

УДК 576.535:[611.018.26+616.419+616.37]: 636.8

МАЗУРКЕВИЧ А.Й., д-р вет. наук, проф., e-mail: a.mazurkevich@nubip.edu.ua,**КОВПАК В.В.**, канд. вет. наук, старший викладач, e-mail: vitkovpak@ukr.net,**КОВПАК О.С.***, e-mail: kovpak8887@gmail.com*Національний університет біоресурсів і природокористування України***ГУДЗЬ Н.В.**, канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: gudznataly@gmail.com*Інститут ветеринарної медицини НААН*

ПОРІВНЯННЯ ЗМІН ФЕНОТИПУ У КУЛЬТУРАХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ, КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ КОТІВ З ПАСАЖАМИ

У статті описаний моніторинг фенотипу культур клітин жирової тканини, кісткового мозку та підшлункової залози з першого до п'ятого пасажу. Дослідження показали, що первинні культури вказаних тканин морфологічно гетерогенні, до їх складу входили: невелика кількість полігональних клітин дифузно розміщених серед фібробластоподібних клітин, що склали основний відсоток клітин культури. Варто зазначити, що відношення полігональних клітин до фібробластоподібних у досліджуваних культурах було різне. У процесі культивування спостерігали збільшення відсотку фібробластоподібних клітин, що призводило до гомогенізації клітинного складу культур з пасажами. Дослідження імунотипу культур клітин кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози також показало відмінності, які не зникали у процесі культивування.

Ключові слова: культура клітин котів, кістковий мозок, жирова тканина, підшлункова залоза, імунотипування, морфологія, CD-маркери.

Вступ. Цукровий діабет 1 типу (або інсулінозалежний ЦД) – хронічне ендокринно-обмінне захворювання, зумовлене абсолютною недостатністю інсуліну внаслідок поєданого впливу різних ендогенних (генетичних) та екзогенних чинників. У тварин цукровий діабет виникає в результаті численних причин, які порушують продукцію інсуліну, його транспортування або ж чутливість тканин до інсуліну [1]. За останні роки у ветеринарній практиці часто зустрічається цукровий діабет у собак та котів [2–6].

Зважаючи на те, що однією із важливих ланок патогенезу цукрового діабету є загибель бета-клітин та на недоліки сучасних методів лікування ЦД 1 із застосуванням інсулінотерапії, стимулюється розвиток і вдосконалюються методи клітинної терапії [7–9].

На сьогодні в якості джерела стовбурових клітин дорослих донорів досить добре досліджено кістковий мозок. Кістковий мозок – єдина тканина дорослого організму, яка в нормі складається з незрілих, недиференційованих і низько диференційованих клітин, так званих стовбурових клітин [10].

Альтернативним джерелом отримання клітинного матеріалу є жирова тканина, з якої вони можуть бути отримані за допомогою менш інвазивних

* Науковий керівник – д-р вет. наук, професор **Мазуркевич А.Й.**

методів у значно більших кількостях, у порівнянні з кістковим мозком. Стовбурові клітини, що містяться у жировій тканині, мультипотентні [11, 12].

Проте не варто забували за інші джерела отримання β -клітин, а саме підшлункову залозу, яка є безпосереднім джерелом острівців Лангерганса [13].

Тому наше дослідження представляє порівняння фенотипових ознак клітин різного походження задля створення експериментальної системи оцінки оптимального джерела клітинного матеріалу для лікування цукрового діабету.

Мета роботи: порівняти фенотипові зміни культур клітин жирової тканини (ККЖТ), кісткового мозку (КККМ) та підшлункової залози (ККПЗ) котів з першого до п'ятого пасажу.

Матеріали і методи дослідження. У досліді для отримання культур клітин використовували жирову тканину, кістковий мозок та підшлункову залозу котів. Матеріал отримували паралельно, під час планових хірургічних операцій. Всі маніпуляції з тваринами здійснювалися за попередньої згоди господарів та з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року).

Отримання культури клітин жирової тканини (ККЖТ) здійснювали з підшкірної жирової клітковини дорослих кішок під час планової гістеректомії за стандартною методикою [14–16] у власній модифікації. КККМ отримували переважно з кісткового мозку стегнових кісток дорослих котів за стандартною методикою [16, 17]. ККПЗ добували із підшлункової залози завмерлих плодів кошенят, що залишалися після надання рододопомоги модифікованим методом експланту [16]. Одержану клітинну масу культивували у стандартному середовищі: 80 % – DMEM; 20% – FBS; 10 мкл/см³ – антибіотика-антимікотика (“Sigma”, США); у CO₂ інкубаторі за 37 °C та 5% концентрації CO₂ [17], до конфлюентності 90–100%.

Клітини знімали за стандартною методикою (розчином 0,25% трипсин/ЕДТА) [17]. Подальше пасажування здійснювалось у розведенні 1:3. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Контроль зміни фенотипу проводили шляхом виявлення CD-маркерів (CD10, CD38, CD34, CD45, CD48, CD54, CD56, CD66e, CD96, CD227, CD326, CD пан-кератин). Підготовку препаратів здійснювали за стандартною методикою) [16]. Аналіз результатів проводили за кількістю клітин з експресією (зелене світіння клітин) та оцінювали 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 білка; 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 [18]. Дослідження здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа Leica DMR (Німеччина).

Результати досліджень та їх обговорення. Порівняльна характеристика морфології культур клітин жирової тканини, кісткового мозку та підшлункової залози kota. Первинні культури адгезивних клітин всіх досліджуваних культур клітин (жирової тканини, кісткового мозку, підшлункової залози) kota характеризувалася морфологічною гетерогенністю.

