

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

МАЛЮК МИКОЛА ОЛЕКСІЙОВИЧ

УДК 602.9:611.018:606:619

**ВЛАСТИВОСТІ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТА
НАУКОВО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЇХ
ЗАСТОСУВАННЯ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ**

16.00.02 – патологія, онкологія і морфологія тварин

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора ветеринарних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

Науковий консультант доктор ветеринарних наук, професор,
член-кореспондент НААН,
заслужений діяч науки і техніки України
Мазуркевич Анатолій Йосипович,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
професор кафедри фізіології, патофізіології
та імунології тварин

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор
Горальський Леонід Петрович,
Житомирський національний
агроєкологічний університет,
завідувач кафедри анатомії і гістології

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

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

Захист відбудеться «15» червня 2016 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Генерала Родимцева, 19, навчальний корпус № 1, кімната 97

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

Автореферат розісланий « » травня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Грушанська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Перспективи успішного використання у ветеринарній медицині клітинно-регенеративної терапії в значній мірі залежать від результатів ґрунтовного вивчення властивостей стовбурових клітин тварин, способів отримання, культивування, зберігання та застосування їх з лікувальною метою.

Незважаючи на чисельні публікації щодо властивостей стовбурових клітин у світі, досліджень з цього питання у ветеринарній медицині України обмаль (Ковпак В. В., 2010; Харкевич Ю. О., 2012; Журба В. І., 2013; Золтан Н. І., 2013; Бобось О. Л., 2013), а публікації щодо застосування стовбурових клітин у вітчизняній клінічній ветеринарній практиці взагалі відсутні. Разом з тим, вирішення цього питання можливе за умови проведення фундаментальних наукових досліджень, що спонукатиме до нових розробок у сфері клітинних технологій та їх впровадження у клінічну практику.

Важливими напрямками дослідження стовбурових клітин є вивчення біологічної активності, цитогенетичної стабільності під час культивування *in vitro* з метою попередження онкологічних процесів *in vivo*, а також реакції організму тварини-реципієнта на введений клітинний матеріал (Bernardo M., 2007; Бочков Н. П., 2007; Sun L., 2009; Омельченко Е. А., 2011).

Патологія апарату руху в тварин становить основну частину всіх випадків у ветеринарній клінічній практиці, за яких інтенсивно впроваджуються методи клітинно-регенеративної терапії. Чільне місце в патології апарату руху тварин займають дегенеративні ушкодження сухожилків. Експериментальними дослідженнями різних авторів доведено, що використання клітинно-регенеративної терапії у тварин за тендинітів стимулює регенеративні процеси (Richardson L., 2007; Schnabel L., 2009; Leppänen M., 2009; Alves A., 2011; Блонський Р. І., 2011). Незважаючи на чисельні публікації з цього приводу, доцільність використання алогенного клітинного матеріалу в доступній літературі не розкрито.

Для отримання стовбурових клітин найчастіше використовують кістковий мозок і жирову тканину. Водночас, науковці в якості альтернативного джерела стовбурових клітин використовують позазародкові органи, зокрема, пупковий канатик. Переваги отримання стовбурових клітин із пупкового канатику полягають у тому, що їх отримують без додаткового хірургічного втручання і етичних обмежень (Karahuseyinoglu S., 2007; Zucconi E., 2010; Lange-Consiglio A., 2011, Маслова О. В., 2014). Проте, існує необхідність удосконалення методичних підходів щодо більш ефективного виділення стовбурових клітин із пупкового канатику тварин (собаки, коні).

Отже, дослідження властивостей стовбурових клітин тварин та їх використання за експериментального ушкодження сухожилка є досить актуальними і такими, які сприятимуть розробленню науково обґрунтованих і ефективних методів клітинної терапії у вітчизняній ветеринарній медицині.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота, як підрозділ наукової тематики, виконувалась у проблемній науково-дослідній лабораторії фізіології та експериментальної патології тварин кафедри фізіології, патофізіології та імунології тварин Національного університету

біоресурсів і природокористування України в різні роки за темами: «Вивчити властивості стовбурових клітин тваринного походження в процесі їх отримання, культивування і застосування у ветеринарній медицині» (номер державної реєстрації 0106U003304, 2006–2010 рр.); «Вивчити вплив мезенхімальних та ембріональних клітин на характер репаративних процесів в патологічно змінених тканинах тваринного організму» (номер державної реєстрації 0108U001671, 2008–2012 рр.); «Вивчення морфо-функціональних характеристик патологічно змінених тканин у тварин-реципієнтів при застосуванні стовбурових клітин» (номер державної реєстрації 0111U003428, 2011–2015 рр.); «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 і задачі дослідження. Метою дисертаційної роботи було дослідити властивості стовбурових клітин тварин (морфологічну та імунофенотипову характеристики, імуномодулюючі властивості, стабільність каріотипу) залежно від їх видової належності, способу отримання, культивування *in vitro*, а також їх вплив на перебіг репаративних процесів *in vivo* в експериментально ушкодженому сухожилку кролів.

Для досягнення мети роботи було поставлено наступні задачі:

- вдосконалити існуючі методи виділення мезенхімальних стовбурових клітин із червоного кісткового мозку тварин різних видів;
- дослідити біологічну активність мультипотентних стовбурових клітин коня залежно від способу отримання моноклеарних клітин із аспірату червоного кісткового мозку;
- дослідити активність процесів клонування первинних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів за різних умов зберігання;
- оптимізувати технологію отримання мезенхімальних стовбурових клітин із пупкового канатика цуценят і лошат;
- вивчити клоногенну активність первинної культури фібробластоподібних клітин пупкового канатика лошат залежно від способу їх виділення;
- провести імуноцитохімічну детекцію ядерних білків, пов'язаних із проліферацією і клітинним циклом, білків клітинної адгезії та цитоскелету мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих із кісткового мозку і пупкового канатика тварин різних видів;
- дослідити особливості остеогенної і адипогенної диференціації мезенхімальних стовбурових клітин собак;
- за змінами імунологічних показників вивчити характер відповіді організму тварин-реципієнтів на системне введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин;
- за показниками цитогенетичного контролю мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів, собак, коней і пупкового канатика лошат виявити ступінь порушення каріотипової стабільності в процесі культивування *in vitro*;
- вивчити біосумісність гемостатичних губок із стовбуровими клітинами кісткового мозку кроля під час культивування *in vitro*;
- дослідити перебіг та активність репаративних процесів у експериментально

ушкодженому загальному п'ятковому сухожилку кролів після введення культури недиференційованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин.

Об'єкт дослідження – властивості мезенхімальних стовбурових клітин щурів, кролів, собак і коней, регенеративні процеси в експериментально ушкодженому сухожилку тварин-реципієнтів.

Предмет дослідження – показники біологічної активності та каріотипової стабільності стовбурових клітин тварин (щурі, кролі, собаки, коні), залежно від джерел їх отримання, методів виділення і культивування; характер відновлювальних процесів в експериментально ушкодженому сухожилку та реакції цілісного організму тварини-реципієнта за впливу стовбурових клітин.

Методи дослідження: біотехнологічні (культивування клітин); імуноцитохімічні (імунофенотипова характеристика клітин); цитогенетичні (аналіз каріотипу клітин кісткового мозку і пупкового канатика тварин, що культивуються); імунологічні (визначення кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій, дослідження цитолітичної активності сироватки крові); гістологічні (мікроскопічні дослідження); хірургічні (аспірація червоного кісткового мозку, отримання пупкового канатика); статистичні (опрацювання цифрових показників результатів досліджень).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджено біологічну активність мезенхімальних стовбурових клітин коня залежно від способу отримання моноклеарних клітин із аспірату червоного кісткового мозку. Проведено оптимізацію технології виділення мезенхімальних клітин із пупкового канатика цуценят і лошат: встановлено, що за допомогою механічної дезагрегації тканин пупкового канатика цуценят вдається отримати фібробластоподібні клітини з високими адгезивними та проліферативними властивостями; для пупкового канатика лошат оптимальними умовами отримання фібробластоподібних клітин є метод ферментативної дезагрегації (36-годинна холодна трипсинізація).

На основі імуноцитохімічних досліджень доведено, що мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку щурів, кролів, собак, коней і пупкового канатика лошат на ранніх пасажах культивування експресують маркери мезенхімальних (віментин, актин), м'язових, епітеліальних і нервових (Е-кадгерин, N-кадгерин) клітин з домінуванням маркерів мезенхімального походження.

За допомогою цитогенетичного аналізу вперше встановлено, що використання хелатуючої дисоціації клітинного матеріалу культури мезенхімальних стовбурових клітин кролів на ранніх пасажах культивування має переваги над застосуванням ферментативного методу дисоціації, оскільки дає можливість отримати культуру клітин із меншими кількісними змінами хромосомного апарату. Показано, що під час культивування *in vitro* культури мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів, собак і пупкового канатика лошат із збільшенням числа пасажів (від I до VII), збільшується кількість клітин із зміненним каріотипом.

Вперше досліджено, що у кістковому мозку кролів існує резистентна фракція стовбурових клітин, яка здатна до активного клонування після 48 годин зберігання клітинної маси за температури 4 °С.

Доведено позитивний вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку на перебіг репаративних процесів в експериментально ушкодженому загальному п'ятковому сухожилку кролів.

Наукова новизна отриманих результатів підтверджена патентами на корисну модель: № 40805 від 27.04.2009 р. «Спосіб прижиттєвого отримання стромальних стовбурових клітин кісткового мозку тварин»; № 46600 від 25.12.2009 р. «Спосіб отримання фракції моонуклеарних клітин кісткового мозку кролів із високою проліферативною активністю»; № 50905 від 25.06.2010 р. «Спосіб отримання фракції моонуклеарних клітин кісткового мозку собак із високою проліферативною активністю»; № 95207 від 10.12.2014 р. «Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин із пупкового канатику коней»; № 93756 від 10.10.2014 р. «Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин із пупкового канатику собак»; № 86839 від 10.01.2014 р. «Спосіб прижиттєвого отримання кісткового мозку у дрібних тварин»; № 89267 від 10.04.2014 р. «Спосіб отримання фракції моонуклеарних клітин кісткового мозку коней із високою проліферативною активністю».

Практичне значення одержаних результатів. Результати експериментальних досліджень можуть бути використані у клінічній практиці для лікування коней та дрібних тварин із патологією апарату руху різного генезу в умовах кінних заводів та клінік ветеринарної медицини.

Перехресно-реагуючі антигени мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку тварин різних видів і пупкового канатика лоша дозволяють використовувати моноклональні антитіла одного клону гібридомних клітин для виявлення експресії специфічних маркерів. Зв'язок цитогенетичних порушень (поліплоїдія, анеуплоїдія) та зміни мікроядерного тесту залежно від кількості пасажів культивування *in vitro* мезенхімальних стовбурових клітин тваринного походження має важливе значення в оцінці безпеки культури клітин перед їх застосуванням із лікувальною метою. Виявлено, що порушення цитогенетичного апарату культивованих клітин залежить від різних методів дисоціації клітинного матеріалу. Вивчена ефективність клонування первинних мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин кролів за різних умов зберігання аспірату кісткового мозку. Доведено вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку тварин на відновлення експериментально ушкодженого загального п'яткового сухожилка кролів.

Отримані результати можуть бути використані в подальших наукових дослідженнях властивостей мезенхімальних стовбурових клітин тварин залежно від їх видового походження та джерел отримання.

Результати досліджень увійшли до науково-методичних рекомендацій: «Отримання, культивування, кріоконсервування та використання стовбурових клітин тваринного організму» (*затверджено науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України, протокол № 1 від 23.12.2010 р.*) та «Використання мезенхімальних стовбурових клітин для корекції репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів» (*затверджено науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 21.12.2012 р.*).

Матеріали дисертаційної роботи використано під час написання: монографії «Стовбурові клітини у ветеринарній медицині», том 1 (*затверджено Вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України (НУБіП України) від 19.11.2013 р., протокол № 3*); підручника «Патологічна фізіологія і

патологічна анатомія тварин» (затверджено Міністерством аграрної політики України, як підручник для підготовки фахівців у аграрних вищих навчальних закладах I–II рівнів акредитації із спеціальності 5.110101 від 17.08.2008 р. № 18-94-128/442); підручника «Патофізіологія тварин» з грифом Міністерства освіти і науки України, як підручник для студентів вищих навчальних закладів, які навчаються за напрямом підготовки «Ветеринарна медицина» (від 13.11.2013 р. № 1/11-17384); посібника «Ветеринарна імунологія» з грифом Міністерства освіти і науки України, як навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів, які навчаються за спеціальністю «Ветеринарна медицина» (від 06.05.2014 р. № 1/11-6618); навчального посібника «Клітинні технології у ветеринарній медицині», призначеного для студентів спеціальності «Ветеринарна медицина» вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації (випущено на підставі рішення Вченої ради НУБіП України від 24.12.2014 р., протокол № 6).

Результати досліджень використовуються в навчальному процесі кафедр вищих навчальних закладів України: фізіології, патофізіології та імунології тварин НУБіП України; гістології, цитології та ембріології НУБіП України; нормальної та патологічної фізіології ім. С. В. Стояновського Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького; нормальної та патологічної фізіології сільськогосподарських тварин Білоцерківського національного аграрного університету; анатомії, нормальної та патологічної фізіології Сумського національного аграрного університету; нормальної та патологічної фізіології Харківської державної зооветеринарної академії; фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин Дніпропетровського державного аграрного університету; патологічної анатомії та патофізіології Полтавської державної аграрної академії, а також використовуються у науковій роботі лабораторії молекулярної та клінічної біохімії, імунології, екологічної фізіології та якості продукції Інституту біології тварин НААН.

Особистий внесок здобувача. Здобувач особисто здійснив пошук і аналіз літературних джерел за темою дисертаційної роботи, провів патентний пошук із проблеми, виконав увесь обсяг експериментальних досліджень, здійснив статистичну обробку цифрових показників, оформив ілюстративні матеріали та написав дисертацію; аналіз одержаних результатів і формулювання висновків проведено спільно з науковим консультантом.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи було апробовано в доповідях та обговорено на: IV Всеукраїнській конференції ветеринарних патологів із міжнародною участю (м. Львів, 2006 р.); Наукових конференціях професорсько-викладацького складу, наукових співробітників і аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва Національного аграрного університету (нині НУБіП України) (м. Київ, 2007–2011 рр.); Международной научной конференции по патофизиологии животных, посвященной 200-летию ветеринарного образования в России и 200-летию Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины (м. Санкт-Петербург, Російська Федерація, 2008 р.); V науково-практичній конференції Всеукраїнського товариства ветеринарних патологів (м. Суми, 2009 р.); Международной научной конференции по патофизиологии

животных, посвященной 90-летию кафедры патологической физиологии Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины (м. Санкт-Петербург, Російська Федерація, 2011 р.); II Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді у вирішенні актуальних проблем виробництва та переробки сировини, стандартизації і безпеки продовольства» (м. Київ, 2012 р.); VI Науково-практичній конференції Всеукраїнського товариства ветеринарних патологів (за міжнародної участі) «Розвиток досліджень та впроваджень у ветеринарній патології» (м. Київ, 2012 р.); II Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми наук про життя та природокористування» (м. Київ, 2013 р.); Міжнародній науковій конференції «Біоресурси планети та біобезпека навколишнього середовища: проблеми та перспективи», присвяченій 115-річчю НУБіП України та 15-річчю GCHERA (м. Київ, 2013 р.), V Міжнародній науково-практичній конференції «Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування» (м. Львів, 2013 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Транскордонні емерджентні інфекційні хвороби тварин: ризики, створення систем контролю та актуальні проблеми біологічної безпеки» (м. Одеса, 2014 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Інноваційність розвитку сучасного аграрного виробництва», присвяченій 230-річчю ветеринарної освіти і науки в Україні (м. Львів, 2014 р.); Міжнародній науковій конференції «Роль фізіології тварин у вирішенні сучасних проблем аграрної освіти, науки і виробництва» (м. Львів, 2014 р.); XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченому 90-річчю від дня народження академіка П. Г. Костюка (м. Львів, 2015 р.); XIV Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу та аспірантів «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва», присвяченій 95-річчю факультету ветеринарної медицини НУБіП України (м. Київ, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Природне агровиробництво в Україні: проблеми становлення, перспективи розвитку», секція «Екологічне тваринництво та рибництво» (м. Дніпропетровськ, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми продовольчої безпеки (екологічна та біологічна безпека, якість та безпечність продукції АПК)», присвяченій 100-річному ювілею від дня народження академіка І. М. Гладенка (м. Одеса, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Інновації у ветеринарну освіту і науку XXI століття», присвяченій 95-річчю заснування факультету ветеринарної медицини НУБіП України (м. Київ, 2015 р.).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 51 наукову працю, в тому числі монографію, 10 статей у наукових фахових виданнях України, 10 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті у науковому виданні України, включеному до міжнародної наукометричної бази даних, 3 статті у наукових виданнях інших держав, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті в інших наукових виданнях, 2 підручники, 2 навчальні посібники, 7 патентів на корисну модель, 2 методичні рекомендації та 10 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, 4 розділів, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел літератури і додатків. Дисертаційна робота викладена на 373 сторінках комп'ютерного тексту. Матеріали дисертації проілюстровано 4 схемами, 106 рисунками і 27 таблицями. Список джерел використаної літератури містить 504 посилань, з яких 391 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ВИБІР НАПРЯМКІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження за темою дисертаційної роботи проведено впродовж 2006–2016 рр. в умовах проблемної науково-дослідної лабораторії фізіології та експериментальної патології тварин кафедри фізіології, патофізіології та імунології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Окремі фрагменти досліджень виконано на базі лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин НААН та відділі експериментальних клітинних систем Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, а також у Деркулівському кінному заводі Луганської області державного підприємства «Конярство України», кінному заводі «Міленіум» Донецької області, державній установі «Центр охорони здоров'я тварин у м. Києві» – клініці ветеринарної медицини Святошинського району м. Києва.

