

витамина Е на содержание некоторых витаминов в яйцах перепелов японской породы. Качество яиц полученных от перепелов определялась по содержанию витаминов А, В₂, Е и каротиноидов. В результате исследования отмечен рост содержания каротиноидов и витамина А в яйцах птицы, которая получала комплекс аминокислот с витамином Е, соответственно на 15,7-42,3 %. Содержание рибофлавина в яйцах подопытных групп было больше по сравнению с контролем на 17,3-18,5 %, а витамина Е на 30-е и 45-е сутки также возросло на 10,5-15,7 % в яйцах перепелов подопытной группы способствовало улучшению их биологической ценности.

Ключевые слова: перепела, аминокислоты, лизин, метионин, треонин, витамин Е, яйца, каротиноиды, витамин А и В₂.

Nischemenko N., Samoray N., Poroshinskay O., Stovbetskay L. Research content of vitamins quail eggs for influence complex essential amino acids combined with vitamin E.

In the article the results of the impact of complex amino acids and vitamin E content of certain vitamins in eggs of Japanese quail breed. It is known that the efficiency of the body affects poultry feed amino acid ratio of essential amino acids to substitute. Established that the essential and nonessential amino acid used by the body better quails in metabolic processes. Quality of quail eggs obtained was determined by the content of vitamins A and B₂ and E, and carotenoids. The increase in the content of carotenoids and vitamins A and B₂ in eggs of birds that received a set of amino acids with vitamin E tocopherol content in eggs experimental groups was higher compared with controls at 17,3-18,5 %. Summing up the results of studies to determine the content of carotenoids, vitamins A, E and B₂ quail eggs should be noted a positive relationship between the content of vitamin E in feed and its concentration in the quail eggs. Growth content of vitamins in eggs obtained from quail research group helped to improve their biological value.

Keywords: quail, amino acids, lysine, methionine, threonine, vitamin E, eggs, carotenoid, vitamin A, B₂.

Рецензент: д.вет.н., професор Замазій А. А.

Дата надходження до редакції: 24.11.2015 р.

УДК 612.014:602.9.395:018.26

ОТРИМАННЯ КУЛЬТУРИ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ІЗ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ СОБАКИ

Л. В. Кладницька, к.вет.н, доцент

А. Й. Мазуркевич, д.вет.н, професор

С. В. Величко, к.біол.н.

О. В. Жигунова

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Представлено методику отримання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) з абдомінальної жирової тканини собаки. Для отримання МСК з жирової тканини собак застосовували методику експланта у нашій модифікації. Матеріалом експланта слугував абдомінальний жир собак віком до 12-ти місяців, який відбирали у стерильних умовах. Жирову тканину тричі промивали фосфатно-буферним розчином і переносили у інший стерильний посуд. Первинний матеріал піддали механічній дезагрегації до шматочків розміром 1-3 мм³, і розміщували в культуральних чашках. У культуральний посуд вносили середовище для культивування Ігла, модифіковане Дюльбекко (DMEM), 15-20 % фетальної сироватки бичків (FBS), 1 % антибіотика-антимікотика. Шматочки експланта накривали покривними скельцями. Культуральні чашки з експлантом абдомінальної жирової тканини культивували за стандартних умов у СО₂ інкубаторі за температури 37°С, 5 % вмісті СО₂. Моношар МСК формувався на 12-14-ту добу культивування. Для зниження гетерогенності культури клітин проводили субкультивування 3-4 рази.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, жирова тканина, собака, метод експланта, культивування.

Жирова тканина відноситься до сполучної тканини із спеціальними властивостями і складається із скупчень адипоцитів, що утворюють часточки, які розділені тонкими прошарками пухкої волокнистої сполучної тканини. У пухкій волокнистій сполучній тканині більше основної речовини ніж волокон. Основна речовина пухкої сполучної тканини містить клітини – фібробласти, гістіоцити, перицити, плазмоцити, тучні клітини, адипоцити, пігментні клітини, а також лейкоцити, що мігрують

з крові, фіксовані та вільні макрофаги.

