

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**КОВПАК ВІТАЛІЙ ВАСИЛЬОВИЧ**

УДК 602.9:611.018:606:619

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТОВБУРОВИХ КЛІТИН  
ТА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ  
ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ  
У ТВАРИН**

16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора ветеринарних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

**Науковий керівник** доктор ветеринарних наук, професор,  
член-кореспондент НААН  
**Мазуркевич Анатолій Йосипович**,  
Національний університет біоресурсів  
і природокористування України,  
професор кафедри хірургії і патофізіології  
імені академіка І. О. Поваженка

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, професор  
**Коцюмбас Галина Іванівна**,  
Львівський національний університет  
ветеринарної медицини та біотехнологій  
імені С. З. Гжицького,  
завідувач кафедри нормальної та патологічної  
морфології і судової ветеринарії

доктор ветеринарних наук, доцент  
**Жила Микола Іванович**,  
Державний науково-дослідний  
контрольний інститут ветеринарних  
препаратів та кормових добавок,  
завідувач лабораторії клініко-біологічних  
досліджень

доктор ветеринарних наук, професор  
**Клестова Зінаїда Сергіївна**,  
Державний науково-контрольний інститут  
біотехнології і штамів мікроорганізмів,  
заступник директора з наукової роботи

Захист відбудеться «05» липня 2019 року о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «04» червня 2019 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Грушанська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** У світі спостерігається тенденція до збільшення частоти захворювання тварин, зокрема котів, на цукровий діабет (Feldman E. S., 1997; Gupta L., 1999; Prahl A., 2007; Ohlund M., 2015). Однак, питання етіології та патогенезу цукрового діабету I типу у тварин все ще залишаються недостатньо вивченими, а методи ефективного лікування взагалі відсутні.

Зважаючи на недоліки сучасних методів лікування тварин із цукровим діабетом I типу із застосуванням інсулінотерапії, а також на те, що однією із важливих ланок патогенезу цукрового діабету є загибель  $\beta$ -клітин підшлункової залози (Graham P. A., 1994; Buschard K., 2011), розробляються нові підходи до лікування хворих на цукровий діабет з використанням клітинних технологій (Балаболкин М. И., 2000; Hussain M. A., 2004; Atkinson M. A., 2014; Katsarou A., 2017). Розроблення методів, здатних активувати регенерацію  $\beta$ -клітин, є актуальним напрямом досліджень науковців (Rooman I., 2002; Pospisilik J. A., 2003; Juhl K., 2010; Benthuisen J., 2016).

Останні дослідження показали, що  $\beta$ -клітини *in vitro* мають досить високу регенераційну здатність (Dog Y., 2004; Chengcheng Liu, 2014), проте *in vivo*, за умови діабету у тварин, ці клітини практично не відновлюються (Jonas J., 1999).

Перспективи успішного використання у ветеринарній медицині клітинно-регенераційної терапії значною мірою залежать від результатів ґрунтовного вивчення властивостей стовбурових клітин тварин, способів їх отримання, культивування, зберігання та застосування з лікувальною метою.

Сьогодні для проведення досліджень як джерело стовбурових клітин переважно використовують червоний кістковий мозок (Guan X. M., 2013; Liu J. F., 2014; Peister A., 2003; Huang S., 2015) та жирову тканину (Кирик В. М., 2010; Carswell K. A., 2012; Siennicka K., 2016). Зважаючи на те, що механізм регенерації підшлункової залози до кінця нез'ясований, у лікуванні хворих на цукровий діабет особливо актуальним є напрям з використанням клітин, отриманих із підшлункової залози (Bonner-Weir S., 2000; Chen B., 2008; Gorurappilly R., 2013).

На відміну від чисельних зарубіжних публікацій щодо властивостей стовбурових клітин тваринного походження та застосування їх у ветеринарній медицині, в Україні дане питання висвітлено недостатньо (Мазуркевич А. Й., 2013; Журба В. І., 2013; Бобось О. Л., 2013; Малюк М. О., 2015), а публікації щодо застосування стовбурових клітин за цукрового діабету в котів у вітчизняній клінічній ветеринарній практиці взагалі відсутні. Водночас, вирішення цього питання спонукає до розробок у сфері клітинних технологій та їх впровадження у клінічну ветеринарну практику.

Важливими напрямками дослідження стовбурових клітин є вивчення їх біологічної активності, цитогенетичної стабільності у процесі культивування *in vitro* з метою попередження їх неопластичної трансформації *in vivo*, а також реакції організму тварини-реципієнта на введений клітинний матеріал за клінічного застосування (Бочков Н. П., 2007; Bernardo M. E., 2007; Омельченко Е. А., 2011).

Отже, дослідження властивостей стовбурових клітин тварин та їх подальше використання за експериментального інсулінозалежного цукрового діабету є досить актуальними та сприятимуть розробленню науково обґрунтованих і ефективних методів клітинної терапії у вітчизняній ветеринарній медицині.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація є частиною наукових тем Національного університету біоресурсів і природокористування України «Вивчення морфофункціональних характеристик патологічно змінених тканин у тварин-реципієнтів при застосуванні стовбурових клітин» (номер державної реєстрації 0111U003428, 2011–2015 рр.) та «Дослідити особливості коригуючої дії введених стовбурових клітин на патологічно змінені структури і функції тканин в організмі тварин-реципієнтів» (номер державної реєстрації 0115U003476, 2015–2017 рр.).

**Мета та завдання дослідження.** Мета дисертації – дослідити біологічні властивості стовбурових клітин різного походження та ефективність їх застосування за експериментального інсулінозалежного цукрового діабету у тварин.

Для досягнення мети поставлено такі завдання:

- визначити оптимальний склад середовищ для культивування та кріоконсервування стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура і kota, дати їх фенотипову характеристику в системі *in vitro*;
- встановити оптимальний склад середовищ для дезагрегації та культивування стовбурових клітин жирової тканини щура і kota, дати їх фенотипову характеристику в системі *in vitro*;
- визначити оптимальний склад середовищ для дезагрегації та культивування стовбурових клітин підшлункової залози щура і kota, дати їх фенотипову характеристику в системі *in vitro*;
- провести цитогенетичний аналіз клітин щура і kota в культурі, отриманих із червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози в процесі субкультивування *in vitro*;
- дослідити морфологічні (щурі) та функціональні зміни (щурі, коти) в організмі за експериментального інсулінозалежного цукрового діабету;
- вивчити характер відповіді організму тварин-реципієнтів (щурі) на внутрішньовенне введення стовбурових клітин червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози за змінами імунологічних показників крові;
- провести мікроскопічний аналіз острівкового апарату підшлункової залози щура та визначити рівень глюкози у крові щура і kota на фоні експериментального інсулінозалежного цукрового діабету за трансплантації стовбурових клітин різного походження.

*Об'єкт дослідження* – біологічні властивості стовбурових клітин, отриманих із різних джерел, та їх вплив на перебіг експериментального інсулінозалежного цукрового діабету у тварин-реципієнтів.

*Предмет дослідження* – показники біологічної активності стовбурових клітин щура і kota залежно від джерел їх отримання, методів виділення і

культивування; показники функціональних змін в організмі тварин-реципієнтів з експериментальним інсулінозалежним цукровим діабетом після трансплантації стовбурових клітин.

**Методи дослідження:** біотехнологічні (культивування клітин); імуноцитохімічні (дослідження імунофенотипової характеристики клітин у культурі); цитогенетичні (аналіз каріотипу клітин); імунологічні (визначення кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій, дослідження цитотоксичної активності сироватки та лімфоцитів крові); гістологічні (мікроскопічні дослідження); хірургічні (аспірація червоного кісткового мозку, отримання жирової тканини та підшлункової залози, трансплантація клітин під капсулу підшлункової залози); статистичні (опрацювання цифрових показників результатів досліджень).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше проведено порівняльний аналіз біологічної активності стовбурових клітин, отриманих із червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози kota. Розроблено технології виділення та умови культивування *in vitro* стовбурових клітин щура та kota, отриманих з червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози.

На основі імуноцитохімічних досліджень встановлено відмінності в експресії маркерів між культурами клітин червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози, а також зміни ступеня їх прояву у процесі культивування.

Вперше проведено порівняльний аналіз генетичної стабільності стовбурових клітин, отриманих із різних джерел (червоний кістковий мозок, жирова тканина, підшлункова залоза) від kota та щура у процесі культивування *in vitro*.

Доведено позитивний вплив трансплантованих стовбурових клітин на відновлення фізіологічних показників за експериментального інсулінозалежного цукрового діабету у тварин.

Наукову новизну отриманих результатів підтверджено патентами на корисні моделі: «Спосіб отримання епітеліальних клітин підшлункової залози»; «Спосіб отримання культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини котів».

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати експериментальних досліджень можуть бути використані у клінічній ветеринарній практиці для лікування котів з інсулінозалежним цукровим діабетом.

Проведено дослідження з трансплантації стовбурових клітин та виявлено нові ланки патогенезу цукрового діабету, які визначили нові можливості корекції інсулінової недостатності завдяки стимулюванню проліферації клітин, що синтезують інсулін, а також прогеніторних клітин підшлункової залози з їх трансформацією у  $\beta$ -клітини. Різна активність відновлювальних процесів за трансплантації культур стовбурових клітин підшлункової залози, червоного кісткового мозку та жирової тканини дає змогу вибору найбільш раціонального напрямку терапії тварин, хворих на цукровий діабет.

Результати оцінки каріотипової та цитогенетичної стабільності стовбурових клітин у культурі залежно від тривалості культивування *in vitro* мають важливе значення в оцінці їх безпечності. Отримані результати можуть бути використані у наукових дослідженнях властивостей стовбурових клітин тваринного організму та для надання методичних рекомендацій практикуючим ветеринарним лікарям.

Результати досліджень увійшли до науково-методичних рекомендацій. Матеріали дисертації використано під час написання монографії: «Стовбурові клітини у ветеринарній медицині» і навчального посібника «Клітинні технології у ветеринарній медицині».

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем обґрунтовано тему дисертації, виконано пошук та аналіз літературних джерел, самостійно проведено експериментальні дослідження, статистичну обробку даних, проаналізовано, теоретично обґрунтовано та узагальнено одержані результати. Гістологічні дослідження проведено на кафедрі анатомії, гістології і патоморфології тварин імені академіка В. Г. Касьяненка Національного університету біоресурсів і природокористування України за консультативної допомоги доктора ветеринарних наук, професора Б. В. Борисевича.

Із результатів проведених досліджень і публікацій зі співавторами, за їх згодою, використано лише ті результати, які було одержано особисто здобувачем.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертації було апробовано в доповідях та обговорено на: Міжнародній науковій конференції «Роль фізіології тварин у вирішенні сучасних проблем аграрної освіти, науки і виробництва» (м. Львів, 2014 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 100-річному ювілею від дня народження академіка І. М. Гладенка «Актуальні проблеми продовольчої безпеки (екологічна та біологічна безпека, якість та безпечність продукції АПК)» (м. Одеса, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 95-річчю заснування факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України «Інновації у ветеринарну освіту і науку XXI століття» (м. Київ, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 150-річному ювілею від дня народження видатного вченого О. В. Дедюліна «Проблеми емерджентних хвороб тварин: молекулярна епізоотологія, експрес-діагностика та біобезпека» (м. Одеса, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Інновації у ветеринарну освіту, науку, виробництво» (м. Київ, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу, аспірантів та студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (м. Київ, 2017 р.); XIII Міжнародній науково-практичній конференції морфологів України «Актуальні проблеми сучасної морфології» (м. Житомир, 2017 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Транскордонні емерджентні хвороби тварин (африканська чума свиней, нодулярний дерматит великої рогатої худоби, грип птиці, блутанг, бруцельоз та ін.): актуальні аспекти біологічної безпеки та контролю» (м. Одеса, 2017 р.).

**Публікації.** За результатами досліджень опубліковано 30 наукових праць, з яких монографія, 10 статей у наукових фахових виданнях України, 12 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті у наукових виданнях інших держав, 2 статті у наукових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 патенти на корисну модель, методичні рекомендації.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається з анотації, переліку умовних позначень, вступу, 4 розділів, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Дисертацію викладено на 360 сторінках. Матеріали дисертації проілюстровано 94 рисунками і 31 таблицею. Список використаних джерел налічує 669 найменувань, з яких 510 латиницею.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження за темою дисертації виконано на базі проблемної науково-дослідної лабораторії фізіології та експериментальної патології тварин кафедри фізіології, патофізіології та імунології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Імунофенотипові та цитогенетичні дослідження проведено у лабораторії біотехнології медичного центру ТОВ «Biotexcom».

У дослідах використовували клінічно здорових тварин: 80 самців білих нелінійних щурів масою тіла 200–250 г, віком 4–5 місяців; білих нелінійних щуренят 12-добового віку; 4 самці та 4 самки безпородних котів віком 15–17 місяців; завмерлих плодів кошенят, що залишилися після надання рододопомоги. Годівля дослідних тварин відповідала їх потребі в поживних і біологічно активних речовинах. Експерименти на тваринах було проведено з дотриманням вимог «Загальних етичних принципів проведення 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) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Відомості ВР, 2010, № 9). Дослідження було розділено на декілька етапів, які виконували протягом 2014–2017 рр.

**Перший етап** дослідження включав роботу з культурами клітин. Проведено дослідження проліферативної активності стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура та kota за культивування у різних за складом культуральних середовищах.

Досліджено ефективність різних методів кріоконсервування та вплив складу кріосередовища на заморожування стовбурових клітин червоного кісткового мозку kota та щура шляхом визначення життєздатності клітин та збереження їх адгезивних властивостей після розморожування. Зокрема порівнювали чотири комбінації середовищ для кріоконсервування методом повільного заморожування: перше середовище – 18 % фетальної сироватки телят + 72 % середовища Ігла, модифікованого Дюльбеко + 10 % диметил-

сульфоксиду; друге середовище – 90 % фетальної сироватки теляти + 10 % диметилсульфоксиду; третє середовище – 45 % фетальної сироватки телят + 45 % середовища Ігла, модифікованого Дюльбеко + 10 % диметилсульфоксиду; четверте середовище – 95 % фетальної сироватки телят + 5 % диметилсульфоксиду. При дослідженні впливу кріоконсервування методом вітрифікації на життєздатність та адгезивні властивості стовбурових клітин червоного кісткового мозку kota та щура порівнювали два вітрифікаційні середовища: середовище ДЕС-1 – 10 % диметилсульфоксиду, 20 % етиленгліколю, 0,5 ммоль сахарози; середовище ДЕС-2 – 10 % диметилсульфоксиду, 15 % етиленгліколю, 1 ммоль сахарози.

Порівнювали різні методи обробки тканини для визначення оптимального методу отримання проліферуючих клітин з жирової тканини щура та kota. Для отримання культури клітин щура було порівняно чотири методи: перший метод – 2 мг/см<sup>3</sup> колагенази (тип II) + 4 % бичачого сироваткового альбуміну; другий метод – 2 мг/см<sup>3</sup> колагенази (тип II); третій метод – 2,5 мг/см<sup>3</sup> трипсину; четвертий метод – метод експланту. Для отримання культури стовбурових клітин kota порівнювали 10 методів обробки жирової тканини: перший метод – 1 мг/см<sup>3</sup> колагенази + 4 % бичачого сироваткового альбуміну; другий метод – 2 мг/см<sup>3</sup> колагенази + 4 % бичачого сироваткового альбуміну; третій метод – 5 мг/см<sup>3</sup> гіалуронідази; четвертий метод – 10 мг/см<sup>3</sup> гіалуронідази; п'ятий метод – 20 мг/см<sup>3</sup> гіалуронідази; шостий метод – 1 мг/см<sup>3</sup> колагенази + 4 % бичачого сироваткового альбуміну + 5 мг/см<sup>3</sup> гіалуронідази; сьомий метод – 1 мг/см<sup>3</sup> колагенази + 5 мг/см<sup>3</sup> гіалуронідази; восьмий метод – 1 мг/см<sup>3</sup> колагенази + 4 % бичачого сироваткового альбуміну + 10 мг/см<sup>3</sup> гіалуронідази; дев'ятий метод – 1 мг/см<sup>3</sup> колагенази + 10 мг/см<sup>3</sup> гіалуронідази; десятий метод – метод експланту. Ефективність визначали за швидкістю формування моношару клітин.

Оптимальний метод отримання проліферуючих клітин із підшлункової залози щура встановлювали, порівнюючи чотири методи обробки тканини: перший метод – 2 мг/см<sup>3</sup> колагенази; другий метод – холодна трипсинізація (0,25 % трипсин); третій метод – тепла трипсинізація (0,25 % трипсин); четвертий метод – метод експланту. Ефективність методу визначали за швидкістю формування моношару клітин.

Подано морфологічну характеристику клітин, отриманих із червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози, у культурі, а також досліджено експресію ними мембранних CD-маркерів у процесі культивування. Використовували панель CD-маркерів, характерних для слабо диференційованих (прогеніторних, стовбурових) клітин.

Провели дослідження генетичної стабільності стовбурових клітин, отриманих з червоного кісткового мозку, жирової тканини, підшлункової залози щура та kota, у процесі їх культивування. Цитогенетичний скринінг включав аналіз метафазних пластинок на I–VI (щур) та I–V пасажах (кіт). У кожній метафазній пластинці визначали кількість хромосом (у щурів підраховували 30 метафазних пластинок у кожному зразку, у kota – 50), встановлювали

відсотковий вміст двоядерних клітин, клітин із мікроядром, визначали мітотичний індекс та клітини у стані апоптозу (з розрахунку на 500 клітин).

