

**Livoschenko L.P., Kambur M.D., Livoschenko E.M. STATE OF INTESTINAL MICROBIocenosis OF PIGLETS AT КОЛІЕНТЕРОТОКСЕМІИ AND METHODS OF HIS CORRECTION**

Weaned piglets per sow was stress, which contributed to the development of dysbiosis and served kolienterotoksemii factor for the development, which manifested itself in violation of the balance between the gut and conditionally normal microflora. Sedation and probiotic on background tseolitoterapii contributed resumption microbiocenosis, fewer opportunistic microorganisms.

**Keywords:** intestinal microbiota, piglets, colienterotoksiemia, immune stimulation, probiotics, zeolites.

Рецензент: д.вет.н., професор Краєвський А.И.

Дата надходження до редакції: 05.01.2014 р.

УДК 602.9:57.086.83:611.018.46:591.81

**ВИВЧЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ ГЕМОСТАТИЧНИХ ГУБОК ІЗ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ КІСТКОВОГО МОЗКУ КРОЛЯ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO***

**А. Й. Мазуркевич**, д.вет.наук, професор,

**М. О. Малюк**, к.вет.наук, доцент,

**С. М. Ткаченко**, к.вет.наук, доцент,

**Ю. О. Харкевич**, к.вет.наук, асистент.

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

Проведені експериментальні дослідження засвідчують, що гемостатична губка «Геласпон» під час сумісного культивування із стовбуровими клітинами кісткового мозку кролів на перших пасажах не викликає пригнічення їх проліферативної активності і не впливає на зміну морфологічних характеристик.

**Ключові слова:** мультипотентні стовбурові клітини, кістковий мозок, гемостатична губка, алогенна трансплантація, ксеногенна трансплантація, біоматрикс, біодеградація.

**Постановка проблеми у загальному вигляді.** Порівняно нескладна методика отримання мультипотентних стовбурових клітин (МСК) кісткового мозку, здатність цих клітин до розмноження *in vitro* і широкі потенції до цитодиференціювання роблять їх досить привабливими для терапевтичного застосування при лікуванні тварин із захворюваннями різноманітних органів і тканин. Окрім цього, МСК володіють імуносупресивними властивостями, уникаючи тим самим відповіді імунокомпетентної системи тварини-реципієнта, що дозволяє їх використовувати не лише для алогенної та ксеногенної трансплантації, але і з метою пригнічення реакції «трансплантат проти господаря» [10].

Аналіз основних досліджень і публікацій. Мультипотентні стовбурові клітини, трансплантовані у ділянку uszkodження органу чи тканини, під впливом факторів мікрооточення набувають здатності до проліферації і диференціювання. Як наслідок, вони заміщують uszkodжені клітини, забезпечуючи тим самим заживлення дефекту.

У окремих випадках для отримання терапевтичного ефекту достатньо ввести клітини в uszkodжену тканину у вигляді суспензії [8, 11]. У той же час, із аналізу літературних джерел відомо, що безпосереднє уведення культури МСК у осередок uszkodження у вигляді суспензії не призводить до бажаного терапевтичного ефекту, оскільки при такому способі застосування вони швидко елімінуються із зони uszkodження, особливо, якщо це стосується кісткової тканини [2, 5].

З метою підвищення ефективності відновлю-

вальної дії МСК у місці їх застосування запропоновано цілий ряд методів. Вони полягають у попередній іммобілізації використовуваних МСК у тому чи іншому носіїві. Вибір того чи іншого носія у першу чергу диктується особливостями uszkodження чи патологічного процесу.

Проблема пошуку ефективного способу іммобілізації та методу доставки мультипотентних стовбурових клітин у осередок uszkodження є актуальною при різних патологічних процесах: захворюваннях серцево-судинної, нервової систем, опорно-рухового апарату та ін. [2, 3]. Використання нетоксичних біосумісних структур, які могли б забезпечити оптимальні умови для адгезії та експансії іммобілізованих клітин, і сприяти повній інтеграції імплантату із оточуючими тканинами, вирішує у відповідній мірі дану проблему. Разом з тим, при використанні матриксів, які не володіють біодеградуючими властивостями, можливі ускладнення, пов'язані із довготривалою присутністю чужорідного матеріалу. Тому, при використанні матриксів доцільно застосовувати матеріали, які уже сертифіковані і допущені до використання у клініці. Основними характеристиками біологічно сумісних матриксів для створення тканинно-інженерних конструкцій мають бути: відсутність цитотоксичних властивостей по відношенню до іммобілізованих клітин, підтримання адгезивних властивостей, проліферації і диференціювання цих клітин, відсутність запальної реакції з боку тканин на імплантований матеріал, достатня його біодеградація та біоінтеграція. При цьому бажано, щоб біоносій мав трьохмірну стру-

ктуру і пролонгований термін біодеградації, щоб трансплантовані клітини не вимивалися транссудатом із місця введення. Всі необхідні властивості біоматриксу визначаються властивостями первинного матеріалу і технологією його обробки [5, 7].

