерні кількісні порушення (анеуплоїдія та поліплоїдія). Результати досліджень зміни кількості хромосомних порушень наведено у **табл. 1**.

Появу анеуплоїдних клітин (**рис. 1, В**) відмічали від першого до шостого пасажу у кількості від 2,2 % до 16,6 %. Цитогенетичну мінливість (анеуплоїдію) в основному становили клітини, каріотип яких містив 39 або 40 хромосом. Різниця середніх величин за цією ознакою у популяціях 3-6 пасажів була достовірною ($p < 0,01$) у порівнянні з першим. Варто відзначити, що найвищий рівень анеуплоїдії (16,6 %) спостерігали на четвертому пасажі, після чого відмічали зниження кількості анеуплоїдних клітин (5-й пасаж) та зростання їх кількості на 6-му пасажі.

№ ПАСАЖУ	КЛІТИНИ З НОРМАЛЬНИМ КАРІОТИПОМ, %	АНЕУПЛОЇДІЯ, %	ПОЛІПЛОЇДІЯ, %
I	97,8 ± 1,3	2,2 ± 1,3	0,0 ± 0,0
II	94,5 ± 1,3	4,4 ± 2	1,1 ± 1,3
III	85,5 ± 1,3**	8,9 ± 1,3**	5,6 ± 1,3*
IV	75,5 ± 1,2**	16,6 ± 2,0**	7,8 ± 1,3**
V	83,3 ± 2,0**	12,2 ± 1,3**	4,5 ± 2,6
VI	82,3 ± 1,3**	13,3 ± 0,0***	4,4 ± 1,3*



Таблиця 1. Результати цитогенетичного аналізу культури клітин підшлункової залози щура 1-6 пасажів, $M \pm m$, $n = 3$.

Примітка:

* – $p < 0,05$;

** – $p < 0,01$;

*** – $p < 0,001$ в порівнянні з першим пасажем.

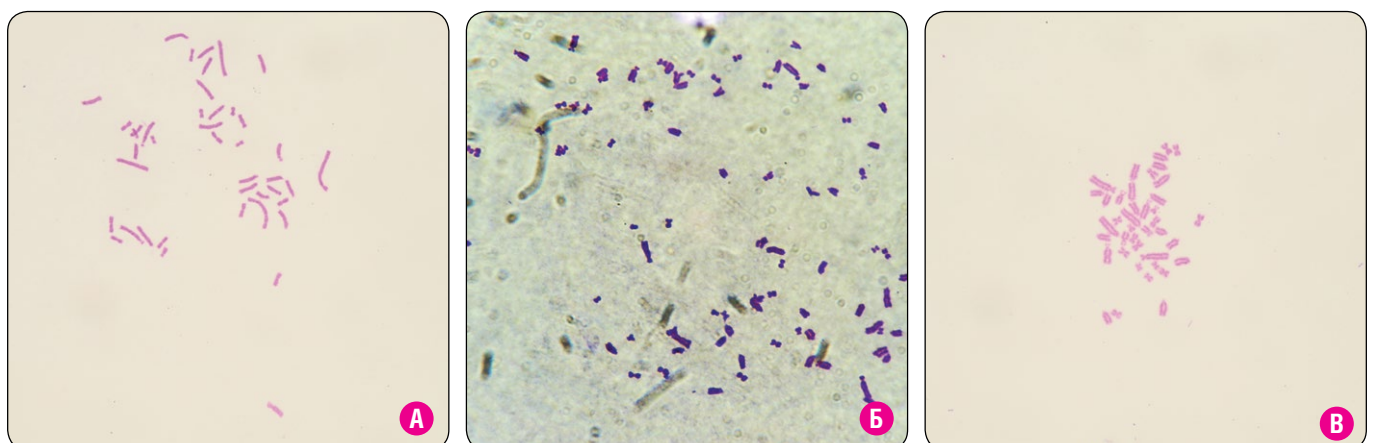


Рис 1. Мікрофотографії метафазних пластинок культури клітин підшлункової залози щура (4-й пасаж), забарвлення Leucodif 200; ок.×100, об. ×100: А) нормальний каріотип (42 хромосоми); Б) поліплоїдія (84 хромосоми); В) анеуплоїдія (40 хромосом).

Вказані зміни можуть бути пояснені тим, що запрограмована смерть клітин *in vitro* індукується накопиченням генетичних помилок, що і відмічалось нами на четвертому пасажі у збільшенні відсотку клітин у стані апоптозу (табл. 2) [8]. В той же час отримані нами показники не перевищували спонтанного рівня соматичного мутагенезу, характерного для лімфоцитів ссавців [11].

