

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

КОВПАК ОКСАНА СЕРГІЇВНА

УДК 57.085.23:616.127-005.8

**БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТА ЇХ ВПЛИВ
НА ВІДНОВЛЕННЯ МІОКАРДА ТВАРИН
ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ШЕМІЧНОГО ІНФАРКТУ**

16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2020

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

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

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

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

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

Захист відбудеться «05» листопада 2020 року о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

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

Автореферат розіслано «02» жовтня 2020 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

В. В. Мельник

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ішемія міокарда – це порушення функції серця, яке викликане недостатнім надходженням крові до його м'язової тканини. Зменшення кровопостачання може бути пов'язане зі звуженням коронарних артерій, коронарним тромбозом чи дифузним звуженням артеріол та інших дрібних судин у серці. Переривання надходження крові до тканин міокарда може призвести до некрозу серцевого м'яза (інфаркт міокарда) (NCBI, 1993).

Коронарні артерії перфузують серце і сприяють транспортуванню поживних речовин і Оксигену в метаболічно активний міокард (Scansen B. A., 2017). Ішемія міокарда, пов'язана з атеросклерозом і обструкцією коронарних артерій, нині є основною причиною смертності у людей і згідно з прогнозами залишиться такою і в 2030 році (Mathers C. D., 2006). Ішемія міокарда й інфаркт, пов'язаний із захворюванням коронарних артерій, також трапляється у дрібних тварин, як собак, так і котів (Falk T., 2000), що може стати причиною раптової смерті чи смерті під час анестезії (Scansen B. A., 2017).

Зважаючи на те, що серце у дорослих ссавців має дуже обмежену здатність до регенерації (Rumyantsev P. P., 1974) і втрачені клітини замінюються фіброзним рубцем (Sutton M. G., 2000), виникає необхідність пошуку методів лікування, що спрямований на відновлення структури серцевого м'яза після ішемії. Клітинні технології є перспективним методом лікування тварин з інфарктом міокарда, що дозволяє відновлювати його структуру та скоротливу функцію (Wang X. J., 2007; Pittenger M. F., 2004; Ко I-К, 2008; Smith R. R., 2008; Jackson K. A., 2001).

Однак, впровадження клітинних технологій у клінічну практику вимагає більш детального викладу протоколів отримання стовбурових клітин, їх культивування та застосування, поглибленого вивчення взаємодії організму-реципієнта із трансплантованими клітинами, ретельного контролю фенотипових і генетичних змін у них для забезпечення високої якості та безпечності застосовуваного клітинного матеріалу у відновлювальній клітинній терапії післяінфарктних змін у міокарді.

У дослідженнях основну увагу зосереджено на стовбурових клітинах культури отриманої з міокарда, як альтернативного джерела клітинного матеріалу за лікування пацієнтів із хворобами серця (Mazurkevych A., 2018; Ковпак В. В., 2016; Ковпак В. В., 2017).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано на базі науково-навчальної лабораторії «Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині» Національного університету біоресурсів і природокористування України як підрозділ наукової тематики за темами: «Вивчення морфофункціональних характеристик патологічно змінених тканин у тварин-реципієнтів при застосуванні стовбурових клітин» (номер державної реєстрації 0111U003428, 2011–2015 рр.) та «Дослідити особливості коригуючої дії введених стовбурових клітин на патологічно змінені структури і функції тканин в організмі тварин-реципієнтів» (номер державної реєстрації 0115U003476, 2015–2017 рр.).

Мета та завдання дослідження. Метою дисертації було дослідити біологічні властивості стовбурових клітин, отриманих з різних джерел, у процесі культивування, та теоретично обґрунтувати й експериментально підтвердити ефективність методу клітинної регенеративної терапії із застосуванням стовбурових клітин, отриманих з різних джерел, на активність відновлення структури міокарда щура, пошкодженого внаслідок експериментального ішемічного інфаркту.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

- дати морфологічну характеристику стовбурових клітин, отриманої з міокарда щура, у процесі їх культивування в системі *in vitro*;
- дослідити фенотип стовбурових клітин культури, отриманої з міокарда щура, з використанням імуноцитохімічних реакцій детекції мембранних білків і тропоніну I;
- проаналізувати каріотипову стабільність стовбурових клітин, отриманих з міокарда щура, в процесі культивування в системі *in vitro*;
- встановити наявність цитотоксичного впливу лейкоцитів та сироватки крові щурів на трансплантовані алогенні стовбурові клітини культури, отриманої з міокарда щура;
- вивчити вплив 5-азацитидину на фенотипові особливості та стабільність каріотипу стовбурових клітин культури, отриманої із червоного кісткового мозку щура;
- дослідити міграційну здатність стовбурових клітин червоного кісткового мозку у зону ушкодження міокарда залежно від способу їх введення в організм тварин-реципієнтів;
- виявити морфологічні зміни у серці щурів за експериментального інфаркту міокарда;
- проаналізувати зміни у серці щурів за експериментального ішемічного інфаркту після трансплантації стовбурових клітин, отриманих із різних джерел;
- з'ясувати вплив способу дезагрегації міокарда та жирової тканини kota на ефективність виділення стовбурових клітин для отримання культури;
- дослідити вплив фактора росту фібробластів (FGF-2), інсуліноподібного фактора росту (IGF-1), гормону росту (rhGH) та Biolaminin 521 LN на проліферативну активність і каріотипову стабільність стовбурових клітин культур kota, отриманих із різних джерел.

Об'єкт дослідження – біологічні властивості стовбурових клітин культур, отриманих із кісткового мозку та міокарда щура і kota та жирової тканини kota; вплив трансплантації стовбурових клітин культур, отриманих з різних джерел, на перебіг експериментально сформованого ішемічного інфаркту у тварин-реципієнтів.

Предмет дослідження – показники біологічної активності стовбурових клітин тварин (щура, kota) у культурі залежно від джерел їх отримання, методів виділення і культивування; показники функціональних змін у міокарді щура з експериментально сформованим інфарктом після трансплантації стовбурових клітин, отриманих із різних джерел.

Методи дослідження: біотехнологічні (культивування клітин); імуноцитохімічні (дослідження імунофенотипової характеристики клітин у культурі); цитогенетичні (аналіз каріотипу клітин); імунологічні (дослідження цитотоксичної активності сироватки та лімфоцитів крові); гістологічні (мікроскопічні дослідження); хірургічні (аспірація червоного кісткового мозку, отримання жирової тканини та серця, трансплантація клітин); статистичні (опрацювання цифрових показників результатів досліджень).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено аналіз біологічної активності стовбурових клітин культур, отриманих із міокарда щура, у процесі культивування в системі *in vitro*. Удосконалено технології виділення та культивування в системі *in vitro* стовбурових клітин kota з червоного кісткового мозку, жирової тканини та міокарда.

Вперше проведено фенотиповий та генетичний аналіз культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку, що піддавалася спрямованій диференціації за впливу 5-азацитидину.

Доведено вплив трансплантації стовбурових клітин культур, отриманих із різних джерел, на зменшення площі некротизованої тканини міокарда щура за експериментального інфаркту.

Наукову новизну отриманих результатів підтверджено патентом на корисну модель «Спосіб отримання культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини котів» та актами впровадження результатів дослідження у клінічну практику.

Практичне значення одержаних результатів. Результати експериментальних досліджень можуть бути використані у клінічній ветеринарній практиці для лікування котів з дистрофічними змінами у серці. Варто зазначити, що різна активність відновлювальних процесів за трансплантації стовбурових клітин, отриманих із різних джерел, дає змогу обрати найбільш раціональний напрям терапії хворих тварин.

Результати оцінки каріотипової та цитогенетичної стабільності стовбурових клітин у культурі залежно від тривалості культивування в системі *in vitro* мають важливе значення для оцінювання їх безпечності. Отримані результати можуть бути використані в подальших наукових дослідженнях властивостей стовбурових клітин тваринного організму та як методичні рекомендації для ветеринарних лікарів-практиків.

Запропоновані комбінації ферментів, що дають змогу збільшити вихід стовбурових клітин з жирової тканини і міокарда kota та оптимізовані умови їх культивування з використанням стимуляторів росту, з метою отримання більшої кількості клітинного матеріалу, придатного для трансплантації, за коротший проміжок часу з використанням меншого об'єму первинного матеріалу. Отримані результати можуть бути використанні як для подальших наукових досліджень, так і у клінічній практиці у процесі застосування клітинних технологій.

Результати досліджень увійшли до науково-методичних рекомендацій: «Методи видоспецифічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній терапії» (затверджено Вченою радою

Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 5 від 27 грудня 2017 р.).

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто здійснено пошук і аналіз літературних джерел за темою дисертації, проведено патентний пошук із досліджуваної проблеми, виконано увесь обсяг експериментальних досліджень, здійснено статистичну обробку цифрових показників, оформлено ілюстративні матеріали та написано дисертацію; аналіз одержаних результатів і формулювання висновків проведено спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації було апробовано в доповідях та обговорено на: Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 150-річному ювілею від дня народження видатного вченого Дедюліна О. В. «Проблеми емерджентних хвороб тварин: молекулярна епізоотологія, експрес-діагностика та біобезпека» (м. Одеса, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Інновації у ветеринарну освіту, науку, виробництво» (м. Київ, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу, аспірантів та студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (м. Київ, 2017 р.); XIII Міжнародній науково-практичній конференції морфологів України «Актуальні проблеми сучасної морфології» (м. Житомир, 2017 р.).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 11 наукових праць, зокрема 3 статті у наукових фахових виданнях України, 4 статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні іншої держави, стаття в іншому науковому виданні України, включеному до міжнародних наукометричних баз даних, патент України на корисну модель, методичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації, вступу, чотирьох розділів, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Загальний обсяг дисертації становить 188 сторінок. Матеріали дисертації проілюстровано 4 схемами, 50 рисунками і 15 таблицями. Список використаних джерел містить 317 найменувань, з яких 273 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження за темою дисертації виконувалися на базі навчально-наукової лабораторії «Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині» кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України, окремі елементи роботи проводилися у лабораторії біотехнології ТОВ «Biotexcom».

У досліджах використовували клінічно здорових тварин (64 самиці білих нелінійних щурів масою тіла 200–250 г і віком 4–5 місяців; 9 білих нелінійних щуренят 12-денного віку; 3 безпородні кішки віком 10 місяців) та завмерлі плоди кошенят, що залишалися після надання рододопомоги.

Котів та щурів утримували у віварії Національного університету біоресурсів і природокористування України в клітках для утримання тварин

відповідного виду з вільним доступом до сухого корму та води. Годівля відповідала потребі тварин кожного виду в поживних і біологічно активних речовинах.

Експерименти на тваринах було проведено з дотриманням вимог Загальних етичних принципів експериментів над тваринами, схвалених Національним конгресом з біоетики і узгоджених з положеннями Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Відомості ВР, 2010).

Дослідження були розділені на декілька етапів, які виконувалися протягом 2015–2018 рр.

Перший етап досліджень передбачав роботу з культурою стовбурових клітин міокарда щура. В його основі було дослідження біологічних особливостей вказаної культури у процесі культивування (дослідження генетичної стабільності отриманої культури; фенотипу культури стовбурових клітин, а також дослідження цитотоксичної активності лейкоцитів та сироватки крові тварин-реципієнтів за трансплантації культури стовбурових клітин).