Отже, вивчення біосумісності МСК тварин із потенційними біоносіями під час *in vitro* культивування являється своєчасним і актуальним завданням.

Мета роботи: дослідити біосумісність гемостатичних губок із недиференційованими стовбуровими клітинами кісткового мозку кролів під час культивування *in vitro* з метою подальшого використання досліджених гемостатичних губок у якості носія для цих клітин.

Матеріали і методи дослідження. Мультипотентні стовбурові клітини одержували з кісткового мозку стегнової кістки кролів [6]. Одержану клітинну масу культивували у стандартному середовищі: DMEM – 80 %, сироватка ембріонів телят – 20 % (виробництва “Sigma”, США) з додаванням 10 мкл/см<sup>3</sup> середовища антибіотика-антимікотика. Культивування проводили у CO<sub>2</sub>-інкубаторі за 37 °С та 5 % концентрації CO<sub>2</sub>. При цьому МСК осідали, прикріплюючись до поверхні культуральних чашок Петрі і розпластувались. Суспензовану культуру гемопоетичних клітин згодом видаляли, після чого продовжували культивувати лише ті клітини, що мають адгезивні

властивості. Після культивування отримували суспензію клітин, використовуючи 0,5/0,2 % розчин трипсину/ЕДТА [4]. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Підрахунок кількості клітин проводили у камері Горяєва. Загальну концентрацію клітин обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A \times 1000}{0,9}$$

де X – кількість клітин у 1 см<sup>3</sup> досліджуваної суспензії;

A – кількість клітин, підрахованих у камері Горяєва;

1000 – кількість кубічних міліметрів у 1 см<sup>3</sup>;

0,9 – об'єм рахункової камери Горяєва, мм<sup>3</sup>.

Загальну кількість клітин вираховували множенням отриманого числа «X» на об'єм досліджуваної клітинної суспензії.

Число клітинних генерацій вираховували за формулою  $N=2^n$ .

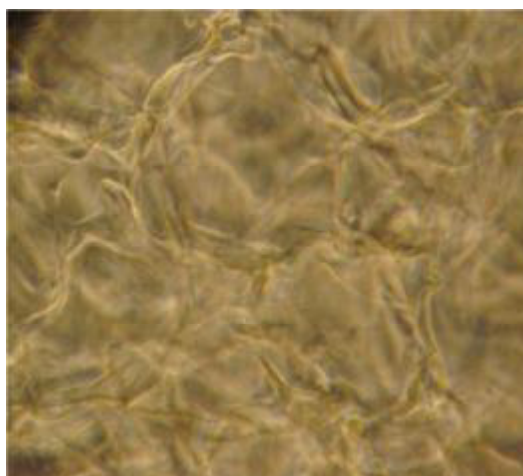
N – загальна кількість клітин на 1см<sup>2</sup>

n – число генерацій.

Після отримання у процесі культивування відповідної кількості клітин, проводили їх культивування у присутності гемостатичної колагенової пластини (виробник: ВАТ Лужський завод «Белкозин», Росія) та гемостатичної желатинової губки «Геласпон» («Gelaspon», виробник: Шовен анкерфарм ГмБХ, Німеччина) (рис.1- а, б).



а



б

Рис. 1. Мікрофотографії гемостатичних губок: а – гемостатична колагенова пластинка; б – гемостатична желатинова губка, х 200

Проведено три досліді. У першому досліді вивчали вплив гемостатичної колагенової пластини, внесеної у поживне середовище з культивованими протягом 24 год. мультипотентними стовбуровими клітинами, на їх проліферативну активність. У другому досліді вивчали вплив гемостатичної желатинової губки, внесеної у поживне середовище з культивованими протягом 24 год. мультипотентними стовбуровими клітинами, на їх проліферативну активність. У третьому дос-

лідженні вивчали вплив поживного середовища, попередньо інкубованого гемостатичною желатиновою губкою (тривалість інкубації – 72 год.), на проліферативну активність МСК кроля.