Кратне збільшення числа хромосом (поліплоїдія) проявилось у популяції клітин з другого по шостий пасаж (рис. 1, Б). Поліплоїдії можуть спричинятися відхиленням від нормального ходу мітозу, а також внаслідок злиття двох клітин, що більш характерно саме для культур клітин [4]. Починаючи з другого пасажу спостерігали тенденцію до збільшення даної геномної мутації до 7,8 %. Проте отриманий нами результат був нижчим спонтанної хромосомної мінливості для ссавців (6-15 %) [7, 11].

Для оцінки цитогенетичних змін культури клітин підшлункової залози щурів був проведений мікроядерний тест. Як відомо, мікроядра утворюються в результаті порушення веретена поділу, що призводить до нерозходження чи відставання в розходженні хромосом до полюсів клітини. До складу мікроядер можуть входити як окремі цілі хромосоми, так і їх фрагменти (рис. 2, А). Вони є патологічною структурою, і їх утворення пов'язано з хромосомною нестабільністю [3, 4].

Результати, наведені у табл. 2, свідчать про наявність мікроядер на всіх пасажах. При цьому з другого пасажу спостерігали достовірне збільшення їх кількості. Однак відсоток клітин з мікроядрами знаходився в межах норми для ссавців (1,6-5,6 %) [7, 20].

Одночасно нами відмічено достовірне збільшення кількості двоядерних клітин з першого до шостого пасажу, що може бути наслідком подовження клітинного циклу, зокрема цитокінезу (рис. 2, Б). Однак їх кількість не перевищувала рівня спонтанних мутацій, характерного для ссавців (5,4 %) [7, 20].

Під час дослідження відмічали зниження мітотичного індексу від першого (2,7 %) до третього пасажу (1,5 %) та його поступове

збільшення на четвертому (1,7 %) і шостому (2,0 %) пасажах. Норма для ссавців становить 2,9-4,1 % [7, 11].

Крім цього, було виявлено незначний відсоток клітин у стані апоптозу (рис. 2, В), кількість яких поступово зростала до 4-го пасажу (0,5 %). На 5-6-му пасажах спостерігали зменшення кількості клітин у стані апоптозу до 0,1 %. Рівень апоптотичних клітин був в межах норми.

За останній час питання генетичної стабільності культури клітин піднімалося багатьма науковцями. Варто зазначити, що в основній масі друкованих праць описуються властивості лише мезенхімальних стовбурових клітин [2, 5, 14-16, 18]. Частина досліджень щодо мезенхімальних стовбурових клітин висувають на перший план питання про те, як нестабільність геному може призвести до спонтанної іморталізації і злоякісної трансформації культури [16]. У той же час роботи деяких дослідників вказують на відсутність генетичних помилок у культурі клітин *in vitro* при їх культивуванні до 2 місяців [15, 18]. Дослідження інших авторів вказують про відсутність новоутворень у імунodefіцитних мишей при введенні культури клітин на ранніх етапах культивування, навіть при наявності у останній зміненого каріотипу [14].

Основна маса дослідників вважає, що злоякісна трансформація можлива при тривалому культивуванні культури клітин [2, 13, 14, 16, 18]. Їх дані свідчать, що кількість клітин зі зміненим каріотипом збільшується з тривалістю культивування. Проте вони зазначають, що важливу роль у підтриманні стабільності культури відіграють: джерело отримання культури клітин, умови культивування (індекс проліферації), обробка ферментами тощо [2, 5, 13].

Отримані нами дані щодо хромосомної стабільності культури клітин підшлункової залози щура на ранніх пасажах підтверджують, що зі зростанням тривалості культивування збільшується кількість клітин із порушеним каріотипом. Отже, дослідження безпечності культури клітин є важливою умовою перед їх подальшим застосуванням.

№ ПАСАЖУ	КЛІТИНИ З НОРМАЛЬНИМ ЯДРОМ, %	КЛІТИНИ З МІКРОЯДРАМИ, %	ДВОЯДЕРНІ КЛІТИНИ, %	АПОПТОЗ, %	МІТОТИЧНИЙ ІНДЕКС, %
I	99,7 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	2,7 ± 0,1
II	99,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1**
III	99,0 ± 0,0***	0,5 ± 0,1*	0,5 ± 0,1*	0,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1***
IV	98,0 ± 0,1***	0,7 ± 0,2*	0,8 ± 0,1**	0,5 ± 0,1*	1,7 ± 0,1***
V	98,5 ± 0,1***	0,5 ± 0,1*	0,8 ± 0,0***	0,2 ± 0,1	1,4 ± 0,0***
VI	98,4 ± 0,2**	0,7 ± 0,1**	0,8 ± 0,1***	0,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1**

Таблиця 2. Результати аналізу ядер в культурі клітин підшлункової залози щура, M ± m, n = 3.

Примітка:
* – p < 0,05;
** – p < 0,01;
*** – p < 0,001
в порівнянні з першим пасажем.



Рис 2. Мікрофотографії цитопрепаратів клітин культури клітин підшлункової залози щура (4-й пасаж) зі змінами у ядрі, забарвлення Leucodif 200, окx10, об. x100: А) клітини з мікроядрами; Б) двоядерна клітина; В) клітина в стані апоптозу.