Другий етап дослідження полягав у вивченні здатності культури стовбурових клітин до міграції у зону пошкодження та направленої диференціації у кардіоміогенному напрямі в системі *in vitro*.

На *третьому етапі* досліджень вивчали макро- та мікроскопічні зміни у серці щура за експериментального формування інфаркту міокарда та за впливу різних видів культур клітин на його перебіг. При цьому порівнювали вплив культури стовбурових клітин міокарда, культури стовбурових клітин кісткового мозку та культури стовбурових клітин жирової тканини.

У процесі *четвертого етапу* досліджень визначали оптимальний метод отримання культур стовбурових клітин міокарда та жирової тканини kota. Також вивчали вплив фактора росту фібробластів (FGF-2), інсуліноподібного фактора росту (IGF-1), гормону росту (rhGH) у різних концентраціях та *Biolaminin 521 LN* на проліферативну активність та генетичну стабільність культур стовбурових клітин кісткового мозку, жирової тканини та міокарда.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Зміна морфології культури стовбурових клітин міокарда щура з пасажами. У процесі вивчення морфології стовбурових клітин міокарда щура було виявлено, що за її отримання методом експланту, первинна культура починає свій ріст зі шматочків тканини, які містилися на дні культурального пластику. Під час культивування у процесі зміни культурального середовища шматочки тканини видалялися (рис. 1а). Під час подальшого культивування встановлено, що первинна культура адгезивних клітин міокарда щура морфологічно гетерогенна, до того ж серед домінуючих епітеліоподібних клітин відмічали незначну кількість веретеноподібних клітин (рис. 1б).

Варто зазначити, що у процесі культивування спостерігали тенденцію до збільшення кількості веретеноподібних клітин з кожним пасажом (рис. 2).

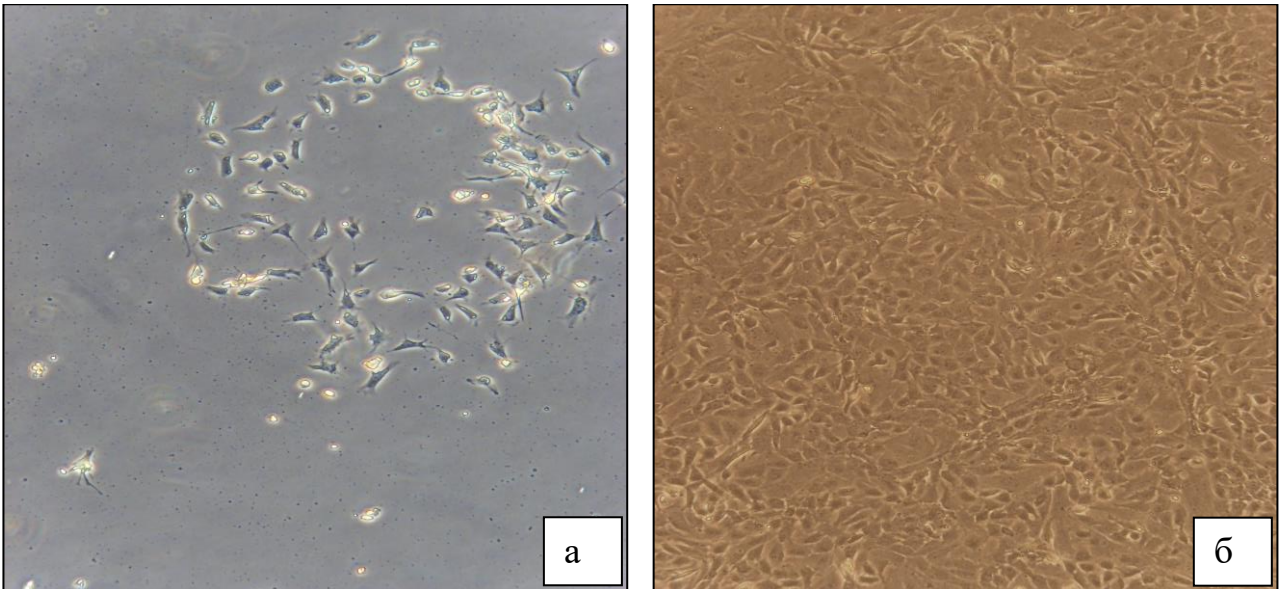


Рис. 1. Мікрофотографії моношару культур стовбурових клітин міокарда щура, 0 пасаж: а) 4 доба; б) 8 доба культивування. Нативні препарати. Збільшення $\times 50$

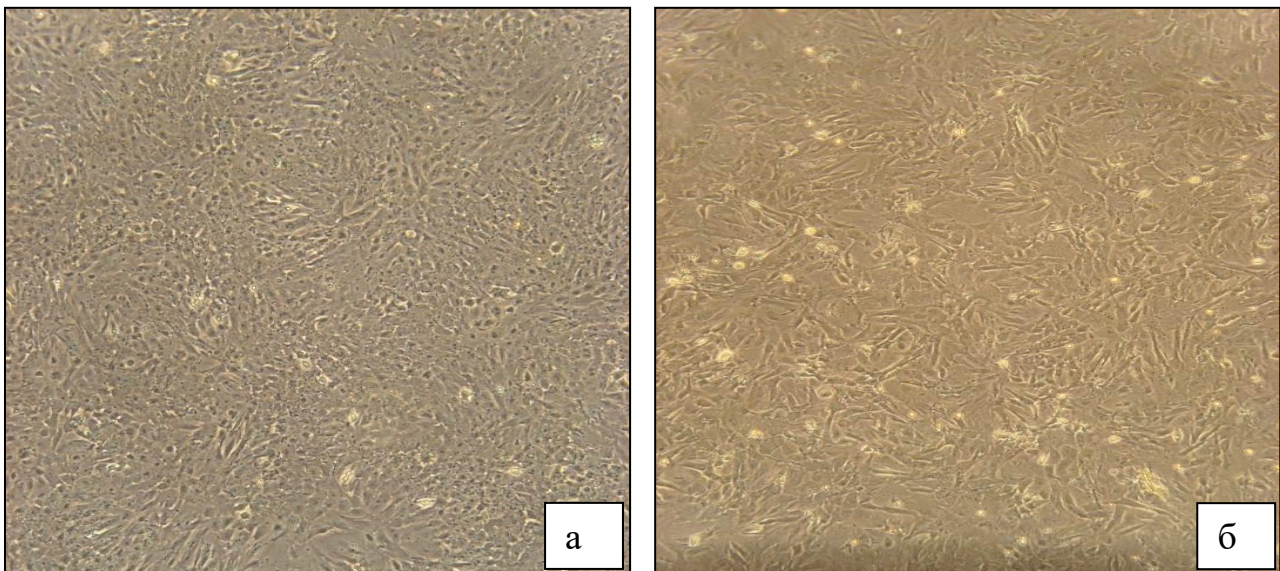


Рис. 2. Мікрофотографії моношару культур стовбурових клітин міокарда щура: а) I пасаж; б) IV пасаж. Нативні препарати. Збільшення $\times 50$

Первинна культура стовбурових клітин міокарду щура досягала конфлюентності 90–100 % у середньому за 8 діб (рис. 1б). В процесі субкультивування час досягнення конфлюентності 70–80 % становив 3 доби.

Отже, у процесі субкультивування культури стовбурових клітин міокарда щура відбувається перехід від гетерогенної культури на 0 пасажі до більш гомогенної культури на IV пасажі.

Характеристика стовбурових клітин культур, отриманих із міокарда, за поверхневими маркерами. У процесі імунофенотипування популяції культури стовбурових клітин, отриманих із міокарда щура, було виявлено зміну експресії досліджуваних поверхневих маркерів з пасажами.

Так, ступінь прояву CD45, CD227 та пан-кератину (рис. 3б) зростав у процесі культивування у межах рівня «відсутність експресії» з $3,3 \pm 3,9$, 0 ± 0 , та 0 ± 0 балів на I пасажі до $23,7 \pm 6,8$, $22,7 \pm 8,9$ та $41,3 \pm 9,1$ балів на IV пасажі відповідно.

Рівень експресії CD66e зростав з помірного ($185,3 \pm 35,8$ балів) на I пасажі до високого ($287,0 \pm 5,8$ балів) рівня на IV пасажі (рис. 3а). Водночас, ступінь прояву CD95 знижувався у процесі культивування у межах помірного рівня з $164,0 \pm 13,4$ балів на I пасажі до $108,3 \pm 8,9$ балів на IV пасажі.

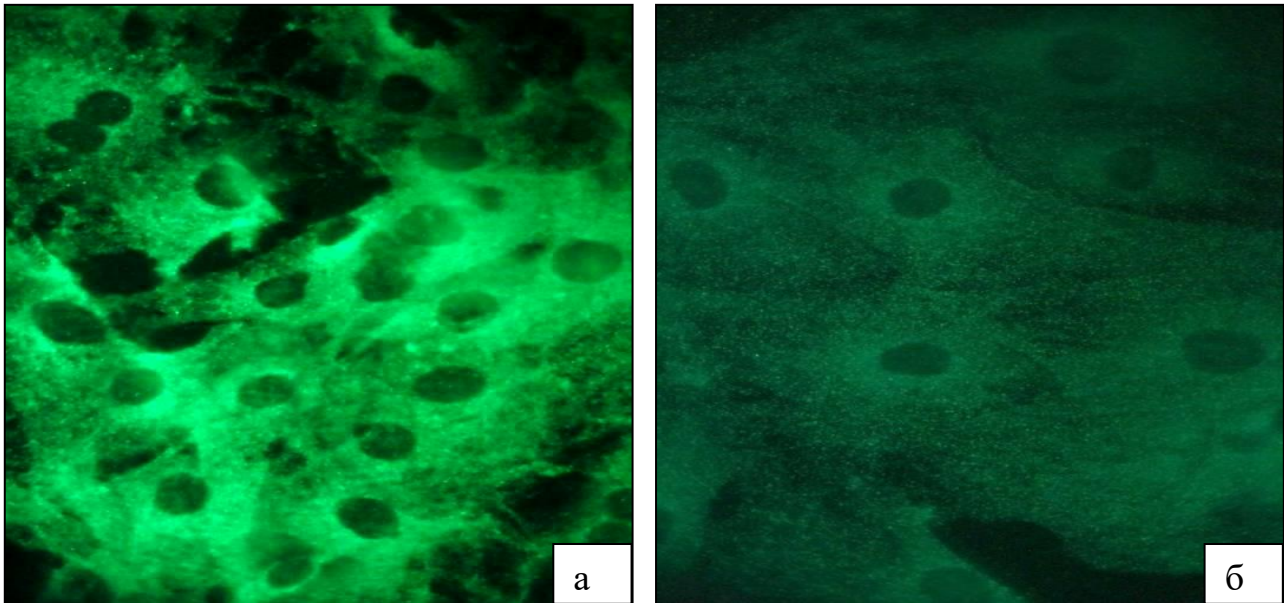


Рис. 3. Рівень експресії поверхневих маркерів у культурі стовбурових клітин міокарда щура, IV пасажі: а) CD66e; б) панкератин. Флуоресцентна мікроскопія. Збільшення $\times 1000$

Упродовж всього часу дослідження не виявлено експресії CD48, CD54 та CD56 (0 ± 0 балів). До того ж рівень експресії CD38 знижувався у межах цього рівня з $22,7 \pm 4,5$ на I пасажі до $18,7 \pm 5,0$ балів на IV пасажі.