Протягом декількох днів, після висівання спостерігали значну кількість слабоадгезивних округлих клітин, які видалялись у процесі пасажування. Починаючи з 3-го дня для ККМ, 5-го – для ККЖТ та ККПЗ відмічали рівномірний ріст фібробластоподібних клітин. Первинна ККЖТ досягала конфлюентності 90–100% у середньому за 12 днів (рис. 1, а), ККПЗ – за 14 днів (рис. 1, б) ККМ – за 8 днів (рис. 1, в).

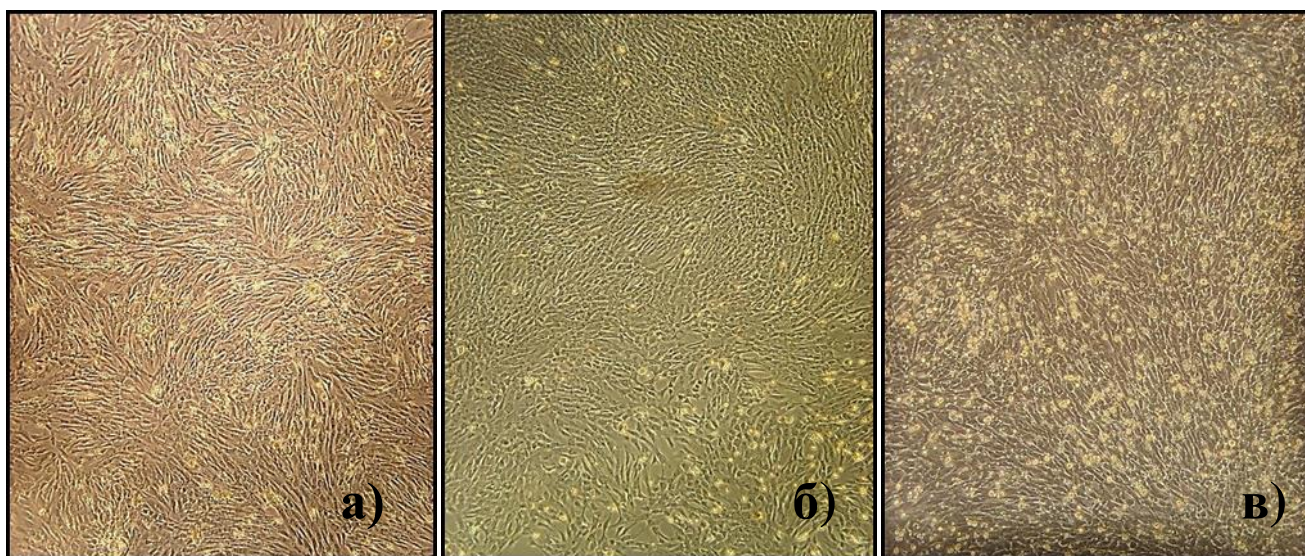


Рис. 1. Мікрофотографія культур клітин kota *in vitro*, 0 пасаж а) жирової тканини, 12 доба від початку культивування; б) підшлункової залози – 14 доба; в) кісткового мозку – 8 доба. Нативний препарат, 3б.×50.

В процесі субкультивування час досягнення конфлюентності 70–80% становив 4 доби для ККПЗ, тоді як для ККМ даний час складав в середньому 3 доби протягом всіх 5 пасажів. Для ККЖТ вказана конфлюентність досягалася за 4 доби на 1–3 пасажах та збільшувалась до 6 доби на 4–5. На першому пасажі відмічали гетерогенність усіх досліджуваних культур у їх склад входили: невелика кількість клітин полігональної форми та фібробластоподібні клітини. З кожним пасажем кількість клітин полігональної форми у досліджуваних культурах зменшувалась. Варто зазначити, що у ККПЗ відсоток клітин полігональної форми значно перевищував такий як у ККМ, так і у ККЖТ.

На п'ятому пасажі відмічали найбільший гомогенний склад культур, їх морфологія характеризувалася переважно фібробластоподібною структурою (рис. 2).