Zuk та інші вперше встановили, що жирова тканина людини є джерелом мультипотентних стовбурових клітин [1, 2.]. У стромі було виявлено популяцію стовбурових прогеніторних клітин з мультилінійним потенціалом диференціювання, подібних до мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), отриманих з кісткового мозку (КМ). Метод отримання МСК з жирової тканини полягав у обробці підшкірного ліпоаспірата колагеназою. Для

цього фрагменти жирової тканини інкубували за 37°C в 0,075 %-му розчині колагенази типу I протягом 30 хв. Отриману первинну суспензію центрифугували, що призводило до розділення її на дві фракції. У верхньому світлому шарі розташовувалися адипоцити, а в осаді – клітини стромально-васкулярної фракції з гемопоетичними клітинами. Еритроцити видаляли за допомогою інкубації в лізуючому розчині хлориду амонію, а інші гемопоетичні клітини, що володіють слабкою адгезивною здатністю, еліминувалися при пасажуванні [4, 5, 6, 7]. Первинна культура адгезивних клітин жирової тканини складається з морфологічно різних клітин, що пов'язано із різноманітністю вихідного спектра клітин у складі стромально-васкулярної фракції (СВФ). У ході культивування відбувається поступова очистка культури від слабоадгезивних клітин, і на 5-ту добу культивування спостерігається рівномірне заповнення дна культурального пластика. До 10-12-ої доби культивування адгезивні клітини СВФ жирової тканини формують 70-80 % конфлюентного моношару. У процесі субкультивування гетерогенність вихідної суспензії поступово знижується, і вже після 3-4 пасажів культура СКЖТ представлена популяцією переважно фібробластоподібних клітин [8, 9, 10, 11].

Враховуючи, що жирову тканину можна отримати з найменшим навантаженням для організму на противагу щодо кісткового мозку, то її можна розглядати як альтернативне джерело МСК, що можуть бути застосовані для трансплантації. Тому враховуючи вище викладене метою нашої роботи було отримання культури стовбурових клітин з жирової тканини собаки.

Матеріали і методи досліджень. Досліди проводили на собаках різних порід віком до 12-ти місяці, в який відбирали у стерильних умовах під час планових операцій (оваріогістеректомія, ушивання грижі) у лікарні ветеринарної медицини (м.Київ, Голосіївський проспект 105 б). Всі дослідження на тваринах були проведені відповідно до Правил належної лабораторної практики щодо використання експериментальних тварин [12] та з дотриманням закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 р. та принципів «Міжнародної Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986).

Для отримання МСК з жирової тканини застосовували метод експланта у нашій модифікації і проводили наступні маніпуляції.

1. Стерильно відбирали абдомінальну жирову тканину у собак віком до 12-ти місяців.

2. Абдомінальну жирову тканину тричі промивали фосфатно-буферним розчином і переносили у інший стерильний посуд.

3. Первинний матеріал піддавали механічній дезагрегації до шматочків розміром 1-3 мм³.

4. Отримані шматочки розміщували у культуральних чашках і додавали середовище для культивування Ігла, модифіковане Дюльбекко (DMEM), 15-20 % фетальної сироватки бичків (FBS), 1 % антибіотика-антимікотика.

5. Шматочки експланта накривали покривним скельцями. Чашки з експлантом абдомінальної жирової тканини культивували за стандартних умов у CO₂ інкубаторі за температури 37°C із вмістом CO₂ 5 %.

6. На 8-10-ту добу культивування покривне скельце знімали та шматочки експланта механічно вилучали з чашок Петрі.

7. На 12-ту добу на дні культуральних чашок формувався моношар адгезивних клітин жирової тканини. Моношар клітин знімали з дна культурального посуду і пересаджували у більший за розміром та проводили субкультивування 3-4-ри пасажі з метою зниження гетерогенності культури клітин.

Результати власних досліджень. Для отримання МСК з жирової тканини собак застосовували методику експланта у нашій модифікації. Матеріалом експланта слугував абдомінальний жир собак віком до 12-ти місяців. Жирову тканину тричі промивали фосфатно-буферним розчином і переносили у інший стерильний посуд. Первинний матеріал піддавали механічній дезагрегації до шматочків розміром 1-3 мм³ і розміщували у культуральних чашках. У культуральний посуд вносили середовище для культивування DMEM, 15-20 % фетальної сироватки бичків (FBS), 1 % антибіотика-антимікотика. Шматочки експланта накривали покривними скельцями (рис. 1). Культуральні чашки з експлантом абдомінальної жирової тканини культивували за стандартних умов у CO₂ інкубаторі за температури 37°C.