Експресія CD10 і тропоніну I знижувалася від високого рівня ($235,7 \pm 35,6$ та $257,0 \pm 23,2$ балів відповідно) на I пасажі до помірного рівня ($170,3 \pm 27,7$ та $181 \pm 9,9$ балів відповідно) на IV пасажі.

Ступінь прояву CD34 зростав від рівня «відсутність експресії» ($8,3 \pm 5,6$ балів) на I пасажі до помірного ($170,0 \pm 19,7$ балів) на IV пасажі, а CD326 – від рівня «відсутність експресії» ($6,3 \pm 3,7$ балів) на I пасажі до низького ($54,0 \pm 8,7$ балів) на IV пасажі.

Цитогенетичний аналіз стовбурових клітин, отриманих із міокарда щура, у процесі культивування. З метою вивчення генетичної стабільності стовбурових клітин, отриманих з міокарда щура, було проаналізовано хромосомну мінливість клітин з I до VI пасажу (табл. 1, рис. 4).

Появу клітин з анеуплоїдним набором хромосом у культурі міокарда щура прослідковували з I до VI пасажу. Варто зазначити, що збільшення відсотка анеуплоїдних клітин спостерігали з I ($3,3 \pm 0$ %) до V ($10,0 \pm 0$ %) пасажу.

Різниця середніх величин за цією ознакою у популяціях клітин III–VI пасажів була достовірно вищою, порівнюючи з I пасажем.

Таблиця 1

Результати цитогенетичного аналізу стовбурових клітин культури міокарда щура I–VI пасажів, $M \pm m$, $n=3$

№ пасажу	Клітини з нормальним каріотипом, %	Анеуплоїдія, %	Поліплоїдія, %
I	94,5±1,3	3,3±0	2,2±1,3
II	93,3±0	5,6±1,3	1,1±1,2
III	90,0±0***	8,9±1,3*	1,1±1,2
IV	90,0±0***	8,9±1,3*	1,1±1,2
V	90,0±0***	10,0±0***	0±0
VI	90,0±0***	10,0±0***	0±0

Примітка. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, порівнюючи з контролем (за контроль взято I пасаж)

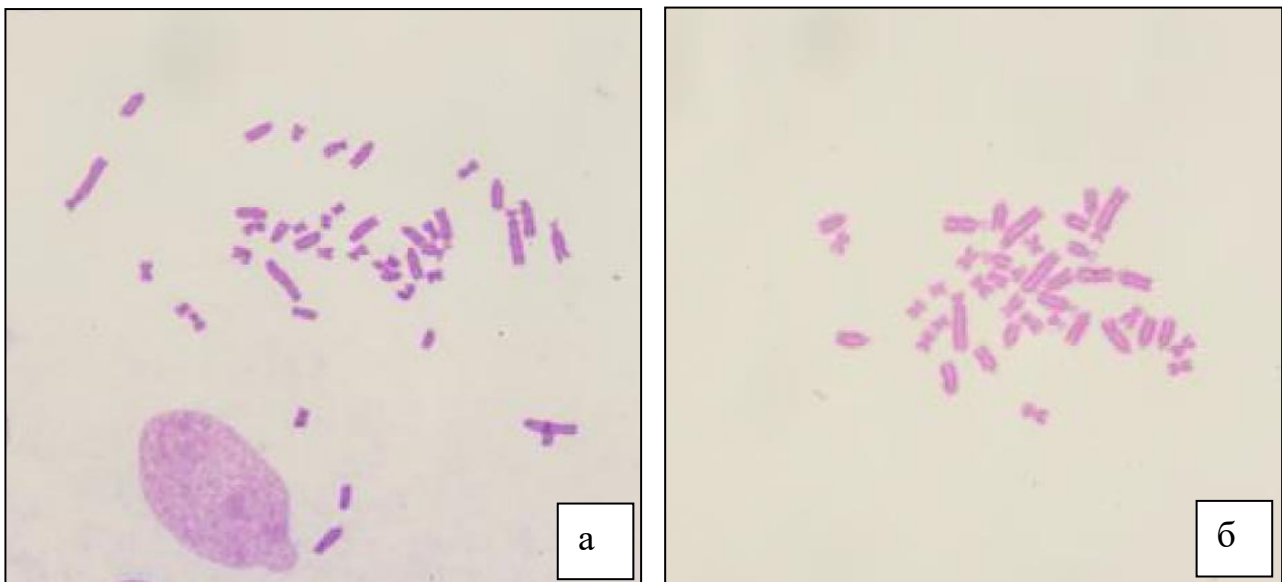


Рис. 4. Мікрофотографії метафазних пластинок щура (I пасаж): а) нормальний каріотип, $n=42$; б) анеуплоїдія, $n=40$. Забарвлення «Лейкодіф 200». Збільшення $\times 1000$

Зауважимо, що значний відсоток прояву анеуплоїдій складала клітини, каріотип яких дорівнював 38 та 76 хромосом за норми 42. Клітини з поліплоїдією, виявляли у культурі стовбурових клітин міокарда щура з I до IV пасажу. У процесі дослідження спостерігали тенденцію до зменшення цієї геномної мутації з $2,2 \pm 1,3$ % на I пасажі до повної її відсутності на VI пасажі. Однак, кількість клітин зі зміненим каріотипом не перевищувала, властивого ссавцям, спонтанного рівня соматичного мутагенезу, який становить 6–15 % (Ковалева О. А., 2008).

Одночасно було проведено мікроядерний тест (рис. 5) для оцінки цитогенетичних змін у стовбурових клітинах культури клітин міокарда щура. Його результати наведено в табл. 2.

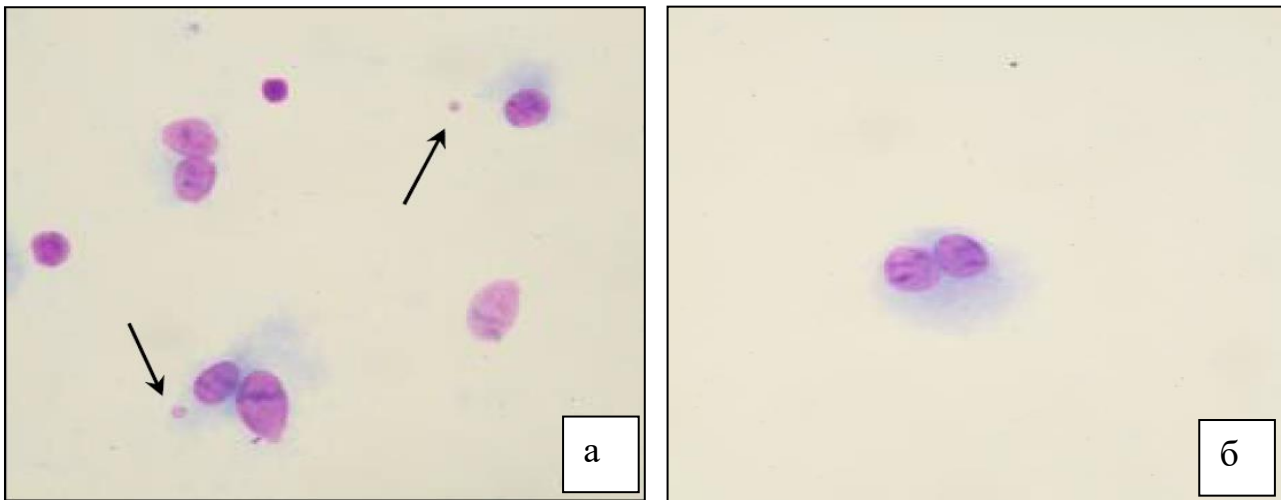


Рис. 5. Мікрофотографії клітин зі змінами у ядрі (IV пасаж): а) клітина з мікроядром (стрілкою вказано мікроядро); б) двоядерна клітина. Забарвлення «Лейкоциф 200». Збільшення $\times 1000$

Таблиця 2

Результати мікроядерного тесту стовбурових клітин культури міокарда щура I–VI пасажів, $M \pm m$, $n=3$

№ пасажу	Клітини з нормальним ядром, %	Клітини з мікроядрами, %	Двоядерні клітини, %	Апоптоз, %	Мітотичний індекс, %
I	99,6 \pm 0	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0 \pm 0	3,7 \pm 0,1
II	99,6 \pm 0	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0 \pm 0	3,4 \pm 0,1
III	99,4 \pm 0***	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0 \pm 0	3,0 \pm 0,1**
IV	99,4 \pm 0***	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0 \pm 0	2,1 \pm 0,1***
V	99,4 \pm 0,1***	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0 \pm 0	1,5 \pm 0,1***
VI	99,4 \pm 0,1***	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0 \pm 0	1,4 \pm 0,1***

Примітка. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, порівнюючи з контролем (за контроль взято I пасаж)

Мікроядра – це патологічні структури, поява яких свідчить про хромосомну нестабільність. У процесі дослідження виявляли клітини з мікроядрами на всіх пасажах (рис. 5а). Варто зазначити, що, починаючи з III пасажу, відсоток клітин з мікроядрами зріс до 0,3 \pm 0,1 %, проте був у межах норми для ссавців (1,6–5,6 %) (Ковалева О. А., 2008).

У процесі дослідження виявляли присутність у культурі стовбурових клітин міокарда щура двоядерних клітин з I до VI пасажу. Їх кількість була незмінною впродовж всього часу дослідження і становила 0,3 \pm 0,1 % та не перевищувала спонтанної мутації, характерної для ссавців (5,4 %) (Ковалева О. А., 2008). Додатково спостерігали достовірне зниження мітотичного індексу з I (3,7 %) до VI (1,4 %) пасажу.

Фенотипові зміни в культурі стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура за впливу 5-азацитидину. Відомо, що 5-азацитидин

індукує диференціювання стовбурових клітин у кардіоміогенному напрямі, що супроводжується змінами у морфології культивованих клітин та експресію ними серцевих маркерів GATA-4, Nkx2.5, тропонін I (Choi S. C., 2004; Qian Q. 2012). Проте наявний недостатній обсяг даних щодо експресії маркерів, характерних для слабодиференційованих (стовбурових) клітин у культурі, що піддавалася впливу 5-азацитидину. Варто зазначити, що інформація щодо стану генетичного апарату вказаних клітин у доступній літературі взагалі відсутня. Вивчення вищеописаних питань і стало наступним завданням.

У процесі культивування на 6–7 добу від початку спрямованої диференціації культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку було відмічено зміну морфології клітин від веретеноподібної до епітеліоподібної (рис. 6). Одночасно відмічалася зниження їх проліферативної активності.