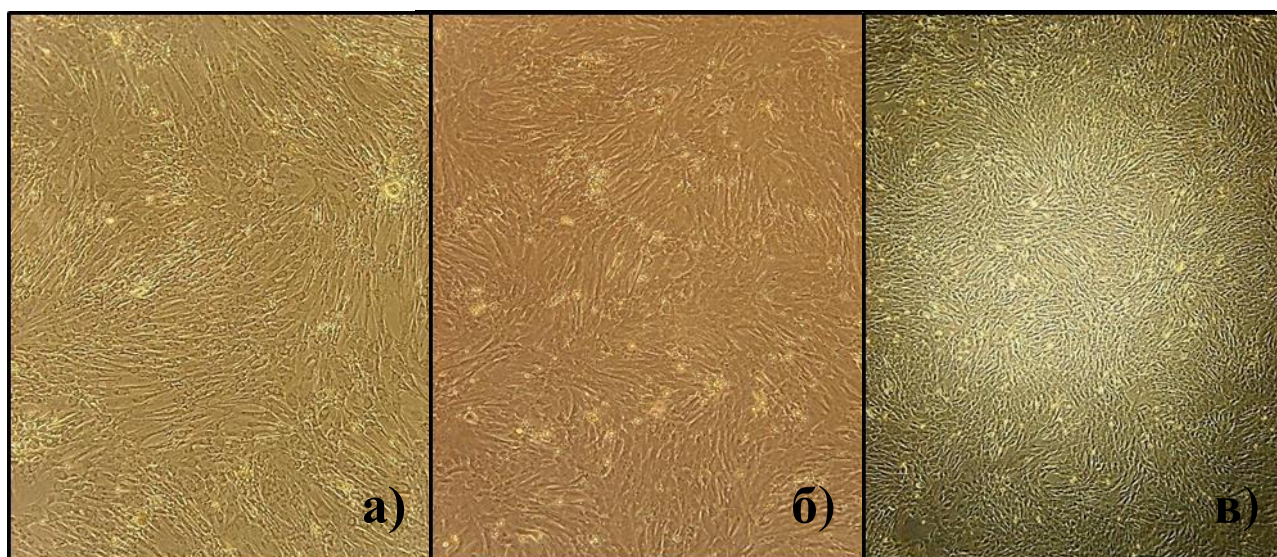


Рис. 2. Мікрофотографія культур клітин kota *in vitro*, 5 пасаж: а) жирової тканини; б) підшлункової залози; в) кісткового мозку. Нативний препарат, 36.×50.

Характеристика культур клітин кісткового мозку, підшлункової залози та жирової тканини за CD-маркерами. Дослідження культур клітин показали відмінності у їх імунофенотипі, які не зникали з пасажами (табл. 1 та 2). Більш докладно зміни експресії досліджуваних CD-маркерів у зразках розглянемо нижче.

CD10 або ж нейтральна ендопептидаза відноситься до родини металопротеїназ [19], ступінь його експресії визначали як негативний упродовж всього періоду пасажування як у КККМ, так і ККПЗ, та низький на 4 та 5 пасажі у ККЖТ (табл. 1).

CD34 – трансмембранний мономерний глікопротеїн I типу, що опосередковує процеси міжклітинної адгезії. Він є маркером гемопоетичних стовбурових клітин, ендотеліальних клітин судин, ембріональних фібробластів [20]. Під час дослідження у КККМ відмічали незначне зниження його експресії з пасажами, у той час як у ККЖТ відмічали різке зниження ступеню прояву CD34 аж до негативного на п'ятому пасажі. У ККПЗ відмічали незначні коливання у прояві даного CD-маркера, проте його експресія не виходила за межі негативного рівня (табл. 1).

CD38 – одноланцюговий трансмембранний глікопротеїн II типу [21], його молекула виявляється посередником кількох різних видів діяльності, включаючи передачу сигналу, клітинної адгезії і синтезу циклічної АДФ-рибози [22]. На першому пасажі у КККМ відмічали найвищий рівень експресії CD38, який з пасажами знижувався. Даний факт може свідчити про найнижчий ступінь диференціації клітин у культурі на початку пасажування, який збільшується з тривалістю культивування. У ККЖТ та ККПЗ відмічали зворотну закономірність (табл. 1).

Таблиця 1

Порівняння зміни експресії CD-маркерів у популяції клітин виділених з жирової тканини, підшлункової залози та кісткового мозку kota з першого до п'ятого пасажу, $M \pm m$, $n=3$

| CD-маркери | Досліджувана культура клітин | Пасаж | | | | |
|------------|------------------------------|--|--------------|---------------|---------------|---------------|
| | | I | II | III | IV | V |
| | | Оцінка в балах за методом H-Score (від 0 до 300) | | | | |
| 10 | КККМ | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| | ККЖТ | 0,0 ± 0,0 | 16,7 ± 5,4* | 18,0 ± 5,2* | 94,3 ± 8,3*** | 62,3 ± 6,2*** |
| | ККПЗ | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| 34 | КККМ | 111,7 ± 7,9 | 105,3 ± 6,0 | 94,0 ± 5,8 | 91,7 ± 6,8 | 90,0 ± 5,8 |
| | ККЖТ | 148 ± 10,8 | 131,0 ± 18,0 | 86,3 ± 13,0* | 55,7 ± 7,7** | 31,7 ± 7,9** |
| | ККПЗ | 5,0 ± 1,2 | 9,3 ± 1,9 | 26,3 ± 6,8* | 29,3 ± 8,3* | 42,0 ± 12,8* |
| 38 | КККМ | 110,7 ± 6,2 | 92,7 ± 5,0 | 61,7 ± 10,6 * | 46,0 ± 9,2** | 23,3 ± 6,1*** |
| | ККЖТ | 9,3 ± 5,4 | 43,0 ± 6,4* | 49,7 ± 2,5** | 70,7 ± 7,2** | 73,7 ± 6,6** |
| | ККПЗ | 46 ± 7,6 | 64,0 ± 8,1 | 70,3 ± 8,3 | 99,7 ± 11,8* | 129,3 ± 17,6* |
| 45 | КККМ | 92,7 ± 4,5 | 83,0 ± 4,1 | 75,0 ± 3,5* | 65,3 ± 3,7** | 52,7 ± 9,7* |
| | ККЖТ | 13,7 ± 2,7 | 16,7 ± 3,7 | 14,7 ± 2,7 | 16 ± 2,3 | 76,3 ± 11,8** |
| | ККПЗ | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| 48 | КККМ | 60,1 ± 7,7 | 68,7 ± 6,6 | 77,3 ± 5,4 | 92,3 ± 5,4* | 106,7 ± 9,4* |
| | ККЖТ | 96,0 ± 15,7 | 59,3 ± 11,4 | 27,3 ± 5,4* | 7,3 ± 4,3** | 139,0 ± 6,4 |
| | ККПЗ | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| 54 | КККМ | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 6,3 ± 3,7 | 7,0 ± 4,1 |
| | ККЖТ | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 44,3 ± 8,3** | 62,7 ± 10,6** | 36,7 ± 4,8** |
| | ККПЗ | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ порівняно з контролем (контролем для кожного CD маркера виступав перший пасаж).