**Другий етап** досліджень полягав у вивченні впливу організму тварин-реципієнтів на трансплантовані культури стовбурових клітин і здатності клітин мігрувати у підшлункову залозу за різних шляхів їх введення.

Морфологічні зміни в різних органах щурів за алоксанового цукрового діабету досліджували шляхом оцінки гістологічних препаратів, отриманих від тварин на 20 добу після формування патології з підшлункові залози, серця, нирок, печінки.

При вивченні здатності стовбурових клітин червоного кісткового мозку до міграції у зону пошкодження, трансплантацію здійснювали двома способами: внутрішньовенно та під капсулу підшлункової залози. Результати дослідження оцінювали шляхом виявлення клітин, мічених вітальним ядерним барвником Hoechst 33258, у кріозрізах підшлункової залози.

Досліджували імунну відповідь організму щурів-реципієнтів на введення алогенних культур стовбурових клітин кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози. Вивчено цитотоксичну активність лімфоцитів і сироватки крові сенсibiliзованих тварин до введених клітин в умовах *in vitro*, а також зміни імунного статусу тварин.

Проведено моніторинг рівня глюкози за алоксанового цукрового діабету у щурів за трансплантації алогенних культур стовбурових клітин, отриманих із червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози, протягом 30 діб після введення (клітини у кількості 2 млн вводили під капсулу підшлункової залози).

Здійснено макро- та мікроскопічну оцінку морфометричних даних підшлункової залози щурів за алоксанового цукрового діабету без лікування (контрольна група) та за трансплантації стовбурових клітин, отриманих із різних джерел. У процесі гістологічного дослідження підшлункової залози звертали увагу на кількість острівців на 10 мм<sup>2</sup> зрізу товщиною 5 мкм, а також кількість клітин в острівці Лангерганса.

**Третій етап** досліджень проводили на котах, орієнтуючись на результати, отримані під час виконання другого етапу досліджень на щурах. Він полягав у вивченні впливу трансплантованих стовбурових клітин на перебіг алоксанового цукрового діабету у котів шляхом моніторингу рівня глюкози. Трансплантацію здійснювали на 20 добу, 30, 40 та 50 добу від початку моделювання цукрового діабету.

## **РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ**

**Проліферативна активність стовбурових клітин червоного кісткового мозку щурів та котів у культурі залежно від складу культурального середовища.** Порівняння різних культуральних середовищ на проліферативну активність стовбурових клітин у культурі червоного кісткового мозку щурів та котів показало відмінності у впливі середовища залежно від виду.

Результати дослідження впливу культурального середовища на проліферативну активність стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура у культурі наведено у табл. 1.

Таблиця 1

**Проліферативна активність стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура у культурі за впливу різних культуральних середовищ (M±m, n=3)**

Показник	DMEM (D5648)	DMEM (D5796)	DMEM F12 (D8437)
Кількість клітин (3 доба), тис.	568±8***	695±17***	908±18***
Індекс проліферації	1,42	1,74	2,27

Примітка. Тут і у табл. 2–4 DMEM – середовище Ігла, модифіковане Дюльбеко; \*\*\* $p < 0,001$ , контроль – посадкова кількість клітин

Культуральне середовище суттєво впливає на проліферативну активність стовбурових клітин червоного кісткового мозку. Так, за культивування стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура у культуральному середовищі Ігла, модифікованого Дюльбеко F12 (D8437) на третю добу індекс проліферації становив 2,27. Кількість клітин за таких умов зросла до 908±18 тис., що, у свою чергу, на 23 % перевищує цей показник за використання середовища Ігла, модифікованого Дюльбеко (D5796) та на 37 % – за використання середовища Ігла, модифікованого Дюльбеко (D5648). Отриманий результат можна пояснити різноманітнішим складом середовища, порівнюючи з іншими.

Проте, за дослідження впливу аналогічних середовищ на проліферативну активність стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку котів відмічали інше. Найвищий індекс проліферації реєстрували за використання середовища Ігла, модифікованого Дюльбеко (D5648).

Наведені у табл. 2 та на рис. 1 дані свідчать що склад культурального середовища впливає на проліферативну активність стовбурових клітин червоного кісткового мозку kota. Так, у першому культуральному середовищі, яке містило середовище Ігла, модифіковане Дюльбеко (D5648), на третю добу культивування відмічали формування щільного моношару з конфлюентністю 95–98 %. При цьому клітини були невеликих розмірів (рис. 1а).

Таблиця 2

**Проліферативна активність стовбурових клітин червоного кісткового мозку kota в культурі за культивування в різних культуральних середовищах (M±m, n=3)**

Показник	DMEM (D5648)	DMEM (D5796)	DMEM/ F12 (D8437)
Кількість клітин (3 доба), тис.	840±23***	570±19***	269±19**
Індекс проліферації	2,10	1,43	0,74

Примітка. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , контроль – посадкова кількість клітин

У середовищі Ігла, модифікованого Дюльбеко (D5796) конфлюентність моношару становила 40–45 %, індекс проліферації – 1,43 (рис. 1б). За

використання середовища Ігла, модифікованого Дюльбеко F12 (D8437) відмічали значну кількість відкріплених клітин, індекс проліферації у даній групі 0,74.

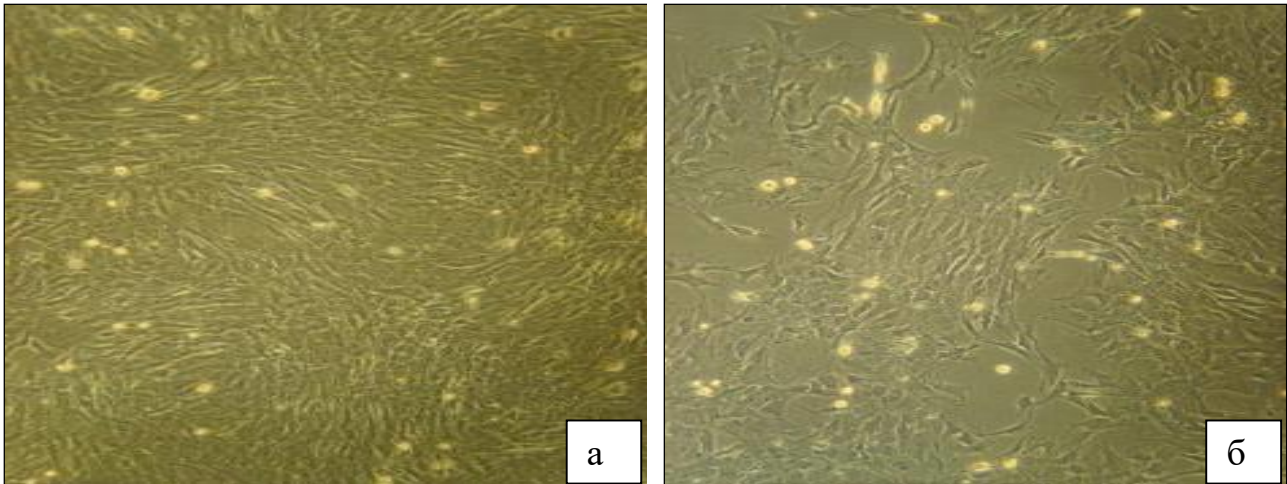


Рис. 1. Мікрофотографії культур клітин червоного кісткового мозку котів, 3 доба культивування (I пасаж): а) середовище Ігла, модифіковане Дюльбеко (D5648); б) середовища Ігла, модифіковане Дюльбеко (D5796). Нативний препарат;  $\times 100$

Варто зазначити, що у групі чашок із середовищем Ігла, модифікованого Дюльбеко F12 (D8437) спостерігали швидку зміну рН середовища у кислий бік та відкріплення клітин від культурального пластику, що свідчить про неспроможність такого культурального середовища підтримувати оптимальне для культури стовбурових клітин kota рН.

Отримані дані вказують на негативний вплив зміщення рН в кислий бік для цієї культури, що стало причиною низької проліферативної активності клітин за використання середовища Ігла, модифікованого Дюльбеко F12 (D8437).

**Ефективність заморожування культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку залежно від методу та складу кріосередовища.** Проведено оцінку ефективності різних методів кріоконсервування та впливу складу кріосередовища на заморожування стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку kota та щура шляхом визначення життєздатності клітин та збереження їх адгезивних властивостей після розморожування.

У дослідах використовували клітини II–III пасажів. Кріоконсервування клітин здійснювали у концентрації  $1 \times 10^6$  клітин на  $1 \text{ cm}^3$  кріосередовища. Результати дослідження наведено в табл. 3.

Результати досліджень впливу кріосередовищ різного складу на ефективність заморожування культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура показали, що кріосередовище з вмістом 90 % фетальної сироватки телят та 10 % диметилсульфоксиду, є оптимальним для кріоконсервування клітин, оскільки їх життєздатність після розморожування становила  $86,3 \pm 1,3$  %, а після 24-годинного культивування (після розморожування) –  $85,0 \pm 1,1$  % клітин зберігали адгезивні властивості.

Таблиця 3

**Ефективність кріоконсервування культури стовбурових клітин  
червоного кісткового мозку щура шляхом повільного заморожування  
залежно від складу середовища (M±m, n=3)**

№ з/п	Склад середовища для заморожування	Життєздатність, %	Адгезивні клітини, %
1	72 % DMEM + 18 % FBS + 10 % ДМСО	24,6±1,5***	23,0±1,1***
2	90 % FBS + 10 % ДМСО	86,3±1,3	85,0±1,1
3	45 % FBS + 45 % DMEM + 10 % ДМСО	15,6±2,7***	16,6±0***
4	95 % FBS + 5 % ДМСО	86±2,7	82,3±2,1

Примітка. Тут і у табл. 4 FBS – фетальна сироватка телят; ДМСО – диметилсульфоксид; \*\*\*p<0,001, контроль – життєздатність клітин до заморожування

У дослідах із використанням інших трьох середовищ для кріоконсервування спостерігали достовірно нижчу життєздатність клітин. Відсоток адгезивних клітин становив: у досліді з середовищем 1 – 23,0±1,1 %; із середовищем 3 – 16,6±0 %; із середовищем 4 – 82,3±2,1 %.

Результати досліджень впливу кріосередовища різного складу на ефективність заморожування культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку kota наведено у табл. 4 та на рис. 2.

Таблиця 4

**Ефективність кріоконсервування культури стовбурових клітин  
червоного кісткового мозку kota шляхом повільного заморожування  
залежно від складу середовища (M±m, n=3)**

№ з/п	Склад середовища для заморожування	Життєздатність, %	Адгезивні клітини, %
1	72 % DMEM + 18 % FBS + 10 % ДМСО	47,0±1,1***	47,0±0,5***
2	90 % FBS + 10 % ДМСО	56,3±0,9**	60,6±1,3
3	45 % FBS + 45 % DMEM + 10 % ДМСО	58,0±1,1**	58,0±1,1
4	95 % FBS + 5 % ДМСО	65,7±0,9	67,0±2,3

Примітка. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01, контроль – життєздатність клітин до заморожування

Із даних, наведених у табл. 4, видно, що середовище зі складом 95 % фетальної сироватки телят та 5 % диметилсульфоксиду є найбільш оптимальним для кріоконсервування культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку kota, оскільки після розморожування клітин їх життєздатність становила 65,7±0,9 %, а після 24 год культивування (після розморожування) – 67,0±2,3 % клітин зберігали адгезивні властивості (рис. 2б).

У серії дослідів із заморожування також досліджено вплив кріоконсервування методом вітрифікації на життєздатність та адгезивні властивості стовбурових клітин червоного кісткового мозку kota та щура. При цьому, було порівняно два вітрифікаційні середовища: ДЕС-1 (10 % диметилсульфоксиду, 20 % етиленгліколю, 0,5 ммоль сахарози) та ДЕС-2 (10 %

диметилсульфоксиду, 15 % етиленгліколю, 1 ммоль сахарози). Результати дослідження представлено у табл. 5.

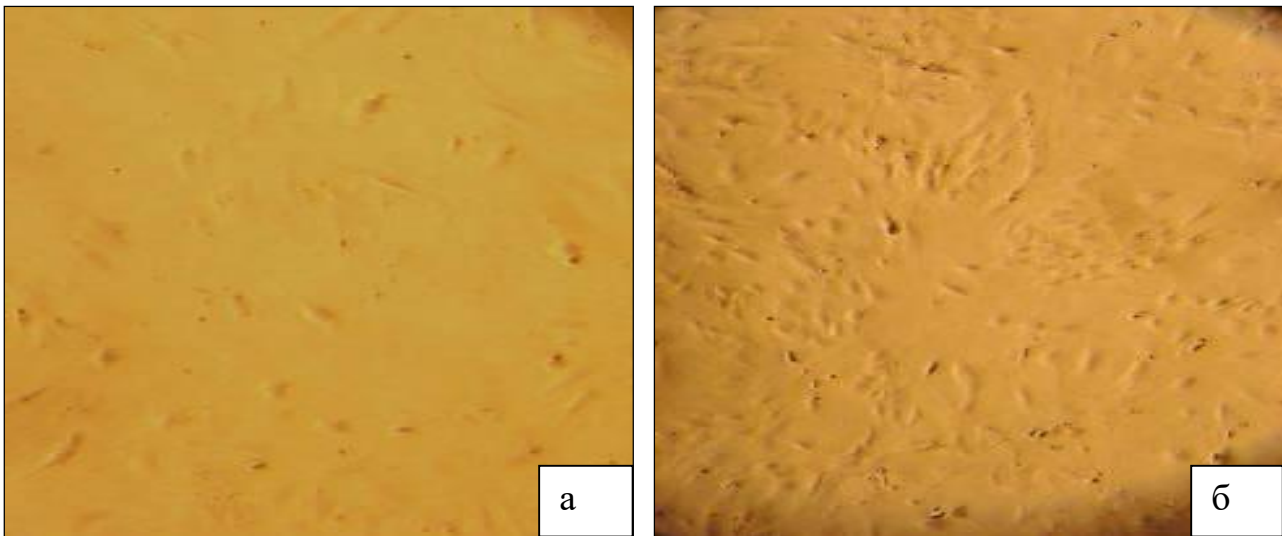


Рис. 2. Мікрофотографії адгезивних клітин червоного кісткового мозку kota, 24 год після розморожування: а) середовище 1; б) середовище 2. Нативний препарат;  $\times 320$

Таблиця 5

**Ефективність кріоконсервування культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку тварин методом вітрифікації залежно від складу середовища ( $M \pm m, n=3$ )**

Вид тварин	Початкова життєздатність клітин, %	ДЕС-1		ДЕС-2	
		Життєздатність клітин після розморожування, %	Адгезивні клітини, %	Життєздатність клітин після розморожування, %	Адгезивні клітини, %
Щур	89,0	78,0 $\pm$ 2,3	14	81,6 $\pm$ 1,0	9
Кіт	87,0	73,0 $\pm$ 1,16	7	77,0 $\pm$ 1,2	5

Під час досліджень відмічалось незначне зниження життєздатності клітин за використання обох середовищ, порівнюючи з вихідним станом. Так, у щура вона знизилася на 11 % за використання ДЕС-1 та на 7,4 % – за використання ДЕС-2. За дослідження життєздатності клітин червоного кісткового мозку kota відмічали її зниження на 14 % за використання ДЕС-1, а у присутності ДЕС-2 – на 10 %. Проте, варто зазначити, що, незважаючи на збереження високої життєздатності клітин, вони втрачали адгезивні властивості. Так, через 24 год після початку культивування лише 14 % стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура прикріпилися до культурального посуду за використання ДЕС-1, а у присутності ДЕС-2 даний показник становив 9 %, для котів – відповідно 7 та 5 %.

**Виділення стовбурових клітин з жирової тканини щура та kota для отримання культури.** Ефективність виділення стовбурових клітин та отримання культури клітин залежить від вибору методу дезагрегації тканини.

Існує декілька підходів для дезагрегації тканин з метою отримання первинної культури: механічна дезагрегація, ферментативна дезагрегація та отримання культури за допомогою первинних експлантів.

Для визначення оптимального методу отримання культури стовбурових клітин жирової тканини щура та kota було порівняно різні методи обробки тканини. Результати дослідження представлено у табл. 6. Так, обробка жирової тканини щурів сумішшю 2 мг/см<sup>3</sup> колагенази типу II з додаванням 4 % бичачого сироваткового альбуміну (метод 1) дозволила отримати 649±14 тис. клітин, здатних до проліферації, що, у свою чергою, перевищує цей показник у 5,8 раза у контрольній групі чашок (без додавання ферменту). Варто зазначити, що метод 1 був найбільш ефективним за виділення стовбурових клітин з жирової тканини щурів. Метод отримання культури стовбурових клітин культури жирової тканини за обробки колагеназою без додавання бичачого сироваткового альбуміну був менш ефективним, порівнюючи з методом 1, проте у 4 рази більш ефективним, порівнюючи з контролем (метод 4).