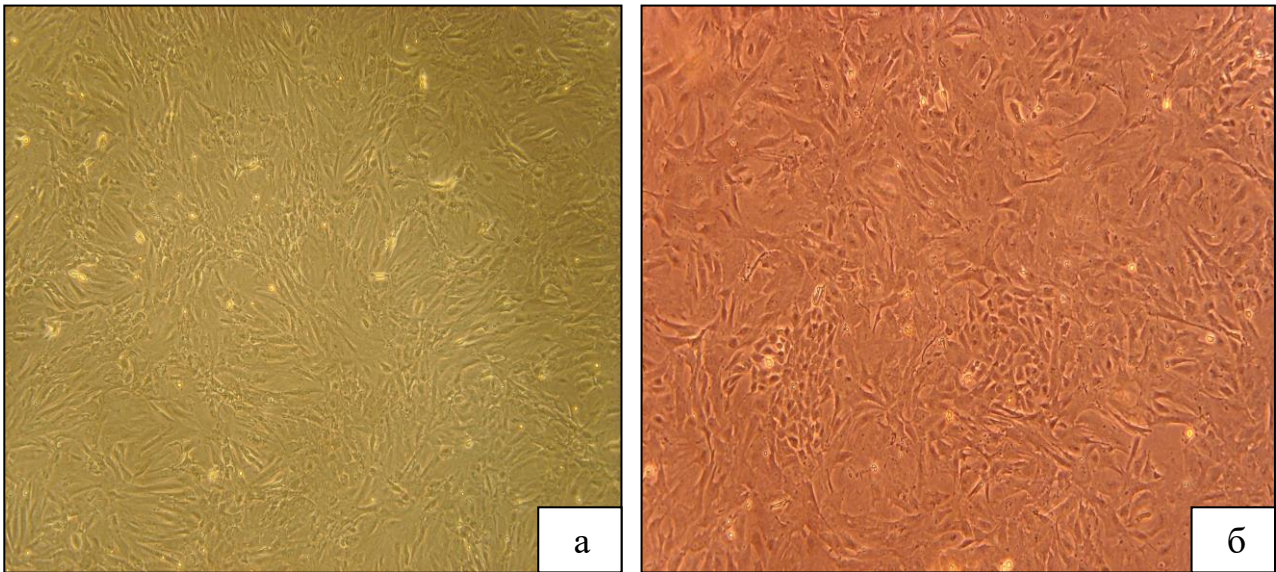


Рис. 6. Мікрофотографії моношару культур клітин червоного кісткового мозку, III пасаж: а) контроль; б) на 6 добу після додавання 5-азацитидину. Нативні препарати. Збільшення $\times 50$

У досліджуваних культурах клітин на 10–22 добу культивування почали відмічати мимовільні скорочення окремих ділянок моношару клітин, що ще раз вказує на їх диференціацію у кардіоміогенному напрямі.

У процесі імунофенотипування популяції стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура, що піддавалася дії 5-азацитидину, відмічали зміну експресії досліджуваних поверхневих маркерів у бік, характерний для культури, виділеної з міокарда.

Так, рівень експресії CD10 достовірно зріс, порівнюючи з контролем, і становив 107 ± 19 балів. Ступінь прояву CD34, CD38 та CD95 зріс на 21, 18 та 22 бали відповідно. Експресія CD48, CD54 та CD66e залишилася у межах одного рівня і в культурі, що піддавалася направленій диференціації, дорівнювала 83 ± 10 , 0 ± 0 та 110 ± 11 балів відповідно.

З низького до рівня «відсутність експресії» знизився ступінь прояву CD45, CD56, CD227 та CD326 та становив 0 ± 0 , 0 ± 0 , 0 ± 0 та 10 ± 6 балів відповідно.

Рівень експресії пан-кератину знизився з високого (253 ± 19 балів) до помірного рівня (77 ± 14 балів), однак ступінь прояву тропоніну I у культурі, що піддавалася направленій диференціації 5-азацитидином, достовірно зріс з рівня «відсутність експресії» (17 ± 10 балів) до помірного 105 ± 9 (балів).

Цитогенетичний аналіз стовбурових клітин культури, отриманої із червоного кісткового мозку щура, після дії 5-азацитидину. З метою вивчення зміни показників генетичної стабільності стовбурових клітин, які піддавалися направленій диференціації, досліджували нативні культури клітин, отримані з червоного кісткового мозку щура III пасажу (контроль), та вказану культуру на 6 добу після дії 5-азацитидину (табл. 3).

Таблиця 3

Результати цитогенетичного аналізу популяції стовбурових клітин, виділених з червоного кісткового мозку щура, $M \pm m$, $n=3$

Показники	Культура стовбурових клітин кісткового мозку щура (III пасаж)	
	Контроль	Оброблена 5-азицитидином
Клітини з нормальним каріотипом, %	$80 \pm 2,2$	$84,5 \pm 1,5$
Анеуплоїдія, %	$18,9 \pm 1,5$	$12,2 \pm 1,5^*$
Поліплоїдія, %	$1,1 \pm 1,2$	$3,3 \pm 0$

Примітка. $*p < 0,05$ порівнюючи з контролем

Як видно з результатів досліджень, представлених у табл. 3, кількість клітин зі зміненим каріотипом після дії 5-азацитидину зменшилася на 4,5 %, порівнюючи з контролем. Кількість клітин з анеуплоїдією у дослідній групі чашок знизилася на 6,7 %, проте відсоток поліплоїдних клітин зріс на 2,2 %, порівнюючи з контролем.

Особливості регенерації у міокарді щура за експериментального інфаркту. На 7 добу після моделювання інфаркту міокарда встановили наявність запального процесу, інфільтрацію зони пошкодження макрофагами, лейкоцитами та утворення грануляційної тканини у вигляді бар'єру навколо ділянки пошкодження. У зоні ішемії присутній міоцитоліз та коагуляційний некроз: загиблі клітини набрякали, зберігаючи свої контури, оскільки цитоплазматичні білки після коагуляції ставали стійкими до дії лізосомальних ферментів (рис. 7).

Одночасно спостерігали підвищену активність стромального компонента – проліферацію клітин стромы, активацію ендотеліоцитів (рис. 8).

На 12 добу після формування інфаркту спостерігали активізацію процесів формування рубцевої тканини і відкладання колагену без утворення колагенових волокон. У позаінфарктній зоні виявляли набряк кардіоміоцитів та формування складів еритроцитів у капілярах. В окремих ділянках зони інфаркту спостерігали поодинокі острівці некротизованих кардіоміоцитів.

На 17 добу, після лігування артерії, у ділянці патологічного процесу протікали початкові етапи формування сполучної тканини: у зоні ушкодження виявлялася значна кількість судин і фібробластів. У центральних ділянках

інфаркту було виявлено присутність сформованих колагенових волокон (рис. 9). Поза зоною пошкодження спостерігався інтрацелюлярний набряк кардіоміоцитів.

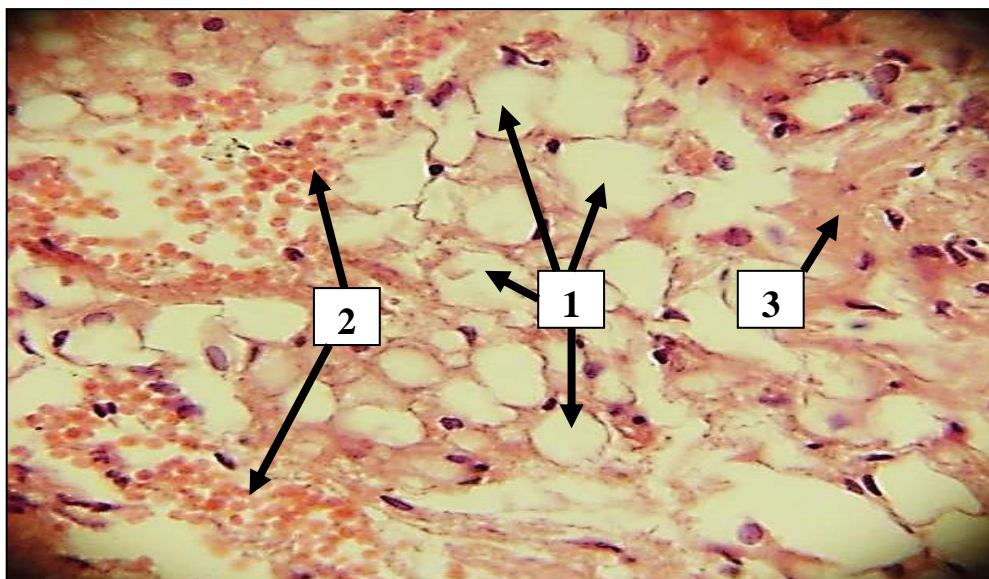


Рис. 7. Міокард щура, 7 доба після лігування гілки лівої коронарної артерії: 1) ознаки коагуляційного некрозу (контури загиблих кардіоміоцитів); 2) еритроцити; 3) кардіоміоцити. Гематоксилін Караці та еозин. Збільшення $\times 400$

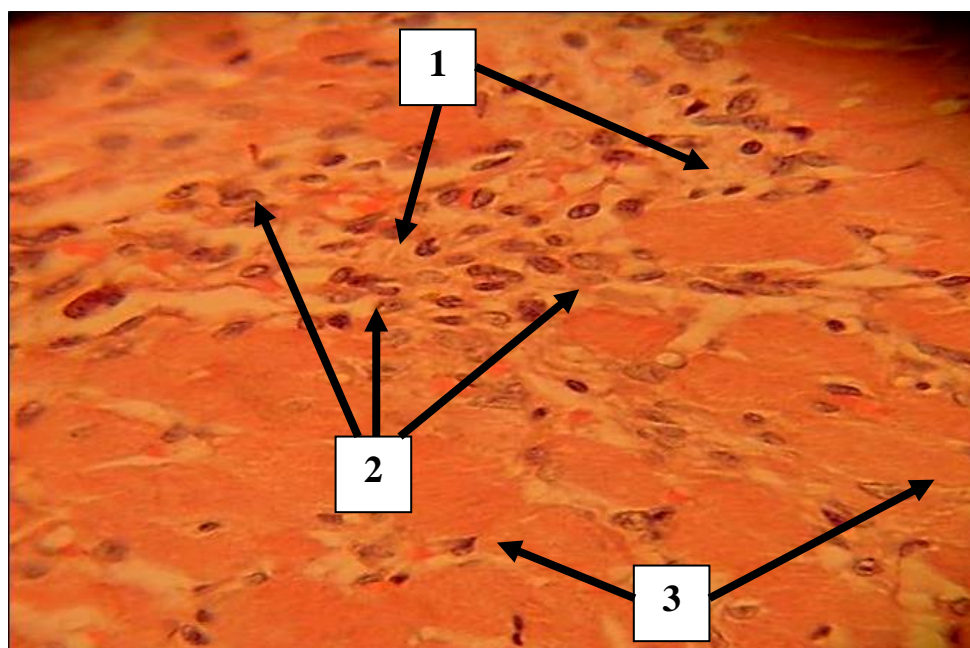


Рис. 8. Міокард щура, 7 доба після лігування гілки лівої коронарної артерії: 1) проліферація клітин стромы; 2) ядра; 3) кардіоміоцити. Ван Гізон. Збільшення $\times 400$

На 25 добу, після формування інфаркту, у зоні пошкодження спостерігали активне формування і структуризацію сполучної тканини. У сполучній тканині відмічали значну кількість судин синусоїдного типу. Патологічний процес захоплював не лише зону інфаркту, а й сусідні ділянки, де також спостерігалися

ознаки прогресуючого периферичного інфаркту міокарда: набряк кардіоміоцитів, активацію стромального компонента, формування грануляційної тканини. В окремих ділянках фіксували повне заміщення некротичної тканини рубцевою. Рубцева тканина була неоднорідна, що свідчить про неодноразоментність її розвитку.

