

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

КОВПАК ОКСАНА СЕРГІЇВНА

УДК 57.085.23:616.127-005.8

ДИСЕРТАЦІЯ

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

16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин»
(ветеринарні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на
відповідне джерело **О. С. Ковпак**

Науковий керівник –
Мазуркевич Анатолій Йосипович,
доктор ветеринарних наук, професор,
член-кореспондент НААН,
Заслужений діяч науки і техніки України

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Ковпак О. С. Біологічні властивості стовбурових клітин та їх вплив на відновлення міокарда тварин за експериментального ішемічного інфаркту. – Кваліфікаційна наукова праця 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 дисертаційній роботі висвітлено актуальне у ветеринарній медицині питання – виділення стовбурових клітин із міокарда (щурів та котів), кісткового мозку та жирової тканини (котів) для отримання культури; розробка методів оцінки якості і безпечності стовбурових клітин котів, призначених для потреб клітинної регенеративної терапії та експериментальне вирішення наукової проблеми впливу стовбурових клітин отриманих з міокарда, кісткового мозку, жирової тканини на відновлення міокарда тварин за експериментального ішемічного інфаркту.

Основну увагу у своїх дослідженнях ми звернули на стовбурові клітини культури отриманої з міокарда, як альтернативного джерела клітинного матеріалу за лікування хвороб серця.

Встановлено, що протягом культивування в системі *in vitro* клітин в культурі змінювали свої фенотипові характеристики: морфологію, експресію CD-маркерів, каріотип. Первинна культура стовбурових клітин міокарда (КСКМ) щура досягала конфлюентності 90–100 % у середньому за 8 діб. В процесі субкультивування час досягнення конфлюентності 70–80 % становив 3 доби. У процесі культивування спостерігали тенденцію до збільшення кількості веретеноподібних клітин з кожним пасажом. Таким чином, у процесі субкультивування стовбурових клітин міокарда відбувається перехід від гетерогенної культури до більш гомогенної.

Аналіз результатів імунофенотипового профілю клітин, отриманих з міокарда щура, показав, що культура стовбурових клітин міокарда неоднорідна за своїм клітинним складом, який додатково змінюється у процесі культивування. Так, на початку дослідження у культурі переважали клітини з ознаками кардіоміоцитів, а саме високим рівнем CD10⁺ та тропонін I^{high}, CD95⁺, низьким

рівнем CD34^{low}, CD38^{low}, CD45^{low}, CD326^{low} та відсутністю експресії CD48⁺, CD54⁺, CD56⁺, CD227⁺. У процесі подальшого культивування на клітинах почали виявляти маркери, властиві комітованим клітинам: CD34⁺, CD45^{low} та епітеліальним клітинам: пан-кератин^{low}, CD326⁺, CD227^{low}. Отримані дані свідчать, про те, що в процесі культивування клітинної маси із міокарда відбувається поступове видалення з культури диференційованих клітин, що втратили здатність до поділу (кардіоміоцитів), на фоні збільшення кількості їх клітин-попередниць.

За результатами цитогенетичної оцінки стовбурових клітин культури міокарда ми відмічали поступове відсоткове збільшення кількості клітин з анеуплоїдією, яке корелювало зі збільшенням відсоткового вмісту клітин з мікроядрами. Дані зміни, очевидно, пов'язані з «стресом», який виникає у клітин при перенесенні їх з організму у штучне середовище. Внаслідок цього у них можливе виникнення генетичних змін, які накопичуються у процесі культивування.

З кожним пасажем відсотковий вміст клітин з поліплоїдією у культурі зменшувався. Кількість двоядерних клітин залишалася на одному рівні упродовж всього часу дослідження. Поясненням наявності клітин з поліплоїдією і двоядерних клітин є морфологічні особливості культури, оскільки у процесі культивування клітини можуть проходити остаточні етапи диференціювання, що підтверджується їх імунофенотиповими змінами, з перетворенням на зрілі клітини – кардіоміоцити, однією з особливостей яких є багатоядерність.

В результаті спрямованої диференціації стовбурових клітин культури кісткового мозку за впливу 5-азацитидину на 6–7 добу відмічалася поява осередків епітеліоподібних клітин. Вже на 10–22 добу культивування у досліджуваних культурах клітин почали відмічати осередки мимовільного скорочення окремих ділянок моношару клітин, що вказує на їх диференціацію у кардіоміогенному напрямку.

Спрямоване диференціювання у кардіоміогенному напрямку призводить до набуття стовбуровими клітинами кісткового мозку ознак, характерних для

кардіоміоцитів на що вказує підвищення рівня експресії CD10 та тропоніну I та зниженням рівня CD45, CD56, CD227, CD326 та пан-кератину.

При дослідженні за впливу 5-азацитидину генетичної стабільності стовбурових клітин кісткового мозку ми відмічали зниження кількості анеуплоїдних та збільшення поліплоїдних клітин, що ще раз підтверджує диференціювання культури у кардіоміогенному напрямку

За результатами дослідження реакції імунної системи організму тварини-реципієнта на одноразово трансплантовані стовбурові клітини не відмічено цитотоксичної дії в системі *in vitro* як лімфоцитів, так і сироватки крові інтактних тварин до стовбурових клітин міокарда щура, що пояснюється відсутністю попередньої сенсibilізації антигенами досліджуваної культури даних тварин.

У досліді з сенсibilізованими тваринами відмічали значний цитотоксичний вплив як лімфоцитів, що проявлялося значним зниженням індексу проліферації досліджуваних клітин, так і сироватки крові. Варто відмітити, що за використання у досліді стовбурових клітин міокарда IV пасажу цитотоксичний ефект лімфоцитів і сироватки крові був меншим. Отримані дані можна пояснити вищою імуногенністю клітин I пасажу. Зниження цитотоксичного впливу як сироватки, так і лімфоцитів крові при дослідженні культури IV пасажу є результатом видаленням з культури у процесі культивування диференційованих клітин, які викликають імунну відповідь, з одночасним збільшення відсоткового вмісту неімуногенних клітин-попередниць та низькодиференційованих клітин, що підтверджується даними імунофенотипування.

За результатами вивчення міграційної здатності стовбурових клітин у зону пошкодження міокарда вводили 0,5 млн мічених флюорохромом стовбурових клітин культури кісткового мозку в камеру серця, інтраміокардіально та внутрішньовенно.

За інтраміокардіального уведення на 2 добу після трансплантації ми виявляли мічені клітини у каналі введення. Проте на 8 добу ми вже відмічали дифузну локалізацію стовбурових клітин в структурі серцевого м'язу, що свідчить про міграцію мічених клітин з каналу. При аналізі зразків сердець за

інтракардіальної на внутрішньовенної трансплантації, мічених стовбурових клітин в структурі серцевого м'язу, як на 2 так 8 добу нами виявлено не було.

Для визначення оптимального методу моделювання ішемії міокарда з подальшим розвитком інфаркту, ми дослідили два методи формування даної патології – метод накладання лігатури на гілку лівої коронарної артерії та метод термокоагуляції артерії.

На 25 добу після формування ішемії міокарда у щурів першим методом гістологічно виявляли ознаки коагуляційного (сухого) некрозу, а також розростання сполучної тканини, вище місця лігування відмічали циркулярні розлади, що проявлялися гіперемією судин, спостерігали дистрофічні зміни у кардіоміоцитах.

У тварин другої дослідної групи на 25 добу після моделювання ішемії міокарда мікроскопічно виявляли порушення структури кардіоміоцитів, варто зазначити, що дані які ми реєстрували, більшою мірою відображали не власне ішемію, а опік тканини. Тому для подальших досліджень ми використовували метод лігування лівої коронарної артерії.

Гістологічні зміни у міокарді за ішемії ми вивчали на 7, 12, 17 та 25 добу після моделювання інфаркту. На 7 добу після моделювання інфаркту міокарда відмічали наявність запального процесу, інфільтрацію зони пошкодження макрофагами, лейкоцитами та появу грануляційної тканини у вигляді бар'єру навколо ділянки ушкодження. У зоні ішемії – явище міоцитолізу та коагуляційного некрозу, а також проліферації клітин строми, активації ендотеліоцитів. На 12 добу після формування інфаркту спостерігали активізацію процесів формування рубцевої тканини і відкладання колагену без утворення колагенових волокон. У позаінфарктній зоні спостерігали набряк кардіоміоцитів та формування складжів еритроцитів у капілярах. В окремих ділянках зони інфаркту поодинокі островці некротизованих кардіоміоцитів. На 17 добу, після лігування гілки лівої коронарної артерії, у ділянці патологічного процесу відмічені початкові етапи формування сполучної тканини: у зоні ушкодження виявлялась значна кількість судин та фібробластів. У центральних ділянках інфаркту відмічали сформовані колагенові

волокна. Поза зоною пошкодження спостерігався інтрацелюлярний набряк кардіоміоцитів. На 25 добу досліду, виявлені активне формування і структуризація сполучної тканини. Патологічний процес захоплював не лише зону інфаркту, а й сусідні ділянки, де також відмічали ознаки прогресуючого периферичного інфаркту міокарда, в окремих ділянках – повне заміщення некротичної тканини рубцевою. Рубцева тканина була неоднорідна, що свідчить про неодномоментність її розвитку.

Дослідження впливу стовбурових клітин щура культур, отриманих з різних джерел (кісткового мозку, жирової тканини та міокарда) на активність відновлювальних процесів у міокарді щура за експериментального інфаркту показали високу їх ефективність. У процесі дослідження на 25 добу ми відмічали зменшення площі некротизованої тканини міокарда у досліджуваних тварин за впливу стовбурових клітин. Найбільш ефективною у наших дослідженнях виявилися культура стовбурових клітин міокарда: за її використання площа некрозу зменшилася у 1,53 рази порівняно з контролем.

Зважаючи на доведений терапевтичний вплив досліджуваних культур на перебіг експериментально сформованого інфаркту міокарда, наступним нашим завданням було визначення оптимальних умов виділення із різних джерел (кістковий мозок, жирова тканина та міокард) та культивування стовбурових клітин котів, для подальшого їх впровадження у ветеринарну практику.

Так, для отримання культури стовбурових клітин міокарда кота порівнювали метод експланту та 5 варіацій ферментативної обробки тканин серця. Обробка тканин серця кота комбінацією 2,5 % трипсину з додаванням 0,5 мг/мл колагенази (тип II) та 0,5 мг/мл гіалуронідази з експозицією 12 годин при температурі 4 °C виявилася найбільш оптимальним методом отримання культури стовбурових клітин міокарда котів, оскільки, комплексний вплив ферментів та тривала експозиція за низької температури дозволили розщепити міжклітинні зв'язки та мінімізувати негативний вплив на клітини, які в подальшому були здатні до проліферації.

У дослідях з визначення оптимального методу отримання культури стовбурових клітин жирової тканини порівнювали метод експланту та 6 комбінацій ферментів. Як і у випадку з культурою стовбурових клітин міокарда, метод експланту виявився найменш ефективним. Найбільший вихід клітин із жирової тканини, здатних до проліферації, отримано за використання комбінації 1 мг/мл колагенази, 10 мг/мл гіалуронідази з додаванням 4 % бичачого сироваткового альбуміну.

У дослідях з вивчення впливу різних стимуляторів росту на проліферативну активність клітин у культурі та їх каріотип встановлено, що оптимальною концентрацією інсуліноподібного фактору росту для культур стовбурових клітин міокарда та кісткового мозку є 50 нг/мл середовища, що дозволяє достовірно підвищити індекс проліферації у 1,4; 2,0 відповідно, для жирової тканини – 10 нг/мл що дозволяє достовірно підвищити індекс проліферації 1,4 рази.

Оптимальною концентрацією фактору росту фібробластів-2 для всіх досліджуваних культур є 10 нг/мл середовища, що дає змогу достовірно підвищити індекс проліферації для культур стовбурових клітин кісткового мозку, жирової тканини та міокарда kota відповідно у 1,2; 1,3 та 2,7 рази порівняно контролем.

Оптимальною концентрацією гормону росту для культури стовбурових клітин жирової тканини та міокарда kota є 10 нг/мл середовища, що призводить до достовірного підвищення індексу проліферації відповідно у 1,2 та 1,3 рази порівняно контролем. Додавання гормону росту до культури клітин кісткового мозку kota призводить до збільшення розміру клітин, але також до зниження індексу проліферації у порівнянні з контролем.

Biolaminin 521 LN має позитивний вплив на швидкість ділення всіх досліджуваних культур клітин kota: індекс проліферації стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини зріс у 1,3 рази; міокарда – у 1,7 разів порівняно з контролем.

За даними цитогенетичного аналізу додавання інсуліноподібного фактору росту-1, фактору росту фібробластів-2 та гормону росту до культурального середовища до достовірного збільшення кількості генетичних помилок не

призводить у всіх досліджуваних культурах отриманих з кісткового мозку, жировії тканини та міокарда kota у порівнянні з контролем, у той час як додавання Biolaminin 521 LN стимулює зменшення кількості клітин зі зміненим каріотипом.

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

ANNOTATION

Kovpak O. S. Biological properties of stem cells and their effects on the restoration of animal myocardium after experimental pale infarction. – As manuscript.

The thesis for awarding a scientific degree of Ph.D. 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.

Our 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 (CMDSC) 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 CMDSC 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 CMDSC 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}. According to the obtained data, the differentiated cells that are unable to divide (cardiomyocytes), against the background of an increase in the number of their precursors, are being removed from the culture.

The cytogenetic analysis of CMDSC showed a gradual percent increase in cells with aneuploidy, which correlated with a percent increase in cells with micronuclei. These results can be explained by the 'stress' being experienced by cells when transferred from the body to the artificial environment. This may cause genetic changes accumulating during cultivation.

The percentage of cells with polyploidy in the culture tended to decrease with passages. The number of binucleated cells remained at the same level during the study. The presence of cells with polyploidy and binucleated cells may be explained by morphological peculiarities of the culture. Thus, in the process of cultivation cells can go through final stages of differentiation as confirmed by their immunophenotypic changes, becoming mature cells – cardiomyocytes – that are multinucleated.

In case of directed differentiation of the culture of bone marrow-derived stem cells (CBMDSC) using 5-azacytidine for 6–7 days, nuclei of epithelial cells tended to appear. At 10–22 days of cultivation, the studied cell cultures started to show unintentional contractions of some areas of cells monolayer, suggesting their differentiation in the cardiomyogenic direction.

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.

The study of the genetic stability of CBMDSC under the influence of 5-azacytidine showed a decrease in the number of aneuploid cells and an increase in the number of polyploid cells that confirms culture differentiation in the cardiomyogenic direction.

The study of the recipient organism immune system - the animal-recipient transplants interaction – in particular, the effect on the transplanted lymphocytes and blood serum – is the essential stage in the course of putting cell technologies into practice.

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

However, a sensitized animals experiment showed a significant cytotoxic effect of lymphocytes - marked by a great decrease in the proliferation index of studied cells – and blood serum. It is important to emphasize that the experiment with the use of CMDSC IV passage showed a weaker cytotoxic effect of lymphocytes and blood serum. This data can be explained by the higher immunogenicity of the I passage cells. The weaker cytotoxic effect of blood serum and lymphocytes in the course of the study of the IV passage culture is the result of the removal of differentiated cells that provide an immune response. Also, there is a simultaneous percent increase in non-immunogenic precursor cells and low-differentiated cells as confirmed by immunophenotyping data.

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. However, on the eighth day, we noticed the diffuse localization of stem cells in the cardiac muscle structure evidencing the migration of labeled cells from the channel. 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.

In order to determine the optimal myocardial ischemia formation method with the further development of an infarction, we have studied two methods of formation of this pathology.

The studies were made on the 25th day after the formation of myocardial ischemia in rats. Histological study showed signs of coagulation (dry) necrosis and growth of

connective tissue. The periphery had circulatory disorders in the form of vascular hyperemia of vessels and dystrophic changes in cardiomyocytes.

A microscopic study of a group of animals with coagulation of the artery showed cardiomyocytes structure disorder. It is important to emphasize that the recorded data showed tissue burn rather than ischemia. Therefore, the method of ligation was chosen for further researches.

In order to study cardiac changes in case of ischemia, we made a histological study of hearts on the 7th, 12th, 17th, and 25th day. On the 7th day after artificial myocardial infarction, there were noticed inflammatory process, infiltration of the damaged area by macrophages and leukocytes, as well as the formation of granulation tissue in the form of a barrier around the damaged area. The ischemic area had myocytolysis and coagulation necrosis. Also, there were stromal cells proliferation and endothelial cells activation. On the 12th day after infarction, there were noticed activation of scarring and deposition of collagen without the formation of collagen fibers. The noninfarction area demonstrated edema of cardiomyocytes and formation of erythrocytes sludge in capillaries. Some infarction areas had isolated islets of necrotized cardiomyocytes. On the 17th day after artery ligation, the area of the pathological process demonstrated the first stages of the connective tissue formation: a great number of vessels and fibroblasts were found in the damaged area. The central parts of infarction formed collagen fibers. The undamaged area had intracellular edema of cardiomyocytes. On the 25th day, there were active formation and structuring of connective tissue. The pathological process covered the area of infarction and adjoining areas that also had signs of progressive peripheral myocardial infarction. In some areas, necrotic tissue was completely substituted with scar tissue. Scar tissue was heterogeneous evidencing its gradual development.

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 CMDSC 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. Our study demonstrated that treatment of the cardiac tissue of a cat with 2.5 % of trypsin adding 0.5 mg/ml of collagenase (type II) and 0.5 mg/ml of hyaluronidase with 12-hours exposure at 4 °C is the optimal method for obtaining the cat myocardium stem cells culture. At the same time, the complex effect of enzymes and long-time exposure at low temperatures made it possible to break down intercellular junctions and minimize the negative effect on cells that are potentially able to proliferate.

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. Like CMDSC, the method of explant appeared to be the least effective. The greater number of adipose tissue stem cells able to proliferate was obtained using a combination of 1 mg/ml of collagenase, 10 mg/ml of hyaluronidase, with the addition of 4 % BSA.

Further, we studied the effect of different growth stimulators on the proliferative activity of cells in the culture and their karyotype.

The study revealed that the optimal concentration of insulin-like growth factor for cultures of the stem cells of myocardium and bone marrow is 50 ng/ml of medium making it possible to increase the proliferation index 1,4; 2.0 times, respectively, for adipose tissue it is 10 ng/ml making it possible to increase the proliferation index 1.4 times.

The optimal concentration of growth factor of fibroblasts-2 for all studied cultures is 10 ng/ml of medium making it possible to increase the proliferation index for cultures of the stem cells of bone marrow, adipose tissue, and myocardium of a cat 1,2; 1.3 and 2.7 times, respectively if compared with the control group.

The optimal concentration of the growth hormone for the culture of stem cells of adipose tissue and myocardium of a cat is 10 ng/ml of medium increasing the proliferation index 1,2 and 1,3 times, respectively if compared with control group. Adding the growth

hormone to the culture of bone marrow cells of a cat increases the size of cells and decreases the proliferation index if compared with the control group

Biolaminin 521 LN improves the rate of division of all studied cultures of a cat: the proliferation index of stem cells of bone marrow and adipose tissue increased 1.3 times; myocardium – 1.7 times if compared with the control group.

The cytogenetic analysis has revealed that the addition of insulin-like growth factor-1, growth factor of fibroblasts-2, and growth hormone to culture medium does not increase the number of genetic errors in studied cultures if compared with the control group, while the addition of Biolaminin 521 LN decreases the number of cells with changed karyotype.

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

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. Режим доступу до статті: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/6841> (Здобувачем

досліджено зміни морфології клітин щура у кардіоміогенному напрямку за дії 5-азацитидину).

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. Режим доступу до статті: <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., **Kovpak O.**, 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 кота 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 кота 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»).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	19
ВСТУП	20
РОЗДІД 1: ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. Сучасний стан вивченості ролі стовбурових клітин в регенерації тканин	26
<i>1.1.1. Джерела стовбурових клітин дорослого організму</i>	<i>30</i>
<i>1.1.2. Мезенхімальні стовбурові клітини</i>	<i>31</i>
<i>1.1.3. Гемопоетичні стовбурові клітини</i>	<i>33</i>
<i>1.1.4. Ендотеліальні клітини-попередниці</i>	<i>35</i>
<i>1.1.5. Преадипоцити</i>	<i>36</i>
<i>1.1.6. Стовбурові клітини дорослого серця</i>	<i>37</i>
1.2. Інфаркт міокарда	38
1.3. Підходи до лікування хворих з ішемією серця	41
1.4. Висновки з огляду літератури	45
РОЗДІЛ 2: ВИБІР НАПРЯМКІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	47
РОЗДІЛ 3: РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	74
3.1 Оцінка якості і безпечності культур стовбурових клітин міокарда щура, призначених для трансплантації	74
<i>3.1.1. Зміна морфології культури стовбурових клітин міокарда щура з пасажжами</i>	<i>74</i>
<i>3.1.2. Характеристика стовбурових клітин культур, отриманих із міокарда за поверхневими маркерами</i>	<i>76</i>
<i>3.1.3. Цитогенетичний аналіз стовбурових клітин, отриманих із міокарда щура у процесі культивування</i>	<i>78</i>
3.2. Оцінка культури червоного кісткового мозку щура після направленої диференціації у кардіоміогенному напрямку	81

3.2.1. Фенотипові зміни в культурі стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура за впливу 5-азацитидину	82
3.2.2. Цитогенетичний аналіз стовбурових клітин культури отриманої із червоного кісткового мозку щура після дії 5-азацитидину	84
3.3. Особливості регенерації в міокарді щура за експериментального інфаркту	85
3.4. Цитотоксична активність лейкоцитів і сироватки крові щурів відносно алогенної культури стовбурових клітин міокарда	93
3.5. Здатність стовбурових клітин до міграції у міокард за його ушкодження..	96
3.6. Вплив трансплантації стовбурових клітин культур, отриманих з різних джерел на активність відновлення структури міокарда щура внаслідок експериментального ішемічного інфаркту	98
3.7. Оптимізація умов отримання і культивування стовбурових клітин kota отриманих з різних джерел	100
3.7.1. Вплив способу дезагрегації міокарда kota на ефективність виділення стовбурових клітин для отримання культури	100
3.7.2 Вплив способу дезагрегації жирової тканини kota на ефективність виділення стовбурових клітин для отримання культури	103
3.7.3 Влив фактору росту фібробластів (FGF-2), інсуліноподібного фактору росту (IGF-1), гормону росту (rhGH) та biolaminin 521 LN на проліферативну активність та каріотипові стабільність стовбурових клітин культур kota отриманих з різних джерел.....	106
РОЗДІЛ 4: АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	115
ВИСНОВКИ	136
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	139
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	140
ДОДАТКИ	173

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АК – апоптозні клітини

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ГСК – гемопоетичні стовбурові клітини

ДЯ – двоядерні клітини

ЕДТА - етилендіамінтетраоцетова кислота

ЕКП – ендотеліальні клітини-попередниці

ККМ – культура клітин міокарда

КСКЖТ – культура стовбурових клітин жирової тканини

КСККМ – культура стовбурових клітин кісткового мозку

КСКМ – культура стовбурових клітин міокарда

МІ– мітотичний індекс

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

МЯ – клітини із мікроядром

СВФ – стромально-васкулярна фракція

ТТХ – трифенілтетразолій хлорид

ФБР – фосфатно-буферний розчин

FBS – фетальна бичача сироватка

CD-маркер – кластер диференціювання

de novo – заново

DMEM – середовище Ігла модифіковане Дюльбеко

FGF-2 – фактор росту фібробластів

IGF-1 – інсуліноподібний фактор рост

in vitro – характеристика певного біологічного процесу, змодельованого поза організмом

in vivo – характеристика певного біологічного процесу, який відбувається в організмі

rhGH – гормон росту

ВСТУП

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 і інших дрібних судин у серці. Переривання надходження крові до тканин міокарда може призвести до некрозу серцевого м'яза (інфаркт міокарда) [202].

Коронарні артерії перфузують серце і сприяють транспортуванню поживних речовин і Оксигену в метаболічно активний міокард [253]. 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 [183]. Ішемія міокарда й інфаркт, пов'язаний із захворюванням коронарних артерій, також трапляється у дрібних тварин, як собак, так і котів [110, 253], що може стати причиною раптової смерті чи смерті під час анестезії [253].

Зважаючи на те, що серце у дорослих ссавців має дуже обмежену здатність до регенерації [244] і втрачені клітини замінюються фіброзним рубцем [273] виникає необхідність пошуку методів лікування, що спрямований на відновлювати структури серцевого м'яза після ішемії. Клітинні технології є перспективним методом лікування тварин з інфарктом міокарда, що дозволяє відновлювали його структуру та скоротливої функції [295, 126, 164, 267, 151].

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 [187, 13, 15, 12].

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.); «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.

Наукова новизна отриманих результатів підтверджена патентом на корисну модель за № 118933 від 28.08.2017 р. «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. Здобувач особисто здійснив пошук і аналіз літературних джерел за темою дисертації, провів патентний пошук із досліджуваної 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 керівником.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи було апробовано в доповідях та обговорено на: Міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми емерджентних хвороб тварин: молекулярна епізоотологія, експрес-діагностика та біобезпека», присвяченій 150-річному ювілею від дня народження видатного вченого Дедюліна О. В. (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, включених до міжнародних наукометричних баз даних, патент 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 комп'ютерного тексту. Матеріали дисертації проілюстровано 4 схемами, 50 рисунками і 15 таблицями. Список використаних джерел містить 317 найменувань, з яких 273 латиницею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасний стан вивченості ролі стовбурових клітин в регенерації тканин

За останні 50 років виконано значну кількість експериментальних досліджень, які вирішують різні проблеми клітинних технологій. Опубліковані сотні робіт, які вказують на позитивні результати використання стовбурових клітин (СК) при різноманітних захворюваннях людини і тварин [6, 70, 133]. Внаслідок проведених досліджень прийшло розуміння того, що стовбурові клітини та їх похідні, на тому чи іншому етапі гістогенезу, можуть слугувати основою для розробки інноваційних клітинних технологій. При цьому вражає широта клінічних проблем, у вирішенні яких роль таких методів лікування оцінюється, як реальна [44].

На даний час існують жорсткі критерії до клітин, які претендують на визначення «справжні стовбурові клітини». Вони повинні бути неспеціалізованими, клоногенними і здатними до необмеженого самооновлення (процес, при якому стовбурові клітини можуть симетрично ділитися і давати початок дочірнім стовбуровим клітинам). Саме здатність самостійно відновлюватися протягом тривалого часу забезпечує збереження популяції стовбурових клітин протягом усього життя організму. Крім того вони мають володіти здатністю до асиметричного поділу, при якому відбувається утворення двох дочірніх стовбурових клітин, одна з яких у відповідь на сигнали може диференціюватися у кілька типів спеціалізованих клітин усіх трьох ембріональних зародкових шарів – ектодерми, мезодерми і ендодерми [44].

Виходячи з двох основних характеристик стовбурових клітин (необмежене самооновлення та здатність до диференціації), їх подальший розвиток може проходити чотирма шляхами [199]. Перший шлях розвитку полягає в тому, щоб стовбурові клітини залишатися у стані спокою, тобто не піддавалися діленню чи диференціюванню. При чому, такі клітини зберігають своє місце в пулі

стовбурових клітин. Прикладом можуть бути стовбурові клітини в кістковому мозку, які чекають сигналів активації з організму.

Основою другого шляху розвитку є симетричне ділення стовбурових клітин, за якого утворюються дві дочірні клітини, ідентичні батьківській. Даний процес не призводить до утворення диференційованих клітин, проте збільшує пул стовбурових клітин, з яких можуть розвиватися спеціалізовані.

За третього шляху розвитку стовбурових клітин відбувається їх асиметричний поділ: стовбура клітина ділиться на дві дочірні клітини, одна з яких є копією батьківської, інша – більш спеціалізована клітина, що називається соматичною чи комутованою клітиною-попередницею. Асиметричне ділення приводить до утворення диференційованих клітин, необхідних для розвитку / регенерації тканин, а також для підтримки пулу стовбурових клітин на майбутнє;

Четвертий шлях розвитку стовбурових клітин полягає в тому, що при їх поділі утворюється дві дочірні клітини, які відрізняються від батьківської, що призводить до збільшення кількості диференційованих клітин з втратою чисельності стовбурових клітин.

Фактори, що визначають долю стовбурових клітин в організмі, є ключовою проблематикою наукових досліджень стемологів, знання біологічних властивостей стовбурових клітин корисне при їх клінічному застосуванні. Наприклад, клініцисти та вчені могли б провокувати популяцію стовбурових до симетричного самооновлення з метою диференціювання в мультипотентні або більш спеціалізовані клітини-попередниці. Це забезпечить велику однорідну популяцію клітин на корисній стадії диференціювання, яка може бути доставлена пацієнтам для успішної регенерації тканин.

Варто зазначити, що поняття «стовбурові клітини» охоплює багато видів клітин, тому на основі їх походження їх розділяють на два типи [268]: ембріональні стовбурові клітини, які отримують з внутрішньоклітинної маси передімплантаційних ембріонів і мають здатність утворювати всіх три ембріональні зародкові шари (тобто ектодерму, ендодерму і мезодерму); стовбурові клітини дорослого організму, які знаходяться у різних тканинах та

органах, і мають здатність до диференціювання принаймні в один тип функціональних клітин.

Проте, з розвитком науки дане поняття набуло ширшого значення, оскільки нові дослідження виявили, що повністю диференційовані клітини дорослого організму можливо повернути назад у ембріональні стовбурові клітини [58]. Так, дві незалежні групи вчених змусили дорослі клітини повернутися до плюрипотентного стану за допомогою молекулярної маніпуляції, отримавши «індуковані плюрипотентні стовбурові клітини» (iPS), які володіють тими ж характеристиками, що і ембріональні стовбурові клітини: проліферацією, морфологією та експресією генів (у формі відповідних поверхневих маркерів та білків) [277, 276, 310, 220, 50]. Обидві групи дослідників для транспортування генів для транскрипційних факторів у клітини дорослих використовували ретровіруси. Ці гени транскрибуються і транслуються в білки, які регулюють експресію інших генів, призначених для перепрограмування дорослого ядра назад у ембріональний стан. Вчені представили ембріональні транскрипційні фактори, відомі як Sox2 і Oct4, при чому одна група також додала Klf4 і c-Мус [277], а інша – Lin28 і Nanog [310].

Саме тому все частіше використовують класифікацію стовбурових клітин, що заснована на діапазоні диференційного потенціалу [114]: тотіпотентні, плюрипотентні, мультипотентні, олігопотентні і уніпотентні.

Медичний словник Національного інституту охорони здоров'я дає два різні визначення терміну «тотіпотент»: «здатний розвиватися в повний організм» або «диференціюватися в будь-які його клітини чи тканини» [98]. Зважаючи на це, існує дискусія навколо терміну «тотіпотентність», що зумовлена суттєвими відмінностями між цими двома визначеннями. Одноядерний ембріон (зигота) є «тотіпотентним» при використанні обох визначень, у той самий час деякі автори характеризують пухлини [111, 141] та стовбурові клітини [45, 200] як «тотіпотентні», спираючись лише на друге визначення (тобто здатність цих клітин диференціюватися у широкий спектр клітин). Саме тому більшість дослідників схильється до того, що тотіпотентні клітини – це зиготи та клітини ембріонів на

ранніх стадіях розвитку, які здатні диференціюватися у всі види клітин дорослого організму та позазародкові ембріональні клітини трофобласту. Плюрипотентні клітини, до яких належать клітини ембріобласту у бластоцисті, здатні диференціюватися у клітини всіх трьох зародкових шарів організму [174, 152, 166].

Плюрипотентні стовбурові клітини, що використовуються в дослідженнях, переважно отримують із ембріонів, звідки і назва, яку досить часто використовують: «ембріональні стовбурові клітини». Передімплантаційні ембріони протягом декількох днів містять лише 10–15 % плюрипотентних клітин. Ці клітини можна ізолювати та культивувати на шарі «фідерних» клітин, які забезпечують сигнали (на даний час ще не достатньо вивчені), що стимулюють проліферацію стовбурових клітин підтримуючи при цьому їх плюрипотентність.

Найбільш перспективним кандидатом клітинної терапії, для використання у клінічній практиці є мезенхімальні стовбурові клітини. Ці клітини володіють достатньою пластичністю, щоб стати клітинами-попередницями у межах конкретного зародкового шару [152, 166]. Мультипотентні стовбурові клітини, що мають найвищий потенціал для диференціювання знаходяться в ембріоні на стадії гаструляції. При чому вони здатні дати початок усім клітинам відповідного зародкового шару, не будучи плюрипотентними стовбуровими клітинами, оскільки втратили здатність до диференціації у клітини всіх трьох зародкових шарів.

Олігопотентні стовбурові клітини можуть диференціюватися лише у кілька типів клітин, наприклад, лімфоїдні стовбурові клітини дають початок НК-клітинам і лімфоцитам, мієлоїдні стовбурові клітини – гранулоцитам [71].

На нижньому кінці спектра пластичності знаходяться уніпотентні клітини, які здатні диференціюватися лише в одному спеціалізованому клітинному напрямку [266]. Наприклад, стовбурові клітини епідермісу або м'язові стовбурові клітини дають початок лише відповідним типам клітин. Лише здатність до самооновлення відрізняє уніпотентні стовбурові клітини від нестовбурових клітин [138]. Дані стовбурові клітини, як правило, знаходяться в межах певного органа і, хоча їх диференційована здатність обмежена, ці клітини-попередниці відіграють

важливу роль у збереженні цілісності тканин шляхом відновлення пошкоджених чи старих клітин.

1.1.1. Джерела стовбурових клітин дорослого організму

У органах і тканинах дорослого організму містяться власні стовбурові клітини, так звані «регіональні стовбурові клітини». Дані клітини в першу чергу відповідають за оновлення клітинної популяції тканини, у яких розміщуються, та першими активуються при пошкодженні. Регіональні стовбурові клітини розміщені у більшості органів та тканин дорослого організму: головному та спинному мозку [245, 154], шкірі [94], травному тракті [142, 78], пульпі зубів [219], рогівці та сітківці ока [137, 74], скелетних м'язах [248], підшлунковій залозі [81], серці [158] та ін.

Хоча значна кількість науковців досліджує властивості ембріональних стовбурових клітин, проте їх подальше використання у клінічній практиці стикається з рядом етичних проблем. У той час, використання стовбурових клітин дорослого організму вже давно практикується у клінічній практиці [135]. Проте, варто зазначити, що з розвитком науки і збільшенням знань про стовбурові клітини науковці почали розділяти клітини не за джерелом отримання, а за властивостями самих клітин.

Найбільш вивченим джерелом стовбурових клітин дорослого організму на сьогоднішній день є кістковий мозок. Ще в 1974 р. А. Я. Фріденштейн отримав з кісткового мозку стовбурові стромальні клітини, які прикріплювалися до культурального посуду та мали фіброблостоподібну форму [121]. На даний час науковці виділяють з кісткового мозку різні види клітин, які здатні до поділу в системі *in vitro*: плюрипотентні [300, 301] та мультипотентні [138] стовбурові клітини, зокрема гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) [272, 303, 228], мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) [228, 224], ендотеліальні клітини-попередниці [308, 210],.

Альтернативним джерелом стовбурових клітин дорослого організму все частіше слугує жирова тканина. Через широку доступність і здатність

диференціюватися в межах мезодерми включаючи кісткову, хрящову, м'язову та жирову тканин, СК жирової тканини можуть використовуватися для вирішення багатьох питань клітиннозаміщувальної терапії [194]. Варто зазначити, що вперше стовбурові клітини з жирової тканини були ізольовані М. Родбелом ще в 1960-х роках [239]. Дана тканина також гетерогенна за своїм клітинним складом. З жирової тканини виділяють гемопоетичні стовбурові клітини [72, 155] (більшість науковців схиляються до думки, що вони потрапляють у культуру клітин жирової тканини з кровоносного русла [55, 196]), мезенхімальні стовбурові клітини [178, 80], ендотеліальні клітини-попередниці [314, 305] та преадипоцити [257].

Проте не варто забувати і про органоспецифічні стовбурові клітини, які знаходяться у кожному органі тваринного організму, це стосується і серця, адже їх використання є логічним у серцевій регенеративній терапії. Поняття «дорослого серця», як незмінно диференційованого органа без здатності до регенерації, було розвінчано дослідженнями Beltrami A. P. та колег [63]. Існування кардіальних стовбурових клітин відкриває нові можливості для відновлення міокарда.

1.1.2. Мезенхімальні стовбурові клітини.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) були вперше виділені і охарактеризовані Фріденштейном та його колегами в 1974 році [121]. МСК, також відомі як «мезенхімальні стромальні клітини» – підгрупа негемопоетичних стовбурових клітин дорослого організму, що походять з мезодерми. Вони володіють здатністю до самооновлення і багатолінійного диференціювання не тільки в межах мезодермальної лінії, зокрема в хондроцити, остецити та адипоцити, а й у клітини екто- та ендодерми [68, 230, 130, 247, 106]. МСК виділяють з кісткового мозку, жирової тканини, пуповини, печінки, м'язів та легенів з подальшою можливістю культивування їх в системі *in vitro* [10, 49, 225, 69].

Фенотип МСК. На даний час відомий повний список поверхневих маркерів МСК: вони позитивні за CD13, CD29, CD44, CD49a, b, c, e, f, CD51, CD54, CD 58, CD71, CD73, CD 90, CD102, CD105, CD106, CDw119, CD120a, b, CD123, CD124,

CD126, CD127, CD140a, CD166, P75, TGFb1R, TGFbIIIR, HLA- A, B, C, SSEA-3, SSEA-4, D7 та негативні за CD3, CD4, CD6, CD9, CD10, CD11a, CD25, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD50, CD62E, L, S, CD80, CD86, CD95, CD117, CD133, SSEA-1 [226]. Проте більшістю науковців для характеризувannya клітин як МСК зазвичай використовується набір мінімальних критеріїв до мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин, запропонованих у 2006 році Комітетом мезенхімальних і тканинних стовбурових клітин (Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee) Міжнародного товариства клітинної терапії (International Society for Cellular Therapy). Серед них: 1) мезенхімальні стовбурові клітини адгезують до культурального пластику при стандартних умовах культивування; 2) вони мають експресувати CD105, CD73 та CD90, у той час як експресія CD45, CD34, CD14 чи CD11b, CD79α чи CD19 та HLA-DR має бути відсутня; 3) МСК мають бути здатні до диференціації у остеогенному, хондрогенному та адипогенному напрямках [108]. Крім того, нещодавно переглянута заява ISCT та Міжнародної федерації жирової терапії та науки (IFATS) передбачає додаткові маркери для стовбурових клітин отриманих з жирової тканини: вони мають бути позитивними за CD36 і негативними за CD106 на відміну від МСК кісткового мозку [75].

Генетична стабільність МСК. На даний час існують суперечливі дані щодо генетичної стабільності МСК. За даними Foudah D. та ін. [115] у культурі МСК, отриманих з кісткового мозку щурів, з пасажами збільшується кількість анеуплоїдій без залежності від культурального середовища. Проте, науковці у свою чергу стверджують, що МСК є оптимальним джерелом для досліджень у клітинній терапії. Miura M. та ін. [197] сверджують, що МСК, отримані з кісткового мозку мишей, після численних пасажів здатні переходити до злоякісного стану, що призводить до утворення фібросаркоми в системі *in vivo*. У той же час роботи Mareschi K. та ін. [181] та Rubio D. та ін. [243] вказують на відсутність змін каріотипу МСК у культурі людини в системі *in vitro* при їх культивуванні до 2 місяців [181, 243]. Дослідження Izadpanah R. та ін. [150] вказують про відсутність новоутворень у імунodefіцитних мишей при введенні культури клітин на ранніх етапах культивування навіть при наявності у останній зміненого каріотипу.

Проте більшість дослідників згодна, що злоякісна трансформація можлива при тривалому культивуванні МСК в системі *in vitro* [243, 150, 197, 3, 115]. Їх дані свідчать, що кількість клітин зі зміненим каріотипом збільшується з тривалістю культивування. Разом з тим, важливу роль у підтриманні генетичної стабільності МСК у культурі відіграють: джерело отримання клітин, умови культивування, спосіб отримання первинної культури та методика субкультивування [3, 28, 115].

1.1.3. Гемопоетичні стовбурові клітини

Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) – це клітини гемопоетичної системи, які мають потенціал як до асиметричного поділу, так і до самопоновлення. Варто зазначити, що гемопоетичні стовбурові клітини виникають із попередників мезодерми в різних місцях і на різних стадіях розвитку організму [103, 211]. Вони є мультипотентними, і у випадку ГСК – це здатність диференціюватися у всі функціональні клітини крові [256].

Фенотип ГСК. У 1988 році групою науковців на чолі з Spangrude G. J. [269] почалося очищення фракції гемопоетичних стовбурових клітин, отриманих з кісткового мозку мишей, за допомогою відносно нових технологій: мультикольорового флюорисцентного сортування клітин та моноклональних антитіл. Отримана популяція ГСК мала наступний поверхневий маркерний фенотип: Lin, TER119, Mac1, Gr1, CD45R/B220, CD3, CD4, CD8⁻, Thy-1^{low} Sca-1⁺. Дана популяція становила приблизно 0,05 % клітин кісткового мозку. Spangrude G. J. та його колеги продемонстрували, що це єдині клітини кісткового мозку миші, здатні переносити довгострокове, понад 3 місяці, відновлення всієї кровотворної системи при пересадці летально опроміненим мишам. Однак вони вказали, що тільки 30 % Lin⁻, Thy-1^{low}, Sca-1⁺ клітин, що були трансплантовані шляхом введення в хвостову вену, можуть врятувати 50 % летально опромінених мишей. Тому, в 1991 році, Ogawa M. та ін. повідомили, що прогеніторні гемопоетичні клітини кісткового мозку миші експресують c-kit, який є рецептором для фактору стовбурових клітин [212]. З того часу, Lin⁻, Thy-1^{low}, Sca-1⁺, c-kit⁺ (LSK) зазвичай використовуються, як канонічні маркери для збагаченої фракції ГСК.

Подальше вивчення гемопоетичних стовбурових клітини показало, що LSK – фракція кісткового мозку неоднорідна і містить клітини з фенотипом як CD34⁺ так і CD34^{-low} [217]. Зважаючи на це, Kiel M. J. та ін. розробили альтернативний метод очищення ГСК заснований на схемі експресії групи білків SLAM. Вони вказали, що CD150⁺, CD48⁻ та CD244⁻ у поєднанні з канонічними маркерами дозволяє збільшити чистоту отриманих культур у декілька разів [163].

Зважаючи на те, що гемопоетичні клітини, як вважають, походять від гемангіобластів та / або гемогенного ендотелію, який може виробляти як гематопоетичні клітини, так і ендотеліальні клітини, здається цілком природним, що ГСК експресують поверхневі маркери, характерні для клітин ендотеліального походження: CD34, PECAM-1 / CD31, ендоглін, Tie2 і VE-кадгерин [192, 278, 309]. Проте, експресія даних маркерів знижується або навіть зникає на пізніх стадіях розвитку [192].

Проте, варто зазначити, що фенотип гемопоетичних стовбурових клітин у різних видів відрізняється. Так, ГСК людини не експресують Sca-1 та CD150 [168], тоді як CD34⁺ та CD38⁻ фенотип розглядається як канонічний маркер, встановлений для людських ГСК. У той час як ГСК, отримані з кісткового мозку дорослих мишей, є CD34⁻ та CD38⁺ [234, 185, 275].

ЕСАМ – один з останніх маркерів, який був запропонований для ідентифікації ГСК. ЕСАМ функціонально незамінний для ГСК при відновленні гомеостатичного кровотворення, адже рівень його експресії збільшується при активації ГСК, у той час як зниження його рівня приводить до тривалого пригнічення кровотворення у кістковому мозку [271].

Генетична стабільність ГСК. У стаціонарних умовах *in vivo* ГСК переважно перебувають у стані спокою [92, 221]. Після гематологічного ураження, сплячі ГСК входять у клітинний цикл, щоб генерувати клітини-попередниці, які можуть породжувати зрілі клітини. Після відновлення гемопоетичного гомеостазу, активовані ГСК знову повертаються в стан спокою [302]. Регулятори клітинного циклу відіграють у цьому процесі ключову роль [97]. Інгібітори циклінзалежної кінази p21Cip1, p27Kip1 та p57Kip2 підтримують спокій гемопоетичних

стовбурових клітин та клітин-попередниць, стримуючи активність циклінзалежної кінази (Cdk). Їх інактивація в кровотворних клітинах може змінювати розмір пулу ГСК і самовідновлення [90, 89, 184, 316].

Проте культивування ГСК в системі *in vitro* призводить до зміни у вищеописаних процесах. Так, за даними Liu A. M. та ін. [176] культивування ГСК в системі *in vitro* призводить до генетичних змін у культурі. У клітинах фракції LSK виявили значний рівень геномічної нестабільності після культивування, про що свідчить поява анеуплоїдних клітин. Варто зазначити, Liu A. M. та ін. відмічали, що культивування клітин у гіпоксичному середовищі 3 % O₂ (що імітує умови в червоному кістковому мозку) призвело до зменшення генетичних змін. Окрім того, аналіз гемопоетичних стовбурових клітин після тривалого культивування в системі *in vitro* показав збільшення кількості генетичних помилок у порівнянні з молодого культурою виявив посилену хромосомну нестабільність, викликану культурою, що пояснюється підвищенням окисного стресу у клітинах з віком [176].

1.1.4. Ендотеліальні клітини-попередниці

У 1997 році Asahara T. та ін. [53] повідомили про виявлення циркулюючих клітин-попередниць ендотеліального походження. Ендотеліальні клітини-попередниці (ЕПС) одержані з кісткового мозку, демонстрували високий рівень маркерів «ендотеліальних» клітин та низький – «гемопоетичних» маркерів під час культури в системі *in vitro* [52, 54]. Диференціація гемангібласта призводить до утворення як гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК), так і ендотеліальних клітин-попередниць (ЕКП). У свою чергу ці клітини забезпечують регенерацію всі клітин крові та ендотелію. ГСК та ЕКП також з'являються одночасно під час розвитку від мезодермальних попередників. Спочатку вважалося, що ЕКП присутні тільки під час ембріонального розвитку, тепер, як відомо, вони існують і у дорослому організмі [308]. Ці ангіогенні клітини мають властивості ембріональних ангіобластів [143]. ЕКП мігрують у пошкоджені судини і стають зрілими ендотеліальними клітинами під час ендотеліалізації та неоваскуляризаційних процесів. Крім того, ЕКП, одержані з інших джерел, також можуть породжувати

зрілі ендотеліальні клітини, що робить цю групу клітин більш різноманітною. Точний механізм мобілізації та диференціації ЕКП на даний час повністю не вивчений [193].

Фенотип ЕКП. Ендотеліальні клітини-попередниці є попередниками зрілих ендотеліальних клітин і спочатку були охарактеризовані експресією CD34 та більш незрілого маркерного білка CD133, ендотеліальних маркерних білків, таких, як судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF)R2 (KDR), фактор фон Віллебранда (VWF), VE-кадгерин [290, 107]. Дещо пізніше Hager G. та ін. [132] вказали, що ЕКП експресують специфічні маркери CD31, CD144, CD146, CD73 та CD105, додатково підтвердивши експресію фактору росту ендотелію судин (VEGF) R2. Zhang H. та ін. [312] у своїх дослідженнях вказують, що ЕКП позитивні за CD34, CD31, CD73, CD105 та (VEGF) R2, негативні за CD45, CD90 і лейкоцитарним антиген-антигеном D. Проте, на даний час більшість дослідників, які мали на меті ідентифікувати ЕКП, сходяться на думці, що ЕКП мають експресувати CD34, CD117, CD133, CD105, CD144, CD184 [180, 307, 51, 263].

Генетична стабільність. Corselli та ін. [99] у своїх дослідженнях вказують, що ЕКП, отримані з пуповинної крові, показують високий рівень хромосомних змін у культурі. Додатково вони вказують, що збільшення популяції *ex vivo* одержуваних з пуповинної крові ЕКП, не приводило до порушень у їх каріотипі. У той час ЕКП, отримані з периферійної крові, показали нормальний каріотип у культурі в системі *in vitro* (40–60 подвоєнь популяції клітин) [286].

1.1.5. Преадипоцити

У 1940-х рр. гістологічні спостереження за появою адипоцитів в камерах, імплантованих у вуха живих кроликів, показали, що формування жиру можливе *de novo* [95]. Подальші дослідження показали, що нові адипоцити утворюються лише вздовж судинної системи [95], чим підтвердилися попередні повідомлення про зв'язок васкуляризації та утворення жиру [96]. Подальші дослідження підтвердили наявність у білій жировій тканині мітотично активної клітинної популяції [136]. Після розробки Rodbell M. 1964 році методів розділення клітин білої жирової

тканини на адипоцити та стромально-васкулярну фракцію (СВФ) [240] Hollenberg С. Н. та Vost А. у 1969 році виявили наявність у останній адипоцитарних клітин-попередниць [140]. Дослідження, проведені пізніше, вказали на наявність у СВФ фібробластних клітин, здатних до адипогенезу [207, 229, 289]. Як наслідок, дані клітини були названі «первинними» преадипоцитами, які здатні диференціюватися в адипоцити, хондроцити, остеобласти та міоцити [282, 37].

Фенотип преадипоцитів. За даними Berry R. та Rodeheffer M. S. [67] клітини-попередниці адипоцитів негативні за CD31 і CD45 та позитивні за маркерами мезенхімальних стовбурових клітин Sca-1, CD34 та CD29. За рівнем CD24 вони розділили клітини на преадипоцити і адипоцити-попередники за високим та низьким рівнем експресії відповідно [67]. У той час Carrière А та ін. [82] характеризують преадипоцити як CD45⁻, CD31⁻, CD34^{low}, CD38⁺.

1.1.6. Стовбурові клітини дорослого серця

Тривалий час серце вважалося постмітогенним органом без здатності до регенерації, тому пошук стовбурових клітин у цьому органі вважався марним. Проте з часом почали з'являтися повідомлення про існування міоцитів шлуночка, що зазнають мітозу та цитокінезу у нормі та за патологій у серці дорослих ссавців кількох видів, включаючи людей [156, 65]. А вже в 2003 році Beltrami А. Р. та ін. [63] остаточно підтвердили наявність у серці так званих «дорослих стовбурових клітин серця» які, у свою чергу, володіють здатністю до самовідновлення, клоногенністю та є мультипотентними: здатними до диференціації у міоцити, гладку мускулатуру та ендотеліальні клітини [61].

Фенотип стовбурових клітин дорослого серця. За даними Beltrami А. Р. та ін. [63], ізольовані за експресією c-kit⁺, Lin⁻ клітини з серця були рівномірно негативними за маркерами мієлоїдних, лімфоїдних та еритроїдних клітинних ліній (CD34, CD45, CD20, CD45RO, CD8 та TER-119). У той час, за даними Barile L. та ін. [59], стовбурові клітини, виділені з серця, є позитивними за маркерами стовбурових / прогеніторних клітин Kit, Sca-1, Isl-1. Разом з тим Wang X. та ін. [296] додатково вказують, що дані клітини негативні за CD31. У той час, як

маркери, що використовуються для ідентифікації стовбурових клітин серця та їх біологічних функцій у людини, включають SSEA-1, Oct-3/4, Isl-1, c-Kit (CD117, SCFR), Sca-1 (Ly 6), MDR-1 (Abcb1, Pgp), Abcg2 (MXR1, BCRP), CD133, CD90 (Thy-1), CD105, CD34, CD31 (PECAM-1) і CD45 (LCA) [267].

