

УДК 611-018.46-032:611-013.8]-076-092.9
DOI 10.11603/bmbr.2706-6290.2022.1.12970

О. М. Загречук, І. Р. Палій, А. І. Довгалюк, С. Б. Крамар, Г. Й. Лавренчук

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

ЦИТОГЕНЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН ІЗ ПУПОВИНИ ЩУРІВ, КУЛЬТИВОВАНИХ *IN VITRO*

Цитогенетичне дослідження мезенхімальних стовбурових клітин із пуповини щурів, культивованих *in vitro*

О. М. Загречук, І. Р. Палій, А. І. Довгалюк,
С. Б. Крамар, Г. Й. Лавренчук

Тернопільський національний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Резюме. Результати преклінічних наукових досліджень та клінічних випробувань свідчать про високу ефективність використання стовбурових клітин для відновлення уражених патологією структур організму. Важливою умовою отримання високоякісного клітинного матеріалу для регенеративної медицини є підтримання цитогенетичної стабільності культури стовбурових клітин *in vitro*.

Мета дослідження – цитогенетично проаналізувати культуру клітин пуповинних канатиків ембріонів щурів на різних пасажах культивування та оцінити стабільність каріотипу культивованих стовбурових клітин.

Матеріали і методи. Для отримання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) використовували пуповинні канатики щурів лінії Wistar Rattus norvegicus Berkenhout. Аналіз проводили протягом 1–8 пасажів. Метафазні пластинки отримували за модифікованою стандартною методикою каріотипування. Після тригодинного інкубування у 10^{-7} М розчині колхіцину, здійснювали трипсинізацію матеріалу. Далі фермент нейтралізували кондиційним середовищем і до клітин додавали теплий гіпотонічний розчин KCl (0,075 М). Матеріал фіксували оцтовим метанолом (1:3) на танучому льоді. Фіксатор замінювали трічі, потім суспензію клітин розкапували на холодній вологій предметній скельці. Зразки фарбували розчином Романовського – Гімзи. Цитогенетичний аналіз МСК проводили на 30 метафазних пластинках на кожному пасажі. В отриманих зразках виявляли кількісні порушення хромосомного набору (анеуплоїдію (АП), поліплоїдію (ПП)) та підраховували кількість клітин з мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (МІ). Частоту прояву АП, ПП та МЯ вираховували на 500 клітин (у %).

Результати. При дослідженні МСК пуповини щурів вже на перших пасажах виявлено поодинокі порушення в хромосомному наборі, такі, як АП та ПП. Кількість клітин із цитогенетичними аномаліями поступово зростала із збільшенням тривалості культивування, однак відсоток клітин з нормальним каріотипом не зменшився до восьмого пасажу більше ніж на 10 %. Відсоток АП на перших двох пасажах зростав від 1,5 до 1,9 %. При подальшому

©О. М. Загречук та ін., 2022

Cytogenetic research of mesenchymal stem cells from rat umbilical cord in cultivated *in vitro*

O. M. Zahrychuk, I. R. Palii, A. I. Dovhalyuk,
S. B. Kramar, H. Y. Lavrenchuk

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University

e-mail: dovghalyuk@tdmu.edu.ua

Summary. The results of preclinical researches and clinical trials indicate the high efficiency of the use of stem cells to restore pathologically affected body structures. To obtain high-quality cellular material for regenerative medicine, the important condition is to maintain the cytogenetic stability of stem cell culture *in vitro*.

The aim of the study – cytogenetic analysis of the culture of umbilical cord cells of rat embryos at different passages of cultivation and assessment of the karyotype stability of cultivated stem cells.

Materials and Methods. To obtain mesenchymal stem cells (MSCs), the umbilical cords of Wistar Rattus norvegicus Berkenhout rats were used. The analysis was performed during 8 passages. Metaphase plates were obtained by a modified standard karyotyping technique. After three hours of incubation in 10^{-7} M colchicine solution, trypsinization of the material was performed. Next, the enzyme was neutralized with conditioned medium and warm hypotonic KCl solution (0.075 M) was added to the cells. The material was fixed with acetic methanol (1:3) on melting ice. The fixing solution was replaced three times, then the cell suspension was dripped onto cold wet slides. The samples were stained with Romanowski-Gimza solution. Cytogenetic analysis of MSC was performed on 30 metaphase plates at each passage. Quantitative abnormalities of the chromosome set (aneuploidy (AP), polyploidy (PP)) were detected in the obtained samples and the number of cells with micronuclei (MN) and mitotic index (MI) were counted. The frequency of AP, PP and MN was calculated per 500 cells (in %).