CD45 – трансмембранний глікопротеїн I типу, що належить до родини протеїн тирозин фосфатаз і експресується на всіх гемопоетичних клітинах, за винятком еритроцитів та тромбоцитів [23]. Даний факт може пояснювати достовірне зменшення експресії даного маркера в отриманій КККМ з 92,7 (I пасаж) до 52,7 (V пасаж) балів. Під час дослідження ККЖТ на перших пасажах відмічали незначну кількість клітин, що експресують CD45, що різко підвищився на 5 пасажі. Експресія CD45 характерна для жирової тканини [24, 25]. У ККПЗ даний кластер диференціювання дослідження не виявляли упродовж всього часу (табл. 1).

CD48 – трансмембранний глікопротеїн I типу, зв'язаний з клітинною мембраною за допомогою глікозит фосфатидилінозита [26]. CD48 експресований на деяких гемопоетичних та ендотеліальних клітинах. Приймає участь у активації і шляхах диференціації вказаних клітин. Під час дослідження відмічали достовірне зниження у ККЖТ експресії від низького до негативного ступеня, з різким підвищенням на 5 пасажі. У КККМ ступінь прояву CD48 достовірно збільшувався від низького до помірного. У ККПЗ даний кластер диференціювання дослідження не виявляли упродовж всього часу (табл. 1).

CD54 – одноланцюговий трансмембранний глікопротеїн I типу, який присутній на мембранах ендотеліальних клітин і має важливе значення для адгезії лейкоцитів [27]. Упродовж всього періоду культивування його експресії у КККМ відмічали негативний ступінь експресії, у ККПЗ відмічали відсутність його прояву. У ККЖТ прослідковувалося збільшення експресії CD54 на 3 (44,3 бали) та 4 (62,7 балів) пасажі з незначним зниженням на 5 (36,7 балів) (табл. 1).

CD56 – трансмембранний глікопротеїн I типу, ізоформа молекули клітинної адгезії нейронів, що опосередковує розвиток нервової тканини, маркер НК-клітин, плазматичних клітин [28]. Упродовж перших двох пасажів його експресії в ККЖТ виявлено не було, починаючи з третього пасажу рівень його достовірно збільшувався, проте не виходив за межі негативного. У КККМ відмічали поступове збільшення ступеня прояву даного маркера у культурі з піком на 5 пасажі (68,3 бали – I пасаж; 101,7 – V пасаж). У ККПЗ даний кластер диференціювання дослідження не виявляли упродовж всього часу (табл. 2).

Таблиця 2

Порівняння зміни експресії CD-маркерів у популяції клітин виділених з жирової тканини та кісткового мозку kota з першого по п'ятий пасаж, $M \pm m, n=3$

| CD-маркери | Досліджувана культура клітин | Пасаж | | | | |
|---------------|------------------------------|--|--------------|--------------|----------------|----------------|
| | | I | II | III | IV | V |
| | | Оцінка в балах за методом H-Score (від 0 до 300) | | | | |
| 56 | КККМ | 68,3 ± 7,9 | 71,3 ± 10,3 | 77,0 ± 9,2 | 84,3 ± 6,8 | 101,7 ± 7,7* |
| | ККЖТ | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 28,3 ± 9,7* | 45,7 ± 7,7** | 44,0 ± 6,4** |
| | ККПЗ | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| 66e | КККМ | 58,0 ± 10,5 | 69,0 ± 9,2 | 91,3 ± 2,5* | 98,3 ± 8,9* | 113,0 ± 11,0 |
| | ККЖТ | 0,0 ± 0,0 | 7,0 ± 4,1 | 20,0 ± 4,1** | 61,3 ± 6,0*** | 72,0 ± 7,0*** |
| | ККПЗ | 12 ± 2,3 | 30 ± 8,7 | 36,3 ± 10,8 | 47,3 ± 12,6* | 75,7 ± 12,0** |
| 95 | КККМ | 52,7 ± 4,5 | 71,3 ± 7,7 | 86,0 ± 5,2** | 108,0 ± 11,0** | 107,3 ± 14,3* |
| | ККЖТ | 102,7 ± 12,39 | 145,3 ± 11,8 | 26,3 ± 7,4** | 53,3 ± 14,1 | 67,3 ± 16,1 |
| | ККПЗ | 87,7 ± 11,4 | 102,7 ± 18,2 | 147,3 ± 21,3 | 166,7 ± 23,6* | 195,0 ± 26,7* |
| 227 | КККМ | 55,0 ± 4,6 | 64,3 ± 5,6 | 81,7 ± 2,5** | 88,0 ± 1,7** | 92,7 ± 4,5** |
| | ККЖТ | 0,0 ± 0,0 | 6,3 ± 3,7 | 21,0 ± 7,0* | 34,0 ± 8,7* | 65,7 ± 5,6*** |
| | ККПЗ | 46,0 ± 7,6 | 63,3 ± 14,1 | 74,7 ± 11,4 | 112,0 ± 7,6** | 126,3 ± 14,1** |
| 326 | КККМ | 92,7 ± 4,5 | 71,0 ± 12,8 | 52,7 ± 2,1* | 34,7 ± 6,0** | 25,0 ± 8,1** |
| | ККЖТ | 76,0 ± 5,2 | 65,7 ± 6,8 | 15,3 ± 5,6** | 26,7 ± 4,5** | 70,0 ± 8,1 |
| | ККПЗ | 15,7 ± 3,7 | 41,0 ± 13,4 | 51,3 ± 12,0* | 80,7 ± 8,5** | 116,0 ± 9,3*** |
| пан - кератин | КККМ | 234,3 ± 15,5 | 226,7 ± 13,6 | 216,3 ± 15,5 | 188,3 ± 6,8 | 172,3 ± 11,8* |
| | ККЖТ | 0,0 ± 0,0 | 19,0 ± 5,8* | 28,3 ± 3,9** | 60,7 ± 6,8*** | 84,3 ± 6,0*** |
| | ККПЗ | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |