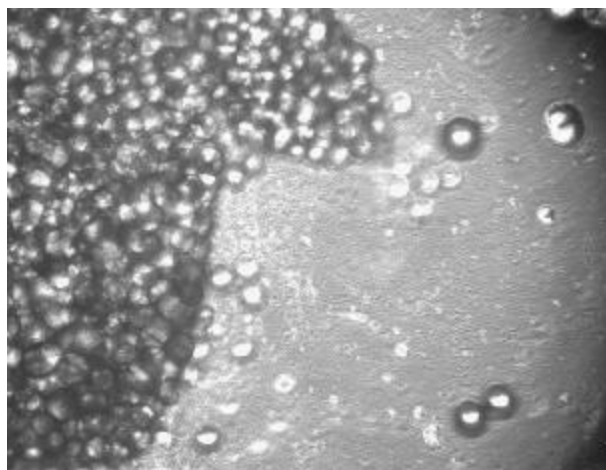


Рис. 1. Шматочки експланта жирової тканини собаки, x 100

На 3-6-ту добу культивування було зафіксовано прикріплення поодиноких клітин до дна культурального посуду навколо шматочків експланта (рис. 2).

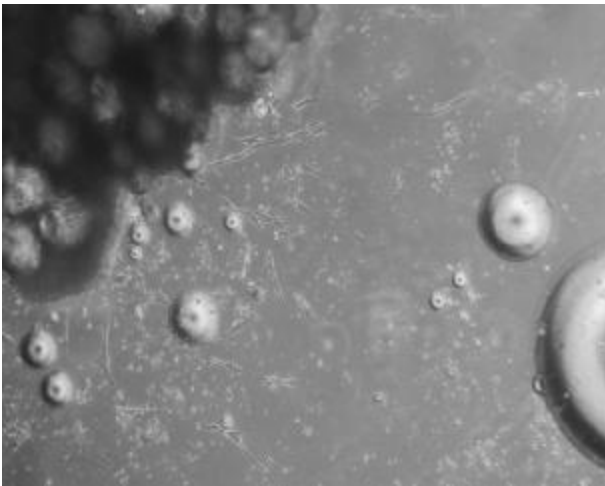
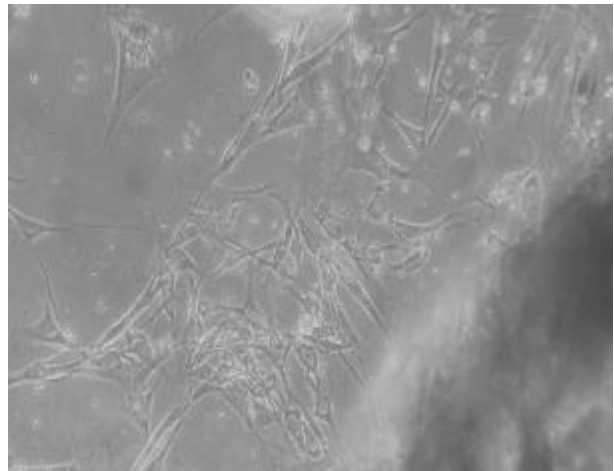


Рис. 2. Прикріплення поодиноких клітин до дна культурального посуду навколо експланта, x 100, x200



На 5-6 добу дослідження спостерігали формування колоній клітин з адгезивними властивостями навколо експланта (рис. 4, 5).

Кожну добу контролювали середовище культивування у чашках та за необхідності частково замінювали на свіже, а також проводили візуалізацію прикріплення клітин до дна культурального посуду, їх проліферацію, формування колоній (рис. 3).