Таблиця 6

**Порівняння методів виділення стовбурових клітин з жирової тканини щура для отримання культури (M±m, n=3)**

Показник	Метод обробки			
	2 мг/см <sup>3</sup> колагенази (тип II) + 4 % BSA	2 мг/см <sup>3</sup> колагенази (тип II)	2,5 мг/см <sup>3</sup> трипсин	Метод експланту (контроль)
№ методу	1	2	3	4
Кількість клітин, тис. (13 доба культивування)	649±14***	443±18***	351±23**	112±13

Примітка. Тут і табл. 7 BSA – бичачий сироватковий альбумін; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01, контролем слугував метод експланту

Трипсин виявився менш ефективним ферментом, порівнюючи з колагеназою, оскільки кількість клітин за цього методу дезагрегації становила 351±23 тис., що у 3,1 раза більше контролю.

Дослідження показали, що найбільш ефективним методом дезагрегації жирової тканини щура з метою отримання культури стовбурових клітин є використання 2 мг/см<sup>3</sup> колагенази типу II з додаванням 4 % бичачого сироваткового альбуміну.

Для визначення оптимального методу отримання культури стовбурових клітин жирової тканини kota порівнювали 10 комбінацій середовищ (табл. 7).

Результати досліджень свідчать, що комбінація колагенази 1 мг/см<sup>3</sup> з додаванням гіалуронідази 10 мг/см<sup>3</sup> та 4 % бичачого сироваткового альбуміну (рис. 3б) є найбільш ефективним методом отримання культури стовбурових клітин жирової тканини kota. Кількість клітин за використання вказаного методу на 9 добу культивування становила 560,0±52,3 тис., що у 4,4 раза вище показника контролю (рис. 4б).

**Порівняння методів виділення стовбурових клітин  
з жирової тканини kota для отримання культури ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

№ з/п	Тип обробки	Кількість колоній, 5 доба культивування, шт.	Конфлюентність 9 доба культивування, %	Кількість клітин 9 доба культивування, тис.
1	1 мг/см <sup>3</sup> колагенази + 4 % BSA	6,0±0,6**	44,3±3,7*	145,3±3,7*
2	2 мг/см <sup>3</sup> колагенази + 4 % BSA	1,3±0,4	68,3±4,8**	310,0±23,2**
3	5 мг/см <sup>3</sup> гіалуронідази	0±0**	4,0±1,2***	9,3±0,8***
4	10 мг/см <sup>3</sup> гіалуронідази	1,3±0,4	9,3±0,8***	20,7±2,5***
5	20 мг/см <sup>3</sup> гіалуронідази	3,3±0,4	23,3±1,9	118,3±10,6
6	1 мг/см <sup>3</sup> колагенази + 4 % BSA + 5 мг/см <sup>3</sup> гіалуронідази	9,0±0,5***	81,7±4,8***	466,7±21,3***
7	1 мг/см <sup>3</sup> колагенази + 5 мг/см <sup>3</sup> гіалуронідази	3,7±0,4	46,7±3,9**	149,7±4,5**
8	1 мг/см <sup>3</sup> колагенази + 4 % BSA + 10 мг/см <sup>3</sup> гіалуронідази	16,3±0,4***	90,1±2,5***	560,0±52,3**
9	1 мг/см <sup>3</sup> колагенази + 10 мг/см <sup>3</sup> гіалуронідази	7,3±0,4***	55,0±2,9**	175,0±14,5*
10	Метод експланту (контроль)	2,3±0,4	27,3±1,5	127,3±1,5

Примітка. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ , контролем слугував метод експланту

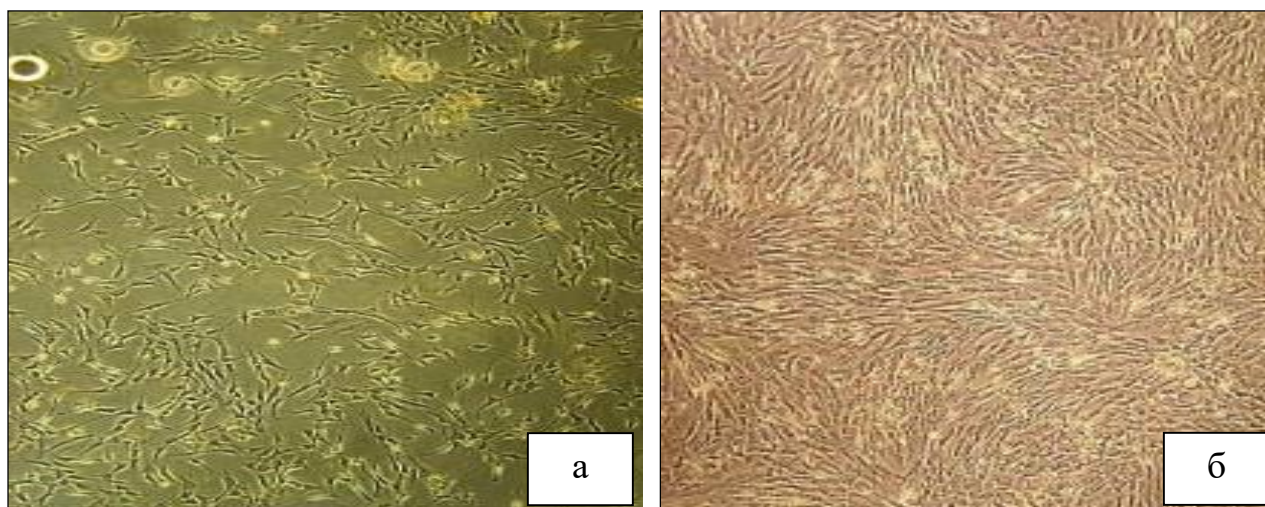


Рис. 3. Мікрофотографії культур стовбурових клітин жирової тканини kota, 9 доба культивування (0 пасаж): а) метод 2; б) метод 8. Нативні препарати;  $\times 50$

Дещо нижчий показник проліферації клітин спостерігали за використання 1 мг/см<sup>3</sup> колагенази з додаванням 5 мг/см<sup>3</sup> гіалуронідази та 4 % бичачого сироваткового альбуміну. Кількість клітин становила 466,7±21,3 тис. на 9 добу культивування, що у 3,7 раза вище, ніж у контрольній групі.

Третім за ефективністю отримання культури стовбурових клітин жирової тканини kota був метод з використанням 2 мг/см<sup>3</sup> колагенази з додаванням 4 % бичачого сироваткового альбуміну (рис. 3а). Кількість клітин за такого методу

обробки жирової тканини kota була у 2,4 раза більшою, ніж у групі чашок контролю без використання ферментів, і становила  $310,0 \pm 23,2$  тис. Інші досліджувані методи були менш ефективні для отримання культури стовбурових клітин жирової тканини kota.

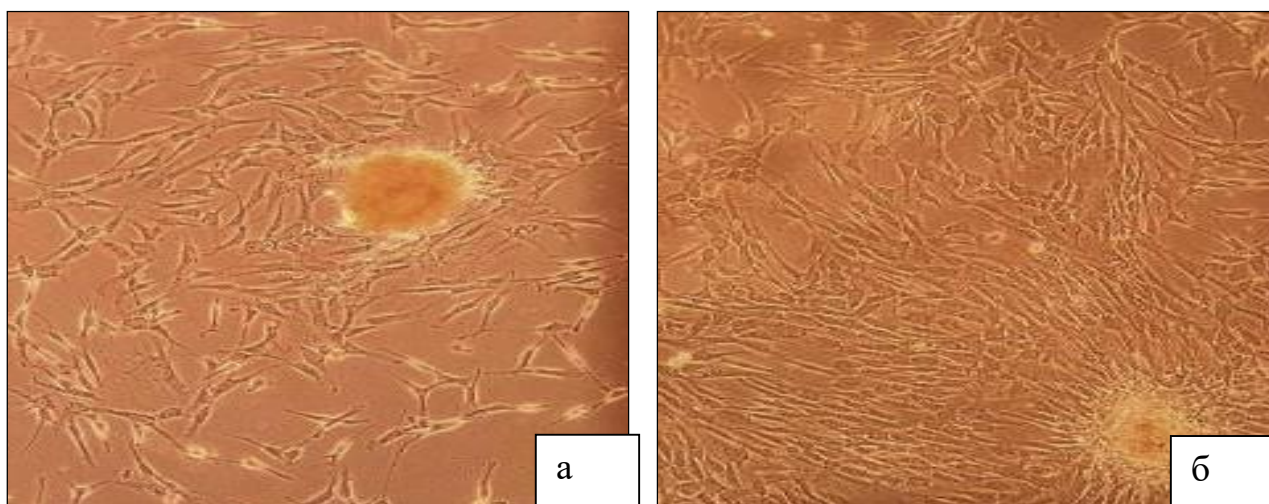


Рис. 4. Мікрофотографії культур стовбурових клітин жирової тканини kota, 9 доба культивування (0 пасаж): а) метод 5; б) метод 10. Нативні препарати;  $\times 100$

**Виділення стовбурових клітин з підшлункової залози щура для отримання культури.** Для визначення оптимального методу отримання культури стовбурових клітин підшлункової залози щура порівнювали 4 методи обробки тканини (табл. 8).

Таблиця 8

**Порівняння різних методів виділення стовбурових клітин з підшлункової залози щура для отримання культури ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

Показник	Метод обробки			
	2 мг/см <sup>3</sup> колагенази	Холодна трипсинізація (0,25 % розчин трипсину)	Тепла трипсинізація (0,25 % розчин трипсину)	Метод експланту (контроль)
№ методу	1	2	3	4
Кількість клітин, тис. (14 доба культивування)	$216,3 \pm 12,4^{***}$	$475,0 \pm 27,9^{**}$	$385,0 \pm 16,2^{***}$	$627,3 \pm 9,7$

Примітки.  $*** p < 0,001$ ;  $** p < 0,01$ , контролем слугував метод експланту

На третю добу культивування за використання перших трьох методів дезагрегації у чашках Петрі виявляли появу поодиноких адгезованих клітин. За використання 4 методу обробки тканини підшлункової залози появу адгезованих клітин відмічали на 4–5 добу після висівання.

Найменш ефективним із досліджуваних методів виявився метод 1. Кількість клітин на 14 добу культивування була у 2,9 раза меншою, порівнюючи з контролем (без використання ферментів) і становила  $216,3 \pm 12,4$  тис. За використання методу теплої трипсинізації кількість клітин на 14 добу

культивування була в 1,6 раза меншою, ніж у контролі, та становила  $385,0 \pm 16,2$  тис. Найбільший ефект за використання ферментної обробки підшлункової залози було отримано методом холодної трипсинізації. Водночас, кількість клітин на 14 добу культивування за використання цього методу становила  $475,0 \pm 27,9$  тис. та була у 1,3 раза нижчою, порівнюючи з контролем.

За результатами дослідження, представленими у табл. 8, оптимальним методом отримання культури стовбурових клітин підшлункової залози щура є метод експланту. Кількість клітин на 14 добу культивування становила  $627,3 \pm 9,7$  тис., що достовірно більше, порівнюючи з іншими досліджуваними методами. Можна припустити, що низька ефективність від використання ензимів для отримання культур стовбурових клітин підшлункової залози щура обумовлена руйнуванням ацинарних клітин та вивільненням їх ферментів, що призводить до загибелі значної кількості стовбурових клітин, які є основою культури клітин підшлункової залози.

Дослідження ефективності отримання культури стовбурових клітин підшлункової залози кота залежно від різних методів не проводили, оскільки результати пробного дослідження у цьому напрямі показали найвищий ефект від застосування методу експланту, як і для щура.

**Імунофенотипова характеристика культур клітин щура *in vitro*.**  
*Культура стовбурових клітин червоного кісткового мозку.* Імунофенотипування популяції клітин, отриманих із червоного кісткового мозку щура, дало змогу виявити зміни експресії досліджуваних CD-маркерів у процесі культивування.

Так, у культурі стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура упродовж усього часу дослідження експресії CD10 і CD54 не спостерігалось. Відмічалось зниження рівня прояву CD34 від помірного ( $108 \pm 8$  балів) до низького ( $97 \pm 4$  балів). Експресія CD38 знизилася різко з помірного рівня ( $116 \pm 9$  балів на I пасажі) до її відсутності ( $38 \pm 11$  балів – IV пасаж).

Ступінь експресії CD45 і CD326 поступово знижувався з пасажами від низького рівня ( $95 \pm 12$  і  $97 \pm 21$  балів відповідно) до «відсутності експресії» ( $45 \pm 7$  і  $37 \pm 6$  балів відповідно). Водночас, рівень CD48, CD66e і CD95 зростав від низького ( $68 \pm 11$  балів,  $57 \pm 12$  і  $66 \pm 13$  балів відповідно) до помірного ( $115 \pm 13$  балів,  $115 \pm 15$  і  $119 \pm 9$  балів відповідно). Експресія CD56 і CD227 коливалася у межах низького рівня протягом усього періоду дослідження (від  $73 \pm 12$  до  $96 \pm 7$  балів та від  $52 \pm 12$  до  $89 \pm 11$  балів відповідно). Під час дослідження відмічали достовірне зниження ступеня прояву панкератину від високого до помірного рівня.

*Культура стовбурових клітин жирової тканини.* Імунофенотипування клітин культур, отриманих із жирової тканини, дало змогу прослідкувати зміни, які відбуваються у ній під час культивування. Так, експресія CD34, CD38, CD45 і CD48 (рис. 5) знижувалася від низького ( $93 \pm 5$  балів,  $75 \pm 9$ ,  $74 \pm 6$  і  $98 \pm 14$  балів відповідно) до негативного рівня ( $8 \pm 5$  балів,  $14 \pm 5$ ,  $5 \pm 3$  і  $26 \pm 3$  балів відповідно).

Під час вивчення експресії CD227 і CD326 відмічали зворотну залежність, оскільки рівень експресії з кожним пасажем зростав (від  $28 \pm 7$  до  $50 \pm 9$  балів і від  $0 \pm 0$  до  $87 \pm 7$  балів відповідно). Експресія панкератину реєструвалася на низькому рівні впродовж всього часу дослідження (від  $71 \pm 4$  до  $85 \pm 5$  балів).

Прояв CD66e характеризувався високим рівнем ( $248 \pm 10$  балів) на початку культивування та низьким ( $66 \pm 7$  балів) – у кінці дослідження. CD10, CD54 і CD56 мали негативний ступінь експресії (від  $0 \pm 0$  до  $45 \pm 15$  балів,  $0 \pm 0$  та  $0 \pm 0$  балів відповідно) на всіх пасажах.

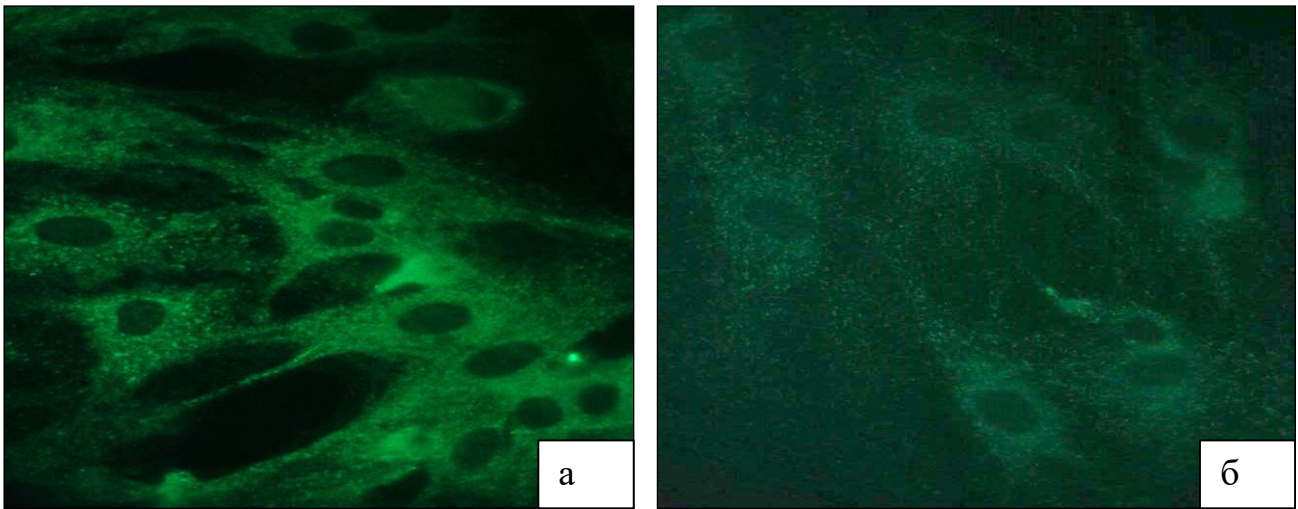


Рис. 5. Експресія CD48 у культурах стовбурових клітин щура, IV пасаж: а) червоний кістковий мозок; б) жирова тканина. Флуоресцентна мікроскопія;  $\times 1000$

Рівень експресії CD95 у культурі стовбурових клітин жирової тканини щура збільшувався від низького ( $62 \pm 7$  балів) до помірного рівня ( $126 \pm 13$  балів) з кожним пасажем.

*Культура стовбурових клітин підшлункової залози.* У результаті імунофенотипування клітин культур, отриманих із підшлункової залози щура, також виявлено зміни експресії досліджуваних CD-маркерів у процесі культивування.

Так, експресія CD38 змінювалася від низького рівня ( $96 \pm 14$  балів) на I пасажі до високого ( $261 \pm 13$  балів) – на IV. Низький рівень експресії CD227 спостерігали впродовж усього періоду культивування (від  $57 \pm 9$  до  $94 \pm 9$  балів). Зміни експресії від її відсутності до помірного ступеня прослідковували у CD66e та CD326 (від  $11 \pm 3$  до  $112 \pm 21$  балів та від  $34 \pm 9$  до  $101 \pm 13$  балів відповідно). Ступінь прояву CD95 був помірним упродовж всього часу дослідження (від  $102 \pm 21$  до  $174 \pm 15$  балів). Варто зазначити, що у популяції клітин підшлункової залози була відсутня експресія CD10, CD34; CD45, CD48, CD54, CD56 та панкератину.