Примітка: * – P<0,05; ** – P< 0,01; *** – P< 0,001 порівняно з контролем (контролем для кожного CD маркера виступав перший пасаж).

CD66e – глікозильований глікопротеїн поверхневої мембрани епітеліальних клітин, чим пояснюється його виявлення у більшості органів [29]. У ККЖТ та ККПЗ його експресія достовірно збільшувалась з першого (відсутність експресії) до п'ятого пасажу (низький рівень), відповідну

закономірність спостерігали і у КККМ від низького рівня на I пасажі (58,0 балів) до помірного на V (113,0 балів) (табл. 2).

CD95 – трансмембранний глікопротеїн д I типу, опосередковує сигнал, що ініціює апоптоз [30]. Починаючи з першого пасажу інтенсивність експресії даного маркера достовірно збільшується як у КККМ, так і ККПЗ, що корелює з сповільненням росту культури. У ККЖТ ступінь експресії CD95 був нерівномірний, що може пояснюватися нерівномірністю росту культури (табл. 2).

CD227 – трансмембранний глікопротеїн, що експресується епітеліальними та деякими гемопоетичними клітинами [31]. Гіперекспресія даного маркера призводить до трансформації клітин та нівелює стрес-індукований апоптоз через Akt або p53 каскади [32]. Під час дослідження нами відмічалось низький ступінь експресії CD227. У КККМ його рівень достовірно збільшувався від 55,0 балів – на першому пасажі; до 92,7 – на п'ятому. У ККЖТ спостерігали нижчий рівень експресії даного маркера ступінь його прояву збільшувався від негативного на першому пасажі до низького (65,7 балів) на п'ятому (табл. 2).

CD326 – трансмембранний глікопротеїн першого типу – маркер епітеліальних клітин. Клітини, що експресують даний маркер мають знижену потребу в факторах росту, спостерігають збільшення їх метаболічної активності і здатності до формування колоній [33]. У КККМ відмічали зниження експресії CD326 від низького до негативного ступеня. У ККЖТ відмічали зниження прояву даного маркера з першого (76,0 балів) до третього пасажу (15,3 бали) з поступовим відновленням початкової експресії на п'ятому (70,0 балів). У ККПЗ відмічали ріст прояву даного маркера від негативного рівня на першому пасажі (15,7 балів), до помірного – на п'ятому (116,0 балів) (табл. 2).

Кератин – входить до складу проміжних філаментів цитоскелета епітеліальних клітин [34]. Наявність позитивної реакції з даними антитілами свідчить про епітеліальне походження клітин [35]. Згідно наших досліджень рівень експресії кератину у ККЖТ зростав від 0 (I пасаж) до 84,3 балів (V пасаж), варто відмітити, що цитокератин був виявлений у жировій тканині і іншими науковцями [12, 36]. У КККМ відмічали достовірне зменшення даного білка з високого до помірного ступеня. У ККПЗ експресія кератину впродовж усього часу культивування не виявлялась (табл. 2).

Висновки та перспективи подальших досліджень. Результати наших досліджень показали, що первинна культура адгезивних клітин усіх досліджуваних культур складається з різних видів клітин, що пов'язано з різноманітністю вихідного пулу.

З пасажами відмічалось збільшення відсоткового вмісту фібробластоподібних клітин у досліджуваних культурах клітин.

Впродовж пасажування CD-профіль клітин у досліджуваних культурах змінювався, з певними закономірностями. Виходячи зі спектру використаних CD-маркерів, характерних для неспеціалізованих (низькодиференційованих) клітин, найнижчий рівень експресії відмічали у ККПЗ, дещо вищий у ККЖТ (у

порівнянні з КККМ) може свідчити про більший рівень універсальності культури клітин отриманої із кісткового мозку. Дана гіпотеза підтверджується сповільненням утворення моношару у культурах, у той час як у КККМ час досягнення конфлюентності 90–100% залишався стабільним.