1.2. Інфаркт міокарда

Інфаркт міокарда – ішемічний некроз міокарда, який виникає в результаті гострої невідповідності коронарного кровообігу та потреби міокарда [42, 87, 273].

Серце ссавців потребує значної кількості Оксигену, оскільки воно у стані спокою споживає приблизно 8–15 мл O_2 / хв / 100 г тканини та споживання може збільшуватися до 70 мл O_2 / хв / 100 г тканини міокарда під час енергійних вправ [299, 77]. Зважаючи на це, серцевий м'яз не може виробляти достатню кількість енергії в анаеробних умовах для підтримки суттєвих клітинних процесів. Таким чином, постійна подача оксигену є необхідною умовою для підтримки серцевої функції та життєздатності кардіоміоцитів [125].

Енергетичний дефіцит на фоні нестачі O_2 стає пусковим механізмом у формуванні вогнищового некрозу міокарда на фоні ішемії, а анаеробний гіркий стає основним джерелом макроергів [112, 270]. Піруват, що утворюється, не піддається окиснювальному декарбоксилюванню і, як наслідок, перетворюється у лактат, який, у свою чергу, стає причиною внутрішньоклітинного ацидозу. Ацидоз пригнічує метаболічні реакції та іонний транспорт. Внутрішньоклітинний ацидоз також веде до порушення секвестрації іонів кальцію у мітохондріях та ендоплазматичній сітці. Конкуренція іонів гідрогену та кальцію за місця зв'язування, стає причиною накопичення внутрішньоклітинних вільних іонів кальцію. У свою чергу, підвищена концентрація кальцію в крові веде до посилення процесів оксидантного стресу, надлишкового синтезу оксиду азоту, активації внутрішньоклітинних ферментів. Крім того, зниження рН всередині клітини та в позаклітинному середовищі володіє безпосередньою цитотоксичною дією [112, 270].

Додатково під час ішемічного пошкодження на фоні некротичної загибелі кардіоміоцитів відмічається і активізація процесів апоптозу [204, 281]. До того ж, в індукції апоптозу приймає участь не тільки пошкодження мітохондрій, а і сигнальні системи міжклітинних взаємодій. Доведено, що в перинфарктній зоні одразу після розвитку ішемії міокарда починає підвищується експресія Bcl-2 [139] (апоптозний білок) . У самій зоні ішемії експресія даного білка знижена, у той час як експресія Вах – підвищена [91]. Варто відмітити, що на початковому етапі ішемії (коли кардіоміоцити ще життєздатні) різко підвищується експресія EAT / mcl-1 (ген, що інгібує апоптоз) [186]. На відміну від EAT, експресія c-fos (ген раннього реагування) індукується як ішемічною, так і неішемічною ділянками, які розміщені вище ішемічної області. На більш пізніх термінах після розвитку ішемії (більше місяця) в перинфарктній зоні спостерігають зворотну картину: експресія Bcl-2 знижується, а Вах – підвищується [195].

Доведено, що апоптична загибель кардіоміоцитів у експериментальних тварин проходить і в зоні, що перенесла «ішемічний удар» [60]. Кількість загинувших кардіоміоцитів варіюється в залежності від обсягів перенесеного інфаркту та може становити до 35 % від загальної кількості клітин, що були пошкоджені ішемією [170, 251].

Поява в міжклітинному просторі міокарда внутрішніх мембран міоцитів активізує компоненти комплемента [306]. Їх активація симулює вибухову дегрануляцію тучних клітин і вивільнення серотоніну, гістаміну і тромбоцит активуючого фактору [223, 242, 117]. Розвиток хвороби супроводжується розвитком запальної реакції. Проте, на сьогоднішній день не повністю зрозумілий причинно-наслідковий зв'язок ішемічних на запальних процесів у міокарді [118, 235]. Реакція запалення супроводжується коагуляційним некрозом кардіоміоцитів, набряком м'язової тканини, значною інфільтрацією зони пошкодження нейтрофілами, моноцитами/макрофагами і Т-клітинами [153, 173, 206, 241].

Поява Т-клітин в зоні некрозу стимулює формування рубцевої тканини. До цього моменту завершується руйнування позаклітинного матриксу пошкодженого міокарда і починається його формування *de novo*. Джерелом матриксу стають

фіброblastи, що мігрують в зону запалення. Відомо, що фактори хемотаксису SCF, TGF1 β , IP-10, які активно секретуються в зоні ішемії, маркери клітинної адгезії, фактори росту та гормони сприяють міграції у зону пошкодження стовбурових клітин і, можливо, фіброblastів для подальшого відновлення міокарда [261, 274].

Серце у дорослих ссавців має дуже обмежену здатність до регенерації після травми [244], внаслідок чого втрачені клітини замінюються фібротичним рубцем [273]. Фіброblastи слугують джерелом колагену I і III типів, з яких формується тканина рубця. Продукція колагену в зоні ішемії спостерігається вже на 3–4 добу після інфаркту міокарда. На мікроскопічному рівні фібрили колагену виявляються в зоні, що межує безпосередньо з некрозом на 7 добу після пошкодження. В тканинах, що перенесли «ішемічний удар» і позаінфарктній зоні синтез колагену продовжується протягом місяців після виникнення ішемічного пошкодження в зоні інфаркту [118].

Фіброз, який виникає у відповідь на ішемію міокарда, розділяють на 2 види: замісний та реактивний фіброз, які опосередковані фіброblastами та міофіброblastами. Замісний фіброз, тобто утворення рубців, є основним процесом запобігання розриву стінки шлуночка після ішемії [288, 259]. Проте збільшення механічного стресу після інфаркту міокарда, разом з гормональними та паракринними медіаторами, викликає також розростання сполучної тканини в районах, віддалених від інфаркту. Такий реактивний фіброз у прикордонній зоні інфаркту та у віддаленому неушкодженому міокарді призводить до зниження скоротливої функції та потовщення шлуночків, що, у свою чергу, знижує продуктивність серцевого м'яза [273].

Область інфаркту поступово розширюється і піддається рубцюванню, а непошкоджені ділянки гіпертрофуються з подальшим розвитком дилатації, що слугує пристосуванням до нових умов функціонування. На тканинному рівні спостерігається видовження і потоншення міофібрил (міокардіофіброз). Відбувається розтягнення і потоншення ішемованого міокарда, а у тяжких випадках можливий розрив серцевого м'яза [280].

1.3. Підходи до лікування хворих з ішемією серця

На даний час існує 2 класичні підходи до лікування хворих з ішемічною хворобою серця у тварин [2].

1. профілактика ішемічної хвороби серця (зміна умов утримання, боротьба з зайвою вагою і малоактивним способом життя);
2. обмеження зони пошкодження і збереження життєздатності міокарда.

Перший вид лікування є найбільш ефективним, однак профілакування захворювання не набуло широкого розповсюдження. Таким чином, найбільш поширений підхід до лікування хворих з ішемією серця базується на обмеженні зони пошкодження, збереження життєздатності міокарда і представлений методами медикаментозної і хірургічної корекції.

Проте, ні один з традиційних методів лікування не дозволяє повною мірою відновити функціональну активність пошкодженого міокарда. На даний час методи медикаментозного і хірургічного лікування хворих з ішемією серця залишаються малоефективними. Недосконалість класичних методів лікування пацієнтів з інфарктом міокарда призвели до необхідності розробки альтернативних: терапевтичний ангиогенез і клітинна регенеративна терапія.

Терапевтичний ангиогенез – це метод клітинного використання ангиогенних факторів росту чи їх генів для стимуляції розвитку кровоносних судин за ішемії у тканинах [4, 7]. Ця тактика полягає у використанні існуючого в судинній системі потенціалу до неоангиогенезу, який розвивається у відповідь на ангиогенні стимули, якими є ішемія, гіпоксія, запалення і некроз. Ангиогенні фактори FGF, VEGF інтенсивно використовуються як у експериментах, так і в клініці [255, 279]. Практично при всіх випадках введення факторів росту і їх генів стимулювало розвиток колатералей і капілярів. Оскільки жодне клінічне дослідження не проводилося як подвійне сліпе плацебо-контрольоване дослідження, зробити однозначний висновок про ефективність генної терапії при лікуванні інфаркту міокарда неможливо.

Таким чином, терапевтичний ангиогенез представляє собою сучасний і ефективний метод лікування пацієнтів з інфарктом міокарда, однак нетривалість

ефекту і наявність ускладнень (ріст судин у невиявлених пухлинах, гіпотензії, посилений атеросклеротичний процес) обмежують його використання, що потребує подальших досліджень.

Клітинна регенеративна терапія в кардіології. Клітинна терапія – новий метод лікування пацієнтів з захворюваннями, які пов’язані з незворотною загибеллю клітинних елементів. В основі клітинної терапії лежить трансплантація різноманітного клітинного матеріалу (ембріональних стовбурових клітин, аутологічних і алогенних стовбурових клітин дорослого організму, фетальних прогеніторних клітин) внутрішньовенно, в судини, які живлять органи-мішені, інтраорганно. Також пропонують вводити клітини на різноманітних носіях. На даний момент опубліковано велику кількість робіт як з біології стовбурових клітин, так і з їх експериментального застосування в якості агентів клітинної терапії. Розробляються і апробуються клінічні протоколи з використанням стовбурових клітин. Клітинна терапія при серцевій недостатності має потенціал для відновлення функцій серця шляхом посилення ангіогенезу, відновлення життєздатного міокарда за рахунок заміщення ушкоджених міоцитів та захисту міокарда від смерті клітин.

Вплив МСК за інфаркту міокарда. На даний час існує декілька теорій впливу МСК на відновлення міокарда, проте до кінця їх вплив залишається незрозумілим. Традиційна теорія полягає у тому, що трансплантовані МСК можуть диференціюватися у кардіоміоцити та вбудовуватися у пошкоджений міокард. На підтримку даної теорії представлена модель диференціації МСК у кардіоміоцити під дією 5-азацитидину [231] чи суміші факторів росту [214]. У експериментах *in vivo* на свинях показано, що при введенні МСК у інфарктний міокард відмічали експресію м'язово-специфічних білків на трансплантованих клітинах та поліпшення функцій серця. Диференціація МСК в кардіоміоцити була продемонстрована на культурі МСК, обробленій або 5-азацитидином, або коктейлем факторів росту. У дослідженнях проведених на свинях продемонстровано, що введенні в інфарктний міокард, ін'єкційні МСК

експресували м'язово-специфічні білки. При цьому функція серця була покращена, а зона – ураження зменшена [258].

Згідно іншої гіпотези, МСК після трансплантації можуть диференціюватися в ендотеліальні клітини та сприяти ангиогенезу. Це, у свою чергу, призводить до обмеження зони інфаркту та покращення процесів відновленн міокарда. За даними Ohnishi S та ін. [214], трансплантація МСК посилює ангиогенез і формування колатералей. Одночасно МСК можуть сприяти ангиогенезу шляхом секреції ангиогенних факторів, зокрема, фактор росту ендотелію судин (VEGF) [62] та продукувати SDF-1, який відіграє важливу роль у міграції та залученні в ангиогнезі проангиогенних мієлоїдних клітин-попередниць [85].

Регенерація серця за впливу МСК передбачає вивільнення паракринних факторів. Їх функція полягає у запобіганні апоптозу кардіоміоцитів, стимуляції ангиогенезу, сприянні реорганізації матриксу та збільшенню пулу МСК [295]. МСК здатні виділяти ангиогенні, антиапоптотичні та мітогенні фактори, такі як VEGF, фактор росту гепатоцитів, адреномедулін та інсуліноподібний фактор росту-1 [214]. Дослідження, проведені на тваринах, показали, що ін'єкція середовища, у якому культивувались МСК, володіє цитопротекторною дією на міокард [126]. Результат показує, що ізоляція та введення таких факторів у високих концентраціях або інженерних МСК для секреції більшої кількості таких факторів може призвести до значних захисних ефектів.

Здатність МСК до міграції у зону пошкодження відіграє не менш важливу роль. Дослідження Jackson K. A. та ін. [151] показали, що МСК у здорових тварин були локалізовані лише в кістковому мозку, тоді як у щурів з інфарктним міокардом МСК були також виявлені в зоні інфаркту. Це свідчить про те, що міокард за ішемії може вивільняти цитокіни та експресувати молекули адгезії, які полегшують міграцію МСК у міокард у стані інфаркту [164].

Вплив ГСК за інфаркту міокарда. Jackson K. A. та ін. [151] після трансплантації ГСК у міокард вражений ішемією виявили, що введені клітини вмонтовувалися в серцевий м'яз і судини, де набували характеристик диференційованих кардіоміоцитів чи ендотеліальних клітин. За даними Orlic D. та

ін. [216] після введення клітин, на фоні інфаркту міокарда, з фенотипом Lin⁻ та c-kit⁺ (характерним для ГСК) відмічали відновлення міокарда. При цьому через 9 діб після введення ГСК регенерована тканини складала 68 % частини шлуночка, ураженого інфарктом. Дана тканина складалася з проліферуючих міоцитів та судинних структур. Davy P. та ін. [102] відзначають прискорення відновлення функції серця, зменшення розміру рубця та збільшення щільності капілярів при трансплантації клітинної суспензії, збагаченої ГСК у 100 разів, у порівнянні з клітинною суспензією збідненою на ГСК у 10 разів. У той самий час Bailey A. S. та ін. [57] у своїх дослідженнях показали відсутність суттєвого збільшення кардіоміоцитів в порівнянні з плацебо. Варто зазначити, що популяція ГСК не однорідна, чим і можна пояснити розрізненість отриманих даних.

Вплив ЕКП за інфаркту міокарда. За даними Kawamoto A. та ін. [160, 162] внутрішньовенне введення ЕКП, що культивувалися в системі *in vitro*, призводить до зниження інтенсивності фіброзу та підтримує функціонально ушкоджений міокард. При цьому трансплантовані клітини залучаються до ішемічної області та сприяють неоваскуляризації. Kocher A. A. [165] у своїх дослідженнях підтверджують дослідження Kawamoto та ін. і при введенні свіжовиділених ЕКП. Дослідження наступних років тільки підтвердили роль ЕКП у неоваскуляризації ішемізованого міокарда [161].

Вплив «стовбурових клітин дорослого серця» за інфаркту міокарда. При введенні в серце за інфаркту «стовбурових клітин дорослого серця» відновлюється добре диференційований міокард, який утворюється шляхом продукування нових судин і міоцитів з характеристиками молодих клітин та охоплює приблизно 70 % ураженого шлуночка [64].

Маккар R. R. та ін. [179] відзначають, що за введення стовбурових клітин отриманих з серцевої тканини, за інфаркту міокарда відмічають зменшення розміру рубця та утворення нових здорових тканин. Вказані дані спростовують теорію, що рубці серцевого м'язу є постійними, і після втрати здорові серцеві м'язи не можуть бути відновлені.

Проте, незважаючи на значний позитивний ефект від застосування стовбурових клітин дорослого серця за ішемії міокарда, їх масовому застосуванню заважають етичні суперечності та важкість отримання даної культури клітин.

1.4. Висновки з огляду літератури

Отже, інфаркт міокарда трапляється у дрібних домашніх тварин, зокрема у собак і кішок. Він виникає як наслідок ішемії, пов'язаної із порушенням коронарного кровотоку через звуження просвіту або обструкцію коронарних артерій. Ішемія міокарда, яка розвивається в окремих його зонах, призводить спочатку до гіпоксії, некробіозу, некрозу міокардіоцитів, що може стати причиною раптової загибелі тварини в природних умовах чи під час анестезії.

Після перенесеного інфаркту недостатність капілярного кровотоку і перфузії міокарда призводять до апоптозу ендотеліоцитів, що свою чергу збільшує зону інфаркту і розвитку дисфункції лівого шлуночка.

Внаслідок інфаркту частина кардіоміоцитів втрачається безповоротно, і на їх місці формується рубець, що стає визначальним фактором формування серцевої недостатності. Як відомо, серце у дорослих ссавців має обмежену здатність до регенерації. Традиційними методами відновлення серцевої діяльності вдається лише сповільнити розвиток дегенеративних змін в міокарді, стимулювати основні його функції (автоматизм, провідність, збудливість, скоротливість), проте відновити повністю ушкоджену ділянку міокарда не вдається.

Останні досягнення регенеративної клітинної терапії з використанням стовбурових клітин і продуктів клітинних технологій відкривають нові перспективи у лікуванні інфаркту міокарда саме із відновленням його структури та скоротливої функції. Доведена можливість регенерувати міокард, ангіогенез, знизити апоптоз міокардіоцитів і загальмувати кардіальне ремоделювання за допомогою стовбурових клітин отриманих з різних джерел.

Однак набагато частіше дослідниками використовуються МСК, у той час як поза увагою залишаються роль та властивості тканинних стовбурових клітин в якості альтернативного джерела клітинного матеріалу для клітинної регенеративної

терапії. У зв'язку з цим, існує необхідність поглиблення знань щодо біологічних властивостей культур стовбурових клітин отриманих з різних джерел (міокарда, жирової тканини та червоного кісткового мозку) та їх використання для лікування тварин з інфарктом серця.

РОЗДІЛ 2

ВИБІР НАПРЯМКІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження за темою дисертаційної роботи виконували 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, елементи роботи проходили у лабораторії біотехнології ТОВ «Biotexcom».

У дослідах використовували клінічно здорових тварин (70 самиць білих нелінійних щурів масою тіла 200–250 г, віком 4–5 місяців; 9 білих нелінійних щуренят 12-денного віку; 8 безпородних кішок віком 10 місяців) та нежиттєздатні кошенята, що залишалися після надання рододопомоги.

Котів та щурів утримували у віварії НУБіП 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 проводили з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року), «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 «Положення про утримання та використання піддослідних тварин в віварії та клініці НАУ», розглянутого та затвердженого ректором НАУ 20.05.2001 р.

Дослідження були розділені на декілька етапів, які виконували протягом 2015–2018 років.

I етап включав у себе роботу з культурою стовбурових клітин міокарда (КСКМ) щура. В його основі було дослідження біологічних особливостей КСКМ у процесі культивування (схема 2.1).

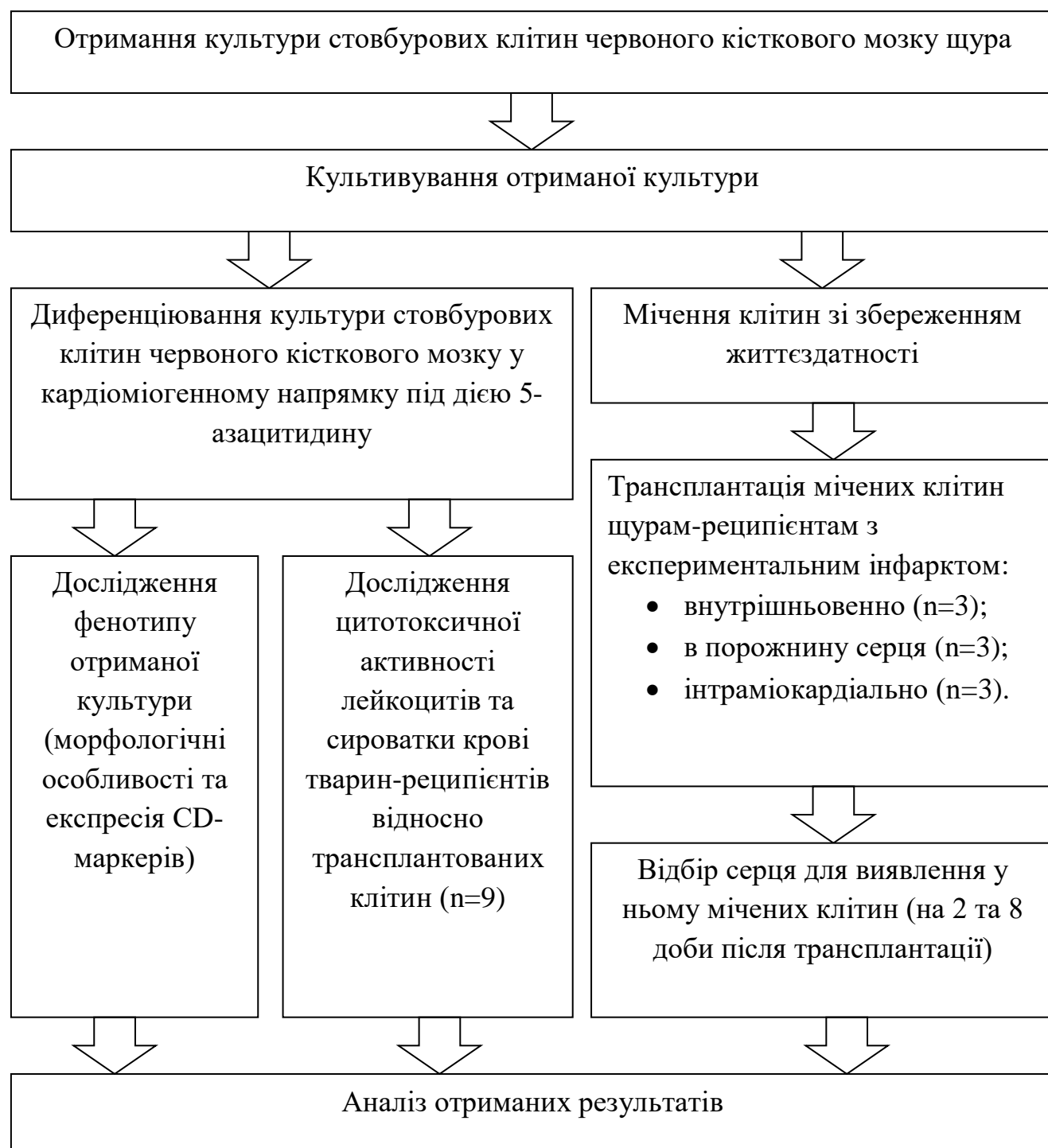
Схема 2.1



Маніпуляції з клітинним матеріалом виконували у ламінарному боксі біологічної безпеки II класу Esco SC2-4A1 (тип A2) (ESCO, Німеччина). Культивування клітин здійснювали в CO₂-інкубаторі CCL-170-B-9-P Esco серії CelCulture (ESCO, Німеччина), що забезпечував сталі умови культивування: t=37 °C, абсолютну вологість повітря та вміст у газовій суміші 5 % CO₂.

II етап дослідження полягав у вивченні здатності стовбурових клітин до міграції у зону пошкодження. Дослідженні направленої диференціації стовбурових клітин червоного кісткового мозку у кардіоміогенному напрямку в системі *in vitro* (схема 2.2).

Схема 2.2



III етап досліджень полягав у вивченні змін у серці щура за експериментального формування інфаркту міокарда та впливу різних видів культур клітин на його перебіг (схема 2.3).

Схема 2.3



IV етап досліджень проводився з використанням тканин kota. На даному етапі проводилося визначення оптимального методу отримання культур стовбурових клітин міокарда та жирової тканини kota. При цьому вивчали вплив фактору росту фібробластів (FGF-2), інсуліноподібного фактору 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.

Схема 2.4



Поживні середовища, інші розчини та реактиви зберігали в побутовому холодильнику Nord (Україна) за температури 4 °C та -18 °C відповідно до настанов виробника. Центрифугування клітинних суспензій здійснювали на лабораторній центрифугі Elmi CM-6MT (Elmi, Латвія). Для підігрівання розчинів використовували лабораторний сухоповітряний термостат ТС-200 СПУ (СКТБ СПУ, Росія). Дистильовану воду отримували за допомогою дистилятора АСД-4 (Росія). Величину рН розчинів контролювали за допомогою рН-метра рН-150М

(Білорусія). Деіонізовану воду для приготування розчинів отримували за допомогою деіонізатора Elgastat UNQ (Великобританія). Зважування реагентів здійснювали та аналітичних електронних вагах Radwag AS 220/X (Radwag, Польща). Для стерилізації розчинів використовували шприцеві нітроцелюлозні фільтри (Millipor, США) з порами $d=0,22$ мкм. Мікроскопічний аналіз, оцінку культур клітин та їх підрахунок у 4-лунковій камері Горяєва (МиниМед, Росія). Оцінку культур клітин здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопу Axiovert40 (Carl Zeiss, Німеччина). Оцінку метафазних пластинок, виявлення експресії CD-маркерів та дослідження гістозрізів виконували на флуорисцентному мікроскопі DMR (Leica, Німеччина) за збільшення $\times 400$, $\times 1000$.

Фотографування здійснювали фотокамерою Canon DS126291 (Canon, Тайвань).

Обладнання, що було використане у процесі досліджень, застосовували згідно інструкцій з їх експлуатації. Всі вимірювальні прилади проходили повірку протягом 2015–2018 рр.

Отримання первинної культури стовбурових клітин міокарда щура

Для отримання культури стовбурових клітин міокарда відбирали серця у 12-добових щуренят (після їх попередньої евтаназії, шляхом декапітації під хлороформним наркозом).

Доступ до серця здійснювали здійснювали через вентральний серединний розріз грудної стінки. Попередньо шкіра та шерсть тварин рясно обробляли 70 % етанолом. Пошарово розтинали шкіру, підшкірну клітковину та м'язи, які закріплювали зажимами задля попередження потрапляння шерсті та дезинфіктанту в рану. Потім за допомогою ножиць відділяли ребра від грудини та звільняли серце від осердя та судин, які утримували його у грудній порожнині. Орган видаляли з грудної порожнини та переносили у стерильну чашку Петрі, де його розрізали та промивали у теплому ($t=37$ °C) фосфатно-буферному розчині (ФБР) (Sigma, США). ФБР декілька разів змінювали з метою повного звільнення порожнини серця від крові.

Серце подрібнювали ножицями на шматочки розміром 1–2 мм. Після цього отримані шматочки з ФБР переносили у центрифужні пробірки та центрифугували протягом 5 хв. при 1000 об/хв. Надосадову рідину відбирали піпеткою, а до осаду додавали стандартне культуральне середовище (середовище Ігла, модифіковане Дюльбеко (DMEM) (Sigma, США) – 80 % + фетальна бичача сироватка (FBS) (Sigma, США) – 20 % з додаванням 10 мкл/см³ антибіотика-антимікотика (Sigma, США)) з розрахунку 6 мл : 1 серце. Осад розпіпетовували, а суспензію розділяли на дві культуральні чашки (d=35 мм) (Sarstedt, Німеччина) та ставили на культивування у CO₂-інкубатор (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Шматочки серця у культуральній чашці перед культивуванням

Пасажування клітин здійснювали з розрахунку 1:3 за стандартною методикою описаною нижче.

Пасажування культур стовбурових клітин

Культивування стовбурових клітин здійснювали в одноразових пластикових культуральних чашках Петрі (d=35, 60 та 100 мм) (Sarstedt, Німеччина), а також

пластикових 96-лункових планшетах (Sarstedt, Німеччина) згідно стандартної методики [24, 146] шляхом їх пасажування після досягнення культурою стовбурових клітин конфлюентності 90–100 %. З цією метою з культурального посуду видаляли поживне середовище, клітини, прикріплені до культурального пластику, промивали ФБР до повного видалення залишків культурального середовища. Після цього, в чашку Петрі з моношаром стовбурових клітин додавали 0,25 % розчин трипсину/етилендіамінтетраоцетової кислоти (ЕДТА) (Sigma, США) і залишали в термостаті при +37 °C на 1–2 хв. Процес округлення та відкріплення адгезованих клітин контролювали під мікроскопом. При досягненні бажаного ефекту (відкріплення клітин від культурального пластику, розділення моношару на клітини) розчин трипсину/ЕДТА нейтралізовували за допомогою фетальної бичачої сироватки (FBS) з розрахунку 1:30 до загального об'єму суспензії клітин. Залишки клітин змивали та дезагрегували наявні конгломерати шляхом піпетування напівавтоматичною піпеткою. Отриману суспензію клітин збирали у центрифужні пробірки і піддавали центрифугуванню протягом 5 хв при 2000 об/хв. Після чого надосадову рідину обережно відбирали, а до осаду додавали стандартне поживне середовище та ретельно розпіпетовували. Пасажування здійснювали у співвідношенні 1:3.

Приготування препаратів хромосом із культури перещеплюваних клітин

У процесі приготування препаратів хромосом керувалися стандартною методикою [1, 2] у власній модифікації.

У чашки Петрі до культурального середовища з культурою стовбурових клітин додавали розчин колцеміду (Sigma, США) в кінцевій концентрації 1×10^{-7} М та поміщали культуральні чашки у CO₂-інкубатор на 6 год. Після закінчення визначеного часу культуральне середовище зливали, а моношар клітин знімали згідно стандартної методики [24, 146]. Отриману суспензію клітин піддавали центрифугуванню протягом 5 хв при 2000 об/хв. Після цього надосадову рідину

відбирали, а до осаду додавали 5 мл 0,56 % розчину KCl (Sigma, США), клітини обережно розпіпетовували та повертали у CO₂-інкубатор на 20 хв.

Суспензію клітин після гіпотонічної обробки знову піддавали центрифугуванню протягом 5 хв при 2000 об/хв., після цього надосадову рідину обережно відбирали, залишаючи 0,5 см³ гіпотонічного розчину над осадом. Осад обережно ресуспензували у гіпотонічному розчині до однорідності. До отриманої суспензії додавали свіжоприготований попередньо охолоджений до t=4 °C фіксатор, який складався з льодяної оцтової кислоти (Sigma, США) та метилового спирту (Sigma, США) у співвідношенні 1:3, у кількості 8-10 см³, у залежності від кількості клітин. Клітинну суспензію ретельно перемішували з фіксатором та залишали на 10 хв, t=4 °C (у холодильнику).

Після закінчення визначеного часу, клітинну суспензію знову центрифугували в тому ж режимі, надосадову рідину відбирали, залишаючи над осадом 0,5 см³. Його ресуспендували свіжою порцією фіксатора в 10 см³ і залишали на 20 хв t=4 °C.

На охолоджені до t=4 °C у бідистильованій воді предметні скельця Superfrost (Thermo Scientific, США) з висоти 20 см наносили одну краплю клітинної суспензії з пастерівської піпетки. Зразки висушували на повітрі і оцінювали якість метафазних пластинок під інвертованим мікроскопом.

Якщо у полі зору виявляли велику кількість клітин, то суспензію додатково розбавляли фіксатором, якщо малу, то суспензію клітин знову осаджували центрифугуванням і ресуспендували у меншому об'ємі фіксатора. У випадку виявлення великої кількості ядер у яких не була зруйнована ядерна оболонка та всередині яких знаходилися метафазні хромосоми або відмічали значну кількість хромосом, які накладалися одна на одну, то суспензію клітин розкапували з більшої висоти. Після висушування препарати фарбували.

Аналіз метафазних пластинок здійснювали під мікроскопом Leica DMR (Німеччина) за збільшення $\times 400$, $\times 1000$. Він включав у себе оцінку метафазних пластинок культур стовбурових клітин міокарда щурів I–VI пасажів та IV пасажу нативного червоного кісткового мозку та за впливу 5-азацитидину. У процесі

дослідження враховували лише метафазні пластинки, у яких хромосоми розміщувалися в одній площині окремо одна від одної та були добре зафарбовані. В кожній метафазній пластинці проводили підрахунок кількості хромосом, не менше ніж у 30 метафазних пластинках у кожному зразку. При дослідженні стовбурових клітин міокарда щура вираховували відсоток (на 500 клітин) двоядерних клітин (ДЯ), клітин із мікроядром (МЯ), клітини у стані апоптозу (АК) та вираховували мітотичний індекс (МІ) за формулою:

$$MI = \frac{MP}{n} \times 100 \%$$

де: МІ – мітотичний індекс;

МП – кількість клітин у стані поділу (кількість метафазних пластинок);

n – загальна кількість клітин (500 клітин).

Фарбування метафазних пластинок

У своїх дослідженнях ми використовували метод рутинного фарбування препаратів метафазних пластинок промисловим набором для фарбування мазків «Лейкодиф 200» (Erba Lachema, Чехія), згідно настанов виробника.

Реактиви № 1, 2, 3 заливали у посудини та готували промиваючий розчин (фосфатний буфер 2,5 ммоль/табл. (1 табл./250 мл H₂O), рН 7,2).

Фіксацію виконували шляхом послідовного 5 разового занурення зразків на 1 секунду у фіксуєчий реактив 1 (метанол 24 моль/л + нафталіновий зелений 1 мг/л). Варто зазначити, що після кожного занурення надлишок реактиву видаляли шляхом доторкання скельця до краю посуду.

Після обробки реактивом № 1 зразки послідовно 3 рази на 1 секунду занурювали в реактив 2 (еозин У 1,73 ммоль/л + фосфатний буфер 60 ммоль/л, рН 6,8). Після кожного занурення надлишок реактиву видаляли шляхом доторкання скельця до краю посуду.

У реактив № 3 зразок занурювали 6 разів на 1 секунду (азур II 12 г/л + фосфатний буфер 60 ммоль/л, рН=6,8). Після кожного занурення давали

можливість стекти розчину і його надлишок видаляли доторканням скельця до краю.

Останнім етапом слугувала обробка промиваючим розчином, після чого зразки залишали сушитися на повітрі. Після повного висихання зразків проводили їх аналіз.

Виявлення у культурі клітин специфічних CD-маркерів

Для виявлення у культурі стовбурових клітин специфічних CD-маркерів ми використали непрямий метод візуалізації, який полягає у приєднанні первинних антитіл без флюорисцентної мітки до антигену. При цьому вторинні антитіла з флюорисцентною міткою приєднуються до первинних. Варто зазначити, що первинним антитілом може зв'язатися декілька молекул вторинних антитіл, що, у свою чергу, дозволяє посилити сигнал.

Для проведення дослідження культуру стовбурових клітин вирощували на накривних скельцях (Thermo Scientific, США). Після досягнення моношару конфлюєнтності 65–80 % скельця з клітинами виймали з планшетів та промивали 3 рази у ФБР. Зразки переносили у чашку Петрі з попередньо охолодженим, $t=4\text{ }^{\circ}\text{C}$ розчином метилового спирту / льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 1:1 та залишали у морозильній камері, $t=-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 2 години. Після закінчення визначеного часу скельця з клітинами три рази промивали ФБР та переносили у розчин 1 % бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (Sigma, США), який був приготований на ФБР, та поміщали на 20 хвилин у термостат, $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$

Після цього скельця, не промиваючи, звільняли шляхом струшування від рідини і одразу, запобігаючи висиханню, наносили первинні антитіла до CD-маркерів – CD10, CD38, CD34, CD45, CD48, CD54, CD56, CD66e, CD96, CD227, CD3266, CD пан-кератин та специфічного для кардіоміоцитів білка – тропоніну I (Invitrogen, США) за допомогою напівавтоматичної піпетки. Після цього на 1 годину скельця поміщали у вологе середовище (зادля попередження висихання зразків) при кімнатній температурі.

Після закінчення визначеного часу зразки 3 рази промивали у ФБР, змінюючи посудини, наносили вторинні видоспецифічні антитіла, кон'юговані з флуоресцентною міткою Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) (розведення 1:500) (Invitrogen, США) та на 1 годину поміщали у вологе середовище при кімнатній температурі. Після цього зразки повторно 3-разово промивали у ФБР. Залишки ФБР струшували, а скельця перевертали на предметне скло з гліцеринном.

Контролем специфічності імуноцитохімічного аналізу слугував зразок без додавання первинних антитіл, зі збереженням всіх інших етапів обробки.

Оцінку результатів мічення проводили під флуоресцентним мікроскопом Leica DMR (Німеччина) за збільшення $\times 400$, $\times 1000$. Оцінку результатів здійснювали за допомогою класичного методу H-Score:

$$S = 1 \times A + 2 \times B + 3 \times C$$

де: S – показник «H-Score», значення якого знаходяться у межах від 0 (білок не експресується) до 300 (сильна експресія у 100 % клітин);

A – клітини з слабкою експресією;

B – відсоток клітин з помірною експресією;

C – відсоток клітин з сильною експресією.

Ступінь експресії визначали як негативний, якщо число балів було в діапазоні від 0 до 50; низький – від 51 до 100; помірний – від 101 до 200 ; високий – 201 та вище [40, 190].

Визначення цитотоксичної активності лімфоцитів та сироватки крові відносно алогенних культур клітин

У досліді використали культуру стовбурових клітин міокарда отриману від 5 нелінійних щуренят 12-добового віку. При цьому клітини I та IV пасажу вводили інтраперетоніально 9 нелінійним самицям щура з масою тіла 250–300 г.

Тварини були поділені на 2 групи: I – контрольна (культура стовбурових клітин не вводились), II – вводили культуру стовбурових клітин міокарда. Маніпуляції із дослідними тваринами проводили під загальним наркозом. Для

введення щурів у наркоз одноразово внутрішньочеревно вводили 2 % розчин тіопенталу-натрію з розрахунку 4 мг на 100 г маси тіла.

Для визначення цитотоксичної активності лімфоцитів у сенсibilізованих тварин на 15 добу після введення клітин відбирали 1,5 мл крові та за методикою Boyum A. [76] виділяли лейкоцити. Після цього в 96-лункові плоскодонні планшети (Sarstedt, Німеччина) у 0,1 мл стандартного культурального середовища вносили 3×10^4 досліджуваних клітин (до яких були сенсibilізовані тварини) та ставили в CO₂-інкубатор на 1 годину із метою адгезії клітин до дна культурального пластику. Після закінчення визначеного часу в лунки із досліджуваними клітинами вносили 1×10^4 лімфоцитів (сенсibilізованих та інтактних тварин в залежності від групи) у 0,1 мл стандартного культурального середовища (співвідношення клітини-мішені : лімфоцити – 1 : 3). Після цього планшети переносили у CO₂-інкубатор, та культивували протягом 18 годин за 5 % вмісту CO₂, 100 % вологості та $t=37^\circ\text{C}$ [24].

Цитотоксичну активність сироватки крові щодо культур стовбурових клітин визначали на 15 добу за методом Г. В. Діденка [9], модифікованим співробітниками кафедри [9]. З метою отримання сироватки кров, відібрану у дослідних тварин, відстоювали до повного згортання фібриногену. Після цього пастерівською піпеткою відбирали сироватку крові та центрифугували протягом 5–7 хв при 3000 об/хв. Паралельно в 96-лункові плоскодонні планшети вносили 0,1 мл стандартного культурального середовища з 3×10^4 досліджуваних клітин (до яких були сенсibilізовані тварини) та додавали 0,1 мл сироватки дослідних тварин. Клітини інкубували 40 хв за кімнатної температури. Після закінчення визначеного часу додавали 0,1 мкл комплементу (розведення 1:4) та інкубували за стандартних умов протягом 18 год [24].

Після закінчення визначеного часу лунки тричі промивали ФБР з метою видалення неадгезованих клітин та лімфоцитів (у випадку їх наявності). З метою відкріплення адгезованих клітин від культурального пластику у кожен лунку з клітинами вносили 100 мкл 0,25 %-го р-ну трипсин/ЕДТА ($t=37^\circ\text{C}$), чекали 1–2 хв та розпіпетовували відкріплені клітини. Підрахунок їх кількості здійснювали в

камері Горяєва при збільшенні у 200 разів в усіх квадратах та розраховували за формулою:

$$X = A \times 1000 \div 0,9$$

де:

X – число клітин в 1 см³;

A – число клітин у всіх квадратах;

1000 – кількість мм³ в см³;

0,9 – об'єм камери Горяєва в мм³.

Про наявність цитотоксичного ефекту відносно трансплантованих клітин свідчила відсутність їх проліферативної активності [24].

Отримання культури стовбурових клітин кісткового мозку щура

З метою отримання матеріалу для виділення культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура використовували 12-добових щуренят (n=6). Евтаназію дослідних тварин здійснювали під хлороформним наркозом.

Червоний кістковий мозок отримували із стегнових, великогомілкових та плечових кісток за стандартною методикою [24, 146]. Кістки старанно відділяли від м'язової тканини та залишків крові, після чого відділяли епіфізи та за допомогою 5 мл шприца (Alexpharm, Китай) наповненого ФБР, вимивали вміст кістково-мозкової порожнини. Отриману суспензію центрифугували протягом 5 хв при 3000 об/хв. Надосадову рідину зливали, а до осаду додавали стандартне культуральне середовище та розпіпетовували. Клітини культивували у культуральних чашках (d=35 мм) у СО₂-інкубаторі. На 3 добу культивування культуральне середовище зливали, адгезовані клітини обережно промивали ФБР, з метою видалення еритроцитів. Після цього у чашку Перті додавали нову порцію культурального середовища та культивували до досягнення конфлюентності 80–90 %. Пасажування клітин здійснювали з розрахунку 1:3 за стандартною методикою.

Мічення клітин зі збереженням життєздатності

Для мічення стовбурових клітин використовували вітальний ядерний барвник Hoechst 33258 (Sigma, США). Фарбуванню піддавали культуру стовбурових клітин червоного кісткового мозку, яка досягла конфлюентності 60–80 %. Перед внесенням Hoechst 33258 адгезовані клітини двічі промивали ФБР та додавали нове стандартне культуральне середовище, попередньо підігріте до $t=37^{\circ}\text{C}$, з додаванням 2 мкг/мл флюорохрому та інкубували в CO_2 -інкубаторі протягом 30 хв.

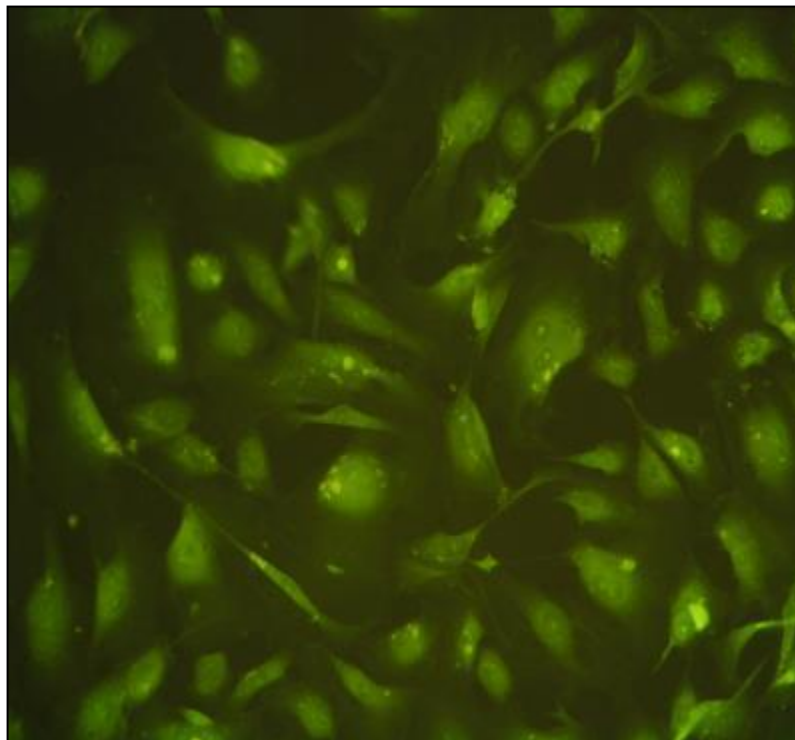


Рис. 2.2. Культура стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура, мічених Hoechst 33258. Нативний препарат. Зб. $\times 600$

Після закінчення зазначеного часу інкубування клітини одноразово промивали ФБР та змінювали культуральне середовище [36]. Після мічення клітини флуоресціюють яскраво зеленим кольором (рис. 2.2).

Дослідження міграційної здатності стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку

Перед використанням клітини знімали з культурального пластику за допомогою 0,25 % розчину трипсину/ЕДТА за стандартною методикою [24].

Нелінійні самиці щура з експериментально сформованим інфарктом міокарда були розділені на 6 груп:

- тваринам I групи здійснювали інтраміокардіальне введення $0,05 \text{ см}^3$ DMEM ($n=3$);
- тваринам II групи здійснювали інтраміокардіальне введення $0,5 \text{ млн}$ стовбурових клітин в $0,05 \text{ см}^3$ DMEM ($n=3$);
- тваринам III групи здійснювали внутрішньовенне введення $0,05 \text{ см}^3$ DMEM ($n=3$);
- тваринам IV групи здійснювали внутрішньовенне введення $0,5 \text{ млн}$ стовбурових клітин в $0,05 \text{ см}^3$ DMEM ($n=3$);
- тваринам V групи здійснювали введення $0,05 \text{ см}^3$ DMEM в порожнину серця ($n=3$);
- тваринам VI групи здійснювали введення $0,5 \text{ млн}$ стовбурових клітин в $0,05 \text{ см}^3$ DMEM в порожнину серця ($n=3$);

Трансплантацію стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура здійснювали за допомогою інсулінового шприца (Chirana, Словаччина) через 24 години після лігування артерії.

За зведення в порожнину серця та інтраміокардіального введення стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку потрапляння / не потрапляння в порожнину серця перевіряли, відтягуючи поршень в шприці (в порожнину серця – наявність крові, інтраміокардіально – відсутність). Введення клітин проводили поступово задля попередження надмірного розтягнення серцевого м'яза.

Виготовлення кріозрізів

З метою виявлення мічених клітин у серцевому м'язі із свіжоотриманого органа виготовляли кріозрізи завтовшки $7-9 \text{ мк}$. При цьому методи шматочки серця без фіксації і заливки в тверді середовища швидко охолоджували в рідкому азоті при температурі $-196 \text{ }^\circ\text{C}$, що забезпечувало гальмування метаболічних процесів у клітинах і перехід води з рідкої фази в тверду [30, 23]. Після заморожування блоки

нарізали на ультрамікромомі при низькій температурі. Отримані зрізи досліджували під флуоресцентним мікроскопом.

Диференціювання культури стовбурових клітин кісткового мозку у кардіоміогенному напрямку

Для індукції диференціації культури стовбурових клітин кісткового мозку в кардіоміоцити використовували клітини III пасажу. КСККМ культивували в стандартних умовах до формування моношару на 50–60 %. Потім до стандартного культурального середовища додавали 10 мкМ 5-азацитидину (Sigma, США). Щоб попередити загибель клітин внаслідок тривалої дії 5-азацитидину, після індукції диференціації на 24 години адгезовані клітини 3 рази промили ФБР та додавали нову порцію стандартного культурального середовища. Для повного диференціювання клітини культивували протягом 3 тижнів, змінюючи половину культурального середовища на нове кожні 3 доби [24, 231]. З метою дослідження фенотипових, генетичних змін та цитотоксичного впливу лейкоцитів та сироватки крові культуру стовбурових клітин досліджували на 6 добу після індукції диференціювання.

Визначення оптимального методу моделювання інфаркту міокарда у щура

Для досліджень використовували самиць лабораторних щурів масою тіла 210-250 г, віком 3 місяці. Всі маніпуляції з тваринами виконувалися під загальним наркозом, для чого одноразово внутрішньочеревно вводили 2 % розчин тіопенталу-натрію з розрахунку 4 мг на 100 г живої маси тварини. Інфільтраційну анестезію проводили 0,5 % розчином новокаїну.

Для доступу до серця проводили бічну торакотомію. Розріз довжиною 5 см виконували з лівого боку у 5-му міжребер'ї. Пошарово розтинали шкіру, підшкірну клітковину та поверхневу фасцію. Шкіру під час розрізу зміщували для кращої герметизації грудної порожнини при ушиванні. М'язи грудної клітки розшаровували тупим методом. Розріз міжреберних м'язів здійснювали

максимально наближено до краніального краю ребра, обережно, щоб не травмувати плевру. Після ревізії операційної рани розсікали плевру. Для кращого доступу до серця за допомогою ранорозширювачів розсували ребра, при необхідності здійснювали резекцію ребра, після чого розсікали осердя.

Для визначення оптимального методу моделювання інфаркту міокарда використовували два способи. У першій дослідній групі ($n=3$) інфаркт міокарда моделювали шляхом накладання лігатури на гілку лівої коронарної артерії (рис. 2.3.).

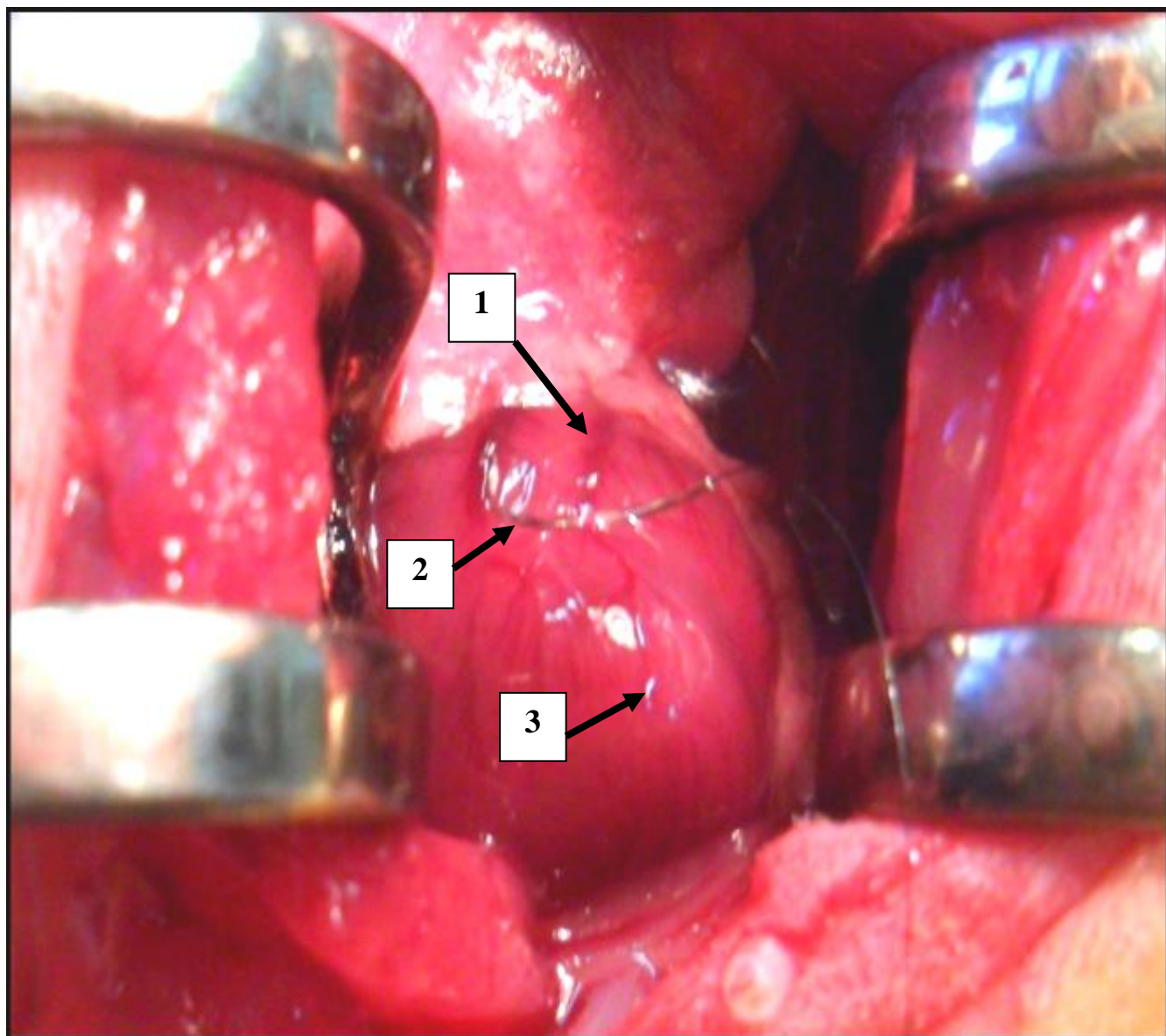


Рис. 2.3. Підведення голки під передню нисхідну гілку лівої коронарної артерії у щура I дослідної групи: 1) передня низхідна гілка лівої коронарної артерії; 2) атравматична голка; 3) верхівка серця

Поліпропілен з атравматичною голкою (діаметр 0,2 мм, довжина 6,5 мм, 3/8 кола) (ДЕВЦ «Олімп», Україна) підводили під передню нисхідну гілку лівої коронарної артерії (приконусна міжшлуночкова гілка лівої вінцевої артерії) на відстані приблизно 3 мм від верхівки серця та затягували лігатуру. Враховуючи властивості шовного матеріалу, маніпуляцію проводили дуже обережно, задля попередження перерізання судини.