**Імунофенотипова характеристика культур клітин kota *in vitro*.**  
*Культура стовбурових клітин червоного кісткового мозку.* За вивчення експресії CD-маркерів у популяції клітин, виділених із червоного кісткового мозку kota, було виявлено зміни в інтенсивності їх експресії у процесі культивування.

За дослідження популяцій клітин червоного кісткового мозку kota експресії CD10 і CD54 не реєструвалося впродовж усього часу культивування. Зростання рівня експресії від низького рівня ( $60,1 \pm 7,7$  балів;  $68,3 \pm 7,9$ ;  $58,0 \pm 10,5$  та  $52,7 \pm 4,5$  балів відповідно) на I пасажі до помірного ( $106,7 \pm 9,4$  балів;  $101,7 \pm 7,7$ ;

113,0±11,0 та 107,3±14,3 балів відповідно) на V пасажі відмічали у CD48, CD56, CD66e, CD95.

Експресія CD227 протягом усього періоду дослідження була у межах помірною рівня (від 55,0±4,6 до 92,7±4,5 балів).

Поступове зниження рівня експресії з пасажами відмічали у CD34 від помірною до низького (від 111,7±7,9 до 90,0±5,8 балів), у CD45 – у межах низького рівня (від 92,7±4,5 до 52,7±9,7 балів) та різке – у CD38 від помірною рівня до відсутності (від 110,7±6,2 до 23,3±6,1 балів), у CD326 – від низького рівня до відсутності (від 92,7±4,5 до 25,0±8,1 балів) та панккератину – від високого рівня до помірною (від 234,3±15,5 до 172,3±11,8 балів).

*Культура стовбурових клітин жирової тканини.* Імунофенотипування клітин культур, отриманих із жирової тканини kota, також дало змогу виявити зміни експресії досліджуваних CD-маркерів у процесі культивування.

Так, експресія CD10 не реєструвалася з I до III пасажу, після чого спостерігалось підвищення експресії даного маркера на IV пасажі до низького рівня (94,3±8,3 балів) з поступовим зниженням на V пасажі (62,3±6,2 балів). Відмічали різке зниження експресії CD34 від помірною рівня (148,0±10,8 балів) до її відсутності (31,7±7,9 балів). Водночас, ступінь експресії CD38 зростав від «відсутності експресії» (9,3±5,4 балів) до низького рівня (73,7±6,6 балів).

Експресія CD48 знижувалася з I (96,0±15,7 балів) до IV пасажу (7,3±4,3 балів), з різким збільшенням на V пасажі до помірною рівня (139,0±6,4 балів).

Експресія CD54 характеризувалася як «відсутність експресії» з I пасажу (0±0 балів) до III пасажу (44,3±8,3 балів) із збільшенням на IV пасажі до низького рівня (62,7±10,6 балів) та зниженням до 36,7±4,8 балів на V пасажі. Протягом усього періоду дослідження прояв CD56 характеризувався як «відсутність експресії» (від 0±0 до 45,7±7,7 балів), однак, експресія CD66e зростала від відсутності до низького рівня (від 0±0 до 72,0±7,0 балів).

Експресія CD95 зростала від I до II пасажу (від 102,7±12,39 до 145,3±11,8 балів) у межах помірною рівня, на III пасажі її характеризували як «відсутність експресії» (26,3±7,4 балів), проте, на IV та V пасажах вона підвищувалася до низького рівня (53,3±14,1 та 67,3±16,1 балів). Ступінь прояву CD227 поступово зростав від «відсутності експресії» з I до IV пасажу (від 0±0 до 34,0±8,7 балів) до низького рівня (V пасаж – 65,7±5,6 балів).

Експресія CD326 знижувалася з I пасажу від низького рівня до відсутності експресії на III пасажі (76,0±5,2 і 15,3±5,6 балів відповідно). Починаючи з IV пасажу, ступінь прояву CD326 почав поступово відновлюватися з поверненням на V пасажі до низького рівня (26,7±4,5 і 70,0±8,1 балів відповідно). Рівень експресії панккератину поступово зростав упродовж усього періоду дослідження від відсутності експресії до низького рівня (від 0±0 до 84,3±6,0 балів).

*Культура стовбурових клітин підшлункової залози.* Імунофенотипове дослідження культури клітин підшлункової залози котів показало зміни у їх фенотиповому профілі у процесі пасажування.

Так, експресія CD10, CD34, CD45, CD48, CD54 не реєструвалася протягом усього періоду досліджень ( $0 \pm 0$  балів).

Експресія CD38, CD227 та CD326 у процесі культивування зростала від відсутності експресії на I пасажі ( $46,0 \pm 7,6$  балів;  $46,0 \pm 7,6$  і  $15,7 \pm 3,7$  балів відповідно) до помірного рівня на V пасажі ( $129,3 \pm 17,6$  балів;  $126,3 \pm 14,1$  і  $116,0 \pm 9,3$  балів відповідно). Ступінь прояву CD66e поступово зростав від відсутності експресії ( $12,0 \pm 2,3$  балів) до низького рівня ( $75,7 \pm 12,0$  балів). Експресія CD95 поступово зростала від низького ( $87,7 \pm 11,4$  балів) до помірного рівня ( $195,0 \pm 26,7$  балів) (рис. 6).

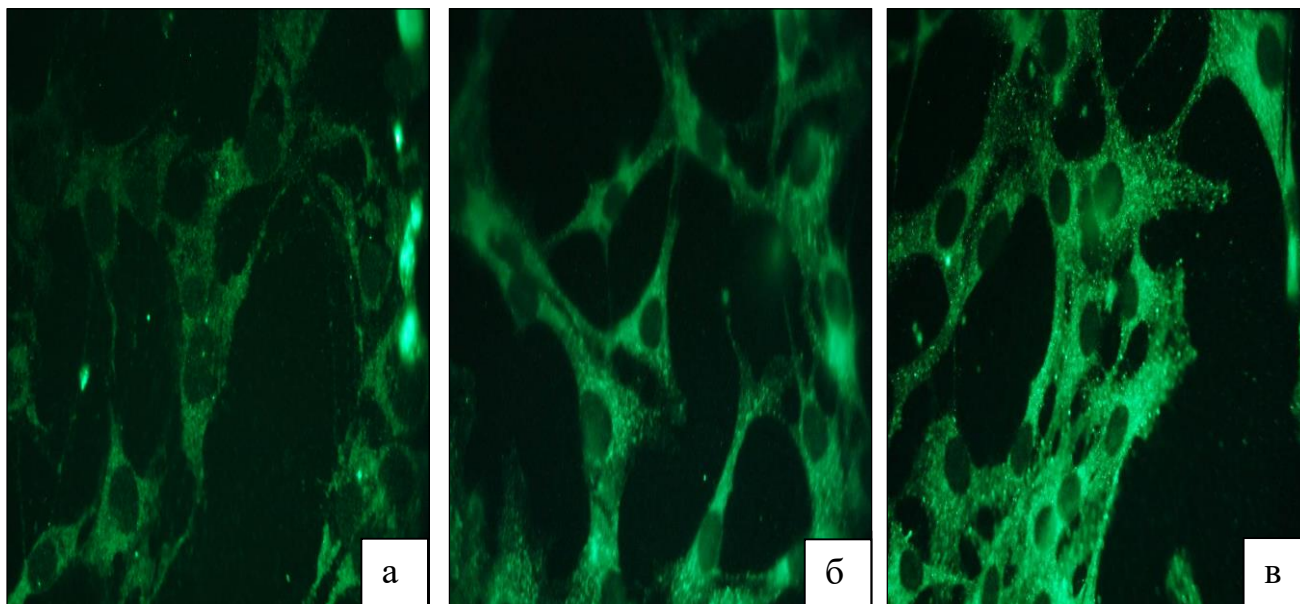


Рис. 6. Експресія CD95 на стовбурових клітинах культури kota, II пасаж: а) червоний кістковий мозок; б) жирова тканина; в) підшлункова залоза. Флуоресцентна мікроскопія;  $\times 1000$

Аналізуючи дані, отримані за час імунофенотипування клітин у культурі, можна зробити висновок, що вони неоднорідні за своєю морфологією та змінюються з пасажами. Варто зазначити, що підібрана панель CD-маркерів характерна для слабодиференційованих (прогеніторних, стовбурових) клітин.

Так, у культурі червоного кісткового мозку виявляли клітини, що експресують маркери гемопоетичних (CD34, CD45, CD48), епітеліальних (CD66e, CD326, панкератин) клітин. Також відмічали експресію CD56 та CD66e, що виявляються на мезенхімальних стовбурових клітинах. З отриманих даних можна зробити висновок, що культури клітин червоного кісткового мозку kota і щура містить у своєму складі гемопоетичні клітини (як стовбурові, так і інші), мезенхімальні стовбурові клітини, та, можливо, епітеліальні. Оскільки показники CD-маркерів, характерних для епітеліальних клітин, дуже різняться за експресією, можна припустити, що роль таких кластерів диференціювання у червоному кістковому мозку та його культурах вивчена недостатньо.

У культурі клітин жирової тканини також відмічали експресію маркерів, які виявляються на гемопоетичних, епітеліальних, мезенхімальних клітинах, а також преадипоцитах. Варто зазначити, що експресія маркерів, характерних для

гемопоетичних клітин, зменшувалася з пасажами, що свідчить про зменшення відсотка цих клітин у культурі. Також відмічали відмінності у культурах клітин жирової тканини kota і щура. Аналізуючи дані імунофенотипового профілю, можна зробити висновок, що культура клітин жирової тканини kota, починаючи з III пасажу, піддавалася спрямованій диференціації в адипогенному напрямі, що підтверджується морфологічною оцінкою та зменшенням проліферативної активності клітин. У культур клітин, отриманих з жирової тканини щура, подібних змін не відмічали.

У культурі клітин підшлункової залози спостерігали клітини з найменшим спектром експресії використаних CD-маркерів. Культура клітин підшлункової залози була негативною за маркерами, що характеризують гемопоетичні клітини. До того ж, експресія епітеліальних маркерів була добре вираженою. Аналізуючи вищеописані дані, можна припустити, що початок культурі в основній масі дали клітини дрібних проток, які у процесі культивування піддавалися дедиференціації.

**Цитогенетичний аналіз стовбурових клітин щура, отриманих з різних джерел, у процесі культивування.** Потенційне використання стовбурових клітин для терапевтичного застосування передбачає їх тривале культивування *in vitro*. Генетична стабільність є невід'ємною проблемою пасажування, оскільки більшість із них складається з гетерогенної маси клітин у різних станах диференціювання та дедиференціації.

Зважаючи на розрізненість даних щодо генетичної стабільності клітин у процесі культивування, наступним етапом дослідження став цитогенетичний аналіз клітин червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози щура та kota в культурі на ранніх пасажах.

*Культура стовбурових клітин червоного кісткового мозку.* За результатами аналізу каріотипу культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура виявлено, що для них характерні кількісні хромосомні порушення (анеуплоїдія та поліплоїдія). Результати досліджень цитогенетичного аналізу культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура приведено у табл. 9.

Таблиця 9

**Результати цитогенетичного аналізу культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура на I–VI пасажах (M±m, n=3)**

№ пасажу	Клітини з нормальним каріотипом, %	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %
I	90,0±0	8,9±1,3	1,1±1,2
II	85,7±1,3*	13,2±2	1,1±1,2
III	80,0±0***	18,9±1,3**	1,1±1,2
IV	83,3±2,0*	14,5±2,6	2,2±1,3
V	80,0±0***	15,6±1,3*	4,4±1,3
VI	77,8±1,3***	17,8±1,3**	4,4±1,3

Примітка. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05, порівнюючи з контролем (контролем слугували показники, отримані на I пасажі)

Поява анеуплоїдних клітин (рис. 7б) спостерігалася від I до VI пасажу у кількості від  $8,9 \pm 1,3$  (I пасаж) до  $17,8 \pm 1,3$  % (VI пасаж). Цитогенетичну мінливість (анеуплоїдію) в основному викликала поява гіпоплоїдних клітин, каріотип яких  $2n=39$ ,  $2n=30$  хромосом. Різниця середніх величин за цією ознакою у популяціях клітин III, V, VI пасажів була достовірною, порівнюючи з I пасажем. Варто відзначити, що найвищий рівень анеуплоїдії ( $18,9 \pm 1,3$  %) спостерігали на III пасажі, після чого відмічали зниження кількості анеуплоїдних клітин (IV пасаж) та поступове зростання їх кількості з наступними пасажами.

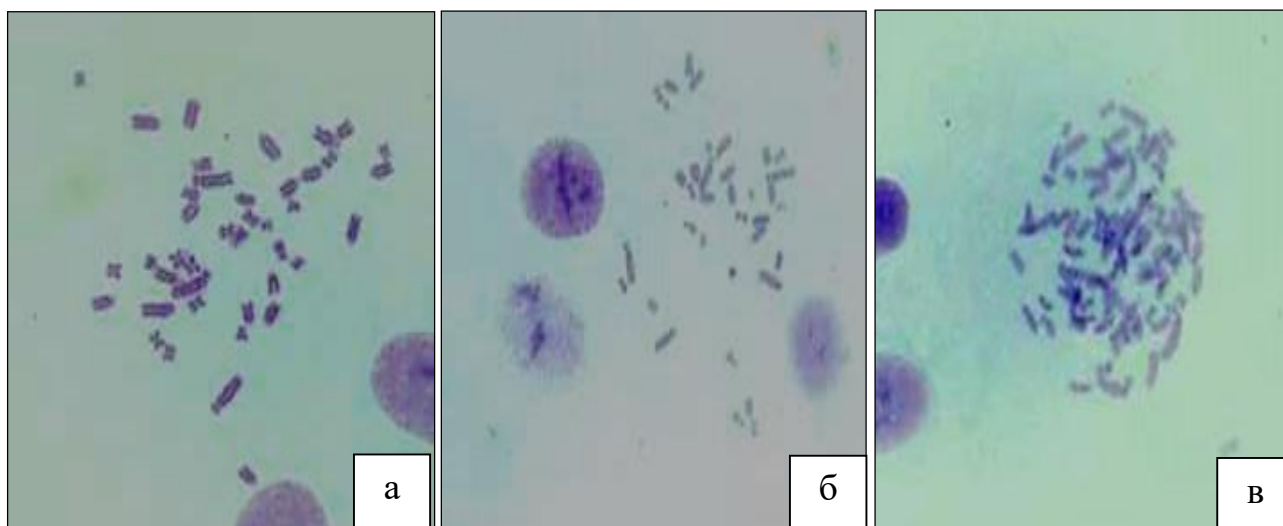


Рис.7. Мікрофотографії метафазних пластинок хромосом щура (I пасаж), забарвлення «Лейкоциф-200»: а) нормальний каріотип,  $n=42$ ; б) анеуплоїдія,  $n=38$ ; в) поліплоїдія,  $n=84$ ;  $\times 1000$

Кратне збільшення числа хромосом (поліплоїдія) у популяції клітин також проявилася з I до VI пасажу (рис. 7в). З I до III пасажу відмічали стабільну кількість клітин із поліплоїдією –  $1,1 \pm 1,2$  %. Починаючи з IV пасажу, спостерігали тенденцію до збільшення частоти такої геномної мутації у культурі стовбурових клітин до  $4,4 \pm 1,3$  %. Однак, отриманий результат був нижчим спонтанної хромосомної мінливості, характерної для ссавців (6–15 %) (Ковалева О. А., 2008).

Для оцінки цитогенетичних змін у культурі стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура також було проведено мікроядерний тест. У процесі досліджень мікроядра виявлено на всіх пасажах. До того ж, із кожним наступним пасажем спостерігали достовірне збільшення їх кількості. Проте, відсоток клітин із мікроядрами знаходився у межах норми для ссавців (1,6–5,6 %) (Хікум Х., 1999; Ковалёва О. А., 2008).

Під час досліджень було відмічено достовірне підвищення кількості двоядерних клітин у культурі клітин червоного кісткового мозку з I до VI пасажу. Проте, їх кількість не перевищувала показники спонтанної мутації лімфоцитів крові, характерної для ссавців (5,4 %) (Хікум Х., 1999; Ковалёва О. А., 2008). Підвищення кількості двоядерних клітин у культурі із збільшенням тривалості культивування можна пояснити подовженням клітинного циклу за старіння культури клітин, зокрема цитокінезу.

У процесі проведення досліджень спостерігалось зниження мітотичного індексу з I ( $4,1 \pm 0,2$  %) до IV пасажу ( $2,7 \pm 0,3$  %) та його поступове збільшення на V ( $3,3 \pm 0,1$  %) та VI ( $3,5 \pm 0,1$  %) пасажах. Даний показник не виходив за межі норми, характерної для ссавців, яка становить 2,9–4,1 % (Ковалева О. А., 2008, Эрнст Л. К., 2006).

Крім цього, на кожному пасажі відмічали незначний відсоток клітин у стані апоптозу, кількість яких поступово зростала до IV пасажу ( $0,7 \pm 0,2$  %). На VI–VI пасажах спостерігали зниження кількості клітин у стані апоптозу до 0,5 %. Рівень апоптозних клітин знаходився у межах норми.