Різний фенотип КККМ, ККЖТ та ККПЗ дозволить у подальшому використовувати їх у клітинній терапії та очікувати від них різного впливу за однакових умов.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Graham P. A. Canned high fiber diet and postprandial glycemia in dogs with naturally occurring diabetes mellitus / P. A. Graham, I. E. Maskell, A.S. Nash // *Journal of Nutrition*. – 1994. – №124. – P. 2712–2715.
2. Feldman E. C. Intensive 50 – week evaluation of glipizide administration in 50 cats with previously untreated diabetes mellitus / E. C. Feldman // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* – 1997. – Vol. 210, №6. – P. 772–777.
3. Goossens M. Response to insulin treatment and survival in 104 cats with diabetes mellitus (1985–1995) / M. Goossens // *J. Vet. Intern. Med.* – 1998. – Vol. 12, № 1. – P. 1–6.
4. Guptill L. Is canine diabetes on the increase? / L. Guptill // *In Recent Advances in Clinical Management of Diabetes Mellitus*, Iams Company. – 1999. – P. 24–27.
5. Marmor M. Epidemiologic patterns of diabetes mellitus in dogs / M. Marmor, P. Willeberg, L. T. Glickman, W. A. Priester // *American Journal of Veterinary Research*. – 1982. – № 43. – P. 465–470.
6. Panciera D. L. Epidemiologic patterns of diabetes mellitus in cats: 333 cases (1980–1986) / D. L. Panciera // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* – 1990. – Vol. 197, № 11. – P. 1504–1508.
7. Балаболкин М. И. Диабетология / М. И. Балаболкин – М.: Медицина, 2000. – 673 с.
8. Дедов И. И. Болезни органов эндокринной системы. – М.: Медицина, 2000. – С. 149–252.
9. Hussain M. A. Stem-cell therapy for diabetes mellitus / M. A. Hussain, N. D. Theise // *Lancet*. – 2004. – Vol. 364. – P. 203–205.
10. Ningning He. Bone Marrow Vascular Niche: Home for Hematopoietic Stem Cells / He Ningning, Zhang Lu, Cui Jian et al // *Hindawi Publishing Corporation: Bone Marrow Research*. – 2014. – Article ID 128436, 8 pages.
11. Guilak F. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells / F. Guilak, K. E. Lott, H. A. Awad, et al. // *J. Cell Physiol.*, 2006. – № 206. – P. 229–237.
12. Zuk P. A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, et al. // *Tissue Eng.* – 2001. – №7. – P. 211–228.
13. Dor Y. Adult pancreatic b-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation / Y. Dor, J. Brown, O.I. Martinez, D.A. Melton // *Nature*. – 2004. – Vol. 429 – P. 41–46.
14. Bunnell B. A. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation / B. A. Bunnell, M. Flaatt, Ch. Gagliardi, et al. // *Methods*. – 2008. – № 45 (2). – P. 115–120.
15. Carswell K. A. Culture of Isolated Human Adipocytes and Isolated Adipose Tissue / K. A. Carswell, Mi-Jeong Lee, S. K. Fried // *Methods Mol Biol.*, 2012. – № 806. – P. 203–214.
16. Ian Freshney R. Culture of animal cells: a manual of basic technique / R. Ian Freshney. – [5th ed.] - USA: John Wiley & Sons. – 2005. – 642 p.
17. Мазуркевич А.Й., Ковпак В.В., Данілов В.Б. Клітинні технології у ветеринарній медицині // Навчальний посібник – К.: КОМПРИНТ. – 2014. – 132 с.
18. Упоров А.В. Иммуногистохимическое изучение клеток рака молочной железы с использованием разных маркеров пролиферации / А.В. Упоров, В.Ф. Семиглазов, К.М. Пожарисский // *Арх. патологи.* – 2000. – №2. – С. 26–30.

19. Shipp M.A. Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): direct evidence by cDNA transfection analysis / Shipp M.A., Vijayaraghavan J., Schmidt E.V. et al // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – № 86 (1) – P. 297–301.
20. Krause D.S. CD34: structure, biology, and clinical utility / D.S.Krause, M.J.Fackler, C.I.Civin, W.S. May // Blood. – 1996. – Vol. 87, № 1. – P. 1–13.
21. Alessio M. CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes, and plasma cells / M.Alessio, S. Roggero, A. Funaro et al // Immunol. – 1990. – Vol. 3 – P. 878–884.
22. Malavasi F. Human CD38: a glycoprotein in search of a function / F. Malavasi, A. Funaro, S. Roggero et al // Immunol. Today. – 1994. – № 3. – P. 95–97.
23. Trowbridge I.S. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development / I.S. Trowbridge, M.L. Thomas // Annu. Rev. Immunol. – 1994. – №12. – P. 85–116.
24. Кирик В.М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине (обзор литературы) / В. М. Кирик, Бутенко Г. М. // Журн. АМН України. – 2010. – Том 16, № 4. – С. 576–604.
25. Astori G. "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 / G. Astori, F. Vignati, S. Bardelli et al // J. Transl. Med. – 2007. – Vol. 5, № 1. – P. 55.
26. Shin J.S. Glycosylphosphatidylinositol-anchored receptor-mediated bacterial endocytosis / J.S. Shin, S.N. Abraham // FEMS Microbiol Lett. – 2001. – Vol. 197, № 2. – P. 131–138.
27. Gay A. N. Wound healing characteristics of ICAM-1 Null mice devoid of all isoforms of ICAM-1 / A. N. Gay, O. P. Mushin, D. A. Lazar et al // J. Surg. Res. – 2011. – № 171 (1) – P. 1–7.
28. Cunningham B. A. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing / B. A. Cunningham, J.J. Hemperly, B.A. Murray // Science. – 1987. – № 236 (4803). – P. 799–806.
29. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues / S.Hammarström // Semin. Cancer. Biol., 1999. – Vol. 9. – P. 67–81.
30. Yonehara S. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor / S. Yonehara, A.Ishii, M.Yonehara // Exp. Med., 1989. – Vol.169, №5. – P. 1747–1756.
31. Inagaki Y. Clinicopathology of sialomucin: MUC1, particularly KL-6 mucin, in gastrointestinal, hepatic and pancreatic cancers / Y. Inagaki, H. Xu, M. Nakata et al // Biosci. Trends. – 2009. – № 6. – P. 220–232.
32. Raina D. The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts / D. Raina, S. Kharbanda, D. Kufe // Biol. Chem. – 2004. – Vol.279, № 20. – P. 20607–20612.
33. Münz M. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation / M.Münz, C.Kieu, B.Mack, B.Schmitt, et al // Oncogene. – 2004. – Vol. 23, № 24. – P. 5748–5758.
34. Chang L. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk / L. Chang, R.D.Goldman // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2004. – Vol. 5, № 8 – P. 601–613.
35. Moll R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells / R.Moll, W.W.Franke, D.L.Schiller, B.Geiger et al // Cell. – 1982. – Vol. 31, № 1. – P. 11–24.