У другій групі (n=3) інфаркт моделювали шляхом коагуляції артерії у вищезазначеному місці за допомогою розжареної голки (рис. 2.4).

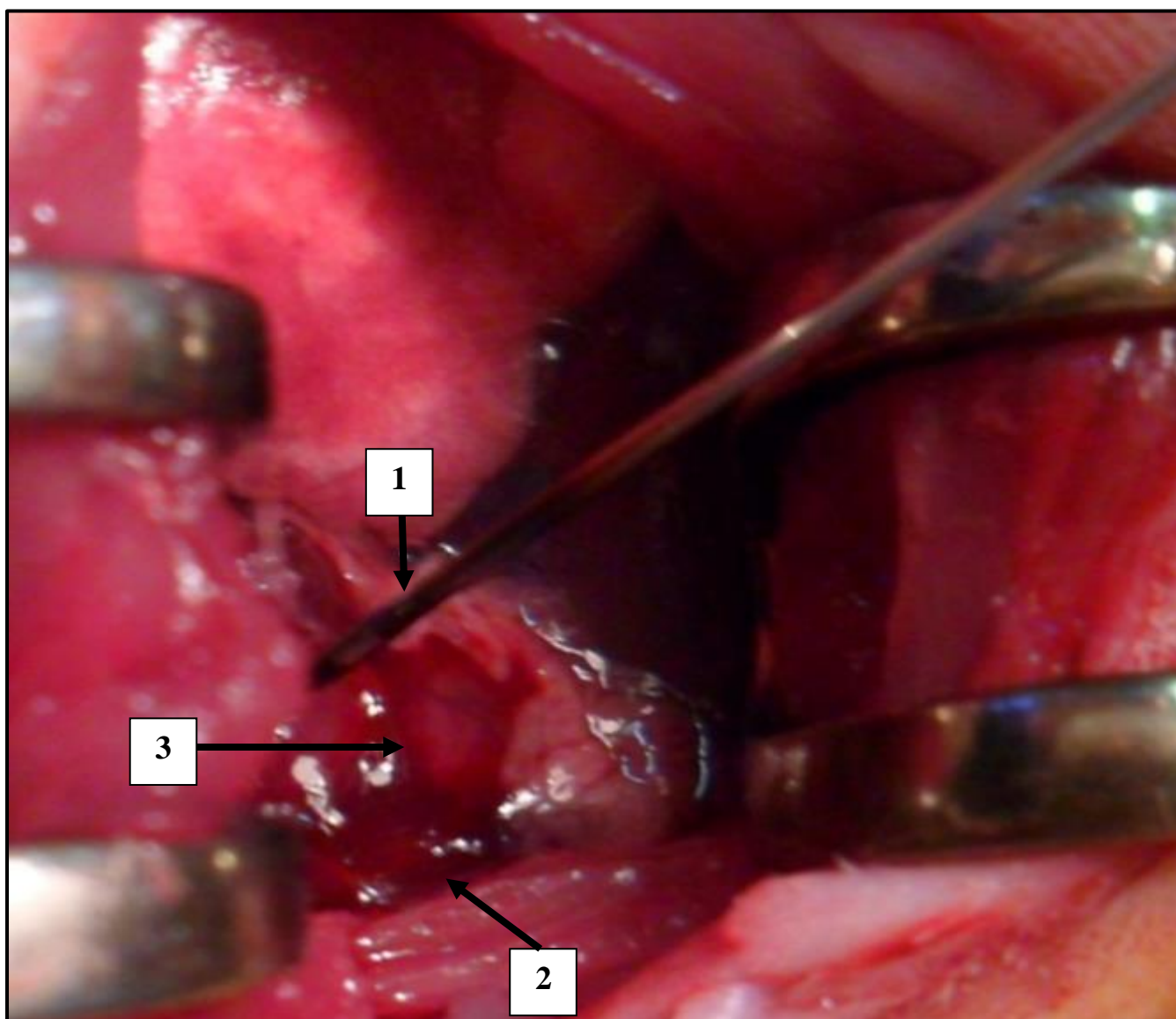


Рис. 2.4. Процес коагулювання передньої нисхідної гілки лівої коронарної артерії у щура II дослідної групи: 1) розжарена голка; 2) крововилив; 3) серце

Після проведення маніпуляції операційну рану пошарово ушивали. Для попередження розгризання щурами швів їх покривали клеєм БФ-6 (Лубнифарм, Україна) та накладали марлеву пов'язку.

Отримання культури стовбурових клітин жирової тканини щура

Отримання культури стовбурових клітин жирової тканини (КСКЖТ) здійснювали за стандартною методикою [24, 146, 80] у власній модифікації.

Жирову тканину для отримання стовбурових клітин відбирали з підшкірної жирової клітковини білих нелінійних щурів віком 4–5 місяців. Евтаназію тварин проводили шляхом декапітації під хлороформним наркозом. Перед розтином шкіри її рясно обробляли 70 % етанолом з метою дезінфекції та попередження потрапляння шерсті на зразки. З метою доступу до підшкірної клітковини робили розтин шкіри від мечоподібного відростку груднини до симфізу тазових кісток. Додаткового здійснювали розрізи шкіри на рівні передніх та задніх кінцівок у напрямку до хребта, відкриваючи таким чином кращий огляд. Шкіру фіксували за допомогою цапок, після цього починали препарування підшкірної клітковини.

Отримані шматочки жирової тканини переносили у чашки Петрі з ФБР. Подальші маніпуляції проводили у ламінарі. Отриману тканину 3 рази промивали ФБР та подрібнювали на шматочки розміром 2–3 мм. Після цього жирову тканину переносили у центрифужні пробірки з розчином DMEM з додаванням 2 мг/мл колагенази II тип (Sigma, США) та 4 % BSA (Sigma, США) з розрахунку 1 см³ на 20 мг тканини .

Після цього пробірки з подрібненою жировою тканиною та дезагрегаційними розчинами на 1 годину поміщали у CO₂-інкубатор. Після закінчення визначеного часу зразки піддавали центрифугуванню протягом 20 хв за 2000 об/хв. Потім зливали надосадову рідину, а до осаду клітин додавали стандартне культуральне середовище та розпіпетовували. Отриману суспензію переносили в чашки Петрі з розрахунку 20 мг тканини та чашку (d=35 мм) та переносили у CO₂-інкубатор для подальшого культивування. Пасажування здійснювали з розрахунку 1:2 за стандартною методикою.

Трансплантація культур стовбурових клітин

Трансплантацію стовбурових клітин у кількості 0,5 млн в 0,05 см³ культурального середовища Ігла, модифікованого Дюльбеко (DMEM) (Sigma, США), проводили інтраміокардіально за допомогою інсулінового шприца (Chirana, Словаччина) одразу після лігування лівої коронарної артерії, на 1 мм нижче місця накладання лігатури. Введення клітин здійснювали поступово задля попередження надмірного розтягнення серцевого м'яза. Контрольній групі тварин вводили 0,05 см³ DMEM.

Визначення площі некротизованої тканини міокарда

Площу пошкоджених тканини міокарда визначали на 25 добу після накладання лігатури на ліву коронарну артерію за допомогою фарбування зрізів серця 2,3,5-трифенілтетразолієм хлоридом (TTX) (Sigma, США) (рис. 2.5) [262].

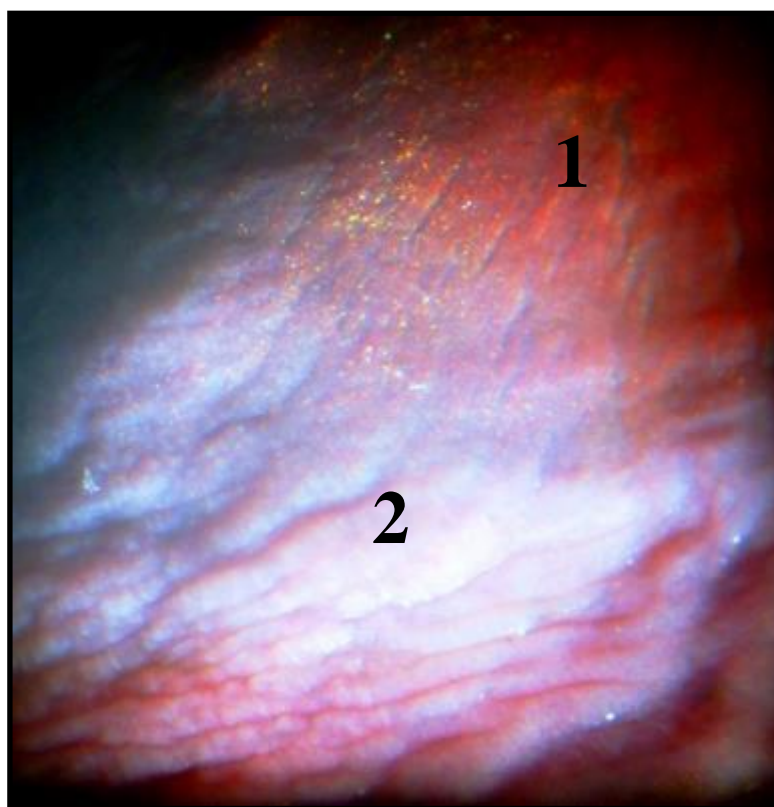


Рис. 2.5. Міокард щура з експериментально сформованим інфарктом, оброблений ТТХ: 1 – життєздатна ділянка міокарда, 2 – некротизована ділянка. 36. ×20

Для визначення площі некротизованої ділянки міокарда серце за допомогою леза розрізали на 3 сегменти однакової товщини. Зрізи переносили у чашку Петрі з 1 % розчином ТТХ на фосфатному буферному розчині (Sigma, США) та інкубували протягом доби в CO₂-інкубаторі. Методика фарбування ТТХ дозволяє на макроскопічному рівні відмежувати незворотно пошкоджену тканину міокарда від тканини, що зберегла життєздатність. Життєздатний міокард, де збережена активність НАД-залежних ферментів, зафарбовується в темно-червоний (буряковий) колір, некротизовані тканини залишаються блідно-рожевими.

Зафарбовані зрізи фотографували та піддавали цифровій обробці за допомогою програми Adobe Photoshop. Загальну площу рубця визначали за 3 зрізами і виражали у відсотковому відношенні від загальної площі зрізу.

Виготовлення гістологічних препаратів

Відбір зразків серця для гістологічних досліджень при вивченні перебігу ішемічного інфаркту проводили на 7, 12, 17 та 25 доби. Для цього, після евтаназії дослідних тварин, відбирали зразки тканин та проводили гістологічні дослідження згідно наступної методики.

Фіксацію відібраного органа здійснювали протягом 7 діб 10 % водним розчином нейтрального формаліну, об'єм якого у 30 разів перевищував об'єм матеріалу, що фіксували. З зразків серця, після закінчення визначеного часу, у місці патологічного процесу крізь усю товщину тканини вирізали шматочки завтовшки 3–4 мм та закладали у пластикові касети для подальшої гістологічної обробки.

Зневоднення фіксованих зразків серця здійснювали у автоматі для гістологічної обробки тканин карусельного типу STP – 120 (MICROM, Німеччина). При цьому, зразки проходили через ряд ємностей, які містили спирт у послідовно зростаючій концентрації та ксилол (для кращого змішування з парафіном).

Формування парафінових блоків здійснювали за допомогою станції заливання в парафін AP 280 (MICROM, Німеччина). Зрізи серця двічі проводили через теплий гістологічний парафін (t=62 °C) з експозицією 120 хв.

Зрізи завтовшки 5–7 $\mu\text{к}$ виготовляли на ротаційному мікротомі HM 320 E (MICROM, Німеччина). За допомогою системи переносу зрізів (STS, MICROM, Німеччина) зразки переміщали на попередньо підготовлене предметне скло і залишали підсихати.

Депарафінізацію та фарбування зрізів за методом Ван Гізона і гематоксилином Караці та еозином здійснювали у автоматі для фарбування тканин лінійного типу HMS 70 (MICROM, Німеччина).

Визначення оптимального методу отримання культури стовбурових клітин міокарда kota

Для отримання тканин серця використовували завмерлі плоди кошенят (за згоди господарів), що залишалися після надання рододопомоги. Для отримання культури стовбурових клітин міокарда отримані шматочки серця масою 10 мг вносили у пробірки та додавали 1 см^3 :

1. в якості контролю використовували модифікований метод експланту: шматочки тканин культивували у стандартному поживному середовищі (80 % – середовище Ігла модифікованого Дюльбеко (DMEM), 20 % – ембріональна сироватка ВРХ) з додаванням 10 мкл/см^3 антибіотика-антимікотика);
2. 2 мг/мл колагенази (тип II) (Sigma, США);
3. 2 мг/мл колагенази (тип II) (Sigma, США) + 5 % бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (Sigma, США);
4. 1 мг/мл колагенази (тип II) (Sigma, США) + 1 мг/мл гіалуронідази (Life Global, Бельгія) + 5 % BSA (Sigma, США);
5. 2,5 % трипсину (Sigma, США);
6. 2,5 % трипсину (Sigma, США) + 0,5 мг/мл колагенази (тип II) (Sigma, США) + 0,5 мг/мл гіалуронідази (Life Global, Бельгія).

Пробірки з тканиною та розчинами № 1, 2, 3 та 4 поміщали у CO_2 -інкубатор, $t=37^\circ\text{C}$ на 1 годину, пробірки з тканиною та розчинами № 5 та 6 – у холодильник, $t=4^\circ\text{C}$ на 12 годин. Після закінчення визначеного часу їх піддавали центрифугуванню протягом 20 хв за відцентрової сили 300 g. Зливали надосадову

рідину, а до осаду клітин вносили стандартне поживне середовище з додаванням 10 мкл/см^3 антибіотика-антимікотика, розпіпетовували, переносили в чашки Петрі з поживним середовищем та ставили на культивування.

Найбільш оптимальним методом отримання культури стовбурових клітин міокарда вважали метод, за якого найшвидше утворювався моношар клітин у одній із чашок Петрі. При цьому враховували кількість клітин у моношарі, які підраховували у камері Горяєва за допомогою мікроскопу при збільшенні у 200 разів.

Визначення оптимального методу отримання культури стовбурових клітин жирової тканини kota

Тканину отримували від 3 безпородних кішок у процесі планової гістеректомії, попередньо отримавши згоду господарів. Тваринам перед проведенням оперативного втручання проводили седацію шляхом одноразового внутрішньом'язового введення препарату «Золетил 100» (Virbac, Франція) в дозі 15 мг на 1 кг маси тіла тварини. Примедикацією слугувало підшкірне введення атропіну сульфату («ГНЦЛС», Україна) в дозі 0,04 мг/кг за 15 хвилин до седації. Оперативне поле обробляли 5 % спиртовим розчином йоду.

Отримання зразків тканини проводили у межах планової операції, тому розріз розміром 3–4 см здійснювали каудальніше від пупка по білій лінії. Після цього відпрепаровували шматочки жирової тканини у кількості, що в подальшому не зашкоджувала б нормальному загоєнню рани.

Отримані шматочки жирової тканини поміщали у центрифужні пробірки з ФБР та якнайшвидше доставляли до лабораторії, де зразки тканини переносили у ламінар, промивали рази ФБР у чашці Петрі та подрібнювали на шматочки розміром 2–3 мм.

Для визначення оптимального методу отримання культури стовбурових клітин жирової тканини отримані шматочки розділяли у пробірки з 1 см^3 DMEM по 10 мг та додавали:

1. у якості контроль слугувала група без додавання реактивів (модифікований метод експланту – шматочки тканини заливали стандартним культуральним середовищем) (n=3);
2. 1 мг/мл колагенази II тип (Sigma, США) (n=3);
3. 2 мг/мл колагенази II тип (Sigma, США) + 10 мг/мл гіалуронідази (Life Global, Бельгія) (n=3);
4. 2 мг/мл колагенази II тип (Sigma, США) + 10 мг/мл гіалуронідази (Life Global, Бельгія) + 4 % БСА (Sigma, США) (n=3);
5. 1 мг/мл колагенази II тип (Sigma, США) + 20 мг/мл гіалуронідази (Life Global, Бельгія) + 4 % БСА (Sigma, США) (n=3);
6. 2 мг/мл колагенази II тип (Sigma, США) + 20 мг/мл гіалуронідази (Life Global, Бельгія) + 4 % БСА (Sigma, США) (n=3);
7. 1 мг/мл колагенази II тип (Sigma, США) + 10 мг/мл гіалуронідази (Life Global, Бельгія) + 4 % БСА (Sigma, США) (n=3);

Пробірки зі зразками переносили у CO₂-інкубатор на 1 годину, а після закінчення визначеного часу їх піддавали центрифугуванню протягом 20 хв при 2000 об/хв. Рідину обережно відбирали піпеткою, а до тканини додавали стандартне культуральне середовище, розпіпетовували та переносили в культуральні чашки (d=35 мм) та ставили на культивування у CO₂-інкубатор.

Для визначення оптимального методу дезагрегації виконували підрахунок кількості клітин після утворення моношару у одній із чашок. Пасажування клітин здійснювали з розрахунку 1:2 за стандартною методикою, описаною вище.

Дослідження впливу різних стимуляторів росту на проліферативну активність стовбурових клітин

У дослідах використовували стовбурові клітини III пасажу. Пасажування здійснювалось у розведенні 1:5. Клітини культивували у стандартному середовищі: 80 % – DMEM; 20 % – FBS; 10 мкл/см³ – антибіотика-антимікотика (Sigma, США) з додаванням:

1. інсуліноподібного фактору росту (IGF-1) (Sigma, США) у концентрації 10, 20 та 50 нг/см³ (n=3);
2. фактору росту фібробластів (FGF-2) (Sigma, США) у концентрації 10, 20 та 50 нг/см³ (n=3);
3. гормону росту rhGH (Sigma, США) у концентрації 10, 20 та 50 нг/см³;
4. Biolaminin 521 LN (LN521) (BioLamina, Швейцарія) згідно настанов виробника;
5. контроль (культивування у стандартному культуральному середовищі) (n=3).

Підрахунок кількості клітин здійснювали після досягнення конфлюентності 95–100% у одній із досліджуваних груп чашок (КСКМ – 2 доба, КСКЖТ – 3 доба, КСКМ – 2 доба). Додатково визначали індекс проліферації:

$$ІП = \frac{ПП}{ПК}$$

Де: ІП – індекс проліферації;

ПП – кількість клітин після пасажування;

ПК – посадкова кількість клітин.

Мікроскопічний аналіз і оцінку культур здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Статистичний аналіз результатів досліджень

Статистичну обробку одержаних цифрових матеріалів проводили в програмі Excel. Визначали середньоарифметичну величину (M), середнє відхилення ($\pm m$) і критерій достовірності (p). Статистично достовірним результатом вважали різницю між величинами, при яких коефіцієнт (p) був не більшим 0,05, що є загальноприйнятим у біологічних дослідженнях.

Висновки до розділу 2

Застосування загальноприйнятих та спеціальних методів та методик дало змогу вирішити поставлені у дисертаційній роботі завдання. Методи статистичної обробки результатів дослідження в повній мірі забезпечили достовірність отриманих результатів.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Оцінка якості і безпечності культур стовбурових клітин міокарда щура, призначених для трансплантації

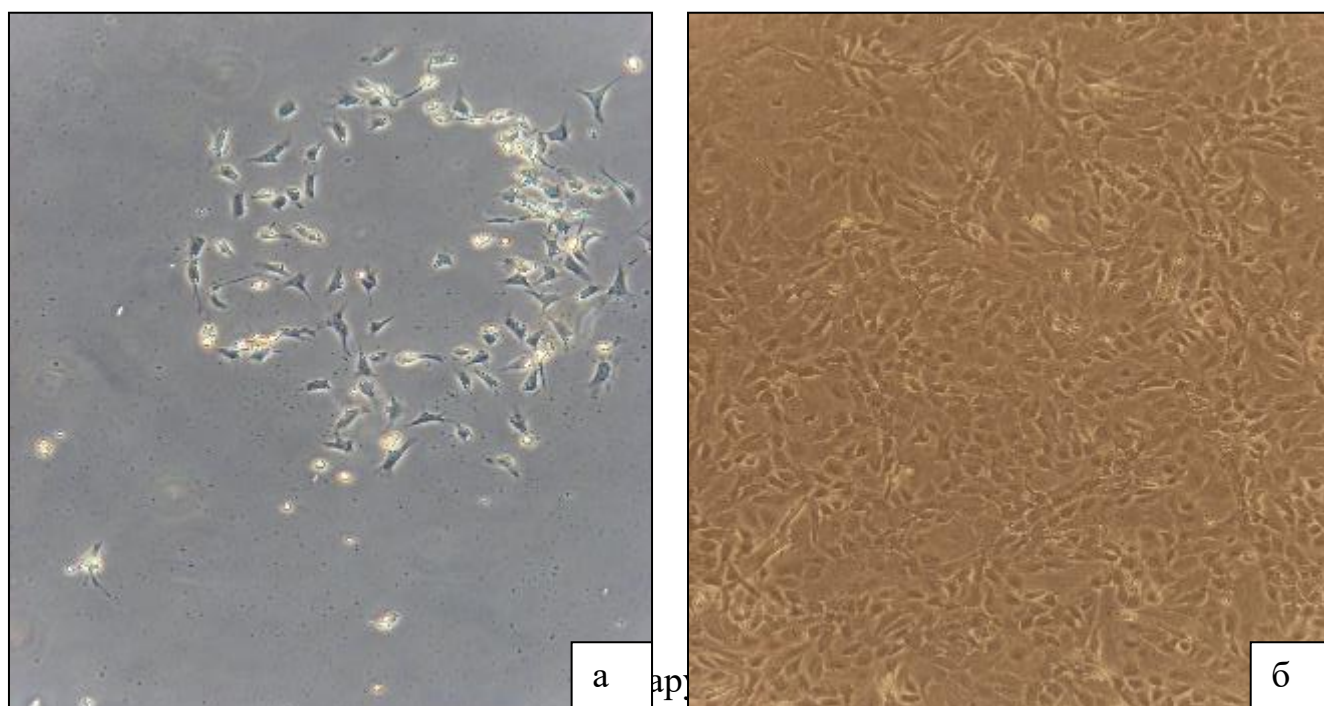
При культивуванні в системі *in vitro* клітин в культурі вони можуть змінювати свої фенотипові характеристики: морфологію, експресію CD-маркерів). При цьому, первинна культура буде характеризуватися найбільшою гетерогенністю, що є результатом присутності у ній всіх клітин тканини з якої вони походять, які володіють адгезивними властивостями, в залежності від джерела отримання. У процесі культивування вони видаляються, а клітини, які здатні до поділу, проліферують. Варто зазначити, що кожна популяція клітин має свою швидкість ділення, що у подальшому може змінювати фенотипові особливості культури.

На даний час культури клітин, отримані з кісткового мозку та жирової тканини, є найбільш дослідженими. Разом з тим, культура стовбурових клітин, отримана з міокарда (КСКМ), як альтернативне джерело стовбурових клітин у терапії захворювань серця, майже не вивчена. Зважаючи на це, першим етапом нашого дослідження було вивчення фенотипових характеристик культури стовбурових клітин міокарда щура у процесі культивування. Отримані дані дозволять прослідкувати фенотипову та генетичну стабільність культури з метою їх подальшого безпечного використання.

3.1.1. Зміна морфології культури стовбурових клітин міокарда щура з пасажами

У процесі вивчення морфології стовбурових клітин міокарда щура нами було виявлено, що за її отримання методом експланту, первинна культура починає свій ріст із шматочків тканини, які знаходилися на дні культурального пластику. У процесі культивування при зміні культурального середовища шматочки тканини видалялися (рис. 3.1, а). При подальшому культивуванні встановлено, що первинна культура адгезивних клітин міокарда щура морфологічно гетерогенна, при чому,

серед домінуючих епітеліоподібних клітин відмічали незначну кількість веретеноподібних клітин (рис. 3.1, б.).



щуре, 0 пасаж: а) 4 доба; б) 8 доба культивування. Нативні препарати. Зб.: $\times 50$

Варто відмітити, що у процесі культивування спостерігали тенденцію до збільшення кількості веретеноподібних клітин з кожним пасажем (рис. 3.2).

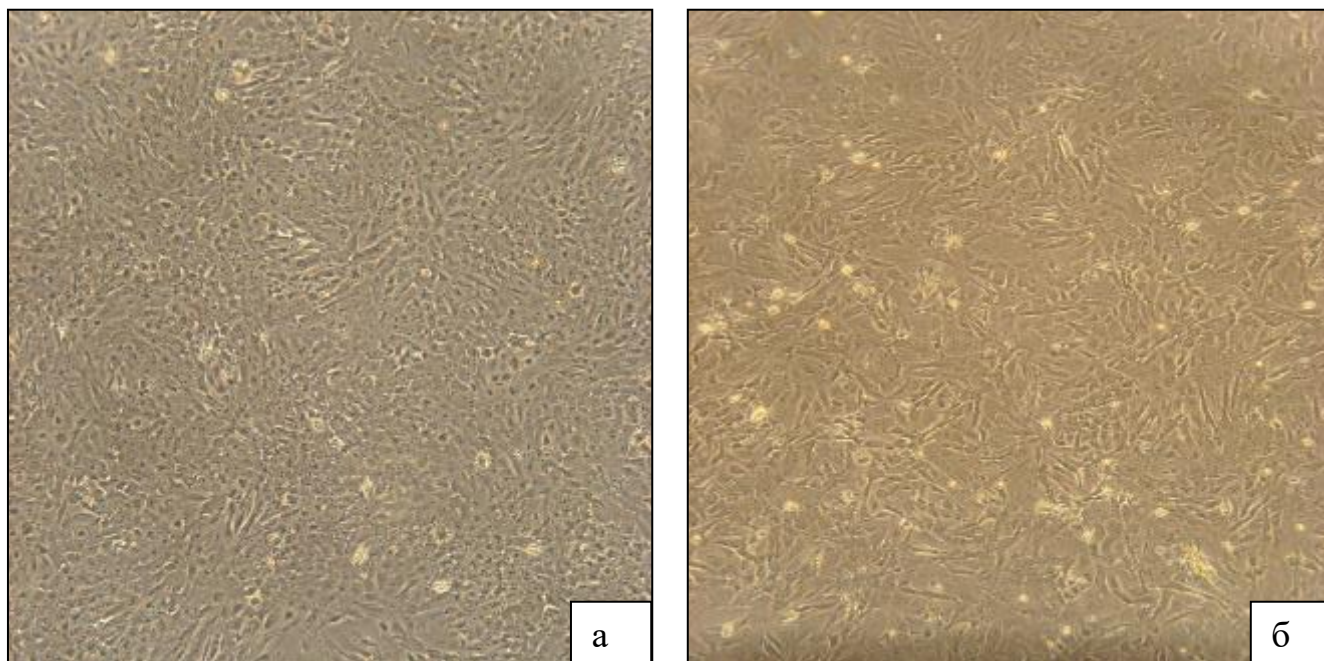


Рис. 3.2. Мікрофотографії моношару культур стовбурових клітин міокарда щуре: а) I пасаж; б) IV пасаж. Нативні препарати. Зб. $\times 50$

Первинна КСКМ щура досягала конфлюентності 90–100 % у середньому за 8 діб (рис. 3.1., б). В процесі субкультивування час досягнення конфлюентності 70–80 % становив 3 доби.

Таким чином, у процесі субкультивування КСКМ відбувається перехід від гетерогенної культури на 0 пасажі до більш гомогенної культури на IV пасажі.

3.1.2. Імунофенотипова характеристика культури стовбурових клітин міокарда

У процесі імунофенотипування популяції культури стовбурових клітин, отриманих з міокарда щура, було виявлено зміну експресії досліджуваних поверхневих маркерів з пасажами (табл. 3.1).

Так, ступінь прояву CD45, CD227 та пан-керитину (рис. 3.3, а) 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.

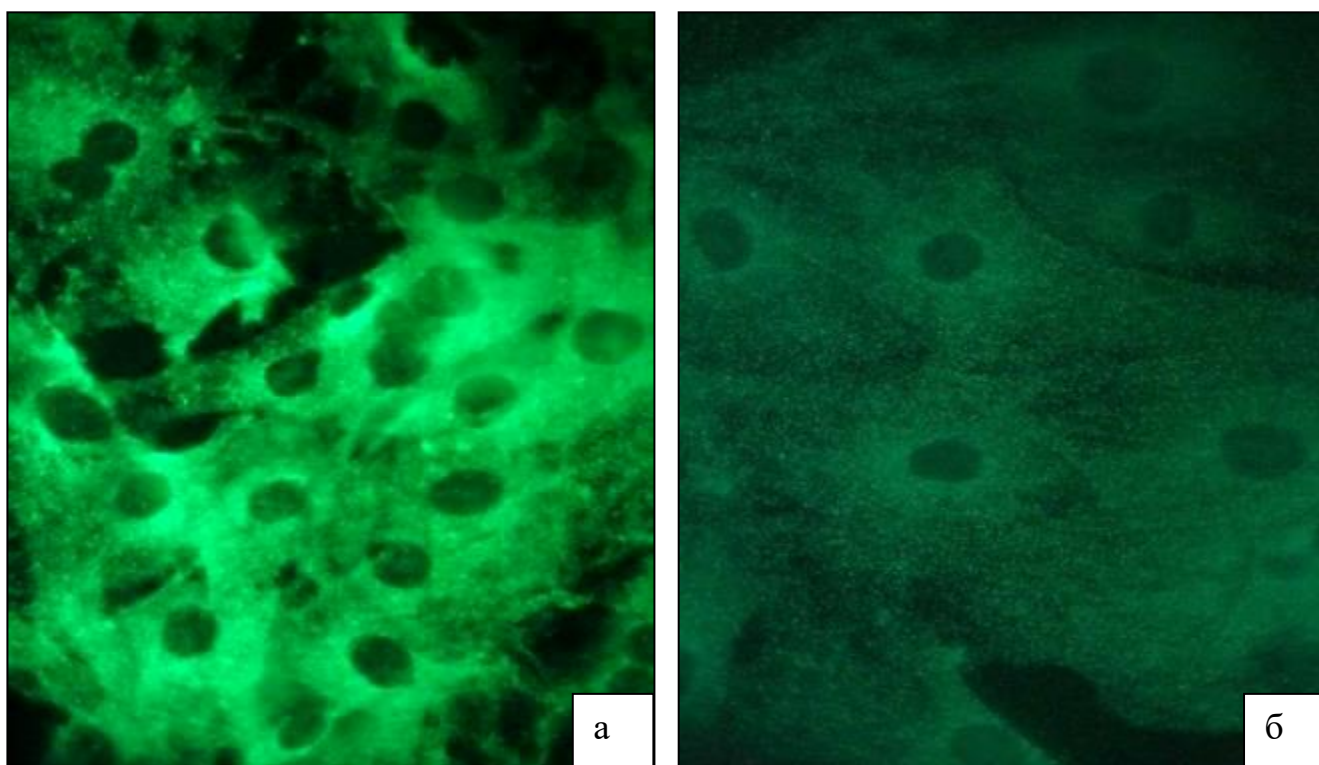


Рис. 3.3. Рівень експресії поверхневих маркерів у культурі стовбурових клітин міокарда щура, IV пасаж. а) CD66e; б) пан-кератин. Флюорисцентна мікроскопія. Зб.: $\times 1000$

Експресія поверхневих маркерів у популяції клітин, виділених з міокарда щура з I до IV пасажу, $M \pm m$, $n=3$

Поверхневі маркери (CD)	Пасаж			
	I	II	III	IV
	Оцінка в балах за методом H-Score (від 0 до 300)			
10	235,7 \pm 35,6	190,0 \pm 39,9	171,0 \pm 39,4	170,3 \pm 27,7
34	8,3 \pm 5,6	53,7 \pm 14,9*	122,0 \pm 15,7**	170,0 \pm 19,7**
38	22,7 \pm 4,5	21,7 \pm 5,6	20,7 \pm 6,1	18,7 \pm 5,0
45	3,3 \pm 3,9	15,7 \pm 8,3	21,7 \pm 7,7	23,7 \pm 6,8
48	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
54	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
56	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
66e	185,3 \pm 35,8	223,7 \pm 29,8	261,0 \pm 12,8	287,0 \pm 5,8*
95	164,0 \pm 13,4	147,3 \pm 7,7	121,3 \pm 6,6*	108,3 \pm 8,9*
227	0 \pm 0	0 \pm 0	11,7 \pm 6,7	22,7 \pm 8,9
326	6,3 \pm 3,7	10,7 \pm 1,9	21 \pm 3,5*	54,0 \pm 8,7**
Пан-кератин	0 \pm 0	0 \pm 0	14,3 \pm 5,4	41,3 \pm 9,1*
Тропонін I	257,0 \pm 23,2	231 \pm 22,1	200,7 \pm 14,3	181 \pm 9,9*

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, порівняно з контролем (у якості контролю слугував I пасаж)

Упродовж усього часу дослідження ми не виявляли експресії CD48, CD54 та CD56 (0 \pm 0 балів).

При цьому рівень експресії CD38 знижувався у межах цього рівня з 22,7 \pm 4,5 на I-му пасажі до 18,7 \pm 5,0 балів на IV.

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

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

Рівень експресії CD66e зростав з помірного ($185,3 \pm 35,8$ балів) на I-му пасажі до високого ($287,0 \pm 5,8$ балів) рівня на IV-му (рис. 3.3, б). У той же час 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-му.

3.1.3. Цитогенетичний аналіз культур стовбурових клітин міокарда щура у процесі культивування

З метою вивчення генетичної стабільності стовбурових клітин, отриманих з міокарда щура, ми проаналізували хромосомну мінливість клітин з I-го до VI-го пасажу (табл. 3.2)

Таблиця 3.2

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

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

Примітка: $*p < 0,05$; $***p < 0,001$, порівняно з контролем (у якості контролю слугував I пасаж)

Появу клітин з анеуплоїдним набором хромосом у культурі міокарда щура відмічали з I до VI пасажу. Варто зазначити, що збільшення відсотку анеуплоїдних клітин відмічали 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 у порівнянні з I-им пасажем. Зазначимо, що значний відсоток прояву анеуплоїдій складали клітини, каріотип яких дорівнював 38 та 76 хромосом при нормі 42 норма. Разом з тим, кількість клітин зі зміненим каріотипом не перевищувала спонтанного рівня соматичного мутагенезу, властивого ссавцям, який становить 6–15 % [11].

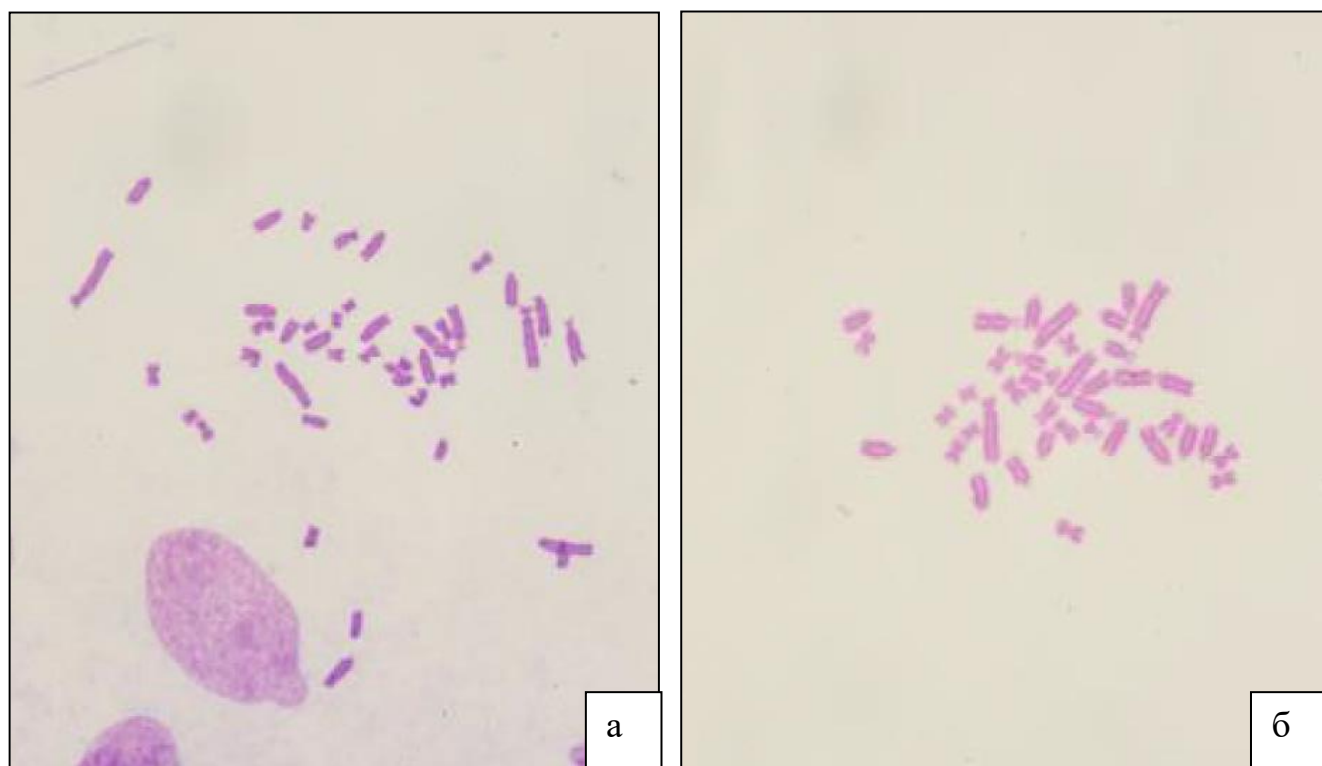


Рис. 3. 4. Мікрофотографії метафазних пластинок щура (I пасажу): а) нормальний каріотип, $n=42$; б) анеуплоїдія, $n=40$. Забарвлення «Лейкодиф 200». Зб.: $\times 1000$

Клітини з поліплоїдією, відмічали у культурі стовбурових клітин міокарда щура з I до IV пасажу. У процесі дослідження ми спостерігали тенденцію до зменшення даної геномної мутації з $2,2 \pm 1,3$ % на I пасажі до повної її відсутності на VI. Варто зазначити, що отриманий нами результат поліплоїдій був нижчим від рівня характерного для спонтанної хромосомної мінливості у ссавців (6–15 %) [11].

Одночасно нами був проведений мікроядерний тест (рис 3.5) для оцінки цитогенетичних змін у стовбурових клітинах культури клітин міокарда щура. Його результати наведені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

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: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, порівняно з контролем (у якості контролю слугував I пасаж)

Мікроядра – це патологічні структури, поява яких свідчить про хромосомну нестабільність. У процесі дослідження ми виявляли клітини з мікроядрами на всіх пасажах (рис. 3.5). Варто відмітити, що, починаючи з III пасажу, відсоток клітин з мікроядрами зріс до 0,3 \pm 0,1 %, проте, знаходився у межах норми, для ссавців (1,60–05,6 %) [11].

У процесі дослідження ми відмічали присутність у культурі стовбурових клітин міокарда щура двоядерних клітин з I до VI пасажу. Їх кількість була незмінною упродовж всього часу дослідження і складала 0,3 \pm 0,1 % та не перевищувала спонтанної мутації, характерної для ссавців (5,4 %) [11]. Додатково ми відмічали достовірне зниження мітотичного індексу з I (3,7 %) до VI (1,4 %) пасажу.

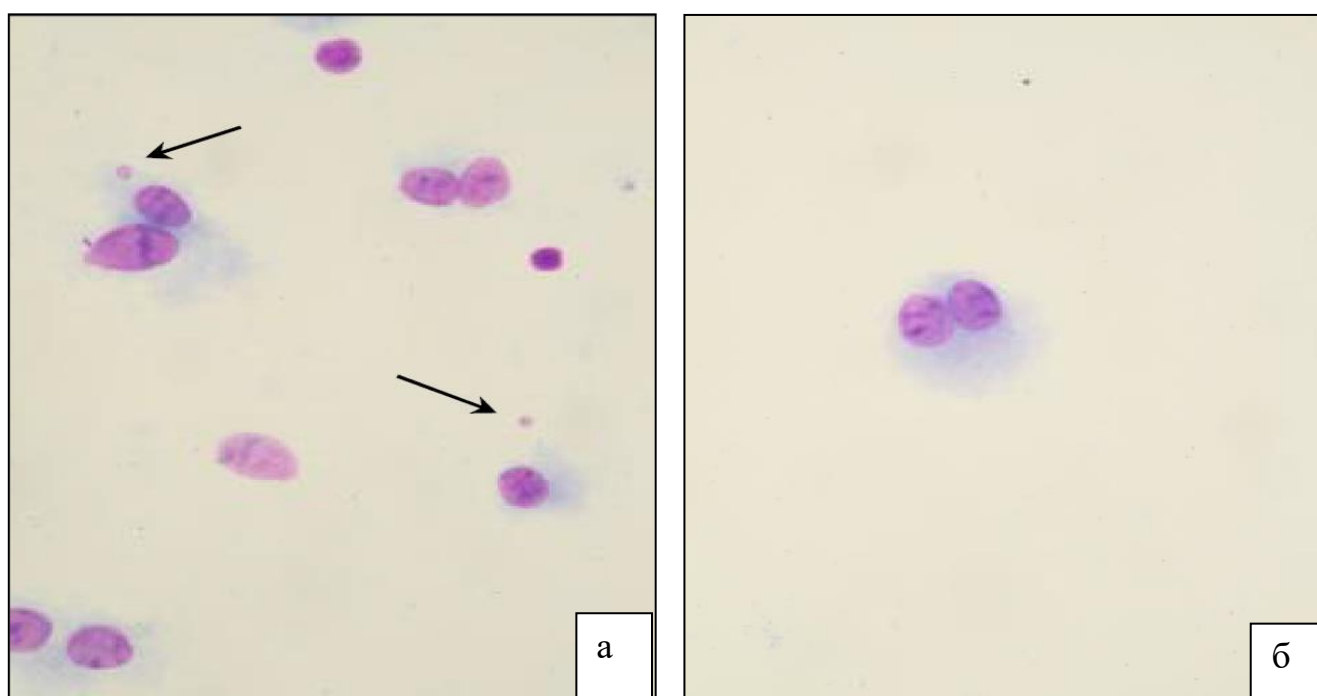


Рис. 3.5. Мікрофотографії клітин зі змінами у ядрі (IV пасаж): а) клітина з мікроядром (стрілкою вказано мікроядро); б) двоядерна клітина. Забарвлення «Лейкодиф 200». Зб.: $\times 1000$

Отже при оцінці якості і безпечності культур стовбурових клітин міокарда щура, призначених для трансплантації ми виявили, що первинна культура характеризується гетерогенністю, проте в процесі субкультивування вона за рахунок веретеноподібних клітин набуває гомогенності. Культура, отримана з міокарда щура, була не однорідною і за результатами імунофенотипування виявили зміни з пасажами: на I пасажі у культурі переважали 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 відмічали маркери, характерні для епітеліальних клітин (панкератин low , $CD326^+$, $CD227^{low}$) та підвищення експресії маркерів, які характерні для прогеніторних клітин ($CD34^+$, $CD45^{low}$). При цитогентичному аналізі стовбурових клітин, отриманих із міокарда у процесі культивування в системі *in vitro* у клітинах виявляються зміни каріотипу, які проявляються анеуплоїдією, поліплоїдією, появою клітин з мікроядрами та двоядерними клітинами, проте їх кількість не виходила за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців. Результати даного підрозділу були опубліковані у роботах [17, 18].

3.2. Оцінка культури червоного кісткового мозку щура після направленої диференціації у кардіоміогенному напрямку

3.2.1. Фенотипові зміни в культурі стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура за впливу 5-азацитидину

Відомо, що 5-азацитидин індукує диференціювання стовбурових клітин у кардіоміогенному напрямку, що супроводжується змінами у морфології культивованих клітин та експресією ними серцевих маркерів, таких як GATA-4, Nkx2.5, тропонін I [231, 93]. Проте, існує обмаль 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. Дослідження вищеописаних питань і стало нашим наступним завданням.

У процесі культивування на 6–7 доби від початку спрямованої диференціації культури стовбурових клітин червоного кісткового мозку ми відмічали зміну морфології клітин від веретеноподібної до епітеліоподібної (рис. 3.6).

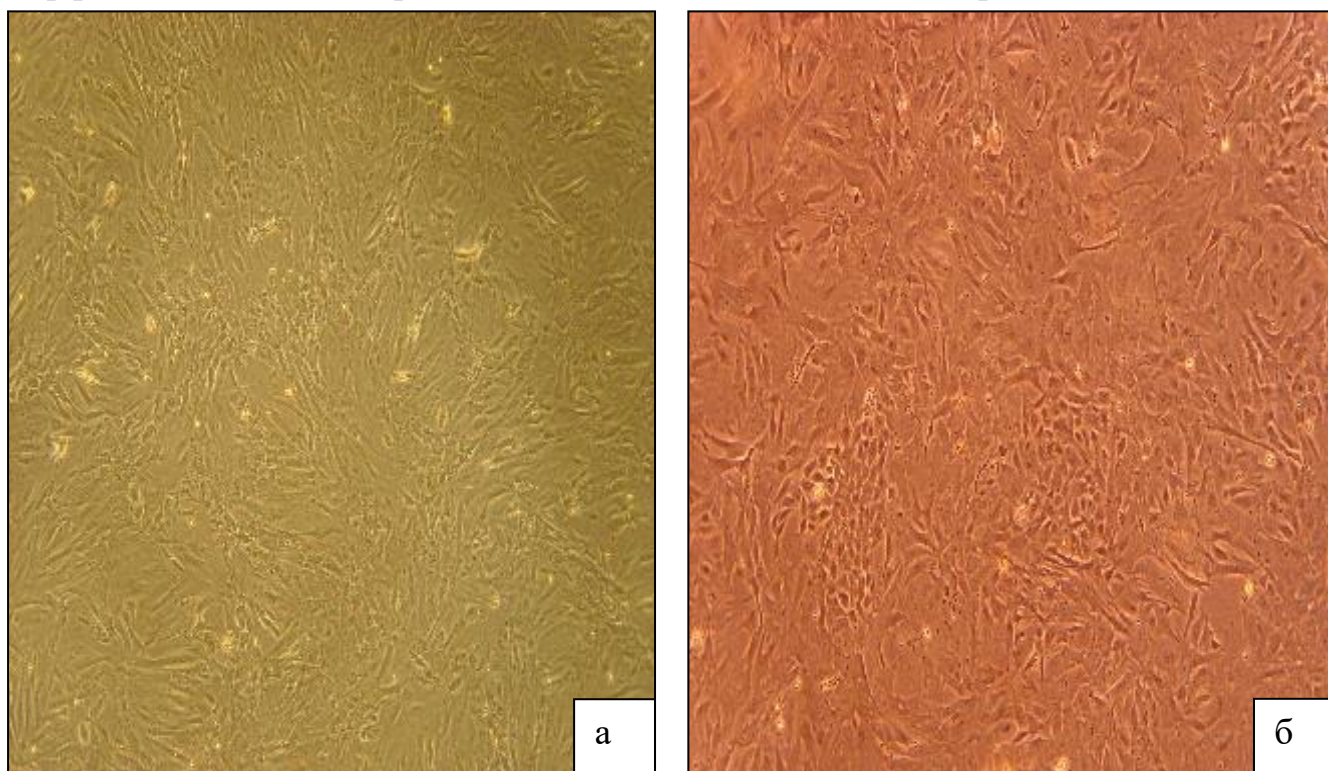


Рис. 3.6. Мікрофотографії моношару культур клітин червоного кісткового мозку, III пасаж: а) контроль; б) на 6 добу після додавання 5-азацитидину. Нативні препарати. Зб. $\times 50$

Одночасно відмічалось зниження їх проліферативної активності. У досліджуваних культурах клітин на 10–22 доби культивування почали відмічати мимовільні скорочення окремих ділянок моношару клітин, що ще раз вказує на їх диференціацію у кардіоміогенному напрямку.

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 (табл. 3.1 та 3.4).

Таблиця. 3.4

**Експресія поверхневих маркерів у популяції стовбурових клітин,
виділених з червоного кісткового мозку щура, $M \pm m$, $n=3$**

Поверхневі маркери (CD)	Культура стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура (III-й пасаж)	
	Контроль	Оброблена 5-азицитидином
	Оцінка в балах за методом H-Score (від 0 до 300)	
10	0 \pm 0	107 \pm 19**
34	92 \pm 2	113 \pm 14
38	57 \pm 7	75 \pm 9
45	76 \pm 13	0 \pm 0**
48	84 \pm 15	83 \pm 10
54	0 \pm 0	0 \pm 0
56	96 \pm 7	0 \pm 0***
66e	108 \pm 14	110 \pm 11
95	110 \pm 7	132 \pm 10
227	89 \pm 11	0 \pm 0***
326	76 \pm 11	10 \pm 6*
Пан-кератин	253 \pm 19	77 \pm 14*
Тропонін I	17 \pm 10	105 \pm 9*

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно з контролем

Так, рівень експресії CD10 достовірно зріс у порівнянні з контролем і складав 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 у культурі, що піддавалася направленій диференціації, складала 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), у той час, як 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).

3.2.2. 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, ми досліджували нативні культури клітин, отримані з червоного кісткового мозку щура III пасажу (контроль) та вказану культуру на 6 добу після дії 5-азацитидину (табл. 3.5).

Таблиця. 3.5

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: $*p < 0,05$ порівняно з контролем

Як видно з результатів досліджень, представлених у таблиці 3.6, кількість клітин зі зміненим каріотипом після дії 5-азацитидину зменшилася на 4,5 % порівняно з контролем. Кількість клітин з анеуплоїдією у дослідній групі чашок знизилася на 6,7 %, проте, відсоток поліплоїдних клітин зріс на 2,2 % порівняно з контролем.

Отже, при оцінці культури червоного кісткового мозку щура після направленої диференціації у кардіоміогенному напрямку шляхом додавання 5-азацитидину ми виявили появу у ній осередків епітеліоподібних клітин, які експресують маркери, характерні для кардіоміоцитів ($CD10^+$, $CD45^-$, $CD95^+$, $CD326^{low}$, тропонін I^+). Цитогенетичний аналіз культури, що піддавалася диференціації показав, що у культурі знижується відсотковий вмісту анеуплоїдних та підвищується – поліплоїдних клітин, що вказує на сповільнення проліферації та початок диференціації. Результати даного підрозділу були опубліковані у роботах [14, 188].