*Культура стовбурових клітин жирової тканини.* Дані аналізу каріотипу стовбурових клітин, отриманих із жирової тканини щура, у процесі їх культивування показали, що для них також характерні кількісні порушення (анеуплоїдія та поліплоїдія). Результати цитогенетичного аналізу культури стовбурових клітин жирової тканини щура наведено у табл. 10.

Таблиця 10

**Результати цитогенетичного аналізу культур стовбурових клітин  
жирової тканини щура на I–VI пасажах ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

№ пасажу	Клітини з нормальним каріотипом, %	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %
I	$90,0 \pm 0$	$4,4 \pm 1,3$	$5,6 \pm 1,3$
II	$92,3 \pm 1,3^*$	$4,4 \pm 1,3$	$3,3 \pm 2,0$
III	$94,4 \pm 1,3^*$	$5,6 \pm 1,3$	$0 \pm 0^*$
IV	$94,4 \pm 1,3^*$	$5,6 \pm 1,3$	$0 \pm 0^*$
V	$93,3 \pm 0^{***}$	$6,7 \pm 0$	$0 \pm 0^*$
VI	$87,8 \pm 1,3$	$12,2 \pm 1,3^*$	$0 \pm 0^*$

Примітка.  $***p < 0,001$ ;  $*p < 0,05$ , порівнюючи з контролем (контролем слугували показники, отримані на I пасажі)

Присутність анеуплоїдних клітин відмічали з I до VI пасажу у кількості від  $4,4 \pm 1,3$  до  $12,2 \pm 1,3$  %. Цитогенетичну мінливість (анеуплоїдію) в основному спостерігали у клітинах з каріотипом  $2n=38$  хромосом. Відсоток клітин з анеуплоїдією незначно зростав з I ( $4,4 \pm 1,3$  %) до V ( $6,7 \pm 0$  %) пасажу. Варто зазначити, що на VI пасажі відмічали різке достовірне збільшення кількості клітин з анеуплоїдією до  $12,2 \pm 1,3$  %. Кратне збільшення числа хромосом (поліплоїдія) проявилось у популяції клітин лише на I ( $5,6 \pm 1,3$  %) та II пасажах ( $3,3 \pm 2,0$  %). За наступного пасажування поліплоїдій не відмічали.

За дослідження культури стовбурових клітин жирової тканини на перших пасажах відмічали велику кількість двоядерних клітин ( $2,9 \pm 0,2$  % – I пасаж;  $2,5 \pm 0,3$  % – II пасаж) та високий мітотичний індекс ( $4,3$  % – I пасаж;  $4,1$  % – II пасаж). Це наводить на думку, що виявлені поліплоїдії на перших пасажах культивування зумовлені високою швидкістю поділу, що призвело до виявлення під час аналізу великої кількості клітин у процесі цитокінезу. Проте, отримані результати були нижчими за показники спонтанної хромосомної мінливості лейкоцитів крові ссавців (6–15 %) (Эрнст Л. К., 2006).

Для оцінки цитогенетичних змін стовбурових клітин жирової тканини щура у процесі культивування також було проведено мікроядерний тест, результати якого показали наявність клітин із мікроядрами на всіх пасажах. До того ж, на VI пасажі відмічали достовірне збільшення їх кількості, що корелює з показниками анеуплоїдій, вказаними у табл. 10. Відсоток клітин з мікроядрами, виявлений в процесі дослідження, знаходився у межах норми для ссавців (Хікум Х., 1999; Ковалева О. А., 2008; Ковалёва О., 2008).

Одночасно відмічалось достовірне зменшення кількості двоядерних клітин у культурі жирової тканини щура з I до VI пасажу, що можна пояснити зменшенням кількості поділів клітин за одиницю часу, що характерно для старіння культури. Кількість двоядерних клітин протягом всього часу дослідження не перевищувала цей показник, характерний для спонтанної мутації лімфоцитів ссавців (Эрнст Л. К., 2006).

Мітотичний індекс у процесі культивування достовірно знижувався з I ( $4,3 \pm 0,2$  %) до VI ( $2,0 \pm 0,1$  %) пасажу. Також під час дослідження було виявлено клітини у стані апоптозу, кількість яких незначно зростала до V пасажу ( $0,1 \pm 0,1$  % – I пасаж;  $0,3 \pm 0,1$  % – V пасаж) з наступним різким достовірним збільшенням на VI пасажі ( $1,4 \pm 0,1$  %).

*Культура стовбурових клітин підшлункової залози.* Аналіз каріотипу клітин, отриманих із підшлункової залози щура, у процесі культивування показав, що для них також характерні кількісні хромосомні порушення. Результати досліджень представлено у табл. 11.

Таблиця 11

**Результати цитогенетичного аналізу культури стовбурових клітин підшлункової залози щура на I–VI пасажах ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

№ пасажу	Клітини з нормальним каріотипом, %	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %
I	$97,8 \pm 1,3$	$2,2 \pm 1,3$	$0 \pm 0$
II	$94,5 \pm 1,3$	$4,4 \pm 2$	$1,1 \pm 1,3$
III	$85,5 \pm 1,3^{**}$	$8,9 \pm 1,3^{**}$	$5,6 \pm 1,3^*$
IV	$75,5 \pm 1,2^{**}$	$16,6 \pm 2,0^{**}$	$7,8 \pm 1,3^{**}$
V	$83,3 \pm 2,0^{**}$	$12,2 \pm 1,3^{**}$	$4,5 \pm 2,6$
VI	$82,3 \pm 1,3^{**}$	$13,3 \pm 0^{***}$	$4,4 \pm 1,3^*$

Примітка. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , порівнюючи з контролем (контролем слугували показники, отримані на I пасажі)

У культурі стовбурових клітин підшлункової залози щурів клітини з анеуплоїдією відмічали від I до VI пасажу у кількості від  $2,2 \pm 1,3$  (I пасаж) до  $16,6 \pm 2,0$  % (IV пасаж).

Цитогенетичну мінливість (анеуплоїдію) в основному спостерігали у клітинах з каріотипом  $2n=39$ ,  $2n=40$ . Різниця середніх величин за цією ознакою у популяціях III–VI пасажів була достовірною ( $p < 0,01$ ), порівнюючи з I пасажем. Варто відзначити, що найвищий рівень анеуплоїдії ( $16,6 \pm 2,0$  %), спостерігали на IV пасажі, після чого відмічали зниження кількості анеуплоїдних клітин (V пасаж) та зростання їх кількості на VI пасажі.

Кратне збільшення числа хромосом проявилось у популяції клітин з II до VI пасажу. Починаючи з II пасажу, спостерігали тенденцію до збільшення цієї геномної мутації до  $7,8 \pm 1,3$  % (IV пасаж) із різким зниженням на V ( $4,5 \pm 2,6$  %).

Для оцінки цитогенетичних змін у культурі стовбурових клітин підшлункової залози щура було проведено мікроядерний тест, результати якого показали наявність клітин з мікроядрами на всіх пасажах (рис. 8а). До того ж, починаючи з II пасажу, спостерігали достовірне збільшення їх кількості.

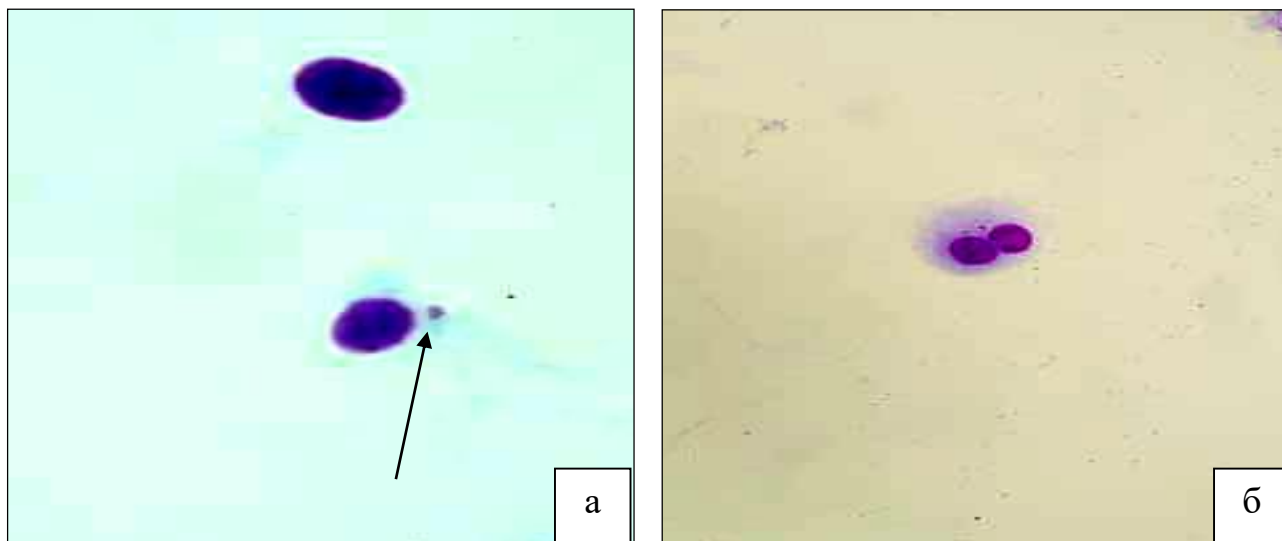


Рис. 8 Мікрофотографії клітин зі змінами у ядрі (VI пасаж): а) клітина з мікроядром (показано стрілкою); б) двоядерна клітина. Забарвлення «Лейкоцидиф-200»;  $\times 1000$

Одночасно відмічали достовірне збільшення кількості двоядерних клітин у культурі стовбурових клітин підшлункової залози щура з I до VI пасажу (рис. 8б).

У процесі дослідження відмічали зниження мітотичного індексу з I ( $2,7 \pm 0,1$  %) до III пасажу ( $1,5 \pm 0,1$  %) та його поступове збільшення на IV ( $1,7 \pm 0,1$  %) і VI ( $2,0 \pm 0,1$  %) пасажах.

Виявлено незначний відсоток клітин у стані апоптозу, вміст яких поступово зростав до IV пасажу ( $0,5 \pm 0,1$  %). На V–VI пасажах спостерігали зменшення кількості клітин у стані апоптозу.

За результатами цитогенетичної оцінки стовбурових клітин культури підшлункової залози встановлено, що кількість клітин з мікроядрами, двоядерних клітин та клітин у стані апоптозу знаходиться у межах норми з I до VI пасажу. Кількість анеуплоїдій та поліплоїдій змінюється з кожним пасажем, але не виходить за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців.

**Цитогенетичний аналіз культур стовбурових клітин kota у процесі культивування.** *Культура стовбурових клітин червоного кісткового мозку.* У процесі аналізу каріотипу стовбурових клітин червоного кісткового мозку kota у процесі культивування виявлено, що для них характерні кількісні порушення (анеуплоїдія та поліплоїдія).

Результати цитогенетичного аналізу культур стовбурових клітин червоного кісткового мозку kota наведено у табл. 12.

Таблиця 12

**Результати цитогенетичного аналізу культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку kota на I–V пасажах (M±m, n=3)**

№ пасажу	Клітини з нормальним каріотипом, %	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %
I	88±1,2	9,3±0,8	2,7±0,8
II	85,4±0,8	11,3±1,5	3,3±0,8
III	79,3±0,8**	16,7±0,8**	4,0±0
IV	78,7±0,8**	16,0±0**	5,3±0,8
V	77,4±0,8**	17,3±0,8**	5,3±0,8

Примітка. \*\* $p < 0,01$ , порівнюючи з контролем (контролем слугували показники, отримані на I пасажі)

Метафазні пластинки хромосом з анеуплоїдією (рис. 9в) у клітинах червоного кісткового мозку котів виявляли з I до V пасажу. Найнижчий їх відсоток (9,3±0,8 %) відмічали на I пасажі. Після чого їх вміст поступово зростав до III пасажу (16,7±0,8 %) з поступовим зниженням на IV пасажі (16,0±0 %). Максимальна кількість клітин з некрратним набором хромосом відмічалася на V пасажі (17,3±0,8 %).

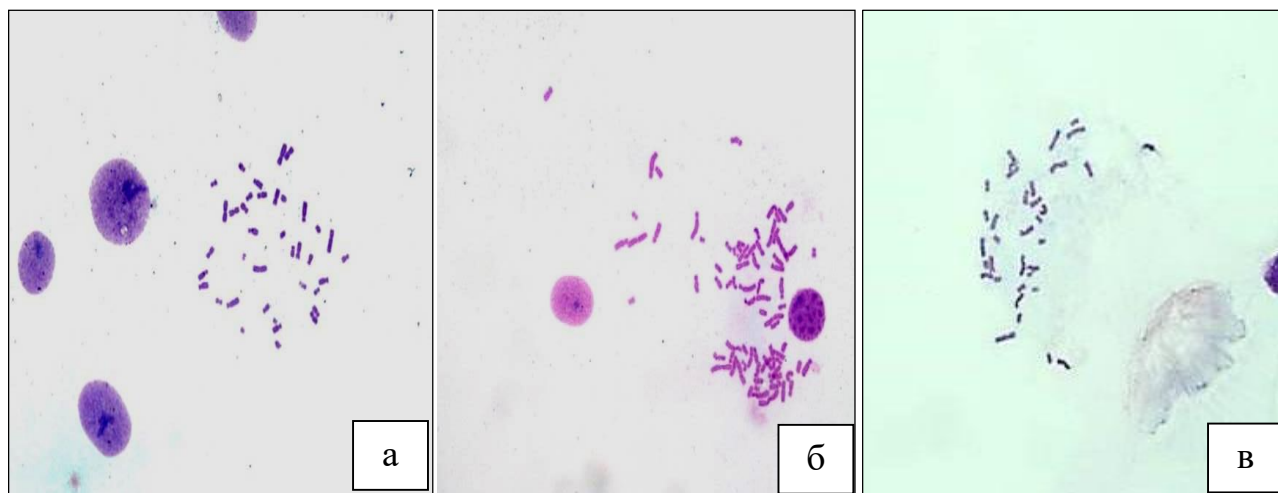


Рис. 9. Мікрофотографії метафазних пластинок хромосом kota (I пасаж): а) нормальний каріотип,  $n=38$ ; б) поліплоїдія,  $n=76$ ; в) анеуплоїдія,  $n=36$ . Забарвлення «Лейкодиф-200»;  $\times 1000$

Присутність у культурі клітин червоного кісткового мозку kota клітин з анеуплоїдією можна пояснити тим, що у процесі культивування кількість клітин із неправильним набором хромосом збільшується у результаті їх неконтрольованого поділу. Водночас, отримані показники не перевищували спонтанного рівня соматичного мутагенезу, характерного для лімфоцитів ссавців.

Метафазні пластинки з поліплоїдією (кратним збільшенням числа хромосом) (рис. 9б) виявляли у культурі стовбурових клітин червоного кісткового мозку kota з I ( $2,7 \pm 0,8$  %) до V ( $5,3 \pm 0,8$  %) пасажу.

*Культура стовбурових клітин жирової тканини.* Із даних аналізу каріотипу стовбурових клітин жирової тканини kota у процесі культивування видно, що для неї також характерні кількісні порушення. Результати цитогенетичного аналізу цієї культури наведено у табл. 13.

Таблиця 13

**Результати цитогенетичного аналізу культури стовбурових клітин  
жирової тканини kota I–V пасажів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

№ пасажу	Клітини з нормальним каріотипом, %	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %
I	$88,0 \pm 1,2$	$6,7 \pm 0,8$	$5,3 \pm 0,8$
II	$90,7 \pm 1,9$	$7,3 \pm 0,8$	$2,0 \pm 1,2$
III	$88,6 \pm 0,8$	$10,7 \pm 1,5$	$0,7 \pm 0,8^*$
IV	$85,3 \pm 0,8$	$14,0 \pm 1,2^{**}$	$0,7 \pm 0,8^*$
V	$84,0 \pm 1,2$	$16,0 \pm 1,2^{**}$	$0 \pm 0^{**}$

Примітка.  $**p < 0,01$ ;  $*p < 0,05$ , порівнюючи з контролем (контролем слугували показники, отримані на I пасажі)

У процесі дослідження відмічали поступове збільшення кількості метафазних пластинок з анеуплоїдним набором хромосом у культурі стовбурових клітин жирової тканини з I до V пасажу. Найнижчий їх відсоток ( $6,7 \pm 0,8$  %) спостерігався на I пасажі. Максимальний відсоток клітин із анеуплоїдією відмічено на V пасажі ( $16,0 \pm 1,2$  %).

Метафазні пластинки з кратним збільшенням числа хромосом виявляли у культурі стовбурових клітин жирової тканини з I ( $5,3 \pm 0,8$  %) до IV ( $0,7 \pm 0,8$  %) пасажу (див. табл. 13). Варто зазначити, що з пасажами кількість клітин з поліплоїдією знижувалася до повної їх відсутності на V пасажі.

*Культура стовбурових клітин підшлункової залози.* Результати аналізу каріотипу стовбурових клітин підшлункової залози kota у процесі їх культивування показали, що для них характерна наявність клітин як з анеуплоїдним, так і поліплоїдним наборами хромосом (табл. 14).

