

та м'ясних кормів кропивою запареною червоні лиси до 16,7%, вони мали найвищі серед дослідних груп показники відтворення.

3. Самки білих лисів порівняно із сріблясто-чорними та червоними, краще адаптувалися до помірної кількості кропиви (до 11,1%).

ЛІТЕРАТУРА

1. Вагнер Н. Кладовая растительного белка // Фермерське господарство. - 2013. - № 43. - С. 11.
2. Зайцев А. Г. Брусова З. А., Поляков К. С. Звероводство. - К.: Урожай, 1984. - 118, [2] с.
3. Кулик М.Ф., Кравців Р.Й, Обертюх Ю.В. та ін. Корми: оцінка, використання, продукція тваринництва, екологія. - Вінниця: ПП «Видавництво «Тезис», 2003. - 334 с.
4. Лисиці та пєсці // Домашня ферма. - 2004. - № 3. - С. 19-22.
5. Перельдик Н. Ш., Милованов Л. В., Ерин А. Т. Кормление пушных зверей - М.: Агропромиздат, 1987. - 350, [2] с.
6. Утримання і розведення лисиць // Агросвіт України. - 2007. - № 1/2. - С. 24-26.

УДК 602.9:611.013/.018:636.1

Клоногенна активність первинної культури фібробластоподібних клітин пупкового канатика лошат

Анотація. Встановлено, що метод ферментативної дезагрегації (36-ти годинної холодної трипсинізації) тканин пупкового канатика дає змогу отримати фібробластоподібні клітини із високими адгезивними і клоногенними властивостями.

Ключові слова: пупковий канатик, мезенхімальні стовбурові клітини, механічна дезагрегація, ферментативна дезагрегація, холодна трипсинізація, суспензія клітин.

Аннотация. Установлено, что метод ферментативной дезагрегации (36-ти часовой холодной трипсинизации) тканей пуповинного канатика позволяет выделить фибробластоподобные клетки с большими адгезивными и клоногенными свойствами.

Ключевые слова: пуповинный канатик, мезенхимальные стволовые клетки, механическая дезагрегация, ферментативная дезагрегация, холодная трипсинизация, суспензия клеток.

Investigation of clonogenic activity of primary culture of fibroblast-like cells from umbilical cord of newborn foals depending on the method of their obtaining. MYKOLA O. MALYUK (National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine).

Abstract. Established that method of enzymatic disaggregation (36-hour cold trypsinization) of umbilical cord tissue allows to obtain fibroblast-like cells with high adhesive and clonogenic properties.

Key words: umbilical cord, mesenchymal stem cells, mechanical disaggregation, enzymatic disaggregation, cold trypsinization, suspension cells.

М.МАЛЮК, канд. вет.наук
Національний університет біоресурсів
і природокористування України

Основою для розвитку клітинних технологій є стовбурові клітини, які здатні залежно від мікрооточення перетворюватись у клітини різних видів тканин. У сучасному світі стрімко розвиваються методи одержання, культивування стовбурових клітин та активного їх використання у

клітинно-регенеративній терапії (КРТ). Особливо це стосується мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). Саме МСК є об'єктом пильного вивчення спеціалістів при їх використанні у КРТ.

Основним джерелом МСК до недавнього часу вважався кістковий мозок. Разом з тим, M. Pittenger і співавтори встановили, що тільки 0,01 – 0,001% ядерних клітин аспірату кісткового мозку людей, виділених за допомогою градієнта щільності, утворюють адгезивні фібробластоподібні колонії клітин. Також було встановлено, що вміст стовбурових клітин в організмі людей з віком знижується [8]. У тварин, зокрема коней, встановлена така ж тенденція, як і у людей. Так, наприклад, в ембріоні лошади, на кожні 10 тис. клітин припадає одна стовбурова клітина, у молодих лошади таких клітин у 10 разів менше, а у дорослих коней одна стовбурова клітина приходить на 5-8 млн. інших клітин організму [3]. Отже, кістковий мозок не може бути основним джерелом для одержання МСК. Крім того операція з отримання кісткового мозку містить небезпеку можливого інфікування під час виділення аспірату. Не слід забувати, що й сама процедура отримання кісткового мозку у коней певною мірою небезпечна і для осіб, які виконують цю процедуру.