36. Yang J. *In vitro* expression of cytokeratin 18, 19 and tube formation of adipose-derived stem cells induced by the breast epithelial cell line HBL-100 / J. Yang, L. Xiong, R. Wang et al // J. Cell Mol. Med. – 2015. – №19 (12). – P. 2827–2831.

СРАВНЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ФЕНОТИПА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ, КОСТНОГО МОЗГА И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОТОВ С ПАССАЖАМИ / Мазуркевич А.И., Ковпак В.В., Ковпак О.С., Гудзь Н.В.

В статье описан мониторинг фенотипа культур клеток жировой ткани, костного мозга и поджелудочной железы с первого по пятый пассаж. Исследования показали, что первичные культуры указанных тканей морфологически гетерогенны, в их состав входило небольшое количество полигональных клеток диффузно расположенных среди фибробластообразных клеток, составлявших основной процент клеток культуры. Стоит отметить, что отношение полигональных клеток к фибробластообразным, в исследуемых культурах, было разным. При дальнейшем культивировании происходило увеличение процента фибробластообразных клеток, что приводило к гомогенизации клеточного состава культур с пассажами. Исследование иммунофенотипа культур клеток костного мозга, жировой ткани и поджелудочной железы также показало различия, которые не исчезали в процессе культивирования.

Ключевые слова: культура клеток кошек, костный мозг, жировая ткань, поджелудочная железа, иммунофенотипирование, морфология, CD-маркеры.

COMPARISON OF PHENOTYPE CHANGE IN CELLS OF FAT TISSUE, BONE MARROW AND PANCREATIC GLAND OF CATS WITH PASSAGES / Mazurkevich A., Kovpak V., Kovpak O., Hudz N.

Introduction. *Considering that one of the important parts of the pathogenesis of diabetes mellitus is the death of beta-cells and due to the disadvantages of modern methods of treating diabetes mellitus I with the use of insulin therapy and pancreatic gland (PG) tissue transplantation, there is a stimulation of the development and improvement of cell therapy methods.*

Therefore, our study is a comparison of changes in phenotypic cell characteristics in order to create an experimental system for evaluating and selecting the optimal source of cellular material for further treatment of diabetes mellitus.

The goal of the work *Compare phenotypic changes in fat tissue, bone marrow and pancreatic gland of cats from the first to the fifth passage.*

Materials and methods. *In the experiment fat tissue, bone marrow and pancreatic gland were used to produce cell cultures. The material was received in parallel during scheduled surgical operations. The control of phenotype changes was performed by detecting CD markers (CD10, CD38, CD34, CD45, CD48, CD54, CD56, CD66e, CD96, CD227, CD326, CD pan keratin). The results were analyzed by the number of cells with expression (green glow of cells) and evaluated using the classic H-Score method.*

Results of research and discussion. *Studies have shown that the primary cell cultures of these tissues are morphologically heterogeneous, they include: a small number of polygonal cells diffusely located among the fibroblast-like cells, which constituted the main percentage of cell culture. It should be noted that the ratio of polygonal cells to fibroblast-like cells in the studied cultures was different. At a later stage of cultivation, we observed increase in the percentage of fibroblast-like cells, which led to the homogenization of the cell composition of cultures with passages. Investigation of the immunophenotype of cell cultures of bone marrow, fat tissue and pancreatic gland also showed differences that did not disappear during the cultivation.*

Conclusion and prospects for further research. *The results of our studies have shown that the primary culture of adhesive cells of all studied cultures consists of different types of cells, due to the diversity of the output pool.*

Within passages, an increase in the percentage of fibroblast-like cells in the studied cell cultures was observed.

During passage, the CD profile of cells in the studied cultures varied, with certain regularities. Based on the range of used CD markers specific for non-specialized (low-differentiated) cells, the lowest expression level was observed in the cells cultures of pancreatic gland, insignificantly higher level in cells cultures of fat tissue (compared with cells cultures of bone marrow), which can indicate a higher level of cell culture universality received from bone marrow. This hypothesis is confirmed by the deceleration of a monolayer formation in cultures of pancreatic gland and fat tissue, while in the cells cultures of bone marrow, the time of achievement of the confluence remained stable.

A different phenotype cells culture of bone marrow, fat tissue and pancreatic gland will allow using them in cellular therapy in the future and it is expected they influence differently under the same conditions.

Keywords: cell culture of cats, bone marrow, fat tissue, pancreatic gland, immunophenotyping, morphology, CD markers.