3.3. Особливості регенерації в міокарді щура за експериментального інфаркту

Для відтворення гострого інфаркту міокарда в експерименті зазвичай використовують лігування коронарної артерії. Даний метод дозволяє повністю зупинити кровообіг у даній артерії [22]. Більшість науковців [8, 22] сходяться на думці, що після лігування коронарних судин виникають характерні некротичні зміни в міокарді. Проте використання даного методу пов'язане з високою летальністю дослідних тварин [5], що зумовлює необхідність пошуку альтернативних методів формування даної патології [1, 8, 32].

Для визначення оптимального методу формування ішемії міокарда з подальшим розвитком ішемічного некрозу ділянки міокарда – інфаркта, дослідили два методи формування даної патології.

На 25 добу після формування ішемії міокарда тварин піддавали евтаназії та досліджували макроскопічні та мікроскопічні зміни, які виникали у міокарді щурів протягом вказаного часу.

У групі тварин із ліговою гілкою лівої коронарної артерії відмічали яскраво виражені зони некрозу міокарда, макроскопічно вони були дещо світліші та з більш щільною консистенцією, ніж у нормі, поверхня розрізу – сухувата. Гістологічно виявляли ознаки коагуляційного (сухого) некрозу (розпад цитоплазми на грудки, пікноз та рексис ядра, а також розростання сполучної тканини (рис. 3.7).

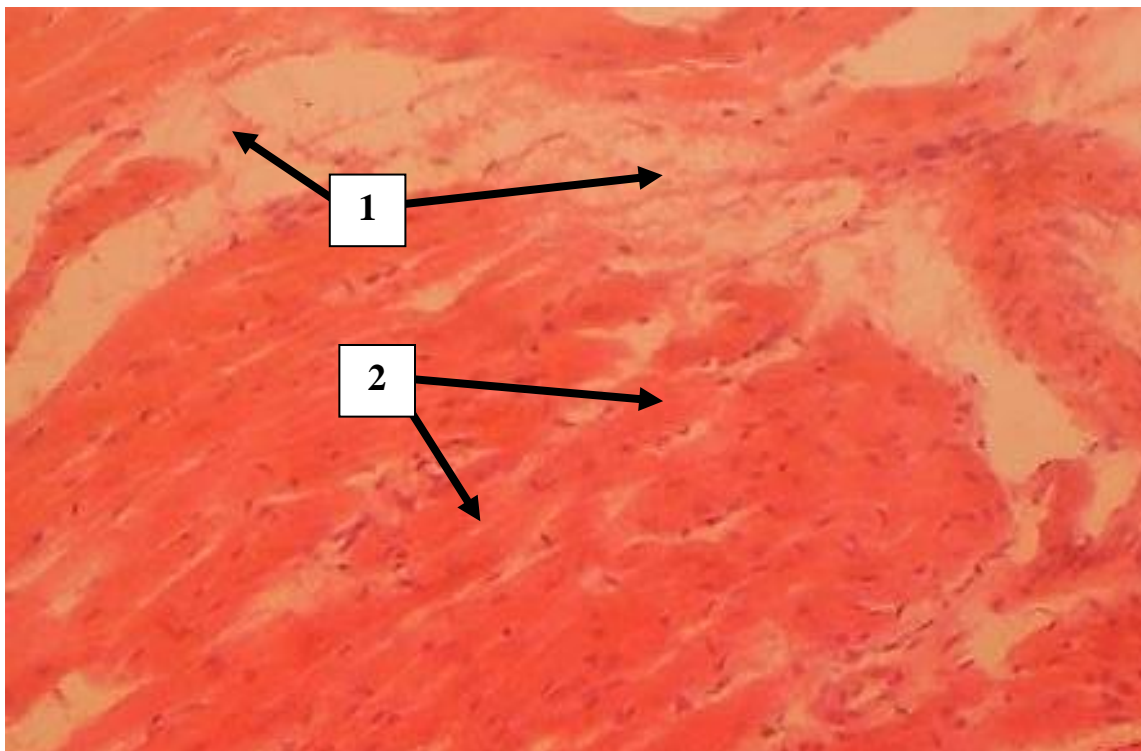


Рис. 3.7. Міокард щура, I дослідна група: 1) волокна сполучної тканини; 2) кардіоміоцити. Гематоксилін Караці та еозин. Зб.: $\times 100$.

На периферії (вище місця лігування) – циркулярні розлади, що проявляються гіперемією судин (рис. 3.8), спостерігалися дистрофічні зміни у кардіоміоцитах.

У групі тварин з коагуляцією лівої коронарної артерії макроскопічно спостерігали посвітлішення ділянки припікання та червоний вінець який її обмежував на відстані 2 мм від місця коагуляції. Мікроскопічно виявляли порушення структури кардіоміоцитів (рис. 3.9).

Варто зазначити, що дані які ми реєстрували, при використанні методу коагулювання судини, більшою мірою відображали не власне ішемію, а опік тканини, який виник у відповідь на проведену маніпуляцію.

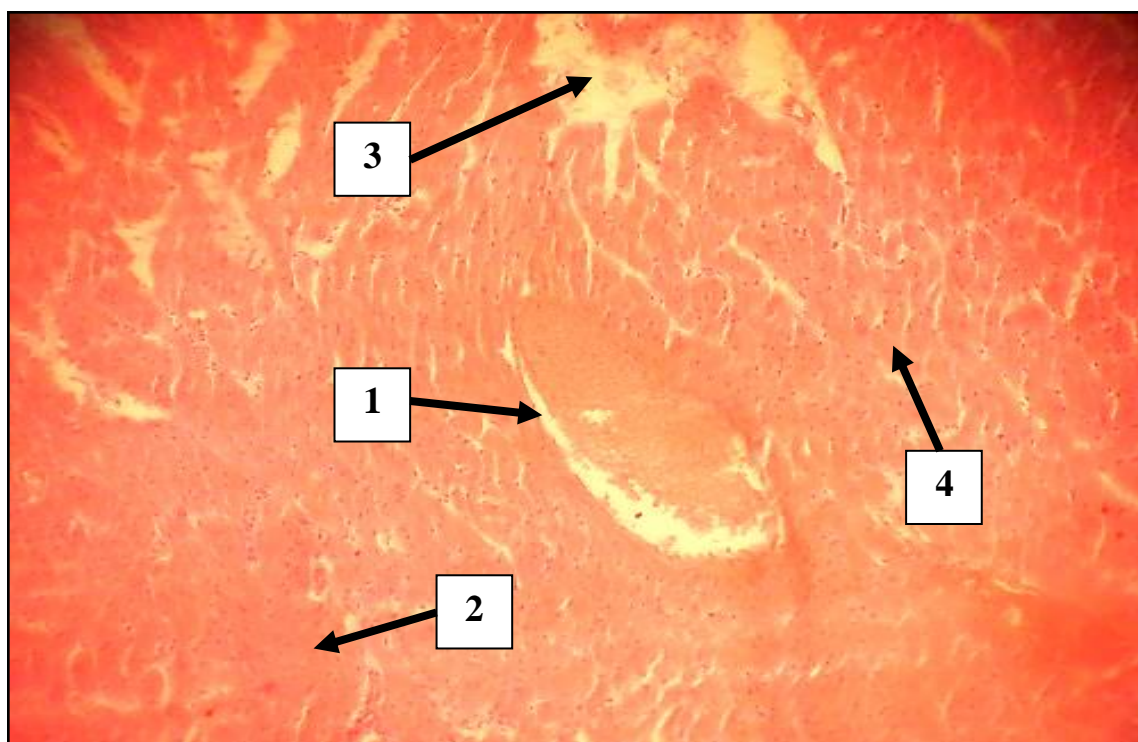


Рис. 3.8. Міокард щура, I дослідна група: 1) гіперемійована судина; 2) дистрофічні зміни кардіоміоцитів; 3) сполучна тканина; 4) кардіоміоцити. Гематоксилін Караці та еозин. Зб.: $\times 100$.

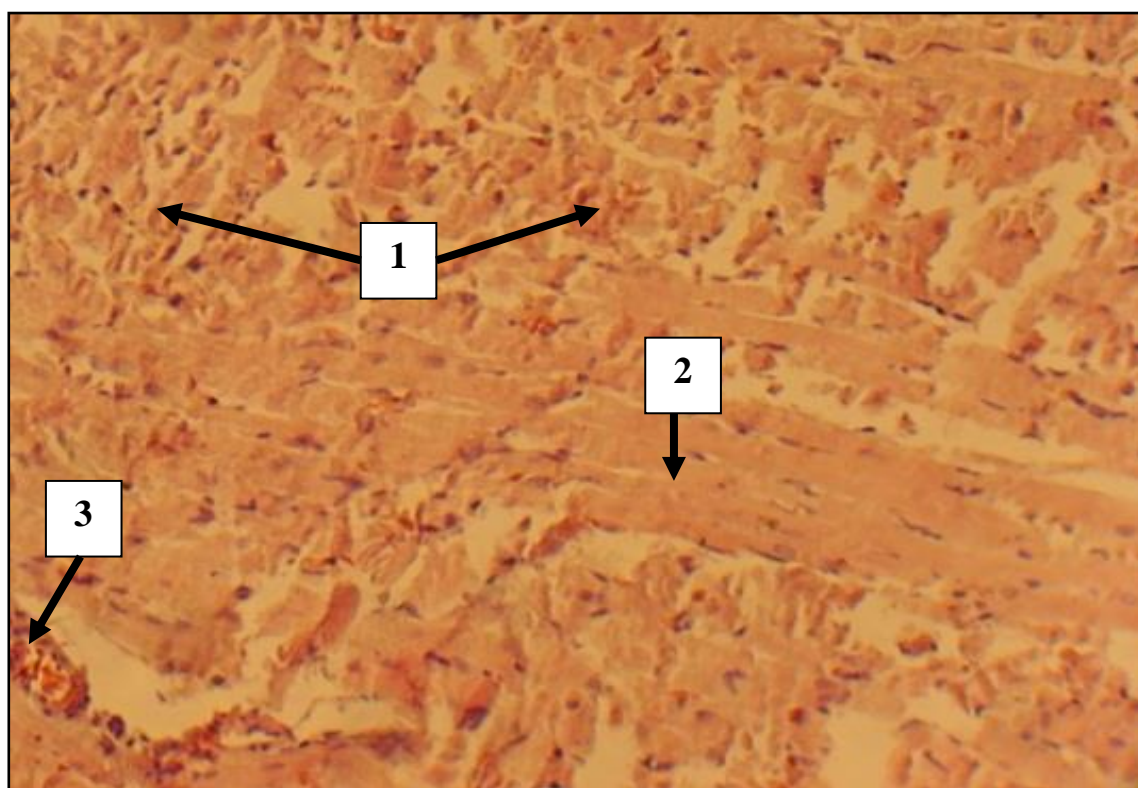


Рис. 3.9. Міокард щура, II дослідна група: 1) кардіоміоцити з порушеною структурою; 2) кардіоміоцити; 3) судина. Гематоксилін Караці та еозин. Зб.: $\times 100$

Таким чином, нами було встановлено, що повною мірою зміни, характерні для ішемії міокарда з подальшим некрозом його ділянки, можливо досягнути за лігування судини, тому в подальших дослідженнях вивчення перебігу ішемії використовувався зазначений метод.

Кожен зразок серця, отриманий від дослідних тварин, піддавали макроскопічному порівнянню з серцем неоперованих тварин і лише після підтвердження наявності змін продовжували подальше гістологічне дослідження. Підставою для подальших гістологічних досліджень було: збільшення розмірів серця відносно норми, наявність аневризм, візуалізація зони ішемії (дещо світліша ділянка міокарда та з більш щільною консистенцією, ніж у нормі) «сухість» поверхні розрізу (рис. 3.10).

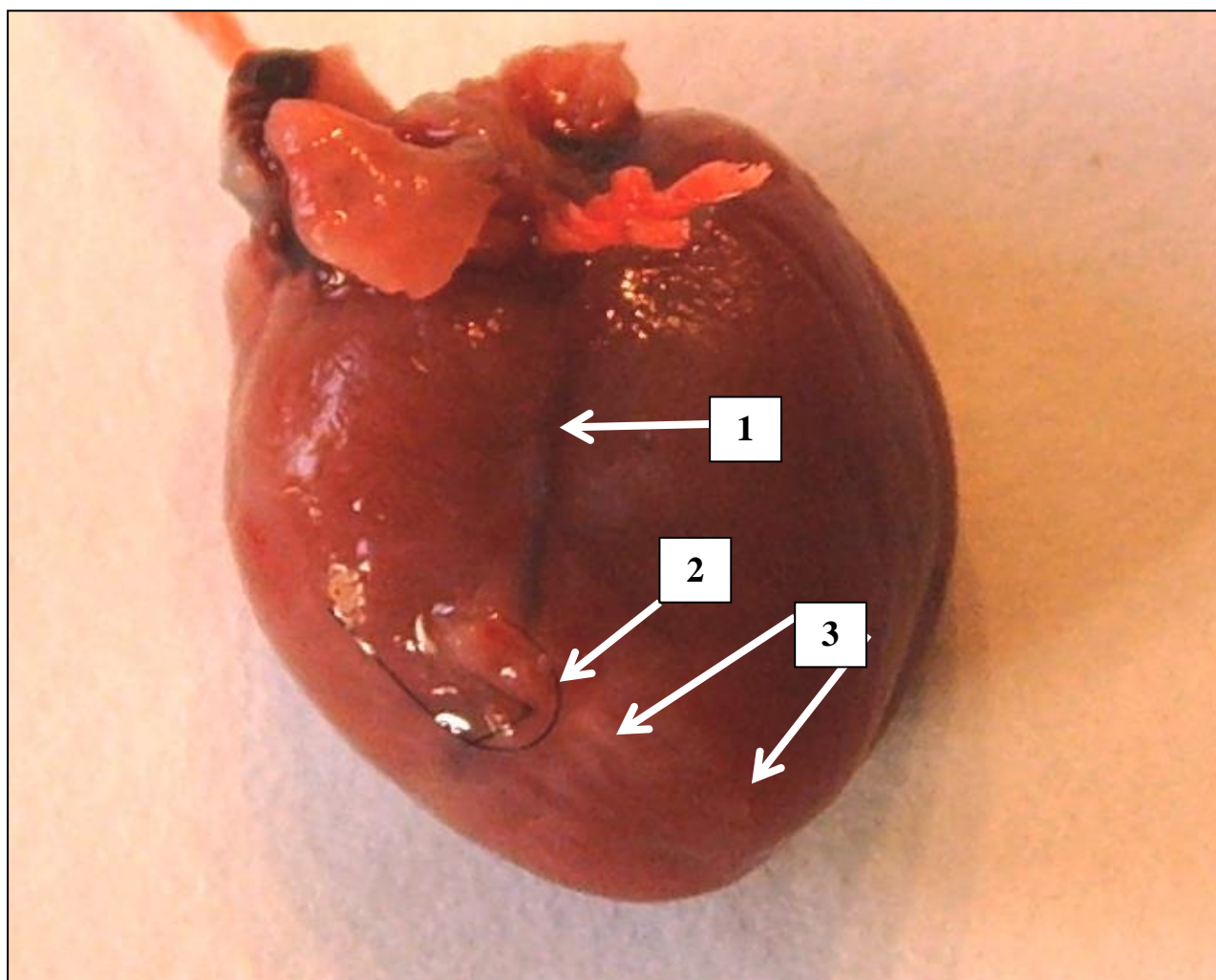


Рис. 3.10. Макроскопічні зміни в серці щура після лігування лівої коронарної артерії: 1 – гіперемійована судина; 2 – місце лігатури; 3 – ділянка ішемії. Нативний препарат

На 7 добу після моделювання інфаркту міокарда відмічали 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. 3.11).

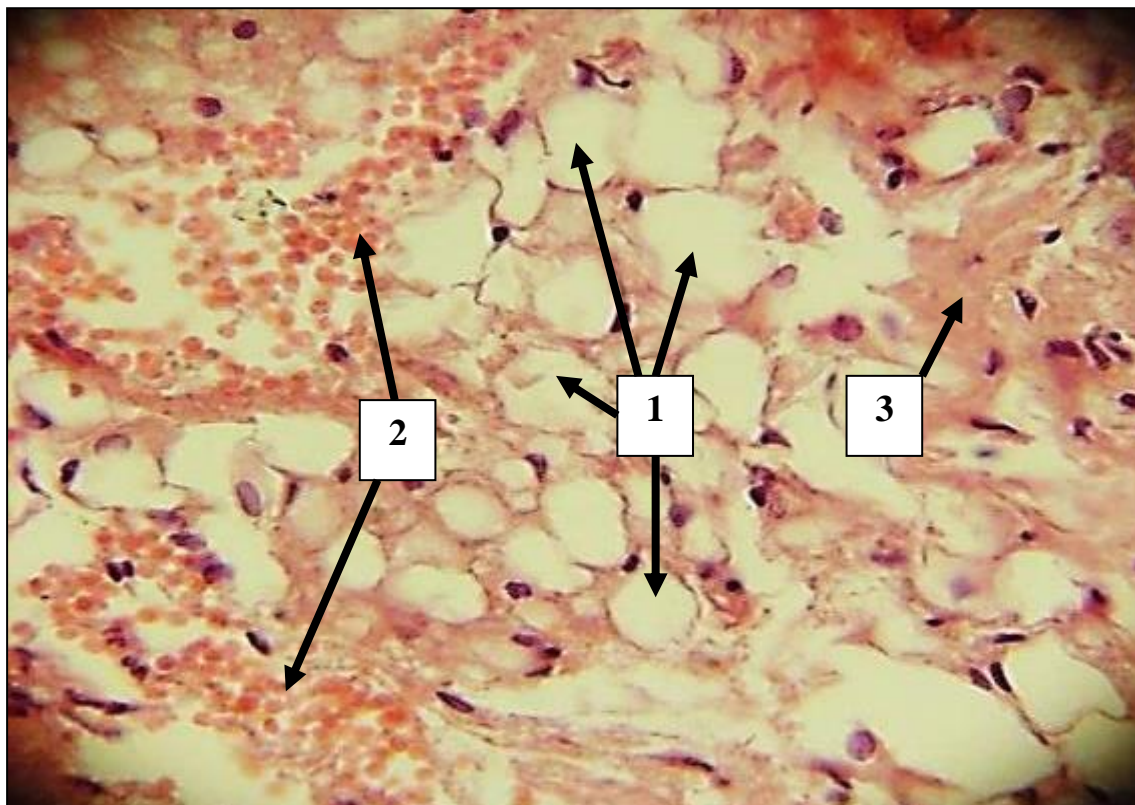


Рис. 3.11. Міокард щура, 7-ма доба після лігування гілки лівої коронарної артерії: 1) ознаки коагуляційного некрозу (контури загиблих кардіоміоцитів) 2) еритроцити; 3) кардіоміоцити. Гематоксилін Караці та еозин. Зб.: $\times 400$

Одночасно спостерігали підвищену активність стромального компоненту – проліферацію клітин стромы, активацію ендотеліоцитів (рис. 3.12).

На 12-у добу після формування інфаркту спостерігали активізацію процесів формування рубцевої тканини і відкладання колагену без утворення колагенових волокон (рис. 3.13).

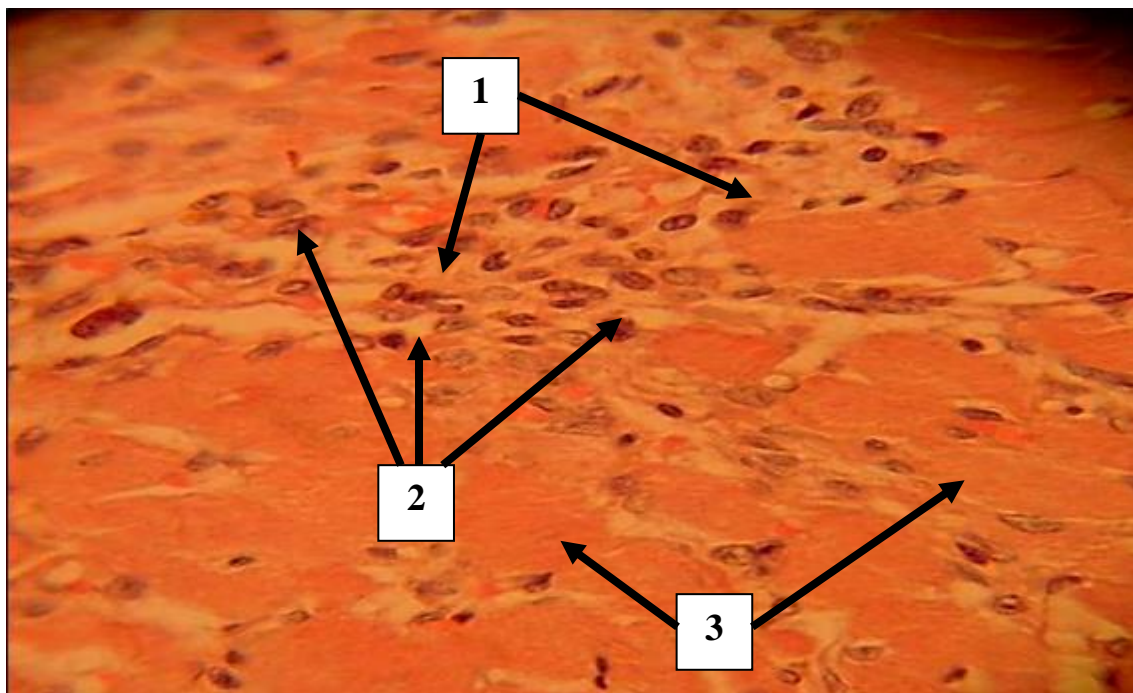


Рис. 3.12. Міокард щура, 7-ма доба після лігування гілки лівої коронарної артерії: 1) проліферація клітин стромы; 2) ядра; 3) кардіоміоцити. Ван Гізон. Зб.: $\times 400$

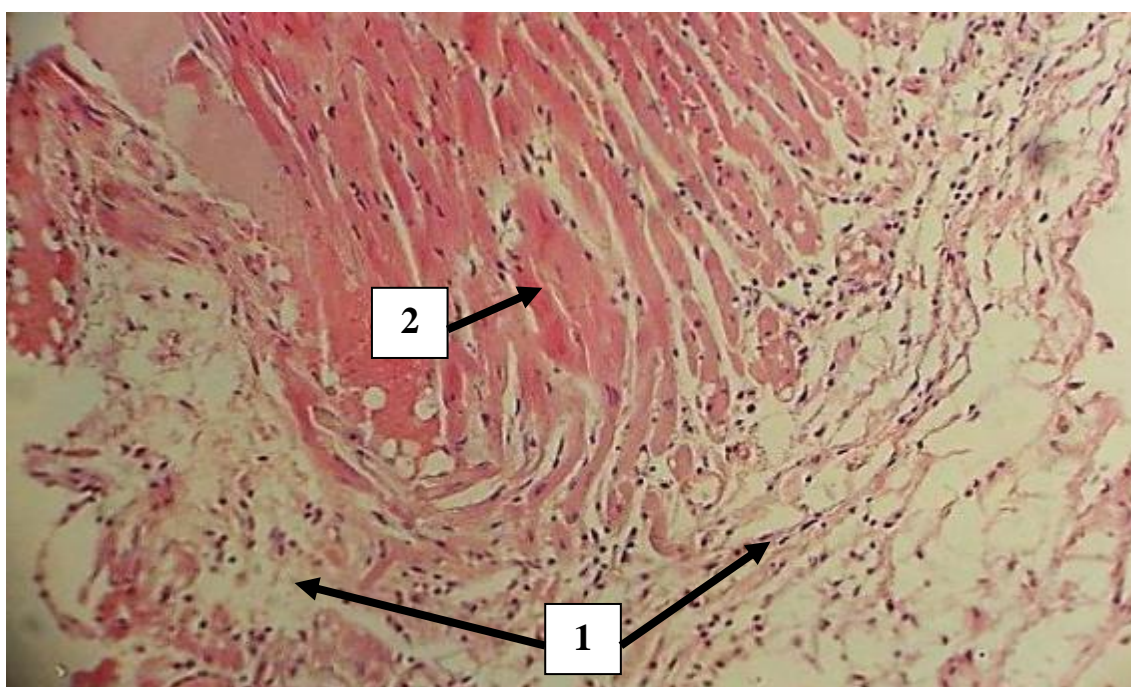


Рис. 3.13. Міокард щура, 12-та доба після лігування гілки лівої коронарної артерії: 1) відкладення колагену; 2) кардіоміоцити. Ван Гізон. Зб.: $\times 100$

У позаінфарктній зоні спостерігали набряк кардіоміоцитів та формування складжів еритроцитів у капілярах. В окремих ділянках зони інфаркту спостерігали поодинокі островці некротизованих кардіоміоцитів (рис. 3.14).

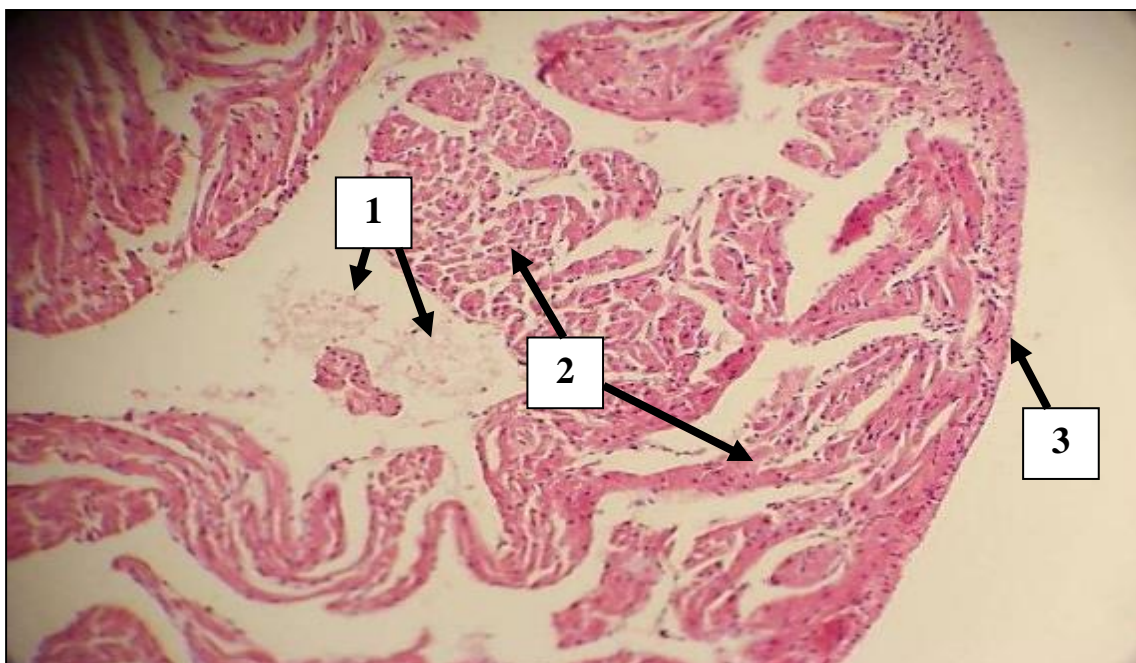


Рис. 3.14. Міокард щура, 12-та доба після лігування гілки лівої коронарної артерії: 1) острівці некротизованих кардіоміоцитів; 2) кардіоміоцити; 3) епікард. Гематоксилін Караці та еозин. Зб.: $\times 100$

У позаінфарктній зоні спостерігали набряк кардіоміоцитів та формування складжів еритроцитів у капілярах. В окремих ділянках зони інфаркту спостерігали поодинокі острівці некротизованих кардіоміоцитів (рис. 3.14).

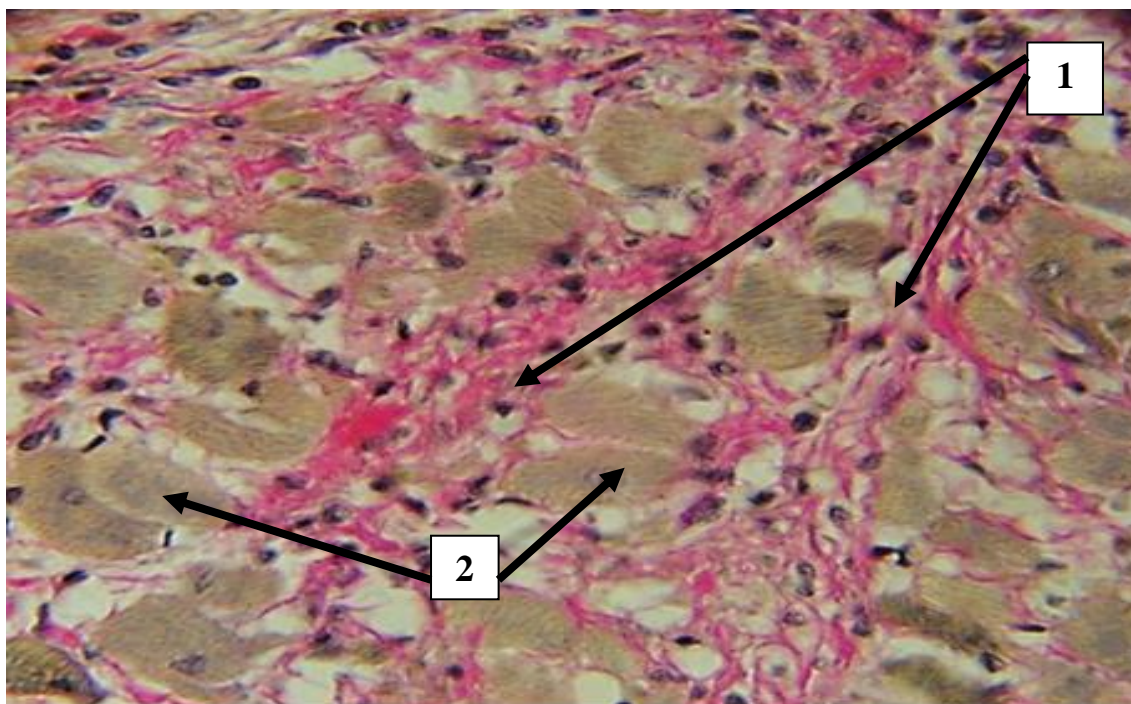


Рис. 3.15. Міокард щура, 17-та доба після лігування гілки лівої коронарної артерії: 1) сформовані колагенові волокна; 2) кардіоміоцит. Ван Гізон. Зб.: $\times 400$

На 17-у добу, після лігування артерії, у ділянці патологічного процесу спостерігались початкові етапи формування сполучної тканини: у зоні ушкодження виявлялась значна кількість судин та фібробластів. У центральних ділянках інфаркту відмічалась присутність сформованих колагенових волокон (рис. 3.15). Поза зоною пошкодження спостерігався інтрацелюлярний набряк кардіоміоцитів.

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 спостерігались ознаки прогресуючого периферичного інфаркту міокарду: набряк кардіоміоцитів, активацію стромального компоненту, формування грануляційної тканини (рис. 3.16).

В окремих ділянках відмічали повне заміщення некротичної тканини рубцевою. Рубцева тканина була неоднорідна (рис. 3.17), що свідчить про неодномоментність її розвитку.

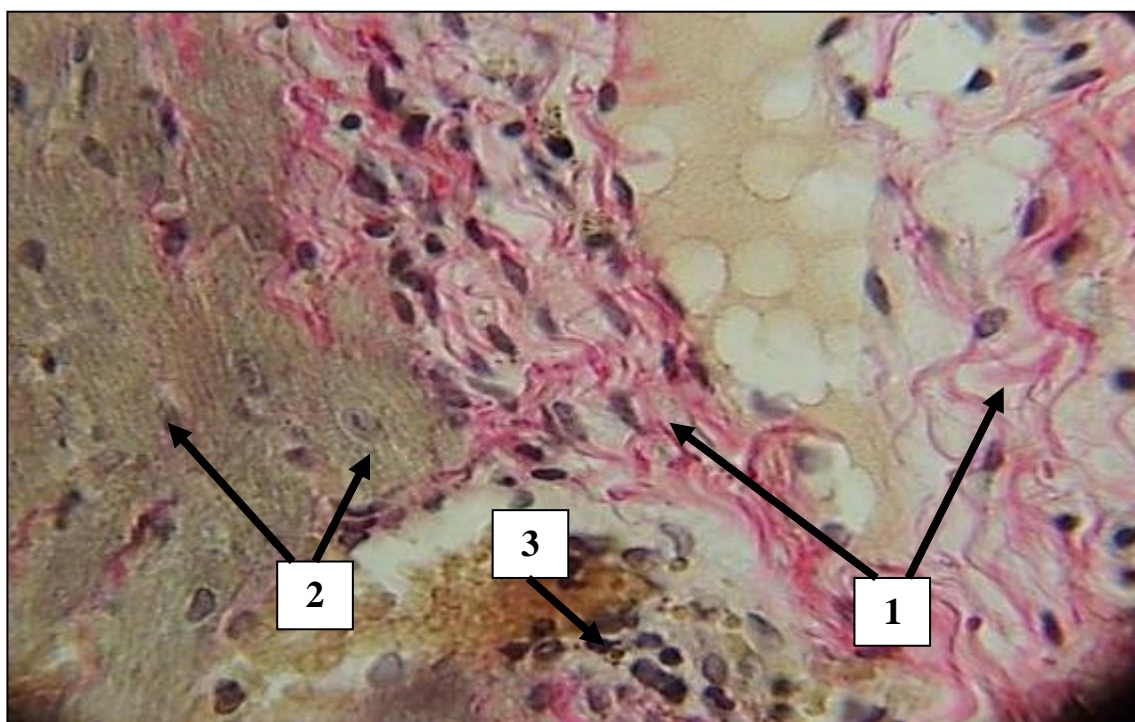


Рис. 3.16. Міокард щура, 25-та доба після лігування гілки лівої коронарної артерії: 1) колагенові волокна; 2) кардіоміоцити; 3) грануляційна тканина. Ван Гізон. 3б.: $\times 400$

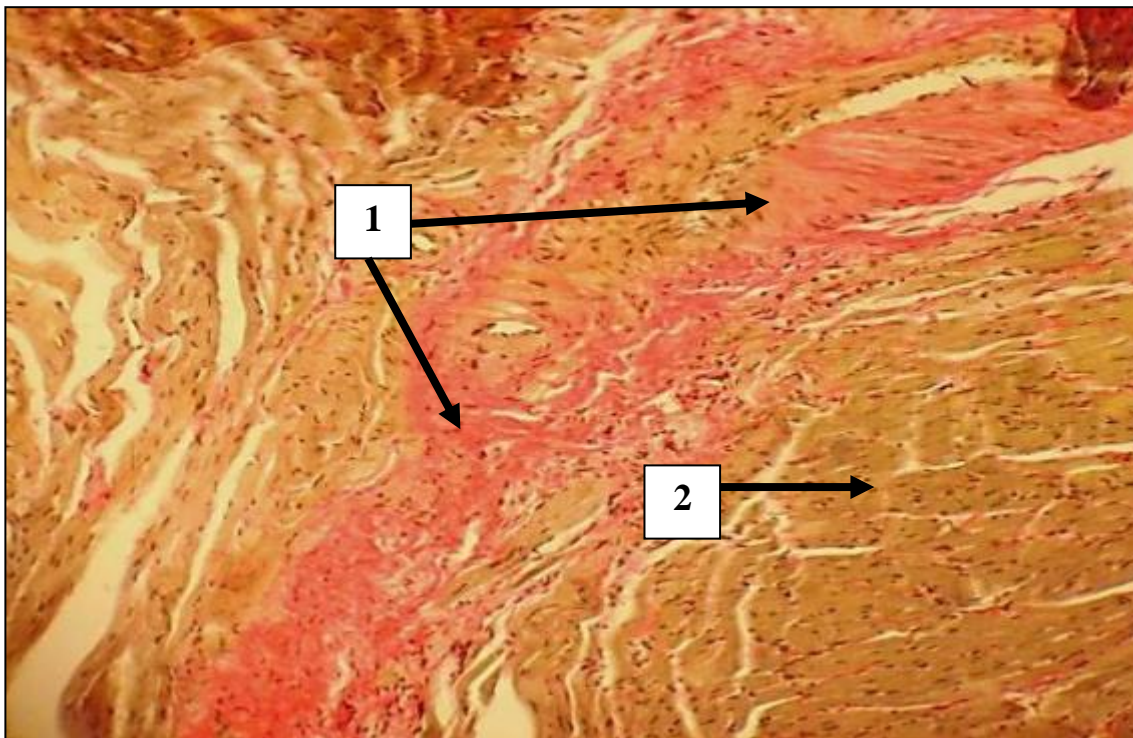


Рис. 3.17. Міокард щура, 25-та доба після лігування гілки лівої коронарної артерії: 1) сполучнотканинний рубець; 2) кардіоміоцити. Ван Гізон. Зб.: $\times 400$.

Отже, у процесі дослідження ми виявили, що оптимальним методом формування інфаркту міокарда є лігування висхідної гілки лівої коронарної артерії, що повною мірою дозволяє досягнути змін, характерних для ішемії міокарда з подальшим некрозом. При гістологічному дослідженні зразків серця з сформованим інфарктом міокарда ми відмічали стадійність розвитку патологічного процесу та збільшення зони пошкодження, що, можливо, відбувалося за рахунок стискання судин набряклими пошкодженими кардіоміоцитами. Результати цього підрозділу були опубліковані у роботі [26].

3.4. Цитотоксична активність лімфоцитів і сироватки крові щурів відносно алогенної культури стовбурових клітин міокарда

Наступне питання, що постає перед застосуванням стовбурових клітин, є відповідь організму-реципієнта на трансплантацію чужорідного матеріалу. Варто відмітити, що культура клітин отримана з міокарда, містить у своєму складі клітини на різних стадіях диференціації та є органоспецефічною. Зважаючи на це, нашим наступним завданням було вивчити вплив імунної системи на трансплантацію алогенних культур стовбурових клітин міокарда щура (табл. 3.6).

**Проліферативна активність культури стовбурових клітин міокарда
щура під час вивчення цитотоксичної активності лімфоцитів та сироватки
крові інтактних та сенсibilізованих тварин, $M \pm m$, $n=3$**

Група тварин	Пасаж	Показники	Співкульт. з лейкоцитами	Співкульт. з сироваткою
Інтактні тварини	I	К-ть клітин після культивування	$29,6 \pm 0,2$	$29,6 \pm 0,2$
		Індекс проліферації	$0,99 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0$
	IV	К-ть клітин після культивування	$29,7 \pm 0,13$	$29,7 \pm 0,2$
		Індекс проліферації	$0,99 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0,01$
Сенсibilізовані тварини (дослід)	I	К-ть клітин після культивування	$20,8 \pm 1,1^{**}$	$1,2 \pm 0,6$
		Індекс проліферації	$0,69 \pm 0,04^{**}$	$0,04 \pm 0,02^{**}$
	IV	К-ть клітин після культивування	$26,0 \pm 1,2^*$	$9,3 \pm 2,4$
		Індекс проліферації	$0,87 \pm 0,04^*$	$0,31 \pm 0,08^{**}$

Примітка: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$, порівняно з контролем

Існують суперечливі дані щодо імунологічних властивостей стовбурових клітин: за даними одних авторів [122, 105] вони володіють імуносупресивною дією, у той час як інші автори імунологічні властивості стовбурових клітин пов'язують з їх дозою, способом введення та видом клітинного трансплантату на [149, 205, 227].

Аналіз результатів дослідження впливу сироватки та лімфоцитів крові показав, що проліферативна активність алогенних культур стовбурових клітин міокарда у цитотоксичному тесті із сироваткою та лімфоцитами крові інтактних та сенсibilізованих тварин достовірно відрізняється.

У процесі дослідження не відмічали цитотоксичного впливу лімфоцитів та сироватки крові інтактних тварин на культури стовбурових клітин міокарда щура як I (рис. 3.18), так і IV пасажів, про що свідчить близький до 1 індекс проліферації.

У той час, сироватка крові сенсibilізованих тварин мала значний цитотоксичний вплив на клітини досліджуваної культури (рис. 3.19, б).

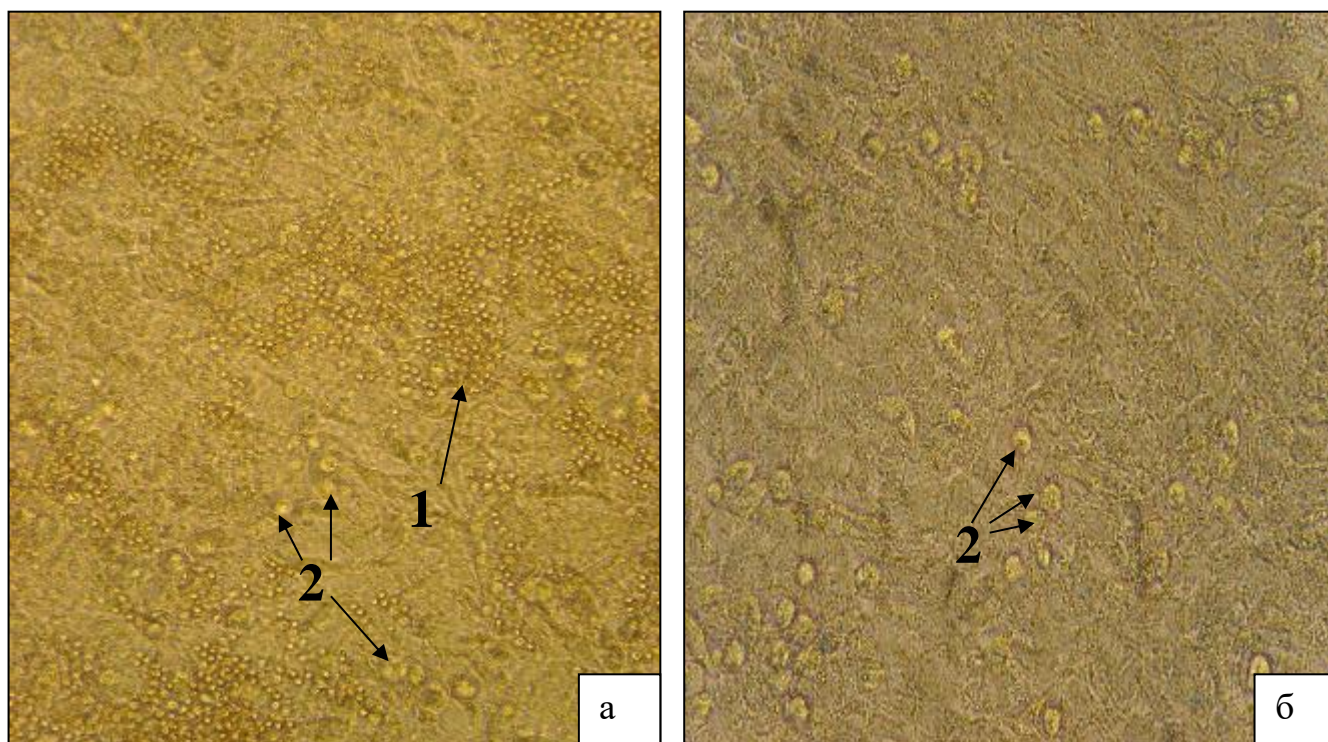


Рис. 3.18. Співкультивування стовбурових клітин міокарда щура І пасажу з:
а) лімфоцитами; б) сироваткою крові інтактних тварин. (стрілками вказано: 1 –
лімфоцити; 2 – відкріплені клітини культури. Нативний препарат. Зб.: $\times 320$

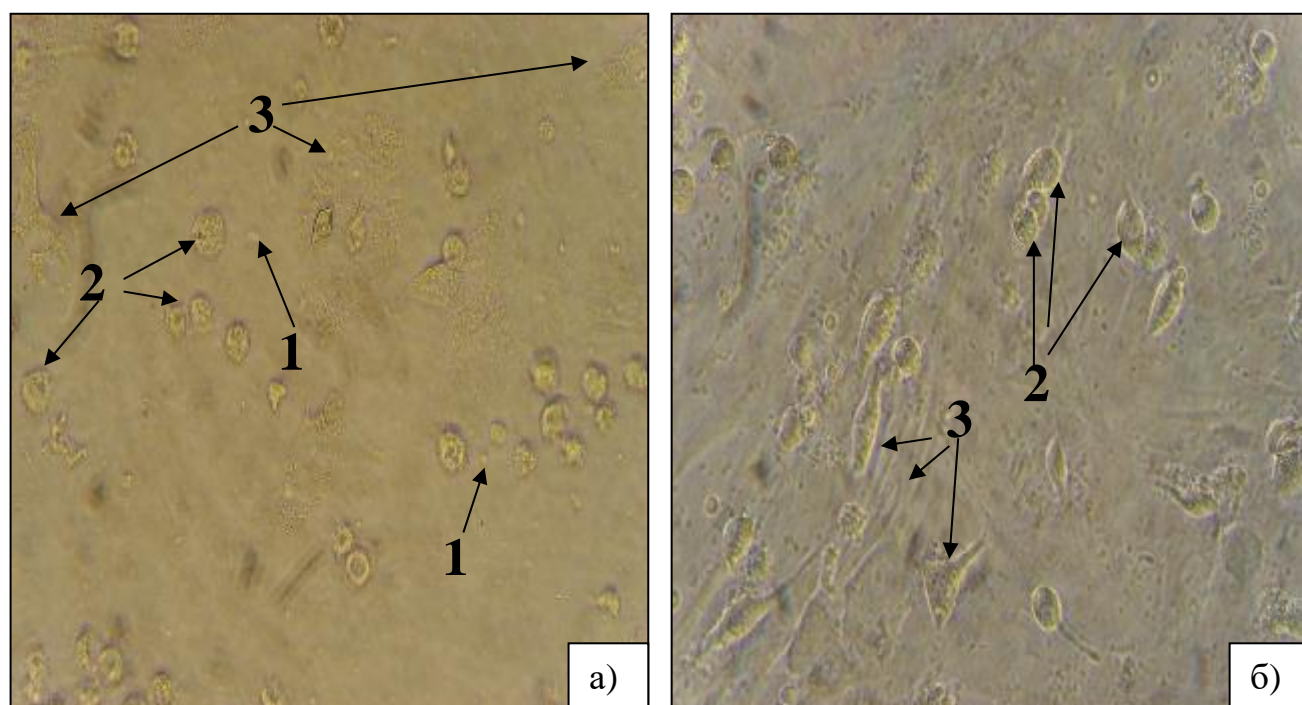


Рис. 3.19. Співкультивування культур стовбурових клітин міокарда щура І
пасажу з додаванням: а) лейкоцитів; б) сироватки крові сенсibilізованих тварин: 1
– лейкоцити; 2 – відкріплені клітини; 3 – адгезовані клітини. Нативний препарат.
Зб.: $\times 320$

Так, індекс проліферації стовбурових клітин міокарда щура I пасажу за співкультивування з сироваткою крові сенсibilізованих тварин складав $0,04 \pm 0,02$, тоді як IV пасажу – $0,31 \pm 0,08$, що відповідно у 24,75 та 3,19 разів нижче, ніж у контрольній групі.

Лімфоцити крові сенсibilізованих тварин також проявляли цитотоксичний вплив на клітини досліджуваної культури (рис. 3.19, а), проте значно нижчий у порівнянні з сироваткою крові. Так, індекс проліферації культури I пасажу складав $0,69 \pm 0,04$, IV – $0,87 \pm 0,04$, що відповідно у 1,43 та 0,88 разів нижче, ніж у контрольній групі. З наведених результатів досліджень видно, що з пасажами цитотоксичність як сироватки, так і лейкоцитів крові знижується.

Отже, лейкоцити та сироватка крові сенсibilізованих щурів на 7 добу після інтраперетоніального введення їм стовбурових клітин, отриманих з міокарда щура, проявляють цитотоксичний ефект щодо останніх в системі *in vitro*, варто відмітити, що цитотоксичний вплив як сироватки крові, так і лейкоцитів крові був менший на клітини IV пасажу.

3.5. Здатність стовбурових клітин до міграції у міокард за його ушкодження

Для терапії патологічних процесів з використанням стовбурових клітин важливим є їх «доставка» у зону пошкодження. Даний процес потребує самонаведення і міграцію клітин у тканину-мішень. Однак, зважаючи на те, що при лікуванні інфаркту міокарда використовують стовбурові клітини з різних джерел, тому при їх введенні у кровоносне русло вони можуть затримуватися у інших органах: печінці, кістковому мозку тощо. Тому наступним етапом нашого 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 $0,05 \text{ см}^3$ DMEM інтракардіально, інтраміокардіально та внутрішньовенно. Аналіз результатів виконували на 2 та 8

добу після трансплантації (рис. 3.20). Пошук мічених клітин здійснювали на межі пошкодженої та здорової тканин серцевого м'язу.

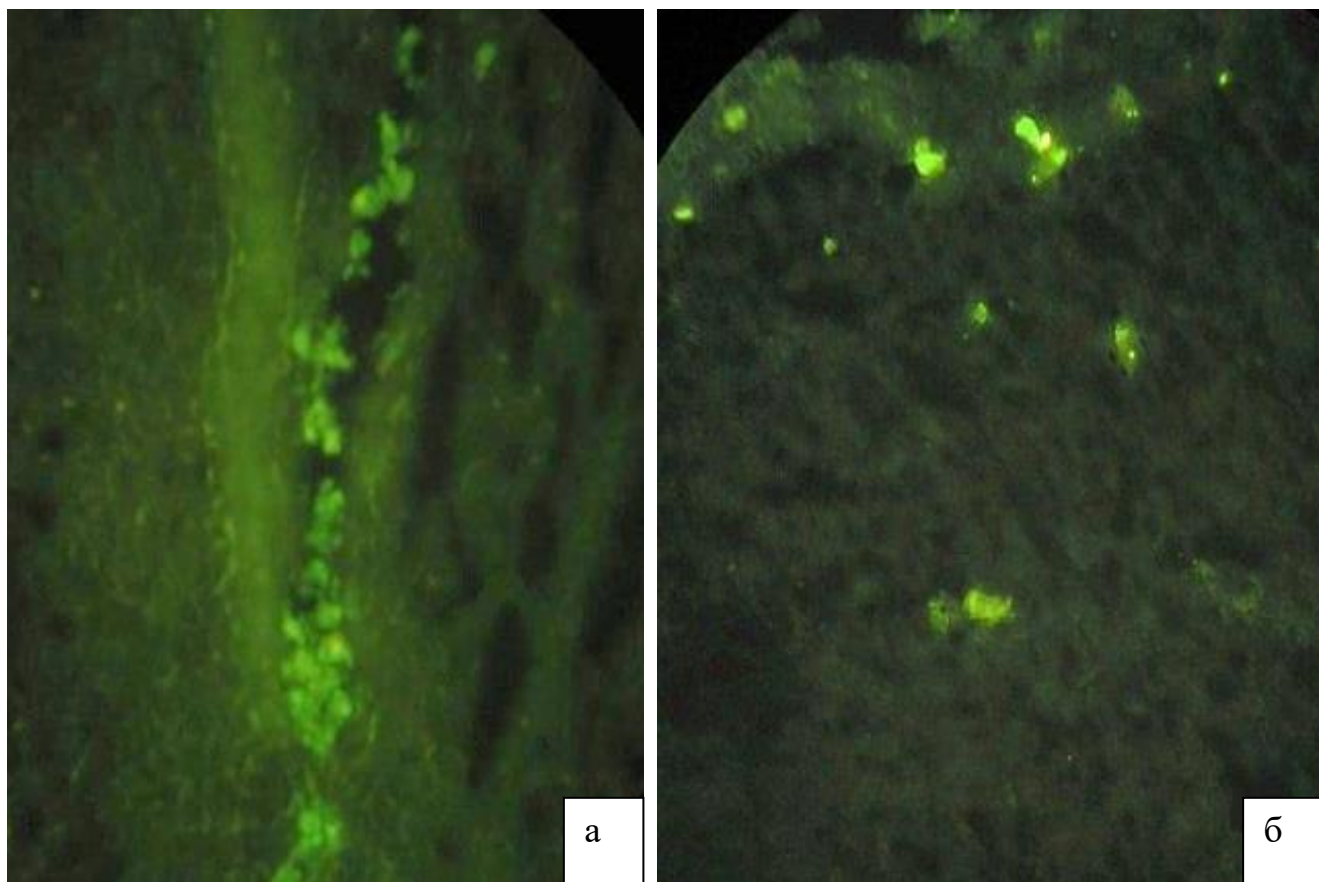


Рис. 3.20. Виявлення у серцевому м'язі клітин, мічених Hoechst, за інтраміокардіального введення: а) 2 доба після введення, мічені стовбурові клітини локалізовані у каналі введення; б) 8 доба, клітини дифузно розташовані у серцевому м'язі. Нативний препарат, флюорисцентна мікроскопія. Зб.: $\times 400$

При інтраміокардіальному введенні на 2 добу після трансплантації ми виявляли мічені клітини у каналі введення (рис. 3.20, а). Проте на 8 добу ми вже відмічали дифузну локалізацію стовбурових клітин в структурі серцевого м'язу, що свідчить про міграцію мічених клітин з каналу (рис. 3.20, б).