Останнім часом у якості альтернативного джерела МСК використовують і позазародкові тканини, зокрема, пупковий канатик, плаценту, кров пуповини. Клітини пупкового канатика здатні бути альтернативним джерелом МСК для використання їх з метою відновлення ушкоджених тканин опорно-рухового апарату тварин.

Враховуючи наведені вище факти, виділення МСК із пупкового канатика тварин є досить актуальним і своєчасним завданням. Це дасть змогу зберігати їх в кріобанках клітинних культур і використовувати як аутологічний матеріал для проведення КРТ.

Мета дослідження: провести порівняльний аналіз механічної та ферментативної дезагрегації тканин пупкового канатика лошади на ефективність виділення та клоногенну активність первинної культури фібробластоподібних клітин.

Матеріали і методи дослідження.

Пупковий канатик відбирали під час народження лошади чистокривної верхової породи в умовах кінного заводу «Міленіум» Донецької обл., Володарського району, с. Ключове. Зразки пупкового канатика лошади відбирали відразу після народження тварин. Після накладання лігатури здійснювали резекцію пуповини за допомогою хірургічних ножиць. Отриману тканину промивали у водопровідній воді для повного видалення

іноридних часточок та переносили в посудину із 70 % етиловим спиртом на 5 хв. Після цього пупковий канатик занурювали у місткість, заповнену фізіологічним розчином із антибіотиком-антимікотиком, переносили у контейнер із холодогеном ($t + 4^{\circ}\text{C}$) і транспортували в лабораторію для досліджень. Проведення подальших процедур здійснювали у стерильному боксі «Проблемної науково-дослідної лабораторії фізіології та експериментальної патології тварин» кафедри фізіології, патофізіології та імунології тварин Національного університету біоресурсів та природокористування України (м. Київ). Пупковий канатик декілька разів промивали у фосфатно-буферному розчині (ФБР), звільняли від судин (артерій, вени) та подрібнювали за допомогою хірургічних ножиць на фрагменти розміром 3-5 мм (рис. 1). У досліді були використані пупкові канатики від шістьох лошади.

Проведено три серії досліджень. У першій серії вивчали вплив механічної грегачії тканин пупкового канатика на ефективність виділення первинної культури фібробластоподібних клітин. З цією метою подрібнений пупковий канатик піддавали механічній дезагрегації на магнітній мішалці (М-5, Україна) протягом 15 – 20 хв.

У другій серії досліджень вивчали вплив ферментативної дезагрегації тканин пупкового канатика на ефективність виділення первинної культури фібробластоподібних клітин, обробляючи тканину 0,25% розчином трипсину при $t + 4^{\circ}\text{C}$ із експозицією 24 год.

У третій серії досліджували вплив ферментативної дезагрегації тканин пупкового канатика на ефективність виділення первинної культури фібробластоподібних клітин, обробляючи тканини пупка 0,25% розчином трипсину при $t + 4^{\circ}\text{C}$, але із експозицією 36 год.

Клітинну суспензію, одержану у першій, другій і третій серіях досліджень, фільтрували через 4 шари стерильного марлевого фільтру, центрифугували, осад клітин ресуспендували в поживному середовищі.

Експериментальний клітинний матеріал висівали у культуральні чашки Петрі ($d=35$, 60 мм) і культивували за стандартною методикою у CO_2 -інкубаторі ($t 37^{\circ}\text{C}$, $\text{CO}_2 - 5\%$). Склад поживного середовища: 80 % – DMEM, 20 % – ембріональна сироватка теляти з додаванням 10 мкл/см³ середовища антибіотика – антимікотика. Заміну середовища проводили через три доби культивування. При досягненні моношару 80 – 90 % конфлюентності, клітини переводили в суспензію, використовуючи розчин трипсину/ЕДТА і розсівали у співвідношенні 1 : 3 [5]. Мікроскопічний аналіз і оцінку якості культури клітин здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert



а

б

в

Рис. 1. Пупковий канатик лошади: а – нативний препарат; б – пупковий канатик і відпрепаровані судини; в – подрібнений пупковий канатик

Вплив механічної та ферментативної дезагрегації тканин пупкового канатика на ефективність виділення та проліферативну активність мезенхімальних стовбурових клітин ($M \pm m$, $n=6$)

Метод дезагрегації тканин пупкового канатика	Кількість колоній, шт.	Кількість отриманих клітин на 0 пасажі, тис.		Кількість отриманих клітин на I пасажі, тис	
		15 день культив. тис/см ²	20 день культив. тис/см ²	20 день культив. тис/см ²	31 день культив. тис/см ²
Механічна дезагрегація	0	0	0	0	0
Ферментативна дезагрегація		Холодна трипсинізація			
Експозиція протягом 24 год	3-5	–	2,08±0,16	–	19,56±1,74***
Експозиція протягом 36 год	7-9	6,36±0,48	–	99,39±28,9*	–

Примітка * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

40 (Карл Цейс). Мікроскопічні дослідження проводили щодоби.