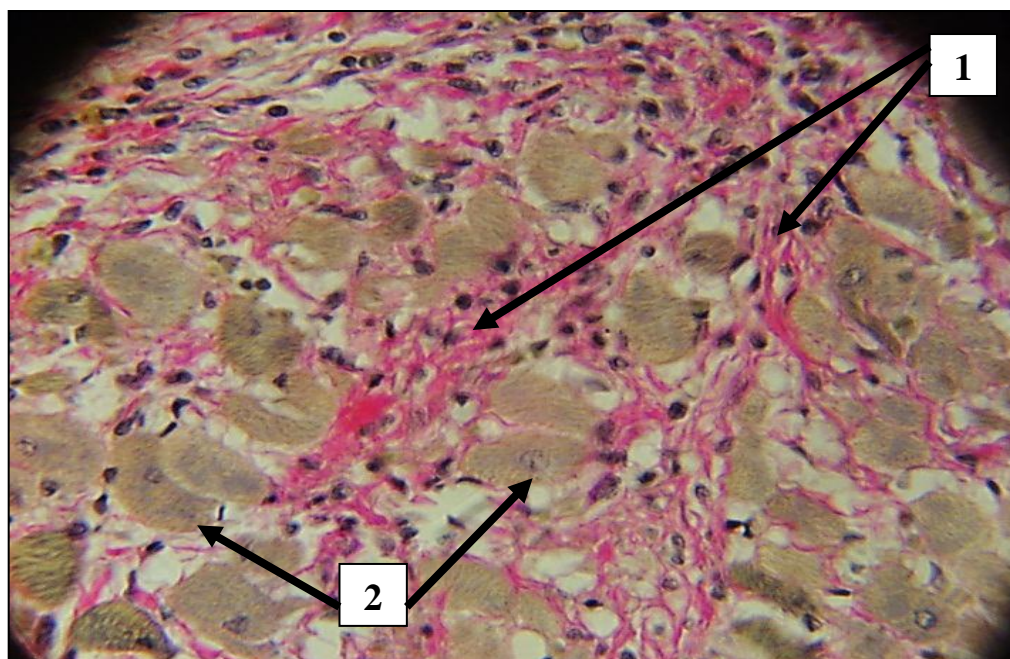


Рис. 9. Міокард щура, 17 доба після лігування гілки лівої коронарної артерії: 1) сформовані колагенові волокна; 2) кардіоміоцит. Ван Гізон. Збільшення $\times 400$

У процесі перебігу інфаркту його зона збільшувалася, що, можливо, відбувалося внаслідок стискання судин набряклими пошкодженими кардіоміоцитами.

Цитотоксична активність лейкоцитів і сироватки крові щурів відносно алогенної культури стовбурових клітин міокарда. Наступним завданням було вивчити вплив імунної системи на трансплантацію алогенних культур стовбурових клітин міокарда щура (див. табл. 3).

За результатами аналізів дослідження впливу сироватки та лімфоцитів крові встановлено, що проліферативна активність алогенних культур стовбурових клітин міокарда у цитотоксичному тесті із сироваткою та лімфоцитами крові інтактних та сенсibiliзованих тварин достовірно відрізняється (табл. 4).

У процесі дослідження не виявлено цитотоксичного впливу лімфоцитів та сироватки крові інтактних тварин на культури стовбурових клітин міокарда щура як I, так і IV пасажів, про що свідчить близький до 1 індекс проліферації.

Проте, сироватка крові сенсibiliзованих тварин мала значний цитотоксичний вплив на клітини досліджуваної культури. Так, індекс проліферації стовбурових клітин міокарда щура I пасажу за співкультивування з сироваткою крові сенсibiliзованих тварин склав $0,04 \pm 0,02$, а IV пасажу – $0,31 \pm 0,08$, що відповідно у 24,75 та 3,19 разів нижче, ніж у контрольній групі.

**Проліферативна активність культури стовбурових клітин міокарда
щура під час вивчення цитотоксичної активності лімфоцитів
та сироватки крові інтактних та сенсibilізованих тварин**

Група тварин	Пасаж	Показник	Співкультивування з лейкоцитами	Співкультивування з сироваткою
Інтактні тварини (контроль)	I	Кількість клітин після культивування	29,6±0,2	29,6±0,2
		Індекс проліферації	0,99±0,01	0,99±0
	IV	Кількість клітин після культивування	29,7±0,13	29,7±0,2
		Індекс проліферації	0,99±0,01	0,99±0,01
Сенсibilізовані тварини (дослід)	I	Кількість клітин після культивування	20,8±1,1**	1,2±0,6
		Індекс проліферації	0,69±0,04**	0,04±0,02**
	IV	Кількість клітин після культивування	26,0±1,2*	9,3±2,4
		Індекс проліферації	0,87±0,04*	0,31±0,08**

Примітка. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, порівнюючи з контролем

Лімфоцити крові сенсibilізованих тварин також проявляли цитотоксичний вплив на клітини досліджуваної культури, проте значно нижчий, порівнюючи з сироваткою крові. Так, індекс проліферації культури I пасажу склав 0,69±0,04, IV пасаж – 0,87±0,04, що відповідно у 1,43 та 0,88 рази нижче, ніж у контрольній групі. З наведених результатів досліджень видно, що з пасажами цитотоксичність як сироватки, так і лейкоцитів крові знижується.

Здатність стовбурових клітин до міграції у міокард за його ушкодження. Для терапії патологічних процесів із використанням стовбурових клітин важливим є їх «доставка» у зону пошкодження. Процес потребує самонаведення і міграцію клітин у тканину-мішень. Однак, зважаючи на те, що для лікування тварин з інфарктом міокарда використовують стовбурові клітини з різних джерел, за їх введення у кровоносне русло вони можуть затримуватися в інших органах: печінці, кістковому мозку тощо. Тому наступним етапом дослідження було визначення оптимального методу «доставки» клітинного матеріалу до органу-мішені (серця).

З метою вивчення міграційної здатності стовбурових клітин у зону пошкодження міокарда вводили 0,5 млн мічених флюорохромом стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку в 0,05 см³ середовища Ігла модифікованого Дюльбеко в порожнину серця, інтраміокардіально та внутрішньовенно. Аналіз результатів виконували на 2 та 8 добу після трансплантації. Пошук мічених клітин здійснювали на межі пошкодженої та здорової тканин серцевого м'язу.

За інтраміокардіального введення на 2 добу після трансплантації виявляли мічені клітини у каналі введення (рис. 10а).

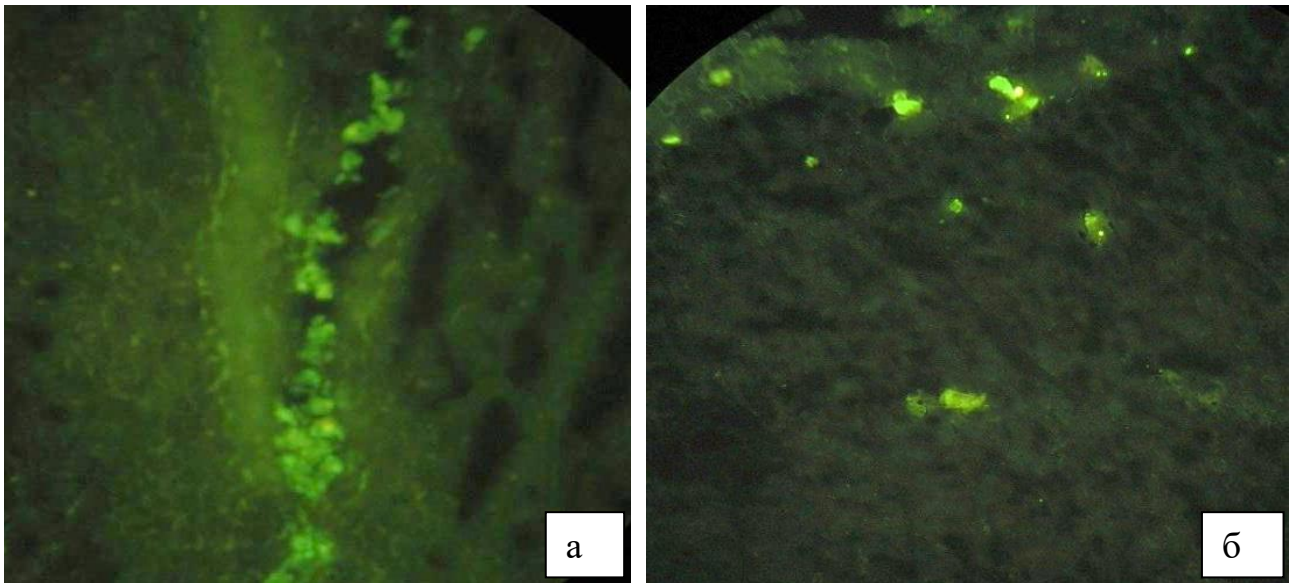


Рис. 10. Виявлення у серцевому м'язі клітин, мічених Hoechst, за інтраміокардіального введення: а) 2 доба після введення, мічені стовбурові клітини локалізовані у каналі введення; б) 8 доба, клітини дифузно розташовані у серцевому м'язі. Нативний препарат, флуоресцентна мікроскопія. Збільшення $\times 400$

Проте вже на 8 добу спостерігали дифузну локалізацію стовбурових клітин у структурі серцевого м'яза, що свідчить про міграцію мічених клітин з каналу (рис. 10б). При аналізі зразків сердець за введення в порожнину серця на внутрішньовенної трансплантації, мічених стовбурових клітин в структурі серцевого м'яза, як на 2 так 8 добу виявлено не було.

Вплив трансплантації стовбурових клітин культур, отриманих з різних джерел на активність відновлення структури міокарда щура внаслідок експериментального ішемічного інфаркту. Нині є декілька теорій впливу трансплантованих у міокард стовбурових клітин на його відновлення, проте механізм цього впливу залишається не зрозумілим до кінця. Згідно з традиційною теорією, трансплантовані стовбурові клітини диференціюються у кардіоміоцити та вбудовуються у пошкоджений міокард (Shake J. G., 2002). Відповідно іншої гіпотези, стовбурові клітини після трансплантації диференціюються в ендотеліальні клітини та сприяють ангиогенезу (Ohnishi S., 2007). Це призводить до обмеження зони інфаркту та стимулювання процесів відновлення міокарда. Зважаючи на те, що за отримання культури стовбурових клітин з різних джерел їх клітинний склад відрізняється, логічно припустити і відмінності у їх впливі на регенеративні процеси у пошкодженому міокарді. З огляду на це, метою було дослідити вплив стовбурових клітин різного походження на перебіг експериментально сформованого інфаркту міокарда у щурів.

У процесі макроскопічного дослідження нативних зразків сердець щурів контрольної групи виявляли збільшення їх розмірів та незначне розширення судин вище місця їх лігування. Нижче лігатури відмічали ознаки некротизування тканини.