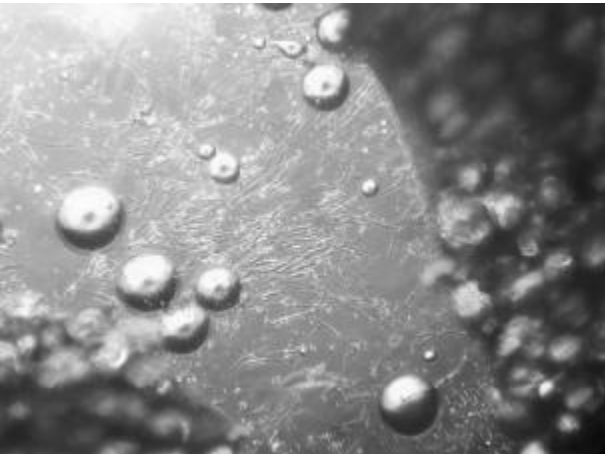


Рис. 3. Проліферація клітин навколо шматочка експланта, x100

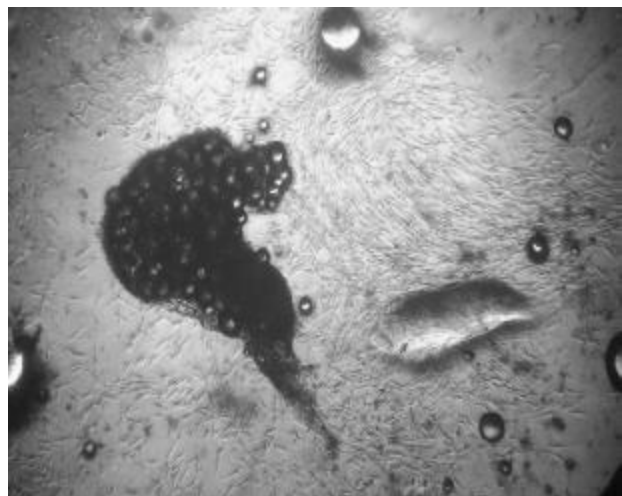
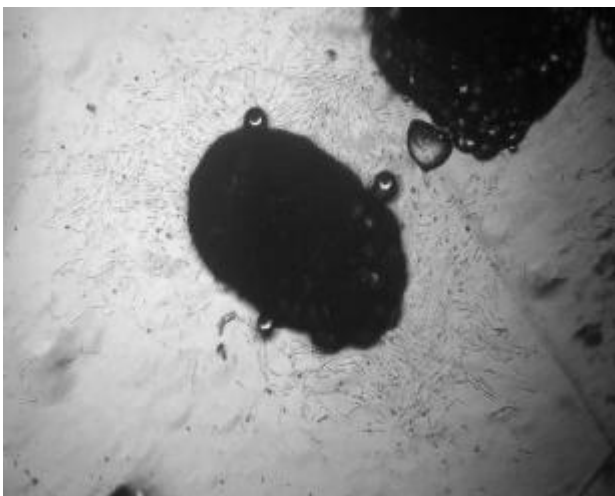


Рис. 4. Формування колоній клітин з адгезивними властивостями навколо експланта, x 40.

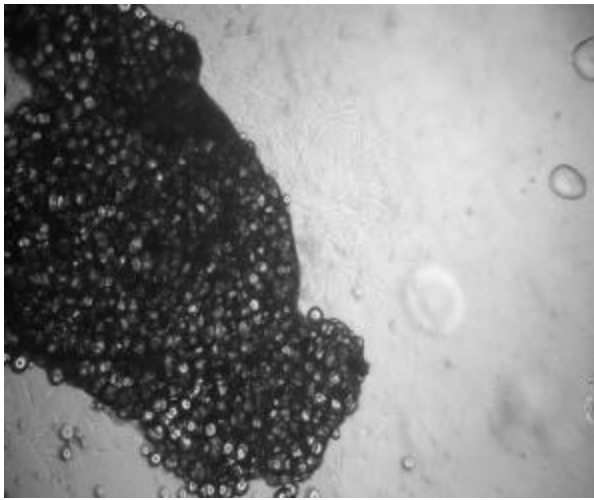
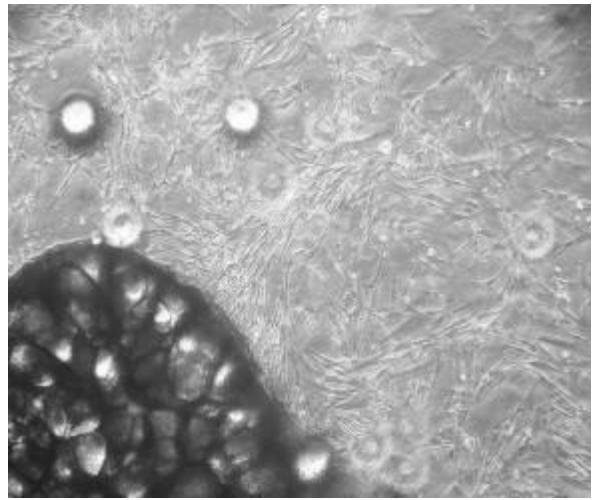