Результати досліджень. Порівняльні результати оцінки ефективності виділення та проліферативної активності фібробластоподібних клітин, отриманих за допомогою механічної та ферментативної дезагрегації тканин пупкового канатика, наведені у таблиці та рис.2 – 4.

Як видно із результатів, наведених у таблиці, у першій серії досліджень із застосуванням механічної дезагрегації на 15-й, 20-й та 31-й день культивування в одержаній культурі при мікроскопічному огляді не було виявлено клітинних елементів із адгезивними та високопроліферативними властивостями.

У другій серії досліджень на 7 – 8 день культивування після висівання клітинного матеріалу в культуральних чашках було виявлено поодинокі клітини, адгезовані до пластику. При цьому кількість кластерів (попередників колоній) в одній культуральній чашці становила від 3 до 5. Слід

відмітити, що спочатку із утворених клітинами кластерів на 13-15-й день утворювались колонії. Було встановлено, що клітини активно проліферували саме лише в колоніях, що сприяло швидкому утворенню моношару. При цьому за межами колоній культивованих клітин не було встановлено ні кластерів, ні поодиноких клітинних елементів. Кількість клітин первинної культури із пуповини коня на 20 день культивування становила 2,08 тис/см². На першому пасажі кількість отриманих фібробластоподібних клітин збільшилась до 19,56 тис/см².

У третій серії досліджень після висівання клітинного матеріалу в культуральні чашки було встановлено, що поодинокі клітини адгезовані до пластику, під час мікроскопічного дослідження були помітні на 4 – 6 день культивування. При цьому кількість колоній в одній культуральній ч. Петрі становила від 7 до 9 шт. При мікроскопічному дослідженні було встановлено, що первинні стовбурові клітини пуповини коня активно про-

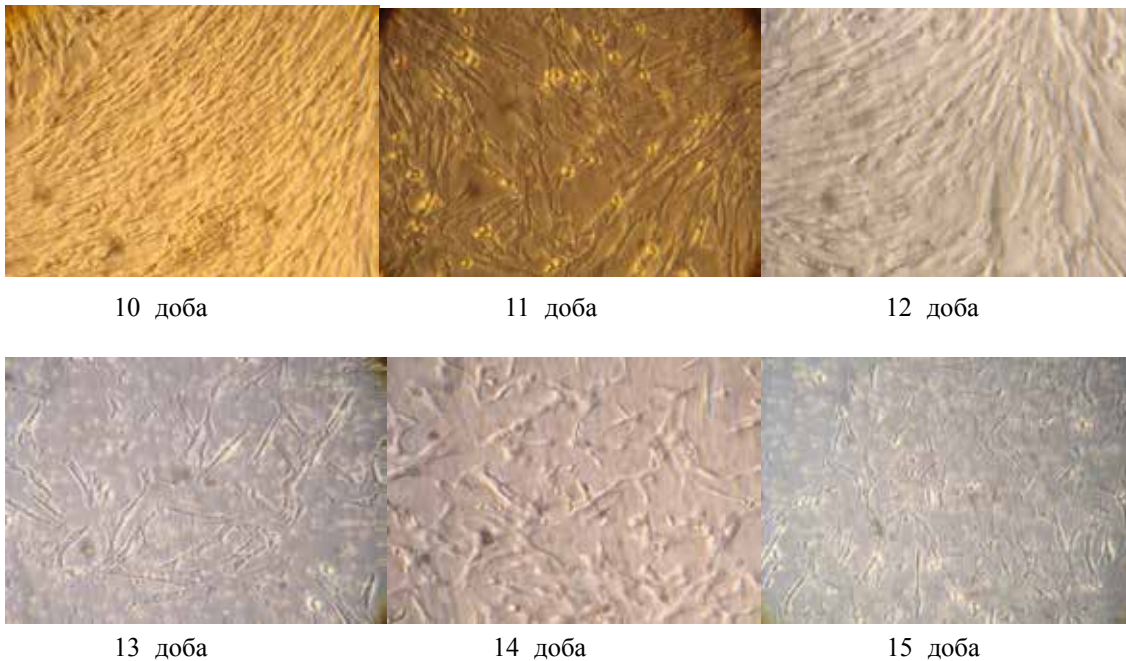


Рис. 2 . Жива незабарвлена культура МСК. Формування моношару первинної культури МСК із пуповини коня (0 пасаж, 10-15 доба культивування), x 100.