В досліджах використовувались клінічно здорові тварини: білі безпородні щури масою тіла 200–250 г, віком 4–5 місяців; кролі породи шиншила масою тіла 2,5–3,0 кг, віком 4–5 місяців; безпородні собаки масою тіла 13–15 кг, віком 9–12 місяців; коні чистокровної верхової породи масою тіла 250–400 кг, віком 9 місяців – 2 роки.

Раціон дослідних тварин відповідав потребі в поживних і біологічно активних речовинах. Тварини мали вільний доступ до води.

Експерименти на тваринах проведено з дотриманням вимог «Загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах», схвалених І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2004 р.) та положень «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986 р.), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Відомості ВР, 2010 р.).

Виділення мезенхімальних стовбурових клітин із кісткового мозку тварин проводили шляхом розділення аспірату червоного кісткового мозку донорів у градієнті щільності фікол-тріомасту. Отримані клітини ресуспендували в культуральному середовищі, висівали у чашки Петрі ($d=30, 60$ мм), а також пластикові флакони площею 25 см^2 (Corning, США) в концентрації 3×10^5 кл/см² і культивували до досягнення 80 % конфлюентності моношару із зміною поживного середовища кожні три доби.

Виділення мезенхімальних стовбурових клітин із пупкового канатика цуценят проводили із тканин пупкового канатика, який отримували в процесі планового кесаревого розтину в сук на 59–63 добу щенності. Пупковий канатик промивали фосфатно-буферним розчином (ФБР), відпрепарували артерії і вени та

подрібнювали за допомогою хірургічних ножиць на фрагменти розміром 2–3 мм з дотриманням умов асептики і антисептики, після чого піддавали механічній обробці за допомогою магнітного електрозмішувача (М-5, Україна) протягом 10–15 хв за кімнатної температури. Отриману клітинну суспензію фільтрували через стерильний марлевий фільтр, центрифугували, осад клітин ресуспендували в поживному середовищі. Отриману суспензію клітинної маси висівали у культуральні чашки Петрі в концентрації 3×10^5 кл/см² і культивували до отримання моношару 80 % конфлюентності.

Виділення мезенхімальних стовбурових клітин із пупкового канатика лошат проводили із тканин пупкового канатика, який отримували під час родів на 330–350 добу жеребності. При цьому на пупковий канатик накладали лігатури і здійснювали його резекцію за допомогою хірургічних ножиць.

Пупковий канатик промивали ФБР, видаляли артерії і вени та подрібнювали за допомогою хірургічних ножиць на фрагменти розміром 3–5 мм з дотриманням умов асептики і антисептики. Подрібнену тканину переносили у 0,25 % розчин трипсину за температури 4 °С із експозицією 24 і 36 год. Після ферментативної дезагрегації фрагментів пупкового канатика отриману клітинну суспензію фільтрували через 4 шари стерильного марлевого фільтру, центрифугували за відцентрової сили 300 g впродовж 5 хв, осад клітин ресуспендували в поживному середовищі та висівали у культуральні чашки Петрі в концентрації 3×10^5 кл/см² і культивували до отримання моношару 80 % конфлюентності.

Культивування клітин кісткового мозку тварин різних видів та пупкового канатика лошат і цуценят проводили за стандартною методикою в культуральних чашках Петрі та CO₂-інкубаторі (t 37 °С, 5 % CO₂). Склад поживного середовища: 80 % – DMEM, 20 % – ембріональна сироватка теляти з додаванням 10 мкл/см³ середовища антибіотика-антимікотика. Заміну середовища проводили через кожні 3 доби. За досягнення моношару 80 % конфлюентності клітини переводили в суспензію, використовуючи 0,25/0,02 % розчин трипсину/ЕДТА і розсівали у співвідношенні 1:2 з розрахунку 5×10^4 кл/см² дна культуральної чашки.

Імуноцитохімічну детекцію ядерних білків та білків клітинної адгезії і цитоскелету проводили за допомогою імуноцитохімічного аналізу. Досліджувані клітини вирощували на покривних скельцях протягом 48–72 год. За умови 50–70 % моношару клітини фіксували у розчині (метанол + ацетон – 1:1) протягом 2 год за температури -20 °С, інкубували з 1 % розчином бичачого сироваткового альбуміну (BSA) та наносили моноклональні антитіла (МКАт) (anti: PCNA (clone PC-10, NeoMarkers), Ki-67 (clone RB-9043-PO, Neomarkers), CD44 (clone 156-3C11, DiagnosticBioSystems), PanMuscleActin (clone 1a45C5, DiagnosticBioSystems), E-cadherin (clone SPM 471, ThermoScientific), N-cadherin (clone CD 325, ThermoScientific), віментин (V9, DiagnosticBioSystems), CD24 (SN3b, NeoMarkers), на 30–60 хв (згідно з інструкцією до антитіла), після чого застосовували систему візуалізації PolyVue (ThermoScientific), кон'юговану з пероксидазою та виявляли активність ферменту із застосуванням в якості субстрату діамінобензидину (ThermoScientific). Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивали водою та дофарбовували Hematoxylin Solution according to Mayer (Sigma) (15–30 с), після чого препарати заключали у Faramount Aqueous Mounting Medium.

Аналіз результатів проводили за кількістю клітин з експресією (коричневе забарвлення клітин) та оцінювали за допомогою класичного методу H-Score: $S=1xA + 2xB + 3xC$, де S – показник «H-Score», значення якого знаходяться у межах від 0 (антиген не виявляється) до 300 (сильна експресія у 100 % клітин); A – відсоток слабо «зафарбованих» клітин; B – відсоток помірно «зафарбованих» клітин; C – відсоток сильно «зафарбованих» клітин за R. McClelland (1991).

Спрямована диференціація МСК в остеогенному і адипогенному напрямках. Мезенхімальні стовбурові клітини культивували в середовищі Ігла, модифікованому Дюльбекко (DMEM), доповненому 20 % ембріональної сироватки теляти (ЕСТ) та 10 мкл/см³ антибіотика-антимікотика. На третьому пасажі культивування, після заповнення дна культурального посуду клітинами на 60–80 % конфлюентності моношару, стандартне поживне середовище видаляли та замінювали на індукційне, у якому клітини культивували впродовж 2–3 тижнів. Для направленої диференціації мезенхімальних стовбурових клітин в остеогенному напрямі використовували культуральне середовище наступного складу: DMEM – 90 %, ЕСТ – 10 %, аскорбінова кислота – 50 мкг/мл поживного середовища, β-гліцерофосфат – 5 ммоль/мл поживного середовища, дексаметазон – 10⁻⁸ моль/мл поживного середовища, антибіотик-антимікотик – 10 мкмоль/мл поживного середовища; у адипогенному напрямі – DMEM – 90 %, ЕСТ – 10 %, дексаметазон – 10 мкмоль/мл поживного середовища, індометацин – 60 мкмоль/мл поживного середовища, 3-ізобутил-1-метилксантин – 500 мкмоль/мл поживного середовища, інсулін – 10 мкг/мл поживного середовища, антибіотик-антимікотик – 10 мкл/мл поживного середовища. Заміну індукційного середовища здійснювали кожні 3 доби.

Процес диференціювання клітин у остеогенному напрямі контролювали шляхом визначення у клітинах активності ендогенної лужної фосфатази за Карлов (1955), яка бере безпосередню участь в процесі остеогенезу, та відкладання солей Кальцію. Процес диференціювання клітин у адипогенному напрямі контролювали шляхом визначення у клітинах включень нейтрального жиру за фарбування ліпофільним барвником Oil Red O за J. Kilrnan (1990).

Визначення показників імунного статусу тварин-реципієнтів за системного (внутрішньовенного) введення чужорідних стовбурових клітин. Лімфоцити отримували шляхом центрифугування проб стабілізованої гепарином крові у фікол-тріомбрасовому градієнті щільності за A. Voum (1974). Кількість Т-лімфоцитів визначали методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана за M. Jondal (1972). Кількість В-лімфоцитів визначали методом розеткоутворення з еритроцитами барана за методикою, запропонованою С. Bianco (1970). Цитолітичну активність сироватки крові визначали за P. Gorero (1956).

Отримання препаратів для цитогенетичного аналізу і мікроядерного тесту. Цитогенетичний скринінг включав аналіз метафазних пластинок стовбурових клітин кролів, собак, коней I–VII пасажів. В цілому було проаналізовано 2310 метафазних пластинок тварин. У кожній культурі клітин – не менше 100 метафазних пластинок. При пасажуванні клітин одну культуральну чашки з культурою клітин використовували для отримання метафазних пластинок, а іншу – для субкультивування з метою безперервного аналізу каріотипу при наступних пасажах. Для отримання препаратів хромосом використовували модифікацію стандартного

цитогенетичного методу за Р. Moorhead (1960). У процесі досліджень враховували: кількісні порушення хромосом – анеуплоїдію (А), поліплоїдію (ПП) та структурні аберації – розриви хромосом (ХР) і хроматид (ХМ). На цих же препаратах проводили мікроядерний тест: підраховували кількість двоядерних (ДЯ) клітин, клітин із мікроядром (МЯ), мітотичний індекс (МІ), апоптозних клітин (АП). Частоту ДЯ, МЯ, МІ, АП вираховували на 1000 клітин (‰).

Дослідження показників клонування первинних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів за різних умов зберігання. Проведено три серії досліджень: у першій серії досліджень (*клітини кісткового мозку кролів контрольної групи*) клітини кісткового мозку кролів у перші 60 хв після отримання висівали у чашки Петрі; у другій серії досліджень (*клітини кісткового мозку кролів першої дослідної групи*) після відбору кістковий мозок розбавляли середовищем 199 у співвідношенні 1:2 та зберігали протягом 48 год за температури 4 °С у холодильнику, після чого його клітини висівали у чашки Петрі; у третій серії досліджень (*клітини кісткового мозку кролів другої дослідної групи*) після відбору кістковий мозок відразу переносили у холодильник та зберігали протягом 48 год за температури 4 °С, після чого його клітини висівали у чашки Петрі.

Дослідження біосумісності гемостатичних губок із стовбуровими клітинами кісткового мозку кроля під час культивування *in vitro*. Після отримання у процесі культивування відповідної кількості клітин, проводили їх культивування у присутності гемостатичної колагенової пластини (виробник: ВАТ Лужський завод «Белкозин», Російська Федерація) та гемостатичної желатинової губки «Геласпон» (виробник: Шовен анкерфарм ГмБХ, Федеративна Республіка Німеччина).

Гістологічне дослідження загального п'яткового сухожилка кролів. Контроль ефективності репаративних процесів у загальному п'ятковому (ахілловому) сухожилку кролів проводили в декілька етапів. Перший етап експериментального дослідження виконано на 8 кролях-самцях масою тіла 2,5–3,0 кг. Тваринам контрольної групи (4 кролі) у товщу загального п'яткового сухожилка на 2,5 см проксимальніше від місця кріплення до п'яткової кістки чотириразово з інтервалом у 7 діб за допомогою інсулінової голки вводили 0,25 мл ізотонічного розчину NaCl. Тваринам дослідної групи (4 кролі) для дегенеративно-дистрофічного ушкодження тканин сухожилка у товщу загального п'яткового сухожилка з таким же інтервалом вводили 0,25 мл дипроспану, що відповідає 1,6 мг бетаметазону дипропіонату. Через 7 діб після останнього введення препарату тварин вилучали із досліджу.

Другий етап експериментального дослідження виконано на 16 кролях-самцях масою тіла 2,5–3,0 кг, яким у товщу загального п'яткового сухожилка на 2,5 см проксимальніше від місця кріплення до п'яткової кістки вводили чотириразово за допомогою інсулінової голки 0,25 мл дипроспану. Через 7 діб після моделювання дегенеративно-дистрофічного ураження загального п'яткового сухожилка тваринам одноразово в товщу сухожилка, на 2,5 см проксимальніше від п'яткового горба вводили: кролям контрольної групи (8 тварин) – 0,5 мл ізотонічного розчину NaCl; кролям дослідної групи (8 тварин) – алогенні мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку в дозі $2,5 \times 10^6$ клітин. Загальний об'єм введеної суспензії МСК

становив 0,5 мл. Відбір проб тканин для гістологічних досліджень з метою вивчення впливу трансплантації аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин на перебіг репаративних процесів у загальному п'ятковому сухожилку кролів контрольної і дослідної груп проводили на 7 і 21 доби експерименту після місцевого введення аlogenного клітинного матеріалу. Отримували гістологічні зрізи товщиною 7–9 мкм, які забарвлювали гематоксиліном Караці та еозином, а також пікрофуксином за Ван Гізон.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Морфологічні особливості мезенхімальних стовбурових клітин в процесі культивування *in vitro*. Встановлено, що основна складність виділення МСК із червоного кісткового мозку пов'язана із присутністю в ньому декількох популяцій клітин, здатних адгезуватись до культурального пластику. Тому на 0 пасажі первинні культури клітин із кісткового мозку містили окремі колонії округлих клітин, які морфологічно відрізнялись від фібробластоподібних клітин. На I і послідуєчих пасажах культура містила фібробластоподібні клітини і була гомогенною (рис. 1, 2).

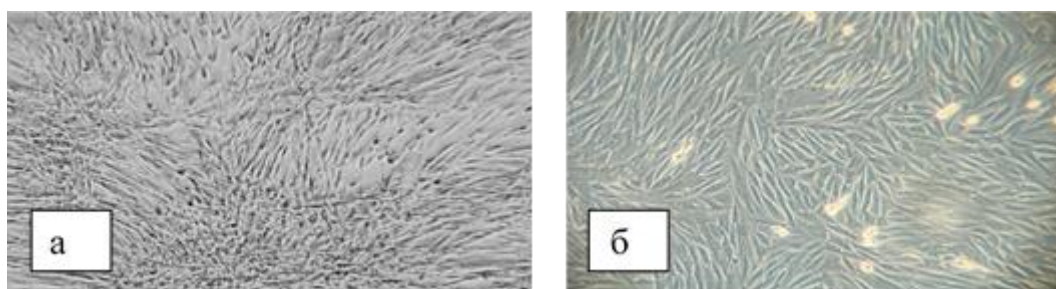


Рис. 1. Жива незабарвлена культура мезенхімальних клітин кісткового мозку собаки (а) і кроля (б) III пасажу із 90 % конфлюентністю моношару, $\times 100$

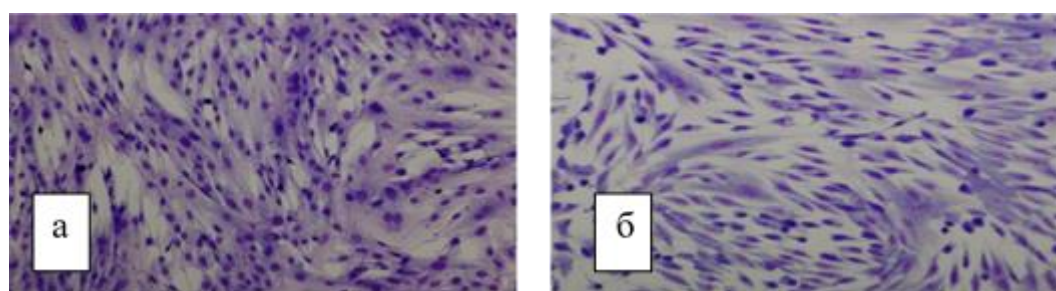


Рис. 2. Культура мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика лошат і кісткового мозку кроля на III пасажі. Фарбування за Паппенгеймом, $\times 200$

На відмінну від недиференційованих клітин кісткового мозку, морфологія фібробластоподібних клітин пупкового канатика лошат і цуценят була більш гетерогенною. Встановлено, що в період адаптації окремі культивовані клітини на 0 та I пасажах (рис. 3) мали витягнуту форму (чорна стрілка), в той час як інші були більш округлі (біла стрілка). На II і послідуєчих пасажах з досягненням конфлюентності моношару 70 % і більше, культивовані клітини характеризувались однорідною фібробластоподібною морфологією.

