

## ДОСЛІДЖЕННЯ АБЕРАНТНИХ МІТОЗІВ У ПОПУЛЯЦІЯХ ЕМБРІОНАЛЬНИХ ГЕРМІНАТИВНИХ КЛІТИН МИШІ *IN VITRO*

Грипич О. А.<sup>1</sup>, Кушнірук В.О.<sup>2</sup>, Яцишина А.П.<sup>3</sup>,

Підпала О.В.<sup>3</sup>, Рубан Т.П.<sup>3</sup>, Лукаш Л.Л.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Національний технічний університет України «КПІ»

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Т.Г. Швченка

<sup>3</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України

Ембріональні гермінативні клітини (ЕГК) являються альтернативним джерелом плюрипотентних стовбурових клітин. Метою даного дослідження був аналіз аберантних мітозів в популяції мишиних ЕГК *in vitro*. В статті представлені результати, що досліджуванні мишині ЕГК лінії мають генетичну нестабільність, незважаючи на відмінності умов культивування.

**Ключові слова:** Ембріональні гермінативні клітини, стовбурові клітини, аберантні мітози.

Клітинні лінії різного походження активно використовують у багатьох лабораторіях для наукових досліджень у генетиці, клітинній біології, цитології, вірусології, експериментальній онкології та медицині. Одним із найперспективніших напрямків у медицині є клітинна терапія із використанням різних типів стовбурових клітин (СК) завдяки їхній здатності до необмеженого поділу та диференціювання в певному напрямку [1, 2].

Плюрипотентні СК, наприклад ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) та ембріональні гермінативні клітини (ЕГК), розглядають як необмежене джерело матеріалу для клітинної терапії [3, 4]. Незважаючи на різні джерела одержання, ЕСК і ЕГК мають спільні характеристики, серед яких важливими є нормальний каріотип,

можливість тривалого пасажування та здатність диференціюватися в клітини усіх трьох зародкових шарів [1-4]. Із мишиних ЕСК та ЕГК можна отримати *in vitro* гематопоетичні клітини, кардіоміоцити, а також культури нейронів, склетних м'язів тощо [5-8].

Сучасні біотехнології із практичним застосуванням СК у тому числі у клітинній терапії серцево-судинних захворювань людини, пов'язані з необхідністю одержання в умовах культивування достатньої кількості клітинного матеріалу. При роботі з клітинними лініями завжди виникає питання про їхню генетичну стабільність у культурі, оскільки відомо, що при тривалому культивуванні СК ссавців відбуваються генетичні та епігенетичні зміни [9-12]. Ці результати поставили дискусивні питання щодо можливостей використання культивованих *in vitro* СК у регенеративній медицині, пошуку характеристик для прогнозу генетичної стабільності клітинних популяцій, а також необхідності постійного ретельного тестування отриманих культур. Тому метою даного дослідження був аналіз аберантних мітозів у популяціях ембріональних гермінативних клітин миші *in vitro*.

**Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження були одержані у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України клональні лінії G1, G4, G6, G7 ЕГК, ізольовані із статевих горбиків 12,5-денних ембріонів миші лінії BALB/c [13]. У роботі використовували методи культивування ссавців *in vitro*, мікроядерний тест у модифікації до клітинних ліній [14, 15] та статистичні методи аналізу отриманих результатів [16].

**Результати та обговорення.** Як контроль при аналізі мікроядерних та багатоядерних клітин у популяціях клітинних ліній миші брали результати аналогічного дослідження ембріональних фібробластів миші (ЕФМ) лінії BALB/c на 3-му пасажі культивування та ембріональні фібробласти стандартної клітинної лінії 3Т3 миші.

Як багатоядерні клітини враховували такі, які мають від трьох ядер і більше, оскільки двоядерні клітини можуть бути проліферуючими та мати затримку цитотомії. Результати проведених досліджень наведені у таблиці 1.

## Розподіл клітин різних культур за кількістю ядер

Культура клітин	Пасаж	Вибірка	Кількість клітин із певною кількістю ядер, %		
			1 ядро	2 ядра	3 ядра
G4	28	4234	99,50±0,11	0,50±0,11	0
G6	15	4113	99,37±0,12	0,51±0,11	0,049±0,035
G7	14	4173	99,065±0,15	0,72±0,13	0,14±0,058

Примітка: “0” – Не виявлено.