ліферували в колоніях клітин (рис. 1). Загальний вигляд культури з формуванням моношару в перші 10 – 15 діб культивування представлений на рис. 2.

Фотографії, представлені на рис. 2, одержані фотографуванням культури під мікроскопом, яке проводили в одній ділянці культуральної чашки щодобово при однаковому збільшенні протягом 10-15-ї доби. При цьому встановлено, що первинна культура МСК із пуповини коня, характеризувалась значним рівнем морфологічної гетерогенності клітин: поряд із фібробластоподібними клітинами спостерігались прикріплені до культурального пластику і клітини округлої форми, які, очевидно, є ендотеліальними. Проте, вже на 0-му пасажі у міру збільшення конфлюентності моношару клітин до 70-80 % округлі клітини витіснялись фібробластоподібними. На другому, третьому та більш пізніх пасажах культивування, ріст округлих клітин не спостерігався.

На 10-12 день культивування первинного клітинного матеріалу також зустрічали значну кількість поодиноких кластерів клітин і окремих клітин адгезованих до пластику, які не межували із колоніями активно проліферуючих клітин. Кількість фібробластоподібних клітин первинної культури із пуповини коня на 15 день культивування становила 6,36 тис/см², що було більше у 3 рази проти їх кількості у другій серії досліджень. Слід відмітити, що на 1-му пасажі культивування кількість клітин становила 99,39 тис/см², що значно перевищувала кількість їх у другій серії досліджень (табл. 1, рис.3).

Встановлено, що в період адаптації на нульовому та першому пасажах, фібробластоподібні клітини із пуповини (рис. 1, 2) були морфологічно подібні між собою і характеризувались розплатаною формою із приблизно однаковими розмірами в повздовжньому і поперечному напрямках.

При досягненні конфлюентності в процесі активної проліферації клітинних елементів до 100 % в інтервалі значення конфлюентності 85–100 % моношару, незалежно від номера пасажу, в усіх випадках спостерігалось помітне зниження мітотичної активності клітинних елементів МСК пуповини (рис. 4).

Відмічено, що контактного гальмування росту культури клітин не спосте-

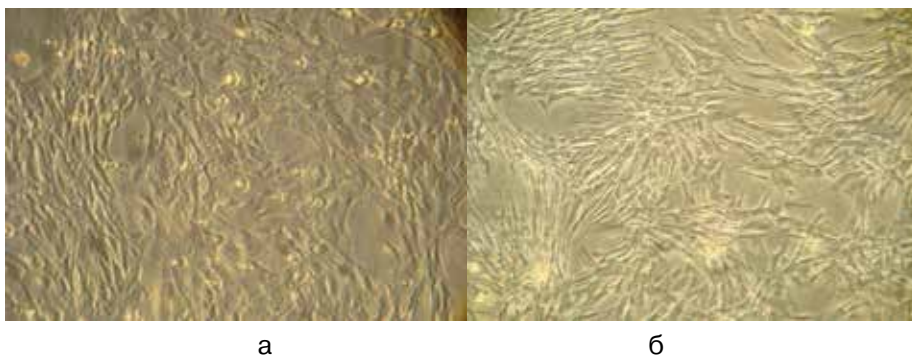


Рис. 3 .Жива незабарвлена культура мезенхімальних стовбурових клітин коня, отриманих на I пасажі: а – із пупкового канатика лошати; б – із кісткового мозку коня, x 100.