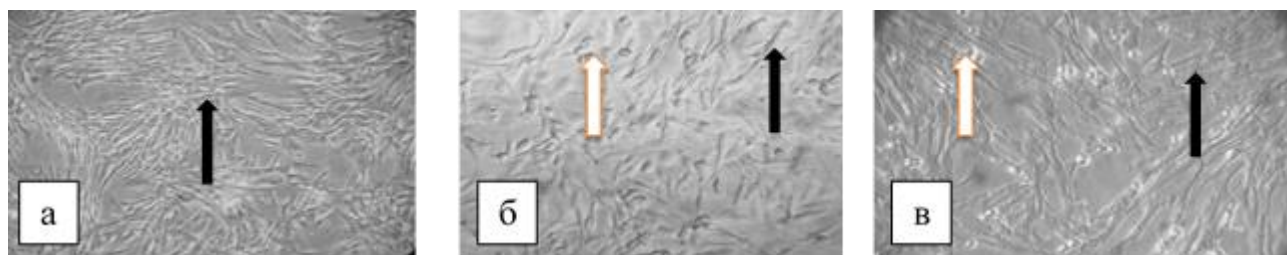


Рис. 3. Жива незабарвлена культура мезенхімальних стовбурових клітин тварин на 0 пасажі: а – кісткового мозку коня; б – пупкового канатика цуценят; в – пупкового канатика лошат (чорна стрілка – фібробластоподібні клітини; біла стрілка – округлі, очевидно, ендотеліальні клітини), $\times 100$.

Біологічна активність мезенхімальних стовбурових клітин коня залежно від способу їх отримання. Дані, наведені на рис. 4, свідчать, що отримання стовбурових клітин центрифугуванням суспензії клітин кісткового мозку коней у градієнті щільності фікол-тріомбразу $\rho=1,076$ за відцентрової сили 300 g є найбільш оптимальним, оскільки дає можливість отримувати популяції клітин з найвищою проліферативною активністю. На 11 добу культивування кількість отриманих у такий спосіб клітин, наділених адгезивними властивостями, становила 372185 тис, що достовірно більше, ніж у пробах, отриманих центрифугуванням у градієнті щільності $\rho=1,074$ за відцентрової сили 300 g, а також у інших. Показник експансії МСК становив близько 90 %, у той час як клітини контрольних зразків, отримані за центрифугування суспензії клітин кісткового мозку у градієнті щільності 1,074 за відцентрової сили 300 g, покривали дно культурального посуду лише на 45 %. У досліджах із виділення фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку в градієнті щільності фікол-тріомбразу $\rho=1,078$ за відцентрової сили 300 g експансія клітин становила близько 60 %.

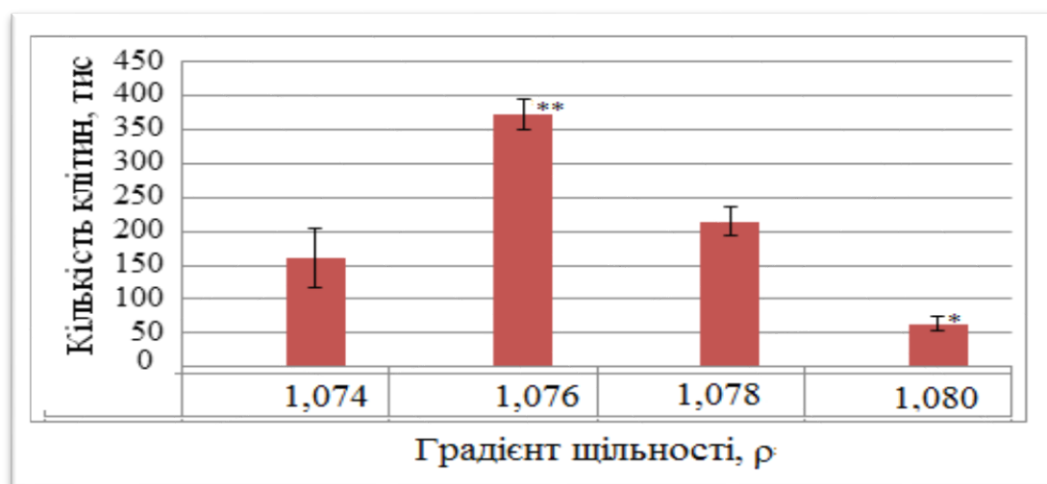


Рис. 4. Мітотична активність первинної культури мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня, виділених у градієнті щільності різної величини.

Примітка. * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$ порівняно з клітинами, отриманими центрифугуванням у градієнті щільності $\rho=1,074$ за відцентрової сили 300 g

Найнижчу вірогідну проліферативну активність мали клітини фракції мононуклеарів, отриманих у градієнті щільності $\rho=1,080$ за відцентрової сили 300 g. Експансія клітин становила менше 20 %.

Отримання мезенхімальних стовбурових клітин із альтернативних джерел тваринного організму. Під час експериментальних досліджень встановлено, що за допомогою механічної дезагрегації тканин пупкового канатика цуценят вдається отримати фібробластоподібні клітини з високими адгезивними та проліферативними властивостями. Також було встановлено, що оптимальними умовами для отримання фібробластоподібних клітин із високими адгезивними і клоногенними властивостями із пупкового канатика лошат є метод ферментативної дезагрегації (36-годинна холодна трипсинізація).

Імунофенотиповий профіль мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку щурів на різних пасажах *in vitro*. В таблиці 1 наведено дані щодо імунофенотипування некомітованих МСК КМ щура на I, II та V пасажах за показниками наявності у них ряду антигенів.

Таблиця 1

Імунофенотиповий профіль мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку щурів на різних пасажах (M±m, n=4)

Досліджуваний антиген	I пасаж	II пасаж	V пасаж
	Оцінка в балах за методом H-Score (від 0 до 300)		
Ядерні білки (асоційовані із проліферацією і клітинним циклом)			
PCNA	89,6±14,0	95,0±2,0	32,0±7,0**
Ki 67	62,4±8,5	60,4±4,0	23,4±1,4**
Білки клітинної адгезії і цитоскелету			
Віментин	180,6±22,5	168,0±14,5	194,0±28,5
Актин	90,4±13,2	60,4±2,1	84,8±12,2
Е-кадгерин	87,5±4,2	96,5±19,5	21,0±9,5**
N-кадгерин	86,0±12,4	89,0±7,0	42,8±4,2**
CD44	30,0±9,0	34,0±8,5	52,5±7,0

Примітка. ** – $p \leq 0,01$ порівняно із клітинами I пасажу

Встановлено, що кількість PCNA-позитивних клітин у культурі МСК щура на I та II пасажах достовірно вища, ніж на V, що свідчить про високу проліферативну активність МСК на перших пасажах. Відмічено тенденцію уповільнення процесів проліферації клітин за показником наявності антигена Ki-67.

Протягом усіх досліджуваних пасажів спостерігалась інтенсивна експресія віментину. У МСК щурів виявляли і актин-позитивні клітини, що також свідчить про їх мезенхімальну природу. При цьому спостерігався цікавий факт певної клональної специфічності: достовірно висока інтенсивність експресії актину в деяких клітинах популяції.

Кількість Е- та N-кадгерин-позитивних клітин на II пасажі мала тенденцію до збільшення, що свідчить про активацію міжклітинної взаємодії та стабільну експресію білків. Це характерно для епітеліальних, нервових і скелетних клітин дорослого організму і підтверджує гетерогенність некомітованих МСК щура II пасажу. Також виявлено достовірне зменшення кількості Е-кадгерин-позитивних клітин на V пасажі, що свідчить про селективне домінування клітин із мезенхімальними характеристиками над клітинами з епітеліальними характеристиками під час пасажування МСК.

Також виявлено невелику кількість CD44-позитивних клітин на перших пасажах МСК, яка мала тенденцію до підвищення експресії цього антигену на більш пізніх пасажах.

Імунофенотиповий профіль мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів під час культивування *in vitro*. В таблиці 2 наведено дані щодо імунофенотипування мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів на I, VII, XII, XVIII пасажах культивування. Встановлено, що на I, VII, XII пасажах кількість PCNA-позитивних клітин була стабільно високою, що свідчить про їх високу проліферативну активність, проте достовірно знижувалась на XVIII пасажі. При аналізі Ki-67-позитивних клітин, який також є маркером проліферуючих клітин, встановлено помірну експресію цього білка. Слід відмітити, що на VII пасажі рівень експресії Ki-67 у культивованих клітин достовірно збільшувався по відношенню до клітин I пасажу. Встановлено, що експресія Ki-67 мала тенденцію до зниження на XII пасажі і достовірно знижувалась на XVIII пасажі відносно I пасажу.

Таблиця 2

Імунофенотиповий профіль мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кроля на різних пасажах ($M \pm m$, $n=3$)

Дослідний антиген	Пасаж клітин із кісткового мозку кролів <i>in vitro</i>			
	I	VII	XII	XVIII
	Оцінка в балах за методом H-Score (від 0 до 300)			
Ядерні білки (асоційовані з проліферацією і клітинним циклом)				
PCNA	218,3±4,8	201±20	227±14	82±13***
Ki67	108±8,7	180±16**	89±11	18±5***
Білки клітинної адгезії і цитоскелету				
Віментин	238,3±18,4	300±0**	264±26	271±24
Актин	163±10	211±22	68±11***	246±19**
Е-кадгерин	162±12,6	120±10	136±11	132±19
Н-кадгерин	243±13,5	52±7***	76±4***	141±16**
CD44	247±10	72±13***	89±10***	19±4***

Примітка. ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ порівняно із клітинами I пасажу

Під час дослідження віментин-позитивних клітин кісткового мозку (рис. 5а), було встановлено достовірне збільшення максимальної кількості актин-позитивних клітин (300 балів) на VII пасажі. Також було встановлено стабільно високу експресію клітинами віментину на XII (264 бали) і XVIII (271 бал) пасажах із тенденцією до збільшення відносно I пасажу, що є підтвердженням домінування у культурі клітин власне мезенхімального походження.

Під час дослідження актин-позитивних клітин (рис. 5б) було відмічено, що рівень експресії цього білка в культурі клітин на VII пасажі мав тенденцію до збільшення порівняно із I пасажем. Також було встановлено, що рівень експресії

цього білка достовірно знижувався на XII пасажі та достовірно підвищувався на XVIII пасажі відносно I пасажу.

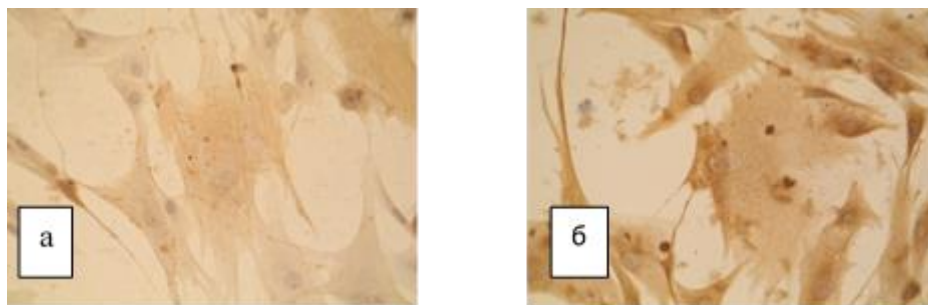


Рис. 5. Статус мезенхімальних маркерів у мезенхімальних стовбурових клітинах кісткового мозку кроля на VII пасажі: а – актин-позитивні клітини; б – віментин-позитивні клітини, $\times 400$.

Кількість E-і N-кадгерин-позитивних клітин достовірно зменшувалася в культурі МСК кісткового мозку кроля на VII пасажі, що свідчить про інактивацію міжклітинних взаємодій і зниження експресії білків, які характерні для епітеліальних, нервових і скелетних клітин дорослого організму. Разом з тим, кількість E-кадгерин-позитивних клітин в культурі МСК кісткового мозку кроля на XII і XVIII пасажах є стабільно помірною, що свідчить про присутність клітин з епітеліальними маркерами на пізніх пасажах.

У експериментах виявлено велику кількість CD44-позитивних клітин на I пасажі культивування МСК, із достовірним зниженням експресії цього антигену на більш пізніх пасажах.

Імунофенотиповий профіль мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собак за культивування *in vitro* на ранніх пасажах. В таблиці 3 наведено дані щодо імунофенотипування мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собаки на ранніх пасажах культивування.

Встановлено, що на I та II пасажах кількість PCNA-позитивних клітин суттєво не змінюється, що свідчить про високу проліферативну активність клітин. На I пасажі рівень експресії білка Ki-67 в культивуючих клітинах мав тенденцію до збільшення на 13 % відносно експресії Ki-67 у клітинах I пасажу. Очевидно, збільшення кількості Ki-67-позитивних клітин на II пасажі свідчить про адаптацію клітин до культурального середовища протягом II пасажу та активації їх проліферативної активності.

Було встановлено стабільно високу експресію віментину (рис. 6в) на ранніх пасажах, що є підтвердженням домінування в культурі клітин мезенхімального походження.

Під час дослідження актин-позитивних клітин (рис. 6г) було встановлено, що рівень експресії цього білка в культурі клітин мав стабільну середню експресію як на I, так і на II пасажах, що також свідчить про їх мезенхімальну природу.

Імунофенотиповий профіль мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собаки на ранніх пасажах (M±m, n=3)

Досліджу-ваний антиген	Пасаж клітин із кісткового мозку собаки <i>in vitro</i>	
	I	II
	Оцінка в балах за методом H-Score (від 0 до 300)	
Ядерні білки (асоційовані із проліферацією і клітинним циклом)		
PCNA	185±10,3	180±9,8
Ki 67	88±9,3	101±4,8
Білки клітинної адгезії та цитоскелету		
Віментин	225±5,8	221±9,6
Актин	175±8,7	170±5,8
Е-кадгерин	124±11	163±9,7
N-кадгерин	46±7	240±11,6***
CD44	101±14	230±8,7***

Примітка. *** – $p \leq 0,001$ порівняно з клітинами I пасажу

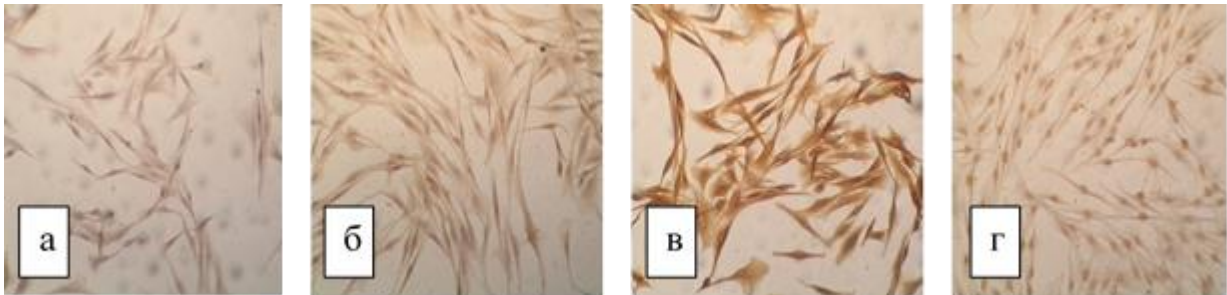


Рис. 6. Імунофенотипова характеристика специфічних білків некомітованих мезенхімальних стовбурових клітин собаки (II пасаж): а – Е-кадгерин позитивні клітини, $\times 200$; б – N-кадгерин позитивні клітини, $\times 200$; в – віментин-позитивні клітини, $\times 400$; г – актин-позитивні клітини, $\times 200$.