При аналізі зразків сердець за інтракардіальної на внутрішньовенної трансплантації, мічених стовбурових клітин в структурі серцевого м'язу, як на 2 так 8 добу нами виявлено не було.

Отже, спираючись на отримані результати можна зробити висновок, що 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. Результати цього розділу були опубліковані у роботі [21].

3.6. Вплив трансплантації стовбурових клітин культур отриманих з різних джерел на активність відновлення структури міокарда щура внаслідок експериментального ішемічного інфаркту

На даний час існує декілька теорій впливу трансплантованих в міокард стовбурових клітин на його відновлення, проте до кінця механізм цього впливу залишається незрозумілим. Згідно традиційної теорії, трансплантовані стовбурові клітини диференціюються у кардіоміоцити та вбудовуються у пошкоджений міокард [258]. Згідно іншої гіпотези, стовбурові клітини після трансплантації диференціюються в ендотеліальні клітини та сприяють ангіогенезу [214]. Це, у свою чергу, призводить до обмеження зони інфаркту та стимулювання процесів відновлення міокарда. Зважаючи на те, що при отриманні культури стовбурових клітин з різних джерел їх клітинний склад відрізняється, логічним буде припустити і відмінності у їх впливі на регенеративні процеси у пошкодженому міокарді.

З огляду на це, нашою метою було дослідити вплив стовбурових клітин різного походження на перебіг експериментально сформованого інфаркту міокарда у щурів.

При макроскопічному дослідженні нативних зразків сердець щурів контрольної групи відмічали 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 дана ознака була менш виражена у порівнянні з контролем. Вище місця лігування відмічали анеризму 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 дозволяє 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 у порівнянні з контролем (табл. 3.7).

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

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

Таблиця 3.7.

Відсоткове відношення некротизованої тканини міокарда до загальної площі зрізу за трансплантації досліджуваних видів культур клітин на фоні експериментального ішемічного інфаркту у щура, $M \pm m$, $n=3$

Культура стовбурових клітин	Площа некротизованої тканини, %
Червоного кісткового мозку	$14,67 \pm 0,77^{**}$
Жирової тканини	$17,00 \pm 0,58^*$
Міокарда	$13,33 \pm 0,39^{**}$
Контроль (введення DMEM)	$20,33 \pm 0,97$

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ порівняно з контролем

Отже при дослідженні впливу трансплантації стовбурових клітин культур отриманих з різних джерел на активність відновлення структури міокарда щура внаслідок експериментального ішемічного інфаркту ми виявили, що всі досліджувані культури 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 у порівнянні з контролем. Варто зазначити, що найефективнішим є застосування

стовбурових клітин міокарда, за якого площа некрозу на 7 % менша такого показника у тварин контрольної групи. Результати цього підрозділу були опубліковані у роботах [21, 27].

3.7. Оптимізація умов отримання і культивування культур стовбурових клітин kota отриманих з різних джерел

3.7.1. Вплив способу дезагрегації міокарда kota на ефективність виділення стовбурових клітин для отримання культури

Стовбурові клітини міокарда є перспективним біологічним матеріалом для лікування домашніх тварин із хворобами серця, викликаних 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 нашим наступним завданням було визначити оптимальний метод отримання стовбурових клітин міокарда kota, що дозволить виділити більшу кількість клітин з однакової маси тканини.

На сьогоднішній день метод експланту 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. Разом з тим, ферментативний метод отримання первинної культури у разі правильного підбору комбінації ферментів та експозиції дозволяє отримати більший порівняно з методом експланту вихід клітин, здатних до проліферації. З огляду на це, для отримання культури стовбурових клітин міокарда kota ми порівнювали як метод експланту, 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 ми спостерігали відмінності у рості клітин. Так, за використання I методу (метод експланту) відмічали утворення поодиноких колоній (рис. 3.21, а), тоді як за використання VI методу відмічали появу великої

кількості клітин, що були дифузно прикріплені до культурального пластику (рис. 3.21, б). При оцінці росту клітин у інших дослідних групах на 3-тю добу культивування виявляли як наявність колоній, так і поодинокі клітини.

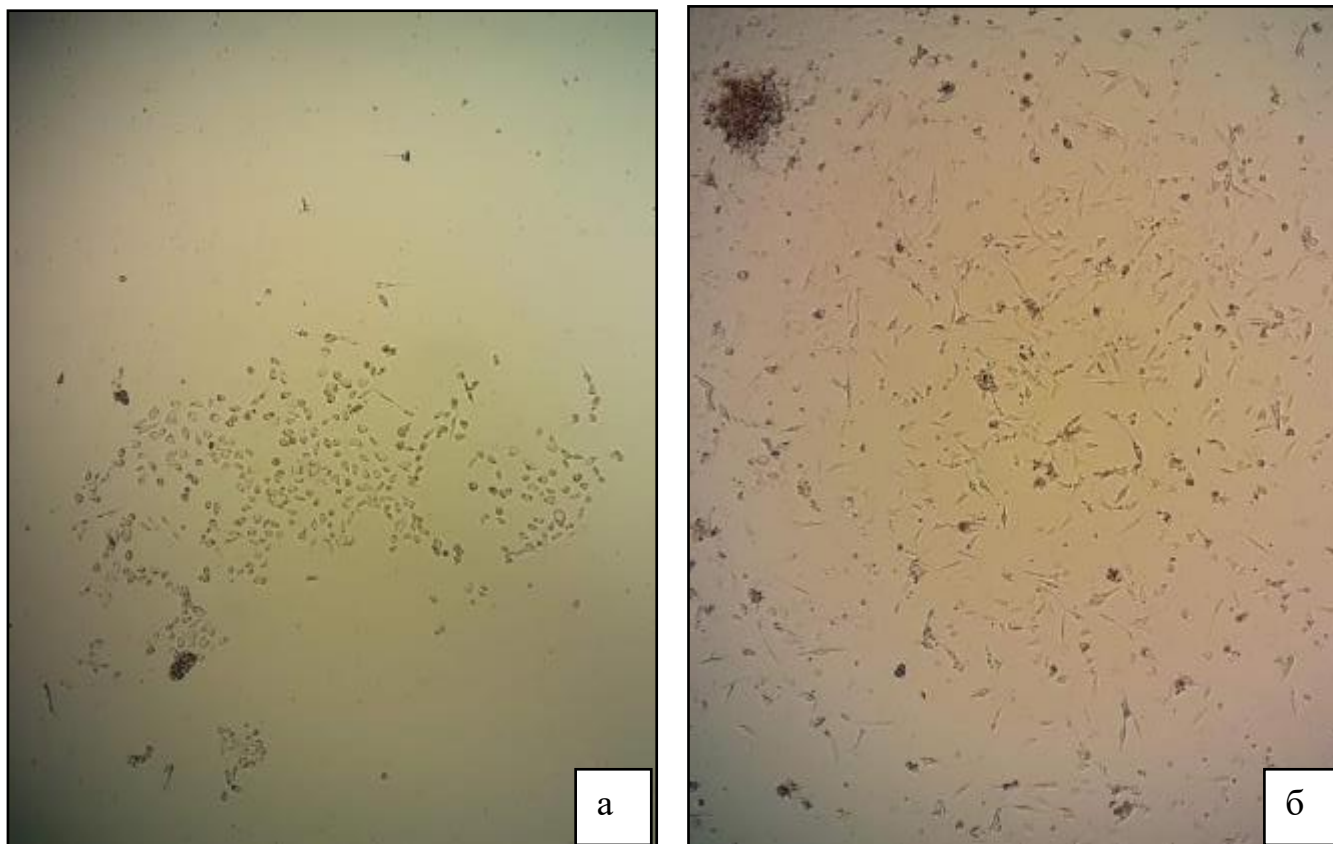


Рис. 3.21. Моношар культур стовбурових клітин міокарда kota за використання різних методів обробки тканини (3-тя доба культивування, 0 пасаж): а) I метод (метод експланту); б) VI метод (2,5 % трипсину + 0,5 мг/мл колагенази (тип II) + 0,5 мг/мл гіалуронідази). Нативний препарат. Зб.: $\times 40$

Статистичні результати щодо отримання культури стовбурових клітин міокарда kota на 5 добу культивування представлені у таблиці 3.8.

При оцінці статистичних даних, представлених в таблиці 3.18, та візуальних відмінностей, продемонстрованих на рисунку 3.22, можна стверджувати, що за ферментативної обробки тканин серця kota вдається отримати достовірно більшу кількість клітин, здатних до проліферації, порівняно з використанням методу експланту (без застосування ферментів).

Так, обробка 10 мг тканини міокарда комбінацією ферментів, яку використовували у VI дозволила досягти 100 % конфлюентності моношару на 5 добу культивування (рис. 3.22 б). Кількість клітин при цьому становила

986,0±9,3 тис, що, у свою чергу, у 27,6 разів більше, ніж за використання методу експланту (контроль) (рис. 3.22 а). Варто зазначити, що даний метод виявився найбільш ефективним у нашому дослідженні.

Таблиця 3.8

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 експланту (контроль)	35,7±6,2
II	2 мг/мл колагенази (тип II)	560,3±7,8***
III	2 мг/мл колагенази (тип II) + 5 % БСА	340,7±15,8***
IV	1 мг/мл колагенази (тип II) + 1 мг/мл гіалуронідази + 5 % БСА	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***

Примітки: *** $p < 0,001$ порівняно з контролем

Наступним за ефективністю був III метод обробки тканини серця з використанням 2 мг/мл колагенази (тип II) та додаванням 5 % БСА. Кількість клітин, здатних до проліферації, становила 340,7±15,8 тис., що у 9,5 разів більше, ніж за використання методу експланту.

Менш ефективними методами ферментативної обробки тканини серця виявилися IV (додавання 1 мг/мл колагенази (тип II) + 1 мг/мл гіалуронідази + 5 % БСА) та V (з додаванням 2,5 % трипсину) методи. Кількість клітин за використання IV методу на 5 добу культивування становила 276,0±8,7 тис., V методу – 175,0±7,3 тис, що відповідно у 7,7 та 4,9 разів більше порівняно з контролем.

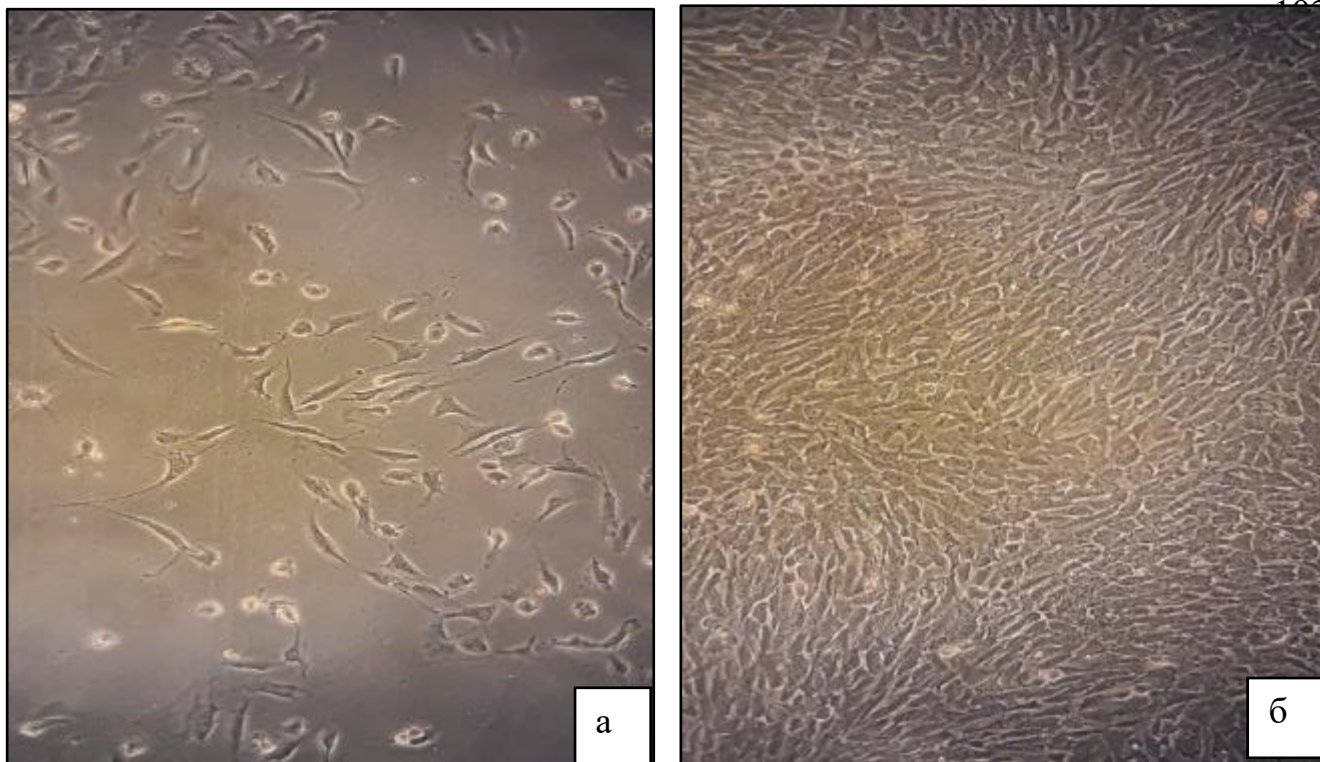


Рис. 3.22. Моношар культур стовбурових клітин міокарда kota за використання різних методів отримання (5 доба культивування, 0 пасаж): а) метод експланту (контроль); б) VI метод (2,5 % трипсину + 0,5 мг/мл колагенази (тип II) + 0,5 мг/мл гіалуронідази). Нативний препарат. Зб.: $\times 200$

Отже, 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 годин при температурі 4 °C є оптимальною та дозволяє отримати на 5 добу культивування 27,6 разів більше клітин, здатних до проліферації, ніж у контрольній групі (метод експланту). Результати цього підрозділу були опубліковані у роботі [19].

3.7.2. 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 на даний час вважається перспективним джерелом отримання стовбурових клітин, наступним завданням, що постало перед ними, 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. 3.9). Аналіз результатів проводили після досягнення конфлюентності 100 % у одній із чашок.

Таблиця 3.9

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

№ п/п	Тип обробки	Конфлюентність (10 доба)	К-ть 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 % БСА	$98,7 \pm 1,1^{***}$	$611,7 \pm 26,4^{***}$
IV	1 мг/мл колагенази + 20 мг/мл гіалуронідази + 4 % БСА	$52,7 \pm 5,6^{***}$	$346,7 \pm 51,1^{**}$
V	2 мг/мл колагенази + 20 мг/мл гіалуронідази + 4 % БСА	$19,3 \pm 0,9^{***}$	$123,7 \pm 5,8^{***}$
VI	2 мг/мл колагенази + 10 мг/мл гіалуронідази + 4 % БСА	$36,3 \pm 2,2^{***}$	$231,7 \pm 14,4^{***}$
VII	Без додавання ферментів (контроль)	$1,3 \pm 1,1$	$12,0 \pm 8,0$

Примітки: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ у якості контролю слугував метод експланту

На основі отриманих даних, представлених у таблиці 3.9, можна стверджувати, що найбільш ефективним з 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 % БСА (рис. 3.19, б). Кількість клітин на 10 добу культивування за використання даного

методу, складала $611,7 \pm 26,4$ тис, що у 51 раз вище показника у групі чашок без застосування ферментів (рис. 3.19, а) (контроль, метод експланту).

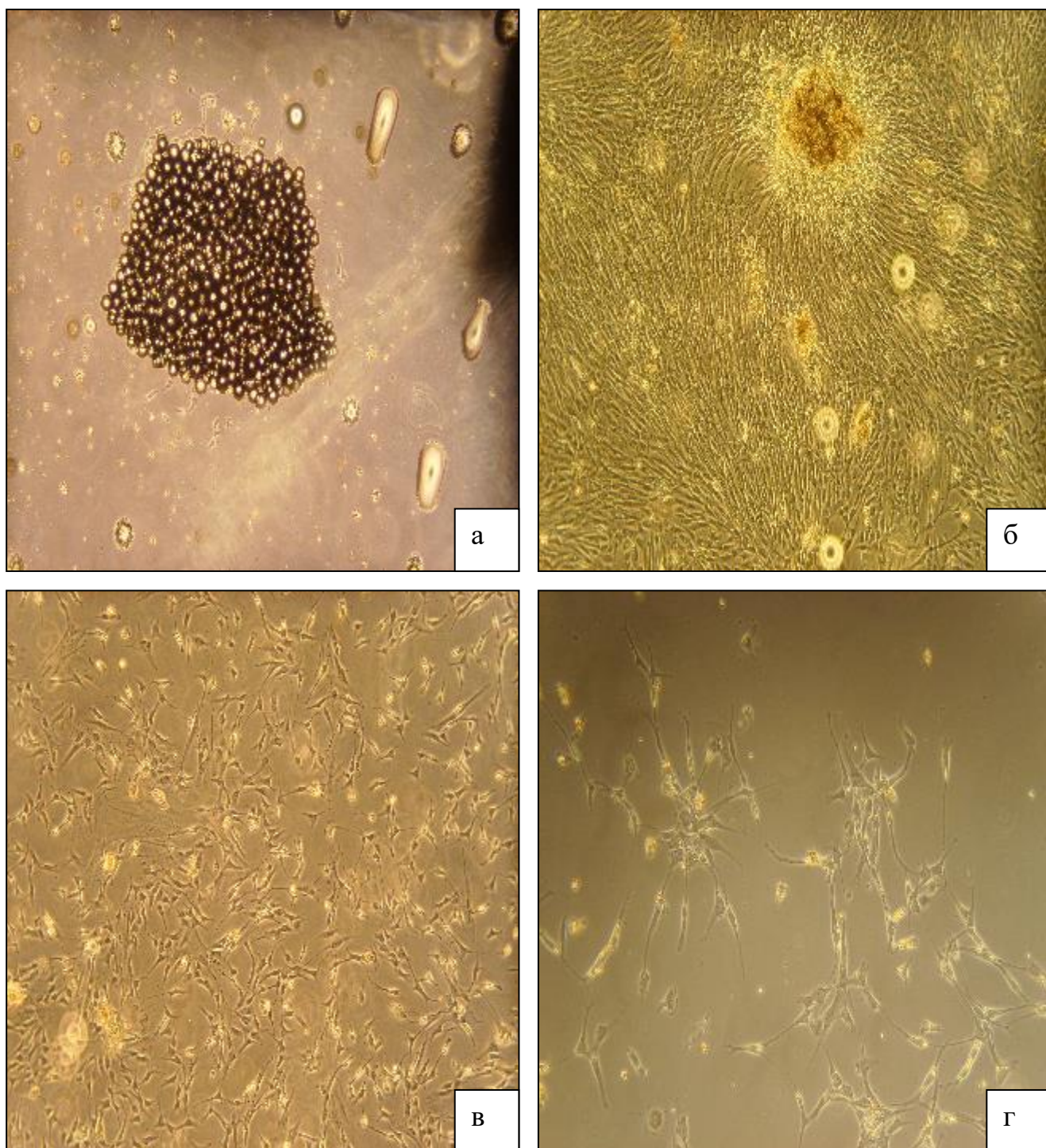


Рис. 3.23. Мікрофотографія моношару культур стовбурових клітин жирової тканини kota (0 пасаж, 7 доба культивування): а) VII метод (контроль); б) III метод; в) IV метод; г) V метод. Нативні препарати. Зб.: а – $\times 320$; б, в – $\times 50$; г – $\times 100$.

Дещо нижчий показник проліферації клітин спостерігали за використання дезагрегаційного розчину з вмістом 1 мг/мл колагенази, 20 мг/мл гіалуронідази та

4 % БСА (рис. 3.23, в), він складав $346,7 \pm 51,1$ тис. клітин на 10 добу культивування, що у 29 разів вище, ніж у контрольній групі чашок.

Третім за результативністю був метод за використання дезагрегаційного розчину з вмістом 2 мг/мл колагенази, 10 мг/мл гіалуронідази та 4 % БСА. Кількість клітин за даного методу обробки жирової тканини kota була у 19 разів більшою ніж у групі чашок без використання ферментів (контроль) і складала $231,7 \pm 14,4$ тис.

Інші досліджувані методи були менш ефективні при отриманні КСКЖТ kota. Так за використання дезагрегаційного розчину який містить 2 мг/мл колагенази, 10 мг/мл гіалуронідази кількість адгезивних клітин складала $152,0 \pm 11,3$ тис; 2 мг/мл колагенази, 20 мг/мл гіалуронідази та 4 % БСА – $123,7 \pm 5,8$ тис (рис. 3.23, г); 1 мг/мл колагенази – $55,3 \pm 4,9$ тис; що відповідно у 13, 12 та 5 разів більше, ніж у контрольній групі чашок.

Отже, оптимальним методом отримання культури стовбурових жирової тканини є ферментативна обробка комбінацією 1 мг/мл колагенази, 10 мг/мл гіалуронідази з додаванням 4 % бичачого сироваткового альбуміну, що в свою чергу на 10 добу культивування дозволяє отримати в 51 раз більше клітин ніж у групі чашок без застосування ферментів (контроль). Результати цього підрозділу були опубліковані у роботі [16].

3.7.3. Влив фактору росту фібробластів (FGF-2), інсуліноподібного фактору росту (IGF-1), гормону росту (rhGH) та biolaminin 521 LN на проліферативну активність стовбурових клітин kota отриманих з різних джерел

Зважаючи на широту використання клітинних технологій у клінічній практиці, виникає необхідність отримання великої кількості клітинного матеріалу, що, у свою чергу, стимулює удосконалення умов культивування, які б дозволили отримати більшу кількість клітинного матеріалу за менший проміжок часу.

З літературних даних відомо, що фактор росту фібробластів (FGF-2) [236], інсуліноподібний фактор росту (IGF-1) [208], гормону росту (rhGH) [297] та

Biolaminin 521 LN [147] здатні позитивно впливати на мітотичну активність стовбурових клітин. Проте, зважаючи на відмінності у клітинному складі культур, отриманих з різних джерел, різним буде і вплив стимуляторів на проліферацію.

Тому, наступним завданням було дослідити вплив інсуліноподібного фактору росту (IGF-1), фактору росту фібробластів (FGF-2), гормону росту (rhGH) у різних концентраціях та Biolaminin 521 LN на проліферативну активність та генетичну стабільність культур стовбурових клітин, отриманих з червоного кісткового мозку, жирової тканини та міокарда kota.

В процесі дослідження ми відмічали відмінності у впливі різних стимуляторів росту на проліферативну активність клітин у культурі. Так, при додаванні IGF-1 у культуральне середовище ми відмічали підвищення індексу проліферації КСККМ та КСКМ порівняно з контролем (рис. 3.24, табл. 3.10).

Індекс проліферації вищезазначених культур зростає із підвищенням концентрації IGF-1. Разом з тим, у КСКЖТ спостерігали зворотній ефект (рис. 3.25), а саме зниження індексу проліферації з підвищенням концентрації IGF-1 у середовищі.

Таблиця 3.10

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

Культура клітин	Концентрація IGF-1 у культуральному середовищі			Контроль
	10 нг/мл	20 нг/мл	50 нг/мл	
	Індекс проліферації			
КСККМ	1,66±0,05*	1,82±0,05***	2,08±0,07***	1,44±0,05
КСКЖТ	2,67±0,08**	2,08±0,06	1,06±0,09**	1,85±0,11
КСКМ	2,41±0,07***	2,66±0,13***	3,65±0,15***	1,81±0,10

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно з контролем

Варто відмітити, що збільшення концентрації даного фактору росту у середовищі корелювали зі збільшенням індексу проліферації. Так, за концентрації IGF-1 50 нг/мл індекс проліферації КСККМ та КСКМ був вище у порівнянні з контролем у 1,4 та 2,0 разів відповідно (табл. 3.10).

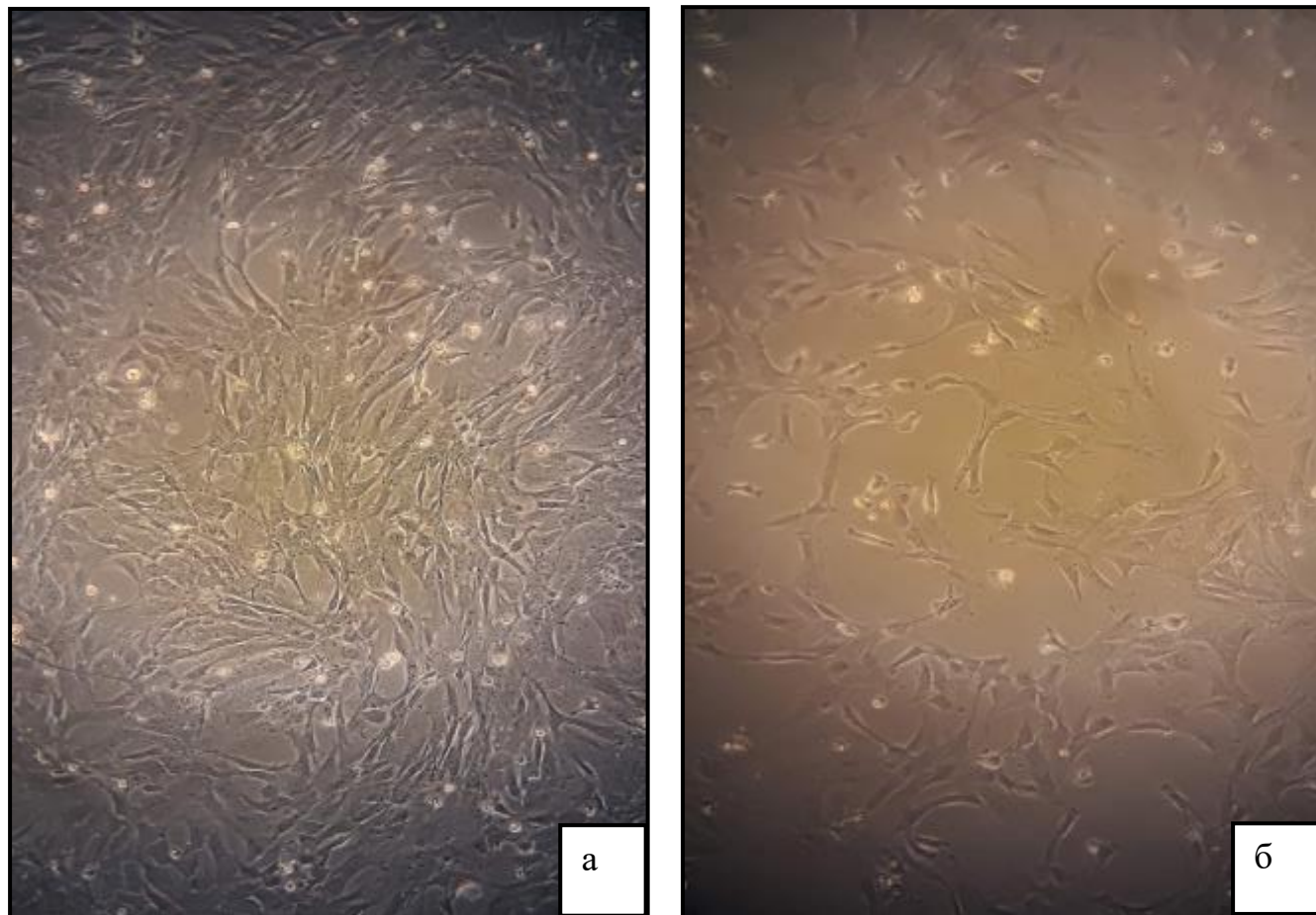


Рис. 3.24. Мікрофотографії культур стовбурових клітин червоного кісткового мозку за впливу різних мітогенів: а) 50 нг/мл IGF-1; б) контроль. Нативні препарати. Зб.: $\times 100$

У КСКЖТ відмічали зворотну закономірність: за концентрації IGF-1 10 нг/мл індекс проліферації був у 1,4 разів вище контролю (табл. 3.10), тоді як концентрація IGF-1 50 нг/мл призвела до зниження індексу проліферації у 1,8 разів нижче контролю.

При дослідженні FGF-2 нами 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. 3.11).

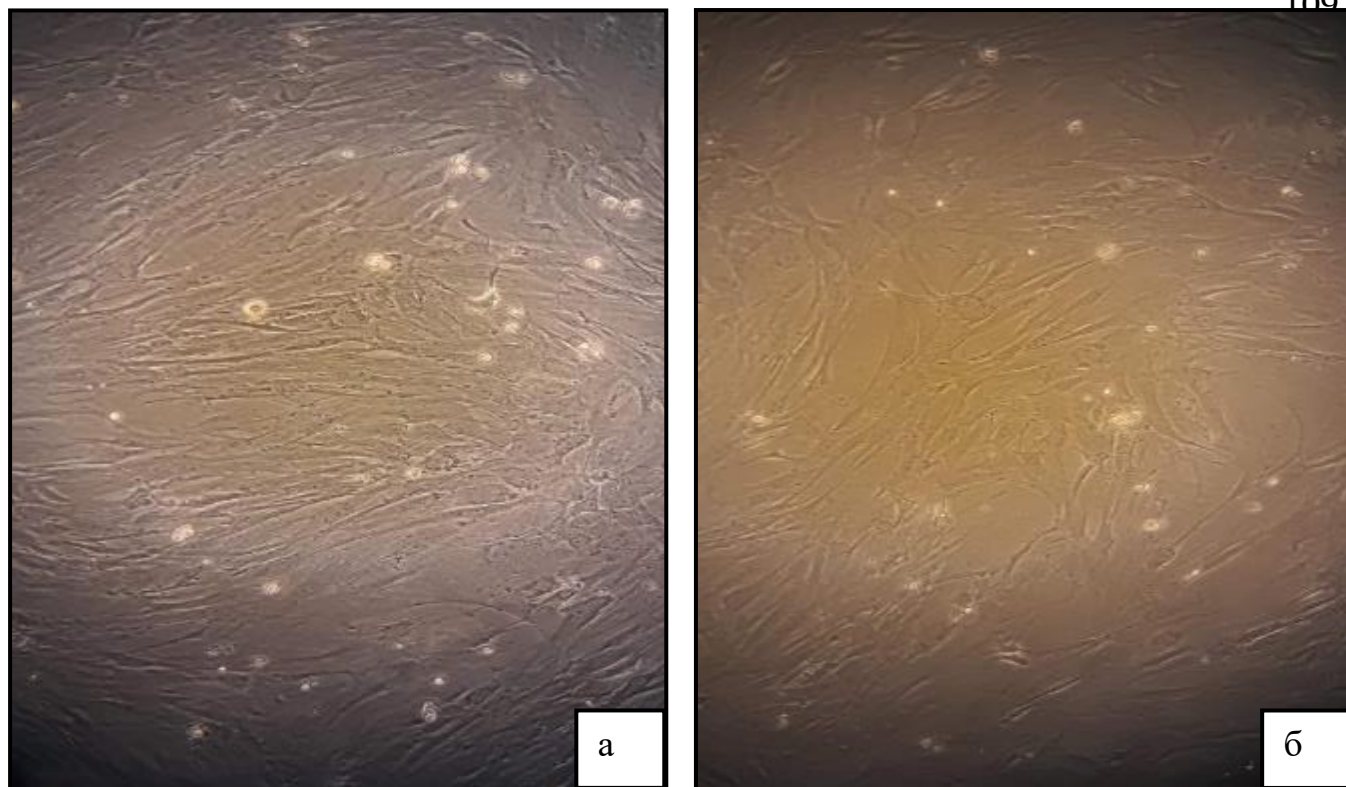


Рис. 3.25. Мікрофотографії культур стовбурових клітин жирової тканини за впливу різних мітогенів: а) 10 нг/мл IGF-1; б) контроль. Нативні препарати. 36.:×100

Таблиця 3.11

Проліферативна активність стовбурових клітин отриманих з різних джерел, залежно від концентрації FGF-2 у культуральному середовищі, $M \pm m$, $n=3$

Культура клітин	Концентрація FGF-2 у культуральному середовищі			Контроль
	10 нг/мл	20 нг/мл	50 нг/мл	
	Індекс проліферації			
КСККМ	1,69±0,04**	1,28±0,03*	0,74±0,02	1,44±0,05
КСКЖТ	2,43±0,05**	1,81±0,06	1,56±0,08	1,85±0,11
КСКМ	4,84±0,11***	3,87±0,22***	2,51±0,06***	1,81±0,10

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно з контролем

Найбільш виражений вплив FGF-2 відмічався на КСКМ (табл. 3.11) та (рис. 3.26). За концентрації даного фактору росту 10 нг/мл індекс проліферації

збільшився у 2,7 разів у порівнянні контролем. Відмічали кореляцію між збільшенням концентрації FGF-2 у культуральному середовищі та зниженням індексу проліферації клітин у культурі.

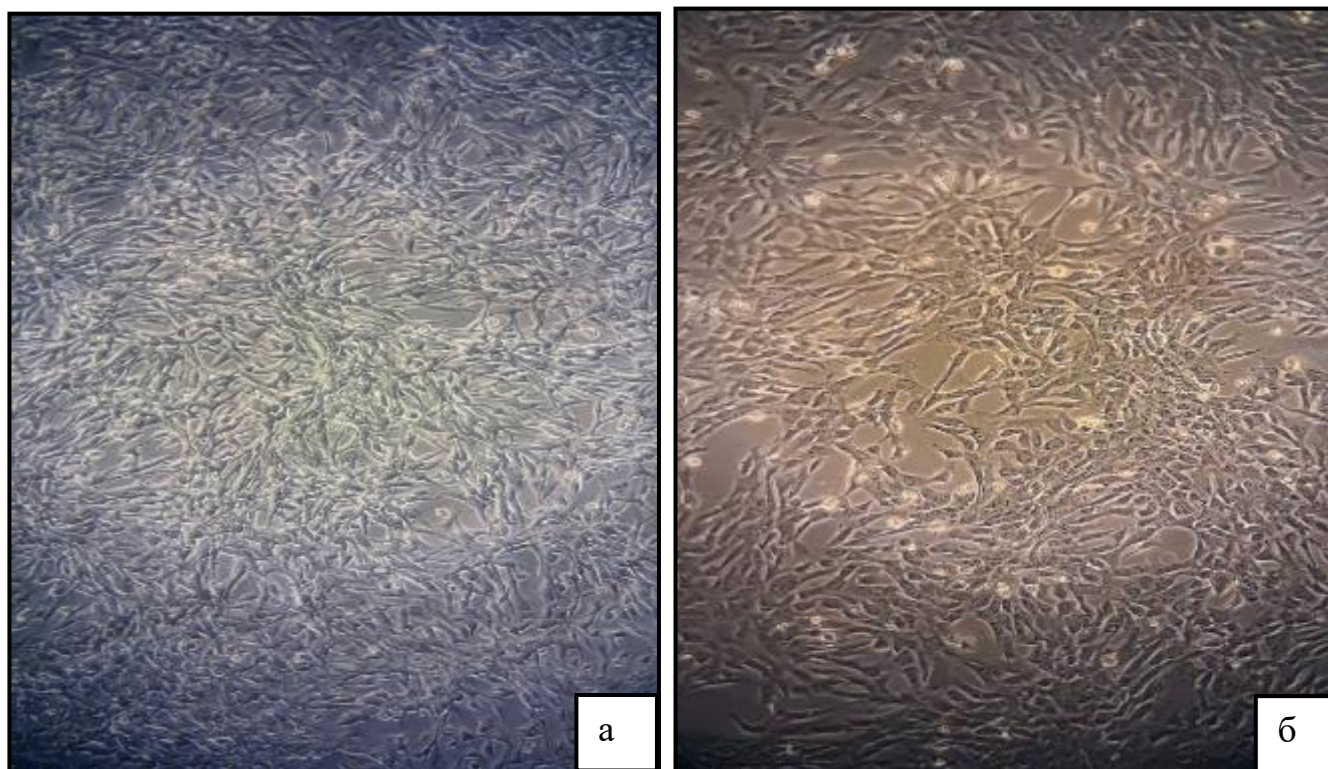


Рис. 3.26. Мікрофотографії культур стовбурових клітин міокарда за впливу FGF-2: а) 10 нг/мл; б) контроль. Нативні препарати. Зб. $\times 100$

Значно нижчий стимулюючий ефект FGF-2 відмічали у КСККМ та КСКЖТ, так за додавання 10 нг/мл індекс проліферації у досліджуваних культурах збільшився у 1,2 та 1,3 рази відповідно (табл. 3.11). Зі збільшенням концентрації даного фактору росту у середовищі індекс проліферації знижувався.

За додавання гормону росту (rhGH) до культурального середовища з КСККМ ми відмічали зниження індексу проліферації клітин нижче контролю, при чому спостерігали кореляцію між збільшенням концентрації гормону та зменшенням індексу проліферації (табл. 3.12).

При додаванні rhGH у дозі 10 нг/мл до КСКЖТ та КСКМ відмічали збільшення індексу проліферації у 1,2 та 1,3 рази відповідно (табл. 3.12). Проте зі збільшенням концентрації гормону rhGH у середовищі індекс проліферації знижувався.

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

Культура клітин	Концентрація rhGH у культуральному середовищі			Контроль
	10 нг/мл	20 нг/мл	50 нг/мл	
	Індекс проліферації			
КСККМ	1,22±0,04**	1,09±0,04***	0,88±0,04***	1,44±0,05
КСКЖТ	2,39±0,06	2,08±0,05	1,05±0,06**	1,85±0,11
КСКМ	2,36±0,07**	2,20±0,08**	2,07±0,04*	1,81±0,10

Примітка: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ порівняно з контролем

Варто відмітити, що клітини за додавання rhGH були візуально більші, ніж у контрольній групі чашок (рис. 3.27).

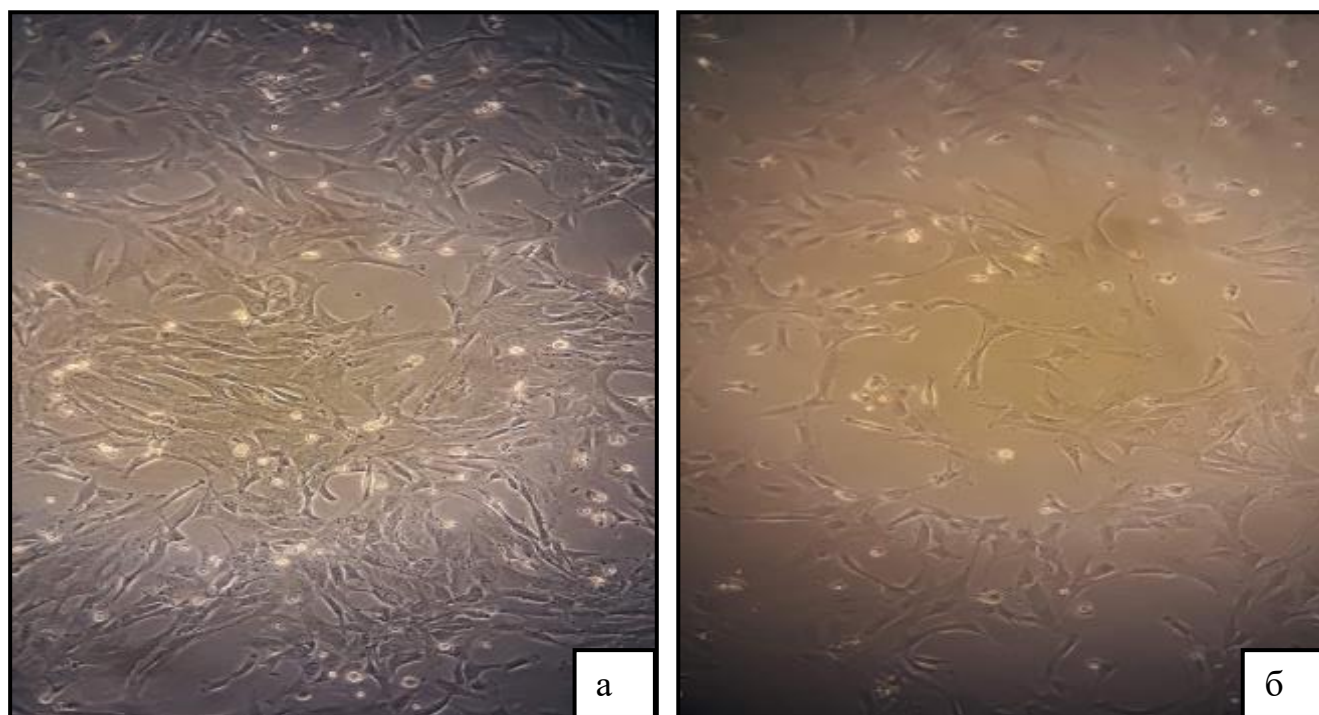


Рис. 3.27. Мікрофотографії культур стовбурових клітин кісткового мозку за впливу rhGH: а) 10 нг/мл; б) контроль. Нативні препарати. Зб. $\times 100$

Biolaminin 521 (LN521) проявляв позитивний вплив на всі досліджувані культури клітин. Так, індекс проліферації КСККМ та КСКЖТ зріс у 1,3 рази, КСКМ – у 1,7 рази порівняно з контролем (табл.3.13).

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

Культура клітин	LN521	Контроль
	Індекс проліферації	
КСКМ	$1,88 \pm 0,05^{***}$	$1,44 \pm 0,05$
КСКЖТ	$2,35 \pm 0,12^*$	$1,85 \pm 0,11$
КСКМ	$3,07 \pm 0,08^{***}$	$1,81 \pm 0,10$

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно з контролем

Варто зазначити, що за використання LN521 відмічали швидке прикріплення клітин до культурального пластику та сильне їх розпластування. Окрім того, при дослідженні LN521, моношар утворювався найшвидше (рис. 3.28).

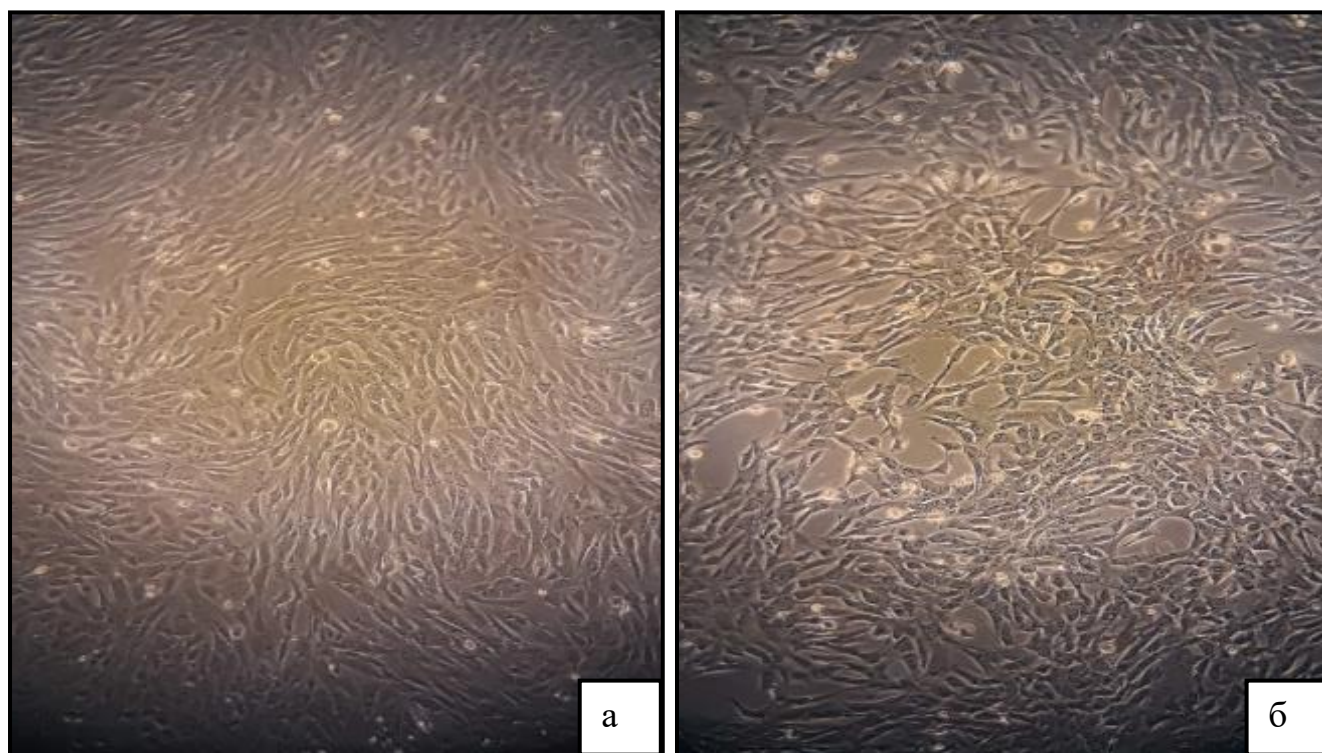


Рис. 3.28. Мікрофотографії культур стовбурових клітин міокарда за впливу LN521: а) за додавання LN521; б) контроль. Нативні препарати. Зб.: $\times 100$

Для подальшого використання стовбурових клітин у клінічній практиці необхідно підтвердження її генетичної стабільності (табл. 3.14, 3.15).

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

Культура клітин	IGF-1		FGF-2	Контроль
	10 нг/мл	50 нг/мл	10 нг/мл	
	Нормальний каріотип, %			
КСККМ	80,0±1,3	-	81,3±0,9	79,3±0,9
КСКЖТ	-	86,0±1,3	86,7±0,9	88,7±0,8
КСКМ	89,3±2,2	-	88,7±0,9	90±1,3

Оскільки прискорення проліферації може призвести до збільшення кількості клітин зі зміненим каріотипом у культурі, нами було вирішено додатково провести цитогенетичний аналіз (рис. 3.29) досліджуваних культур з найвищим індексом проліферації.

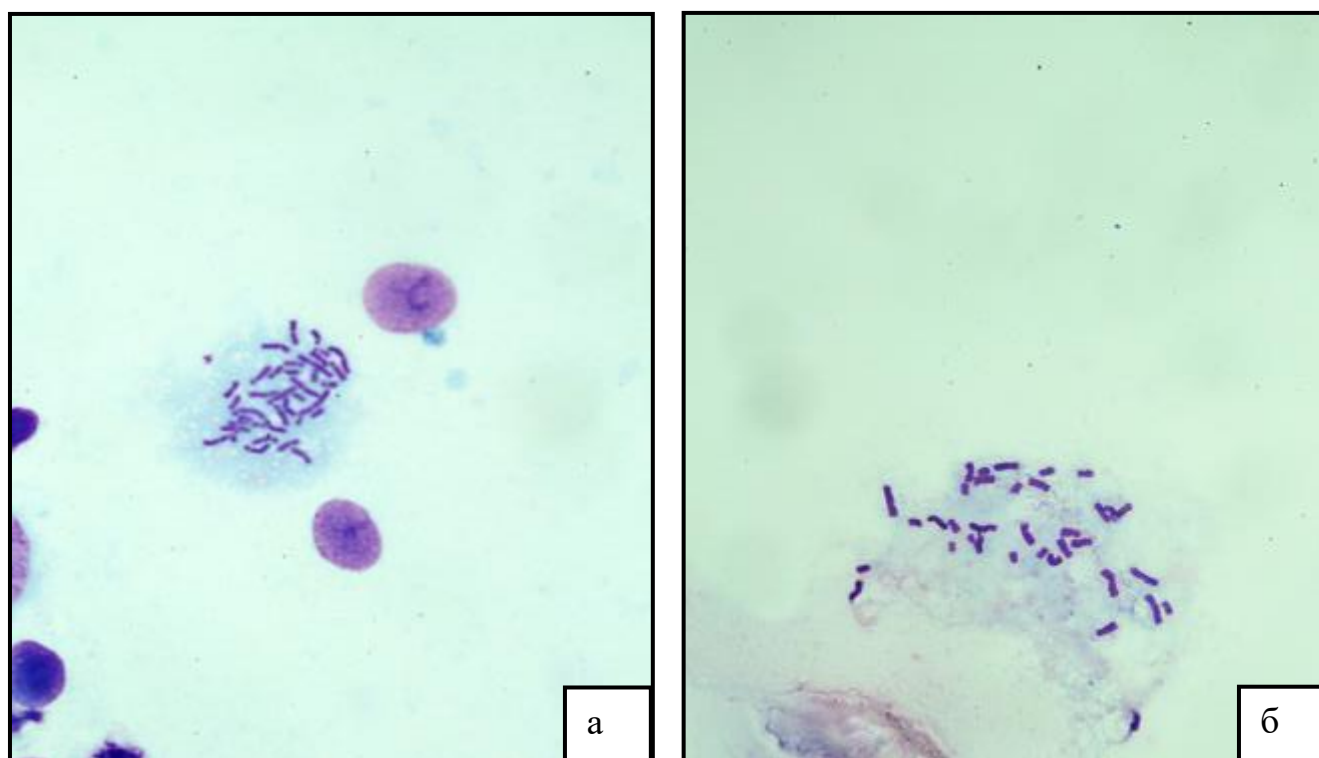


Рис. 3.29. Мікрофотографії метафазних пластинок клітин кота: а) нормальний каріотип, $n=38$; б) анеуплоїдія, $n=35$. Фарбування «Лейкодіф 200». 36.: $\times 1000$

**Результати цитогенетичного аналізу культур клітин kota за впливу
rhGH та LN521, $M \pm m$, $n=3$**

Культура клітин	rhGH, 10 нг/мл	LN521	Контроль
	Нормальний каріотип, %		
КСККМ	78,7 \pm 0,9	83,3 \pm 0,9*	79,3 \pm 0,9
КСКЖТ	86,7 \pm 0,9	92,0 \pm 1,3	88,7 \pm 0,8
КСКМ	88,7 \pm 1,8	94,0 \pm 0*	90,0 \pm 1,3

Примітка: * $p < 0,05$ порівняно з контролем

За даними цитогенетичного аналізу додавання гормону росту у культуральне середовище не призводить до достовірного збільшення кількості клітин зі зміненим каріотипом (у порівнянні з контролем) у всіх досліджуваних культурах. Водночас, як застосування LN521 призводить до достовірного зниження кількості генетичних помилок у досліджуваних культурах, що ще раз підтверджує властивості Biolaminin 521 LN і для культур клітин kota, заявлені виробником для культур клітин людини.