Таблиця 14

**Результати цитогенетичного аналізу культури стовбурових клітин  
підшлункової залози kota I–V пасажів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

№ пасажу	Клітини з нормальним каріотипом, %	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %
I	$90,0 \pm 1,2$	$10,0 \pm 1,6$	$0 \pm 0$
II	$86,0 \pm 2,3$	$11,3 \pm 1,9$	$2,7 \pm 0,8^*$
III	$84,0 \pm 0^{**}$	$13,3 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,8^*$
IV	$81,3 \pm 0,8^{**}$	$14,7 \pm 0,8^*$	$4,0 \pm 0^{***}$
V	$80,7 \pm 0,8^{**}$	$16,0 \pm 0^{**}$	$3,3 \pm 0,8^*$

Примітка.  $***p < 0,001$ ;  $**p < 0,01$ ;  $*p < 0,05$ , порівнюючи з контролем (контролем слугували показники, отримані на I пасажі)

Метафазні пластинки хромосом з анеуплоїдією у культурі стовбурових клітин підшлункової залози відмічали з I до V пасажу. Так, найнижчий їх відсоток відмічали на I пасажі, коли він становив  $10,0 \pm 1,6 \%$ , максимальну кількість клітин із некротичним набором хромосом реєстрували відповідно на V пасажі –  $16,0 \pm 0 \%$ .

Метафазні пластинки із кратним збільшенням числа хромосом виявляли у культурі стовбурових клітин підшлункової залози з II ( $2,7 \pm 0,8 \%$ ) до V ( $3,3 \pm 0,8 \%$ ) пасажу з піком на IV пасажі ( $4,0 \pm 0 \%$ ).

**Мікроскопічні зміни в різних органах щурів за алоксанового цукрового діабету.** За вивчення гістологічних препаратів, одержаних з органів тварин на 20 добу після формування експериментального алоксанового цукрового діабету, відмічали ряд змін у досліджуваних органах, властивих цьому захворюванню.

*Зміни у підшлунковій залозі.* Отже, у підшлунковій залозі щурів за експериментального алоксанового цукрового діабету розвиваються дисконкомплексация та руйнування усіх клітин панкреатичних острівців (рис. 10).

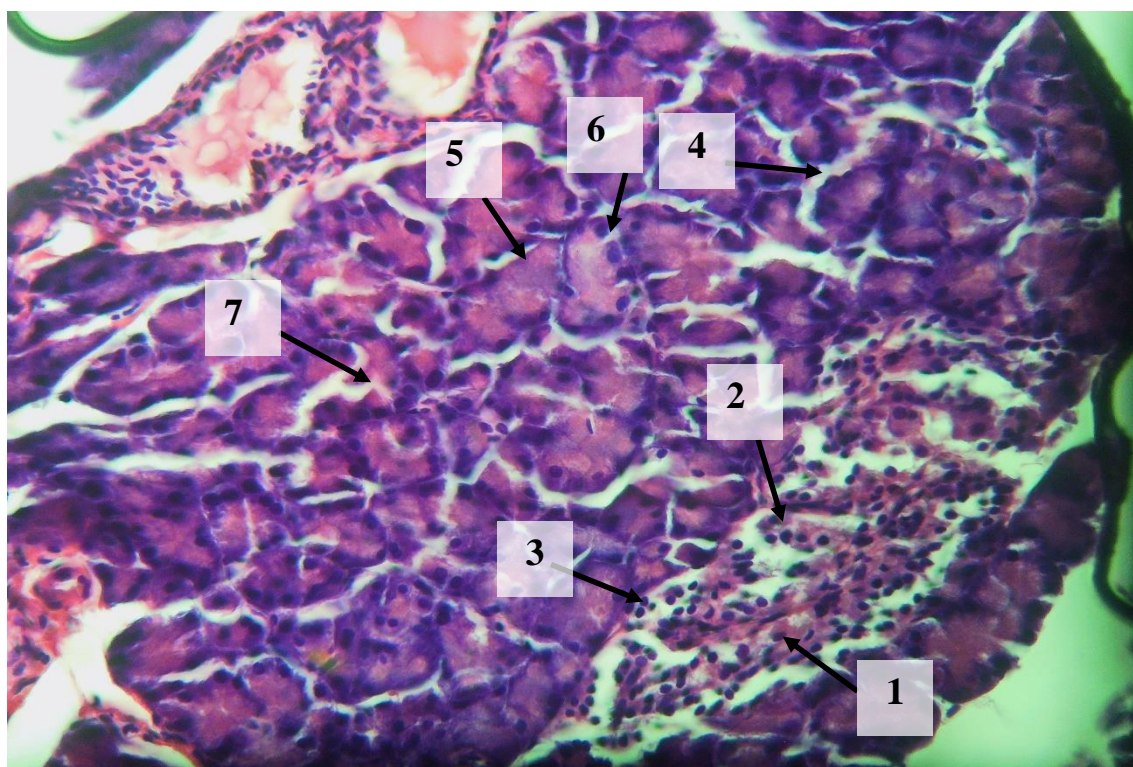


Рис. 10. Підшлункова залоза щура за експериментального алоксанового цукрового діабету: 1 – дисконкомплексация клітин панкреатичного острівця; 2 – руйнування клітин панкреатичного острівця; 3 – лімфоцити в межах панкреатичного острівця; 4 – набряк між ацинусами; 5 – зерниста дистрофія панкреатоцитів; 6 – дисконкомплексация панкреатоцитів; 7 – дезорганізація ацинуса. Гематоксилін Караці та еозин;  $\times 200$

Такі зміни ускладнюються панкреатитом, що документується запальним набряком, наявністю лімфоцитів у межах панкреатичних острівців, дистрофічними й некротичними змінами панкреатоцитів, що, своєю чергою,

супроводжувалося дезорганізацією частини ацинусів з розвитком вогнищевого склерозу.

*Зміни у печінці.* У печінці на 20 добу після моделювання алоксанового цукрового діабету ми встановили мікроскопічні ознаки гепатиту, який супроводжується дистрофічними змінами гепатоцитів і внутрішньочасточковим застоєм жовчі.

*Зміни у нирках.* За експериментального алоксанового цукрового діабету відмічали дифузні зміни в нирках щурів. Спостерігали руйнування всіх структурних компонентів клубочків з наступними їх некрозом, а також дистрофічні зміни й руйнування епітелію звивистих і прямих каналців.

*Зміни у серці.* За експериментального алоксанового цукрового діабету в міокарді щурів реєструються набряк, вогнищева інфільтрація стромі еритроцитами, а також дистрофічні зміни й осередки некрозу кардіоцитів.

**Міграційна здатність стовбурових клітин червоного кісткового мозку в зону пошкодження.** Вважають, що міграція стовбурових клітин у зону патологічного процесу обумовлена цитокінами та хемокінами запалення. Водночас механізм міграції до зони пошкодження вивчений недостатньо, тому одним із наших завдань було дослідити міграційну здатність клітин червоного кісткового мозку залежно від способу їх введення в організм тварини-реципієнта.

Введення клітин виконували двома шляхами: внутрішньовенно та під капсулу підшлункової залози. Результати оцінювали шляхом виявлення мічених клітин у кріозрізах підшлункової залози (рис. 11). Аналіз проводили на 8 добу після трансплантації клітин.

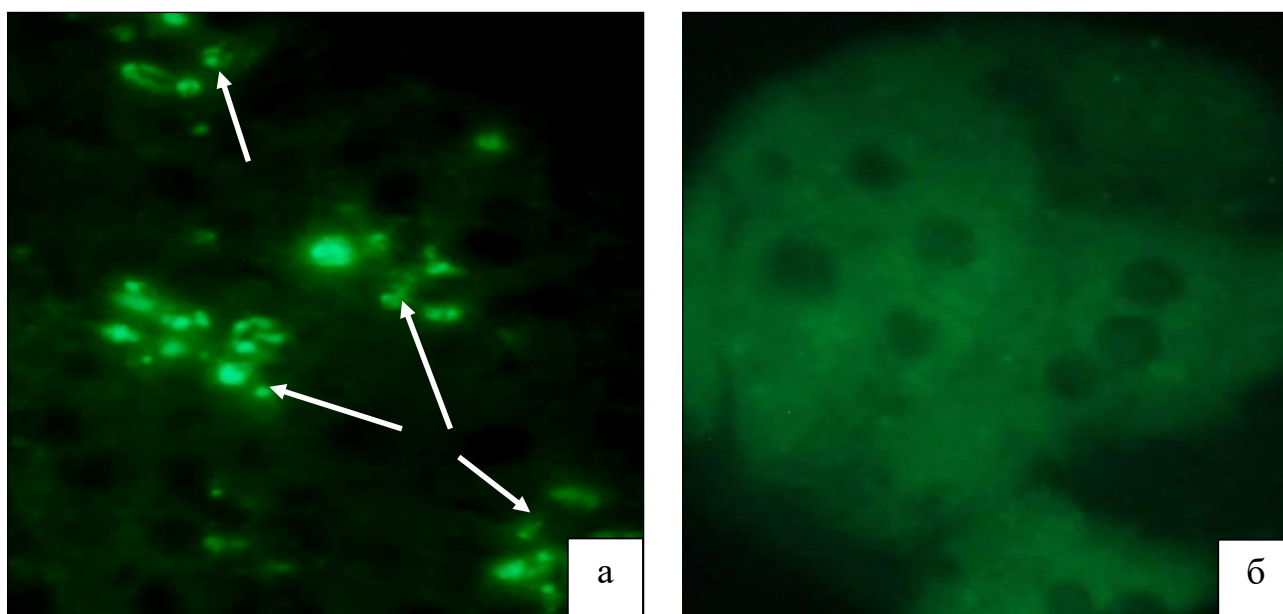


Рис. 11. Виявлення у підшлунковій залозі тварин-реципієнтів клітин, мічених Hoechst: а) введення під капсулу (стрілками позначені скупчення ядер, що флуоресціюють; б) контроль (відсутність ядер з флуоресценцією). Кріозрізи, флуоресцентна мікроскопія;  $\times 1000$

За місцевого введення культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку тваринам з експериментально сформованим цукровим діабетом на 8 добу спостерігали їх дифузне розміщення у тканині підшлункової залози (рис. 11а).

Отримані дані свідчать не лише про збереження життєздатності клітин після введення протягом тривалого часу, а і про їх міграцію у товщу пошкодженого органу. За внутрішньовенного введення клітин, мічених Hoechst, виявляли поодинокі сигнали, що свідчить про те, що основна маса клітинного матеріалу так і не досягла підшлункової залози. Тому для наступних досліджень було вирішено проводити трансплантацію культур клітин лише під капсулу підшлункової залози.

**Імунна відповідь організму тварин-реципієнтів на введення стовбурових клітин.** Важливим питанням трансплантації стовбурових клітин є відповідь організму-реципієнта. Існують дані про низьку імуногенність та імуносупресивну дію стовбурових клітин (Prigozhina T. B., 2008; Han Z., 2012). Однак, зважаючи на те, що культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози гетерогенні за своїм клітинним складом, можлива зміна їх імуногенності, порівняно з «чистими» культурами мезенхімальних стовбурових клітин. Саме тому питання відповіді імунної системи на трансплантацію культур клітин спонукає до більш детального вивчення цього питання.

У результаті досліджень цитотоксичного впливу лейкоцитів крові сенсibilізованих тварин щодо культур стовбурових клітин, отриманих з червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози на I та IV пасажах не відмічали. Індекс проліферації клітин під час співкультивування з лімфоцитами контрольної групи тварин та лімфоцитами сенсibilізованих тварин майже не відрізнявся та був у діапазоні 1,01–1,02.

Цитотоксичного впливу сироватки крові сенсibilізованих тварин на стовбурові клітини жирової тканини та червоного кісткового мозку в культурі також виявлено не було. Індекс проліферації у клітин цих культур був у межах 0,97–1,02.

Проте, дослідження цитотоксичного впливу сироватки крові сенсibilізованих тварин на культуру стовбурових клітин підшлункової залози показало достовірне зниження індексу їх проліферації на I та IV пасажах відповідно до 0,73 та 0,94 (контроль – 1,01). Отримані дані свідчать про цитотоксичний ефект сироватки крові сенсibilізованих тварин на клітини підшлункової залози.

Цитотоксичність сироватки на культуру стовбурових клітин підшлункової залози із її наступним зниженням із пасажами можна пояснити наявністю у первинній культурі диференційованих клітин, кількість яких із пасажами знижується.

**Зміна рівня глюкози у крові щурів за алоксанового цукрового діабету за трансплантації культур стовбурових клітин, отриманих з різних джерел.** Наступний етап досліджень полягав у вивченні впливу різних за походженням стовбурових клітин на перебіг експериментально сформованого алоксанового цукрового діабету у щурів.

На 20 добу після формування алоксанового цукрового діабету у щурів виявили збільшення рівня глюкози у крові до  $13,96 \pm 1,37$  ммоль/л, порівнюючи з вихідним станом –  $4,70 \pm 0,40$  ммоль/л. На основі отриманих даних можна стверджувати, що на 20 добу після формування алоксанового цукрового діабету, окремі тканини дослідних тварин не здатні нормально утилізувати глюкозу з крові внаслідок нестачі інсуліну.

На 20 добу після формування цукрового діабету дослідним щурам проводили трансплантацію стовбурових клітин під капсулу підшлункової залози: тваринам I групи – червоного кісткового мозку; II – підшлункової залози; III – жирової тканини. Результати дослідження представлено на рис. 12.

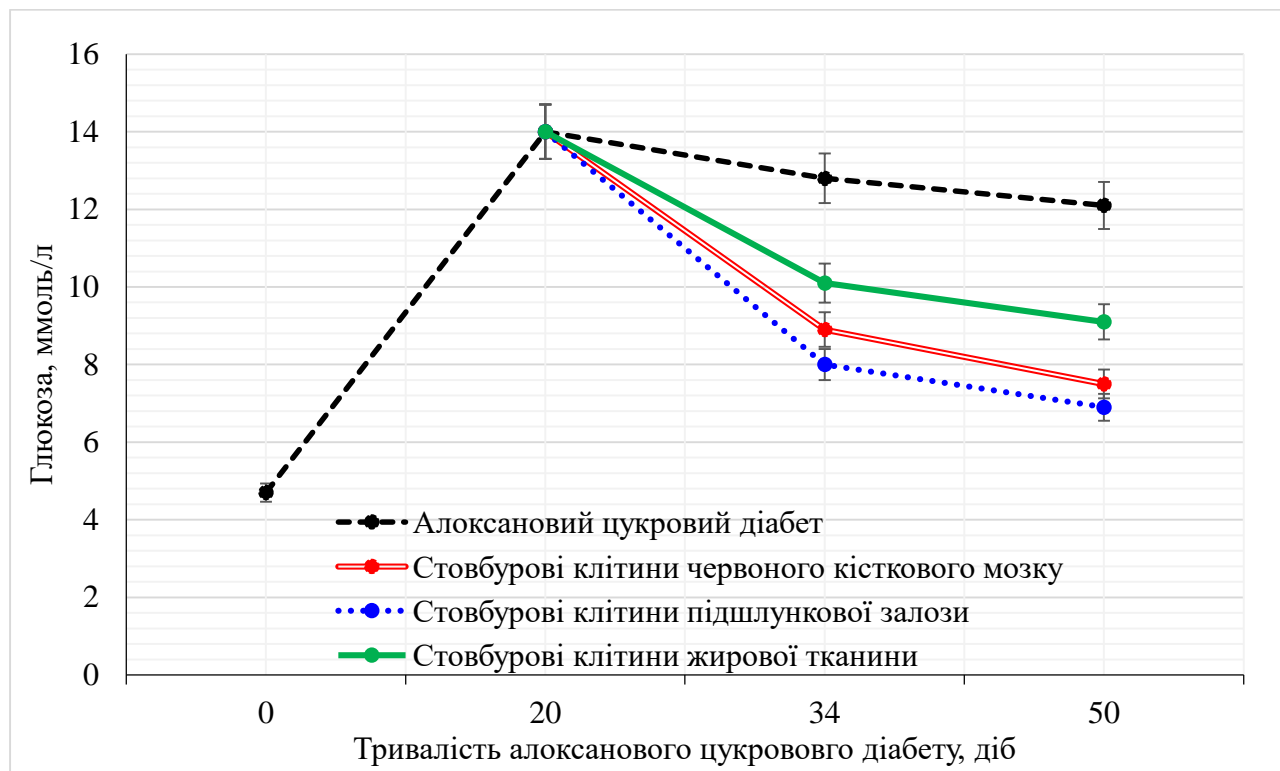


Рис. 12. Рівень глюкози у крові щурів за цукрового діабету на фоні введення різних за походженням культур стовбурових клітин ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Дослідження показали, що у крові тварин контрольної групи на 34 добу експерименту рівень глюкози становив  $12,84 \pm 2,45$  ммоль/л, що на 9 % нижче показника 20 доби.

У тварин дослідних груп (14 доба після введення клітин) рівень глюкози у крові зменшився, порівнюючи з контролем, за трансплантації культур стовбурових клітин червоного кісткового мозку на 30 %; підшлункової залози – 38 % та жирової тканини – 21 %. Подальші дослідження показали прогресуюче зменшення рівня глюкози у крові дослідних тварин. Так, у щурів контрольної групи він знизився до  $12,12 \pm 2,01$  ммоль/л, що на 14 % менше, порівнюючи з 20 добою експерименту. В інших дослідних групах на 30 добу після введення стовбурових клітин кількість цього моноцукриду знизилася: за трансплантації стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку – на 38 %, підшлункової залози – 43 % та жирової тканини – 25 %, порівнюючи з

контрольною групою, що вказує на позитивний вплив трансплантації стовбурових клітин на засвоєння тканинами глюкози. Варто також зазначити, що за введення культури стовбурових клітин підшлункової залози відмічали різке зниження рівня глюкози на 14 добу після введення, що можна пояснити походженням культури та наявністю у ній інсулінпродукуючих клітин.