REFERENCES

1. Graham, P.A., Maskell, I.E. & Nash, A.S. (1994). Canned high fiber diet and postprandial glycemia in dogs with naturally occurring diabetes mellitus. *Journal of Nutrition*, 124, 2712-2715.
2. Feldman, E.C. (1997). Intensive 50 – week evaluation of glipizide administration in 50 cats with previously untreated diabetes mellitus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 210 (6), 772-777.
3. Goossens, M. (1998). Response to insulin treatment and survival in 104 cat's with diabetes mellitus (1985–1995). *J. Vet. Intern. Med.*, 12 (1), 1-6.
4. Guptill, L. (1999). Is canine diabetes on the increase? *In Recent Advances in Clinical Management of Diabetes Mellitus*, Iams Company, 24-27.
5. Marmor, M., Willeberg, P., Glickman, L.T. & Priester, W.A. (1982). Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 43, 465-470.
6. Panciera, D.L. (1990). Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in cats: 333 cases (1980–1986). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 197(11), 1504-1508.
7. Balabolkin, M.I. (2000). *Diabetologiya [Diabetology]*. M.: Meditsina [in Russian].
8. Dedov, I.I. (2000). *Bolezni organov endokrinnoy sistemy [Diseases of the endocrine system]*. M.: Meditsina [in Russian].
9. Hussain, M.A. & Theise, N.D. (2004). Stem-cell therapy for diabetes mellitus. *Lancet*, 364, 203-205.
10. Ningning, He, Zhang, Lu, Cui, Jian et al (2014). Bone Marrow Vascular Niche: Home for Hematopoietic Stem Cells. *Hindawi Publishing Corporation: Bone Marrow Research*, Article ID 128436, 8.
11. Guilak, F., Lott, K.E., Awad, H.A., et al. (2006). Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J. Cell Physiol.*, 206, 229-237.
12. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., et al. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, 7, 211-228.
13. Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I. & Melton, D.A. (2004). Adult pancreatic b-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, 429, 41-46.
14. Bunnell, B.A., Flaatt, M., Gagliardi, Ch., et al. (2008). Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45(2), 115-120.
15. Carswell, K.A., Mi-Jeong, Lee & Fried, S.K. (2012). Culture of Isolated Human Adipocytes and Isolated Adipose Tissue. *Methods Mol Biol.*, 806, 203-214.
16. Ian, Freshney R. (2005). *Culture of animal cells: a manual of basic technique (5th ed)*. USA: John Wiley & Sons.
17. Masurkewitsch, A.J., Kowpak, V.V. & Danilow, W.B. (2014). *Klitinni tehnologii u weterinarnij medizini. Nawtschal'nij pocibnik. [Cellular technologies in veterinary medicine. Manual]*. Kyev : KOMPRINT [in Ukrainian].

18. Uporov, A.V., Semihlazov, V.F. & Pozharis, K.M. (2000). Immunohistokhymycheskoe vyvchennya klityn raku molochnoyi zalozy z vykorystannyam riznykh markeriv proliferatsiyi [Immunohistochemical study of breast cancer cells using a variety of proliferation markers]. *Arkh patolohiyi – Arch. of pathology*, 2, 26-30 [in Russian].
19. Shipp, M.A., Vijayaraghavan, J., Schmidt, E.V. et al. (1989). Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 (“enkephalinase”): direct evidence by cDNA transfection analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (1), 297-301.
20. Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I. & May, W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87 (1), 1-13.
21. Alessio, M., Roggero, S., Funaro, A. et al (1990). CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T-lymphocytes, thymocytes, and plasma. *Immunol.*, 3, 878-884.
22. Malavasi, F., Funaro, A., Roggero, S. et al (1994). Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol. Today*, 3, 95-97.
23. Trowbridge, I.S. & Thomas, M.L. (1994). CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 85-116.
24. Kirik, V.M. & Butenko, G.M. (2010). Stvolovyye kletki iz zhirovoy tkani: osnovnyye kharakteristiki i perspektivy klinicheskogo primeneniya v regenerativnoy meditsine (obzor literatury) [Stem cells from adipose tissue: the main characteristics and perspectives of clinical use in regenerative medicine (literature review)]. *Zhurnal AMN Ukraini – Journal of AMS of Ukraine*, 16(4), 576-604 [in Ukrainian].
25. Astori, G., Vignati, F., Bardelli, S. et al (2007). "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. Transl. Med.*, 5 (1), 55.
26. Shin, J.S. & Abraham, S.N. (2001). Glycosylphosphatidylinositol-anchored receptor-mediated bacterial endocytosis. *FEMS Microbiol Lett.*, 197 (2), 131-138.
27. Gay, A.N., Mushin, O.P., Lazar, D.A. et al (2011). Wound healing characteristics of ICAM-1 Null mice devoid of all isoforms of ICAM-1. *J. Surg. Res.*, 171 (1), 1-7.
28. Cunningham, B.A., Hemperly, J.J. & Murray, B.A. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*, 236 (4803), 799-806.
29. Hammarström, S. (1999). The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer Biol.*, 9, 67-81.
30. Yonehara, S., Ishii, A., & Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *Exp. Med.*, 169 (5), 1747-1756.
31. Inagaki, Y., Xu, H., Nakata, M. et al. (2009). Clinicopathology of sialomucin: MUC1, particularly KL-6 mucin, in gastrointestinal, hepatic and pancreatic cancers. *Biosci. Trends.*, 6, 220-232.
32. Raina, D., Kharbanda, S. & Kufe, D. (2004). The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. *Biol. Chem.*, 279 (20), 20607-20612.
33. Münz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., et al (2004). The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene*, 23 (24), 5748-5758.
34. Chang, L. & Goldman, R.D. (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5 (8), 601-613.
35. Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., et al (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 1, 11-24.
36. Yang, J., Xiong, L., Wang, R. et al (2015). *In vitro* expression of cytokeratin 18, 19 and tube formation of adipose-derived stem cells induced by the breast epithelial cell line HBL-100. *J. Cell Mol. Med.*, 19 (12), 2827-2831.