Аналізуючи отримані дані, можна зробити висновок, що стимулятори росту мають суттєвий вплив на проліферативну активність стовбурових клітин у культурі та не призводить до достовірного збільшення кількості клітин зі зміненим каріотипом (у порівнянні з контролем). Результати цього підрозділу були опубліковані у роботі [20, 25].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Загальновідомо, що для використання клітинних технологій у клінічній практиці необхідна значна кількість клітинного матеріалу для трансплантації, що можна досягти шляхом культивування його в системі *in vitro*. Однак, у процесі поділу поза організмом клітини зазнають змін, що призводять до сповільнення мітозу, старіння чи іморталізації. Зважаючи на це, виникає необхідність у дослідженні фенотипових та генетичних змін, які виникають у культурах клітин у процесі культивування в системі *in vitro*.

При оцінці морфології культур стовбурових клітин, отриманих з міокарда щура, ми відмічали певні особливості.

Первинна культура, отримана з міокарда щура, характеризується гетерогенністю. Дані результати можна пояснити різноманітністю клітинного пулу в матеріалі, з якого отримували КСКМ. Так, за даними Urbanek K. та ін. [287] та Oh H. та ін. [213] у серцевому м'язі міститься три популяції проліферуючих клітин: стовбурові клітини, які розміщуються безпосередньо у міокарді, а також ендотеліальні клітини та клітини-попередниці гладкої м'язової тканини, що організовано розташовані у коронарних судинах.

У процесі субкультивування культура стовбурових клітин, що була отримані з міокарда щура, візуально ставала більш гомогенною за рахунок фібробластоподібних клітин, що є результатом їх високої проліферативної активності. У той час як клітини епітеліоподібної морфології були менш мітотично активні.

Наступним завданням дисертаційної роботи було вивчення фенотипу стовбурових клітин міокарда щура на ранніх пасажах (з I до IV) за стандартних умов культивування.

Приймаючи до уваги обмеженість комерційних моноклональних антитіл до відповідних мембранних маркерів клітин тварин, у дослідженнях ми

використовували відповідні людські або мишачі моноклональні антитіла, які здатні перехресно реагувати з відповідними антигенами (перехресна реактивність).

Перехресна реактивність виникає у випадку, коли антитіло, направлене проти одного конкретного антигена, успішно зв'язується з іншим антигенами, у зв'язку з наявністю в останньому структурно гомологічних протеїнів [167]. Зважаючи на вищесказане, взаємодія антитіл проти людських антигенів можлива з ідентичними антигенами тварин (міжвидова перехрестна реактивність) [182].

При дослідженні експресії мембранних маркерів та тропоніну I, що засноване на властивостях перехресної реактивності, ми відмічали зміни у ступені їх прояву.

Так, ми відмічали, що рівень експресії CD10 (нейтральна пептидаза 24.11 або NEP) на стовбурових клітинах міокарда щура у процесі культивування знижувався, від високого до помірного рівня. Варто відмітити, що в КСККМ щура, що піддавалася направленій диференціації у кардіоміогенному напрямку експресія даного маркера зростала до помірного рівня (рис. 4.1).

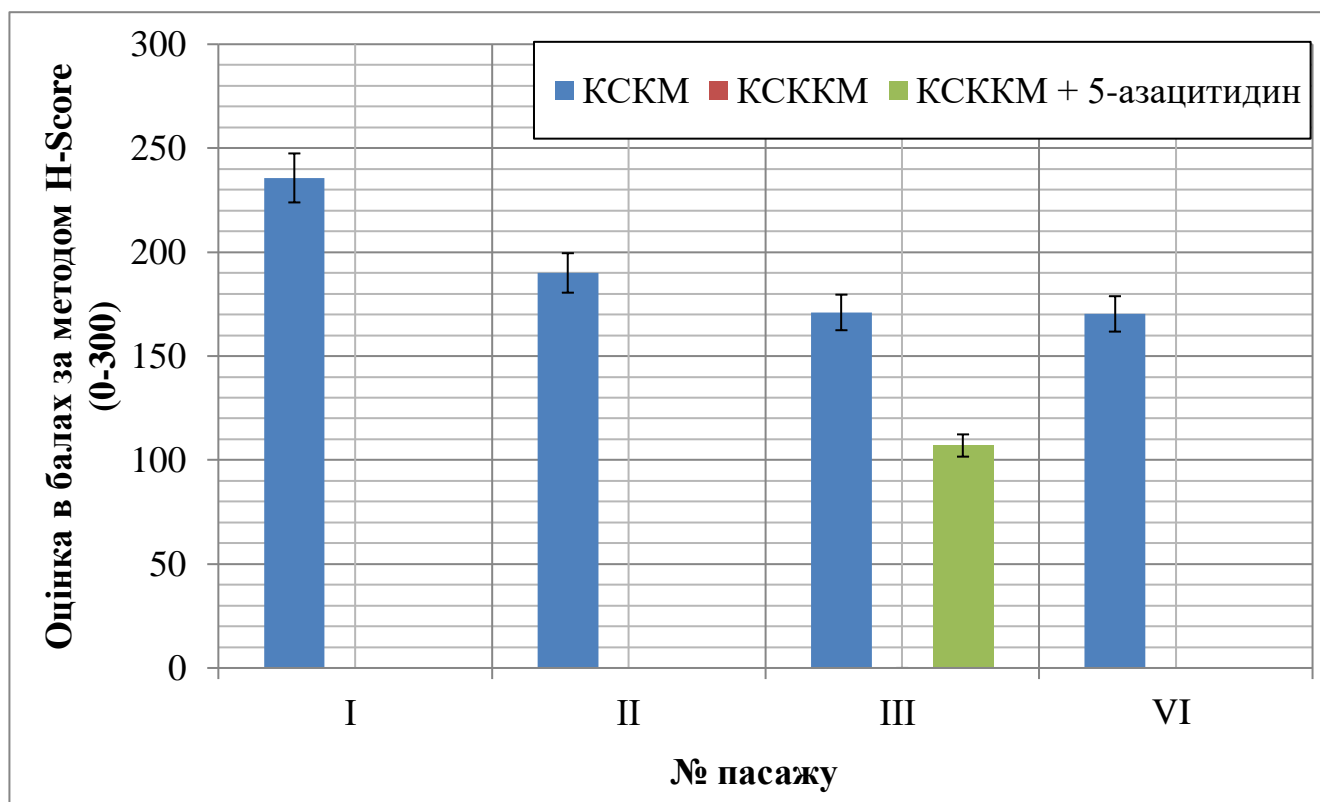


Рис. 4.1. Експресія CD10 у популяціях стовбурових клітин щура ($M \pm m$, $n=3$)

NEP виконує різноманітні функції, які залежать від типу клітин. Broccolini A. та ін. [79] вказують, що CD10 прямо або опосередковано через інсуліноподібний

фактор росту I може відігравати важливу роль у диференціації м'язових клітин. У Разом з тим, Fielitz J. та ін. [113] вказують на здатність NEP деградувати брадикінін і натрійуретичні пептиди у серцевому м'язі. Тому виявлення експресії CD10 на клітинах досліджуваних культур є прогнозованим. Крім того наявність CD10 на клітинах міокарда щурів підтверджується дослідженнями Piedimonte G. та ін. [222].

Експресія CD34 на клітинах культури, отриманій з міокарда щура, також змінювалася з пасажами. Її рівень зростає від «відсутності експресії» до помірного. Зростання ступеня прояву CD34 до помірного рівня відмічали і в культурі стовбурових клітин червоного кісткового мозку, що була оброблена 5-азицитидином (рис. 4.2).

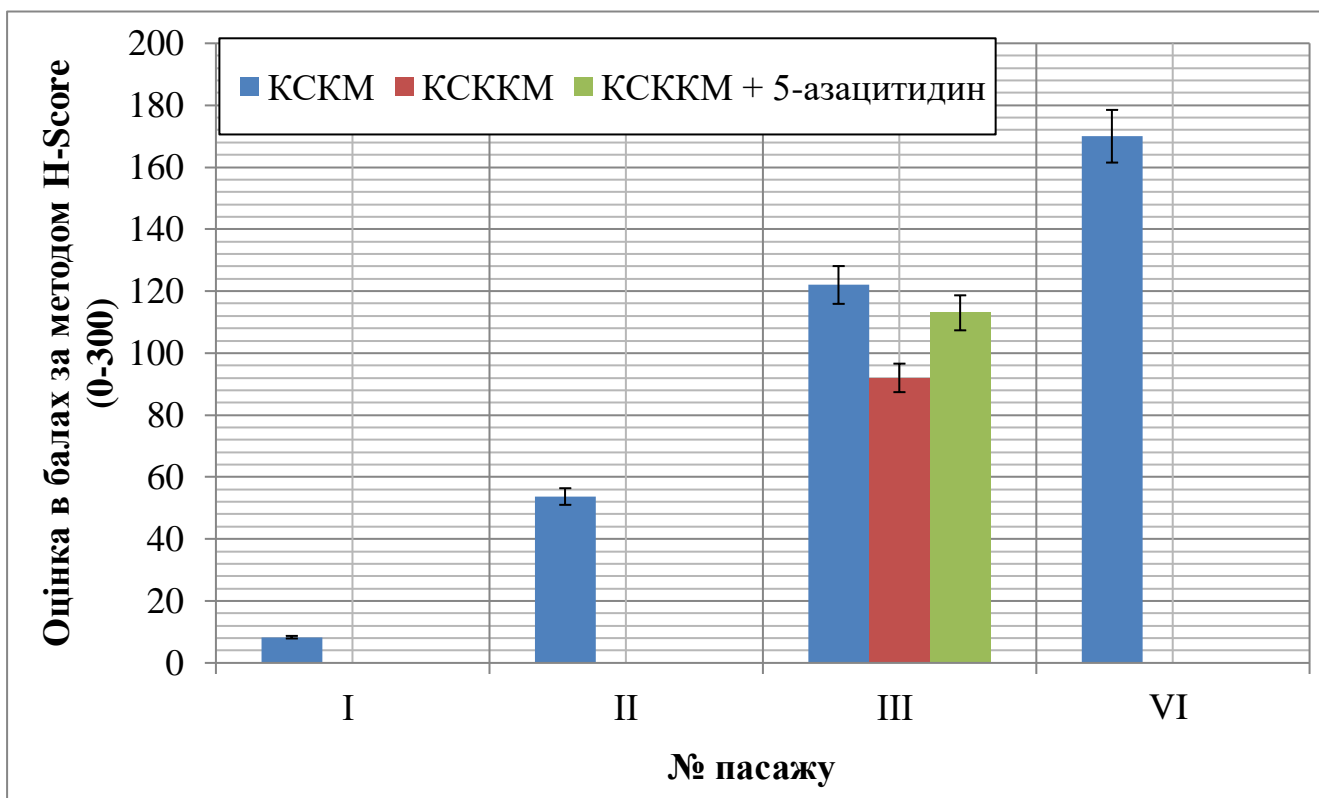


Рис. 4.2. Експресія CD34 у популяціях стовбурових клітин щура ($M \pm m$, $n=3$)

CD34 є маркером, який виявляється на більшості клітин-попередниць [263]. Хоча його функція до цього часу не визначена, відомо, що клітини, які експресують CD34, володіють високою здатністю до формування колоній і довготривалою проліферативною активністю [232, 293, 101]. Однак існують суперечливі дані щодо експресії даного маркера у культурі клітин, отриманій із міокарда. Darryl R. та ін.

[101] пояснюють наявність експресії даного маркера у первинній культурі, отриманій з міокарда, присутністю ендотеліальних клітин, які є CD34-позитивними. Вони стверджують, що клітини-попередниці серцевого м'яза CD34-негативні. У свою чергу, Zhou Q. та ін. [315] вказують, що у первинній культурі міокарда містяться телоцити (тип інтерстиціальних клітин, які характеризуються маленьким тілом з декількома довгими відростками – телоподіями), які експресують даний маркер та здатні до поділу [315, 313].

Експресія CD38 залишалася у межах рівня «відсутність експресії», тоді як обробка КСКМ 5-азацитидином призвела до підвищення його прояву у межах низького рівня (рис. 4.3).

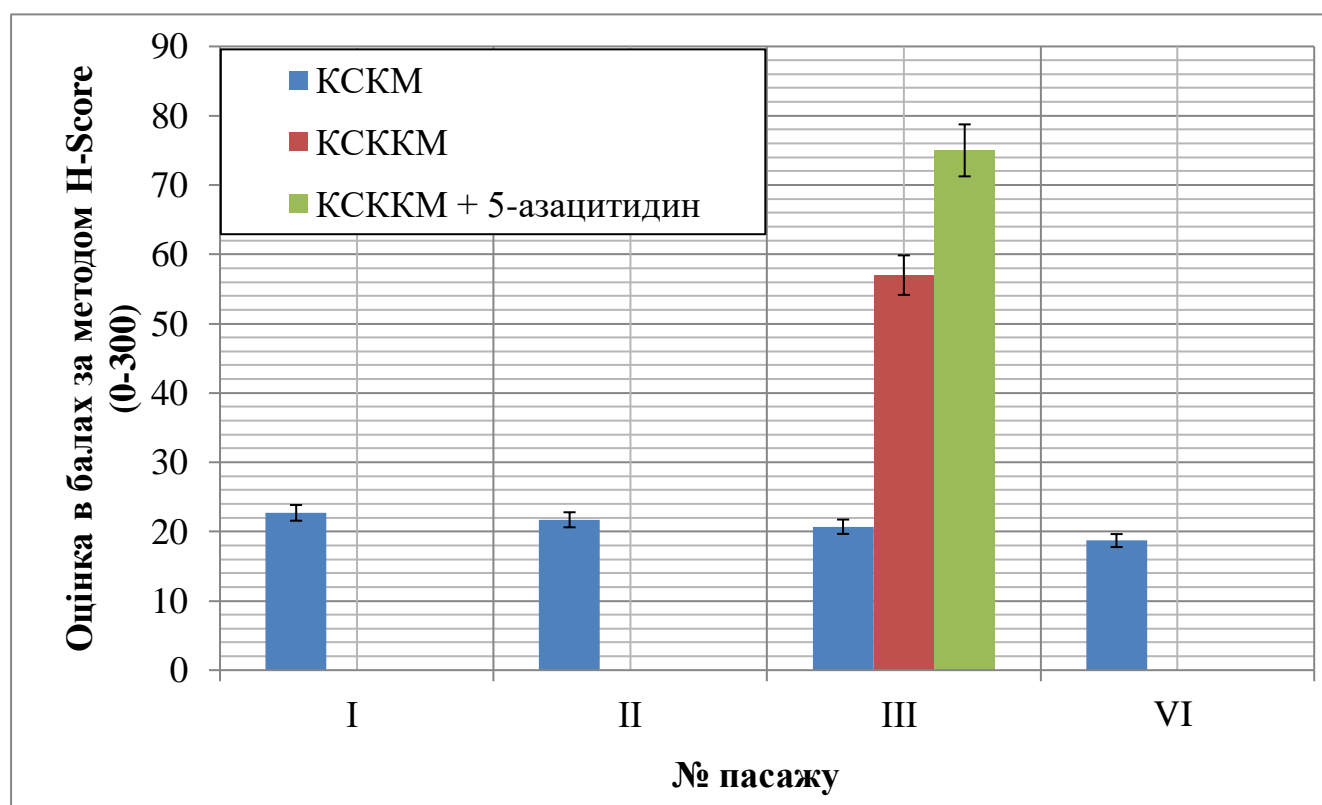


Рис. 4.3. Експресія CD38 у популяціях стовбурових клітин щура ($M \pm m$, $n=3$)

У серці CD38 виконує роль регулятора клітинного NAD(P)(H) проте він активується лише за окиснювального стресу (що характерне для ішемії) [291, 73]. Варто відмітити, що експресія даного маркера відрізняється у різних типів клітин серця. Так, за даними Boslett J. та ін. [73] ендотеліальні клітини серця характеризуються високим ступенем експресії CD38, фібробласти – низьким, а у кардіоміоцитах його виявляють лише у вигляді слідів.

Експресія CD45 на стовбурових клітинах, отриманих з міокарда щура, також характеризувалася рівнем «відсутність експресії» упродовж всього дослідження. Тоді як спрямована диференціація КСККМ щура у кардіоміогенному напрямку призвела до зниження експресії даного маркера з низького до вище зазначеного рівня (рис. 4.4).

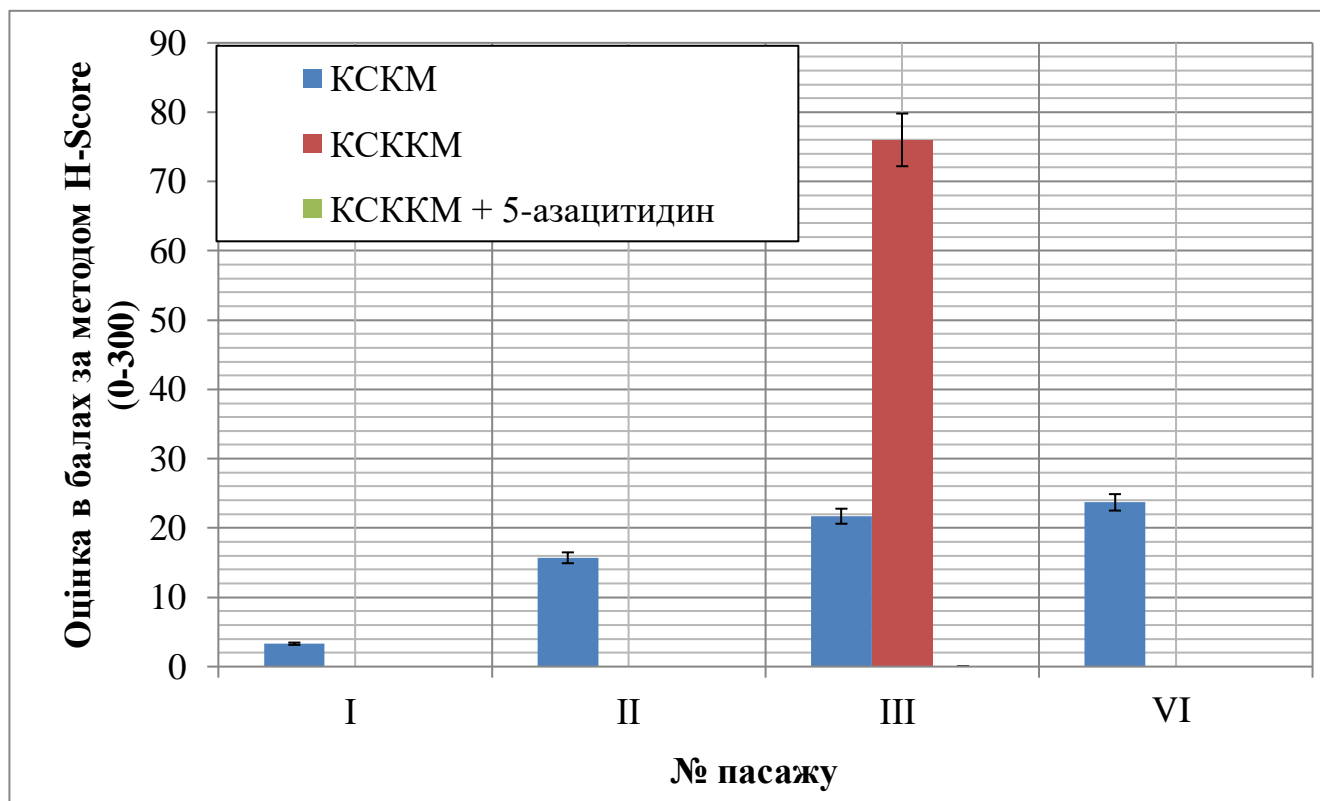


Рис. 4.4. Експресія CD45 у популяціях стовбурових клітин щура ($M \pm m$, $n=3$)

На сьогоднішній день достеменно невідома роль CD45 у життєдіяльності стовбурових клітин [260]. Однак існують дані про інгубуючий вплив даного маркера на диференціацію та проліферацію клітин, шляхом дії на сигнальний шлях JAK/STAT [148]. Варто зазначити, що дані щодо експресії CD45 клітинами серця теж неоднозначні. Так, за даними Sandstedt J. та ін. [250] у серцевому м'язі міститься популяція як CD45-позитивних, так і CD45-негативних клітин. Варто зазначити, що CD45⁻ клітини вони характеризували як ендотеліальні клітини-попередниці, тоді як CD45⁺ клітини відносили до тучних клітин. У своїх подальших дослідженнях [249], вчені вказують на присутність у серцевому м'язі CD45-негативних стовбурових клітин, які дотатково експресують кардіальні маркери.

Експресію CD48 на стовбурових клітинах, отриманих з міокарда щура, не відмічали упродовж всього періоду культивування. Разом з тим, у культурі клітин, що піддавалася впливу 5-азацитидину, його рівень відповідав такому контрольної групи (рис. 4.5).

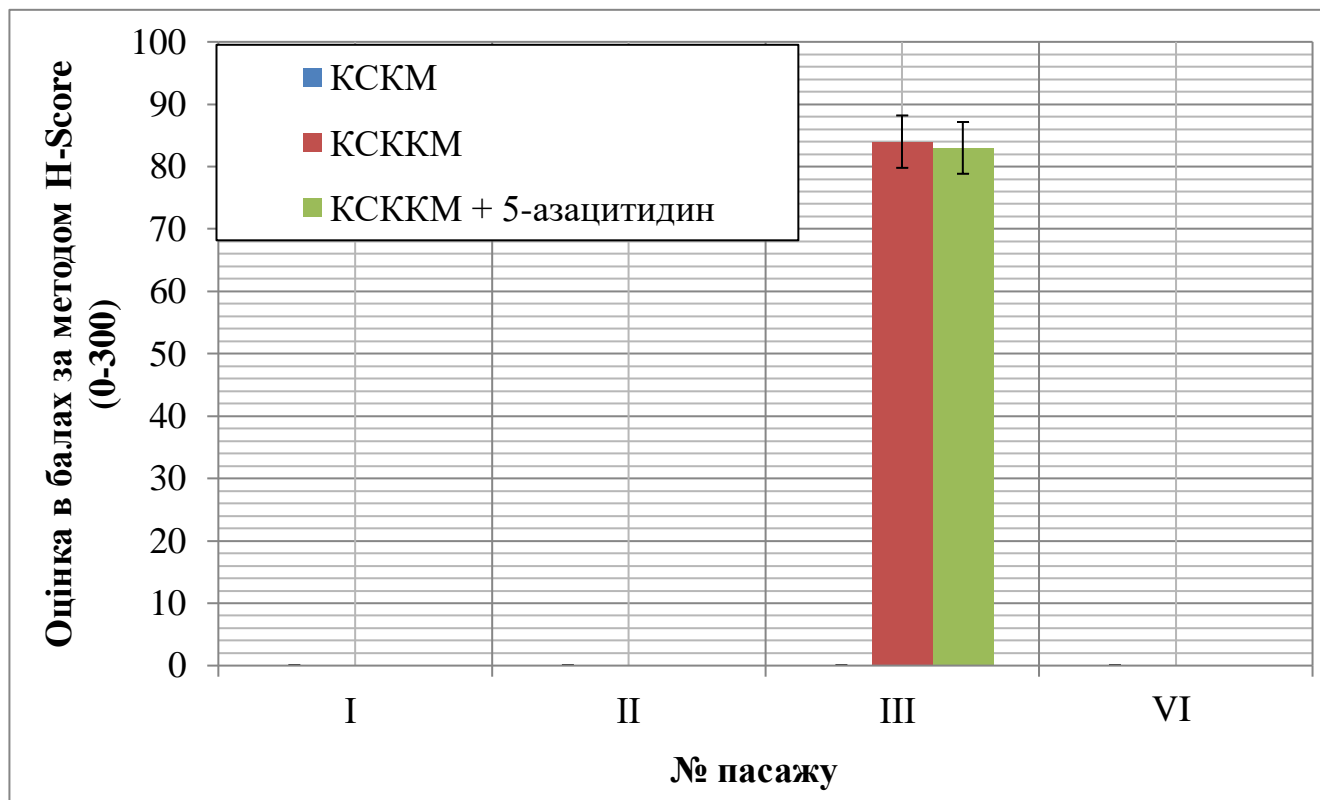


Рис. 4.5. Експресія CD48 у популяціях стовбурових клітин щура ($M \pm m$, $n=3$)

CD48 виконує імунорегуляторну функцію та є маркером гемопоетичних клітин [189], чим можна пояснити його відсутність у культурі стовбурових клітин отриманих з міокарда щура.

Експресію CD54 (ICAM-1) у культурах не виявляли протягом всього часу дослідження. Конститутивно ICAM-1 розміщується на ендотеліальних клітинах, проте його експресія підвищується при дії запальних цитокінів [171], адже він приймає участь у зміні проникності стінки судин при запаленні [119]. На кардіоміоцитах експресію CD54 відмічають за гострого інфаркту міокарда [209, 66]. Відсутність експресії даного маркера у досліджуваних культурах можна пояснити відсутністю умов для запальної реакції при культивуванні клітин в системі *in vitro*.

Також не відмічали і експресії CD56 (NCAM) у культурах упродовж всього часу дослідження. CD56 опосередковує клітинну адгезію і сигналізацію в нервовій системі [116]. Проте, варто відмітити, що за даними Naga K. та ін. [203] NCAM виступає, як кардіопротекторний фактор, що проявляється в кардіоміоцитах при метаболічному стресі. Вчені стверджують, що експресія CD56 сильно виражена в залишкових серцевих міоцитах в області інфаркту. Відсутність прояву CD56 у досліджуваних культурах можна пояснити відсутністю метаболічного стресу для клітин в представлених умовах культивування в системі *in vitro*.

Рівень експресії CD66e (CEACAM5, CEA) на клітинах культури отриманій з міокарда щура, у процесі культивування збільшувалася від помірного до високого (рис. 4.6.).

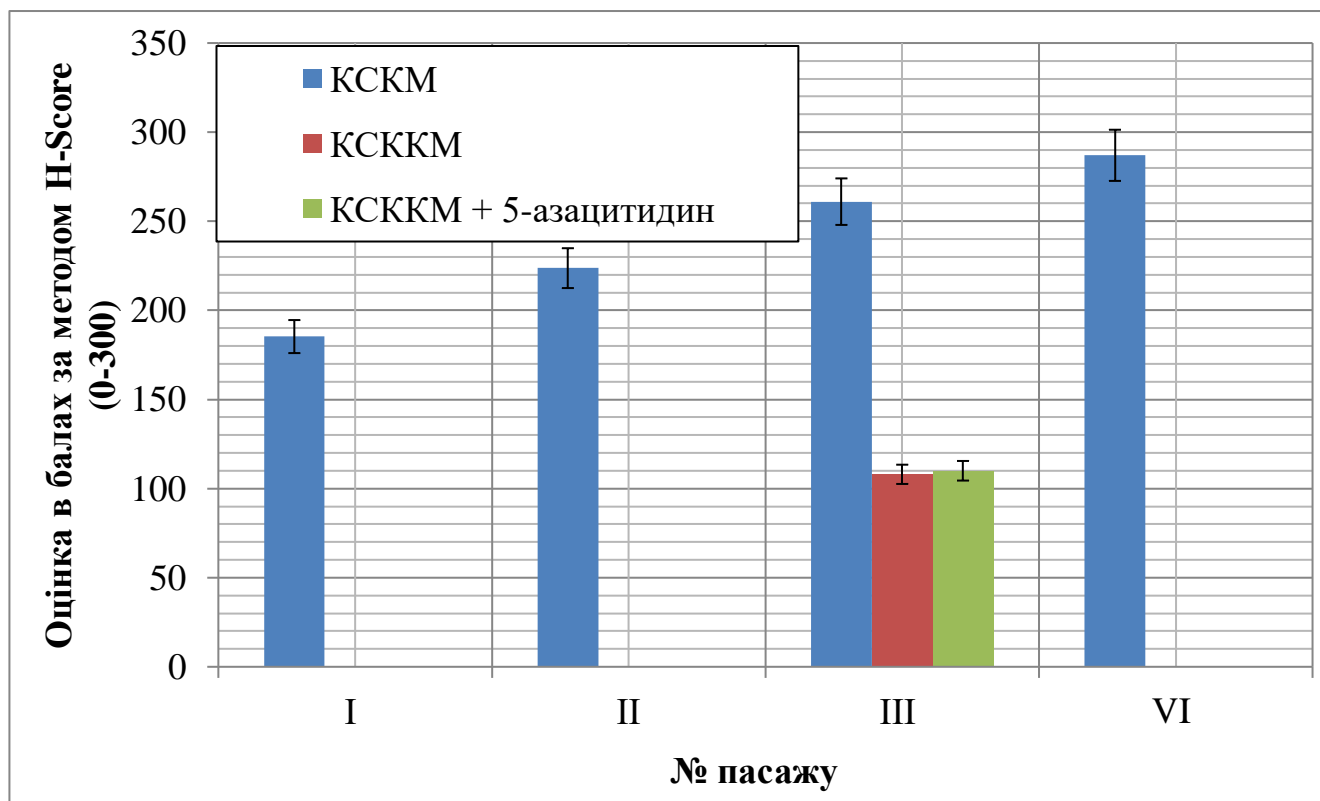


Рис. 4.6. Експресія CD66e у популяціях стовбурових клітин щура ($M \pm m$, $n=3$)

Варто відмітити, що CEA володіє різноманітними функціями в системі *in vitro*, які включають клітинну адгезію, виконує допоміжну роль при зв'язуванні колагену та у активізації екто-АТФаз [285].

Однак експресію даного маркера в зразках отриманих зі здорових зразків серця, зазвичай не відмічають [84]. Саме тому виявлений нами високий рівень

експресії CD66e на клітинах культури, отриманій з міокарда щура, вказує на необхідність подальшого вивчення функцій даного маркера.

Рівень експресії CD95 (Fas) на клітинах культури, отриманій з міокарда щура, знижувався у межах помірного рівня, тоді як ступінь прояву даного маркера у КСККМ щура за дії 5-азацитидину збільшувався у межах вказаного рівня (рис. 4.7.).

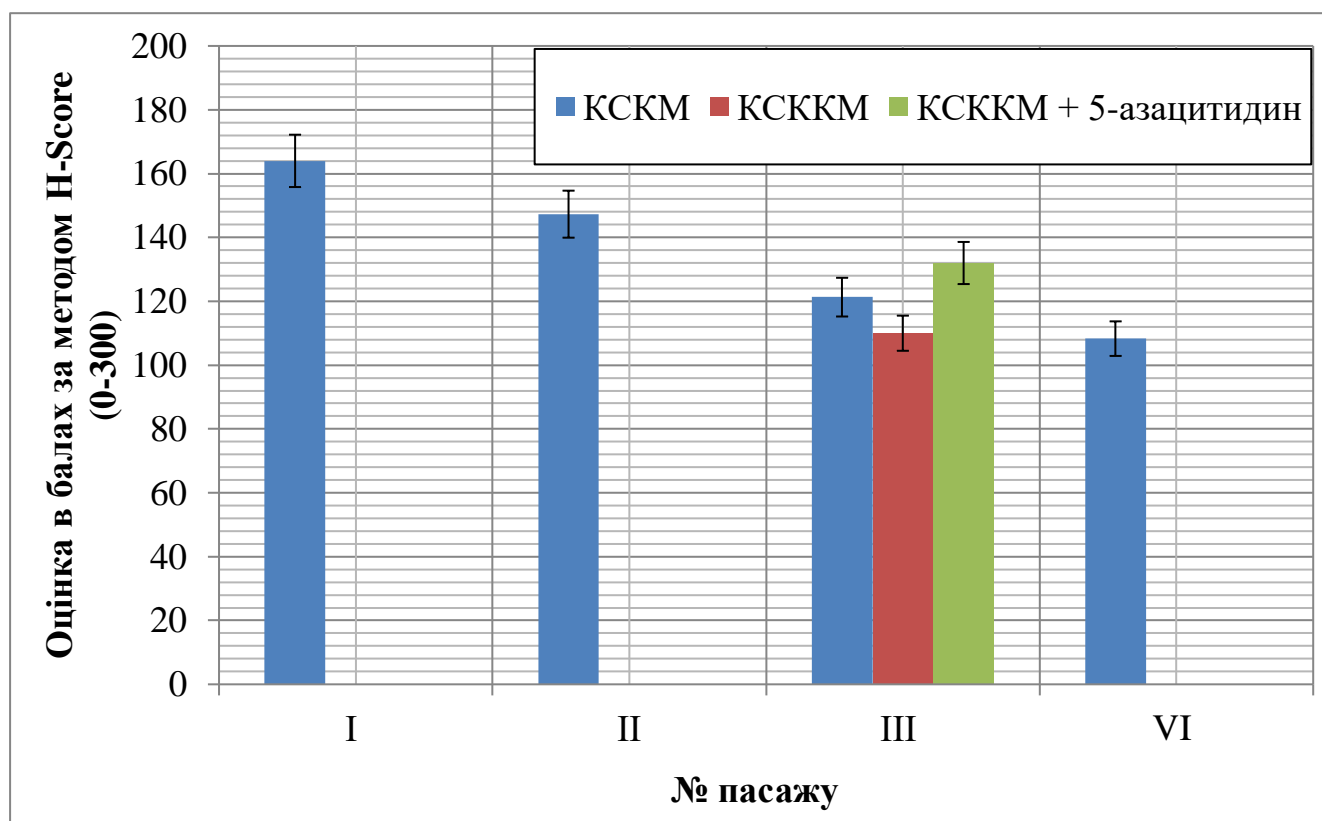


Рис. 4.7. Експресія CD95 у популяціях стовбурових клітин щура ($M \pm m$, $n=3$)

За даними Wollert K. C. та ін. [304] Fas конститутивно експресується в міокарді та кардіоміоцитах, а ступінь його прояву напряму залежить від умов навантаження в системі *in vivo*, тобто підвищенні рівня CD95 не провокує у даних клітинах каскаду реакцій, що призводять до апоптозу. Отже, експресія даного маркера у досліджуваних культурах може бути пояснена як наявністю у ній попередників кардіоміоцитів, так і присутністю клітин у стані апоптозу.

Експресія CD227 (MUC1) у досліджуваних культурах коливалася у межах рівня «відсутність експресії». Варто зазначити, що дія 5-азицитидину на КСККМ призвела до зникнення на клітинах експресії вказаного маркера (рис. 4.8).

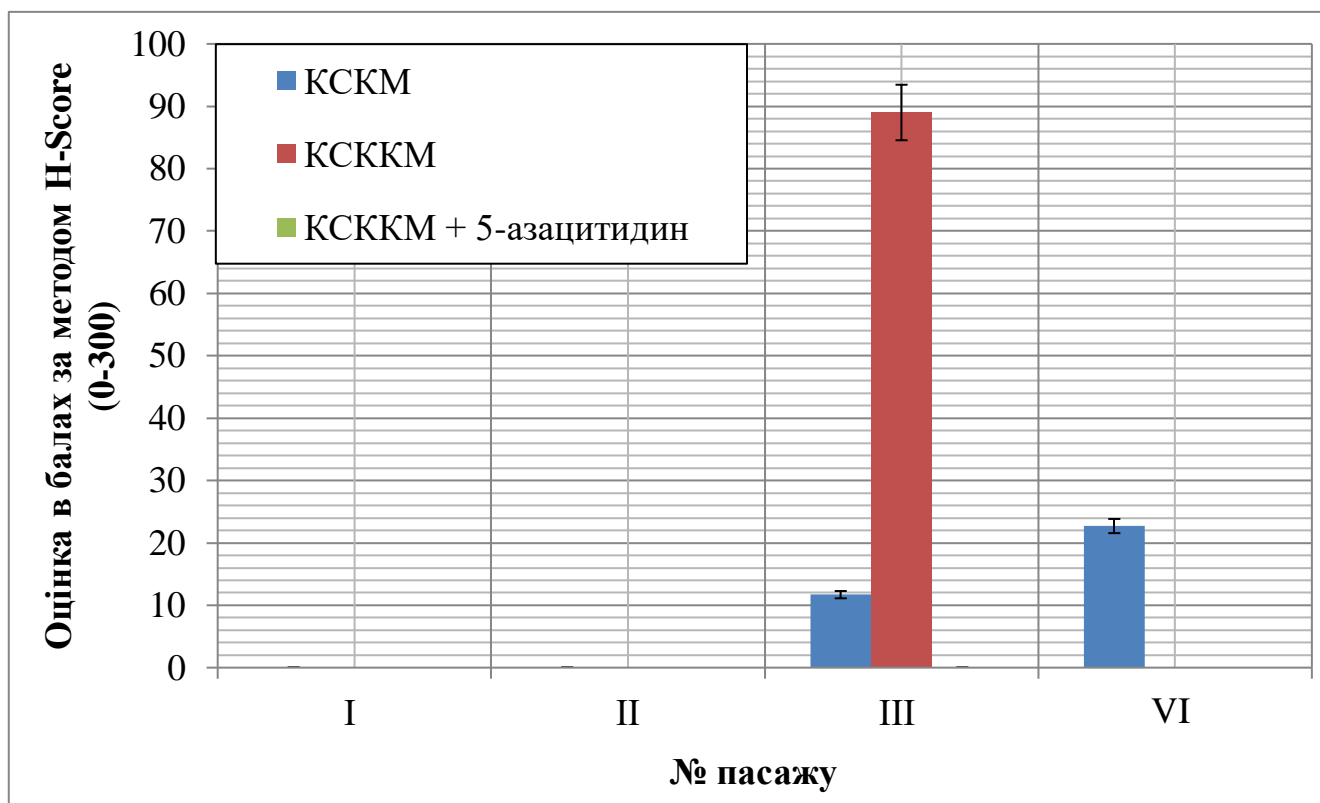


Рис. 4.8. Експресії CD227 у популяціях стовбурових клітин щура ($M \pm m$, $n=3$)

MUC1 найчастіше виявляють на епітеліальних та пухлинних клітинах. Він здатний взаємодіяти з рецепторами фактора росту [254] та інгібувати власний шлях апоптозу [233, 298]. Тим самим зберігаючи баланс між ростом і апоптозом. Варто відмітити, що за даними Thie H. та ін. [284] експресію CD227 не виявляють на клітинах здорового серця, що узгоджується з даними, отриманими нами.

Рівень експресії CD326 (ErCAM) на клітинах, отриманих з міокарда щура, зростав від «відсутності експресії» до низького. У той час як дія 5-азицитидину на культуру стовбурових клітин червоного кісткового мозку щура призводила до протилежного ефекту (рис. 4.9).

CD326 відіграє важливу роль у міжклітинній взаємодії [144]. Також відомо, що даний маркер бере участь у підтриманні ознак «стовбуровості» соматичними клітинами [177, 215]. Sarrach S. та ін. [252], у свою чергу, стверджують, що високий рівень експресії ErCAM характерний для проліферуючих клітин, а для диференційованих – низький.

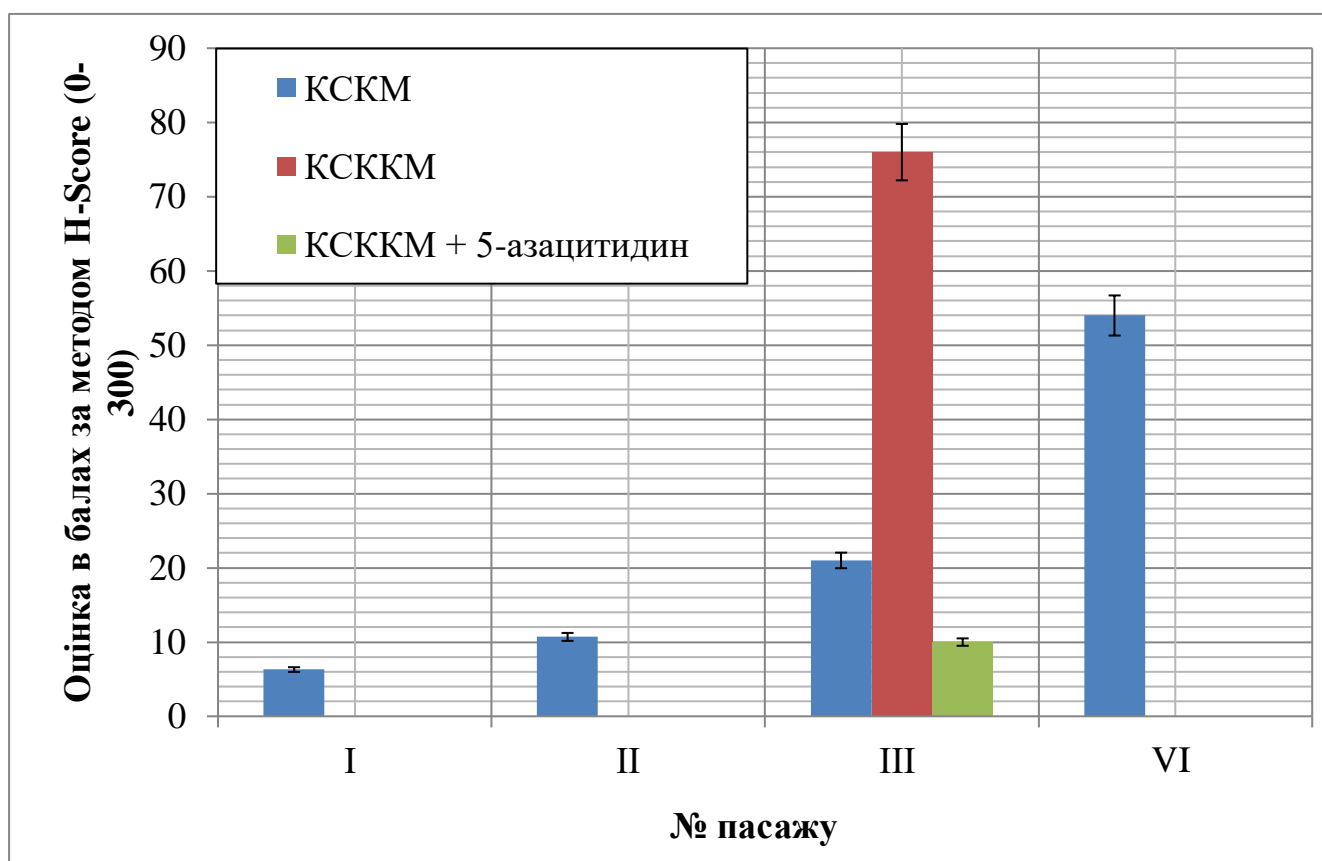


Рис. 4.9. Експресія CD326 у популяціях стовбурових клітин щура ($M \pm m$, $n=3$)

Наведеними вище даними можна пояснити збільшення даного маркера у KCKM у процесі культивування за рахунок збільшення кількості клітин у стані поділу. У той час, за дії на KCKKM 5-азацитидину відмічали зниження експресії CD326, що свідчить про диференціацію клітин.

Експресія пан-кератину (панцитокератину) на клітинах, отриманих з міокарда щура, зростала у межах рівня «відсутність експресії», у той час, як вплив 5-азицитидину на KCKKM призводив до зниження його експресії (рис. 4.10).

Цитокератини є групою проміжних філаментів, що виявляються в епітеліальних клітинах всіх типів, тому їх вважають специфічними маркерами для клітин епітеліальної лінії. Пан-кератин, у свою чергу, виявляють на клітинах на початковому етапі їх термінальної диференціації [218]. Разом з тим, у своїх дослідженнях в системі *in vitro*, так *in vivo* Gown A. M. та ін. [129] вказують на присутність цитокератинів у гладкій м'язовій тканині, а також серцевому м'язі.

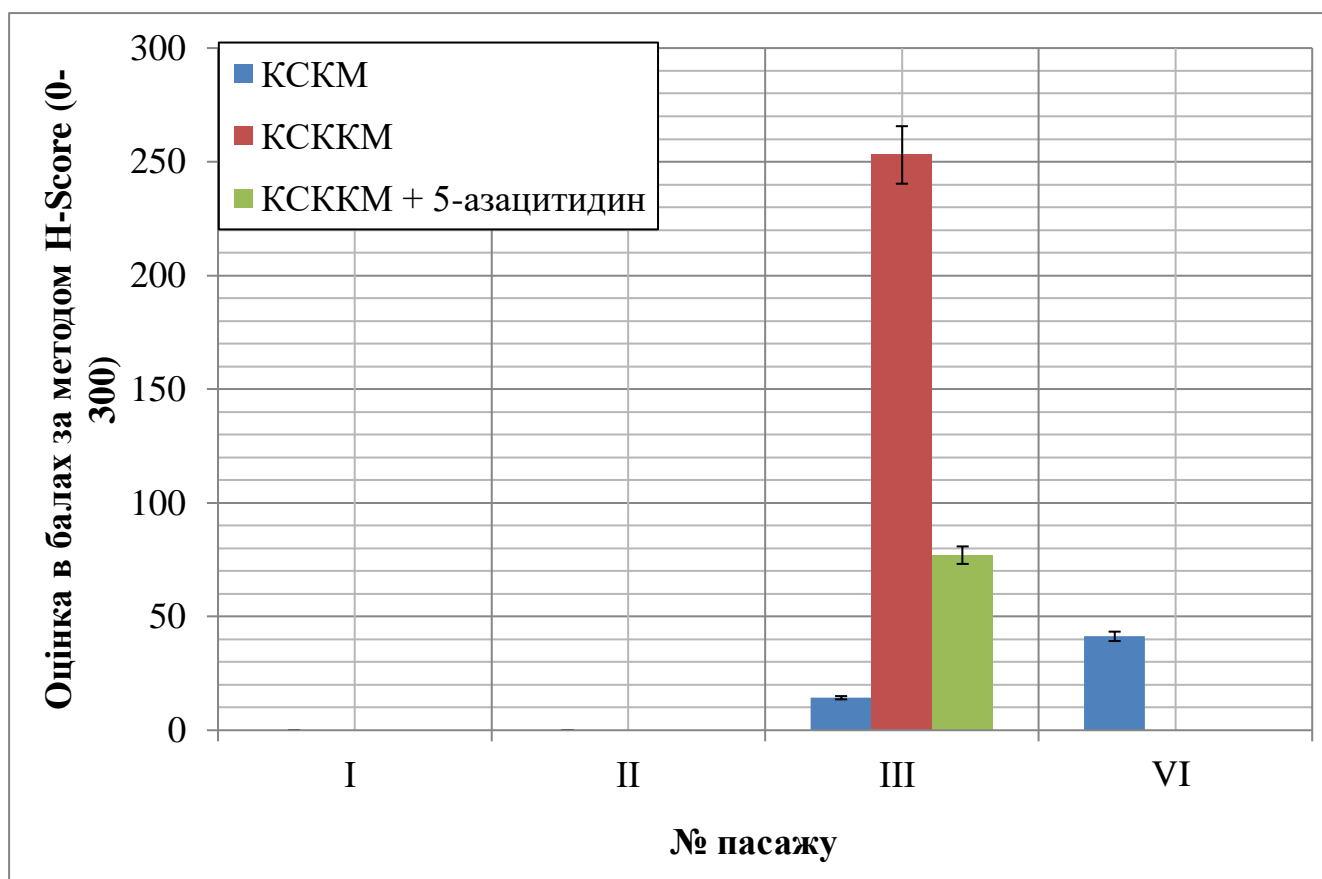


Рис. 4.10. Експресія пан-кератину у популяціях стовбурових клітин щура ($M \pm m$, $n=3$)

Поява експресії пан-кератину у КСКМ щура на III пасажі з подальшим її ростом можна пояснити появою у культурі диференційованих клітин. У той час, зниження рівня даного маркера на клітинах, що піддавалися впливу 5-азацитидину, свідчить про їх направлене диференціаціювання у кардіоміогенному напрямку.

Тропонін I або кардіотропонін I – це ізоформа тропоніну, який виявляється лише у серці і слугує маркером кардіоміоцитів [46]. Saito T. та ін. [246] і Wang H. S. та ін. [294] у своїх дослідженнях вказують на появу експресії даного маркера на стовбурових клітинах за направленого диференціювання у кардіоміогенному напрямку.

У процесі нашого дослідження ми відмічали зниження ступеню прояву тропоніну I на клітинах культури, отриманій з міокарда щура (рис. 4.11), що може свідчити про зниження з пасажами кількості клітин з характеристиками кардіоміоцитів.

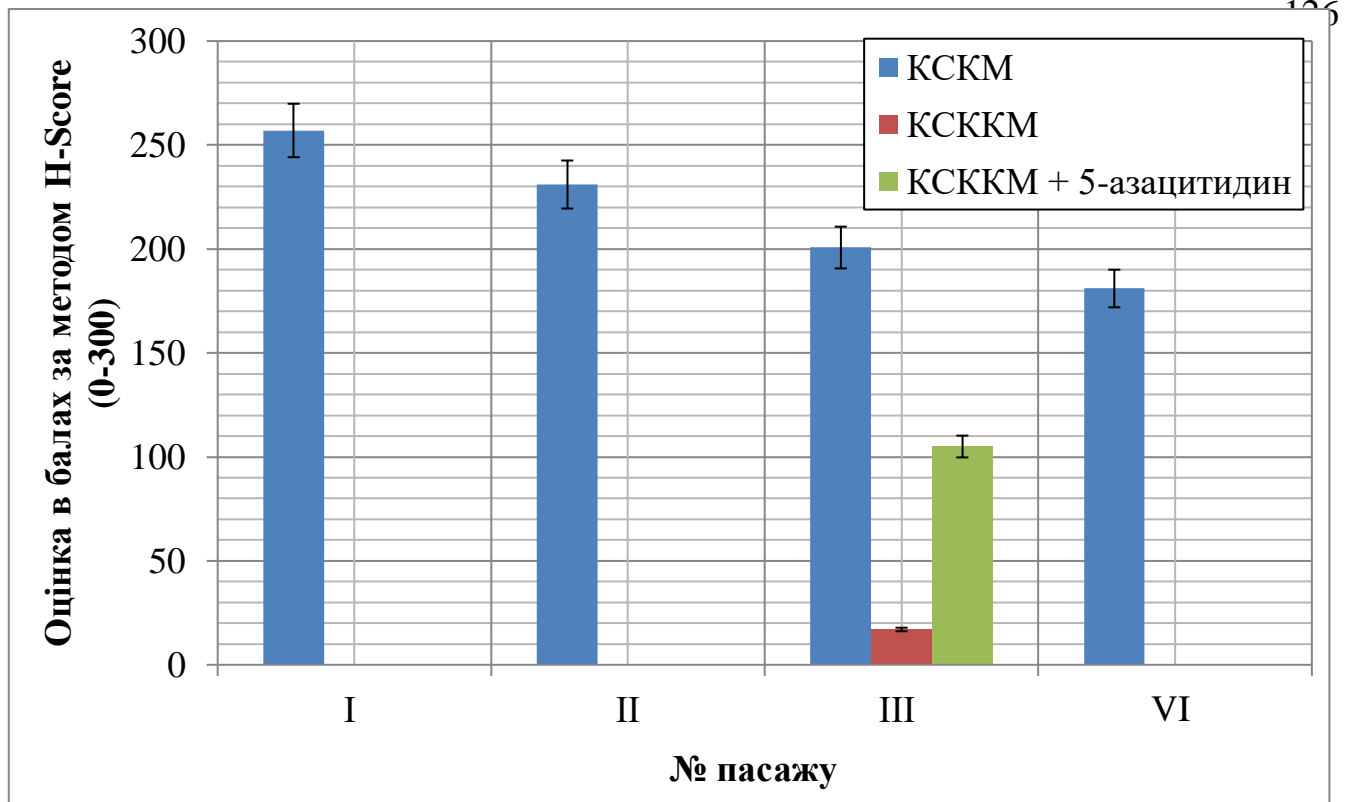


Рис. 4.11. Експресії тропоніну I у популяціях стовбурових клітин щура ($M \pm m$, $n=3$)

Разом з тим направлена диференціація КСККМ щура за використання 5-азацитидину призвела до достовірного підвищення рівня експресії тропоніну I (рис. 4.11), що збігається з даними, отриманими іншими науковцями.