У всіх групах тварин після трансплантації досліджуваних клітин також відмічали збільшення сердець, проте така ознака була менш виражена, порівнюючи з контролем. Вище місця лігування було зафіксовано аневризму судини, нижче – рубцеві зміни.

Отримані дані свідчать про пришвидшення регенеративних процесів у серцевому м'язі за трансплантації усіх досліджуваних культур стовбурових клітин. Для визначення найбільш ефективної з них провели мікроскопічне дослідження міокарда після його обробки 2,3,5-трифенілтетразолієм хлоридом, що дає змогу чітко відмежувати уражену ділянку.

Так, після оцінки площ некрозу виявили, що у міокарді щурів контрольної групи вона складала $20,33 \pm 0,97$ %, після інтраміокардіальної трансплантації культури клітин червоного кісткового мозку – $14,67 \pm 0,77$ % ($p < 0,01$), що на 5,66 % менше, порівнюючи з контролем.

За введення культури стовбурових клітин жирової тканини площа некрозу була меншою на 3,33 %, порівнюючи з контролем, і на 25 добу експерименту становила $17,00 \pm 0,58$ % ($p < 0,05$).

За інтраміокардіального введення культури стовбурових клітин міокарда площа некрозу займала $13,33 \pm 0,39$ % ($p < 0,01$), що на 7 % менше, ніж у контролі.

Вплив способу обробки первинної тканини на отримання стовбурових клітин міокарда kota. Стовбурові клітини міокарда є перспективним біологічним матеріалом для лікування домашніх тварин із хворобами серця, викликаними дистрофічними змінами у міокарді. Проте, незважаючи на позитивний ефект від застосування міокардіальних стовбурових клітин за ішемії міокарда, перешкодою їх масового клінічного використання є етичні суперечності та складність в отриманні. Саме тому наступним завданням було визначити оптимальний метод отримання стовбурових клітин міокарда kota, що дасть змогу виділити більшу кількість клітин з однакової маси тканини.

Сьогодні метод експланта вважається найбільш оптимальним для отримання первинної культури з малої кількості тканини, адже ферментативна обробка може призвести до пошкодження клітин і, як наслідок, втрати їх життєздатності. Водночас, ферментативний метод отримання первинної культури у разі правильного підбору комбінації ферментів та експозиції дає змогу отримати більший, порівнюючи з методом експланта вихід клітин, здатних до проліферації. З огляду на це, для отримання культури стовбурових клітин міокарда kota порівнювали як метод експланта, так і ферментативну дезагрегацію.

У процесі дослідження було встановлено, що візуальна відмінність у формуванні колоній первинної культури міокарда kota залежала від методу, що був застосований для її отримання. Вже на 3 добу культивування спостерігали відмінності у рості клітин. Так, за використання I методу (метод експланта) відмічали утворення поодиноких колоній, тоді як за використання

VI методу фіксували появу великої кількості клітин, що були дифузно прикріплені до культурального пластику. Під час оцінювання росту клітин в інших дослідних групах на 3 добу культивування виявляли як наявність колоній, так і поодиноких клітин.

Статистичні результати щодо отримання культури стовбурових клітин міокарда kota на 5 добу культивування представлено у табл. 5.

Таблиця 5

**Кількість стовбурових клітин міокарда kota в моношарі
залежно від методу обробки первинного матеріалу, $M \pm m$, $n=3$**

№ методу	Метод обробки серцевої тканини	Кількість клітин на 5 добу культивування, тис. шт.
I	метод експланта (контроль)	35,7±6,2
II	2 мг/мл колагенази (тип II)	560,3±7,8***
III	2 мг/мл колагенази (тип II) + 5 % бичачого сироваткового альбуміну	340,7±15,8***
IV	1 мг/мл колагенази (тип II) + 1 мг/мл гіалуронідази + 5 % бичачого сироваткового альбуміну	276,0±8,7***
V	2,5 % трипсину	175,0±7,3***
VI	2,5 % трипсину + 0,5 мг/мл колагенази (тип II) + 0,5 мг/мл гіалуронідази	986,0±9,3***

Примітка. *** $p < 0,001$, порівнюючи з контролем

У процесі аналізу статистичних даних, представлених у табл. 5, можна стверджувати, що за ферментативної обробки тканин серця kota вдається отримати достовірно більшу кількість клітин, здатних до проліферації, порівнюючи з використанням методу експланта (без застосування ферментів).

Так, обробка 10 мг тканини міокарда комбінацією ферментів, яку використовували у VI пасажі, дала змогу досягти 100 % конфлюентності моношару на 5 добу культивування. Кількість клітин за такої умови становила 986,0±9,3 тис., що у 27,6 раза більше, ніж за використання методу експланта (контроль). Варто зазначити, що цей метод виявився найбільш ефективним серед інших застосованих у дослідженні.

Вплив способу дезагрегації жирової тканини kota на ефективність виділення стовбурових клітин для отримання культури. Ефективність виділення клітин, що здатні до диференціації, напряму залежить від методу обробки тканини. Оскільки жирова тканина зараз вважається перспективним джерелом отримання стовбурових клітин, наступним завданням було визначити оптимальний метод отримання стовбурових клітин з жирової тканини kota.

Для визначення оптимального методу отримання культури клітин жирової тканини котів порівнювали 7 комбінацій середовищ (табл. 6). Аналіз результатів проводили після досягнення конфлюентності 100 % у одній із чашок.

На основі отриманих даних, представлених у табл. 6, можна стверджувати, що найбільш ефективним із досліджених методів ферментативної обробки жирової тканини kota є використання дезагрегаційного розчину, що містить

1 мг/мл колагенази з додаванням 10 мг/мл гіалуронідази та 4 % бичачого сироваткового альбуміну. Кількість клітин на 10 добу культивування за використання цього методу складала $611,7 \pm 26,4$ тис., що у 51 раз вище показника у групі чашок без застосування ферментів.

Таблиця 6

Порівняння різних методів отримання культури стовбурових клітин з жирової тканини kota, $M \pm m$, $n=3$

№ з/п	Тип обробки	Конфлюентність (10 доба)	Кількість клітин (10 доба)
I	1 мг/мл колагенази	$9,0 \pm 0,7^{**}$	$55,3 \pm 4,9^*$
II	2 мг/мл колагенази + 10 мг/мл гіалуронідази	$23,3 \pm 1,8^{***}$	$152,0 \pm 11,3^{***}$
III	1 мг/мл колагенази + 10 мг/мл гіалуронідази + 4 % бичачого сироваткового альбуміну	$98,7 \pm 1,1^{***}$	$611,7 \pm 26,4^{***}$
IV	1 мг/мл колагенази + 20 мг/мл гіалуронідази + 4 % бичачого сироваткового альбуміну	$52,7 \pm 5,6^{***}$	$346,7 \pm 51,1^{**}$
V	2 мг/мл колагенази + 20 мг/мл гіалуронідази + 4 % бичачого сироваткового альбуміну	$19,3 \pm 0,9^{***}$	$123,7 \pm 5,8^{***}$
VI	2 мг/мл колагенази + 10 мг/мл гіалуронідази + 4 % бичачого сироваткового альбуміну	$36,3 \pm 2,2^{***}$	$231,7 \pm 14,4^{***}$
VII	Без додавання ферментів (контроль)	$1,3 \pm 1,1$	$12,0 \pm 8,0$

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

Влив фактора росту фібробластів (FGF-2), інсуліноподібного фактора росту (IGF-1), гормону росту (rhGH) та Biolaminin 521 LN на проліферативну активність стовбурових клітин kota отриманих з різних джерел. З огляду на широту використання клітинних технологій у клінічній практиці, виникає необхідність отримання великої кількості клітинного матеріалу, що стимулює удосконалення умов культивування, які б дозволили отримати більшу кількість клітинного матеріалу за менший проміжок часу. Тому наступним завданням було дослідити вплив інсуліноподібного фактора росту-1, фактора росту фібробластів-2, гормону росту у різних концентраціях та Biolaminin 521 LN на проліферативну активність і генетичну стабільність культур стовбурових клітин, отриманих з червоного кісткового мозку, жирової тканини та міокарда kota. У процесі дослідження виявлено відмінності у впливі різних стимуляторів росту на проліферативну активність клітин у культурі.

Так, після додавання інсуліноподібного фактора росту-1 у культуральне середовище спостерігали підвищення індексу проліферації культури стовбурових клітин кісткового мозку та культури стовбурових клітин міокарда, порівнюючи з контролем (табл. 7). Індекс проліферації зазначених культур зростав із підвищенням концентрації інсуліноподібного фактора росту-1. Водночас, у культури стовбурових клітин жирової тканини спостерігали зворотній ефект, а саме зниження індексу проліферації з підвищенням концентрації інсуліноподібного фактора росту-1 у середовищі.

**Проліферативна активність стовбурових клітин,
отриманих з різних джерел, залежно від концентрації інсуліноподібного
фактора росту-1 у культуральному середовищі, $M \pm m$, $n=3$**

Культура клітин	Концентрація інсуліноподібного фактора росту-1 у культуральному середовищі			Контроль
	10 нг/мл	20 нг/мл	50 нг/мл	
	Індекс проліферації			
Кісткового мозку	1,66±0,05*	1,82±0,05***	2,08±0,07***	1,44±0,05
Жирової тканини	2,67±0,08**	2,08±0,06	1,06±0,09**	1,85±0,11
Міокарда	2,41±0,07***	2,66±0,13***	3,65±0,15***	1,81±0,10

Примітка. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, порівнюючи з контролем

Варто зауважити, що збільшення концентрації цього фактора росту у середовищі корелювало зі збільшенням індексу проліферації. Так, за концентрації інсуліноподібного фактора росту-1 50 нг/мл індекс проліферації культури стовбурових клітин кісткового мозку та міокарда був вище, порівнюючи з контролем, у 1,4 та 2,0 рази відповідно. У культурі стовбурових клітин жирової тканини відмічали зворотну закономірність: за концентрації інсуліноподібного фактора росту-1 10 нг/мл індекс проліферації був у 1,4 раза вище контролю, водночас концентрація інсуліноподібного фактора росту-1 50 нг/мл призвела до зниження індексу проліферації в 1,8 раза нижче контролю.

У процесі дослідження фактора росту фібробластів-2 було виявлено відмінності у його впливі на проліферативну активність клітин, який залежав від походження культури клітин, а також від його концентрації у культуральному середовищі (табл. 8).

Таблиця 8

**Проліферативна активність стовбурових клітин,
отриманих із різних джерел, залежно від концентрації фактора росту
фібробластів-2 у культуральному середовищі, $M \pm m$, $n=3$**

Культура клітин	Концентрація фактора росту фібробластів-2 у культуральному середовищі			Контроль
	10 нг/мл	20 нг/мл	50 нг/мл	
	Індекс проліферації			
Кісткового мозку	1,69±0,04**	1,28±0,03*	0,74±0,02	1,44±0,05
Жирової тканини	2,43±0,05**	1,81±0,06	1,56±0,08	1,85±0,11
Міокарда	4,84±0,11***	3,87±0,22***	2,51±0,06***	1,81±0,10

Примітка. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, порівнюючи з контролем

Найбільш виражений вплив фактора росту фібробластів-2 було встановлено на культуру стовбурових клітин міокарда. За концентрації цього фактора росту 10 нг/мл індекс проліферації збільшився у 2,7 раза, порівнюючи з контролем. Спостерігали кореляцію між збільшенням концентрації фактора росту фібробластів-2 у культуральному середовищі та зниженням індексу проліферації клітин у культурі. Значно нижчий стимулюючий ефект фактора росту фібробластів-2 відмічали у культурі стовбурових клітин кісткового мозку

та культурі стовбурових клітин жирової тканини. Так, за додавання 10 нг/мл індекс проліферації у досліджуваних культурах збільшився в 1,2 та 1,3 раза відповідно. Зі збільшенням концентрації цього фактору росту у середовищі індекс проліферації знижувався.