Рис. 5. Формування колоній клітин з адгезивними властивостями навколо експланта, x 100, x 200

У процесі культивування з кожною добою численність колоній та кількість клітин в них збільшувалась (рис. 6.)

На 8-10-ту добу культивування покривне



скельце та шматочки експланта механічно вилучали з чашок Петрі. На 12-14-ту добу на дні культуральних чашок формувалась моношар адгезивних СВФ клітин жирової тканини (рис. 7).

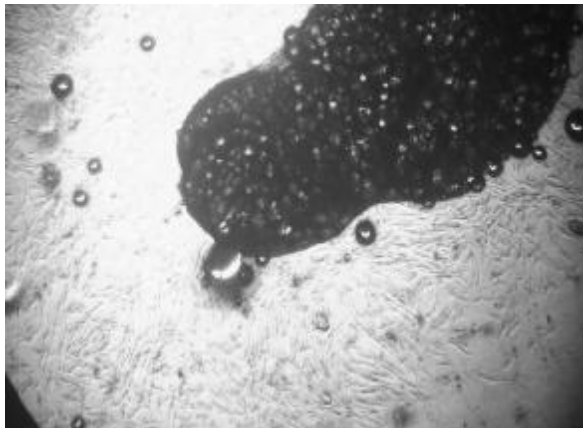


Рис. 6. Збільшення численності клітин у колоніях навколо експланта, x 40

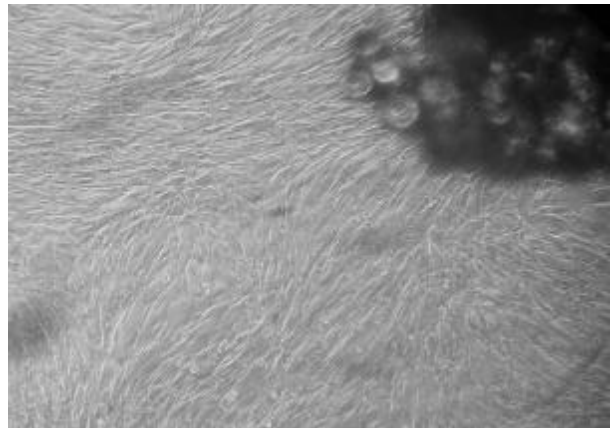


Рис. 7. Моношар клітин з експланта жирової тканини, x 100

Моношар клітин знімали з дна культурального посуду за допомогою розчину трипсину з етилендиметилтетраоцтовою кислотою і пересаджували у більший за розміром та проводили субкультивування 3-4 пасажі з метою зниження гетерогенності культури клітин.

Висновки. 1. Абдомінальна жирова тканина собаки може слугувати джерелом мезенхімальних стовбурових клітин.

2. З метою отримання МСК з жирової тканини застосовували метод експланта.

3. Матеріалом експланта слугував абдомінальний жир собак віком до 12-ти місяців.

4. Абдомінальний жир собаки піддавали механічній дезагрегації без обробки колагеназою. Експлант культивували за стандартних умов за температури 37° С із вмістом CO₂ 5 %. Моношар клітин формувалась на 12-14-ту добу культивування.

5. Для зниження гетерогенності клітин проводили субкультивування культури 3-4 рази.

Список використаної літератури:

1. Zuk P.A. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. // *Mol. Biol. Cell.* — 2002. — V. 13. — P. 4279-4295.
2. Zuk P.A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies / Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al. // *Tissue Eng.* — 2001. — V. 7. — P. 211-218
3. Lin C.S. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture / Lin C.S., Xin Z.C., Deng C.H., Ning H., Lin G., Lue T.F. // *Histol Histopathol.* — 2010. — P. 807-815.
4. Lin C.S. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture / Lin C.S., Xin Z.C., Deng C.H., Ning H., Lin G., Lue T.F. // *Histol Histopathol.* — 2010 Jun; 25 (6): 807-15.
5. Петренко А.Ю. Стромальные клетки предшественники жировой ткани: выделение, феноти-

пические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании / Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г. // Журн. АМН України. — 2008. — Т. 14, №2. — С. 354-365.