У клітинних популяціях досліджуваних ліній G4, G6 і G7 виявили менший відсоток багатоядерних клітин та вищий відсоток одноядерних (таблиця), порівняно з популяцією ЕФМ, для яких відповідно частоти таких клітин становили  $0,35\pm 0,14\%$  і  $96,06\pm 0,47\%$  [15]. Цікаво, що в популяції клітин лінії G4 багатоядерних клітин взагалі не спостерігали. На відміну від даних клітинних культур для лінії G1 показано, що частоти багатоядерних клітин були значно вищими, зокрема  $2,35\pm 0,39\%$ , до того ж у клітинах даної лінії спостерігали до десяти ядер [15].

У результаті проведених досліджень виявили вірогідну різницю між частотами одноядерних клітин в популяціях ЕФМ та G4, G6 і G7 із вірогідністю безпомилкових прогнозів 0,999, обчислену за [16]. Між частотами багатоядерних клітин ЕФМ і лінії G7 вірогідної різниці не спостерігали, тоді як для ЕФМ і G6 вони відрізнялися із вірогідністю безпомилкових прогнозів 0,95. Для клітинних ліній G6 і G7 виявили вірогідно нижчі частоти багатоядерних клітин, порівняно із лінією G1 [15] (вірогідність безпомилкових прогнозів 0,999).

Для аналізу мікроядерних клітин враховували клітини з одним і більше мікроядрами. Мікроядра спостерігали не лише в одноядерних, але і в багатоядерних клітинах, наприклад, G6 і G7 ліній. Дані частот мікроядерних клітин наведені на рисунку.

Культура клітин ЕФМ та ембріональні фібробласти лінії 3T3 миші характеризувалися значно нижчими частотами мікроядерних клітин, порівняно з

отриманими лініями ЕГК миші (рисунок). Виявлена різниця частот мікроядерних клітин у популяціях ЕФМ і G1 мала вірогідність безпомилкових прогнозів 0,99, а для ЕФМ і досліджених ліній G4, G6 і G7 становила 0,999. Окрім зазначених вище патологій мітозу значно рідше спостерігали інші форми порушень клітинного циклу, наприклад, клітини із мостами, а також із такими патологіями ядра: каріолізис, каріопікноз, клітини із деформованими і сегментованими ядрами, клітини із вибрунькуванням апоптичних тілець.



Рис. 1 Кількість мікроядерних клітин у популяціях клітинних культур:  
 1 – 3Т3; 2 – ЕФМ, 3-й; 3 – G1, 41-й, 4 – G4, 28-й, 5 – G6, 15-й,  
 6 – G7, 14-й пасажі.

Відомо, що незначна кількість аберантних мітозів спостерігається у нормальних клітинах ссавців (від 0,3% в епідермісі мишей до 2% в епітеліальних тканинах людини), а підвищена – у клітинах неопластичного походження (10-25% у клітинах ліній HeLa, Нер-2 тощо) [17]. У результаті проведених досліджень у популяціях клітин ліній G4 на 28-му пасажі та G6 на 15-му пасажі виявили частоти мікроядерних клітин, які перевищували межу норми (2% бар'єр). Це може свідчити про генетичну нестабільність даних ліній та про порушення регуляції клітинного циклу, які можуть сприяти непластичній трансформації даних клітин.

Оскільки відомо, що СК чутливі до стресових умов культивування та здатні набувати генетичних змін *in vitro* навіть при вирощуванні на фідерному шарі клітин [9-11], підвищені частоти клітин з аберантними мітозами в досліджених лініях ЕГК миші (G1, G4, G6 і G7) можуть бути наслідком переведення їх в умови моношарового культивування. Таким чином, необхідний підбір умов культивування СК та постійний моніторинг генетичної стабільності клітинних популяцій *in vitro*.