Встановлено, що кількість Е-кадгерин-позитивних клітин (рис. 6а) на II пасажі мала тенденцію до збільшення, тоді як кількість N-кадгерин-позитивних клітин (рис. 6б) на II пасажі достовірно збільшувалась, що свідчить про активацію міжклітинної взаємодії та стабільну експресію білків, які характерні для епітеліальних, нервових і м'язових клітин дорослого організму.

Імунофенотиповий профіль мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коней і пупкового канатику лошат на ранніх пасажах культивування *in vitro*. В таблиці 4 наведено дані щодо імунофенотипування мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коней і пупкового канатику лошат на ранніх пасажах культивування.

Встановлено, що кількість PCNA-позитивних клітини на II та V пасажах суттєво відрізнялась. Так, на II пасажі PCNA-позитивних клітин виявлено не було, тоді як на V пасажі спостерігалась експресія цього білка на рівні 242 балів. Досліджено, що експресія Ki-67 на II пасажі була помірною і становила 142 бали, в той час як на V пасажі позитивних клітин щодо цього білка не виявлено. Очевидно, кістковий мозок коней містить декілька клонів мультипотентних стовбурових

клітин, які відрізняються експресією специфічних ядерних маркерів, присутніх у проліферуючих клітинах.

Таблиця 4

Імунофенотиповий профіль мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня і пупкового канатика лошат на ранніх пасажах (M±m, n=3)

Досліджуваний антиген	Пасаж клітин кісткового мозку коня		Пасаж клітин пупкового канатика лошат
	II	V	II
	Оцінка в балах за методом H-Score (від 0 до 300)		
Ядерні білки (асоційовані із проліферацією і клітинним циклом)			
PCNA	0	242±22	198±13
Ki-67	142±11	0	134±23
Білки клітинної адгезії та цитоскелету			
Віментин	229±21	274±11*	265±12
Актин	128±11	221±27**	244±19
Е-кадгерин	138±12	0	11±5
N-кадгерин	109±18	0	64±9
CD24	94±6	0	0
CD44	46±9	0	0

Примітка. * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$ порівняно з клітинами II пасажу

В імуноцитохімічній реакції оцінки активності експресії віментину було виявлено велику кількість позитивних клітин із високою активністю експресії цього білка на II пасажі (229 балів) та достовірне збільшення його активності на V пасажі до 274 балів (рис. 7б). Встановлено помірну кількість актин-позитивних клітин на II пасажі (128 балів) та достовірне збільшення актин-позитивних клітин на V пасажі (221 бали), що також свідчить про їх мезенхімальну природу. Водночас спостерігався цікавий факт певної клональної специфічності: висока інтенсивність експресії актину в деяких клітинних популяціях (рис. 7а).

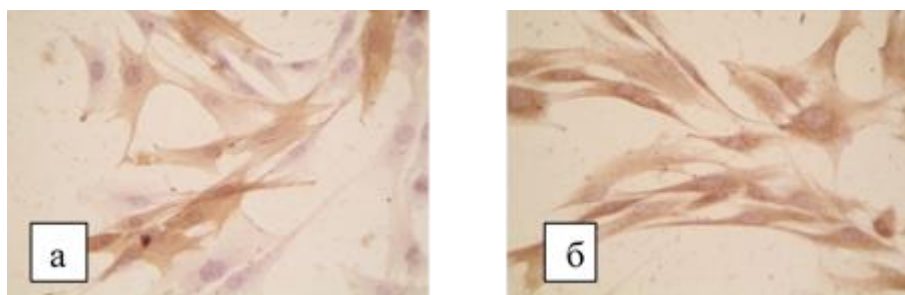


Рис. 7. Імунофенотипова характеристика мультипотентних стовбурових клітин кісткового мозку коня (V пасаж): а – актин-позитивні клітини, б – віментин-позитивні клітини, $\times 400$.

Кількість E- та N-кадгерин-позитивних клітин на II пасажі становила відповідно 138 і 109 балів, тоді як на V пасажі E-кадгерин і N-кадгерин-позитивних клітин не виявлено.

Під час імунофенотипування МСК КМ коня *in vitro* було виявлено незначну кількість CD24-позитивних клітин на II пасажі та повну відсутність експресії цього білка на V пасажі.

За результатами імуноцитохімічного аналізу встановлено, що кількість PCNA-позитивних клітин пупкового канатика лошат на II пасажі становила 198 балів. Слід відмітити, що експресія білка Ki-67, який характеризує проліферативний потенціал клітин, на II пасажі була помірною і становила 134 бали. Ці показники свідчать про здатність МСК пупкового канатика експресувати специфічні ядерні маркери, які притаманні проліферуючим клітинам.

В результаті проведення імуноцитохімічної реакції з визначення активності експресії віментину на II пасажі було виявлено велику кількість позитивних клітин із високою активністю експресії цього білка (265 балів), а також актин-позитивних клітин (244 бали), що підтверджує їх мезенхімальну природу.

В свою чергу, кількість E- та N-кадгерин-позитивних клітин була незначною, що свідчить про надто низьку експресію білків, характерних для епітеліальних і скелетних клітин організму тварин. Отже, на II пасажі культивування МСК пупкового канатика лошат виявлено незначна кількість E- та N-кадгерин-позитивних клітин, що свідчить про селективне домінування клітин з мезенхімальними характеристиками над клітинами з епітеліальними характеристиками. Інтенсивність експресії β -катенінів в МСК пупкового канатика лошат також була слабкою.

За результатами проведення імуноцитохімічного аналізу CD44-позитивних клітин виявлено не було. На II пасажі була встановлена також повна відсутність клітин з експресією маркеру CD24.

Остеогенна та адипогенна диференціація мезенхімальних стовбурових клітин собак. Як свідчать результати досліджень, вже на четверту добу після індукції направленої диференціації мезенхімальних стовбурових клітин собак у остеогенному напрямі в них було відмічено високий рівень активності лужної фосфатази – 3+, що свідчить про активацію процесу остеогенезу. Даний фермент мав форму досить великих гранул та локалізувався у цитоплазмі клітин (рис. 8а).

Встановлено, що на 14 добу культивування у моношарі мезенхімальних стовбурових клітин було виявлено локуси мінералізації, що підтверджується гістохімічним дослідженням на виявлення солей кальцію. Локуси мінералізації являли собою невеликі частинки позаклітинного матриксу, забарвлені в червоний колір (рис. 8б).

Як свідчать результати досліджень направленої диференціації МСК в адипогенному напрямі, починаючи з 10 доби експерименту у цитоплазмі клітин формуються вакуолі, які у світловому полі мікроскопа мають вигляд дрібних включень овальної форми, що пропускають промені світла. У процесі диференціювання вакуолі дещо збільшувалися в розмірах та набували більш округлого вигляду.

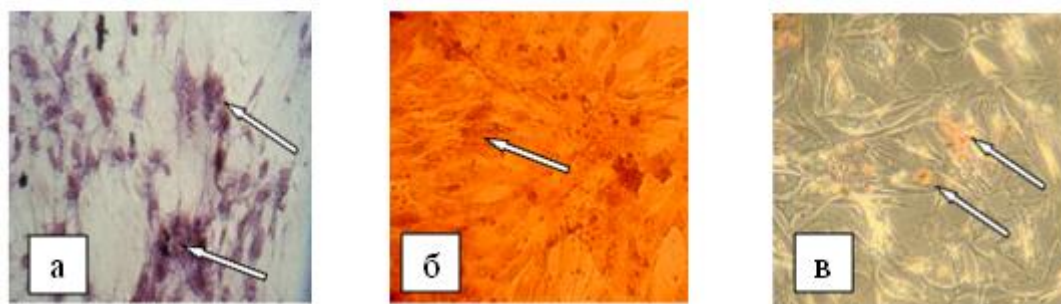


Рис. 8. Направлена диференціація мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собаки в остеогенному і адипогенному напрямках: а – гранулярний тип ендогенної лужної фосфатази (стрілками позначено гранули лужної фосфатази в цитоплазмі клітини); б – позаклітинні кристали Кальцію, фарбування алізариновим червоним (стрілкою показано локус мінералізації); в – внутрішньоклітинні вакуолі (показано стрілкою), які містять нейтральні жири (фарбування барвником Oil Red O), $\times 200$.

На 21 добу експерименту в сформованих внутрішньоклітинних вакуолях стовбурових клітин поступово накопичувались нейтральні жири, які виявляли шляхом фарбування моношару цих клітин ліпофільним барвником Oil Red O (рис. 8в).

Зміна імунологічних показників крові тварин-реципієнтів за системного введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин. Під час визначення загальної кількості лейкоцитів та окремих субпопуляцій лімфоцитів у крові кролів після введення у їх кров алогенних МСК було достовірно встановлено, що введені клітини володіють вираженою імуносупресивною властивістю (рис. 9).

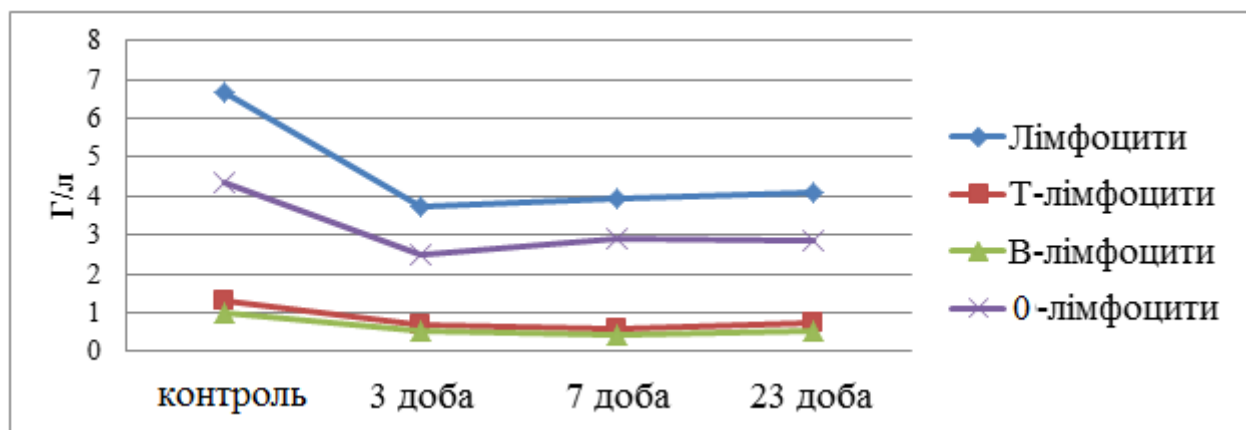


Рис. 9. Загальний вміст у крові кролів окремих субпопуляцій лімфоцитів після введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин

Так, у період з 3 до 23 доби після введення стовбурових клітин абсолютна кількість лейкоцитів була достовірно меншою відповідно на 54 та 32 % проти вихідного стану. Загальна кількість лімфоцитів також була достовірно меншою протягом періоду дослідження після введення МСК із 3 до 23 доби на 56 та 62 %. Кількість Т-лімфоцитів достовірно зменшувалась після введення стовбурових клітин з 3 до 23 доби дослідження відповідно на 53 та 57 %. Причому, найменша кількість їх спостерігалась на 7 добу і складала лише 43 % від вихідного стану. Також встановлено достовірне зменшення кількості вмісту цих клітин на 3, 7 і 23 доби

після введення в кров'яне русло МСК. Дані, наведені на рис. 9, свідчать, що динаміка змін кількості Т-лімфоцитів протягом всього періоду досліджень (3–23 доби) співпадає з динамікою змін кількості В-лімфоцитів. Кількість 0-лімфоцитів також достовірно зменшувалась протягом усього періоду досліджень порівняно з вихідним станом.

Таким чином, проведені експериментальні дослідження *in vivo* підтверджують імуносупресивний вплив МСК на різні субпопуляції клітин імунокомпетентної системи (Т, В, 0-лімфоцити).

Під час дослідження цитолітичної активності сироватки крові за допомогою МТТ-тесту було встановлено, що на 3 і 7 доби експерименту відбувалась тенденція до збільшення цитолітичної активності сироватки крові щодо клітин карциноми Ерліха. Цитолітичність на даний період дослідження відповідно становила 45,11 та 39,9 % проти вихідного стану – 39,17 %.

Отже, системне введення аlogenних стовбурових клітин викликає активацію цитолітичної активності сироватки крові, що, очевидно, можна розцінювати як активацію неспецифічної ланки імунітету на фоні інактивації клітинного імунітету.

Каріотиповий аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів за різних методів дисоціації клітинного моношару на ранніх пасажах культивування *in vitro*. Було проведено дві серії досліджень. У першій серії досліджень під час пасажування мезенхімальних стовбурових клітин використовували ферментативну дисоціацію клітинного моношару додаванням до культуральної суміші трипсину/ЕДТА, після чого проводили цитогенетичний аналіз цих клітин на I, III і V пасажах.

У другій серії досліджень під час пасажування мезенхімальних стовбурових клітин використовували хелатуючу дисоціацію клітинного моношару шляхом додавання етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА). В подальшому проводили цитогенетичний аналіз цих клітин на I, III і V пасажах під час культивування *in vitro*.

Дані, наведені в таблиці 5, свідчать, що для цих клітин характерні кількісні порушення хромосом, зокрема анеуплоїдія та поліплоїдія.

Анеуплоїдія в МСК кроля за ферментативної дисоціації моношару МСК проявлялася з частотою 15 % на I пасажі, 15,4 % на III та 8,3 % на V пасажах, що не перевищує спонтанний рівень (25–35 %) цієї мінливості, виявленої у клітинах кісткового мозку ссавців. Цитогенетичну мінливість (анеуплоїдію), в основному, становили гіперплоїдні клітини, каріотип яких дорівнював $n=46$, $n=56$ хромосом.

Поява анеуплоїдних клітин за хелатуючої дисоціації моношару МСК спостерігалась від I до V пасажів з показниками від 11,1 до 12,5 %, що не перевищує спонтанний рівень (25–35 %) цієї мінливості, виявленої у клітинах кісткового мозку ссавців. Цитогенетичну мінливість (анеуплоїдію), в основному, становили гіпоплоїдні клітини, каріотип яких дорівнював $2n=39$, $2n=43$ хромосом. Різниця середніх величин за цією ознакою у популяціях клітин I, III і V пасажів була недостовірною і не перевищувала спонтанного рівня соматичного мутагенезу, характерного для ссавців (рис. 10б).

Кратне збільшення гаплоїдного набору хромосом було виявлено у МСК кроля за ферментативної дисоціації клітинного матеріалу на всіх пасажах культивування. Поліплоїдні клітини були, в основному, тетра- та гексаплоїдні, каріотип яких

відповідно дорівнював $n=88$ та $n=132$ хромосом. Кількість поліплоїдних клітин серед мезенхімальних стовбурових клітин кроля I пасажу становила 6,3 %, III пасажу – 15,4 %, V пасажу – 37,5 %. У популяціях клітин від I до V пасажу спостерігалось підвищення відсотку поліплоїдії з достовірною різницею середніх величин ($p \leq 0,001$).

Таблиця 5

Показники цитогенетичного контролю мезенхімальних стовбурових клітин кролів на ранніх пасажах культивування за різних методів дисоціації клітинного матеріалу ($M \pm m$, $n=5$)

Метод дисоціації клітинного матеріалу	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %	Структурні порушення
I пасаж			
Ферментативна дисоціація	15,0±2,3	6,3±1,2	–
ЕДТА-дисоціація	11,1±2,1	5,5±0,9	5,5±1,2
III пасаж			
Ферментативна дисоціація	15,4±2,5	15,4±1,4***	–
ЕДТА-дисоціація	11,7±1,5	–	–
V пасаж			
Ферментативна дисоціація	8,3±1,1*	37,5±3,2***	–
ЕДТА-дисоціація	12,0±1,5	26±2,0***	–

Примітка. * – $p \leq 0,05$; *** – $p \leq 0,001$ порівняно з клітинами I пасажу

Кратне збільшення числа хромосом (поліплоїдія) проявилось і в популяції клітин I, V пасажів за хелатуючої дисоціації клітинного матеріалу. Поліплоїдія каріотипу клітин I пасажу становила 5,5 %, що не перевищувала спонтанний рівень цієї мінливості, характерний для ссавців. На III пасажі поліплоїдних клітин виявлено не було. Частота поліплоїдних клітин на V пасажі становила 26 %, що у 4,7 рази вище спонтанної хромосомної мінливості за цією ознакою, характерною для МСК I пасажу. Різниця середніх величин за цієї мінливості між I і V пасажами була достовірною ($p \leq 0,001$). Тим часом поліплоїдні клітини були, в основному, тетраплоїдні, каріотип яких дорівнював $4n=88$. Поліплоїдизацію пов'язують із зменшенням мітотичного потенціалу клітини і втратою цитоплазматичної здатності до поділу (рис. 10в).