6. Katz A.J. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose derived adherent stromal cells // Katz A.J., Tholpady A., Tholpady S.S. — Stem cells. — 2005. — V. 23. — P. 412-423.

7. Strioga M. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells / Strioga M., Viswanathan S., Darinskas A., Slaby O., Michalek J. // Stem Cells.Dev. — 2012 Sep 20; 21(14):2724-52. doi: 10.1089/scd.2011.0722. Epub 2012 May 9.

8. Nathan S. Cell based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue / Nathan S., Das De S., Thambyah A. // Tissue Eng. — 2003. — V. 9. — P. 733-744.

9. 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 / Astori G., Vignati F., Bardelli S. // J. Transpl. Med. — 2007. — V. 5, № 1. — P. 55.

10. Трактуев Д.О. Стромальные клетки жировой ткани — пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом / Трактуев Д.О., Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Марч К.Л. // Цитология. — 2006. — Т. 48, № 2. — С. 83–93. 9.

11. Kronenwett R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells / Kronenwett R., Martin S., Haas R. // Stem Cells. — 2000. — V. 18. — P. 320–330.

12. Washington D.C. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals / Washington D.C. // National Academy of Press. — 1996. — 140 p.

Кладницька Л. В., Мазуркевич А. Й., Величко С. В., Жигунова О. В. Получение культуры стволовых клеток из жировой ткани собаки.

Представлена методика получения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) с абдоминальной жировой ткани собаки с целью получения клеточной массы для последующей трансплантации. Для получения МСК из жировой ткани собак применяли методику эксплантов в нашей модификации. Материалом экспланта служил абдоминальный жир собак возрастом до 12-ти месяцев, который отбирали в стерильных условиях. Жировую ткань трижды промывали фосфатно-буферным раствором и переносили в стерильную посуду. Первичный материал подвергали механической дезагрегации до кусочков размером 1-3 мм³, и размещали в культуральных чашках. В культуральные чашки вносили среду для культивирования Игла, модифицированная Дюльбекко (DMEM), 15-20 % фетальной сыворотки бычков (FBS), 1 % антибиотика-антимикотика. Кусочки экспланта накрывали покровными стеклами. Культуральные чашки с эксплантом абдоминальной жировой ткани культивировали при стандартных условиях в CO₂ инкубаторе при температуре 37°С. Монослой МСК формировался на 12-14-е сутки культивирования. Для снижения гетерогенности культуры клеток проводили субкультивирование 3-4 раза.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, метод экспланта, культивирование.

Kladnytska L. V., Mazurkevych A. Y., Velychko S. V., Zygunova O. V. The method of obtaining the culture of stem cells from the adipose tissue of the dog.

The article presents the method of obtaining mesenchymal stem cells (MSCs) from abdominal adipose tissue of dog. We used explants method in our modification for obtaining MSCs from dog's adipose tissue. We are taken abdominal adipose tissue in dog age not older 12 monthes which were taken in the sterile conditions. It was the material of explants. Adipose tissue washed three times with phosphate buffer solution and transferred into another sterile laboratory dishes. The original material was subjected to mechanical disaggregation in pieces size of 1-3 mm³ and placed in culture dishes, covered lenses. We used Igle medium, modified Dulbecco (DMEM) with 15-20 % fetal bovine serum (FBS), 1 % antibiotic-antimycotics for cells cultivation. Cultural cups with explants (abdominal adipose tissue) were cultured under standard conditions in a CO₂ incubator at a temperature 37° C. MSC monolayer formed on the 12-14-th day of cultivation. To reduce the heterogeneity of cell culture performed subcultivation 3-4 times.

Keywords: mesenchymal stem cells, adipose tissue, dog, the explant method, cultivation.

Рецензент: д.вет.н., професор Замазій А. А.

Дата надходження до редакції: 08.05.2015 р.