ВИСНОВКИ

1. Аналіз каріотипу культури клітин підшлункової залози щурів показав, що за використаних нами умов їх культивування кількість анеуплоїдій та поліплоїдій змінювалась з кожним пасажом, але не виходила за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців.
2. За результатами цитогенетичної оцінки культури встановлено, що кількість клітин з мікроядрами, двоядерних клітин та клітин у стані апоптозу знаходилась у межах видової норми з першого до шостого пасажу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аметов А. С. Перспективы развития диабетологии [Текст] / А. С. Аметов // Тер. архив. – 2005. – № 10. – С. 5-9.
2. Берсенев А. В. Изучение спонтанной онкогенетической трансформации мезенхимальных стволовых клеток человека в культуре [Текст] / А. В. Берсенев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – № 1. – С. 14–16.
3. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей: методические рекомендации [Текст] / Т. С. Колмакова, С. Н. Белик, Е. В. Моргуль, и др. // Ростов на Дону: Изд-во РостГМУ. – 2013. – 31 с.
4. Ковалева О. А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих [Текст] / О. А. Ковалева // Цитология и генетика. – 2008. – № 1. – С. 58–72.
5. Каріотиповий аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів за різних методів дисоціації клітинного моношару на ранніх пасажах культивування in vitro [Текст] / А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, Л. Ф. Стародуб, та ін. // Науковий вісник НУБіП України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. – 2015. – Вип. 227.
6. Мазуркевич А. Й. Клітинні технології у ветеринарній медицині [Текст] / А. Й. Мазуркевич, В. В. Ковпак, Данілов В. Б. // Навчальний посібник – К.: КОМПРИНТ – 2014. – 132 с.
7. Микроядерный тест как метод определения сезонной изменчивости цитогенетических показателей у млекопитающих [Текст] / О. Ковалёва, Н. Кобозева, Е. Бурдо, и др. // Раритетная териофауна та її охорона. Праці Териологічної школи. – Луганськ. – 2008. – № 9. – С. 266-269.
8. Мушкамбаров Н. Н. Молекулярная биология [Текст] / Н. Н. Мушкамбаров, С. Л. Кузнецов // Учебное пособие для студентов медицинских вузов. – М.:ООО «Медицинское информационное агентство». – 2013. – 544 с.
9. Тронько Н. Д. Достижения регенеративной медицины в терапии сахарного диабета 1 типа. I. Источники получения б-клеток (1 часть) [Текст] / Н. Д. Тронько, И. П. Пастер // Эндокринология. – 2012. – 17. № 2. – С. 66-73.
10. Тронько Н. Д. Достижения регенеративной медицины в терапии сахарного диабета 1 типа. I. Источники получения б-клеток (2 часть) [Текст] / Н. Д. Тронько, И. П. Пастер // Эндокринология. – 2012. – 17. № 3. – С. 74-84.
11. Эрнст Л. К. Мониторинг генетических болезней животных в системе крупномасштабной селекции [Текст] / Л. К. Эрнст, А. И. Жигачев. – М: Россельхозакадемия, 2006. – 382 с.
12. Burns C. J. Stem cell therapy for diabetes: do we need to make beta cells? [Text] / C. J. Burns, S. J. Persaud, P. M. Jones // J. Endocrinol. – 2004. – Vol. 183. – P. 437-43.
13. Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells [Text] / D. Foudah, S. Redaelli, E. Donzelli, et al. // Chromosome Res. – 2009. – Vol. 17, № 8. – P. 1025–39.
14. Long-term In vitro Expansion Alters the Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells [Text] / R. Izadpanah, D. Kaushal, C. Kriedt, et al. // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68, № 11. – P. 4229-238.
15. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow [Text] / K. Mareschi, I. Ferrero, D. Rustichelli, et al. // J. Cell. Biochem. – 2006. – Vol. 97, № 4. – P. 744–754.
16. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation [Text] / M. Miura, Y. Miura, N. M. Padilla, et al. // Stem. Cells. – 2005. – Vol. 24. – P.1095–103.
17. Nathan D. M. Long-term complications of diabetes mellitus [Text] / D. M. Nathan // N. Engl. J. Med. – 1993. – № 328. – P. 1676-85.
18. Spontaneous human stem cell transformation [Text] / D. Rubio, J. GarciaCastro, M. C. Martin, et al. // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65. – P. 3035–39.
19. The DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus [Text] // N. Engl. J. Med. – 1993. – № 29. – P. 977-86.
20. Xikum X. Observations on micronuclei germ cells [Text] / X. Xikum, S. Liming // Zool. Res. – 1990. – Vol. 11, № 4. – P. 343.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 14.03.2016 р.

Прийнята до друку 28.04.2016 р.