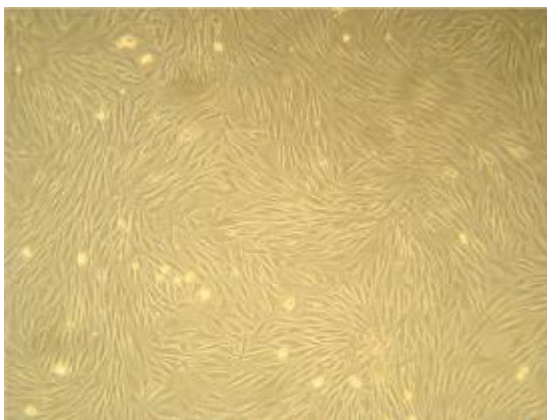
Результати власних досліджень. У першому дослідженні після 24 годин культивування клітин ми вносили у поживне середовище кровозупиняючу колагенову пластину. Під час внесення колагенової пластини у поживне середовище із культивованими клітинами нами було встановлено,

що вона змінювала свою форму: зменшувалась у розмірах, відбувалось її швидке розволокнення та змінювались розміри пор, що являється несприятливим показником для іммобілізованих клітин під час її використання у якості біодеградуємого носія. При цьому культивовані клітини втрачали адгезивні властивості, що призводило до відкріплення їх від пластику та накопичення у культуральному середовищі. На нашу думку, негативний вплив гемостатичної колагенової пластини на біологічні властивості МСК кроля під час культивування *in vitro* виникає у результаті дії

на клітини борної кислоти, яка входить до складу досліджуваного гемостатичного засобу.

Отже, гемостатична колагенова пластинка в процесі культивування із стовбуровими клітинами кроля виявляє на них негативний ефект.

У другому дослідженні під час культивування стовбурових клітин кроля із гемостатичною желатиною губкою ми спостерігали, що клітини не втрачали своїх адгезивних властивостей, активно проліферували, морфологічно не відрізнялись від клітин, які культивувались у контрольних чашках Петрі (рис. 2 - а, б).



а



а

Рис. 2. Моношар культивованих мультипотентних стовбурових клітин у присутності гемостатичної губки (а – контроль; б – дослід), x 100

Кількість клітин та число їх генерацій у дослідних чашках Петрі мали тенденцію до зниження проти таких у контрольних, що на нашу думку, може виникати у зв'язку із прикріпленням окремих клітин під час мітотичного ділення до волокон гемостатичної губки (табл. 1). При мікроскопі-

чному дослідженні желатинової губки «Геласпон» у поживне середовище, було встановлено, що вона не змінювалась у розмірах, її пори були симетричні та не змінювали свого діаметру і форми (рис. 1- б, 2- б).

Таблиця 1.

**Проліферативна активність мультипотентних стовбурових клітин кроля під час їх сумісного культивування із гемостатичною губкою протягом 96 годин (M±m, n=3)**

Умови культивування	Кількість клітин, висіяних на 1 см <sup>2</sup> , тис	Кількість клітин, отриманих на 1 см <sup>2</sup> , тис	Число клітинних генерацій
Контроль	23,4	79,2 <sup>***</sup>	1,69
Дослід	23,4	77,8 <sup>***</sup>	1,66

Примітка: \*\*\*- p<0,001

У третьому дослідженні через 24 год. культивування МСК кроля у поживному середовищі, попередньо інкубованому протягом 72 год із гемостатичною желатиною губкою, нами було встановлено, що пересажені клітини на III пасажі активно проявляли свої адгезивні властивості, подібно до клітин у контрольних чашках Петрі.

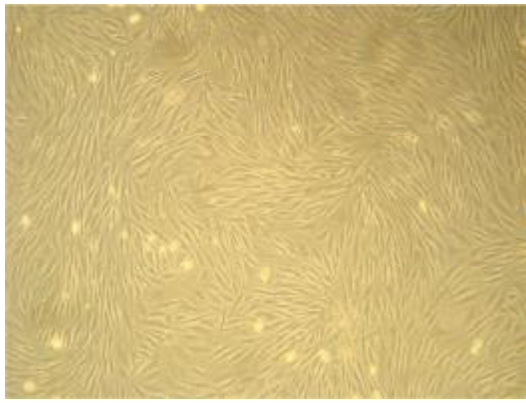
Культивовані клітини активно проліферували, що підтверджується мікроскопічними дослідженнями (рис. 3). При цьому число генерацій у дослідних чашках Петрі незначно перевищувало контроль (<0,01), що підтверджує нетоксичність досліджуваного біоматриксу (табл. 2).

Таблиця 2.