### Література

1. Thomson J.A et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // Science. – 1998. – Vol. 282, № 5391. – P. 1145-1147.
2. Resnick J.L.e alt.. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture // Nature. – 1992. – Vol. 359, № 6395. – P.550-551.
3. Evans M.J., Kaufmann M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature. – 1981. – Vol. 292, № 5819. – P. 154-156.
4. Shambloott M.J. et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells // Proc.Natl.Acad.Sci. USA. – 1998. – Vol. 95, № 23. – P. 13726-13731.
5. Ohtaka T., Matsui Y., Obinata M. Hematopoietic Development of Primordial Germ Cell-Derived Mouse Embryonic Germ Cells in Culture // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1999. – Vol. 260, Issue 2. – P. 475-482.
6. Keller G. et al. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture // Mol. Cell Biol. – 1993. – Vol. 13, № 1. – P. 473-486.
7. Klug M.G. et al. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts // J. Clin. Invest. – 1996. – Vol. 98, № 1. – P. 216–224.
8. Rohwedel J.et al. Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution // Cell Biology Int. – 1996. – Vol. 20, № 8. – P. 579-587.
9. Maitra A. et al Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. // Nat. Genet. – 2005. – Vol. 37, № 10. – P.1099-1103.

10. Kanatsu-Shinohara M. et al. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture // *Development*. – 2005. – Vol. 132, № 18. – P. 4155-4163.
11. Ware C.B., Nelson A.M., Blau C.A. A comparison of NIH-approved human ESC lines // *Stem Cells*. – 2006. – Vol. 24, № 12. – P. 2677-2684.
12. Никольский Н.Н., Габай И.А., Сомова Н.В. Эмбриональные стволовые клетки человека. Проблемы и перспективы // *Цитология*. – 2007. – Т. 49, № 7. – С. 529-537.
13. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Підпала О.В., Вагіна І.М., Кочубей Т.П. Одержання нових ліній стовбурових клітин миші і вивчення впливу мікрооточення на їхню каріотипічну мінливість *in vitro* // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 2006. – Т. 38, № 2. – С. 144-152.
14. Кушнірук В.О., Грипич О.А., Яцишина А.П., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Лукаш Л.Л. Порівняльний аналіз частот аберантних мітозів у популяціях стовбурових клітин ссавців різного походження // *Щорічник наукових праць Асоціації серцево-судинних хірургів “Серцево-судинна хірургія”*. – 2009, випуск 17. – С. 293-296.
15. Яцишина А.П., Підпала О.В., Рубан Т.П., Тимошук О.В., Лукаш Л.Л. Цитоморфологічна характеристика нової клітинної лінії миші G1 // *Цитология и генетика*. – 2006. – Т. 40, № 3. – С. 49-58.
16. Плохинский Н.А. Алгоритмы биометрии / Под ред. акад. АН СССР Б.В. Гнеденко. – М.: Изд-во МГУ, 1980. – 150 с.
17. Гривенников И.А., Бобрышева И.В., Варшавер Н.Б., Григоренко А.П., Иноземцева Л.С., Мануилова Е.С. Молекулярные механизмы дифференцировки, злокачественной трансформации и гибели соматических клеток млекопитающих *in vitro* // *Проблемы и перспективы молекулярной генетики*/ Отв.ред. Е.Д. Сverdlov. – М.: Наука, 2003. – Т. 1. – С. 248-289.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ АБЕРРАНТНЫХ МИТОЗОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ**

## **ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ГЕРМИНАТИВНЫХ КЛЕТОК МЫШИ *IN VITRO***

**Грипич О.А., Кушнирук В.О., Яцишина А.П.,**

**Пидпала О.В., Рубан Т.П., Лукаш Л.Л.**

Эмбриональные герминативные клетки (ЭГК) являются альтернативным источником плюрипотентных стволовых клеток. Целью данного исследования был анализ aberrantных митозов в популяции мышинных ЭГК *in vitro*. В статье представлены результаты, что исследуемые мышинные ЭГК линии имеют генетическую нестабильность, несмотря на отличия условий культивирования.

**Ключевые слова:** Эмбриональные герминативные клетки, стволовые клетки, aberrantные митозы.

## ***IN VITRO* ABERRANT MITOSIS STUDY IN THE EMBRYONAL GERMINATIVE CELLS POPULATIONS OF MOUSE**

**O.A. Gripich, V.O. Kushniruk, A.P. Yatsyshyna,**

**O.V. Pidpala, T.P. Ruban, L.L. Lukash**

Embryonic germ cells (EGCs) are an alternative source of pluripotent stem cells. The main aim of the study presented was the analysis of aberrant mitoses in populations of mouse EGCs *in vitro*. In this article, results of our study show that all mEGC lines examined possessed a certain degree of genetic instability, despite differences in culture conditions.

**Key words:** embryonic germ cells, stem cells, aberrant mitoses.