Внаслідок додавання гормону росту до культурального середовища з культурою стовбурових клітин кісткового мозку відбувалося зниження індексу проліферації клітин нижче контролю. До того ж спостерігали кореляцію між збільшенням концентрації гормону та зменшенням індексу проліферації (табл. 9).

Таблиця 9

**Проліферативна активність стовбурових клітин,
отриманих з різних джерел, залежно від концентрації гормону росту
у культуральному середовищі, $M \pm m$, $n=3$**

Культура клітин	Концентрація гормону росту у культуральному середовищі			Контроль
	10 нг/мл	20 нг/мл	50 нг/мл	
	Індекс проліферації			
Кісткового мозку	1,22±0,04**	1,09±0,04***	0,88±0,04***	1,44±0,05
Жирової тканини	2,39±0,06	2,08±0,05	1,05±0,06**	1,85±0,11
Міокарда	2,36±0,07**	2,20±0,08**	2,07±0,04*	1,81±0,10

Примітка. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, порівнюючи з контролем

За додавання гормону росту у концентрації 10 нг/мл до культури стовбурових клітин жирової тканини та культури стовбурових клітин міокарда спостерігали збільшення індексу проліферації в 1,2 та 1,3 раза відповідно. Проте зі збільшенням концентрації гормону у середовищі індекс проліферації знижувався.

Biolaminin 521 LN проявляв позитивний вплив на всі досліджувані культури клітин. Так, індекс проліферації культури стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини зріс у 1,3 раза, міокарда – в 1,7 раза, порівнюючи з контролем (табл. 10.).

Таблиця 10

**Проліферативна активність культур стовбурових клітин
різного походження за додавання у культуральне середовище
Biolaminin 521 LN, $M \pm m$, $n=3$**

Культура клітин	Biolaminin 521 LN	Контроль
	Індекс проліферації	
Кісткового мозку	1,88±0,05***	1,44±0,05
Жирової тканини	2,35±0,12*	1,85±0,11
Міокарда	3,07±0,08***	1,81±0,10

Примітка. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, порівнюючи з контролем

Варто зазначити, що за використання Biolaminin 521 LN відбувалося швидке прикріплення клітин до культурального пластику та сильне їх розпластування. Окрім того, за дослідження Biolaminin 521 LN моношар утворювався найшвидше.

Оскільки прискорення проліферації може призвести до збільшення кількості клітин зі зміненим каріотипом у культурі, було проведено цитогенетичний аналіз досліджуваних культур з найвищим індексом проліферації. Результати представлено у табл. 11 та 12.

Таблиця 11

Результати цитогенетичного аналізу культур стовбурових клітин kota за впливу факторів росту, $M \pm m$, $n=3$

Культура клітин	Інсуліноподібний фактор росту-1		Фактор росту фібробластів-2	Контроль
	10 нг/мл	50 нг/мл	10 нг/мл	
	Нормальний каріотип, %			
Кісткового мозку	80,0±1,3	–	81,3±0,9	79,3±0,9
Жирової тканини	–	86,0±1,3	86,7±0,9	88,7±0,8
Міокарда	89,3±2,2	–	88,7±0,9	90±1,3

Таблиця 12

Результати цитогенетичного аналізу культур клітин kota за впливу гормона росту та Biolaminin 521 LN, $M \pm m$, $n=3$

Культура клітин	Гормон росту, 10 нг/мл	Biolaminin 521 LN	Контроль
	Нормальний каріотип, %		
Кісткового мозку	78,7±0,9	83,3±0,9*	79,3±0,9
Жирової тканини	86,7±0,9	92,0±1,3	88,7±0,8
Міокарда	88,7±1,8	94,0±0,0*	90±1,3

Примітка. * $p < 0,05$, порівнюючи з контролем

За даними цитогенетичного аналізу, додавання досліджуваних факторів росту у культуральне середовище не призводить до достовірного збільшення кількості клітин зі зміненим каріотипом у всіх досліджуваних культурах, порівнюючи з контролем.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне обґрунтування та експериментальне вирішення наукового завдання щодо впливу стовбурових клітин, отриманих із кісткового мозку, міокарда та жирової тканини на активність відновлення структури міокарда щура, пошкодженої внаслідок експериментального ішемічного інфаркту. Представлено імунофенотипову та генетичну характеристики стовбурових клітин міокарда щура у культурі. Встановлено зміни фенотипу стовбурових клітин, отриманих із кісткового мозку щура за впливу 5-азацитидину. Оптимізовано методи виділення та культивування стовбурових клітин kota, отриманих із різних джерел.

1. Трансплантовані стовбурові клітини червоного кісткового мозку, жирової тканини та міокарда проявляють позитивний терапевтичний вплив на регенераційний процес в ушкодженій зоні міокарда за експериментального інфаркту у щурів, на що вказує зменшення зони ушкодження міокарда на 25 добу, порівнюючи з контролем. Найефективнішим є застосування

стовбурових клітин міокарда, за якого площа некрозу на 7 % менша ($13,33 \pm 0,39$ %) такого показника ($20,33 \pm 0,97$ %) у тварин контрольної групи.

2. Інтраміокардіальне введення стовбурових клітин за експериментального інфаркту міокарда є найбільш оптимальним, на що вказує присутність трансплантованих клітин у каналі введення на 2 добу та їх дифузне розміщення у міокарді на 8 добу після введення.

3. Лейкоцити та сироватка крові сенсibiliзованих щурів на 7 добу після інтраперетоніального введення їм стовбурових клітин, отриманих із міокарда щура, проявляють цитотоксичний ефект щодо останніх в системі *in vitro*. Цитотоксичний вплив як сироватки крові (індекс проліферації: I пасаж – $0,04 \pm 0,02$; IV пасаж – $0,31 \pm 0,08$), так і лейкоцитів крові (індекс проліферації: I пасаж $0,69 \pm 0,04$; IV пасаж – $0,87 \pm 0,04$) був менший на клітини IV пасажу.

4. Первинна культура клітин, отримана з міокарда щура, характеризується гетерогенністю, проте в процесі субкультивування вона набуває гомогенності за рахунок веретеноподібних клітин.

5. Клітинний склад культури, отриманої з міокарда щура, неоднорідний та змінюється з пасажами. На I пасажі переважають клітини з ознаками кардіоміоцитів ($CD10^+$, $CD34^{low}$, $CD38^{low}$, $CD45^{low}$, $CD48^-$, $CD54^-$, $CD56^-$, $CD95^+$, $CD227^-$, $CD326^{low}$, тропонін I^{high}). У процесі культивування на клітинах виявляються маркери, характерні для епітеліальних клітин (панкератин low , $CD326^+$, $CD227^{low}$), а також реєструється підвищення експресії маркерів, які властиві прогеніторним клітинам ($CD34^+$, $CD45^{low}$).

6. У процесі культивування в системі *in vitro* стовбурових клітин, отриманих із міокарда, у клітинах виявляються зміни каріотипу, які проявляються у вигляді анеуплоїдій, поліплоїдій, поява клітин з мікроядрами та двоядерних клітин, проте їх кількість не виходить за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців.

7. Додавання 5-азацитину у культуру стовбурових клітин, отриманих з червоного кісткового мозку щура, призводить до появи у ній осередків епітеліоподібних клітин, які експресують маркери, характерні для кардіоміоцитів ($CD10^+$, $CD45^-$, $CD95^+$, $CD326^{low}$, тропонін I^+). Водночас, у культурі знижується відсотковий вміст анеуплоїдних та підвищується вміст поліплоїдних клітин, що вказує на сповільнення проліферації та початок диференціації.

8. Ферментативна обробка тканин серця kota комбінацією 2,5 % трипсину з додаванням 0,5 мг/мл колагенази (тип II) та 0,5 мг/мл гіалуронідази з експозицією 12 год за температури 4 °C на 5 добу культивування дає змогу отримати у 27,6 рази більше клітин, здатних до проліферації, ніж у контрольній групі (метод експланта).

9. Ферментативна обробка жирової тканини kota комбінацією 1 мг/мл колагенази, 10 мг/мл гіалуронідази з додаванням 4 % бичачого сироваткового альбуміну на 10 добу культивування дає змогу отримати у 51 раз більше клітин, ніж у групі чашок без застосування ферментів (контроль).

10. Стимулятори росту мають суттєвий вплив на проліферативну активність стовбурових клітин у культурі, так, додавання:

а) інсуліноподібного фактора росту у концентрації 10 нг/мл до середовища для культури стовбурових клітин жирової тканини kota та 50 нг/мл для міокарда і кісткового мозку дає змогу підвищити індекс проліферації в 1,4; 1,4 та 2,0 рази відповідно, порівнюючи з контролем;

б) фактора росту фібробластів-2 у концентрації 10 нг/мл середовища, що дає змогу підвищити індекс проліферації для культур стовбурових клітин кісткового мозку, жирової тканини та міокарда kota в 1,2; 1,3 та 2,7 рази відповідно, порівнюючи з контролем;

с) гормону росту у концентрації 10 нг/мл до культурального середовища збільшує індекс проліферації в 1,2 та 1,3 рази відповідно для культури стовбурових клітин жирової тканини та міокарда kota, порівнюючи з контролем. Додавання гормону росту до культури клітин червоного кісткового мозку kota призводить до збільшення розміру клітин та зниження індексу проліферації, порівнюючи з контролем;

д) Biolaminin 521 LN підвищує індекс проліферації стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини kota в 1,3 рази; міокарда – в 1,7 рази, порівнюючи з контролем;

е) інсуліноподібного фактора росту-1, фактора росту фібробластів-2 та гормону росту у культуральне середовище не призводить до достовірного збільшення кількості клітин зі зміненим каріотипом у всіх досліджуваних культурах, порівнюючи з контролем, водночас додавання Biolaminin 521 LN сприяє зменшенню кількості клітин зі зміненим каріотипом.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для стимуляції впровадження клітинних технологій у ветеринарну практику запропоновано:

1. Методичні рекомендації «Методи видоспецифічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній терапії» (розглянуто та затверджено на Вченій раді Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 5 від 27.12.2017 р.).

2. Патент на корисну модель «Спосіб отримання культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини котів», 2017 р.

3. Одержані під час виконання досліджень результати пропонуємо використовувати в навчальному процесі при підготовці студентів освітніх рівнів «Бакалавр» і «Магістр» у закладах вищої освіти України з напрямку «Ветеринарна медицина».

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Ковпак О. С. Фенотипові та морфологічні зміни культури клітин міокарда в процесі їх культивування. Ветеринарна біотехнологія. 2016. № 29. С. 147–156.