Results. In the study of MSC of the rat umbilical cord in the first passages single disorders in the chromosomal set, such as AP and PP were revealed. The number of cells with cytogenetic abnormalities gradually increased with increasing duration of cultivation, but the percentage of cells with normal karyotype did not decrease until the eighth passage by more than 10 %. The percentage of AP in the first two passages was increasing from 1.5 % to 1.9 %. With further cultivation to 6 passages, the level of AP increased almost 3 times. Over the next two passages, the number

культивуванні до 6 пасажу рівень АП зріс майже в 3 рази. За два наступних пасажі кількість АП майже не змінилася. На перших двох пасажах відсоток ПП був мінімальний – 1,1–1,3 %. До шостого пасажу відзначали підвищення кількості таких клітин у 2,8 %. При культивуванні до восьмого пасажу подвоєння числа хромосом зросло ще в 1,1 рази. У першому пасажі в культурі МСК був зареєстрований дуже малий відсоток МЯ ($\approx 0,2$ %). При продовженні пасажування їхня кількість зросла на 2,9 %. Мітотичний індекс МСК зростав з першого до п'ятого пасажу з 3,9 до 4,8 %. З кожним наступним пасажем мітотичний потенціал клітин знижувався і до завершення аналізованого періоду культивування становив 3,1 %.

Висновки. Аналіз каріотипу клітин пуповини щурів за підібраних умов культивування показав незначне зростання відсотка АП та ПП. Також спостерігали низький відсоток клітин з мікроядрами. Отже, на ранніх пасажах дану клітинну лінію можна безпечно використовувати з терапевтичною метою для лікування змодельованих патологій у щурів.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини; цитогенетичне дослідження; анеуплоїдія; поліплоїдія.

ВСТУП

Дослідження стабільності геному стовбурових клітин набуває все більшої актуальності у зв'язку з активним розвитком клітинних технологій та перспектив їх застосування в різних галузях медицини [1, 2]. У процесі культивування при збільшенні кількості пасажів в активно проліферуючих клітинах можуть виникати спонтанні мутації, що призводять або до втрати їхньої життєздатності, або до формування аномальних клітинних клонів. Цитогенетичні порушення (зміни хромосомного набору *de novo*) спричиняють неправильне функціонування геному, що може призвести, у тому числі, й до їх пухлинної трансформації [1, 3–6].

У літературних джерелах зустрічаються суперечливі дані щодо можливостей збереження стабільності каріотипу клітинних ліній *in vitro*. Отже, питання щодо підтримання генетичної стабільності культури клітин поза організмом залишається важливим, оскільки має як теоретичне, так і практичне значення.

Метою дослідження було цитогенетично проаналізувати культуру клітин пуповинних канатиків ембріонів щурів на різних пасажах культивування та оцінити стабільність каріотипу культивованих стовбурових клітин.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Маніпуляції із тваринами проводили з дотриманням вимог етики медичних і біологічних досліджень у відповідності до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) ETS N 123 та вимог «Guide for the care and use of laboratory animals» National Academy Press, USA, 1996 (Осло, 2017).

of APs has hardly changed. In the first two passages, the percentage of PP was minimal – 1.1–1.3 %. Till the sixth passage, there was an increase in the number of such cells by 2.8 %. When cultivated to the eighth passage, the doubling of the number of chromosomes increased 1.1 times. At the first passage in the culture of MSC a very small percentage of MN (≈ 0.2 %) was registered. As the passages continued, the MN number increased by 2.9 %. The MSC's mitotic index was rising from 3.9 to 4.8 % from the first to the fifth passage. With each subsequent passage, the mitotic potential of the cells decreased and by the end of the analyzed cultivation period it was 3.1 %.

Conclusions. Karyotyping the rat umbilical cord cells under the selected cultivation conditions showed a slight increase in the percentage of AP and PP. A low percentage of micronuclear cells was also observed. Therefore, in early passages this cell line can be safely used for therapeutic purposes for the treatment of simulated pathologies in rats.

Key words: mesenchymal stem cells; cytogenetic study; aneuploidy; polyploidy.

Для отримання МСК використовували пуповинні канатики плодів самок щурів лінії Wistar Rattus norvegicus Berkenhout. Евтаназію проводили на 20-му дні гестації із використанням тіопенталу. Для отримання життєздатних МСК дисоціацію клітинної маси здійснювали за стандартною методикою у власній модифікації [7]. Клітинний матеріал культивували в CO_2 інкубаторі за температури 37°C та концентрації CO_2 – 5 %. Візуальну оцінку формування моношару здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Delta Optical NIB-100. Пересів клітин проводили після досягнення культурою 90 % конфлюенту.