Трансплантація культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку на фоні експериментального цукрового діабету також мала значний ефект, проте, зниження глюкози у крові відбувалося не так різко, як за трансплантації культури стовбурових клітин підшлункової залози, що свідчить про відмінності впливу цих культур. Трансплантація стовбурових клітин культури жирової тканини на фоні експериментального цукрового діабету виявилася найменш ефективною.

**Мікроскопічна будова підшлункової залози щурів за експериментального цукрового діабету за введення культур стовбурових клітин, отриманих із різних джерел.** Наступним кроком у дослідженнях була макро- та мікроскопічна оцінка морфометричних даних підшлункової залози щурів за алоксанового цукрового діабету без лікування (контрольна група) та за введення культур стовбурових клітин, отриманих з різних тканин (табл. 15).

*Таблиця 15*

**Морфометричні показники острівців Лангерганса у щурів різних груп на 50 добу після моделювання алоксанового цукрового діабету ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Група тварин	Кількість острівців Лангерганса на 10 мм <sup>2</sup> площі гістологічного зрізу	Кількість клітин у одному острівці Лангерганса
Інтактні тварини	9,7±1,0	100,0±14,9
Контрольна	9,7±1,3	62,5±12,4
За введення культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку	14,7±1,4*	111,0±13,9*
За введення культури стовбурових клітин підшлункової залози	17,7±1,9*	78,3±14,0
За введення культури стовбурових клітин жирової тканини	10,7±0,8	69,5±10,3

Примітка. \* $p < 0,05$ ; показники на 50 добу алоксанового цукрового діабету порівнювали з показниками інтактних тварин, а показники після трансплантації стовбурових клітин за цукрового діабету, порівнюючи з показниками на 50 добу у контролі

Варто зазначити, що за макроскопічної оцінки підшлункової залози тварин інтактною, контрольною та дослідних груп відмінностей не відмічали.

За гістологічного дослідження підшлункової залози інтактних щурів було встановлено, що середня кількість острівців на 10 мм<sup>2</sup> зрізу товщиною 5 мкм становила 9,7±1,0, а середня кількість клітин в острівцях Лангерганса – 100,0±14,9.

За гістологічного дослідження тканин підшлункової залози щурів контрольної групи не виявлено змін кількості острівців, порівнюючи з інтактним тваринами, проте, середня кількість клітин в острівцях зменшилася у 1,6 раза.

За гістологічного дослідження тканин підшлункової залози тварин, яким вводили культуру стовбурових клітин підшлункової залози, відмічали зростання середньої кількості острівців на одиницю площі порівняно із тваринами контрольної групи. На 50 добу експерименту це збільшення становило 1,8 раза ( $p < 0,05$ ). Водночас, їхній розмір значно варіював.

За гістологічного дослідження тканин підшлункової залози тварин, яким вводили культуру стовбурових клітин червоного кісткового мозку, було виявлено як збільшення кількості острівців на одиницю площі, порівнюючи із тваринами контрольної групи, так і збільшення їхнього середнього розміру (середня кількість острівців на  $10 \text{ мм}^2$  зрізу товщиною 5 мкм збільшилася в 1,5 раза). Реєстрували як дрібні, так і великі острівці. До того ж на 50 добу експерименту деякі з них містили більше 170 клітин.

Збільшення питомого об'єму острівкової тканини на одиницю площі після трансплантації культури стовбурових клітин жирової тканини було найнижчим серед усіх застосованих культур (рис. 13).

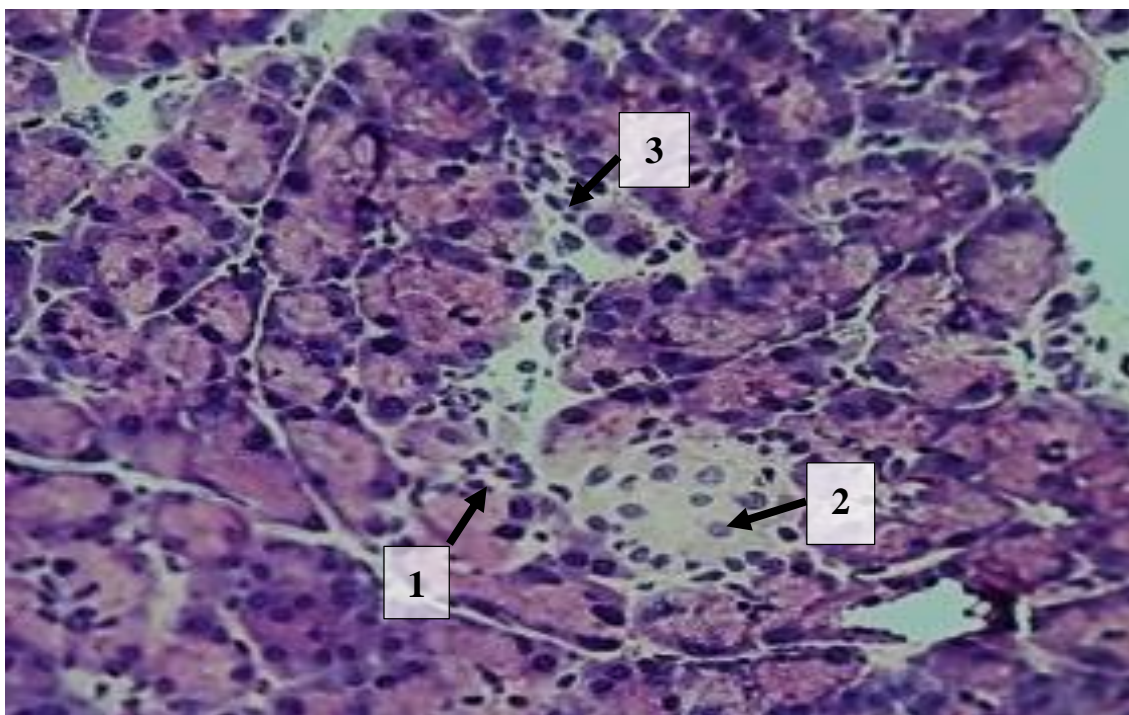


Рис. 13. Підшлункова залоза щура за експериментального алоксанового цукрового діабету за введення культури стовбурових клітин жирової тканини: 1 – формування ацинуса; 2 – панкреатичний острівець; 3 – недиференційовані клітини. Гематоксилін Караці та еозин;  $\times 200$

**Дослідження впливу культури стовбурових клітин підшлункової залози на перебіг експериментально сформованого цукрового діабету у котів.** Надалі, беручи до уваги результати, отримані під час дослідів на щурах, де найбільш ефективними за експериментального цукрового діабету виявилася

культура стовбурових клітин підшлункової залози, подальші дослідження на котях було проведено за трансплантації аналогічної алогенної культури. Трансплантацію здійснювали на 20 добу, 30, 40 та 50 добу від початку моделювання цукрового діабету. У процесі дослідження не відмічали суттєвої залежності рівня зниження глюкози у крові від часу введення клітин.

На ефективність трансплантації культури клітин підшлункової залози у котів вказувало поступове зниження рівня глюкози у крові дослідних тварин. Так, на 10 добу після введення клітин рівень глюкози знизився на 30 %, на 20 добу – 39 %, на 30 – 46 %, на 40 – 51 %, 50 добу – 53 %, порівнюючи з контролем (табл. 16).

Таблиця 16

**Рівень глюкози у крові котів за введення алогенної культури стовбурових клітин підшлункової залози на фоні експериментального цукрового діабету ( $M \pm m$ ,  $n=4$ )**

Показник	Вихідний стан	Алоксановий цукровий діабет					
		20 доба, контроль	Кількість діб після трансплантації культури стовбурових клітин підшлункової залози				
			10	20	30	40	50
Глюкоза ммоль/л	4,98 $\pm 0,15$	13,65 $\pm 0,99^{**}$	9,58 $\pm 0,61^*$	8,35 $\pm 0,69^*$	7,35 $\pm 0,35^{**}$	6,90 $\pm 0,41^{**}$	6,45 $\pm 0,35^{**}$

Примітка.  $^{**}p < 0,01$ ;  $^*p < 0,05$ ; показники на 20 добу алоксанового цукрового діабету порівнювали з вихідним станом; показники на 10 добу, 20, 30, 40, 50 добу після введення культури стовбурових клітин підшлункової залози за цукрового діабету, порівнюючи з показниками на 20 добу (контроль)

У котів після трансплантації прослідковується закономірність, відмічена раніше для щурів: різке зниження глюкози у крові тварин-реципієнтів одразу після введення клітин, що ще раз підтверджує описаний вище вплив культури стовбурових клітин підшлункової залози.

## ВИСНОВКИ

У дисертації проведено теоретичне узагальнення та експериментальне вирішення наукової проблеми встановлення впливу культур стовбурових клітин червоного кісткового мозку, підшлункової залози та жирової тканини на перебіг експериментального алоксанового цукрового діабету у щурів і котів. Представлено імунофенотипову та генетичну характеристики вищезазначених культур стовбурових клітин у процесі їх культивування залежно від видової належності.

1. За дезагрегації жирової тканини за допомогою розчину, який містить  $2 \text{ мг/см}^3$  колагенази типу II, 4 % бичачого сироваткового альбуміну у щурів і  $1 \text{ мг/см}^3$  колагенази,  $5 \text{ мг/см}^3$  гіалуронідази та 4 % бичачого сироваткового альбуміну у котів можна отримати  $649 \pm 14$  (13 доба культивування) та  $560,0 \pm 52,3$  тис. (9 доба культивування) високопроліферуючих клітин відповідно.

2. Використання методу експланту для отримання культури стовбурових клітин підшлункової залози у щурів дає змогу отримати достовірно більшу кількість клітин, здатних до поділу, порівнюючи з ферментативною дезагрегацією (у 2,9 раза за використання 2 мг/см<sup>3</sup> колагенази; 1,6 раза – теплої трипсинізації та 1,3 раза – холодної трипсинізації).

3. Кріоконсервування культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура шляхом повільного заморожування у кріосередовищі, що складається з 90 % фетальної сироватки телят та 10 % диметилсульфоксиду, дозволяє зберегти життєздатність клітин у межах 86,3±1,3 %; для клітин kota найефективнішим є кріосередовище, яке складається з 95 % фетальної сироватки телят та 5 % диметилсульфоксиду, що дозволяє зберегти життєздатність клітин у межах 65,7±0,9 %.

4. Використання розчинів ДЕС-1 (10 % диметилсульфоксиду, 20 % етиленгліколю, 0,5 ммоль сахарози) та ДЕС-2 (10 % диметилсульфоксиду, 15 % етиленгліколю, 1 ммоль сахарози) для вітрифікації стовбурових клітин щура та kota призводить до значної втрати їх адгезивних властивостей.

5. У процесі кріоконсервування-розморожування збільшується кількість клітин зі зміненим каріотипом. Так, у культурі стовбурових клітин червоного кісткового мозку кількість клітин зі зміненим каріотипом збільшилася в 1,7 раза; у культурі стовбурових клітин жирової тканини – в 1,5 раза; у культурі стовбурових клітин підшлункової залози – в 1,4 раза, порівнюючи з культурою, що не піддавалася кріоконсервуванню (контроль).

6. Використання культуральних середовищ на основі середовища Ігла, модифікованого Дюльбеко F12 (D8437) з додаванням 20 % фетальної сироватки телят та антибіотику-антимікотику з розрахунку 10 мкл/см<sup>3</sup> середовища для культивування стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура та середовища Ігла, модифікованого Дюльбеко (D5648), 20 % фетальної сироватки телят із додаванням 10 мкл/см<sup>3</sup> антибіотику-антимікотику середовища для клітин kota достовірно збільшує індекс проліферації досліджуваних клітин.

7. Культури стовбурових клітин, отримані з червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози характеризуються морфологічною гетерогенністю з переважанням клітин фібробластоподібної форми, проте з IV пасажу культури візуально стають гомогенними. У культурі стовбурових клітин жирової тканини kota, починаючи з IV пасажу, відмічається поява грануляції клітин. Культури відрізняються за швидкістю утворення моношару:

– первинна культура клітин червоного кісткового мозку досягає конфлюентності 90–100 % у середньому за 8 діб, підшлункової залози – за 14 діб, жирової тканини – за 12 (у kota) та за 14 діб (у щура);

– у процесі субкультивування час досягнення конфлюентності 70–80 % становить 4 доби для стовбурових клітин підшлункової залози, 3 доби – для кісткового мозку, 4 доби – для жирової тканини щура упродовж всього часу культивування та для kota з I до III пасажу зі збільшенням до 6 діб на IV–V пасажах.

8. Культури клітин, отримані з червоного кісткового мозку як щура, так і kota містять клітини, що експресують маркери, характерні для гемопоетичних

(CD34, CD45, CD48), епітеліальних (CD66e, CD326, панкератин) та мезенхімальних стовбурових (CD56 та CD66e) клітин.

9. Культури клітин, отримані з жирової тканини kota та щура складають клітини, що експресують маркери, характерні для гемопоетичних (CD34, CD45, CD48), епітеліальних (CD66e, CD326, панкератин), мезенхімальних стовбурових клітин (CD56 та CD66e), а також преадипоцитів (CD54). До того ж:

– експресія маркерів, характерних для гемопоетичних клітин, зменшується з пасажами, що свідчить про зменшення відсотка цих клітин у культурі;

– у культурі клітин жирової тканини kota, починаючи з III пасажу, збільшується експресія маркерів, що характеризують спрямовану диференціацію клітин в адипогенному напрямі.

10. Клітини культури підшлункової залози kota та щура експресують найменший спектр досліджуваних CD-маркерів. Вони негативні за маркерами, що виявляються на гемопоетичних клітинах, проте, експресія епітеліальних маркерів добре виражена.

11. У процесі культивування виявляють генетичні зміни у вигляді анеуплоїдій та поліплоїдій у клітинах червоного кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози як котів, так і щурів. Відмічається кореляція піків кількості анеуплоїдних клітин та експресії CD95. Мінливість каріотипу досліджуваних культур клітин у процесі пасажування не виходить за межі спонтанного рівня, характерного для ссавців.

12. Встановлено, що сироватка крові сенсibiliзованих щурів на 7 добу після внутрішньовенної трансплантації культури стовбурових клітин підшлункової залози проявляє цитотоксичний ефект щодо останніх у системі *in vitro*, що підтверджується достовірним зниженням індексу проліферації до  $0,73 \pm 0,03$  на I пасажі та до  $0,94 \pm 0,02$  – на IV пасажі.

13. Трансплантація культур стовбурових клітин підшлункової залози, жирової тканини та червоного кісткового мозку за експериментального цукрового діабету сприяє зниженню рівня глюкози у крові щурів-реципієнтів на 43 %, 25 та 38 %, порівнюючи з групою без лікування.

14. Введення культур стовбурових клітин підшлункової залози, червоного кісткового мозку та жирової тканини під капсулу підшлункової залози щурів на фоні алоксанового цукрового діабету сприяє достовірному збільшенню кількості клітин в острівцях Лангерганса у 3,3 раза, 3,1 та 1,6 раза відповідно, порівнюючи з групою тварин без лікування ( $p < 0,05$ ).

15. Трансплантація культур стовбурових клітин підшлункової залози за експериментального цукрового діабету сприяє достовірному зниженню рівня глюкози у крові котів-реципієнтів ( $p < 0,01$ ).

## ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для стимуляції впровадження клітинних технологій у ветеринарну практику запропоновано:

1. Методичні рекомендації «Методи видоспецифічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній терапії»

(Розглянуто та затверджено на Вченій раді НУБіП України, протокол № 5 від 27.12.2017 р.).

2. Патент на корисну модель «Спосіб отримання культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини котів» (патент на корисну модель № 118933 від 28.08.2017 р.).

3. Патент на корисну модель «Спосіб отримання епітеліальних клітин підшлункової залози» (патент на корисну модель № 102631 від 10.11.2015 р.).

4. Одержані за виконання досліджень результати, пропонуємо використовувати у навчальному процесі за підготовки студентів освітніх рівнів «Бакалавр» і «Магістр» у закладах вищої освіти України з напрямку «Ветеринарна медицина».

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Монографія

1. Мазуркевич А. Й., Маляк М. О., **Ковпак В. В.**, Харкевич Ю. О. Стовбурові клітини у ветеринарній медицині. Експериментальні дослідження з отримання, зберігання і застосування стовбурових клітин. К., 2017. Т. 2. 279 с. (Здобувачем написано розділ «Інсулінзалежний цукровий діабет»).

### Статті у наукових фахових виданнях України:

2. Мазуркевич А. Й., **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. Цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин на різних пасажах. Ветеринарна біотехнологія. 2016. № 28. С. 165–172. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження із генетичної стабільності мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку щурів з 1–6 пасаж).

3. **Ковпак В. В.**, Харкевич Ю. О., Гудзь Н. В. Імунний статус щурів за алоксанового цукрового діабету при введенні культур клітин. Ветеринарна біотехнологія. 2016. № 29. С. 137–146. (Здобувачем досліджено показники імунного статусу тварин після трансплантації культур стовбурових клітин кісткового мозку та підшлункової залози на фоні експериментального цукрового діабету).

4. Ковпак В. В. Фенотипові та морфологічні зміни в культурі клітин підшлункової залози щурів під час культивування. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2016. № 3 (82). С. 72–77.