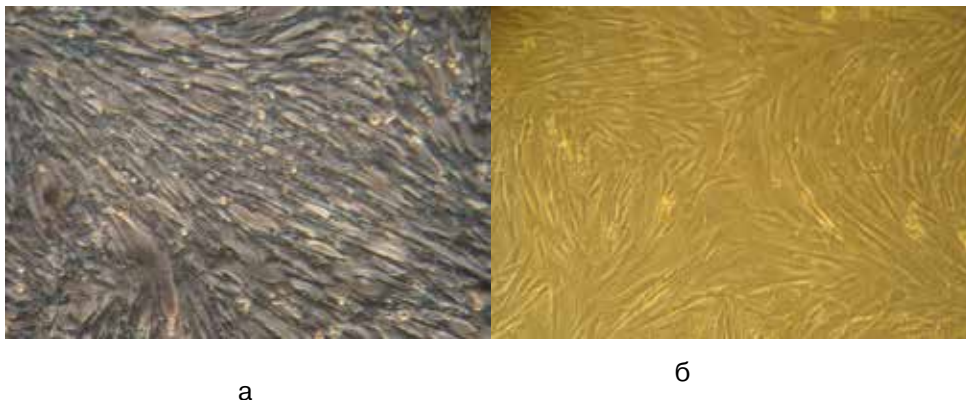


Рис. 4. Моношар живої незабарвленої культури мезенхімальних стовбурових клітини коня на V пасажі із 90% конфлюентністю: а – МСК пуповидного канатика; б – МСК кісткового мозку, х 100

рігалось до досягнення 80 %- ої конфлюентності моношару. Це, зокрема, вказує на проведення пересіву клітинних культур пуповинного канатика не пізніше досягнення ними 80 %-ої конфлюентності. Слід відмітити, що ефект контактного гальмування проліферації клітин пуповинного канатика коня проявлявся не лише на першому, другому та більш пізніх пасажах, але й у колоніях культивуючих клітин на 0 пасажі у другій і третій серіях досліджень.

Висновки

Використання методу механічної дезагрегації тканин пупкового канатика лоша не дає змоги виділити фібробластоподібні клітини, здатні активно проліферувати під час культивування *in vitro*.

Метод ферментативної дезагрегації тканин пупкового канатика із застосуванням 36-годинної холодної трипсинізації забезпечує одержання фібробластоподібних клітин із високими адгезивними і клоногенними властивостями.

Встановлено, що ефект контактного гальмування проліферативної активності фібробластоподібних клітин пупкового канатика лоша проявляється при конфлюентності клітинного моношару близько 85% незалежно від номера пасажу.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Ковач М.** Ортопедические заболевания лошадей. Современные методы диагностики и лечения. // Королевский издательский дом, Москва. – 2013. – 610 с.
2. **Agung M.** Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. // *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* – 2006. – № 14. – P. 1307 – 1314.
3. **Clegg PD. et al.** Evidence-based medicine and stem cell therapy: how do we know such technologies are safe and efficacious. *Vet. Clin. North Am Equine Pract.* – 2011. – Vol. 27, №2, P. 373 – 382
4. **Eder Zucconi, Natassia M. Vieira., Daniela F. Bueno et. al.** Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – A Novel Source for Cell Therapy Studies // *Stem cells and development.* – 2010. – Vol. 19. – № 3. – P. 395–402.
5. **Lange-Consiglio Anna, Corradetti Bruna, Rutigliano Lucia et. al.** In vitro studies of horse umbilical cord matrix-derived cells: from characterization to labeling for magnetic resonance imaging. // *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal.* – 2011. – Vol. 4. – P. 120–133.
6. **Martin A Vidal, Walker Naomi J., Napoli Eleonora, and Dori L. Borjesson.** Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. // *Stem cells and development.* – 2012. – Vol. 21. № 2. – P. 273 – 283.
7. **Pacini S., Spinabella S., Trombi L. et. al.** Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. // *Tissue Eng.* – 2007. – № 13. – P. 2949–2955.
8. **Pittenger M., Mackay A. M., Beck S. C. et al.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. // *Science.* 1999. – Vol. 284. – № 541. – P. 143–147.
9. **Reich CM., Raabe O., Wenisch S., Bridger PS., Kramer M., Arnhold S.** Comparison of canine adipose and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. // *Regen Med Suppl.* – 2009. – Vol. 4. – № 6
10. **Richardson, L. E. et al.** Stem cells in veterinary medicine - attempts at regenerating equine tendon after injury. // *Trends Biotechnol.* – 2007. – Vol. 25. – № 9. – P. 409–416.
11. **Smith RK.** Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. // *Smith RK. // Disabil Rehabil.* – 2008. – Vol. 30. – № 20-22. – P. 1752–1758.