Аналізуючи дані імунофенотипового профілю клітин, отриманих з міокарда щура, можна зробити висновок, що КСККМ неоднорідна за своїм клітинним складом, який додатково змінюється у процесі культивування. Так, на початку дослідження у культурі переважали 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 почали виявляти маркери, характерні для епітеліальних клітин: пан-кератин low , $CD326^+$, $CD227^{low}$; додатково відмічали підвищення експресії маркерів, що властиві комітованим клітинам: $CD34^+$, $CD45^{low}$. Отримані нами дані свідчать, про видалення з культури диференційованих клітин, що втратили здатність до поділу (кардіоміоцити), на фоні збільшення кількості їх попередниць та епітеліальних клітин.

Спрямоване диференціювання у кардіоміогенному напрямку призводить до набуття стовбуровими клітинами червоного кісткового мозку ознак, характерних для кардіоміоцитів.

Вивчення стабільності каріотипу клітин у культурі є важливою передумовою використання клітинного матеріалу для трансплантації, адже хромосомні мутації є важливою складовою канцерогенезу. Тому наступним етапом нашого дослідження було вивчення генетичної стабільності клітин у культурі у процесі культивування шляхом визначення відсоткового вмісту клітин з мікроядрами, анеуплоїдним та поліплоїдним наборами хромосом, двоядерних клітин та мітотичного індексу.

У процесі культивування КСКМ ми відмічали поступове відсоткове збільшення кількості клітин з анеуплоїдією (рис. 4.12). Проте їх кількість не перевищувала рівня спонтанного мутагенезу характерного для лімфоцитів ссавців (6–15 %) [29].

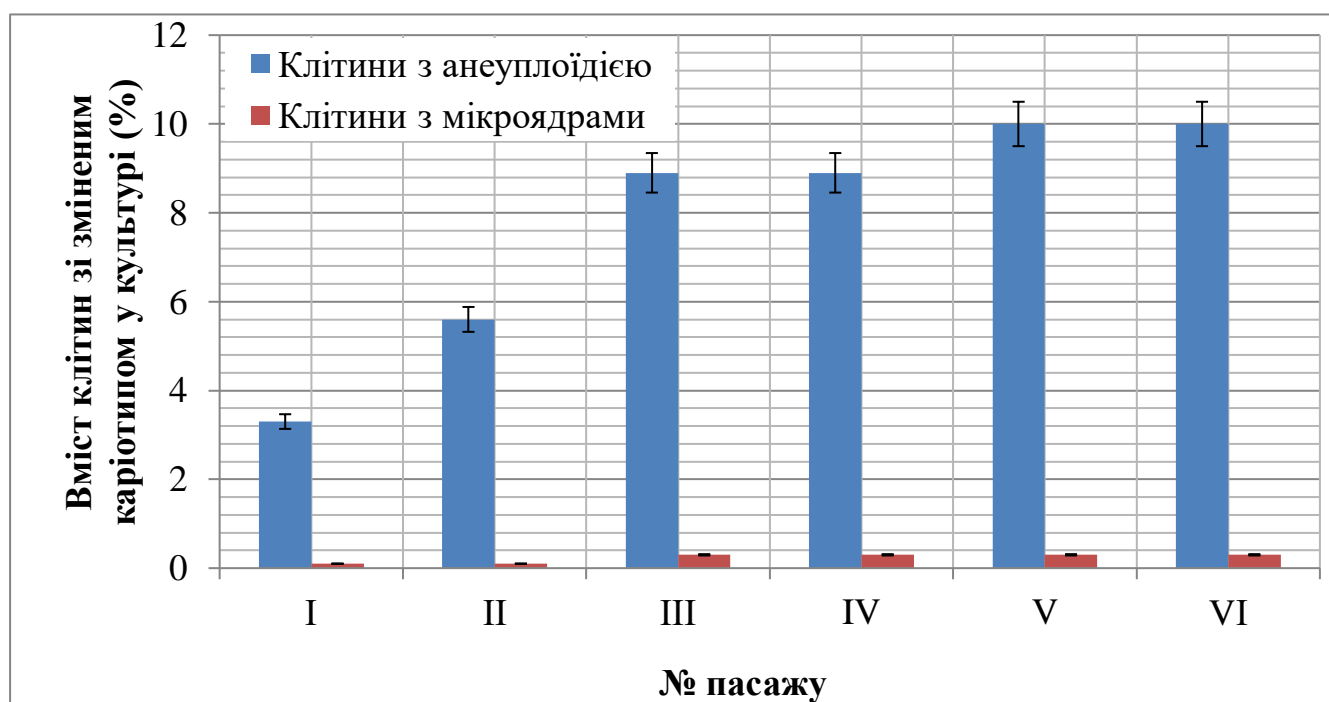


Рис. 4.12. Зміни відсотку клітини зі змінним каріотипом у культурі стовбурових клітин міокарда в процесі пасажування ($M \pm m$, $n=3$)

Відсотковий вміст анеуплоїдних клітин у культурі корелював з вмістом клітин з мікроядрами (рис. 4.12).

Виникнення анеуплоїдій як і мікроядер спричинене відставанням у розходженні до полюсів окремих ділянок хромосом в анафазі під час ділення ядра

[47]. Отримані дані можна пояснити «стресом», який відчувають клітини перенесення їх з організму в штучне середовище [145, 56]. Внаслідок цього у них можливе виникнення генетичних змін, які накопичуються у процесі культивування. Разом з тим, Немцова Л. С. [31] стверджує, що хоча у процесі інтенсивного ділення відсоток клітини з анеуплоїдією у культурі підвищується (наприклад, у кістковому мозку рівень анеуплоїдій становить 25–35 %), це вважається нормою. Відсотковий вміст клітин у культурі з поліплоїдією зменшувався з пасажами, що корелювало з показниками мітотичного індексу

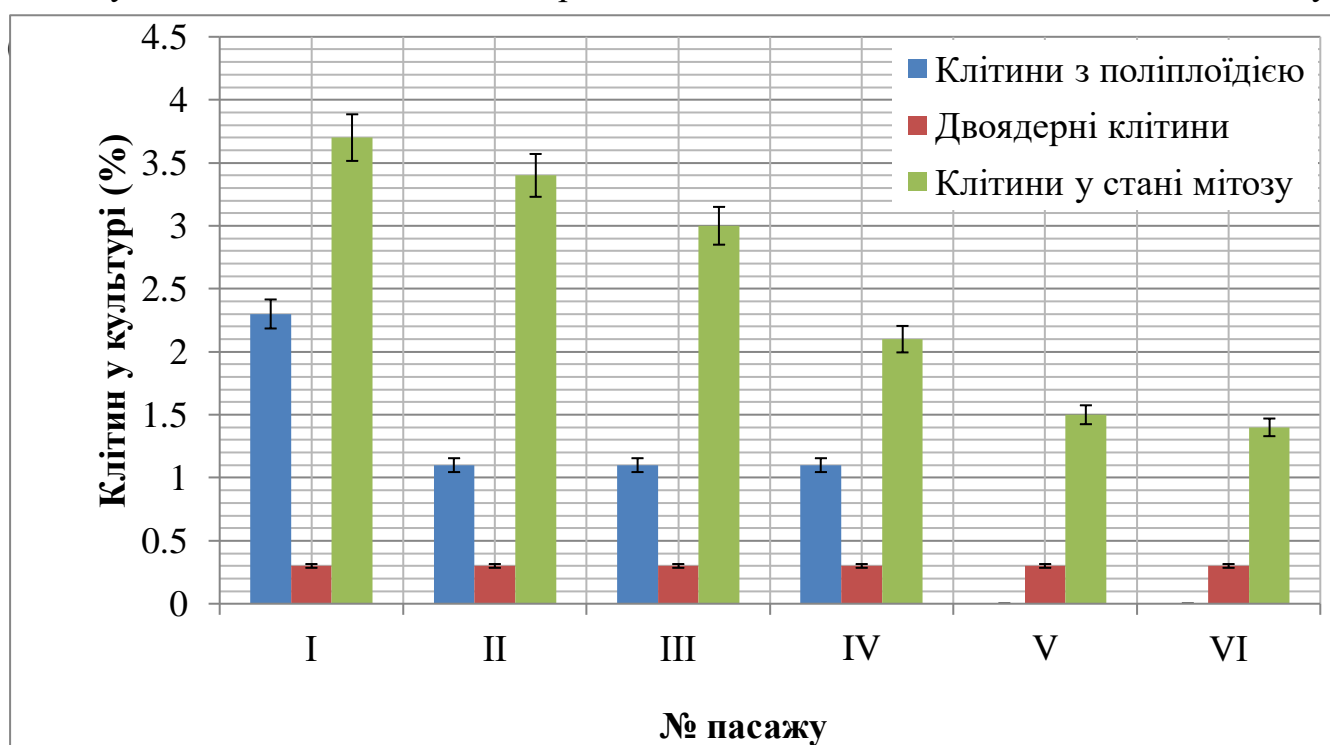


Рис. 4.13. Зміни відсотку двоядерних, поліплоїдних клітин та клітин у стані мітозу у культурі стовбурових клітин міокарда ($M \pm m$, $n=3$)

Кількість двоядерних клітин залишалася на одному рівні упродовж всього часу дослідження (рис. 4.13). Варто відмітити, що отримані показники не виходили за межі спонтанного мутагенезу, характерного для ссавців [29]. Відомо, що поліплоїдія та двоядерність не завжди є показником непластичної трансформації, адже у процесі ділення, клітина стає двоядерною. В свою чергу, високий мітотичний індекс свідчить про значну кількість клітин у стані поділу, які ми можемо ідентифікувати у зразку, як поліплоїдну чи двоядерну клітину.

Додатковим поясненням наявності клітин з поліплоїдією і двоядерних клітин є морфологічні особливості культури, оскільки у процесі культивування клітини можуть проходити остаточні етапи диференціювання, що підтверджується їх імунофенотиповими змінами, з перетворенням на зрілі клітини – кардіоміоцити, однією з особливостей яких є багоядерність.

При дослідженні генетичної стабільності КСКМ за впливу 5-азацитидину ми відмічали зниження кількості анеуплоїдних та збільшення поліплоїдних клітин, що ще раз підтверджує диференціювання культури у кардіоміогенному напрямку.

Важливим етапом при введенні клітинних технологій у практику є вивчення взаємодії імунної системи організму-реципієнта та трансплантату тварин-реципієнтів, зокрема впливу на трансплантовані клітини лімфоцитів та сироватки крові. У процесі дослідження ми не відмічали цитотоксичної дії в системі *in vitro* як лімфоцитів, так і сироватки крові інтактних тварин до КСКМ щура (рис. 4.14, 4.15).

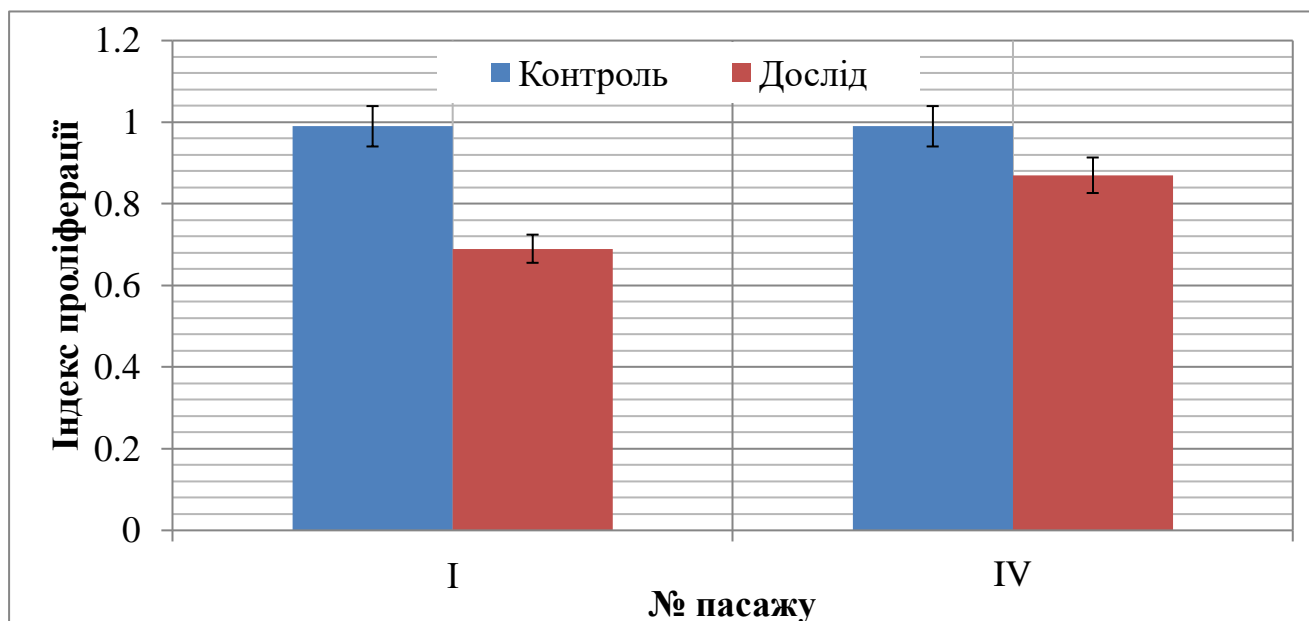


Рис. 4.14. Проліферативна активність стовбурових клітин,отриманих з міокарда щура, з пасажами за вивчення цитотоксичного впливу лімфоцитів щура ($M \pm m$, $n=3$)

У зв'язку з відсутністю попередньої сенсibilізації антигенами досліджуваної культури інтактних тварин, їх імунокомпетентні клітини (цитотоксичні Т-лімфоцити) не здатні проявляти цитотоксичний вплив відносно них. У сироватці

крові інтактних тварин також відсутні специфічні антитіла до антигенів клітин досліджуваної культури, чим пояснюється відсутність і її цитотоксичного впливу.

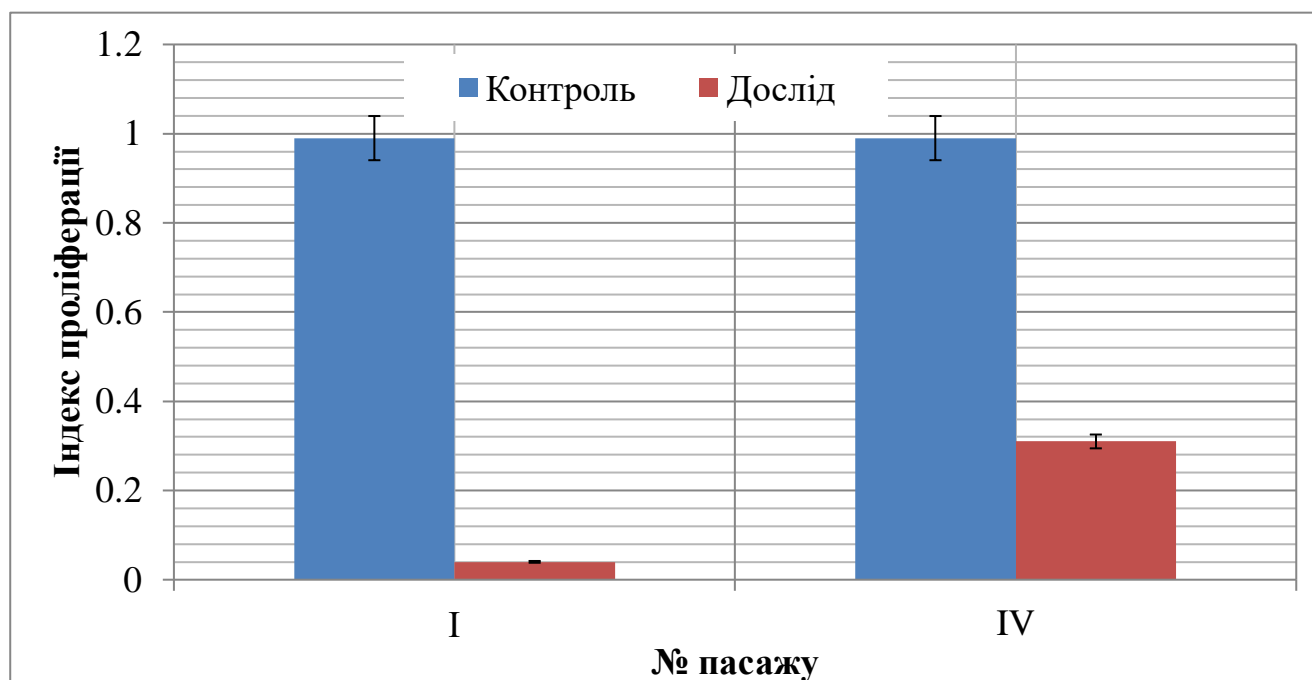


Рис. 4.15. Проліферативна активність стовбурових клітин, отриманих з міокарда щура, з пасажами за вивчення цитотоксичного впливу сироватки крові щура ($M \pm m$, $n=3$)

Разом з тим, у досліді з сенсibilізованими тваринами ми відмічали значний цитотоксичний вплив як лімфоцитів, так і сироватки крові, що проявлялося значним зниженням індексу проліферації досліджуваних клітин (рис. 4.15). Варто відмітити, що за використання у досліді КСКМ IV пасажу цитотоксичний ефект лімфоцитів і сироватки крові був меншим (рис. 4.15).

Отримані нами дані можна пояснити вищою імуногенністю клітин I пасажу. Зниження цитотоксичного впливу як сироватки, так і лімфоцитів крові при дослідженні культури IV пасажу є результатом видалення з культури у процесі культивування диференційованих клітин, які викликають імунну відповідь, з одночасним збільшення відсоткового вмісту неімуногенних клітин-попередниць та низькодиференційованих клітин, що підтверджується даними імунофенотипування.

Завершальним етапом при дослідженні культур стовбурових клітин щура є

вивчення їх впливу за експериментального інфаркту. У процесі дослідження ми відмічали зменшення площі некротизованої тканини міокарда у досліджуваних тварин за впливу стовбурових клітин. Так, за використання КСКЖТ площа рубця зменшилася у 1,39 рази у порівнянні з контролем (рис. 4.16).

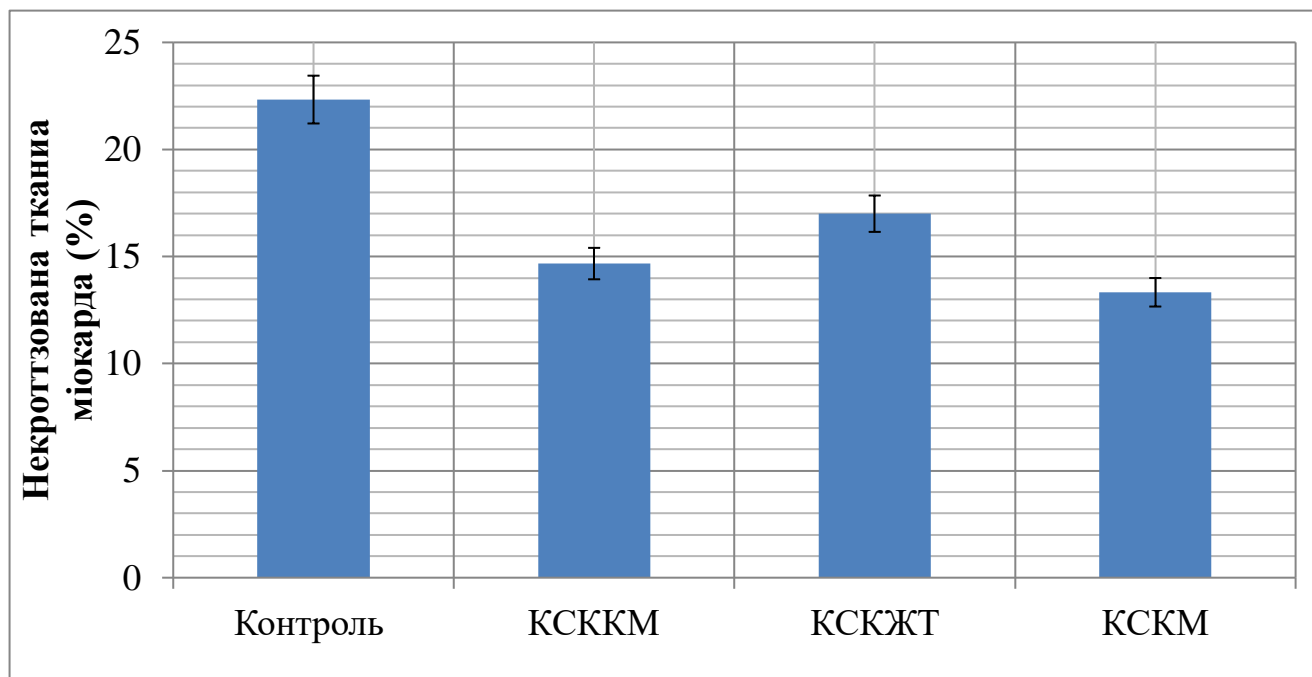


Рис. 4.16. Зміни площі некротизованої тканини міокарда за трансплантації різних видів культур клітин на фоні експериментального ішемічного інфаркту у щурів ($M \pm m$, $n=3$)

Більшість науковців схиляється до думки, що позитивний вплив стовбурових клітин, отриманих з червоного кісткового мозку, на відновлення міокарда за інфаркту зумовлений стимуляцією регенерації пошкодженого міокарда шляхом покращення васкуляризації та відновлення метаболізму пошкоджених тканин [86, 43].

За введення КСКЖТ площа некрозу на 25 добу експерименту зменшилася у 1,20 рази порівняно з контролем (рис. 4.16). Дія стовбурових клітин, отриманих із жирової тканини, на пошкоджений міокард подібна до дії стовбурових клітин, отриманих із червоного кісткового мозку: стимуляція росту кровоносних судин шляхом продукції ангіогенних ростових факторів та цитокінів [35, 34, 39, 237, 198]. Варто відмітити, що використання КСКЖТ було найменш ефективним.

Найбільш ефективною виявилася КСКМ: за її використання площа некрозу

зменшилася у 1,53 рази порівняно з контролем. Відомо, що міокард за використання стовбурових клітин, отриманих з серця, відновлюється шляхом утворення нових судин і міоцитів [63]. Makkar R. R. та ін. [179] відзначають, що за введення даних клітин за інфаркту міокарда відмічають зменшення розміру рубця та утворення нових здорових тканин. Вказані дані спростовують теорію, що рубці серцевого м'язу є постійними, і після ішемії здорові серцеві м'язи не можуть бути відновлені. Наші дослідження, у свою чергу, показали, що за експериментального інфаркту КСКМ найефективніше відновлює ушкоджений міокард з-поміж досліджуваних культур. Проте, варто зазначити, що масове використання даного виду клітин пов'язано з етичними суперечностями та складністю в їх отриманні.

Зважаючи на доведений терапевтичний вплив досліджуваних культур на перебіг експериментально сформованого інфаркту міокарда, наступним нашим завданням було визначення оптимальних умов виділення з різних джерел та культивування культур стовбурових клітин котів, для подальшого їх впровадження у ветеринарну практику.

Так, для отримання культури стовбурових клітин міокарда kota порівнювали метод експланту та 5 варіацій ферментативної обробки тканин серця. Зважаючи на те, що ефективність методу експланту у нашому дослідженні була найнижчою, доцільним буде розглянути вплив ферментів на тканини серця. Варто зазначити, механізм дії трипсину, колагенази та гіалуронідази та тканини тваринного організму значно відрізняється. Так, трипсин розщеплює С-термінальний аргінін та лізин [172], тобто здатний гідролізувати більшість білків. Гіалуронідаза – фермент, який розщеплює гіалуронову кислоту [201] та збільшує проникність тканин, що сприяє розповсюдженню речовин, які надходять разом з ним [156], тому при дезагрегації її використовують у поєднанні з іншими ферментами. Колагеназа здатна розщеплювати колаген, який є найбільш розповсюдженим білком позаклітинного матриксу в організмі ссавців (не виключенням є і серце, у якому в нормі виявляють декілька типів колагену) [264].

На даний час існують розрізнені дані щодо впливу ферментів на тканини серця за її дезагрегації. Так, за даними Masson-Pévet M. та ін. [191] вплив трипсину

на клітини серця призводить до значного їх пошкодження, тоді як за впливу колагенази – пошкоджень клітин не відмічали. De Bruijne J. та ін. [131] повідомляють, що мембранні властивості клітин серця, оброблених колагеназою, відповідають таким у інтактних клітинах. Разом з тим, Colizza D. та ін. [104] у своїх дослідженнях демонструють протилежні результати: клітини, що піддавалися дії трипсину, більш подібні до інтактних клітин, ніж ті, що піддавалися дії колагенази. Speicher D. W. та ін. [311] пояснюють це тим, що вивільнення клітин без їх пошкодження з тканин можливе лише при правильно підібраній концентрації трипсину з урахуванням ступеня його очищення.

У нашому дослідженні 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 годин при температурі 4 °C виявилася оптимальним методом отримання культури стовбурових клітин міокарда котів. При цьому, комплексний вплив ферментів та тривала експозиція за низької температури дозволили розщепити міжклітинні зв'язки та мінімізувати негативний вплив на клітини, які в подальшому були здатні до проліферації.

При визначенні оптимального методу отримання культури стовбурових клітин жирової тканини порівнювали метод експланту та 6 комбінацій ферментів. Як і у випадку з КСКМ, метод експланту виявився найменш ефективним. Найбільший вихід клітин із жирової тканини, здатних проліферації, ми отримали за використання комбінації 1 мг/мл колагенази, 10 мг/мл гіалуронідази з додаванням 4 % БСА. Отримані результати можна, знову-таки, пояснити комплексним впливом ферментів та оптимально підбраною їх концентрацією: гіалуронідаза покращує доступ колагенази до субстрату, а бичачий сироватковий альбумін, у свою чергу, зв'язує вільні жирні кислоти, захищаючи клітинну стінку, та позитивно впливає на експресію цитокінів [83]. Варто відмітити, що інші науковці також вказують на вищий вихід клітин, здатних до проліферації, за використання комплексного впливу ферментів [48].

У подальшому ми дослідили вплив різних стимуляторів росту на проліферативну активність клітин у культурі та їх каріотип.

IGF-1 (соматомедин С) структурно подібний до інсуліну, чим і пояснюється здатність даного фактору росту зв'язувати рецептор інсуліну [169]. Також він є мітогеном для більшості клітин і може діяти, як інсулін [208]. На даний час існують суперечливі дані щодо впливу IGF-1 на проліферацію клітин в системі *in vitro*. За даними Ren J. та ін. [238] та Kaplan R. C. та ін. [157] IGF-1 може стимулювати ріст, проліферацію та диференціацію багатьох типів клітин, включаючи кардіоміоцити, клітини гладкої м'язової тканини та судин як в системі *in vivo*, так *in vitro*, та інгібувати апоптоз і некроз клітин. Отримані дані корелюють з показниками, отриманими нами у групі чашок з КСКМ. Разом з тим, Li Y. та ін. [175] відзначають, що МСК, які культивували в системі *in vitro* з IGF-1 у кінцевих концентраціях 2,5, 5,0 та 10,0 нг/мл протягом 48 годин не змінили швидкості проліферації. У наших дослідженнях при додаванні IGF-1 до культурального середовища ми відмічали підвищення індексу проліферації КСКМ та КСКМ порівняно з контролем. Індекс проліферації вищезазначених культур зростав із підвищенням концентрації IGF-1. Проте у КСКЖТ спостерігали зворотній ефект: зниження індексу проліферації з підвищенням концентрації IGF-1 у середовищі.

FGF-2 – багатофункціональний фактор росту, який впливає на різні властивості, включаючи індукцію проліферації та диференціації клітин, має вплив на широкий спектр клітин мезодермального і нейро-ектодермального походження [283], чим пояснюється його стимулюючий вплив на досліджувані культури клітин. За даними Gospodarowicz D. та ін. [127] даний фактор росту стимулює проліферацію ендотеліальних клітин, що містяться у всіх досліджуваних культурах. Окрім того, дані Hasegawa T. та ін. [134] вказують не лише на стимулюючий вплив FGF-2 на ендотеліальні клітин, а й на зміну фенотипу культивованих клітин у бік, характерний для них. Оптимальною концентрацією фактору росту фібробластів-2 у наших дослідженнях для всіх досліджуваних культур є 10 нг/мл середовища, що дає змогу підвищити індекс проліферації для КСКМ, КСКЖТ та КСКМ у 1,2, 1,3 та 2,7 рази відповідно порівняно контролем. Інгібуючий вплив FGF-2 за збільшення концентрації у культуральному середовищі до кінця залишається не зрозумілим.

Гормон росту (rhGH) сприяє синтезу білка, мобілізації ліпідного обміну та регулює баланс азоту у клітині [88]. За даними Costoya J. A. та ін. [100], гормон росту здатний гальмувати апоптоз шляхом стимуляції серин-треонін кінази Akt, тому можна припустити, що це призводить до появи у культурі великих за розмірами клітин. Гормон росту здійснює прямий вплив на велику кількість тканин. Зокрема, рецептори до гормону росту представлені на м'язовій та жировій тканинах [120]. Разом з тим, на клітинах червоного кісткового мозку вони не виявляються [123], чим пояснюється відмінність впливу rhGH на досліджувані культури клітин. Оптимальною концентрацією фактору росту фібробластів-2 для всіх досліджуваних культур є 10 нг/мл середовища, що дає змогу підвищити індекс проліферації для КСККМ, КСКЖТ та КСКМ у 1,2, 1,3 та 2,7 рази відповідно порівняно контролем.

Biolaminin 521 LN – субстрат на основі рекомбінантного ламініну 521 людини. Biolaminin 521 LN у наших дослідженнях проявляв позитивний вплив на швидкість поділу всіх досліджуваних культур клітин: індекс проліферації для КСККМ та КСКЖТ зріс у 1,3 разів, для КСКМ – у 1,7 разів порівняно з контролем. Згідно даних виробника даний, субстрат позитивно впливає на стабілізацію та гомогенізацію клітинної культури. Через взаємодію з відповідними рецепторами клітинної поверхні, ламініни активують сигнальні каскади (наприклад, PI3K / Akt шлях), забезпечуючи прогнозовану відповідь клітин та поліпшення їх функціональності. Завдяки LN521 клітини ростуть у однорідному моношарі, що легко контролювати, зберігають плюрипотенцію та генетичну цілісність [147]. Заявлені виробником властивості Biolaminin LN 521 були підтверджені нами у досліді.

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 у порівнянні з контролем. Більше того, культивування стовбурових клітин за додавання Biolaminin 521 LN призводило до зменшення кількості клітин у культурі зі зміненим каріотипом.

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 сенсibilізованих 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-азацитидину 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 годин 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;

b) 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;

c) 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;

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

e) 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, у той час як 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 НУБіП 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 вищих навчальних закладах України з напрямку «Ветеринарна медицина».

Список використаних джерел

1. Бабаева А. Г., Шканд Т. В., Чиж Н. А., Трофимова А. В., Слета И. В., Гальченко С. Е., Сандомирский Б. П. Биотехнологические принципы формирования экспериментального некроза миокарда. Вестник неотложной и восстановительной медицины. 2012. Т. 13, № 1. С. 11–15.
2. Беленков Ю. Н., Агеев Ф. Т., Мареев В. Ю., Сычев А. В., Саидова М. О. Стволовые клетки и их применение для регенерации миокарда. Журнал сердечная недостаточность. 2003. Т. 4, № 4 (20). С. 168–173.
3. Берсенева А. В. Изучение спонтанной онкогенетической трансформации мезенхимальных стволовых клеток человека в культуре. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2005. № 1. С. 14–16.
4. Бокерия Л. А., Голухова Е. З., Еремеева М. В. Первый опыт клинического применения терапевтического ангиогенеза с использованием гена VEGF₁₆₅ человека. Бюллетень НЦССХ им. А. В. Бакулева. 2004. Т. 5, № 4. С. 134–142.
5. Большов П. С., Чижмак А. О., Мульский С. В., Куликова С. Г. Разработка модели инфаркта миокарда в хроническом эксперименте у крыс. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. № 5. С. 52–53.
6. Бочков Н. П. Клеточная терапия в свете доказательной медицины. Клиническая медицина. 2006. № 10. С. 4–7.
7. Давыденко В. В., Власов Т. Д., Мачс В. М., Томсон В. В., Вербовая Т. А., Дымань Е. Н. Возможность стимуляции ангиогенеза при ишемии препаратом эмбриональной мозговой ткани человека: первые экспериментальные результаты. Вести хирургии. 2001. Т. 160, № 5. С. 117–120.
8. Джиджихия К. М., Каде А. Х., Занин С. А. Лабораторный синтез экспериментальной модели инфаркта миокарда у крыс. Фундаментальные исследования. 2013. № 12. С. 461–465.
9. Діденко Г. В. Розробка протипухлинних аутовакцин на основі білоквмісних метаболітів *b.subtilis* в-7025 та їх вплив на окремі реакції

протипухлинного імунітету (експериментальні дослідження): дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук: 14.01.07 / Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького. Київ, 2008. 187 с.

10. In't Anker P. S., Scherjon S. A., Kleijburg-van der Keur C., de Groot-Swings G. M., Claas F. H., Fibbe W. E. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004. Vol. 22. P. 1338–1345.

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

12. Ковпак В. В. Цитотоксична активність лейкоцитів і сироватки крові щурів відносно алогенних культур клітин кісткового мозку та підшлункової залози. Наукові доповіді НУБіП України. 2016. № 6 (63). 9 с. URL: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/7561>.

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

14. Ковпак В. В., Ковпак О. С. Проліферативна активність мезенхімальних стовбурових клітин щура за впливу культурального середовища. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2016. № 60. 11 с. Режим доступу до статті: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/6841>

15. Ковпак В. В., Ковпак О. С. Фенотипові та морфологічні зміни культури клітин жирової тканини щурів в процесі їх культивування. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина. 2017. № 1 (40). С. 11–17.

16. 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; № у 201704458; заявлено 05.05.2017; опубліковано 28.08.2017. Бюл. № 16. 4 с.

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

18. 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.

19. 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.

20. Ковпак О. С., Ковпак В. В., Мазуркевич А. Й., Гудзь Н. В. Влив фактору росту фібробластів (FGF-2) та інсуліноподібного фактору росту (IGF-1) на проліферативну активність стовбурових клітин kota. Ветеринарна біотехнологія. 2018. № 33. С. 55–65.

21. 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.

22. Лопухин М. Ю. Экспериментальная хирургия. Москва: Медицина, 1971. 346 с.

23. Луппа Х. Основы гистохимии; пер. с немецкого И. Б. Бухвалова, Е. Д. Вальтер. Москва: Мир, 1980. 343 с.

24. Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В., Данілов В. Б. Клітинні технології у ветеринарній медицині: навч. посібник для студ. вищ. навч. закладів. К.:Компринт, 2014. 132 с.

25. 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.

26. 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. Режим доступу до статті: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/7560>.

27. 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.

28. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Стародуб Л. Ф., Данілов В. Б. Каріотиповий аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кролів за різних методів дисоціації клітинного моношару на ранніх пасажах культивування *in vitro*. Науковий вісник НУБіП України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2015. Вип. 227. С. 172–173.

29. Малюк М. О. Властивості стовбурових клітин та науково-експериментальне обґрунтування їх застосування у ветеринарній медицині: дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук: 16.00.02 / Нац. ун-т біоресурсів і природокористування України. Київ, 2016. 373 с.

30. Морозова К. Н. Электронная микроскопия в цитологических исследованиях: методическое пособие / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2013. 85 с.

31. Немцова Л. С. Метафазний метод учета перестроек хромосом. М.: Наука, 1970. 124 с.

32. Овсеян А. А., Панченков Д. Н., Прохорчук Е. Б. Моделирование инфаркта миокарда на мышах: методология, мониторинг, патоморфология. Аста Naturae. 2011. Т. 3, № 1 (8). С. 114–122.

33. Огнев Б. В., Саввин В. Н., Савельева Л. А. Кровеносные сосуды сердца в норме и патологии. М.: Государственное издательство медицинской литературы, 1954. 120 с.

34. Парфенова Е. В., Трактуев Д. О., Марч К. Л., Ткачук В. А. Стромальные клетки жировой ткани – мультипотентные клетки с терапевтическим потенциалом для стимуляции ангиогенеза при ишемии тканей. Кардиология. 2006. № 46 (6). С. 53–63.

35. Парфенова Е. В., Цоколаева З. И., Трактуев Д. О., Ратнер Е. И., Талицкий К. А., Марч К. Л., Джонстон Б., Рахмат-Задэ Т. М., Цоколаева З. И. Поиск новых «инструментов» для терапевтического ангиогенеза. Молекулярная медицина. 2006. № 2. С. 10–23.

36. Скибо Ю. В., Абрамова З. И. Методы исследования программируемой клеточной гибели: учебно-методическое пособие для магистров по курсу «Теория апоптоза». Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011. 61 с.

37. Степанова Е. В., Гопций Е. В., Ярмыш Н. В., Грозная Л. Н. Рецепторы PPAR γ как центральный адипогенный регулятор и фармакологическая мишень. Вісник проблем біології і медицини. 2013. Т. 1 (104), № 4. С. 40–46.

38. Сыркин А. Л., Инфаркт миокарда, Москва: МИА 2006, 464 с.

39. Трактуев Д. О., Парфенова Е. В., Ткачук В. А., Марч К. Л. Стромальные клетки жировой ткани – пластический тип клеток с высоким терапевтическим потенциалом. Цитология. 2006. № 48 (2). С. 83–94.

40. Упоров А. В., Семиглазов В. Ф., Пожарисский К. М. Иммуногистохимическое изучение клеток рака молочной железы с использованием разных маркеров пролиферации. Арх. Патологии. 2000. № 2. С. 26–30.

41. Фетисова Т. В., Фролькис Р. А. Биохимия инфаркта миокарда. К.: Здоровье, 1976. 168 с.

42. Шахнович Р. М. Острый коронарный синдром. Кардиология. Национальное руководство: учебное пособие для системы послевузовского проф.

образования врачей / под ред. Ю. Н. Беленкова, Р. Г. Оганова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 692 с.

43. Шахов В. П., Попов С. В. Стволовые клетки и кардиомиогенез в норме и патологии. Томск: STT, 2004. 170 с.

44. Щербакова Т. Н., Еремина А. И., Второва М. А. Инновационные клеточные технологии с позиций доказательной медицины. Фармация и фармакология. 2015. № 3 (10). С. 69–71.

45. Abad M., Mosteiro L., Pantoja C., Canamero M., Rayon T., Ors I., Grana O., Megias D., Dominguez O. et al. Reprogramming *in vivo* produces teratomas and iPS cells with totipotency features. Nature. 2013. Vol. 502. P. 340–345.

46. Adamcová M., Šimůnek T., Kaiserová H., Popelová O., Sterba M., Potáková A., Vávrová J., Maláková J., Gersl V. *In vitro* and *in vivo* examination of cardiac troponins as biochemical markers of drug-induced cardiotoxicity. Toxicology. 2007. Vol. 237, № 1–3. P. 218–228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.05.016>.

47. Amanta S., Dey P. Micronucleus and its applications. Diagn Cytopathol. 2012. Vol. 40, № 1. P. 84–90. DOI: <https://doi.org/10.1002/dc.21592>.

48. Amsterdam A., Jamieson J. D. Studies on dispersed pancreatic exocrine cells I. Dissociation technique and morphologic characteristics of separated cells. J. Cell Biol. 1974. Vol. 3, № 63. P. 1037–1056.

49. Anjos-Afonso F., Bonnet D. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1⁺ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. Blood. 2007. Vol. 109. P. 1298–1306.

50. Aoi T., Yae K., Nakagawa M., Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. Science. 2008. Vol. 321 № 5889. P. 699–702.

51. Aragona C. O., Imbalzano E., Mamone F., Cairo V., Lo Gullo A., D'Ascola A., Sardo M. A., Scuruchi M., Basile G., Saitta A., Mandraffino G. Endothelial progenitor cells for diagnosis and prognosis in cardiovascular disease. Stem Cells Int. 2015. Vol. 2016. 12 p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8043792>.

52. Asahara T., Masuda H., Takahashi T., Kalka C., Pastore C., Silver M., Kearne M., Magner M., Isner J. M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 1999. Vol. 85. P. 221–228.
53. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J. M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997. Vol. 275. P. 964–967.
54. Asahara T., Takahashi T., Masuda H., Kalka C., Chen D., Iwaguro H., Inai Y., Silver M., Isner J. M. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999. Vol. 18. P. 3964–3972.
55. Astori G., Vignati F., Bardelli S., Tubio M., Gola M., Albertini V., Bambi F., Scali G., Castelli D., Rasini V., Soldati G., Moccetti T. «*In vitro*» and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *J. Transpl. Med.* 2007. Vol. 5, № 1. P. 55.
56. ATCC. Passage number effects in cell lines. Technical bulletin. 2010. № 7.
57. Bailey A. S., Jiang S., Afentoulis M., Baumann C. I., Schroeder D. A., Olson S. B., Wong M. H., Fleming W. H. Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood*. 2004. Vol. 103, № 1. P. 13–19.
58. Bajada S., Mazakova I., Richardson J. B., Ashammakhi N. Updates on stem cells and their application in regenerative medicine. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2008. Vol. 2, № 4. P. 169–183.
59. Barile L., Messina E., Giacomello A., Marbán E. Endogenous cardiac stem cells. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2007. Vol. 50, № 1. P. 31–48.
60. Bayat H., Swaney J. S., Ander A. N., Dalton N., Kennedy B. P., Hammond H. K., Roth D. M. Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. *Basic Res. Cardiol.* 2002. Vol. 97, № 3. P. 206–213.
61. Bearzi C., Rota M., Hosoda T., Tillmanns J., Nascimbene A., De Angelis A., Yasuzawa-Amano S., Trofimova I., Siggins R. W., Lecapitaine N.,

Cascapera S., Beltrami A. P., D'Alessandro D. A., Zias E., Quaini F., Urbanek K., Michler R. E., Bolli R., Kajstura J., Leri A., Anversa P. Human cardiac stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. Vol. 104, № 35. P. 14068–14073.

62. Beckermann B. M., Kallifatidis G., Groth A., Frommhold D., Apel A., Mattern J., Salnikov A. V., Moldenhauer G., Wagner W., Diehlmann A., Saffrich R., Schubert M., Ho A. D., Giese N., Büchler M. W., Friess H., Büchler P., Herr I. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br. J. Cancer*. 2008. Vol. 99, № 4. P. 622–631.

63. Beltrami A. P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadal-Ginard B., Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003. Vol. 114, № 6. P. 763–776. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00687-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00687-1).

64. Beltrami A. P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadan-Ginard B., Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003. Vol. 114, № 6. P. 763–776.

65. Beltrami A. P., Urbanek K., Kajstura J., Yan S. M., Finato N., Bussani R., Nadal-Ginard B., Silvestri F., Leri A., Beltrami C. A., Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med*. 2001. Vol. 344. P. 1750–1757.

66. Benson V., McMahon A. C., Lowe H. C. ICAM-1 in acute myocardial infarction: a potential therapeutic target. *Curr. Mol. Med*. 2007. Vol. 7, № 2. P. 219–227.

67. Berry R., Rodeheffer M. S. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat. Cell Biol*. 2013. Vol. 15. P. 302–308.

68. Bianchi G., Borgonovo G., Pistoia V., Raffaghello L. Immunosuppressive cells and tumour microenvironment: focus on mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells. *Histol. Histopathol*. 2011. Vol. 26. P. 941–951.

69. Bianco P., Robey P. G., Simmons P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008. Vol. 2. P. 313–319.

70. Biehl J. K, Russell B. Introduction to stem cell therapy. *J. Cardiovasc Nurs.* 2009. Vol. 24(2). P. 98-103.
71. Blanpain C., Horsley V., Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell.* 2007. Vol. 128. P. 445–458.
72. Błogowski W. I., Ratajczak M. Z., Zyżniewska-Banaszak E., Dołęgowska B., Starzyńska T. Adipose tissue as a potential source of hematopoietic stem progenitor cells. *Obesity (Silver Spring).* 2012. Vol. 20, № 5. P. 923–931.
73. Boslett J., Hemann C., Christofi F. L., Zweier J. L. Characterization of CD38 in the major cell types of the heart: endothelial cells highly express CD38 with activation by hypoxia-reoxygenation triggering NAD(P)H depletion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2018. Vol. 314, № 3. P. 297–309.
74. Boulton M., Albon J. Stem cells in the eye. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004. Vol. 36, № 4. P. 643–657.
75. Bourin P., Bunnell B. A., Casteilla L., Dominici M., Katz A. J., March K. L., Redl H., Rubin J. P., Yoshimura K., Gimble J. M. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytherapy.* 2013. Vol. 15. P. 641–648.
76. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.* 1968. Vol. 21. P. 77–89.
77. Braunwald E. Coronary blood flow and myocardial ischemia. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine* / Eds. Braunwald E., Douglas P. Zipes, Libby P. Philadelphia, Pennsylvania, USA: W.B. Saunders Company, 2001. P. 1161–1183.
78. Brittan M., Wright N. A. Gastrointestinal stem cells. *J. Pathol.* 2002. Vol. 197, № 4. P. 492–509.
79. Broccolini A., Gidaro T., Morosetti R., Gliubizzi C., Servidei T., Pescatori M., Tonali P. A., Ricci E., Mirabella M. Neprilysin participates in skeletal muscle regeneration and is accumulated in abnormal muscle fibres of inclusion body myositis. *J. Neurochem.* 2006. Vol. 96. P. 777–789.

80. Bunnell B. A., Flaat M., Gagliardi Ch., Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008. Vol. 45, № 2. P. 115–120.
81. Burke Z. D., Thowfeequ S., Peran M., Tosh D. Stem cells in the adult pancreas and liver. *Biochem. J*. 2007. Vol. 404, № 2. P. 169–178.
82. Carrière A., Jeanson Y., Côté J. A., Dromard C., Galinier A., Menzel S., Barreau C., Dupuis-Coronas S., Arnaud E., Grousse A., Cuminetti V., Paupert J., Cousin B., Sengenès C., Koch-Nolte F., Tchernof A., Casteilla L. Identification of the ectoenzyme CD38 as a marker of committed preadipocytes. *Int. J. Obes. (Lond)*. 2017. Vol. 41, № 10. P. 1539–1546.
83. Carswell K. A., Lee Mi-Jeong, Fried S. K. Culture of isolated human adipocytes and isolated adipose tissue. *Methods Mol. Biol*. 2012. Vol. 806. P. 203–214.
84. CEACAM5. The human protein atlas. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105388-CEACAM5/tissue>.
85. Ceradini D. J., Kulkarni A. R., Callaghan M. J., Tepper O. M., Bastidas N., Kleinman M. E., Capla J. M., Galiano R. D., Levine J. P., Gurtner G. C. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med*. 2004. Vol. 10, № 8. P. 858–864.
86. Chachques J. S., Salanson-Lajos C., Lajos C., Shafy A., Alshamry A., Carpentier A. Cellular cardiomyoplasty for myocardial regeneration. *Asian Cardiovasc. Thorac. Ann*. 2005. Vol. 13, № 3. P. 287–296.
87. Chang J., Nair V., Luk A., Butany J. Pathology of myocardial infarction. *Diagnostic Histopathology*. 2013. Vol. 19, № 1. P. 7–12.
88. Chen J. Y., Liang D.-M., Gan P., Zhang Y, Lin J. *In vitro* effects of recombinant human growth hormone on growth of human gastric cancer cell line BGC823 cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2004. Vol. 10, № 8. P. 1132–1136.
89. Cheng T., Rodrigues N., Dombkowski D., Stier S., Scadden D. T. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). *Nat. Med*. 2000. Vol. 6. P. 1235–1240. DOI: <https://doi.org/10.1038/81335>.

90. Cheng T., Rodrigues N., Shen H., Yang Y., Dombkowski D., Sykes M., Scadden D. T. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science*. 2000. Vol. 287. P. 1804–1808. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1804>.
91. Cheng W., Kajstura J., Nitahara J. A., Li B., Reiss K., Liu Y., Clark W. A., Krajewski S., Reed J. C., Olivetti G., Anversa P. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp. Cell. Res.* 1996. Vol. 226. P. 316–327.
92. Cheshier S. H., Morrison S. J., Liao X., Weissman I. L. *In vivo* proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96. P. 3120–3125.
93. Choi S. C., Yoon J., Shim W. J., Ro Y. M., Lim D. S. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells. *Exp. Mol. Med.* 2004. Vol. 36, № 6. P. 515–523.
94. Chunmeng S., Tianmin C. Skin: a promising reservoir for adult stem cell populations. *Med. Hypotheses*. 2004. Vol. 62, № 5. P. 683–688.
95. Clark E. R., Clark E. L. Microscopic studies of the new formation of fat in living adult rabbits. *Am. J. Anat.* 1940. Vol. 67. P. 255–285.
96. Coats J. A Manual of Pathology. Philadelphia: H. C. Lea's Sons and Co., 1883. 123 p.
97. Coller H. A. Cell biology. The essence of quiescence. *Science*. 2011. Vol. 334. P. 1074–1075. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4765170>.
98. Condit Maureen L. Totipotency: what it is and what it is not? *Stem Cells Dev.* 2014. 15. Vol. 23, № 8. P. 796–812.
99. Corselli M., Parodi A., Moggi M., Sessarego N., Kunkl A., Dagna-Bricarelli F., Ibatici A., Pozzi S., Bacigalupo A., Frassoni F., Piaggio G. Clinical scale *ex vivo* expansion of cord blood-derived outgrowth endothelial progenitor cells is associated with high incidence of karyotype aberrations. *Exp. Hematol.* 2008. Vol. 36. P. 340–349.

100. Costoya J. A., Finidori J., Moutoussamy S. Activation of growth hormone receptor delivers an antiapoptotic signal: evidence for a role of Akt in this pathway. *Endocrinology*. 1999. Vol. 140, № 12. P. 5937–5943.

101. Davis D. R., Zhang Y., Smith R. R., Cheng Ke, Terrovitis J., Malliaras K., Tao-Sheng Li, White A., Makkar R., Marbán. E. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PloS One*. 2009. Vol. 4, № 9. P. e7195. URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0007195>.

102. Davy P., Walker B., Wong L., Allsopp R. Hematopoietic stem cells are a critical sub-population of whole bone marrow in the treatment of myocardial infarction. *Stem Cell Discovery*. 2013. Vol. 3, № 2. P. 117–126.

103. De Bruijn M. F., Speck N. A., Peeters M. C., Dzierzak E. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J*. 2000. Vol. 19. P. 2465–2474.

104. De Bruijne J., Jongsma H. J. Membrane properties of aggregate of collagenase-dissociated rat heart cells. *Adv. Myocardiol*. 1980. Vol. 1. P. 231–242.

105. De Miguel M. P., Fuentes-Julián S., Blázquez-Martínez A., Pascual C. Y., Aller M. A., Arias J., Arnalich-Montiel F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr. Mol. Med*. 2012. Vol. 12, № 5. P. 574–591.