Отримання метафазних пластинок з МСК здійснювали за модифікованою стандартною цитогенетичною методикою [8] протягом 1–8 пасажів. Процедура проводили на 3, 4 та 5 доби, коли клітинна популяція досягала логарифмічної фази росту. Після інкубування клітин протягом 3 год у 10^{-7} М розчині колхіцину при 37°C здійснювали трипсинізацію матеріалу впродовж 10 хв у CO_2 -інкубаторі при 37°C . Далі фермент нейтралізували кондиційним середовищем і до клітин додавали теплий гіпотонічний розчин KCl (0,075 М) та інкубували ще 20 хв. Фіксацію матеріалу здійснювали сумішшю оцтової кислота:метанол (у співвідношенні 1:3) на танучому льоді протягом 10 хв. Фіксатор замінювали тричі, потім суспензію клітин розкапували на холодні вологі предметні скельця. Зразки фарбували розчином Романовського – Гімзи («Merck», Німеччина). Цитогенетичний аналіз клітинної культури проводили на 30 метафазних пластинках на кожному пасажі. Досліджували метафазні клітини за допомогою мікроскопа лабораторного класу Nikon Eclipse Ci-E (Японія).

В отриманих зразках виявляли кількісні порушення хромосомного набору (анеуплоїдію (АП), поліплоїдію (ПП)) та підраховували кількість клітин з мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (МІ). Частоту прояву АП, ПП та МЯ вираховували на 500 клітин (у %).

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Excel (Microsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Цитогенетичний аналіз МСК пуповини щурів виявив, що диплоїдний набір налічує 42 хромосоми

(рис. 1). У каріотипі виділяють 7 пар метацентричних, 3 – субметацентричних та 10 субтело- й акроцентричних пар аутосом. Обидві статеві хромосоми акроцентричні, середнього розміру. Отримані результати каріотипування клітин щурів узгоджуються з даними інших дослідників [9, 10].

Незважаючи на великий відсоток клітин із нормальним каріотипом, ми виявили також такі порушення в хромосомному наборі як АП та ПП (рис. 2). Ці зміни характерні вже з першого пасажу. Результати цитогенетичних досліджень представлено в таблиці.

Серед усіх протестованих зразків кількість клітин із нормальним каріотипом до восьмого пасажу змен-



Рис. 1. Нормальний каріотип *Rattus norvegicus* Berkenhout. $\times 2000$.

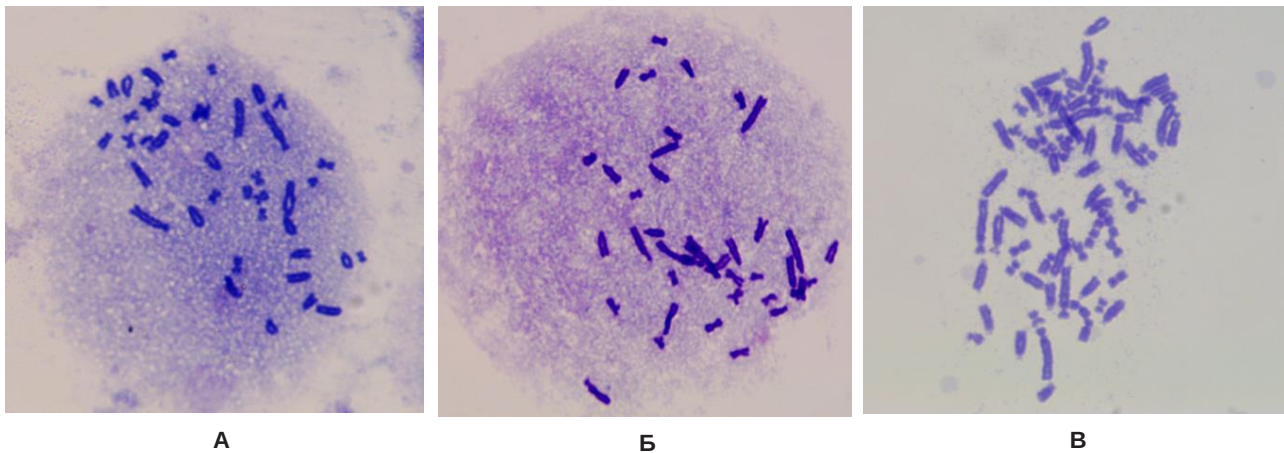


Рис. 2. Мікрофотографії метафазних пластинок культури клітин пуповини щура: а) нормальний каріотип, $n=42$; б) анеуплоїдія, $n=38$; в) поліплоїдія, $n=84$. Забарвлення за Романовським – Гімзою. $\times 1000$.