2. Ковпак О. С., Ковпак В. В., Мазуркевич А. Й., Гудзь Н. В. Вплив фактору росту фібробластів (FGF-2) та інсуліноподібного фактору росту (IGF-1)

на проліферативну активність стовбурових клітин kota. *Ветеринарна біотехнологія*. 2018. № 33. С. 55–65. *(Здобувачем досліджено вплив додавання до культурального середовища різних концентрацій фактору росту фібробластів та інсуліноподібного фактору росту на проліферативну активність стовбурових клітин, отриманих з кісткового мозку, жирової тканини та міокарда kota).*

3. Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В., **Ковпак О. С.** Вплив гормону росту (RhGH) та Biolaminin 521 LN на проліферативну активність стовбурових клітин kota. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2018. № 3 (90). С. 143–148. *(Здобувачем досліджено вплив додавання до культурального середовища Biolaminin 521 LN та різних концентрацій гормону росту на проліферативну активність стовбурових клітин, отриманих з кісткового мозку, жирової тканини та міокарда kota).*

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

4. Ковпак В. В., **Ковпак О. С.** Проліферативна активність мезенхімальних стовбурових клітин щура за впливу культурального середовища. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2016. № 60. 11 с. URL: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/6841> *(Здобувачем досліджено зміни морфології клітин щура у кардіоміогенному напрямку за дії 5-азациитидину).*

5. Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В., **Ковпак О. С.** Гістологічні зміни у міокарді щурів за експериментально сформованої ішемії. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України*. 2016. № 63. 12 с. URL: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/7560>. *(Здобувачем проведено порівняння двох методів формування ішемії та досліджено гістологічні зміни у міокарді щурів на 7 добу, 12, 17 та 25 добу після лігування лівої коронарної артерії).*

6. **Ковпак О. С.**, Ковпак В. В., Мазуркевич А. Й. До методики отримання стовбурових клітин міокарда kota. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького*. 2018. Т. 20. № 88. С. 152–157. *(Здобувачем проведено дослідження з визначення оптимального методу отримання культури стовбурових клітин з міокарда kota шляхом порівняння методу експланту та п'яти комбінацій ферментів).*

7. **Ковпак О. С.**, Мазуркевич А. Й. Вплив трансплантації культур стовбурових клітин на перебіг експериментального ішемічного інфаркту міокарда у щурів. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. Серія: Ветеринарна медицина. 2018. № 11 (43). С. 23–28. *(Здобувачем порівняно терапевтичний вплив алогенних культур клітин, отриманих з кісткового мозку, жирової тканини та міокарда за експериментального ішемічного інфаркту у щурів).*

Стаття у науковому виданні іншої держави

8. Mazurkevych A., Malyuk M., Kovpak V., **Ковпак О.**, Kharkevych Y., Jakubczak A., Gryzinska M. Comparative analysis of cat bone marrow and adipose tissue cell cultures. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2018. Vol. 21. № 3. P. 549–557. *(Здобувачем проведено цитогенетичний аналіз культури клітин кісткового мозку kota на IV пасажі).*

Стаття в іншому науковому виданні України,

включеному до міжнародних наукометричних баз даних

9. Ковпак О. С. Цитогенетичний аналіз прогеніторних клітин міокарда щура на ранніх пасажах. Вісник аграрної науки Причорномор'я. 2016. № 2 (89). Ч. 1. С. 155–163.

Патент України на корисну модель

10. Ковпак В. В., **Ковпак О. С.**, Мазуркевич А. Й., Харкевич Ю. О. Патент України на корисну модель № 118933 МПК А61К35/44 (2015.01). Спосіб отримання культури клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини котів: заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України; № u 201704458; заявлено 05.05.2017; опубліковано 28.08.2017. Бюл. № 16. 4 с. *(Здобувачем проведено елементи дослідження з визначення оптимального методу отримання культури стовбурових клітин жирової тканини kota шляхом порівняння методу експланту та шести комбінацій ферментів, проведено аналіз отриманих результатів).*

Методичні рекомендації

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

АНОТАЦІЯ

Ковпак О. С. Біологічні властивості стовбурових клітин та їх вплив на відновлення міокарда тварин за експериментального ішемічного інфаркту. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2020.

У дисертації висвітлено актуальні у ветеринарній медицині питання – біологічні властивості стовбурових клітин, отриманих з різних джерел у процесі культивування, та теоретичне обґрунтування й експериментальне підтвердження ефективності методу клітинної регенеративної терапії із застосуванням стовбурових клітин, отриманих з різних джерел, на активність відновлення структури міокарда щура, пошкодженого внаслідок експериментального ішемічного інфаркту. У дослідженнях основну увагу зосереджено на стовбурових клітинах культури, отриманої з міокарда, як альтернативного джерела клітинного матеріалу за лікування пацієнтів із хворобами серця. Представлено дані отримання стовбурових клітин із міокарда (щури та коти), кісткового мозку та жирової тканини (коти); розроблення методів оцінки якості і безпечності стовбурових клітин котів, призначених для потреб клітинної регенеративної терапії; теоретично обґрунтовано ефективність методу клітинної регенеративної терапії із застосуванням стовбурових клітин на активність відновлення структури міокарда щура, пошкодженого внаслідок ішемічного інфаркту; експериментально підтверджено вплив трансплантації стовбурових клітин культур, отриманих з різних джерел, на зменшення площі некротизованої тканини міокарда щура на фоні експериментального інфаркту.

Ключові слова: стовбурові клітини, експериментальний інфаркт міокарда, щур, кіт.

АННОТАЦІЯ

Ковпак О. С. Биологические свойства стволовых клеток и их влияние на восстановление миокарда животных при экспериментальном ишемическом инфаркте. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.02 «Патология, онкология и морфология животных». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2020.

В диссертации освещены актуальные в ветеринарной медицине вопросы – биологические свойства стволовых клеток, полученных из разных источников в процессе культивирования; теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение эффективности метода клеточной регенеративной терапии с применением стволовых клеток, полученных из разных источников, на активность восстановления структуры миокарда крысы, поврежденного в результате экспериментального ишемического инфаркта. В исследованиях основное внимание было сосредоточено на стволовых клетках культуры, полученной из миокарда, как альтернативного источника клеточного материала при лечении пациентов с болезнями сердца. Представлены данные получения стволовых клеток из миокарда (крысы и кошки), костного мозга и жировой ткани (коты); разработка методов оценки качества и безопасности стволовых клеток кошек, предназначенных для нужд клеточной регенеративной терапии; теоретически обоснована эффективность метода клеточной регенеративной терапии с применением стволовых клеток на активность восстановления

структуры миокарда крысы, поврежденного в результате ишемического инфаркта; экспериментально подтверждено влияние трансплантации стволовых клеток культур, полученных из разных источников, на уменьшение площади некротизированной ткани миокарда крысы на фоне экспериментального инфаркта.

Ключевые слова: стволовые клетки, экспериментальный инфаркт миокарда, крыса, кот.

ANNOTATION

Kovpak O. S. Biological Properties of Stem Cells and their Effects on the Restoration of Animal Myocardium after Experimental Pale Infarction. – The Manuscript.

The thesis for awarding a scientific degree of Candidate of veterinary sciences in specialty 16.00.02 «Pathology, Oncology and Morphology of Animals». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2020.

The dissertation deals with the current issues of veterinary medicine, in particular, experimental solution of the scientific issue of the effect of stem cells derived from myocardium, bone marrow, and adipose tissue on the restoration of myocardium after experimental pale infarction.

Study were focused on the myocardium-derived cultures of stem cells as an alternative source of cellular material to treat heart diseases.

It is important to emphasize that in the course of *in vitro* cultivation, cells in the culture tended to change their phenotypic characteristics: morphology, expression of CD markers, and karyotype.

The primary culture of myocardium-derived stem cells of a rat reached 90–100 % confluence in 8 days average. In the process of subcultivation, 70–80 % confluence was reached in 3 days. In the process of cultivation, the number of fusiform cells tended to increase with each passage. Thus, in the process of culture of myocardium-derived stem cells cultivation, heterogeneous culture became more homogeneous

Having analyzed the data of the immunophenotypic profile of the rat myocardium cells, it is possible to make a conclusion that is heterogeneous in terms of cellular composition that additionally changes in the process of cultivation. Thus, at the beginning of the study, the culture had more cells with the signs of cardiomyocytes, in particular, high levels of CD10⁺ and troponin I^{high}, CD95⁺, low level of CD34^{low}, CD38^{low}, CD45^{low}, CD326^{low}, and the absence of expression of CD48⁻, CD54⁻, CD56⁻, CD227⁻. It is important to emphasize that in the process of cultivation it appeared that cells had markers peculiar for committed cells: CD34⁺, CD45^{low} and epithelial cells: pan-keratin^{low}, CD326⁺, CD227^{low}. The cytogenetic analysis cultures showed a gradual percent increase in cells with aneuploidy, which correlated with a percent increase in cells with micronuclei. Directed differentiation in the cardiomyogenic direction causes bone marrow-derived stem cells to have cardiomyocytes-like peculiarities. This is marked by an increase

in the level of expression of CD10 and troponin I and a decrease in the levels of CD45, CD56, CD227, CD326, and pan-keratin.

In the course of the study, neither lymphocytes nor blood serum of intact animals showed *in vitro* cytotoxic action to the culture of myocardium-derived stem cells rat, explained by the absence of preliminary sensitization by the antigens of the studied culture of these animals.

However, a sensitized animal's experiment showed a significant cytotoxic effect of lymphocytes – marked by a great decrease in the proliferation index of studied cells – and blood serum.

In order to study the ability of stem cells to migrate, the area of myocardial damage was treated by 0.5 million of fluorochrome-labeled stem cells of the bone marrow culture by intracardiac, intramyocardial and intravenous administration. In case of intramyocardial administration, we detected labeled cells in the administration channel on the second day after transplantation. The analysis of cardiac samples after intracardiac and intravenous transplantation showed no labeled stem cells in the cardiac muscle structure, neither on the second nor on the eighth day.

The final stage in the course of the research of rat stem cell cultures is the study of their effect on experimental infarction. The study showed that stem cells helped to decrease the area of necrotic tissue of animal myocardium. The study revealed that culture of myocardium-derived stem cells appeared to be the most effective: it managed to make the area of necrosis 1.53 times lesser if compared with the control group.

Since the therapeutic effect of the studied cultures on the development of experimental myocardial infarction had been proven, we were to determine the best conditions for isolation from different sources and cultivation of cultures of cat stem cells for their further putting into veterinary practice.

In order to obtain the cat myocardium stem cells culture, there were compared the method of explants and 5 variants of enzymatic treatment of the cardiac tissue. In order to determine the optimal method for obtaining adipose tissue stem cells culture, there were compared the method of explants and 6 combinations of enzymes.

In addition, we were study the optimal concentration of insulin-like growth factor-1, growth factor of fibroblasts-2, growth hormone and Biolaminin 521 LN for proliferation index growth of stem cells of bone marrow, adipose tissue and myocardium, and accounted for the number of genetic errors in studied cultures.

Key words: stem cells, experimental myocardial infarction, rat, cat.

Підписано до друку 01.10.2020 р. Формат 60x84\16
Ум. друк. арк. 0,9 Обл.-вид.арк. 0,9
Наклад 100 прим. Зам. № 200506

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, тел.: 527-81-55
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4097 від 17.06.2011