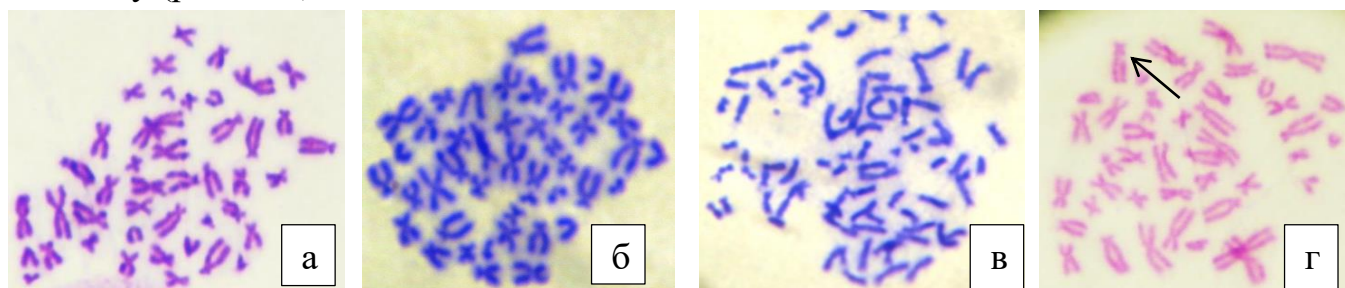


Рис. 10. Каріотип мезенхімальних стовбурових клітин кроля: а – норма $2n=44$; б – анеуплоїдія $2n=42$; в – поліплоїдія $4n=88$; г – структурні порушення, $\times 1000$.

Встановлено, що МСК кроля I пасажу за хелатуючої дисоціації клітинного матеріалу мали структурні порушення хромосом, кількість яких дорівнювала 5,5 %, що не перевищувало спонтанний рівень соматичного мутагенезу, характерного для ссавців. У популяціях МСК кроля II–V пасажів структурних порушень хромосом виявлено не було (рис. 10г).

Для оцінки дестабілізації каріотипу МСК КМ кролів було проведено мікроядерний тест. Частка клітин за ферментативної дисоціації клітинного матеріалу з мікроядрами на I–V пасажах була підвищена та становила 9,0–3,2 %, за норми 1,6–5,6 % для ссавців. Частка двоядерних мезенхімальних стовбурових клітин кроля на I–V пасажах була достовірною вищою ($p \leq 0,05$) за рівень спонтанного мутагенезу, який характерний для клітин ссавців (5,4 %), і становила 7,2–8,2 %. Підвищений мітотичний індекс (11,0–15,2 %) свідчить про посилену проліферацію культивуємих клітин. Водночас, рівень апоптозних клітин знаходився у межах норми.

Результати мікроядерного тесту клітин за хелатуючої дисоціації клітинного матеріалу показали, що у популяціях мезенхімальних стовбурових клітин кроля частка клітин із мікроядром знаходилася у межах 3–7 %. Концентрація цих клітин підвищувалася з кожним наступним пасажем. Різниця середніх величин за цією ознакою у популяції клітин I, III і V пасажів була достовірною ($p \leq 0,05$). Різниця кількості двоядерних клітин у популяціях МСК кроля залежно від номера пасажу не спостерігалася.

Цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собак на ранніх пасажах культивування *in vitro*. Представлені дані у таблиці 6 свідчать, що відсоток анеуплоїдних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собаки I пасажу становив 16,6 %, II – 18,0 %, що не перевищує спонтанний рівень (25–35 %) цієї мінливості, виявленої у клітинах кісткового мозку ссавців. Відсоток МСК з анеуплоїдією III та IV пасажів дорівнював 25,0 та 33,3 %, що відповідно у 1,5 і 2 рази більше рівня спонтанної анеуплоїдності, характерної для МСК кісткового мозку I пасажу. Різниця середніх величин цієї мінливості між I і III, I і IV пасажами виявилася достовірною ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,001$). Клітин із кратним збільшенням числа хромосом та їх структурними порушеннями виявлено не було.

Таблиця 6

Результати цитогенетичного аналізу мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собак I–IV пасажів ($M \pm m$, $n=4$)

№ пасажу	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %	Структурні порушення
I	16,6±1,5	–	–
II	18,0±1,4	–	–
III	25,0±2,10*	–	–
IV	33,3±2,30***	–	–

Примітка. * – $p \leq 0,05$; *** – $p \leq 0,001$ порівняно із клітинами I пасажу

Для оцінки дестабілізації каріотипу МСК КМ собаки було проведено мікроядерний тест. Частота клітин із мікроядрами становила 1,3–4,5 % та знаходилася у межах норми. Частота двоядерних МСК II–IV пасажів становила

1,6 та 2,0 % і знаходилась в межах параметрів, які характерні для ссавців за спонтанного соматичного мутагенезу. У популяції клітин I пасажу двоядерних МСК виявлено не було. Частота мітотичного індексу узгоджувалась прямим пропорційним співвідношенням із частотою апоптозних клітин.

Цитогенетичний контроль мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коней на ранніх пасажах культивування *in vitro*. Показники цитогенетичного аналізу мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коней наведено у таблиці 7. Отримані результати цитогенетичного аналізу МСК кісткового мозку коня показали, що для них характерні кількісні порушення каріотипу, зокрема анеуплоїдія, яка становила відповідно 1,4 та 1,2 %. Суттєвої різниці між кількісними порушеннями хромосом у досліджуваних клітин на різних пасажах не встановлено. Частка МСК із анеуплоїдією не перевищувала рівня спонтанної хромосомної мінливості (1,98 %) за цією ознакою у лімфоцитах периферійної крові коня. Метафазні пластинки з поліплоїдією в мезенхімальних стовбурових клітинах III–IV пасажів виявлено не були. Структурних порушень у цих клітинах також не виявлено.

Таблиця 7

Аналіз каріотипу мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня III і IV пасажів ($M \pm m$, $n=3$)

№ пасажу	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %	Структурні порушення
III	1,4±0,25	–	–
IV	1,2±0,17	–	–

Для більш повної оцінки соматичного мутагенезу МСК було проведено мікроядерний тест. У МСК коня III та IV пасажів частка клітин із мікроядрами становила 1,3 та 0,8 %, що не перевищує спонтанного рівня частки лімфоцитів із мікроядром (1,53 %) у периферійній крові коня. Частка двоядерних мезенхімальних стовбурових клітин III та IV пасажів становила 1 і 1,5 % та знаходилась у межах параметрів, які характерні для ссавців за спонтанного соматичного мутагенезу. Рівень апоптозних клітин на III та IV пасажах у коня не перевищував параметрів (1,57 %), характерних для цього виду.

Цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика лошат під час культивування *in vitro*. Показники цитогенетичного аналізу мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика лошат наведено в таблиці 8. Одержані результати цитогенетичного дослідження МСК пупкового канатика лошат показали, що для цих клітин характерні кількісні порушення хромосомного набору, як анеуплоїдія, так і поліплоїдія (рис. 11). Відсоток метафазних пластинок із анеуплоїдією у МСК пупкового канатика лошат із II по VII пасаж становив 16,7–40,6 %, що суттєво перевищує спонтанний рівень хромосомної мінливості за цією ознакою у лімфоцитах периферійної крові коня (1,98–6,8 %) та у МСК кісткового мозку (1,2–1,4 %). У популяціях клітин від II до VII пасажу спостерігалось підвищення відсотку анеуплоїдії, що свідчить про зростання з кожним наступним пасажем каріотипової нестабільності цих клітин. Різниця

середніх величин за цією ознакою у популяції клітин II, III, IV, V і VII пасажів була достовірною ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,001$).

Таблиця 8

Аналіз каріотипу мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика лошат на II–VII пасажах ($M \pm m$, $n=3$)

№ пасажу	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %	Структурні порушення
II	$16,7 \pm 1,0$	$25 \pm 1,2$	–
III	$23,0 \pm 1,2^*$	$27 \pm 1,7$	–
IV	$35,0 \pm 1,7^{***}$	–	–
V	$38,8 \pm 1,5^{***}$	$4,8 \pm 0,9^{***}$	–
VII	$40,6 \pm 1,9^{***}$	–	–

Примітка. * – $p \leq 0,05$; *** – $p \leq 0,001$ порівняно із клітинами II пасажу

Досліджені мезенхімальні стовбурові клітини пупкового канатика лошат характеризувалися також наявністю тетраплоїдного каріотипу ($4n=128$), який був присутній у популяціях клітин II, III та V пасажів і становив відповідно 25 %, 27 та 4,8 %. Відсоток поліплоїдних клітин II і III пасажів більше ніж у п'ять разів перевищував рівень спонтанної хромосомної мінливості (0,4–4,7 %) за цією ознакою у лімфоцитах периферійної крові коня. Структурні порушення хромосом, у досліджуваних популяціях клітин, не спостерігалися.

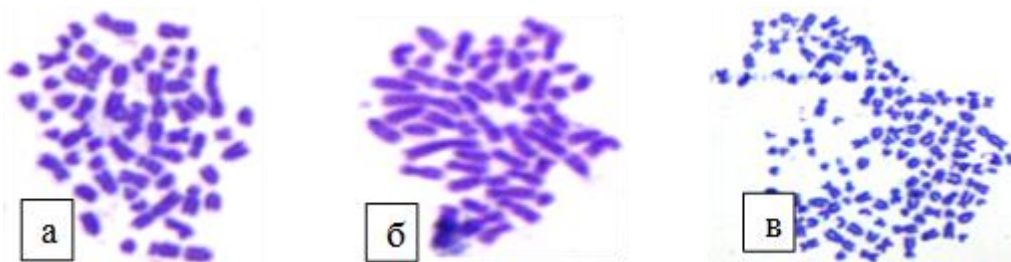


Рис. 11. Каріотип мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика лошат V пасажу: а – норма $2n=64$; б – анеуплоїдія $2n=54$; в – поліплоїдія $4n=128$, $\times 1000$.

Результати мікроядерного тесту вказують на те, що частка клітин із мікроядрами, починаючи з III до VII пасажу, вища у 2–5 разів відносно спонтанного рівня частки лімфоцитів із мікроядром (1,53 %) у периферійній крові коня. Різниця середніх величин за цією ознакою у популяції клітин II та III, V і VII пасажів була достовірною ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$).

Частка двоядерних мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика на II, IV та V пасажах перевищувала межі параметрів, які характерні для клітин ссавців за спонтанного соматичного мутагенезу (1,13 %). Мітотична активність МСК пупкового канатика була теж підвищена, а рівень апоптозних клітин на V та VII пасажах не перевищував параметрів (1,57 %), характерних для цього виду.

Ефективність клонування первинних мультипотентних стовбурових клітин кісткового мозку кролів за різних умов зберігання. У першій серії досліджень встановлено, що під час культивування мононуклеарні клітини, які було отримано методом градієнтного центрифугування аспірату КМ, на 11 добу

утворювали 90–95 % моношару. Кількість клітин на 1 см² становила – 78,31 тис. У той же час за культивування суміші нефракціонованих клітин кісткового мозку спостерігали ріст клітин колоніями різної форми та розміру, незалежно одна від одної, які не з'єднувались між собою. Кількість отриманих клітин на 1 см² становила 33,08 тис.

У другій серії досліджень під час культивування моноклеарів, які було отримано методом градієнтного центрифугування суспензії клітин кісткового мозку на 11 добу культивування встановили, що кількість культивуючих клітин на 1 см² становить 14,30 тис. У той же час, ефективність клонування стовбурових клітин кісткового мозку, які зберігалися та висівалися у поживне середовище разом із іншими клітинами кісткового мозку, значно більша і становила 27,80 тис./см², що на 94 % більше порівняно із кількістю клітин, які було виділено у градієнті щільності філол-тріомрасту. Очевидно, середовище 199, у якому зберігалися клітини протягом 48 год за температури 4 °С, спонукає до активної трансформації стовбурових клітин кісткового мозку у транзиторні клітини. Особливо це стосується клітин, які було отримано методом градієнтного центрифугування.

Отже, порівняльний аналіз свідчить, що умови зберігання клітин кісткового мозку кролів суттєво впливають на проліферативну активність мультипотентних стовбурових клітин. Клітини кісткового мозку, який зберігався у середовищі 199 протягом 48 год за температури 4 °С, знижують свій проліферативний потенціал порівняно з клітинами КМ, який зберігався протягом 48 год за температури 4 °С без середовища 199.

Дослідження біосумісності гемостатичних губок із мезенхімальними стовбуровими клітинами кісткового мозку кроля під час культивування *in vitro*. Було проведено три серії досліджень. У першій серії досліджень вивчали біосумісність гемостатичної колагенової пластини (виробник: ВАТ Лужський завод «Белкозин», Російська Федерація) із МСК кісткового мозку кроля під час культивування *in vitro*. Встановлено, що під час сумісного культивування із колагеновою пластиною МСК втрачали адгезивні властивості, що призводило до відкріплення їх від пластику та накопичення у культуральному середовищі. На нашу думку, негативний вплив гемостатичної колагенової пластини на МСК кроля під час культивування *in vitro* виникає у результаті дії на клітини борної кислоти, яка входить до складу досліджуваного гемостатичного засобу.

У другій серії досліджень вивчали біосумісність гемостатичної желатинової губки «Геласпон» (виробник: Шовен анкерфарм ГмБХ, Федеративна Республіка Німеччина) із МСК кісткового мозку кроля під час культивування *in vitro*. Встановлено, що під час сумісного культивування МСК із гемостатичною желатиною губкою, клітини не втрачали своїх адгезивних властивостей, активно проліферували, морфологічно не відрізнялись від клітин, які культивувались у контрольних культуральних чашках. Кількість клітин на четверту добу культивування у дослідних культуральних чашках становила 77,8 тис./см², тоді як у контрольних – 79,2 тис./см², що, на нашу думку, може виникати у зв'язку із прикріпленням окремих клітин під час мітотичного поділу до волокон гемостатичної губки.

У третій серії досліджень вивчали вплив поживного середовища, попередньо інкубованого протягом 72 год із гемостатичною желатиною губкою «Геласпон» (виробник: Шовен анкерфарм ГмБХ, Федеративна Республіка Німеччина), на проліферативну активність МСК кісткового мозку кроля. Встановлено, що клітини, які культивувались у поживному середовищі, попередньо інкубованому з гемостатичною желатиною губкою, активно проявляли свої адгезивні і проліферативні властивості подібно до клітин у контрольних культуральних чашках. Кількість клітин на четверту добу культивування у дослідних культуральних чашках становила 82,4 тис./см² тоді як у контрольних – 82,0 тис./см², що підтверджує нетоксичність досліджуваного біоматриксу.

Мікроскопічна будова загального п'яткового сухожилка кролів за дії дипроспану. Під час проведення гістологічних досліджень загального п'яткового сухожилка кролів після чотирьохразового введення в сухожилок дипроспану в дозі 0,25 мл було встановлено, що в місці введення препарату реєструється виразна деструкція сухожилка, а в прилеглих до місця введення ділянках – ще й виразна компенсаторно-приспосувальна реакція. В місці введення препарату реєструються некротичні зміни сухожилкових пучків різного порядку. Пучки I порядку в складі пучків II порядку не диференціюються. На їх місці виявляється досить однорідна еозинофільна маса без будь-якої впорядкованої структури, яка досить інтенсивно зафарбовується еозином. В цій масі виявляється помітно зменшена кількість ядер тендиноцитів. Виразне підвищення оксифілії, на нашу думку, свідчить про розпад кислих сполук (глікопротеїнів і глікозаміногліканів), які входять до складу пучків колагенових волокон. Між пучками II порядку та пучками III порядку в пухкій волокнистій тканині, яка їх розділяє, виявлено досить виразний набряк. Отже, чотирьохразове введення кролям у товщу загального п'яткового сухожилка дипроспану у дозі 0,25 мл викликає його некротичні зміни.

Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку на перебіг репаративних процесів у загальному п'ятковому сухожилку кролів. Алогенні МСК КМ застосовували з метою лікування дегенеративного ушкодження сухожилка у дослідних тварин на II етапі експерименту.

Під час проведення гістологічних досліджень загального п'яткового (ахіллового) сухожилка кролів першої групи на 7 добу після введення ізотонічного розчину NaCl було встановлено наявність виразних мікроскопічних змін як безпосередньо в місці введення дипроспану, так і віддалено від нього. Сухожилок мав дифузний набряк. Пучки колагенових волокон блідо зафарбовувались еозином, а межі пучків колагенових волокон I порядку зазвичай не диференціювалися. Набрякова рідина при цьому відокремлювала один від одного переважно пучки колагенових волокон II порядку. Тендиноцити на поверхні пучків колагенових волокон II порядку у багатьох випадках не виявлялися. На нашу думку, це може свідчити про загибель більшої частини цих клітин внаслідок дії дипроспану. Проте, тендиноцити на поверхні пучків колагенових волокон III порядку в більшості випадків залишалися інтактними. У місці введення дипроспану, крім того, реєструвався лізис окремих фрагментів пучків колагенових волокон I та II порядків, що призводило до їх фрагментації. Як показали результати проведених досліджень, такому лізису передувало розпадом окремих ділянок пучків колагенових волокон на

окремі фрагменти округлої форми невеликих розмірів. Такі зміни нерідко супроводжувались некротичними змінами пучків колагенових волокон I і II порядків та пікнозом ядер тендиноцитів (рис. 12).

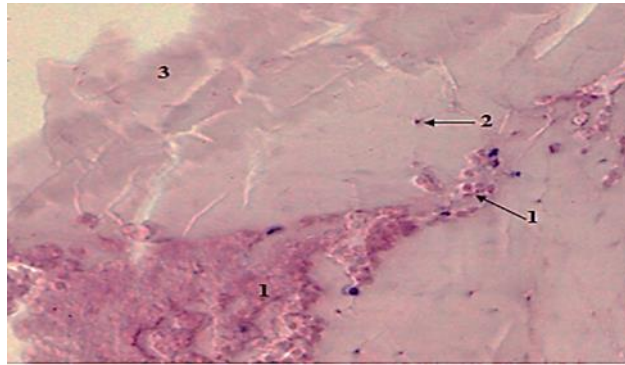


Рис. 12. Загальний п'ятковий сухожилок кроля на 7 добу після введення ізотонічного розчину NaCl: 1 – розпад окремих ділянок пучків колагенових волокон на окремі фрагменти круглої форми; 2 – пікноз ядер теноцитів; 3 – некроз пучків колагенових волокон. Гематоксилін Караці та еозин, $\times 100$.

Проведені гістологічні дослідження також показали, що на 7 добу після застосування стовбурових клітин (тварини другої групи) мікроскопічні зміни в загальному п'ятковому сухожилку мали істотні відмінності. Поза місцем введення дипроспану мікроскопічна будова цього сухожилка майже не відрізнялась від мікроскопічної будови загального п'яткового сухожилка інтактних тварин. Єдина відмінність полягала в наявності незначного набряку між пучками колагенових волокон III порядку. Проте в місці введення дипроспану ще виявлялися мікроскопічні зміни, але їх характер істотно відрізнявся від характеру мікроскопічних змін у місці введення препарату в кролів, яким не вводили стовбурові клітини. Так, було встановлено, що у тварин другої дослідної групи, так як і в тварин першої дослідної групи, реєстрували набряк між пучками колагенових волокон II і III порядку. Проте в сухожилок вrostали досить довгі клітинні тяжі. У місці введення стовбурових клітин у пучках колагенових волокон III порядку виявлялися осередки розмноження таких клітин. Ці осередки розмноження являли собою гетерогенну клітинну популяцію (рис. 13).

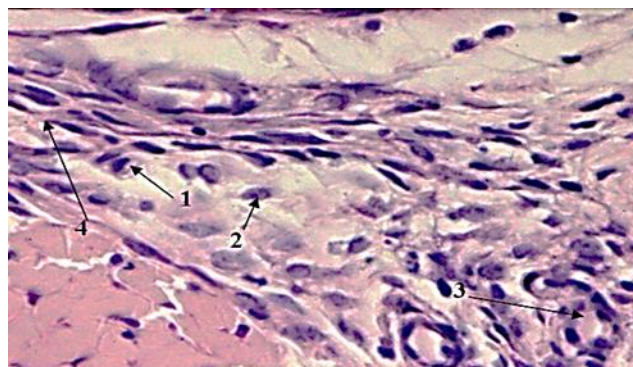


Рис. 13. Загальний п'ятковий сухожилок кроля на 7 добу після введення стовбурових клітин: 1 – «молодий» фібробласт з ядром грушоподібної форми; 2 – «молодий» фібробласт з ядром овальної форми; 3 – новоутворений кровоносний капіляр; 4 – тяж новоутворених фібробластів. Гематоксилін Караці та еозин, $\times 400$.

В той же час у периферійній частині цих скупчень виявлялися морфологічні ознаки клітинної диференціації. Частина стовбурових клітин мала округлу форму та невелику за об'ємом дещо базофільну цитоплазму. На нашу думку, такі синтетичні процеси в даному випадку були пов'язані з ростом і диференціацією стовбурових клітин, оскільки в подальшому реєструвалося збільшення об'єму цитоплазми, а самі клітини спочатку набували грушоподібної, а потім – фібробластоподібної форми. Всі ці клітини, крім того, мали надзвичайно інтенсивно зафарбовані ядра, що характерно для незрілих клітин, які інтенсивно розмножуються. У периферійних частинах загального п'яtkового сухожилка на 7 добу після введення стовбурових клітин формувалися осередки скупчення фібробластів, серед яких виявлялися ще молоді клітини, які мали ядра грушоподібної або овальної форми. В такі скупчення клітин проростали кровоносні капіляри, а всередину сухожилка вросли тяжі новоутворених фібробластів (рис. 13). Клітини в таких тяжах розташовувались досить щільно, але місцями вже реєструвалося продукування цими клітинами помітної кількості міжклітинної речовини, яка, на нашу думку, могла являти собою новоутворені, ще невпорядковано розташовані пучки колагенових волокон.

На 21 добу у кролів першої дослідної групи, яким не вводили стовбурових клітин, мікроскопічна будова загального п'яtkового сухожилка, віддаленого від місця введення дипроспану, не відрізнялась від мікроскопічної будови загального п'яtkового сухожилка тварин контрольної групи. Проте, в місці введення дипроспану ще виявлялися досить виразні мікроскопічні зміни. Пучки колагенових волокон зафарбовувалися еозином більш блідо порівняно з контролем. У самому місці введення виявлялася виразна проліферація тендиноцитів. При цьому в одних ділянках вони утворювали суцільні клітинні поля з наявністю відносно невеликої кількості еозинофільної міжклітинної речовини з слабо вираженою волокнистою будовою. В інших ділянках тендиноцити і пучки колагенових волокон формували сіткоподібну структуру. В подальшому вздовж пучків колагенових волокон цієї структури починалося розмноження тендиноцитів і продукування ними міжклітинної речовини волокнистої структури (рис. 14). В місці введення дипроспану місцями виявлялось формування пучків II і III порядку. Проте, новоутворені пучки ще були досить тонкими, не мали чіткої орієнтації пучків колагенових волокон, містили велику кількість невпорядковано розташованих тендиноцитів, а між ними виявлявся виразний набряк.

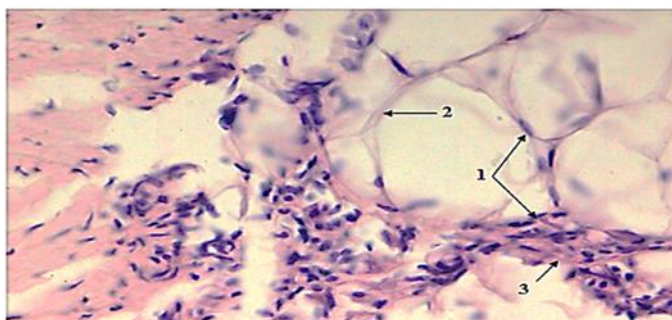


Рис. 14. Загальний п'яtkовий сухожилок кроля на 21 добу після введення ізотонічного розчину NaCl (місце введення дипроспану): 1 – тендиноцит; 2 – пучок колагенових волокон; 3 – міжклітинна речовина волокнистої структури. Гематоксилін Караці та еозин, $\times 200$.

Проведені гістологічні дослідження також показали, що тваринам, яким застосовували стовбурові клітини (друга дослідна група) на 21 добу експерименту мікроскопічні зміни у загальному п'ятковому сухожилку мали істотні відмінності. Поза місцем введення дипроспану мікроскопічна будова цього сухожилка вже не відрізнялась від мікроскопічної будови загального п'яткового сухожилка інтактних тварин. Разом з тим, в місці введення дипроспану ще виявлялися мікроскопічні зміни, але їх характер істотно відрізнявся від характеру мікроскопічних змін загального п'яткового сухожилка кролів першої дослідної групи. Пучки колагенових волокон I, II і III порядків були чітко сформовані. При цьому пучки колагенових волокон I, II і III порядків вже мали чітку орієнтацію, яка відповідала орієнтації цих пучків у ділянках загального п'яткового сухожилка, віддаленого від місця введення дипроспану. Лише місцями виявлялись поодинокі пучки колагенових волокон II порядку на початкових стадіях свого формування та поодинокі пучки колагенових волокон II порядку з не досить щільно упакованими пучками I порядку. Крім того, в місці введення дипроспану ще реєструвалась велика кількість тендиноцитів (рис. 15).

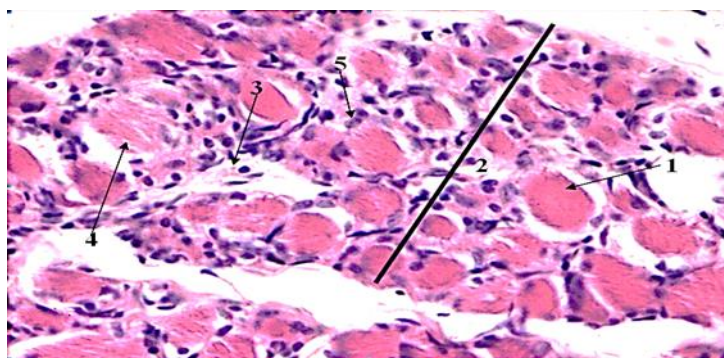


Рис. 15. Загальний п'ятковий сухожилок кроля на 21 добу після введення стовбурових клітин (місце введення дипроспану): 1 – повністю сформований пучок колагенових волокон II порядку; 2 – повністю сформований пучок колагенових волокон III порядку; 3 – початкова стадія формування пучка колагенових волокон II порядку; 4 – пучок колагенових волокон II порядку з не досить щільно упакованими пучками I порядку; 5 – тендиноцити. Гематоксилін Караці та еозин, $\times 200$.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено актуальне питання ветеринарної медицини – досліджено властивості стовбурових клітин тварин як основи клітинних технологій. Представлено імуноцитохімічні та цитогенетичні дослідження, які розкривають сучасні уявлення про біологію мезенхімальних стовбурових клітин залежно від їх видової належності, способів отримання, умов культивування та пасажування, а також їх вплив на оптимізацію репаративних процесів в експериментально ушкодженому сухожилку тварин та реакції цілісного організму тварин-реципієнтів за впливу стовбурових клітин.

1. Центрифугування суспензії клітин кісткового мозку коней у градієнті щільності фікол-тріомбразу є ефективним методом отримання фракції моноклеарних клітин із аспірату кісткового мозку. Оптимальними умовами для отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку коней, збагаченої

популяцією мезенхімальних стовбурових клітин, є центрифугування суспензії клітин кісткового мозку у градієнті щільності фікол-тріомбразу $\rho=1,076$ за відцентрової сили 300 g.

2. Механічна дезагрегація тканин пупкового канатика цуценят дозволяє отримати фібробластоподібні клітини з високими адгезивними та проліферативними властивостями. Для пупкового канатика лошат оптимальними умовами отримання фібробластоподібних клітин із високими адгезивними і проліферативними властивостями є метод ферментативної дезагрегації (36-годинна холодна трипсинізація).

3. Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку щурів, кролів, собак і коней на ранніх пасажах культивування є гетерогенними. Вони експресують маркери мезенхімальних (віментин, актин), м'язових, епітеліальних і нервових (E-кадгерин, N-кадгерин) клітин, що є важливим показником під час цитодиференціювання цих клітин.

4. Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку кроля на пізніх пасажах культивування достовірно знижують експресію ядерних білків, які асоційовані з проліферацією і клітинним циклом, що підтверджується достовірним ($p \leq 0,001$) зниженням експресії цих білків (PCNA – у 2,8 раза, Ki67 – у 4,9 раза).

5. Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку собак, які культивуються у стандартному поживному середовищі, є гетерогенними та експресують на другому пасажі маркери мезенхімальних (віментин – 221 бал, актин – 170 балів), м'язових, епітеліальних та нервових клітин (E-кадгерин – 163 бали, N-кадгерин – 240 балів). Ці клітини здатні до направленої диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках, що підтверджується високою активністю у цитоплазмі клітин ендогенної лужної фосфатази, відкладанням у міжклітинному матриксі солей кальцію та формуванням у цитоплазмі клітин вакуолей, які містять нейтральні жири.

6. Кістковий мозок коней містить декілька клонів мультипотентних стовбурових клітин, які відрізняються експресією специфічних ядерних маркерів, характерних для проліферуючих клітин (PCNA, Ki67), а на V пасажі проявляють морфологічну і фенотипову гомогенність і не містять клітин, які експресують ендотеліальні, м'язові, нервові (E-кадгерин, N-кадгерин) та гемопоетичні (CD24) маркери. Стовбурові клітини пупкового канатика лошат експресують типові маркери, які притаманні мезенхімальним клітинам (віментин – 265 балів, актин – 244 бали) та не експресують гемопоетичних маркерів (CD24).

7. Мезенхімальні стовбурові клітини тварин різних видів мають перехресно-реагуючі антигени, зокрема антигени мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку щурів, кролів, собак і коней, а також пупкового канатика лошат наділені загальним епітопом до таких моноклональних антитіл: PCNA (clone PC-10, NeoMarkers), Ki-67 (clone RB-9043-PO, Neomarkers), CD44 (clone 156-3C11, DiagnosticBioSystems), PanMuscleActin (clone 1a45C5, DiagnosticBioSystems), E-cadherin (clone SPM 471, ThermoScientific), N-cadherin (clone CD 325, ThermoScientific), віментин (clone V9, DiagnosticBioSystems).

8. Мезенхімальні стовбурові клітини на третю добу після введення кролям у кров'яне русло викликають супресію клітин лімфоцитарного ряду, про що свідчить

достовірне зниження ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,001$) популяцій Т-, В- і 0-лімфоцитів у крові цих тварин відповідно на 47 %, 45 та 43 %.

9. Використання хелатуючої дисоціації культури мезенхімальних стовбурових клітин кролів за допомогою етилендіамінтетраоцтової кислоти на ранніх пасажах культивування має переваги над застосуванням ферментативного методу дисоціації, оскільки в меншій мірі впливає на їх цитогенетичну мінливість і дає можливість на ранніх пасажах отримати культуру клітин із меншими кількісними змінами хромосомного апарату (анеуплоїдія, поліплоїдія) та показниками мікроядерного тесту (двоядерні клітини і клітини з мікроядром). За хелатуючої дисоціації клітинного матеріалу кількість клітин із поліплоїдією менша порівняно з ферментативною дисоціацією I пасажу на 13 %, V пасажу – у 1,44 раза, у клітин III пасажу за хелатуючої дисоціації не було відмічено поліплоїдних клітин, тоді як за ферментативною дисоціацією поліплоїдія становила 15,4 %.

10. Показник кількісних порушень хромосом (анеуплоїдія) у популяціях мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку собаки III та IV пасажів порівняно із клітинами I пасажу достовірно вищий відповідно на 50,6 і 100,6 % ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,001$). Відсоток стовбурових клітин із анеуплоїдією III та IV пасажів дорівнює 25,0 та 33,3 %. Клітини із кратним збільшенням числа хромосом (поліплоїдія) та їх структурними порушеннями не виявлено.