Таблиця. Результати цитогенетичного аналізу мезенхімальних стовбурових клітин із пуповини щурів I–VIII пасажів, %

№ пасажу	Клітини з нормальним каріотипом, %	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %	Клітини з мікроядрами, %	Мітотичний індекс, %
I	97,4 $\pm$ 1,4	1,5 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,4
II	96,8 $\pm$ 1,4	1,9 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,4
III	94,7 $\pm$ 1,3	3,2 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	4,5 $\pm$ 0,4
IV	93,8 $\pm$ 1,3	3,8 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,2	4,5 $\pm$ 0,5
V	92,8 $\pm$ 1,3	4,1 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,3	5,1 $\pm$ 0,5
VI	91,1 $\pm$ 1,2	5,2 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,4
VII	90,7 $\pm$ 1,2	5,4 $\pm$ 0,5	3,9 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,5	3,5 $\pm$ 0,4
VIII	90,0 $\pm$ 1,2	5,9 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,3

шилась на 10 %, за рахунок зростання випадків АП та ПП. Відсоток анеуплоїдних клітин збільшився до 5,9 %. Рівень АП на перших двох пасажах був мінімальним (1,5–1,9 %). При подальшому культивуванні до 6 пасажу, порівняно з першим, рівень АП зріс майже в 3,5 раза. За два наступних пасажі відсоток анеуплоїдних клітин зростав значно повільніше.

У популяції МСК з I до VIII пасажу також спостерігали кратне збільшення числа хромосом (ПП). На I та II пасажі відсоток поліплоїдних клітин був мінімальний – 1,1–1,3 %. Протягом III–VI пасажу спостерігалось поступове підвищення кількості таких клітин в 2,8 раза. При подальшому культивуванні до VIII пасажу подвоєння числа хромосом зросло ще майже в 2 рази.

Для додаткової оцінки цитогенетичних змін культури клітин із пуповини щурів був проведений МЯ-тест. У результаті культивування культури МСК вже з I пасажу були виявлені МЯ ($\approx 0,2$ %). При продовженні пасажування їхня кількість зросла на 2,9 %. Однак такі показники не перевищують нормальний, який для ссавців становить від 2,9 до 4,1 % [11].

Мітотичний індекс зростав з I до V пасажу з 3,9 до 4,8 %. При чому на III та IV пасажі, за винятком незначної похибки, зберігалось однакове значення МІ. З кожним наступним пасажем мітотичний потенціал клітин знижувався і до завершення аналізованого періоду культивування становив 3,1 %.

За даними літератури в щурів лінії *Rattus norvegicus* диплоїдний набір становить 42 хромосоми (Karyotypes of the mammals, 2014). В каріотипі виділяють 7 пар метацентричних хромосом, 2 – субтелоцентричних, 3 – субтелоцентричних та 9 акроцентричних пар. Статеві хромосоми акроцентричні. Х хромосома акроцентрична середнього розміру, а Y – найменша акроцентрична та найменша з усього набору хромосом (Karyotypes of the mammals, 2014). Також є повідомлення про варіації в центромерній ділянці у деяких аутозомах та Х-хромосомі [13].

При культивуванні *in vitro* не вдається повністю відтворити умови існування клітин в організмі, і вже на початкових етапах вирощування ізолюваних клітин можливе зниження їхньої життєдіяльності та поява спонтанних мутацій. Цитогенетичні аномалії неминуче накопичуються в клітинних культурах *in vitro*, оскільки клітини *ex vivo* позбавлені захисної дії імунної системи, яка в організмі регулярно виявляє мутовані клітини та елімінує їх. Вважається, що підвищення хромосомної нестабільності

в клітинах, культивованих *in vitro*, пов'язане як із нагромадженням генетичних помилок, так і зі зниженням чутливості клітин до ростових сигналів [12]. Поліплоїдизація може спричинятися порушеннями в проходженні природних фаз мітозу та цитокінезу, або внаслідок злиття двох клітин, що більш характерно для культивованих клітин [11].