106. Dezawa M., Ishikawa H., Itokazu Y., Yoshihara T., Hoshino M., Takeda S., Ide C., Nabeshima Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*. 2005. Vol. 309. P. 314–317.

107. Dimmeler S., Aicher A., Vasa M., Mildner-Rihm C., Adler K., Tiemann M., Rüthen H., Fichtlscherer S., Martin H., Zeiher A. M. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J. Clin. Invest*. 2001. Vol. 108. P. 391–397.

108. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I, Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for

multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for cellular Therapy position statement. Cytoterapy. 2006. Vol. 8. P. 315–317.

109. Driehuys S., Van Winkle T. J., Sammarco C. D., Drobatz K. J. Myocardial infarction in dogs and cats: 37 cases (1985–1994). J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998. Vol. 213. P. 1444–1448.

110. Falk T., Jonsson L. Ischaemic heart disease in the dog: A review of 65 cases. J. Small Anim. Pract. 2000. Vol. 41. P. 97–103. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2000.tb03173.x>.

111. Feigin M. E., Malbon C. C. OSTM1 regulates beta-catenin/Lef1 interaction and is required for Wnt/beta-catenin signaling. Cell Signal. 2008. Vol. 20. P. 949–957.

112. Ferrari R. Healthy versus sick myocytes: metabolism, structure and function. Eur. Heart J. 2002. Vol. 4, suppl. G. P. G1–G12.

113. Fielitz J., Dendorfer A., Pregla R., Ehler E., Zurbrugg H. R., Bartunek J., Hetzer R., Regitz-Zagrosek V. Neutral endopeptidase is activated in cardiomyocytes in human aortic valve stenosis and heart failure. Circulation. 2002. Vol. 105. P. 286–289.

114. Filip S., English D., Mokry J. Issues in stem cell plasticity. J. Cell Mol. Med. 2004. Vol. 8, № 4. P. 572–577.

115. Foudah D., Redaelli S., Donzelli E., Bentivegna A., Miloso M., Dalpra L., Tredici G. Monitoring the genomic stability of *in vitro* cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. Chromosome Res. 2009. Vol. 17. P. 1025–1039.

116. Francavilla C., Loeffler S., Piccini D., Kren A., Christofori G., Cavallaro U. Neural cell adhesion molecule regulates the cellular response to fibroblast growth factor. J. Cell Sci. 2007. Vol. 120. Pt. 24. P. 4388–4394.

117. Frangogiannis N. G., Lindsey M. L., Michael L. H., Youker K. A., Bressler R. B., Mendoza L. H., Spengler R. N., Smith C. W., Entman M. L. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. Circulation. 1998. Vol. 98, № 7. P. 699–710.

118. Frangogiannis N. G., Smith C. W., Entman M. L. Inflammatory response in myocardial infarction. Cardiovasc. Research. 2002. Vol. 53, № 1. P. 31–47.

119. Frank P. G., Lisanti M. P. ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2008. Vol. 295, № 3. P. H926–H927.

120. Frick G. P., Tai L. R., Baumbach W. R. Tissue distribution, turnover, and glycosylation of the long and short growth hormone receptor isoforms in rat tissues. *Endocrinology*. 1998. Vol. 139. P. 2824–2830.

121. Friedenstein A. J., Chailakhyan R. K., Latsinik N. V., Panasyuk A. F., Keiliss-Borok I. V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplantation*. 1974. Vol. 17, № 4. P. 331–340.

122. Ghannam S., Bouffi C., Djouad F., Jorgensen C., Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem cell research and therapy*. 2010. Vol. 1, № 1. P. 2. DOI: <https://doi.org/10.1186/scrt2>.

123. GHR. The Human Protein Atlas. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000112964-GHR/tissue/bone+marrow>.

124. Gimble J. M., Katz A. J., Bunnell B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res*. 2007. Vol. 100, № 9. P. 1249–1260.

125. Giordano F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *Journal of Clinical Investigation*. 2005. Vol. 115, № 3. P. 500–508. URL: <https://www.jci.org/articles/view/24408>.

126. Gneocchi M., He H., Liang O. D., Melo L. G., Morello F., Mu H., Noiseux N., Zhang L., Pratt R. E., Ingwall J. S., Dzau V. J. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat. Med*. 2005. Vol. 11, № 4. P. 367–368.

127. Gospodarowicz D., Massoglia S., Cheng L., Lui G. M., Böhlen P. Isolation of bovine pituitary fibroblast growth factor purified by fast protein liquid chromatography (FPLC). Partial chemical and biological characterization. *J. Cell. Physiol*. 1985. Vol. 122. P. 323–328.

128. Gottlieb R. A., Burleson K. O., Kloner R. A., Babior B. M., Engler R. L. Reperfusion injury apoptosis in rabbit cardiomyocyte. *J. Clin. Invest.* 1994. Vol. 94. P. 1621–1628.
129. Gown A. M., Boyd H. C., Chang Y., Ferguson M., Reichler B., Tippens D. Smooth muscle cells can express cytokeratins of "simple" epithelium. Immunocytochemical and biochemical studies *in vitro* and *in vivo*. *The American journal of pathology.* 1988. Vol. 132, № 2. P. 223–232.
130. Granero-Molto F., Weis J. A., Longobardi L., Spagnoli A. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2008. Vol. 8. P. 255–268.
131. Gross W. O., Schöpf-Ebner E., Bucher O. M. Technique for the preparation of homogeneous cultures of isolated heart muscle cells. *Exp. Cell Res.* 1968. Vol. 53, № 1. P. 1–10.
132. Hager G., Holnthoner W., Wolbank S., Husa A. M., Godthardt K., Redl H., Gabriel C. Three specific antigens to isolate endothelial progenitor cells from human liposuction material. *Cytherapy.* 2013. Vol. 15, № 11. P. 1426–1435.
133. Handbook of stem cells. Vol.2: Adult and fetal / R. Lanza, H. Blau, J. Gearhart; ed. R. Lanza. Amsterdam: Elsevier Inc. 2004. 1760 p.
134. Hasegawa T., Chosa N., Asakawa T., Yoshimura Y., Asakawa A., Ishisaki A., Tanaka M.. Effect of fibroblast growth factor-2 on dental pulp cells derived from human deciduous teeth *in vitro*. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2010. Vol. 1. P. 477–480.
135. Hassan H. T., El-Sheemy M. Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine. *J. R. Soc. Med.* 2004. Vol. 97, № 10. P. 465–471.
136. Hellman B., Hellerstrom C. Cell renewal in the white and brown fat tissue of the rat. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1961. Vol. 51. P. 347–353.
137. Hertszenberg A. J., Funderburgh J. L. Stem Cells in the Cornea. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2015. Vol. 134. P. 25–41.
138. Hima Bindu A., Srilatha B. Potency of various types of stem cells and their transplantation. *J. Stem Cell Res. Ther.* 2011. Vol. 1. P. 115. URL:

<https://www.omicsonline.org/potency-of-various-types-of-stem-cells-and-their-transplantation-2157-7633.1000115.php?aid=3527>.

139. Hockenbery D. M., Zutter M., Hickey W., Nahm M., Korsmeyer S. J. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. Vol. 88. P. 6961–6965.

140. Hollenberg C. H., Vost A. Regulation of DNA synthesis in fat cells and stromal elements from rat adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 1969. Vol. 47. P. 2485–2498.

141. Honecker F., Stoop H., Mayer F., Bokemeyer C., Castrillon D. H., Lau Y. F., Looijenga L. H., Oosterhuis J. W. Germ cell lineage differentiation in non-seminomatous germ cell tumours. *J. Pathol.* 2006. Vol. 208. P. 395–400.

142. Hongjie Li, Heinrich J. Gastrointestinal stem cells in health and disease: from flies to humans. *Disease Models and Mechanisms*. 2016. Vol. 9, № 5. P. 487–499.

143. Hristov M., Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J. Cell Mol. Med.* 2004. Vol. 8, № 4. P. 498–508.

144. Huang L., Yang Y., Yang F., Liu S., Zhu Z., Lei Z., Guo J. Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review). *International journal of molecular medicine*. 2018. Vol. 42, № 4. P. 1771–1785.

145. Hughes P., Marshall D., Reid Y., Parkes H., Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques*. 2007. Vol. 43, № 5. P. 575. DOI: <https://doi.org/10.2144/000112598>.

146. Ian Freshney R. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5th ed. USA: John Wiley and Sons, 2005. 642 p.

147. Instruction for Biolaminin 521 Ln (Ln521). URL: <http://www.biolamina.com/laminin-ln-521-stem-cell-matrix>.

148. Irie-Sasaki J., Sasaki T., Matsumoto W., Opavsky A., Cheng M., Welstead G., Griffiths E., Krawczyk C., Richardson C. D., Aitken K., Iscove N., Koretzky G., Johnson P., Liu P., Rothstein D. M., Penninger J. M. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*. 2001. Vol. 409. P. 349–354.

149. Isakova I. A., Lanclos C., Bruhn J., Kuroda M. J., Baker K. C., Krishnappa V., Phinney D. G. Allo-reactivity of mesenchymal stem cells in rhesus macaques is dose and haplotype dependent and limits durable cell engraftment *in vivo*. PLoS One. 2014. Vol. 9. P. e87238.
150. Izadpanah R., Kaushal D., Kriedt C., Tsien F., Patel B., Dufour J., Bunnell B. A. Long-term *In vitro* expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. Cancer Res. 2008. Vol. 68, № 11. P. 4229–4238.
151. Jackson K. A., Majka S. M., Wang H., Pocius J., Hartley C. J., Majesky M. W., Entman M. L., Michael L. H., Hirschi K. K., Goodell M. A. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J. Clin. Invest. 2001. Vol. 107, № 11. P. 1395–1402.
152. Jaenisch R., Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell. 2008. Vol. 132. P. 567–582.
153. Jaeschke H., Smith C. W. Mechanisms of neutrophil-inducer parenchymal cell injury. J. Leukoc. Biol. 1997. Vol. 61, № 6. P. 647–653.
154. Jin K., Galvan V. Endogenous neural stem cells in the adult brain. J. Neuroimmune Pharmacol. 2007. Vol. 2, № 3. P. 236–242
155. Jinah Han, Young Jun Koh, Hye Rin Moon, Hyun Gee Ryoo, Chung-Hyun Cho, Injune Kim and Gou Young Koh Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. Blood. 2010. Vol. 115. P. 957–964.
156. Kajstura J., Leri A., Finato N., DiLoreto C., Beltrami C. A., Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 8801–8805.
157. Kaplan R. C., Strickler H. D., Rohan T. E., Muzumdar R., Brown D. L. Insulin-like growth factors and coronary heart disease. Cardiol. Rev. 2005. Vol. 13, № 1. P. 35–39.
158. Karra R., Wu S. M. Multipotent stem cells in cardiac regeneration. Regen. Med. 2008. Vol. 3, № 2. P. 189–198.

159. Kaur S., Kartha C. C. Stem cells: concepts and prospects. current trends in science platinum jubilee special / Ed. N. Mukunda. India, Bangalore: Indian Academy of Sciences, 2009. P. 437–452.

160. Kawamoto A., Gwon H. C., Iwaguro H., Yamaguchi J. I., Uchida S., Masuda H., Silver M., Ma H., Kearney M., Isner J. M., Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001. Vol. 103, № 5. P. 634–637.

161. Kawamoto A., Tkebuchava T., Yamaguchi J., Nishimura H., Yoon Y. S., Milliken C., Uchida S., Masuo O., Iwaguro H., Ma H., Hanley A., Silver M., Kearney M., Losordo D. W., Isner J. M., Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*. 2003. Vol. 107, № 3. P. 461–468.

162. Kawamoto Losordo D. W. endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration. *Trends in cardiovascular medicine*. 2008. Vol. 18, № 1. P. 33–37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2007.11.004>.

163. Kiel M. J., Yilmaz O. H., Iwashita T., Yilmaz O. H., Terhorst C., Morrison S. J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005. Vol. 121. P. 1109–1121.

164. Ko I-K, Kim B-S. Mesenchymal stem cells for treatment of myocardial infarction. *International journal of stem cells*. 2008. №1 (1). P. 49–54.

165. Kocher A. A., Schuster M. D., Szabolcs M. J., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N. M., Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med*. 2001. Vol. 7, № 4. P. 430–436.

166. Krampera M., Franchini M., Pizzolo G., Aprili G.. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus*. 2007. Vol. 5. P. 120–129.

167. Krouse J. H., Derebery M. J., Chadwick S. J. Managing the allergic patient 1st Edition. 2008, 400 p.

168. Larochelle A., Savona M., Wiggins M., Anderson S., Ichwan B., Keyvanfar K., Morrison S. J., Dunbar C. E. Human and rhesus macaque hematopoietic stem cells cannot be purified based only on SLAM family markers. *Blood*. 2011. Vol. 117. P. 1550–1554.
169. Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Molecular Pathology*. 2001. Vol. 54, № 5. P. 311–316.
170. Latif N., Khan M. A., Birks E., O'Farrell A., Westbrook J., Dunn M. J., Yacoub M. N. Upregulation of the Bel-2 family of proteins in end stage heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2000. Vol. 35, № 7. P. 1769–1777.
171. Lawson C., Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol. Rep*. 2009. Vol. 61, № 1. P. 22–32.
172. Lee J. H., Ha J. M., Leem C. H. A novel nicotinamide adenine dinucleotide correction method for mitochondrial Ca(2+) Measurement with FURA-2-FF in single permeabilized ventricular myocytes of rat. *Korean J. Physiol. Pharmacol*. 2015. Vol. 19, № 4. P. 373–382. DOI: <https://doi.org/10.4196/kjpp.2015.19.4.373>.
173. Lefer D. J., Granger D. N. Oxidative stress and cardiac disease. *Am. J. Med*. 2000. Vol. 109, № 4. P. 315–323.
174. Li L., Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol*. 2005. Vol. 21. P. 605–631.
175. Li Y., Yu X., Lin S., Li X., Zhang S., Song Y.-H. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2007. Vol. 356, № 3. P. 780–784.
176. Liu A. M., Qu W. W., Liu X., Qu C.-K. Chromosomal instability in in vitro cultured mouse hematopoietic cells associated with oxidative stress. *American Journal of Blood Research*. 2012. Vol. 2, № 1. P. 71–76.
177. Lu T. Y., Lu R. M., Liao M. Y., Yu J., Chung C. H., Kao C. F., Wu H. C. Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J. Biol. Chem*. 2010. Vol. 285. P. 8719–8732. URL: <http://www.jbc.org/content/285/12/8719.abstract>.

178. Mahmoudifar N., Doran P. M. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1340. P. 53–64.

179. Makkar R. R., Smith R. R., Cheng K., Malliaras K., Thomson L. E., Berman D., Czer L. S., Marbán L., Mendizabal A., Johnston P. V., Russell S. D., Schuleri K. H., Lardo A. C., Gerstenblith G., Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2012. Vol. 379, № 9819. P. 895–904. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60195-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60195-0).

180. Mandraffino G., Sardo M. A., Riggio S., D'Ascola A., Alibrandi A., Saitta C., Versace A., Castaldo M., Mormina E., Imbalzano E., Cinquegrana M., Bonaiuto M., Davidd A., Saitta A. Circulating progenitor cells and the elderly: A seven-year observational study. *Exp. Gerontol.* 2012. Vol. 47. P. 394–400.

181. Mareschi K., Ferrero I., Rustichelli D., Aschero S. et al. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J. Cell. Biochem.* 2006. Vol. 97, № 4. P. 744–754.

182. Martin C. A., Badran A. F. Evaluation of antibody crossreactivity in mouse tissues: study of a panel of antibodies reacting to human antigens. *Appl. Immunohistochem.* 1998. Vol. 6. P. 84–88.

183. Mathers C. D., Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *Plos Med.* 2006. Vol. 3, № 11. P. e442. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>.

184. Matsumoto A., Takeishi S., Kanie T., Susaki E., Onoyama I., Tateishi Y., Nakayama K., Nakayama K. I. p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2011. Vol. 9. P. 262–271. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.06.014>.

185. Matsuoka S., Ebihara Y., Xu M., Ishii T., Sugiyama D., Yoshino H., Ueda T., Manabe A., Tanaka R., Ikeda Y., Nakahata T., Tsuji K. CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages. *Blood.* 2001. Vol. 97. P. 419–425.

186. Matsushita K., Umezawa A., Iwanaga S., Oda T., Okita H., Kimura K., Shimada M., Tanaka M., Sano M., Ogawa S., Hata Jun-ichi The EAT/mcl-1 gene, an inhibitor of apoptosis, is up-regulated in the early stage of acute myocardial infarction. *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. Vol. 1472. P. 471–478.
187. Mazurkevych A., Malyuk M., Kovpak V., Kovpak O., 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.
188. Mazurkevych A., Malyuk M., Kovpak V., Kovpak O., 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.
189. McArdel S. L., Terhorst C., Sharpe A. H. Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clinical immunology*. 2016. Vol. 164. P. 10–20.
190. McClelland R. A., Wilson D., Leake R., Finlaya P., Nicholson R. I. A multicentre study into the reliability of steroid receptor immunocytochemical assay quantification. *Eur. J. Cancer*. 1991. Vol. 27. P. 711–715.
191. Messina L., Gavira J. A., Pernagallo S., Unciti-Broceta J. D., Sanchez M. R. M., Diaz-Mochon J. J., Vaccaro S., Conejero-Muriel M., Pineda-Molina E., Caruso S., Musumeci L., Di Pasquale R., Pontillo A., Sincinelli F., Pavan M., Secchieri C. Identification and characterization of a bacterial hyaluronidase and its production in recombinant form. *Febs Lett*. 2016. Vol. 590, № 14. P. 2180–2189. DOI: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12258>.
192. Mikkola H.K.A., Orkin S.H. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*. 2006. Vol. 133. P. 3733–3744.
193. Miller-Kasprzak E., Jagodziński P. P. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 2007. Jul.–Aug. Vol. 55, № 4. P. 247–259.
194. Minteer D., Marra K. G., Rubin J. P. Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 2013. Vol. 129. P. 59–71.

195. Misao J., Hayakawa Y., Ohno M., S Kato, Fujiwara T., Fujiwara H. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulat.* 1996. Vol. 94. P. 1506–1512.
196. Mitchel J. B., McIntoch K., Zvonic S., Garrett S., Floyd Z. E., Kloster A., Halvorsen Y. D., Storms R. W., Goh B., Kilroy G., Wu X., Gimble J. M. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.* 2006. Vol. 24. P. 376–385.
197. Miura M., Miura Y., Padilla Nash N. M., Molinolo A. A., Fu B., Patel V., Seo Byoung-Moo, Sonoyama W., Zheng J. J., Baker C. C., Chen W., Ried T., Shi S. A accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells.* 2005. Vol. 24. P. 1095–1103.
198. Miyahara Y., Nagaya N., Kataoka M., Yanagawa B., Tanaka K., Hao H., Ishino K., Ishida H., Shimizu T., Kangawa K., Sano S., Okano T., Kitamura S., Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat. Med.* 2006. Vol. 12. P. 459–465.
199. Molofsky A. V., Pardal R., Morrison S. J. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004. Dec. Vol. 16, № 6. P. 700–707.
200. Morgani S. M., Canham M. A., Nichols J., Sharov A. A., Migueles R. P., Ko M. S., Brickman J. M. Totipotent embryonic stem cells arise in ground-state culture conditions. *Cell Rep.* 2013. Vol. 3. P. 1945–1957.
201. Mukherjee R., Multani M. M., Sample J. A., Dowdy K. B., Zellner J. L., Hoover D. B., Spinale F. G. Effects of adrenomedullin on human myocyte contractile function and beta-adrenergic response. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2002. Vol. 7, № 4. P. 235–240. DOI: <https://doi.org/10.1177/107424840200700406>.
202. Myocardial Ischemia. The National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68017202>.
203. Nagao K., Ono K., Iwanaga Y., Tamaki Y., Kojima Y., Horie T., Nishi H., Kinoshita M., Kuwabara Y., Hasegawa K., Kita T., Kimura T. Neural cell adhesion

molecule is a cardioprotective factor up-regulated by metabolic stress. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2010. Jun. Vol. 48, № 6. P. 1157–1168.

204. Nakajima H., Yanase N., Oshima K., Sasame A., Hara T, Fukazawa S, Takata R, Hata K, Mukai K, Yamashina A, Mizuguchi J. Enhanced expression of apoptosis inducing ligand TRAIL in mononuclear cells after myocardial infarction. *Jpn. Heart J.* 2003. Vol. 44. P. 833–844.

205. Nauta A. J., Westerhuis G., Kruisselbrink A. B., Lurvink E. G., Willemze R., Fibbe W. E. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood.* 2006. Vol. 108. P. 2114–2120.

206. Neumann F. J., Ott I., Gawaz M., Richardt G., Holzapfel H., Jochum M., Schomig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation.* 1995. Vol. 92, № 4. P. 748–755.

207. Ng C. W., Poznanski W. J., Borowiecki M., Reimer G. Differences in growth *in vitro* of adipose cells from normal and obese patients. *Nature.* 1971. Vol. 231. P. 445.

208. Niedźwiedzka A. Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) and its binding proteins 1 and 3 in children with special consideration of diabetes. *Endokrynol. Diabetol. Chor. Przemiany Materii Wieku Rozw.* 2000. Vol. 6, № 1. P. 51–58.

209. Niessen H. W., Krijnen P. A., Visser C. A., Meijer C. J., Hack C. E. Intercellular adhesion molecule-1 in the heart. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002. Nov. Vol. 973. P. 573–585.

210. Nolan D. J., Alessia Ciarrocchi, Albert S. Mellick, Jaspreet S. Jaggi, Kathryn Bambino, Sunita Gupta, Emily Heikamp, Michael R. McDevitt, David A. Scheinberg, Robert Benezra and Vivek Mittal. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes. Dev.* 2007. Vol. 21, № 12. P. 1546–1558.

211. Oberlin E., Tavian M., Blazsek I., Péault B. Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development.* 2002. Vol. 129. P. 4147–4157.

212. Ogawa M., Matsuzaki Y., Nishikawa S., Hayashi S., Kunisada T., Sudo T., Kina T., Nakauchi H., Nishikawa S.-I. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 1991. Vol. 174. P. 63–71.
213. Oh H., Bradfute S. B., Gallardo T. D., Nakamura T., Gaussin V., Mishina Y., Pocius J., Michael L. H., Behringer R. R., Garry D. J., Entman M. L., Schneider M. D. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. Vol. 100. P. 12313–12318.
214. Ohnishi S., Ohgushi H., Kitamura S., Nagaya N. Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Int. J. Hematol.* 2007. Jul. Vol. 86, № 1. P. 17–21.
215. Okabe M., Tsukahara Y., Tanaka M., Suzuki K., Saito S., Kamiya Y., Tsujimura T., Nakamura K., Miyajima A. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development.* 2009. Vol. 136. P. 1951–1960. URL: <http://dev.biologists.org/content/136/11/1951>.
216. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S. M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D. M., Leri A., Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001. Apr. 5. Vol. 410, № 6829. P. 701–705.
217. Osawa M., Hanada K., Hamada H., Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 1996. Vol. 273. P. 242–245.
218. Painter J. T., Clayton N. P., Herbert R. A. Useful immunohistochemical markers of tumor differentiation. *Toxicologic pathology.* 2009. Vol. 38, № 1. P. 131–141.
219. Park B. W. Dental tissues as adult stem cell source. *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 2013. Apr. Vol. 39, №2. P. 41–42.
220. Park I. H., Zhao R., West J. A., Yabuuchi A., Huo H., Ince T. A., Lerou P. H., Lensch M. W., Daley G. Q. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 2008. Vol. 451, №7175. P. 141–146.
221. Passegue E., Wagers A. J., Giuriato S., Anderson W. C., Weissman I. L. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of

hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J. Exp. Med.* 2005. Vol. 202, № 3. P. 1599–1611.

222. Piedimonte G., Nadel J. A., Long C. S., Hoffman J. I. Neutral endopeptidase in the heart. Neutral endopeptidase inhibition prevents isoproterenol-induced myocardial hypoperfusion in rats by reducing bradykinin degradation. *Circ. Res.* 1994. Oct. Vol. 75, № 4. P. 770–779.

223. Pinckard R. N., Olson M. S., Giclas P. C., Terry R., Boyer J. T., O'Rourke R. A. Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* 1975. Vol. 56, № 3. P. 740–750.

224. Pittenger M. F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol. Biol.* 2008. Vol. 449. P. 27–44.

225. Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999. Vol. 284. P. 143–147.

226. Pittenger M. F., Martin B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.* 2004. Vol. 95, № 1. P. 9–20.

227. Poncelet A. J., Vercruysse J., Saliez A., Gianello P. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation.* 2007. Vol. 83. P. 783–790.

228. Pontikoglou C., Deschaseaux F., Sensebé L., Papadaki H. A. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev.* 2011. Sep. Vol. 7, № 3. P. 569–589.

229. Poznanski W. J., Waheed I., Van R. Human fat cell precursors. Morphologic and metabolic differentiation in culture. *Lab. Invest.* 1973. Vol. 29. P. 570–576.

230. Prockop D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997. Vol. 276. P. 71–74.

231. Qian Q., Qian H., Zhang X., Zhu W., Yan Y., Ye S., Peng X., Li W., Xu Z., Sun L., Xu W. 5-Azacytidine Induces Cardiac Differentiation of Human Umbilical

Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells by Activating Extracellular Regulated Kinase. *Stem Cells and Development*. 2012. Vol. 21, № 1. P. 67–75. DOI: <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0519>.

232. Quirici N., Soligo D., Bossolasco P. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* 2002. Vol. 30. P. 783–791.

233. Raina D., Kharbanda S., Kufe D. The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 20607–20612. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M310538200>.

234. Randall T. D., Lund F. E., Howard M. C., Weissman I. L. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Blood*. 1996. Vol. 87. P. 4057–4067.

235. Rantz S., Bauersachs J., Ertl G. Post-infarct remodeling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc. Research*. 2009. Vol. 81, № 3. P. 474–481.

236. Ratajczak M. Z., Ratajczak J., Skorska M. Effect of basic (FGF-2) and acidic (FGF-1) fibroblast growth factors on early haemopoietic cell development. *Br. J. Haematol.* 1996. Vol. 93, № 4. P. 772–782.

237. Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C. J., Bovenkerk J. E., Pell C. L., Johnstone B. H., Considine R. V., March K. L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004. Vol. 109, № 10. P. 1292–1298.

238. Ren J., Samson W. K., Sowers J. R. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1999. Vol. 31, № 11. P. 2049–2061.

239. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *J. Biol. Chem.* 1966. Jan. 10. Vol. 241, № 1. P. 130–139.

240. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 1964. Vol. 239. P. 375–380.

241. Romson J. L., Hook B. G., Kunkel S. L., Abrams G. D., Schork M. A., Lucchesi B. R. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*. 1983. Vol. 67, № 5. P. 1016–1023.
242. Rossen R. D., Michael L. D., Hawkins H. K., Youker K., Dreyer W. J., Baughn R. E., Entman M. L. Cardiolipin-protein complexes and initiation of complement activation after coronary after occlusion. *Circ . Res*. 1994. Vol. 75, № 3. P. 546–555.
243. Rubio D., GarciaCastro J., Martin M.C. Spontaneous human stem cell transformation. *Cancer Res*. 2005. Vol. 65. P. 3035–3039.
244. Rumyantsev P. P. Ultrastructural reorganization, DNA synthesis, and mitotic division of myocytes in atria of rats with left ventricle infarction. *Virchows Arch*. 1974. Vol. 15. P. 357–378.
245. Sabelström H., Stenudd M., Frisén J. Neural stem cells in the adult spinal cord. *Exp. Neurol*. 2014. Oct. Vol. 260. P. 44–49.
246. Saito T., Kuang J. Q., Lin C. C., Chiu R. C. Transcoronary implantation of bone marrow stromal cells ameliorates cardiac function after myocardial infarction. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2003. Jul. Vol. 126, № 1. P. 114–123. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(03\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(03)00118-1).
247. Salem H. K., Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010. Vol. 28. P. 585–596.
248. Sambasivan R., Tajbakhsh S. Adult skeletal muscle stem cells. *Results Probl. Cell Differ*. 2015. Vol. 56. P. 191–213.
249. Sandstedt J., Jonsson M., Dellgren G., Lindahl A., Jeppsson A., Asp J. Human C-kit+CD45- cardiac stem cells are heterogeneous and display both cardiac and endothelial commitment by single-cell qPCR analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2014. Jan. 3. Vol. 443, № 1. P. 234–238.
250. Sandstedt J., Jonsson M., Lindahl A., Jeppsson A., Asp J. C-kit+ CD45- cells found in the adult human heart represent a population of endothelial progenitor cells. *Basic Res. Cardiol*. 2010. Jul. Vol. 105, № 4. P. 545–556. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0088-1>.

251. Saraste A., Pulkki K., Kallajoki M., Heikkilä P., Laine P., Mattila S., Nieminen M. S., Parvinen M., Voipio-Pulkki L. M. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur. J. Clin. Invest.* 1999. Vol. 29, № 5. P. 380–386.

252. Sarrach S., Huang Y., Niedermeyer S., Hachmeister M., Fischer L., Gille S., Pan M., Mack B., Kranz G., Libl D., Merl-Pham J., Hauck S. M., Paoluzzi Tomada E., Kieslinger M., Jeremias I., Scialdone A., Gires O. Spatiotemporal patterning of EpCAM is important for murine embryonic endo- and mesodermal differentiation. *Scientific reports*. 2018. Vol. 8, №1. P. 1801. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20131-8>.

253. Scansen Brian A. Coronary artery anomalies in animals. *Vet. Sci.* 2017. Vol. 4, № 2. P. 20. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci4020020>.

254. Schroeder J. A., Thompson M. C., Gardner M. M., Gendler S. J. Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 13057–13064. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M011248200>.

255. Schumacher B., Pecher P., von Specht B. U., Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation*. 1998. Vol. 97, № 7. P. 645–650.

256. Seita J., Weissman I. L. Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*. 2010. Vol. 2, № 6. P. 640–653. DOI: <https://doi.org/10.1002/wsbm.86>.

257. Sengenès C., Lolmède K., Zakaroff-Girard A., Busse R., Bouloumié A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J. Cell Physiol.* 2005. Vol. 205, № 1. P. 114–122.

258. Shake J. G., Gruber P. J., Baumgartner W. A., Senechal G., Meyers J., Redmond J. M., Pittenger M. F., Martin B. J. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann. Thorac. Surg.* 2002. Vol. 73, № 6. P. 1919–1925.

259. Shinde A. V., Frangogiannis N. G. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2014. May. Vol. 70. P. 74–82.

260. Shvitiel S., Kollet O., Lapid K., Schajnovitz A., Goichberg P. CD45 regulates retention, motility, and numbers of hematopoietic progenitors, and affects osteoclast remodeling of metaphyseal trabecules. *J. Exp. Med.* 2008. Vol. 205. P. 2381–2395.

261. Shi-Wen X., Chen Y., Denton C. P., Eastwood M., Renzoni E. A., Bou-Gharios G., Pearson J. D., Dashwood M., du Bois R. M., Black C. M., Leask A., Abraham D. J. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol. Biol. Cell.* 2004. Vol. 15, № 6. P. 2707–2719.

262. Shuzo Okuno, Hiroyuki Nakase, Toshisuke Sakaki Comparative study of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) and hematoxylin–eosin staining for quantification of early brain ischemic injury in cats. *Neurological Research.* 2001. Vol. 23, № 6. P. 657–661.

263. Sidney L. E., Branch M. J., Dunphy S. E., Dua H. S., Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 2014. Vol. 32, № 6. P. 1380–1389.

264. Silver L. H., Hemwall E. L., Marino T. A., Houser S. R. Isolation and morphology of calcium-tolerant feline ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 1983. Vol. 245, № 5. Pt 1. P. H891–H896.

265. Simmons P. J., Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood.* 1991. Vol. 78. P. 2848–2853.

266. Simon C., Pellicer A. *Stem Cells in Human Reproduction: Basic Science and Therapeutic Potential.* Ed. 2nd. London: Informa Healthcare, 2009. 269 p.

267. Smith R. R., Barile L., Messina E., Marbán E. Stem cells in the heart: what's the buzz all about? Part 1: preclinical considerations. *Heart Rhythm.* 2008. Vol. 5, № 5. P. 749–757.

268. Sobhani Aligholi, Khanlarkhani Neda, Baazm Maryam, Mohammadzadeh Farzaneh, Najafi Atefeh, Mehdinejadi Shayesteh, Sargolzaei Fereydoon. Aval Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Medica Iranica*. 2017. Vol. 55, № 1. P. 6–23.
269. Spangrude G. J., Heimfeld S., Weissman I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988. Vol. 241, № 4861. P. 58–62.
270. Stanley W., Lopaschuk G., Hall J. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischemic conditions. *Cardiovasc. Res*. 1997. Vol. 33. P. 243–257.
271. Sudo T., Yokota T., Oritani K., Satoh Y., Sugiyama T., Ishida T., Shibayama H., Ezoe S., Fujita N., Tanaka H., Maeda T., Nagasawa T., Kanakura Y. The endothelial antigen ESAM monitors hematopoietic stem cell status between quiescence and self-renewal. *J. Immunol*. 2012. Jul. 1. Vol. 189, №1. P. 200–210.
272. Sugiyama T., Nagasawa T. Bone Marrow Niches for Hematopoietic Stem Cells and Immune Cells. *Inflamm. Allergy Drug Targets*. 2012. Vol. 11, № 3. P. 201–206.
273. Sutton M. G., Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000. Vol. 101, № 25. P. 2981–2988.
274. Taghavi S., George J. C. Homing of stem cells to ischemic myocardium. *American Journal of Translational Research*. 2013. Vol. 5, № 4. P. 404–411.
275. Tajima F., Deguchi T., Laver J. H., Zeng H., Ogawa M. Reciprocal expression of CD38 and CD34 by adult murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 2001. Vol. 97. P. 2618–2624.
276. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861–72.

277. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006. Vol. 126, № 4. P. 663–676.

278. Takakura N., Huang X. L., Naruse T., Hamaguchi I., Dumont D. J., Yancopoulos G. D., Suda T. (1998). Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. *Immunity* Vol. 9, pp 677-686.

279. Takeshita S. Zheng L. P., Brogi E., Kearney M., Pu L. Q., Bunting S., Ferrara N., Symes J. F., Isner J. M. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J. Clin. Invest.* 1994. Vol. 93, № 2. P. 662–670.

280. Talman V., Ruskoaho H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell and Tissue Research*. 2016. Vol. 365, № 3. P. 563–581. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2431-9>.

281. Tanaka M., Ito H., Adachi S. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 1994. Vol. 75. P. 426–433.

282. Tang Q. Q., Lane M. D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu. Rev. Biochem.* 2012. Vol. 81. P. 715–736.

283. Tassi E., Al-Attar A., Aigner A., Swift M. R., McDonnell K., Karavanov A., Wellstein A. Enhancement of fibroblast growth factor (FGF) activity by an FGF-binding protein. *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 43. P. 40247–40253.

284. Thie H., Toleikis L., Li J., von Wasielewski R., Bastert G., Schirrmann T., Esteves I. T., Behrens C. K., Fournes B., Fournier N., de Romeuf C., Hust M., Dübel S. Rise and fall of an anti-MUC1 specific antibody. *Plos one*. 2011. Vol. 6, № 1. P. e15921. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015921>.

285. Thompson J. A., Grunert F., Zimmermann W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.* 1991. Vol. 5, № 5. P. 344–366.

286. Untergasser G., Koeck R., Wolf D., Rumpold H., Ott H. CD34+/CD133-circulating endothelial precursor cells (CEP): characterization, senescence and in vivo application. *Exp. Gerontol.* 2006. Vol. 41. P. 600–608.
287. Urbanek K., Torella D., Sheikh F. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102, № 24. P. 8692–8697.
288. Van den Borne S. W., Diez J., Blankesteyn W. M., Verjans J., Hofstra L., Narula J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* 2010. Jan. Vol. 7, № 1. P. 30–37.
289. Van R. L., Bayliss C. E., Roncari D. A. Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. *J. Clin. Invest.* 1976. Vol. 58. P. 699–704.
290. Vasa M., Fichtlscherer S., Adler K. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001. Vol. 103. P. 2885–2890.
291. Vu C. Q., Lu P. J., Chen C. S., Jacobson M. K. 2'-Phospho-cyclic ADPribose, a calcium-mobilizing agent derived from NADP. *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 4747–4754.
292. Wakao S., Kitada M., Kuroda Y., Shigemoto T., Matsuse D., Akashi H. Multilineage-differentiating stressenduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. Vol. 108. P. 9875–9880.
293. Waller E. K., Olweus J., Lund-Johansen F. et al. The "common stem cell" hypothesis reevaluated: Human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood.* 1995. Vol. 85. P. 2422–2435.
294. Wang H. S., Hung S. C., Peng S. T., Huang C. C., Wei H. M., Guo Y. J., Fu Y. S., Lai M. C., Chen C. C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004. Vol. 22, № 7. P. 1330–1337.

295. Wang X. J., Li Q. P. The roles of mesenchymal stem cells (MSCs) therapy in ischemic heart diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Jul. 27. Vol. 359, №2. P. 189–193.
296. Wang X., Hu Q., Nakamura Y., Lee J., Zhang G., From A. H., Zhang J. The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells.* 2006. Vol. 24, №7. P. 1779–1788.
297. Waters M. J., Brooks A. J. Growth hormone and cell growth. *Endocr. Dev.* 2012. Vol. 23. P. 86–95.
298. Wei X., Xu H., Kufe D. Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell.* 2005. Vol. 7. P. 167–178.
299. West J. B. Cardiac energetics and myocardial oxygen consumption. *Best and Taylor's physiologic basis of medical practice* / Eds. Charles Herbert Best, Norman Burke Taylor, John B. West. Baltimore, Maryland, USA: Williams and Wilkins, 1991. P. 250–260.
300. Wiedemann A., Hemmer K., Bernemann I., Göhring G., Pogozhykh O., Figueiredo C., Glage S., Schambach A., Schwamborn J. C., Blasczyk R., Müller T. Induced pluripotent stem cells generated from adult bone marrow-derived cells of the nonhuman primate (*Callithrix jacchus*) using a novel quad-cistronic and excisable lentiviral vector. *Cell Reprogram.* 2012. Dec. Vol. 14, № 6. P. 485–496.
301. William J. B., Prabakaran R., Ayyappan S., Puskinraj H., Rao D. Functional recovery of spinal cord injury following application of intralesional bone marrow mononuclear cells embedded in polymer scaffold –two year follow-up in a canine. *J. Stem Cell Res. Ther.* 2011. Vol. 1. P. 110.
302. Wilson A., Laurenti E., Oser G., van der Wath R. C., Blanco-Bose W., Jaworski M., Offner S., Dunant C. F., Eshkind L., Bockamp E., Lio P., Macdonald H. R., Trumpp A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell.* 2008. Vol. 135. P. 1118–1129.
303. Wilson A., Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 2006. Vol. 6. P. 93–106.

304. Wollert K. C., Heineke J., Westermann J., Lüdde M., Fiedler B., Zierhut W., Laurent D., Bauer M. K., Schulze-Osthoff K., Drexler H. The cardiac Fas (APO-1/CD95) Receptor/Fas ligand system : relation to diastolic wall stress in volume-overload hypertrophy in vivo and activation of the transcription factor AP-1 in cardiac myocytes. *Circulation*. 2000. Mar. 14. Vol. 101, № 10. P. 1172–1178.
305. Xue S., Zhang H. T., Zhang P., Luo J., Chen Z. Z., Jang X. D., Xu R. X. Functional endothelial progenitor cells derived from adipose tissue show beneficial effect on cell therapy of traumatic brain injury. *Neurosci Lett*. 2010. Apr. 12. Vol. 473, № 3. P. 186–191.
306. Yasojima K., Kilgore K. S., Washington R. A., Lucchesi B. R., McGeer P. L. Complement gene expression by rabbit heart: upregulation by ischemia and reperfusion. *Circ. Res*. 1998. Vol. 82, № 11. P. 1224–1230.
307. Yoder M. C. Endothelial progenitor cell: A blood cell by many other names may serve similar functions. *J. Mol. Med. (Berl)*. 2013. Vol. 91. P. 285–295.
308. Yoder M. C. Endothelial stem and progenitor cells (stem cells): (2017 Grover Conference Series). *Pulm. Circ*. 2018. Jan. Vol. 8, № 1. DOI: <https://doi.org/10.1177/2045893217743950>.
309. Yokota T., Huang J., Tavian M., Nagai Y., Hirose J., Zúñiga-Pflücker J. C., Péault B., Kincade P. W. Tracing the first waves of lymphopoiesis in mice. *Development*. 2006. Vol. 133. P. 2041–2051.
310. Yu J., Vodyanik M., Smuga-Otto K. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007. Vol. 318, № 5858. P. 1917–1920.
311. Zhang D., Wu C. T., Qi X., Meijering R. A., Hoogstra-Berends F., Tadevosyan A., Cubukcuoglu Deniz G., Durdu S., Akar A. R., Sibon O. C., Nattel S., Henning R. H., Brundel B. J. Activation of histone deacetylase-6 induces contractile dysfunction through derailment of α -tubulin proteostasis in experimental and human atrial fibrillation. *Circulation*. 2014. Vol. 129, № 3. P. 346–358. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005300>.
312. Zhang H., Tao Y., Ren S., Liu H, Zhou H, Hu J, Tang Y, Zhang B, Chen H. Isolation and characterization of human umbilical cord-derived endothelial

colony-forming cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017. Vol. 14, № 5. P. 4160–4166. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5035>.

313. Zhou J., Zhang Y., Wen X., Cao J., Li D., Lin Q., Wang H., Liu Z., Duan C., Wu K., Wang C. Telocytes accompanying cardiomyocyte in primary culture: two- and three-dimensional culture environment. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010. Vol. 14, № 11. P. 2641–2645.

314. Zhou L., Xia J., Qiu X., Wang P., Jia R., Chen Y., Yang B., Dai Y. *In vitro* evaluation of endothelial progenitor cells from adipose tissue as potential angiogenic cell sources for bladder angiogenesis. *Plos One*. 2015. Vol. 10, № 2. P. e0117644.

315. Zhou Q., Wei L., Zhong C., Fu S., Bei Y., Huică R. I., Wang F., Xiao J. Cardiac telocytes are double positive for CD34/PDGFR- α . *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015. Vol. 19, № 8. P. 2036–2042.

316. Zou P., Yoshihara H., Hosokawa K., Tai I., Shinmyozu K., Tsukahara F., Maru Y., Nakayama K., Nakayama K. I., Suda T. p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell*. 2011. Vol. 9. P. 247–261.

317. Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001. Vol. 7. P. 211–228.

Додатки

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. Режим доступу до статті: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/6841> *(Здобувачем досліджено зміни морфології клітин щура у кардіоміогенному напрямку за дії 5-азацитидину).*

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. Режим доступу до статті: <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., **Kovpak O.**, 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

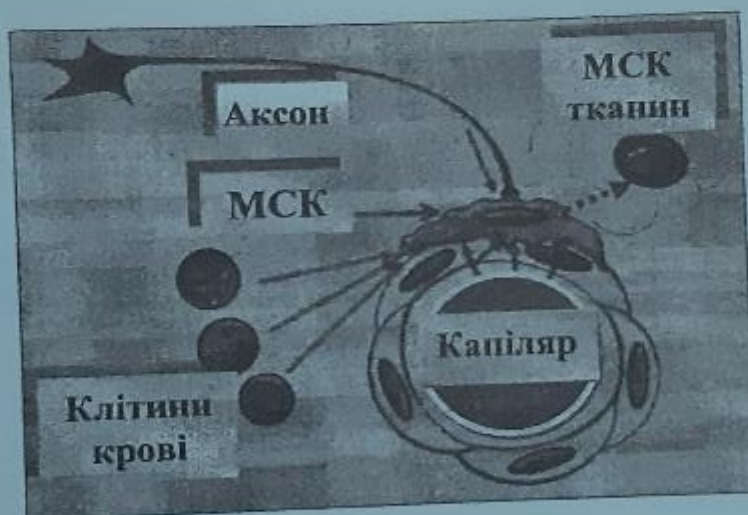
11. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Данілов В. Б., Стародуб Л. В., Ковпак В. В., Кладницька Л. В., Харкевич Ю. О., Бобось О. Л., Кляп Н. І., Бокотько Р. Р., Савчук Т. Л., **Ковпак О. С.** Методи видоспецефічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній терапії: [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»).*



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

МЕТОДИ ВИДОСПЕЦИФІЧНОЇ ОЦІНКИ
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ У
ВЕТЕРИНАРНІЙ КЛІТИННІЙ РЕГЕНЕРАТИВНІЙ
ТЕРАПІЇ

НАУКОВО-МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ



КИЇВ – 2017

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор Львівського
національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького

доцент

І.Б. Турко

2019 р.



АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертації
у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертації на тему: **«Інфаркт міокарда у тварин (морфофункціональні зміни та відновлювальні процеси за впливу стовбурових)»**, які представлені на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», виконаної **Ковпак Оксаною Сергіївною**, розглянуто на засіданні кафедри нормальної та патологічної фізіології імені С.В. Стояновського. Використовуються у навчальну процесі при викладанні дисципліни «Патофізіологія тварин» підготовці студентів другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальності 211 – «Ветеринарна медицина», у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького та у науковій роботі кафедри (протокол № 7 від 17.01.2019р.).

Завідувач кафедри нормальної
та патологічної фізіології
імені С. В. Стояновського,
доктор ветеринарних наук, професор

В. Г. Стояновський

Затверджую

Проректор з наукової та інноваційної
діяльності Білоцерківського
національного аграрного університету,
доктор економічних наук, професор



О. М. Варченко

2019 р.

А К Т

про впровадження результатів кандидатської дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи **Ковпак Оксани Сергіївни** на тему: **«Інфаркт міокарда у тварин (морфофункціональні зміни та відновлювальні процеси за впливу стовбурових клітин)»**, що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Патофізіологія тварин» стосовно впливу стовбурових клітин на відновлювальні процеси у міокарді за ішемічного інфаркту на кафедрі нормальної та патологічної фізіології тварин фахівців ОПР «Бакалавр» зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Білоцерківському національному аграрному університеті.

Затверджені на засіданні кафедри протокол № 1 від 10.02.2019р.

Професор кафедри нормальної
та патологічної фізіології тварин,
доктор ветеринарних наук

М. П. Ніщенко

ЗАТВЕРДЖУЮ

**Перший проректор Львівського
національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького,
кандидат біологічних наук, доцент**



І.Б. Турко

«17» *сигма* 2019 р.

АКТ

**про впровадження результатів кандидатської дисертації
у навчальний процес**

Даним актом стверджується, що результати дисертації на тему: **«Інфаркт міокарда у тварин (морфофункціональні зміни та відновлювальні процеси за впливу стовбурових клітин)»**, що представлені на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», виконаної **Ковпак Оксаною Сергіївною**, розглянуто на засіданні кафедри хірургії та використовуються у навчальну процесі при викладанні дисципліни «Хірургічні хвороби тварин з анестезіологією» за підготовки фахівців ОКР «Магістр» із спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького (протокол № 1 від 16.01.2019 р.).

**Завідувач кафедри хірургії,
доктор ветеринарних наук,
професор**

А. Р. Мисак

Затверджую

Перший проректор

Харківської державної
зооветеринарної академії
Д.В. Кібкало
«18» січня 2019 р.

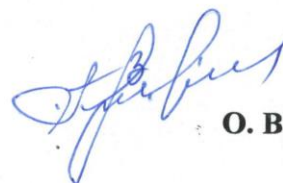
АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертації
у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертації на тему: «Інфаркт міокарда у тварин (морфофункціональні зміни та відновлювальні процеси за впливу стовбурових клітин)», що представлені на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин» виконаної **Ковпак Оксаною Сергіївною**, впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Патологічна фізіологія» стосовно впливу стовбурових клітин на відновлювальні процеси у міокарді за ішемічного інфаркту у підготовці фахівців ОС «Бакалавр» та «Магістр» із спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» в Харківській державній зооветеринарній академії.

Розглянуто на засіданні кафедри нормальної і патологічної фізіології тварин № 7 від 18 січня 2019 р.

Декан факультету
ветеринарної медицини,
кандидат ветеринарних наук, доцент




О. В. Митрофанов

Завідувач кафедри нормальної і
патологічної фізіології тварин,
доктор ветеринарних наук, професор



І. О. Жукова

Головний лікар приватного кабінету
лікаря ветеринарної медицини,
ФОП Деркач м. Київ, Дніпровський р-н,
проспект Соборності 5-Б


_____ К.О. Деркач
«25» листопада 2018 р.

АКТ

впровадження результатів кандидатської дисертаційної роботи у ветеринарну практику

Складений у тому, що матеріали дисертаційної роботи «Інфаркт міокарда у тварин (морфофункціональні зміни та відновлювальні процеси за впливу стовбурових клітин)», аспірантки кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України **Ковпак Оксани Сергіївни**, використовуються у практичній діяльності приватного кабінету лікаря ветеринарної медицини з метою відновлення ушкоджених тканин за допомогою стовбурових клітин.

Головний лікар



К.О. Деркач



ТОВ "BIOTEXCOM"
04107, Україна, м. Київ, вул. Отто Шмідта, 2/6, тел: (+38) 044 592 66 03
www.biotexcom.com

АКТ
впровадження результатів
кандидатської дисертаційної роботи у практичну діяльність

Складений у тому, що окремі матеріали дисертаційної роботи **«Інфаркт міокарда у тварин (морфофункціональні зміни та відновлювальні процеси за впливу стовбурових клітин)»**, аспіранта кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України **Ковпак Оксани Сергіївни**, використовуються у практичній діяльності медичного центру ТОВ «ВіотексКом».

Директор



Дорошенко О.В.



BioTexCom
center for human reproduction

0000279

Директор приватної клініки

ветеринарної медицини

"Дунай", м. Київ,

проспект Академіка Глушкова, 2, К 12



М. Ф. Панько

«26» жовтня 20 18 р.

АКТ

впровадження результатів

кандидатської дисертаційної роботи у ветеринарну практику

Складений у тому, що матеріали дисертаційної роботи **«Інфаркт міокарда у тварин (морфофункціональні зміни та відновлювальні процеси за впливу стовбурових клітин)»**, здобувача кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України **Ковпак Оксани Сергіївни**, використовуються у практичній діяльності клініки ветеринарної медицини "Дунай" з метою відновлення ушкоджених тканин за допомогою стовбурових клітин.




Директор,
кандидат ветеринарних наук, доцент

М. Ф. Панько

Головний лікар приватної клініки
ветеринарної медицини

“Рижик”, ФОП Кирда М.В., м. Київ,
вул. Волгоградська 10 -а

 М. В. Кирда

«25» *листопада* 20 *18* р.

вих. № 10 від 25.10.18

АКТ

впровадження результатів

кандидатської дисертаційної роботи у ветеринарну практику

Складений у тому, що матеріали дисертаційної роботи «Інфаркт міокарда у тварин (морфофункціональні зміни та відновлювальні процеси за впливу стовбурових клітин)», здобувача кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України **Ковпак Оксани Сергіївни**, використовуються у практичній діяльності клініки ветеринарної медицини “Рижик” з метою відновлення ушкоджених тканин за допомогою стовбурових клітин.

Головний лікар