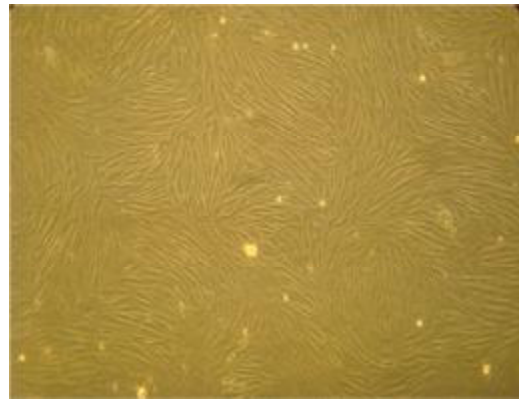
**Вплив поживного середовища, попередньо інкубованого протягом 72 годин із гемостатичною желатиною губкою, на проліферативну активність МСК кроля протягом 96 годин культивування (M±m, n=3)**

Умови культивування	Кількість клітин, висіяних на 1 см <sup>2</sup> , тис	Кількість клітин, отриманих на 1 см <sup>2</sup> , тис	Число клітинних генерацій
Контроль	26,5	82,0 <sup>***</sup>	1,55
Дослід	26,5	82,4 <sup>***</sup>	1,56

Примітка: \*\*\*- p<0,001



а



б

Рис. 3. Моношар клітин, культивованих у поживному середовищі, попередньо інкубованому протягом 72 годин гемостатичною желатиною губкою (а – контроль; б – дослід), x 100

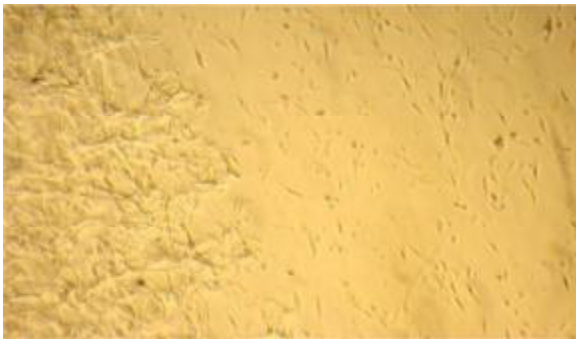


Рис. 4. Гемостатична губка із поодинокими стовбуровими клітинами, адгезованими до пластику, x 40

Варто відзначити, що після перенесення желатинової губки із чашки Петрі №1, у якій висівали та культивувалися мезенхімальні стовбурові клітини протягом 24 год, у чашку Петрі №2 із культуральним середовищем без клітин, у чашці Петрі із перенесеною гемостатичною желатино-

вою губкою через 24 год культивування прослідковувалися поодинокі, адгезовані до пластику, веретеноподібні клітини, які активно проліферували (рис. 4). Це свідчить про насиченість желатинізованої губки «Геласпон» живими клітинами та послідувальною їх міграцією і адгезією до дна чашок Петрі.

#### Висновки.

1. Гемостатична колагенова пластина не може бути використана у вигляді біоматриксу, оскільки вона проявляє негативну дію на мультипотентні стовбурові клітини кісткового мозку кроля під час культивування *in vitro*.

2. Гемостатична губка «Геласпон» являється біосумісною для мультипотентних стовбурових клітин кісткового мозку кроля на ранніх пасажах культивування *in vitro* і може бути використана у якості експериментального біодеградуємого матриксу для стовбурових клітин.

#### Список використаної літератури:

1. Астахова В.С. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека / В.С. Астахова. – К.: Феникс. – 2000. – 176 с.
2. Деев Р.В. Влияние трансплантированной культуры остеогенных клеток костного мозга на репаративный остеогенез в области дефекта теменных костей / Р.В. Деев, Н.В. Цупкина, В.Г. Гололобов // Цитология. – 2008. – Т.50, № 4. – С. 293-301.
3. Кругляков П.В. Влияние сингенных мезенхимальных стволовых клеток на восстановление костной ткани у крыс при имплантации деминерализованного костного матрикса / П.В. Кругляков, И.Б. Соколова, Н.Н.Зинькова и др. // Цитология. – 2005. – Т. 47. – С. 466-476.
4. Методичні рекомендації "Використання мезенхімальних стовбурових клітин для корекції репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів". Мазуркевич А.Й., Данілов В.Б., Малюк М.О. та ін. – К., 2012. – С. 42.
5. Пальцев М.А. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. / М.А. Пальцев. – М.: Медицина. – 2009. – Т.2 – 455 с.
6. Патент України на корисну модель № 40805. Спосіб прижиттєвого отримання стромальних стовбурових клітин кісткового мозку тварин / Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ткаченко С.М., Ковпак В.В.; заявник і власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. – № у 2008 13659; заявл. 26.11.2008; опубл. 27.04.2009, Бюл. № 8.
7. Петренко А.Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения / А.Ю. Петренко, Ю.А. Хунов, Э.Н. Иванов –Луганск.: Прес-экспресс, 2011. – 367 с.
8. Fang L.J. An experimental study of the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into vascular endothelial cells / L.J. Fang, X.B. Fu, T.Z.Sunetal. // Zhonghua Shao Shang Za Zhi. – 2003. – Vol.