Виявлена у наших експериментах цитогенетична нестабільність була незначною (АП зросла до 5,9 %, а ПП – до 4,1%). У роботах деяких інших науковців зазначені дещо вищі темпи цитогенетичних змін у соматичних клітинах ссавців (відсоток АП складав від 4,4 % до 12,2 % а ПП – від 3,3 % до 5,6 %) [3, 4, 6, 13].

При дослідженні метафазних пластинок МСК відзначали незначний відсоток клітин із мікроядрами. МЯ є ознакою патологічних утворень, пов'язаних з появою структурних змін у хромосомах або з порушенням їх кількісного набору. МЯ можуть спостерігатися в будь-яких клітинах проліферуючої тканини [14]. Найчастіше для ссавців вони становлять від 2,9 до 4,1 % [11]. Тож отримані показники не перевищують нормальні значення.

Проведений цитогенетичний аналіз культивованих МСК пуповини щурів показав, що отримані відсоткові значення аномалій каріотипу не перевищують рівень спонтанного мутагенезу, характерного для культивованих *in vitro* соматичних клітин ссавців [3]. Отже, дана клітинна лінія може бути безпечно використана на ранніх пасажах як засіб клітинної терапії для корекції змодельованих патологій у щурів.

ВИСНОВКИ

1. У результаті цитогенетичного дослідження культури мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин з пуповини щурів упродовж 8 пасажів виявили збільшення кількості хромосомних порушень. Відсоток анеуплоїдних клітин зріс із 2,3 до 5,9 %, а поліплоїдних – від 1,1 до 4,1 %.

2. З I до VIII пасажу спостерігалось поступове збільшення кількості клітин з мікроядрами від 0,2 до 3,1 %. Мітотичний індекс з I до VIII пасажу зріс на 1,4 %, але в подальшому, до VIII пасажу, знизився на 2 %.

3. Зважаючи на незначні зміни в хромосомному наборі досліджуваних МСК, дану клітинну лінію на ранніх пасажах можна безпечно використовувати як терапевтичний засіб для лікування змодельованих патологій у щурів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during in vitro culture / B. G. Stultz, K. McGinnis, E. E. Thompson [et al.] // *Cytherapy*. – 2016. – Vol. 18, No. 23. – P. 336–343.
2. Liver injury associated with acute respiratory distress syndrome and the prospects of mesenchymal stromal cells therapy for liver failure / O. Redko, A. Dovgalyuk, A. Dovbush [et al.] // *Cell and Organ Transplantation*. – 2021. – Vol. 9, No. 2. – P. 136–142.
3. Яцишина А. П. Генетична нестабільність клітин ссавців in vitro / А. П. Яцишина // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. – 2010. – № 8. – С. 165–178.
4. Сравнительный цитогенетический анализ стромальных клеток костного мозга на различных пассажах у крыс линии WISTAR / Е. А. Омельченко, В. Е. Кульшин, Е. С. Зарубенко [и др.] // *Проблеми безперервної медичної освіти та науки*. – 2011. – № 4. – С. 55–59.
5. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy and risk of malignancies / F. Casiraghi, G. Remuzzi, M. Abbate [et al.] // *Stem Cell Rev.* – 2013. – Vol. 9. – P. 65–79.
6. Мазуркевич А. Й. Цитогенетичний аналіз культури клітин жирової тканини щурів на ранніх пассажах / А. Й. Мазуркевич, В. В. Ковпак, О. С. Ковпак // *Український часопис ветеринарних наук*. – 2017. – № 265. – С. 159–167.
7. Визначення умов виділення первинного матеріалу та культивування мезенхімальних стовбурових клітин щурів / О.М. Загричук, А.І. Довгалюк, Г.Й. Лавренчук [та ін.] // *Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у*

клінічній та експериментальній медицині – 2020», 05–06 березня 2020 р. – Запоріжжя, 2020. – С. 8–9.

8. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток : практическое руководство / Р. Я. Фрешни. – БИНОМ : Лаборатория знаний. – 2010. – 691 с.

9. Arslan A. Karyotypes of the mammals of Turkey and neighbouring regions: a review / A. Arslan, J. Zima // *Folia Zoologica*. – 2014. – Vol. 63, No. 1. – P. 1–62.

10. Yiğit N. The Taxonomy and Karyology of *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) and *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia: Muridae) in Turkey / N. Yiğit, E. Çolak, M. Sözen // *Tr. J. of Zoology*. – 1998. – Vol. 22. – P. 203–212.