11. Мінливість каріотипу мезенхімальних стовбурових клітин коня III і IV пасажів відповідає спонтанному рівню, характерному для цього виду тварин. Анеуплоїдія III і IV пасажів становить відповідно 1,4 і 1,2 %. Під час культивування мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика лоша із збільшенням числа пасажів, збільшується кількість клітин із зміненим геномом, що характеризується збільшенням метафазних пластинок із анеуплоїдією ($p \leq 0,001$), наявністю тетраплоїдного каріотипу, а також підвищенням параметрів мікроядерного тесту.

12. У кістковому мозку кролів існує резистентна фракція стовбурових клітин, яка здатна до активного клонування після 48 годин зберігання клітинної маси за температури 4 °C.

13. Гемостатична губка «Геласпон» є біосумісною для мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кроля на ранніх пасажах культивування *in vitro* і може бути використана у якості експериментального біодеградуючого матриксу для стовбурових клітин.

14. Введення в ушкодженій сухожилок кролям алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у дозі $2,5 \times 10^6$ активізує відновлення тканин, що підтверджується вираженими процесами регенерації загального п'яtkового сухожилка на 7 та 21 добу, які проявляються інтенсивною проліферацією клітин, формуванням колагенових волокон першого, другого і третього порядків і відновленням структурно-функціональної організації загального п'яtkового сухожилка.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Результати досліджень пропонуються для використання у науковій роботі профільних установ ветеринарної медицини з метою подальшого вивчення стовбурових клітин тваринного походження в умовах *in vivo* та *in vitro*, а також у навчальному процесі для підготовки магістрів спеціальності «Ветеринарна медицина» (за видами), спеціалізації «Клітинні технології у ветеринарній медицині та біології» дисциплін «Теорія і практика використання стовбурових клітин у ветеринарній медицині» та «Молекулярні механізми клітинного і гуморального імунітету тварин».

2. Під час дослідження стовбурових клітин та використання їх з метою клітинно-регенеративної терапії пропонується керуватися методичними рекомендаціями: «Отримання, культивування, кріоконсервування та використання стовбурових клітин тваринного організму» (*затверджено науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України, протокол № 1 від 23.12.2010 р.*); «Використання мезенхімальних стовбурових клітин для корекції репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів» (*затверджено науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 21.12. 2012 р.*).

3. Спосіб отримання кісткового мозку в ділянці проксимального епіфізу плечової та дистального епіфізу стегнової кісток дрібних тварин рекомендується використовувати у клінічній практиці ветеринарної медицини, як низькотравматичний та простий у виконанні.

4. Для оцінки імунофенотипового профілю мезенхімальних стовбурових клітин щурів, кролів, собак і коней пропонується використовувати імуноцитохімічний аналіз із застосуванням таких моноклональними антитіл: PCNA (clone PC-10, NeoMarkers), Ki-67 (clone RB-9043-PO, Neomarkers), CD44 (clone 156-3C11, DiagnosticBioSystems), PanMuscleActin (clone 1a45C5, DiagnosticBioSystems), E-cadherin (clone SPM 471, ThermoScientific), N-cadherin (clon CD 325, ThermoScientific), віментин (clon V9, DiagnosticBioSystems).

5. Для клітинно-регенеративної терапії пропонується використовувати хелатуючу дисоціацію клітинного матеріалу, оскільки використання етилендіамінтетраоцтової кислоти, на відмінну від трипсину, дає можливість на ранніх пасажах культивування *in vitro* отримати культуру мезенхімальних стовбурових клітин із стабільним каріотипом.

6. Для лабораторної практики пропонуються методи виділення і культивування *in vitro* стовбурових клітин різних видів тварин, які захищені сімома патентами України на корисну модель.

7. Результати досліджень можуть бути використані у клінічній практиці як один із методів лікування тендопатій у спортивних коней і собак за допомогою алогенних стовбурових клітин.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДОСЛІДЖЕНЬ

Монографія

1. Стовбурові клітини у ветеринарній медицині. Том перший. Експериментальні дослідження з отримання, зберігання і застосування мезенхімальних стовбурових клітин: [монографія] / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ковпак В. В., Харкевич Ю. О., Журба В. І.] // Київ: Компрінт. – 2013. – 265 с. *(Здобувач брав участь у підготовці і редагуванні монографії).*

Статті у наукових фахових виданнях України:

2. Застосування різних методів дезагрегації первинного матеріалу стовбурових клітин з метою виведення їх із дормантного стану / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ткаченко С. М., Данілов В. Б., Ковпак В. В.] // Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2009. – Вип. 2 (23). – С. 84–89. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень узагальненні отриманих результатів і написання статті).*

3. Імунофенотиповий профіль клітин кісткового мозку щурів на різних пасажах *in vitro* / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Безденежних Н. О., Харкевич Ю. О., Кудрявцев Ю. Й.] // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва». – 2012. – Вип. 172. – Ч. 3. – С. 171–179. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень узагальненні отриманих результатів і написання статті).*

4. Деякі показники імунного статусу тварин-реципієнтів при введенні чужорідних клітин у кров / [Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В., Харкевич Ю. О., **Малюк М. О.**, Данілов В. Б.] // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва». – 2012. – Вип. 172. – Ч. 4. – С. 122–127. *(Здобувач дослідив вплив сироватки крові та лімфоцитів на життєздатність та проліферативну активність стовбурових клітин щурів *in vitro*).*

5. До методики отримання кісткового мозку та культивування стовбурових клітин поні / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Харкевич Ю. О., Бруско Є. П.] // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів і кормових добавок. – 2013. – Вип. 14. – № 3, 4. – С. 308–314. *(Здобувач брав участь у дослідженнях, узагальнив отримані дані, готував статтю до друку).*

6. Малюк М. О. Ефективність клонування первинних мультипотентних стовбурових клітин кісткового мозку кролів за різних умов зберігання / М. О. Малюк // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва». – 2013. – Вип. 188. – Ч. 4. – С. 167–170.

7. Дослідження каріотипу мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатику лошат під час культивування *in vitro* / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Стародуб Л. Ф., Копилов К. В.] // Ветеринарна медицина. – 2014. – № 99. –

С. 217–221. (Здобувач розробив схему досліджень, узагальнив отримані результати, брав участь у написанні статті).

8. Імунофенотипова характеристика та цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня на ранніх пасажах культивування *in vitro* / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Безденежних Н. О., Стародуб Л. Ф.] // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва». – 2014. – Вип. 201. – Ч. 1. – С. 100–108. (Здобувач виконав експериментальну частину роботи, статистичне опрацювання результатів та оформлення статті).

9. Малюк М. О. Пуповинний канатик – альтернативне джерело мезенхімальних стовбурових клітин у собак / М. О. Малюк / Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. Серія «Ветеринарні науки». – 2014. – Т. 16. – № 2 (59). – Ч. – 2. – С. 219–225.

10. Мазуркевич А. Й. Цитогенетичний контроль мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня на ранніх пасажах культивування *in vitro* / А. Й. Мазуркевич, **М. О. Малюк**, Л. Ф. Стародуб // Ветеринарна медицина. – 2014. – № 6 (220). – С. 32–34. (Здобувач виконав експериментальну частину роботи, статистичне опрацювання результатів та оформлення статті).

11. Мазуркевич А. Й. Цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів на ранніх пасажах культивування *in vitro* / А. Й. Мазуркевич, **М. О. Малюк**, Л. Ф. Стародуб // Науковий вісник Львівської національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького. – 2015. – Т. 17. – № 1 (61). – Ч. 2. – С. 100–107. (Здобувач виконав експериментальну частину роботи, статистичне опрацювання результатів та оформлення статті).

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних:

12. Малюк М. О. Імунофенотиповий профіль мультипотентних стовбурових клітин кісткового мозку кролів на пізніх пасажах *in vitro* / М. О. Малюк // Біологія тварин. – 2013. – Т. 5. – № 4. – С. 66–73.

13. Малюк М. О. Клоногенна активність первинної культури фібробластоподібних клітин пупкового канатика лоша / М. О. Малюк // Тваринництво України. – 2014. – № 8, 9. – С. 36–40.

14. Малюк М. О. Імунологічні показники крові тварин-реципієнтів під впливом алогенних стовбурових клітин / М. О. Малюк // Тваринництво України. – 2014. – № 5. – С. 27–31.

15. Біологічна активність стовбурових клітин із кісткового мозку коня / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ковпак В. В., Харкевич Ю. О.] // Тваринництво України. – 2014. – № 2. – С. 21–24. (Здобувач виконав експериментальну частину роботи, статистичне опрацювання результатів та оформлення статті).

16. Мезенхімальні стовбурові клітини пупкового канатика лоша на ранніх пасажах культивування *in vitro* / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Безденежних Н. О., Стародуб Л. Ф.] // Тваринництво України. – 2014. – № 12. –

С. 43–47. *(Здобувач виконав експериментальну частину роботи, статистичне опрацювання результатів та оформлення статті).*

17. Вивчення біосумісності гемостатичних губок із стовбуровими клітинами кісткового мозку кроля під час культивування *in vitro* / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ткаченко С. М., Харкевич Ю. О.] // Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2014. – Вип. 1 (34). – С. 7–11. *(Здобувач виконав експериментальну частину роботи, статистичне опрацювання результатів та оформлення статті).*

18. До методики отримання кісткового мозку у собак / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ткаченко С. М., Харкевич Ю. О.] // Біологія тварин. – 2014. – Т. 16. – № 2. – С. 66–70. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень і написанні статті).*

19. Остеогенна та адипогенна диференціація мезенхімальних стовбурових клітин собак / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ковпак В. В., Харкевич Ю. О.] // Ветеринарна медицина. – 2015. – № 153. – С. 153–156. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень і написанні статті).*

20. Каріотиповий аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів за різних методів дисоціації клітинного моношару на ранніх пасажах культивування *in vitro* / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Стародуб Л. Ф., Данілов В. Б.] // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України: Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва». – 2015. – Вип. 227. – С. 159–164. *(Здобувач виконав експериментальну частину роботи, статистичне опрацювання результатів та оформлення статті).*

21. Мазуркевич А. Й. Цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кроля на ранніх пасажах культивування при дисоціації клітинного моношару за допомогою етилендіамінтетраоцтової кислоти / А. Й. Мазуркевич, **М. О. Малюк**, Л. Ф. Стародуб // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2015. – №8 (57). – Режим доступу до журналу: http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/index.html. *(Здобувач виконав експериментальну частину роботи, статистичне опрацювання результатів та оформлення статті).*

Статті у науковому виданні України,

включеному до міжнародної наукометричної баз даних:

22. Мазуркевич А. Й. Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку собак на ранніх пасажах культивування *in vitro* / А. Й. Мазуркевич, **М. О. Малюк**, Л. Ф. Стародуб // Тваринництво України – 2015. – № 7. – С. 40–42. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень і написанні статті).*

23. Малюк М. О. Вплив стовбурових клітин на відновлення ушкодженого сухожилку кролів / **М. О. Малюк**, В. В. Лісова // Тваринництво України – 2015. – № 11. – С. 26–29. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень і написанні статті).*

**Статті у наукових виданнях інших держав,
включених до міжнародних наукометричних баз даних:**

24. Иммунофенотипический профиль соматических стволовых клеток костного мозга кролика на ранних пассажах *in vitro* / [Мазуркевич А. И., **Малюк Н. А.**, Безденежных Н. А., Харкевич Ю. А., Адаменко И. Н., Кудрявец Ю. И.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины». – 2013. – Т. 49. – Вып. 2. – Ч. 1. – С. 102–106. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень і написанні статті).*

25. Иммунофенотипический профиль мультипотентных стволовых клеток костного мозга собаки при культивировании *in vitro* на ранних пассажах / [Мазуркевич А. И., **Малюк Н. А.**, Безденежных Н. А., Харкевич Ю. А., Адаменко И. Н., Кудрявец Ю. И.] // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2014. – № 1 (21). – С. 17–23. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень і написанні статті).*

26. Малюк Н. А. Иммунофенотипический профиль мезенхимальных стволовых клеток костного мозга лошади на ранних пассажах *in vitro* / **Н. А. Малюк**, Н. А. Безденежных, И. Н. Адаменко // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины». – 2015. – Т. 51. – Вып. 1. – Ч. 1. – С. 88–91. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень і написанні статті).*

Статті в інших наукових виданнях:

27. Мазуркевич А. Й. Перспективи застосування стовбурових клітин у ветеринарній медицині / А. Й. Мазуркевич, **М. О. Малюк**, В. В. Ковпак // Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини ім. С. З. Ґжицького. – 2006. – Т. 8. – № 4 (31). – Ч. 2. – С. 128–134. *(Здобувач брав участь у аналізі літературних джерел і написанні статті).*

28. До отримання та культивування стромальних стовбурових клітин / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ковпак В. В., Лукаш Л. Л.] // Ветеринарна медицина. – 2007. – № 88. – С. 300–305. *(Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень узагальненні отриманих результатів і написання статті).*

Підручники:

29. Патологічна фізіологія і патологічна анатомія тварин: [підручник] / [Мазуркевич А. Й., Урбанович П. П., Василик Н. С., Данілов В. Б., Данкович Р. С., Жила М. І., Карповський В. І., Коцюмбас Г. І., Куц Н. В., **Малюк М. О.**, Стояновський В. Г., Стронський М. І., Шкіль М. І.] // Вінниця. Нова книга. – 2008. – 343 с. *(Здобувач брав участь у підготовці і редагуванні підручника).*

30. Патофізіологія тварин: [підручник] / [Мазуркевич А. Й., Тарасевич В. Л., Данілов В. Б., **Малюк М. О.**, Карповський В. І., Ковпак В. В.]. – Київ. Агроосвіта. – 2013. – 413 с. *(Здобувач брав участь у підготовці і редагуванні підручника).*

Навчальні посібники:

31. Ветеринарна імунологія. Практикум / [Мазуркевич А. Й., Скибіцький В. Г., Харкевич Ю. О., Данілов В. Б., **Малюк М. О.**, Ковпак В. В.] // Київ: Агроосвіта. – 2014. – 168 с. *(Здобувач брав участь у підготовці посібника).*

32. Клітинні технології у ветеринарній медицині. Навчальний посібник / [Мазуркевич А. Й., Данілов В. Б., Ковпак В. В., **Малюк М. О.**] // Київ: Компрінт. – 2014. – 131 с. *(Здобувач брав участь у підготовці посібника).*

Патенти:

33. Патент України на корисну модель № 50905 Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку собак із високою проліферативною активністю / Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ковпак В. В., Харкевич Ю. О., Сушко М. І.; заявник і власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. – № у 2009 13880; заявл. 29.12.2009; опубл. 25.06.2010, Бюл. № 12. *(Здобувач брав участь у дослідженнях, аналізував отримані результати, брав участь у підготовці матеріалів до патентування).*

34. Патент України на корисну модель № 40805. Спосіб прижиттєвого отримання стромальних стовбурових клітин кісткового мозку тварин / Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ткаченко С. М., Ковпак В. В.; заявник і власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. – № 2008 13659; заявл. 26.11.2008. опубл. 27.04.2009. Бюл. № 8. *(Здобувач брав участь у дослідженнях, аналізував отримані результати, брав участь у підготовці матеріалів до патентування).*

35. Патент України на корисну модель № 46600. Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку кролів із високою проліферативною активністю / Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ковпак В. В., Харкевич Ю. О., Сушко М. І.; заявник і власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. – № у 2009 07829; заявл. 24.07.2009; опубл. 25.12.2009, Бюл. № 24. *(Здобувач брав участь у дослідженнях, аналізував отримані результати, брав участь у підготовці матеріалів до патентування).*

36. Патент України на корисну модель № 86839. Спосіб прижиттєвого отримання кісткового мозку у дрібних тварин / Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ткаченко С. М., Харкевич Ю. О.; заявник і власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. – № у 2013 09303; заявл. 25.07.2013; опубл. 10.01.2014. Бюл. № 1. *(Здобувач брав участь у дослідженнях, аналізував отримані результати, брав участь у підготовці матеріалів до патентування).*

37. Патент України на корисну модель № 89267. Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку коней із високою проліферативною активністю / Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ковпак В. В., Харкевич Ю. О.; заявник і власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. – № у 2013 14118; заявл. 04.12.2013; опубл. 10.04.2014. Бюл. № 7. *(Здобувач брав участь у дослідженнях, аналізував отримані результати, брав участь у підготовці матеріалів до патентування).*

38. Патент України на корисну модель № 93756. Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин із пупкового канатику собак /

Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Дорощук В. О., Павленко В. М., Харкевич Ю. О.; заявник і власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. – № у 2014 05423; заявл. 21.05.2014; опубл. 10.10.2014, Бюл. № 19. *(Здобувач брав участь у дослідженнях, аналізував отримані результати, брав участь у підготовці матеріалів до патентування).*

39. Патент України на корисну модель № 93756. Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин із пупкового канатику коней / Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Харкевич Ю. О., Стародуб Л. Ф., Маслова О. О., Бруско Є. П.; заявник і власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. – № у 2014 07751; заявл. 10.07.2014; опубл. 10.12.2014, Бюл. № 23. *(Здобувач брав участь у дослідженнях, аналізував отримані результати, брав участь у підготовці матеріалів до патентування).*

Методичні рекомендації:

40. Методичні рекомендації. Отримання, культивування, кріоконсервування та використання стовбурових клітин тваринного організму / [Мазуркевич А. Й., Карповський В. І., **Малюк М. О.**, Данілов В. Б., Ковпак В. В., Харкевич Ю. О.]. – Київ, 2010. – 24 с. *(Розглянуто та затверджено науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України, протокол № 1 від 23.12.2010 р. Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень і написанні рекомендацій).*

41. Методичні рекомендації. Використання мезенхімальних стовбурових клітин для корекції репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів / [Мазуркевич А. Й., Данілов В. Б., **Малюк М. О.**, Ковпак В. В., Харкевич Ю. О., Журба В. І.]. – Київ, 2012. – 42 с. *(Розглянуто та затверджено науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 21.12.2012 р. Здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень і написанні рекомендацій).*

Тези наукових доповідей:

42. Перспективи використання плюрипотентних стовбурових клітин у ветеринарній медицині / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Данілов В. Б., Куц Н. В., Ковпак В. В.] // Матеріали конференції професорсько-викладацького складу, наукових співробітників і аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва. – Київ, 16–17 березня 2007 р. – С. 76–77. *(Здобувач провів аналіз літературних джерел, підготовку наукової доповіді до друку).*

43. Прижиттєве отримання плюрипотентних стовбурових клітин від лабораторних тварин / [Мазуркевич А. Й., **Малюк М. О.**, Ткаченко С. М., Ковпак В. В.] // Матеріали конференції професорсько-викладацького складу, наукових співробітників і аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва. – Київ, 11–12 березня 2008 р. – С. 77–78. *(Здобувач провів аналіз літературних джерел, отримання та культивування клітин, підготовку наукової доповіді до друку).*

44. К методике получения и культивирования плюрипотентных стволовых клеток млекопитающих / [Мазуркевич А. И., **Малюк Н. А.**, Данилов В. Б., Ковпак В. В.] // Материалы международной научной конференции по патофизиологии животных, посвященной 200-летию ветеринарного образования в России и 200-летию СПбГАВМ. – Санкт-Петербург, 5–6 июня 2008 г. – С. 54–55. *(Здобувач провів аналіз літературних джерел, отримання та культивування клітин, підготовку наукової доповіді до друку).*

45. Порівняльна ефективність механічної та ферментативної дезагрегації первинного клітинного матеріалу / [Мазуркевич А. И., **Малюк М. О.**, Ткаченко С. М., Данилов В. Б., Ковпак В. В.] // Матеріали конференції професорсько-викладацького складу, наукових співробітників і аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва. – Київ, 12–13 березня 2009 р. – С. 101–102. *(Здобувач провів аналіз літературних джерел, отримання та культивування клітин, провів інтерпретацію отриманих результатів).*

46. Отримання, культивування та диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин собак / [Мазуркевич А. И., **Малюк М. О.**, Данилов В. Б., Ковпак В. В., Харкевич Ю. О., Сушко М. І.] // Матеріали конференції професорсько-викладацького складу, наукових співробітників і аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва. – Київ, 10–11 березня 2010 р. – С. 38–39. *(Здобувач провів аспірацію кісткового мозку, отримання та культивування клітин, провів інтерпретацію отриманих результатів).*

47. Цитотоксична активність лімфоцитів крові щурів щодо алогенних мезенхімальних стовбурових клітин та ембріональних фібробластів / [Мазуркевич А. И., **Малюк М. О.**, Данилов В. Б., Ковпак В. В., Харкевич Ю. О.] // Матеріали конференції професорсько-викладацького складу, наукових співробітників і аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва. – Київ, 2011. – С. 42–43. *(Здобувач брав участь у дослідженнях, узагальненні отриманих результатів).*

48. Изменение некоторых показателей иммунного статуса животных-реципиентов при трансплантации клеток разного происхождения / [Мазуркевич А. И., Ковпак В. В., **Малюк Н. А.** Данилов В. Б., Харкевич Ю. О.] // Материалы международной научной конференции по патофизиологии животных, посвященной 90-летию кафедры патологической физиологии ФГОУ ВПО «СПбГАВМ». – Санкт-Петербург, 2011. – С. 67–69. *(Дисертант брав участь у дослідженнях, узагальненні отриманих результатів та виступав з доповіддю).*

49. Оцінка якості мультипотентних стовбурових клітин тварин на різних етапах культивування / [**Малюк М. О.**, Ковпак В. В., Харкевич Ю. О., Мазуркевич А. Й.] // Наукові здобутки молоді у вирішенні актуальних проблем виробництва та переробки сировини, стандартизації і безпеки продовольства: II Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, аспірантів і студентів. – Київ, 20–22 квітня 2012 р.: тези доповідей. – С. 420–421. *(Здобувач провів аспірацію кісткового мозку, отримання та культивування клітин, написання наукової доповіді).*

50. Мазуркевич А. Й. Культивування *in vitro* гемостатичних губок із соматичними мультипотентними стовбуровими клітинами кроля / А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, С. М. Ткаченко // Актуальні проблеми наук про життя та природокористування: II Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, Київ, 16–18 жовтня 2013 р.: тези доповідей. – С. 37–38. (*Розробка ідеї, аналіз літератури, отримання та культивування клітин, написання тез доповідей*).

51. Мазуркевич А. Й. Каріотиповий аналіз мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатику лошат на ранніх пасажах культивування *in vitro* / А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, Л. Ф. Стародуб // Природне агро-виробництво в Україні: проблеми становлення, перспективи розвитку» секція «Екологічне тваринництво та рибництво»: Міжнародна науково-практична конференція, м. Дніпропетровськ, 20–22 жовтня 2015 р. – С. 240–242. (*Здобувач провів аспірацію кісткового мозку, отримання та культивування клітин, підготовку наукової доповіді до друку*).

АНОТАЦІЯ

Малюк М. О. Властивості стовбурових клітин та науково-експериментальне обґрунтування їх застосування у ветеринарній медицині. – 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, 2015.

У дисертаційній роботі вирішено актуальне питання ветеринарної медицини – досліджено властивості мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) тварин. Представлено імуноцитохімічні та цитогенетичні дослідження, які розкривають сучасні уявлення про біологію МСК залежно від їх видової належності, способів отримання, умов культивування та пасажування, а також їх вплив на оптимізацію репаративних процесів в експериментально ушкодженому сухожилку тварин.

За результатами проведених досліджень встановлено, що оптимальними умовами для отримання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку коней, збагаченої популяцією мезенхімальних стовбурових клітин, є центрифугування суспензії клітин кісткового мозку у градієнті щільності фікол-тріомбразу $\rho=1,076$ за відцентрової сили 300 g.

На основі імуноцитохімічних досліджень встановлено, що МСК кісткового мозку щурів, кролів, собак і коней на ранніх пасажах культивування є гетерогенними. Вони експресують маркери мезенхімальних (віментин, актин), м'язових, епітеліальних і нервових (Е-кадгерин, N-кадгерин) клітин.

Підтверджено мультипотентні властивості МСК кісткового мозку собак за властивістю диференціюватися в остеогенному та адипогенному напрямках.

Доведено супресивний вплив МСК, введених кролям у кровноносне русло, на різні субпопуляції клітин лімфоцитарного ряду, про що свідчить достовірне зниження загальної кількості популяцій Т-, В- і 0-лімфоцитів у крові цих тварин.

За допомогою цитогенетичного аналізу досліджено, що використання хелатуючої дисоціації моношару МСК кролів має переваги над застосуванням ферментативного методу дисоціації, оскільки в меншій мірі впливає на їх цитогенетичну мінливість і дає можливість отримати культуру клітин із меншими кількісними змінами хромосомного апарату (анеуплоїдія, поліплоїдія).

Встановлено, що у кістковому мозку кролів існує резистентна фракція стовбурових клітин, яка здатна до активного клонування після 48 годин зберігання первинного матеріалу за температури 4 °С.

Доведено, що введення в ушкоджений загальний п'ятковий сухожилок алогенних МСК активізує на 7 та 21 добу процеси регенерації, що проявлялось відновленням його структурно-функціональної організації.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, кістковий мозок, пупковий канатик, імуноцитохімічний аналіз, цитогенетичний аналіз, поліплоїдія, анеуплоїдія, лімфоцити, тендиноцити.

АННОТАЦІЯ

Малюк Н. А. Свойства стволовых клеток и научно-экспериментальное обоснование их использования в ветеринарной медицине. – 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, 2016.

В диссертационной работе решен актуальный вопрос ветеринарной медицины – исследованы свойства стволовых клеток животных как основы клеточных технологий. Представленные иммуноцитохимические и цитогенетические исследования раскрывают современные представления о биологии мезенхимальных стволовых клеток независимо от видовой принадлежности, способов выделения, условий культивирования и пассажирования, а также их влияние на оптимизацию репаративного процесса в экспериментально поврежденном сухожилии животных.

Центрифугирование суспензии клеток костного мозга лошадей в градиенте плотности фикола-триомбраста является эффективным методом выделения фракции моноклеарных клеток из аспирата костного мозга. Оптимальными условиями для выделения фракции моноклеарных клеток костного мозга лошадей, обогащенной популяцией мезенхимальных стволовых клеток (МСК), является центрифугирование суспензии клеток костного мозга в градиенте плотности фикола-триомбраста $\rho=1,076$ при центробежной силе 300 g.

С помощью механической дезагрегации пупочного канатика щенков, получается выделить фибробластоподобные клетки с высокими адгезивными и пролиферативными свойствами. Для пупочного канатика жеребят оптимальными условиями для выделения фибробластоподобных клеток с высокими адгезивными и пролиферативными свойствами является метод ферментативной дезагрегации (36-часовая холодная трипсинизация).

МСК костного мозга крыс, кролей, собак и лошадей на ранних пассажах культивирования являются гетерогенными. Они экспрессируют маркеры мезенхимальных (виментин, актин), мышечных, эпителиальных и нервных

(E-кадгерин, N-кадгерин) клеток, что является важным показателем во время дифференцирования этих клеток.

Доказано, что МСК животных разных видов имеют перекрестно-реагирующие антигены. В частности антигены МСК костного мозга крыс, кролей, собак и лошадей, а также пупочного канатика жеребят имеют общий эпитоп, что подтверждается их взаимодействием с такими моноклональными антителами: PCNA (clone PC-10, NeoMarkers), Ki-67 (clone RB-9043-PO, Neomarkers), CD44 (clone 156-3C11, DiagnosticBioSystems), PanMuscleActin (clone 1a45C5, DiagnosticBioSystems), E-cadherin (clone SPM 471, ThermoScientific), N-cadherin (clone CD 325, ThermoScientific), виментин (clone V9, DiagnosticBioSystems).

МСК костного мозга собак, которые культивируются в стандартной питательной среде, являются гетерогенными. Эти клетки способны к направленному дифференцированию в остеогенном и адипогенном направлениях, что подтверждается высокой активностью в цитоплазме клеток эндогенной щелочной фосфатазы, отложением в межклеточном матриксе солей кальция и формированием в цитоплазме клеток вакуолей, которые содержат нейтральные жиры.

Установлено супрессивное влияние МСК, введенных кролям в кровь, на разные субпопуляции клеток лимфоцитарного ряда, о чем свидетельствует достоверное снижение количества популяций Т-, В- и 0-лимфоцитов в крови этих животных.

Отмечено, что использование хелатирующей диссоциации клеточного материала культуры МСК кролей с помощью этилендиаминтетрауксусной кислоты на ранних пассажах культивирования имеет превосходство над использованием ферментативного метода диссоциации, поскольку в меньшей степени влияет на их цитогенетическую изменчивость и дает возможность на ранних пассажах получить культуру клеток с меньшими количественными изменениями хромосомного аппарата (анеуплоидия, полиплоидия).

Установлено достоверное повышение количества нарушений хромосом (анеуплоидия) в популяциях МСК костного мозга собаки III и IV пассажей сравнительно с клетками I пассажа соответственно на 50,6 и 100,6 %. Процент стволовых клеток из анеуплоидией III и IV пассажей составлял 25,0 и 33,3 %. Клеток с кратным увеличением числа хромосом (полиплоидия) и структурными нарушениями не выявлено.

Изменчивость кариотипа мезенхимальных стволовых клеток лошади III и IV пассажей соответствует спонтанному уровню, характерному для этого вида животных. Анеуплоидия III и IV пассажей становила 1,4 и 1,2 %, соответственно. Во время культивирования мезенхимальных стволовых клеток пупочного канатика жеребят с увеличением численности пассажей, увеличивается количество клеток с измененным геномом, которое характеризуется увеличением количества метафазных пластинок с анеуплоидией и наличием в клетках тетраплоидного кариотипа, а также повышение параметров микроядерного теста.

Установлено, что в костном мозге кролей существует резистентная фракция стволовых клеток, которая способна к активному клонированию после 48 часов хранения клеточной массы при температуре 4 °С.

Доказано, что введение в сухожилие алогенных мезенхимальных стволовых клеток активизирует процессы восстановления поврежденной ткани. О чем свидетельствуют выраженные процессы регенерации ткани общего пяточного сухожилия на 7 и 21 сутки, которые характеризуются интенсивным митотическим делением клеточных элементов в месте введения стволовых клеток, формированием коллагеновых волокон первого, второго и третьего порядка и восстановлением структурно-функциональной организации общего пяточного сухожилия.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, костный мозг, пупочный канатик, иммуноцитохимический анализ, цитогенетический анализ, полиплоидия, анеуплоидия, лимфоциты, тендиноциты.

ANNOTATION

Malyuk M. O. Properties of stem cells and scientific-experimental study of their use in veterinary medicine. – The manuscript.

The thesis for the scientific degree of doctor of veterinary sciences, specialty 16.00.02 – pathology, oncology and morphology of animals. – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

In the thesis is solved the topical issue of veterinary medicine – the investigation of the properties of mesenchymal stem cells (MSC) of animals. Presented immunohistochemical and cytogenetic studies reveals the current understanding about the biology of MSC depending on the species of an animal, methods of obtaining, conditions of cultivation and passaging and their impact on the optimization of reparative processes in experimental damaged tendon of animals.

Was established that optimal conditions for obtaining the fraction of mononuclear cells from the bone marrow of horses which are enriched by population of MSC are centrifugation of bone marrow cell suspension in ficoll density gradient $\rho=1,076$ with centrifugal force of 300 g.

MSC of the bone marrow of rats, rabbits, dogs and horses and the umbilical cord of foals are heterogeneous, that confirmed by immunohistochemical studies. They express markers of mesenchymal (vimentin, actin), muscle, epithelial and nerve (E-cadherin, N-cadherin) cells.

Confirmed the multipotent properties of MSC of the bone marrow of dogs by their ability to differentiate in osteogenic and adipogenic directions.

It was proved the suppressive effect of MSC on the different subpopulation of lymphocytes after their administration into bloodstream of rabbits, that confirmed by the significant reduction in the total populations of T-, B- and 0-lymphocytes in the blood of these animals.

It was established that using of chelating dissociation of MSC monolayer of rabbits by using the ethylenediaminetetraacetic acid at early passages of cultivation has advantages over using the enzymatic method of dissociation with a solution of trypsin, because of less impact on their cytogenetic variability that allows to get the cell culture with less quantitative and qualitative changes in chromosome apparatus of cells (aneuploidy, polyploidy).

It was established that in a rabbit bone marrow exist a resistant stem cells population that is able to active cloning after 48 hours of storage of primary material at 4 °C.

It was proved that intratendon administration of allogeneic MSC activates on the 7th and 21st day the recovery of damaged tissues, that were manifested by the restoration of the structural and functional organization of a Achilles tendon.

Key words: mesenchymal stem cells, bone marrow, umbilical cord, immunocytochemistry analysis, cytogenetic analysis, polyploidy, aneuploidy, lymphocytes, tendinocytes.