5. **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. Порівняльна характеристика фенотипових змін культур клітин жирової тканини та кісткового мозку в процесі культивування. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2017. № 1–2. С. 113–119. (Здобувачем порівняно фенотип культур клітин жирової тканини та кісткового мозку у процесі культивування).

6. **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. Порівняльна характеристика цитотоксичної активності лейкоцитів і сироватки крові щурів відносно алогенних культур клітин кісткового мозку та жирової тканини. Вісник Житомирського національного агроекологічного університету. 2017. Т. 3. № 1 (60). С. 246–251. (Здобувачем досліджено цитотоксичну активність лейкоцитів та сироватки крові відносно культур клітин).

7. Мазуркевич А. Й., **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С., Гудзь Н. В. Порівняння змін фенотипу у культурах клітин жирової тканини, кісткового мозку та підшлункової залози котів з пасажами. Ветеринарна біотехнологія. 2017. № 31. С. 89–100. *(Здобувачем досліджено фенотип культур стовбурових клітин кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози у процесі їх пасажування).*

8. Ковпак В. В. Вплив трансплантації культур клітин на стан острівкового апарату підшлункової залози та рівень глюкози у крові за експериментального цукрового діабету у тварин. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2017. № 4. С. 101–105.

9. **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. Порівняння різних методів виділення стовбурових клітин з підшлункової залози щура. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2018. № 2. С. 132–135. *(Здобувачем досліджено ефективність використання різних методів дезагрегації тканини підшлункової залози для отримання культури клітин).*

10. **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. Проліферативна активність стовбурових клітин кісткового мозку котів у культурі залежно від культурального середовища. Наукові горизонти. 2018. № 3 (66). С. 62–66. *(Здобувачем досліджено вплив різних культуральних середовищ на проліферативну активність стовбурових клітин kota).*

11. **Ковпак В. В.**, Мазуркевич А. Й., Ковпак О. С., Тарасов О. А. Вплив кріоконсервування на генетичну стабільність стовбурових клітин kota залежно від джерел їх отримання. Ветеринарна біотехнологія. 2018. № 33. С. 39–45. *(Здобувачем досліджено вплив диметилсульфоксиду на генетичну стабільність клітин).*

### **Статті у наукових фахових виданнях України,**

#### **включених до міжнародних наукометричних баз даних:**

12. **Ковпак В. В.**, Харкевич Ю. О., Каленюк Ю. В. Вплив середовища на збереженість стовбурових клітин під час кріоконсервування. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. 2015. Т. 17. № 1 (61). Ч. 2. С. 57–62. *(Здобувачем досліджено вплив різних методів кріоконсервування на життєздатність стовбурових клітин kota та підготовлено статтю до друку).*

13. Мазуркевич А. Й., **Ковпак В. В.**, Харкевич Ю. О. Морфологічні зміни у підшлунковій залозі за алоксанового цукрового діабету у щурів. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2015. № 227. С. 155–159. *(Здобувачем досліджено вплив різних методів кріоконсервування на життєздатність стовбурових клітин kota).*

14. **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. Проліферативна активність мезенхімальних стовбурових клітин щура за впливу культурального середовища. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2016. № 60. 11 с. Режим доступу до статті:

<http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/6841>. *(Здобувачем досліджено вплив культурального середовища на проліферативну активність стовбурових клітин щура та підготовлено статтю до друку).*

15. Мазуркевич А. Й., **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. Фенотипові та морфологічні зміни культури клітин кісткового мозку щурів в процесі їх культивування. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. 2016. Т. 18. № 2 (66). С. 126–131. *(Здобувачем досліджено морфологічні зміни клітин кісткового мозку під час їх культивування).*

16. Ковпак В. В. Цитотоксична активність лейкоцитів і сироватки крові щурів відносно алогенних культур клітин кісткового мозку та підшлункової залози. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2016. № 6 (63). 9 с. Режим доступу до статті: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/7561>.

17. Мазуркевич А. Й., **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. Генетична стабільність культур клітин підшлункової залози та кісткового мозку щурів на ранніх пасажах. Ветеринарна медицина. 2017. № 103. С. 300–303. *(Здобувачем досліджено генетичну стабільність культур клітин кісткового мозку та підшлункової залози).*

18. Мазуркевич А. Й., **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. Цитогенетичний аналіз культури клітин жирової тканини щурів на ранніх пасажах. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2017. № 265. С. 159–167. *(Здобувачем проведено аналіз генетичної стабільності клітин жирової тканини щурів та підготовлено статтю до друку).*

19. **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. Порівняльна характеристика генетичної стабільності культур клітин жирової тканини та кісткового мозку щурів на ранніх пасажах. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2017. Т. 19. № 73. С. 95–100. *(Здобувачем досліджено та порівняно генетичну стабільність культур клітин жирової тканини та кісткового мозку).*

20. Ковпак В. В. Вплив трансплантації культур клітин на перебіг експериментального цукрового діабету у тварин. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2017. Т. 19. № 78. С. 41–47.

21. **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. До методики отримання культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини котів. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2017. № 2. С. 56–61. *(Здобувачем досліджено різні методи отримання культури клітин жирової тканини котів та підготовлено статтю до друку).*

22. **Ковпак В. В.**, Борисевич Б. В., Харкевич Ю. О. Мікроскопічні зміни в печінці, серці і нирках щурів за алоксанового цукрового діабету. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2018. Т. 20. № 88.

С. 56–62. *(Здобувачем досліджено морфологічні зміни в органах за експериментального цукрового діабету).*

23. **Ковпак В. В.**, Харкевич Ю. О. До методики отримання стовбурових клітин з жирової тканини щура. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2018. № 11 (43). С. 20–23. *(Здобувачем досліджено різні методи отримання культури клітин жирової тканини щурів).*

#### **Статті у наукових виданнях інших держав:**

24. Мазуркевич А. Й., **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. Вплив трансплантації культур клітин відновлення ендокринної частини підшлункової залози за експериментального цукрового діабету. Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences. 2018. Vol. VI (17). Issue 157. P. 88–91. *(Здобувачем проведено гістологічні дослідження підшлункової залози та здійснено аналіз результатів).*

25. Mazurkevych A., Malyuk M., **Kovpak V.**, Kovpak O., Khrkevych Y., Jakubczak A., Gryzinska M. Comparative analysis of cat bone marrow and adipose tissue cell cultures. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2018. Vol. 21. № 3. P. 549–557. *(Здобувачем порівняно культури клітин кісткового мозку та жирової тканини kota).*

#### **Статті в інших наукових виданнях України,**

##### **включених до міжнародних наукометричних баз даних:**

26. **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С. Цитогенетичний аналіз культури клітин підшлункової залози щурів на ранніх пасажах. Клітинна та органна трансплантологія. 2016. Т. 4. № 1. С. 62–65. *(Здобувачем досліджено генетичну стабільність культури клітин підшлункової залози у процесі культивування).*

27. **Ковпак В. В.**, Харкевич Ю. О. Імунний статус щурів за цукрового діабету при застосуванні заміщуючої клітинної терапії. Вісник аграрної науки Причорномор'я. 2016. № 2 (89). Ч. 1. С. 164–172. *(Здобувачем досліджено імунний статус щурів за трансплантації культур клітин та підготовлено статтю до друку).*

#### **Патенти на корисну модель:**

28. **Ковпак В. В.**, Ковпак О. С., Мазуркевич А. Й., Харкевич Ю. О. Патент України на корисну модель № 118933 МПК А61К35/44 (2015.01). Спосіб отримання культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини котів: заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України; № u 201704458; заявлено 05.05.2017; опубліковано 28.08.2017; Бюл. № 16. 4 с. *(Здобувачем порівняно різні методи дезагрегації жирової тканини котів).*

29. Мазуркевич А. Й., **Ковпак В. В.**, Харкевич Ю. О. Патент України на корисну модель № 102631 МПК (2015.01) А61К35/00 А61К35/44 (2015.01) С12N5/07 (2010.01). Спосіб отримання епітеліальних клітин підшлункової залози: заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і

природокористування України; № u 201504423; заявлено 06.05.15; опубліковано 10.11.2015; Бюл. № 21. 4 с. (*Здобувачем порівняно проліферативну активність клітин підшлункової залози залежно від способу дезагрегації тканини*).

### Методичні рекомендації

30. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Данілов В. Б., Стародуб Л. В., **Ковпак В. В.**, Кладницька Л. В., Харкевич Ю. О., Бобось О. Л., Кляп Н. І., Бокотько Р. Р., Савчук Т. Л., Ковпак О. С. Методи видоспецефічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній терапії: [методичні рекомендації]. К., 2017. 64 с. (*Розглянуто та затверджено Вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 5 від 27.12.2017 р. Здобувачем підготовлено розділ «Стимулюючий вплив трансплантації стовбурових клітин на відновлювальні процеси в організмі тварин за експериментального цукрового діабету у тварин»*).

### АНОТАЦІЯ

**Ковпак В. В. Порівняльна характеристика стовбурових клітин та ефективність їх застосування за експериментального цукрового діабету у тварин.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ. 2019.

У дисертації висвітлено актуальне у ветеринарній медицині питання – експериментальне вирішення наукової проблеми впливу стовбурових клітин, отриманих з кісткового мозку, підшлункової залози та жирової тканини, на перебіг експериментально сформованого алоксанового цукрового діабету у щурів та котів. Представлено імунофенотипову та генетичну характеристики вищезазначених стовбурових клітин у процесі їх культивування залежно від видової належності.

Запропоновано оптимізовані технології виділення стовбурових клітин із жирової тканини та підшлункової залози котів і щурів, оптимізовані умови їх культивування та зберігання. Здійснено морфологічну та функціональну оцінки вищезазначених культур в умовах *in vitro* та наведено їх характеристику.

За результатами проведених досліджень встановлено, що введення культур стовбурових клітин підшлункової залози, жирової тканини та кісткового мозку за експериментально сформованого цукрового діабету достовірно сприяє зниженню рівня глюкози у крові тварин-реципієнтів. За трансплантації культури стовбурових клітин підшлункової залози відмічали збільшення загального об'єму острівців Лангерганса, насамперед, завдяки неогенезу острівців, а також спостерігали прискорення регенерації клітин у раніше сформованій острівковій тканині. Введення культури стовбурових клітин кісткового мозку призводить до збільшення загального об'єму острівців Лангерганса більшою мірою через

регенерацию шляхом посилення проліферативної активності клітин острівців. Трансплантація стовбурових клітин культури жирової тканини стимулювала неогенез острівців Лангерганса у підшлунковій залозі. Ефективність стовбурових клітин жирової тканини була найнижчою, порівнюючи з культурами червоного кісткового мозку та підшлункової залози.

**Ключові слова:** стовбурові клітини, підшлункова залоза, цукровий діабет, коти, щурі.

## АННОТАЦИЯ

**Ковпак В. В. Сравнительная характеристика стволовых клеток и эффективность их использования при экспериментальном сахарном диабете.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 16.00.02 «Патология, онкология и морфология животных». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев. 2019.

В диссертации освещен актуальный в ветеринарной медицине вопрос – экспериментальное решение научной проблемы влияния стволовых клеток, полученных из костного мозга, поджелудочной железы и жировой ткани, на ход экспериментально сформированного аллоксанового сахарного диабета у крыс и кошек. Представлены иммунофенотипическая и генетическая характеристики таких стволовых клеток в процессе их культивирования в зависимости от видовой принадлежности.

Представлены оптимизированные технологии выделения стволовых клеток из жировой ткани и поджелудочной железы кошек и крыс, оптимизированы условия их культивирования и хранения. Проведены морфологическая и функциональная оценки вышеуказанных культур в условиях *in vitro* и дана их характеристика.

По результатам проведенных исследований установлено, что введение культур стволовых клеток поджелудочной железы, жировой ткани и костного мозга при экспериментально сформированном сахарном диабете достоверно способствует снижению уровня глюкозы в крови животных-реципиентов. При трансплантации культуры стволовых клеток поджелудочной железы отмечали увеличение общего объема островков Лангерганса, в первую очередь, за счет неогенеза островков, а также наблюдали ускорение регенерации клеток в ранее образованной островковой ткани. Введение культуры стволовых клеток костного мозга приводит к увеличению общего объема островков Лангерганса в большей степени за счет регенерации путем усиления пролиферативной активности клеток островков. Трансплантация стволовых клеток культуры жировой ткани стимулировала неогенез островков Лангерганса в поджелудочной железе. Эффективность стволовых клеток жировой ткани была самой низкой, по сравнению с культурами красного костного мозга и поджелудочной железы.

**Ключевые слова:** стволовые клетки, поджелудочная железа, сахарный диабет, коты, крысы.

## ANNOTATION

**Kovpak V. V. Comparative Characteristics of Stem Cells and their Effectiveness in Experimental Diabetes Mellitus in Animals.** – The Manuscript.

The thesis for awarding a scientific degree of doctor of veterinary sciences in specialty 16.00.02 «Pathology, Oncology and Morphology of Animals». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv. 2019.

The thesis deals with the current issues in veterinary medicine, in particular the experimental solution of the scientific issue of the influence of bone marrow stem cells, pancreas stem cells and adipose tissue stem cells, upon the development of alloxan diabetes in rats and cats. There have been presented immunophenotypic and genetic characteristics of the abovementioned stem cells in culture in the course of their cultivation, depending on species.

There have been presented the optimized technologies for the isolation of stem cells from adipose tissue and pancreas of cats and rats. There have been optimized the conditions for their cultivation and storage. The abovementioned cultures have been heterogeneous characterized and assessed in terms of morphology and functioning *in vitro*.

According to the results of the study, it has been found that the adipose tissue disaggregation using 2 mg/ml collagenase (type II) and 4 % bovine serum albumin for a rat, and 1 mg/cm<sup>3</sup> collagenase (type II), 5 mg/cm<sup>3</sup> hyaluronidase and 4 % bovine serum albumin for a cat, is the best practice for obtaining the stem cells culture.

A cryogenic environment containing 90 % fetal bovine serum and 10 % dimethylsulfoxide – making it possible to keep cells viability within 86.3 % – is the best way to preserve the stem cells culture of the bone marrow of a rat using a slow freezing method. A cryogenic environment containing 95 % fetal bovine serum and 5 % dimethylsulfoxide is the best for preservation of the bone marrow stem cells of a cat, as supported by the data obtained after defrosting: cells viability was 65 %.

In the course of determination of the best medium for the cultivation of cultures of the bone marrow stem cells, it has been found that the use of Eagle's medium, modified Dulbecco F12 (D8437) with the addition of 20 % fetal bovine serum and an antibiotic-antimycotic in the amount of 10 µl/cm<sup>3</sup> medium provides the highest proliferation index of cells of a rat. It turned that Eagle's medium, modified Dulbecco (D5648) with the addition of 20 % fetal bovine serum and an antibiotic-antimycotic 10 µl/cm<sup>3</sup> was the best for the cultivation of the bone marrow stem cells of a cat.

Also – using a method of immunocytochemical detection of membrane proteins peculiar for the cells with a low differentiation degree – there has been studied the stem cell cultures phenotype derived from different sources. There has been discovered that the culture of bone marrow cells contains cells expressing markers peculiar for hemopoietic (CD34, CD45, CD48), epithelial (CD66e, CD326, pankeratin) and mesenchymal stem (CD56 and CD66e) cells. The culture of adipose tissue cells consists of cells expressing markers peculiar for hemopoietic (CD34, CD45, CD48), epithelial (CD66e, CD326, pankeratin), mesenchymal stem cells (CD56 and CD66e), and preadipocytes (CD54). The expression of markers peculiar for hematopoietic cells decreases with passages, meaning lower percentage of these cells in the culture. In the

adipose cells culture of a cat, starting from the passage III, the expression of markers peculiar for targeted adipogenic differentiation of cells tends to increase. The study has found out that the pancreas cells culture expresses the smallest spectrum of the CD-markers being studied. The markers of the pancreas cells culture are negative that are peculiar for hematopoietic cells, however the expression of markers peculiar for epithelial cells is well-defined.

In the course of the study there has been evaluated the karyotype stability of culture cells derived from different sources during the *in vitro* cultivation under the cytogenetic control. It has been discovered that the cells cultivated *in vitro* tend to have genetic errors occurring in the form of aneuploidy and polyploidy. There has been tracked the correlation between the peaks of the number of aneuploid cells and the CD95 expression. In the course of cultivation, the variability of karyotype of the stem cells derived from the bone marrow, adipose tissue and pancreas of rats and cats, does not go beyond the spontaneous level of mammals.

The results of the study have showed that introduction of the culture of stem cells of the pancreas, adipose tissue and bone marrow against the background of alloxan diabetes significantly decreases the glucose levels in the blood of recipient animals. In the case of transplantation of the pancreas stem cells culture, there has been observed an increase of islets of Langerhans, mainly due to neogenesis of islets. Also there has been observed the improved regeneration of cells in previously formed islet tissue. The introduction of the culture of bone marrow stem cells significantly increases the total amount of islets of Langerhans thanks to regeneration, by boosting the islet cells proliferative activity. Transplantation of the cultures of adipose tissue stem cells tends to stimulate neogenesis of islets of Langerhans in the pancreas. The adipose tissue stem cells showed the lowest effectiveness in the course of the study.

**Key words:** stem cells, pancreas, diabetes mellitus, cats, rats.

Підписано до друку 03.06.19  
Ум. друк. арк. 1,9  
Наклад 100 прим.

Формат 60x84\16  
Обл.-вид.арк. 1,9  
Зам. № 190493

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України  
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041  
тел.: 527-81-55