19. – P. 22–24.

9. Gurevitch O. Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells / O.Gurevitch, B.Gowda, S.Kurkalli et al. // Stem Cells. – 2003. – Vol. 21. – P. 588–597.

10. Keating A. Mesenchymal stromal cells / A. Keating // Curr. Opin. Hematol. – 2006. – Vol.13. – P. 419-425.

11. Silva G.V. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model / G.V.Silva, S.Litovsky, J.A. Assad et al. // Circulation. – 2005. – Vol.111. – P. 150-156.

**Мазуркевич А.И., Малюк М.О., Ткаченко С.Н., Харкевич Ю.О. ИЗУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ ГУБОК СО СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА КРОЛЯ ВО ВРЕМЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO**

*Проведенные исследования свидетельствуют о том, что гемостатическая губка «Геласпон» во время совместного культивирования со стволовыми клетками костного мозга кролей при первых пассажах не вызывает угнетения их пролиферативной активности и не влияет на изменение морфологических характеристик.*

**Ключевые слова:** мультипотентные стволовые клетки, костный мозг, гемостатическая губка, алогенная трансплантация, ксеногенная трансплантация, биоматрикс, биодеградация.

**Mazurkiewicz A.I., Maljuk M.O., Tkachenko S.N., Kharkevich J.O. STUDYING OF THE BIOPATIBILITY OF HEMOSTATIC SPONGES WITH STEM CELLS OF BONE MARROW OF RABBITS DURING IN VITRO CULTIVATION**

*Experimental studies show that hemostatic sponge "Helaspon" during cocultivation with stem cells from the bone marrow of rabbits on the early passages does not cause inhibition of their proliferative activity and changes in morphological characteristics.*

**Keywords:** multipotent stem cells, bone marrow, hemostatic sponge, allogeneic transplantation, xenogeneic transplantation, biomatrix.

Рецензент: д.вет.н., професор Краєвський А.И.

Дата надходження до редакції: 12.01.2014 р.

УДК: 636.6.087.7:612.1

**БІЛКОВИЙ СКЛАД СИРОВАТКИ КРОВІ ПЕРЕПІЛОК  
ЗА РІЗНОГО РІВНЯ АМІНОКИСЛОТ ТА ВІТАМІНУ Е У РАЦІОНІ**

**Л. С. Стовбецька**, аспірант\*, Білоцерківський національний аграрний університет

\*Науковий керівник – д.вет.н., професор М.П. Ніщепенко

*У статті приведені результати згодовування комплексу незамінних амінокислот, таких як лізин, метіонін, треонін в поєднанні з вітаміном Е перепілкам японської породи. Встановлено позитивний вплив застосування амінокислот з вітаміном Е на такі показники білкового обміну, як загальний білок, альбуміни та імуноглобуліни.*

**Ключові слова:** перепілки, загальний білок, альбуміни, імуноглобуліни, амінокислоти, вітамін Е.

**Постановка проблеми у загальному вигляді.** У зв'язку з тим, що останнім часом інтерес до виробництва продукції перепелівництва в нашій країні підвищився, ця галузь птахівництва набуває широкого розповсюдження у господарствах всіх форм власності. Розробці питань, що стосуються забезпечення високих приростів маси тіла та яєчної продукції перепелів при мінімальних витратах кормів, без шкідливого впливу на організм птиці надається особлива увага.

Висока продуктивність (швидкість росту, несутість) перепелів значною мірою залежать від забезпеченості їх поживними речовинами і, насамперед, повноцінним білком та вітамінами.

Відомо, що основою живої матерії є білки. У функціонуванні будь-якого організму вони відіг-

рають першорядну роль і виконують структурну та функціональну роль у живому організмі. Завдяки їх функції забезпечуються основні прояви життя, такі як здатність рости, розвиватися, розмножуватися.

**Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми.**

Білок в організмі тварин знаходиться в стані динамічної рівноваги між тканинами тіла і амінокислотами плазми крові та клітинами [1]. Білки зазнають постійних змін, тобто розпаду та синтезу, вони в організмі тварини, досить швидко оновлюються. Відомо, що коли з кормами не надходить хоча б одна з незамінних амінокислот, то синтез білків органів і тканин значно погіршується.