11. Ковалева О. А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих / О. А. Ковалева // *Цитология и генетика*. – 2008. – № 1. – С. 58–72.

12. Long-term culture of mesenchymal stem cells impairs ATM-dependent recognition of DNA breaks and increases genetic instability / D. Hladik, I. Höfig, U. Oestreicher [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2019. – No 10. – P. 218. DOI: 10.1186/s13287-019-1334-6.

13. Rat olfactory mucosa mesenchymal stem/stromal cells (OM-MSCs): a characterization study / R. D. Alvites, V. M. Branquinho, A. R. Caseiro [et al.] // *International Journal of Cell Biology*. Vol. 2020, Art. ID 2938258. – 21 p. DOI: 10.1155/2020/2938258.

14. Ткачук Т. В. Використання мікроядерного тесту для скринінгу та моніторингу мутагенів. Історичні контролі / Т. В. Ткачук, М. Г. Проданчук // *Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки*. – 2017. – № 3. – С. 15–25.

REFERENCES

1. Stultz BG, McGinnis K, Thompson EE, Lo Surdo JL, Bauer SR, Hursh DA. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during in vitro culture. *Cytherapy*. 2016 Mar;18(3):336-43. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.11.017. Epub 2016 Jan 15. PMID:26780865. PMCID:PMC5516473.
2. Redko O, Dovgalyuk A, Dovbush A, Nebesna Z, Yakubyshyna L, Krynytska I. Liver injury associated with acute respiratory distress syndrome and the prospects of mesenchymal stromal cells therapy for liver failure. *Cell and Organ Transplantation*. 2021;9(2): 136-42.
3. Yatsyshyna AP. [Genetic instability of mammalian cells in vitro]. *Visn Ukr tov henet i selekts*. 2010;(8): 165-78. Ukrainian.
4. Omelchenko EA, Kulshin VE, Zarubenko ES, Panibrattseva SG, Zabirnik AS. [Comparative cytogenetic analysis of bone marrow stromal cells at different passages in WISTAR rats]. *Probl bezperernv med osviti i nauk*. 2011;(4): 55-9. Russian.
5. Casiraghi F, Remuzzi G, Abbate M, Perico N. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy and risk of malignancies. *Stem Cell Rev Rep*. 2013;9(1): 65-79. PMID: 22237468.
6. Mazurkevich AI, Kovpak VV, Kovpak OS. [Cytogenetic analysis of adipose tissue cell culture in rats

at early passages]. *Ukr zhurn vet nauk*. 2017;(265): 159-67. Ukrainian.

7. Zagrychuk OM, Dovgalyuk AI, Lavrenchuk GY, Fedonyuk LA, Klishch IM. [Determination of conditions for isolation of primary material and cultivation of rat mesenchymal stem cells]. All-Ukrainian scientific-practical conference with international participation "Modern issues of molecular biochemical research and laboratory screening in clinical and experimental medicine - 2020". 2020 Mar 05-06; Zaporizhzhia, Ukraine; 2020. Ukrainian.

8. Freshney RY. [Animal cell culture: a practical guide]. BINOM: Knowledge Lab. 2010. Russian.

9. Arslan A, Zima J. Karyotypes of the mammals of Turkey and neighbouring regions: a review. *Folia Zoologica*. 2014;63(1): 1-62.

10. Yiğit N, Çolak E, Sözen M. The Taxonomy and Karyology of *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) and *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia: Muridae) in Turkey. *Tr. J. of Zoology*. 1998;22: 203-12.

11. Kovaleva OA. [Cytogenetic abnormalities in somatic cells of mammals]. *Tsitol Genet*. 2008;(1):58-72. Russian.

12. Hladik D, Höfig I, Oestreicher U, Beckers J, Matjanovski M, Bao X, et al. Long-term culture of mesenchymal stem cells impairs ATM-dependent

recognition of DNA breaks and increases genetic instability. Stem Cell Research & Therapy. 2019;218(10): 1-12.

13. Alvites RD, Branquinho MV, Caseiro AR, Amorim I, Pedrosa SS, Rêma A. et al. Rat olfactory mucosa mesenchymal stem/stromal cells (OM-MSCs): a characterization study. International Journal of Cell

Biology. 2020 Jan 29;2020: 2938258. PMID:32411249. PMCID:PMC7212324.

14. Tkachuk TV, Prodanchuk MG. [Use of micronucleus test for screening and monitoring of mutagens. Historical controls]. Such probl toksykol, kharch i khim bez. 2008;(1): 58-72. Ukrainian.