

коней с сильным уравновешенным типом ВНД была наиболее существенной и составляла 12 ± 1 м/сек. У животных СВИ типа ВНД бистрота движения при данном алюре составила 10 ± 1 м/с и оказалась меньше у коней со слабым типом ВНД - до $8 \pm 0,5$ м/с.

Ключевые слова: кони, тип ВНД, аллюр, шаг, управление.

Kambur M.D., Samazi A.A., Klimenko M.A. Dependence of characteristics of the gait of horses on the type of HNA.

The article presents data on the study of the health of the horses, depending on the type of HNA, provided the movement of the horse trot and gallop, behavior, assessment of motor and brajkovich qualities, the overall health of horses. Depending on the type of HNA, most healthy horses revealed a second and third type of IRR and the most unsuitable to use revealed horses with a weak type of HNA. The highest number of points for quality motor got horses strong unstable and strong balanced typinator the type of HNA. Animals of these two types of HNA Kohut be recommended for use. We found that the gaits of horses as their form of translational motion depends on the type of HNA. The horses with the SVR type of HNA, the move proved to be the longest. In comparison with the animals of the other three types of GNI stride length horses SVR type HNA turned out to be 1.20, 1.50 and 2.25 times longer. Trot the horses with a strong balanced type of HNA was most significant and amounted to 12 ± 1 m/sec. Animals SVI the type of HNA, the speed at a given gait was 10 ± 1 m/s and was smaller than the horses with claim type of HNA, up to 8 ± 0.5 m/s.

Keywords: horses, type HNA, allure, a move, management.

Дата надходження до редакції: 21.02.2017 р.
Рецензент: д.вет.н., професор Краєвський А.Й.

УДК 576.31: 611.018.26576.

ФЕНОТИПОВІ ТА МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ

В. В. Ковпак, к.вет.н.

О. С. Ковпак, аспірант

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Дослідження морфології первинної культури клітин жирової тканини (ККЖТ) показали, що вона морфологічно гетерогенна, серед домінуючих фібробластоподібних клітин відмічали незначну кількість полігональних. З пасажами відсоток фібробластоподібних клітин збільшувався. Імунофенотипування популяції культури клітин жирової тканини, дозволило виявити негативний ступінь експресії CD10, CD54, CD56 та низький – пан-кератину упродовж всього періоду дослідження. Відмічали зниження експресії CD34, CD38, CD45, CD48, CD66e та зворотну залежність стосовно CD95, CD227 і CD326 з першого до четвертого пасажу.

Ключові слова: культура клітин, жирова тканина, морфологія клітин, імунофенотипування, CD-маркери.

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями. В сучасній регенеративній медицині клітинні технології виходять на лідируючі позиції. Культурі клітин відводять роль інструмента, за допомогою якого можна відновити пошкоджені тканини і скорегувати порушення функцій багатьох органів.

Процедура отримання культур клітин достатньо затратна, але все ж головним обмеженням широкого впровадження клітинної терапії є її безпечність та етична складова. Виходячи з цього серед великої кількості джерел отримання культури клітин останнім часом все більшу цікавість становлять культури клітин отримані із жирової тканини.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Тривалий час функції жирової тканини розглядалися лише в якості ізоляції та захисту внутрішніх органів. Проте це повноцінний ендокринний орган, який включає у себе різні види клітин

[1, 2]. У склад жирової тканини входять жирові клітини – адипоцити, а також клітини, що складають стромально-васкулярну фракцію (Stromal Vascular Fraction –SVF): преадипоцити, ендотеліальні та гладком'язові клітини кровеносних судин, периваскулярні фіброласти і підтримуюча волокниста колагенова строма [1, 3]. Стовбурові клітини, що містяться у жировій тканині, мультипотентні. Вони здатні диференціюватися у різноманітні клітинні лінії, у тому числі жирову, кісткову, хрящову, нервову тканини, ендотелій [4, 5] і клітини печінки [6, 7].

Все вищезазначене, у поєднанні з відносною простотою отримання, свідчить про високий потенціал жирової тканини в якості найбільш важливого джерела стовбурових клітин дорослого організму. Проте сучасна практика запровадження клітинної терапії вимагає кропіткого експертного аналізу вихідного матеріалу, ретельної деталізації кожного з етапів застосування клітин, відстеження подальшої долі останніх *in vitro* або *in vivo*, що і було част-

ково покладено в основу наших досліджень.

Мета дослідження: дослідити морфологічні та фенотипові зміни культури клітин жирової тканини з першого до четвертого пасажу.

Матеріали і методи досліджень. Експерименти на тваринах були проведені з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року). У досліді використали 3-ох самців не лінійних щурів віком 4 місяці. Евтаназію дослідних тварин здійснювали шляхом декапітації під ефірним наркозом.

Отримання культури клітин жирової тканини здійснювали за стандартною методикою [1, 8, 9,] у власній модифікації. Культуру клітин виділяли з підшкірної жирової клітковини. Для цього тканину поміщали в стерильну чашку Петрі, де декілька разів її промивали фосфатно-буферним розчином (PBS) ("Sigma", США). Далі зразки под-

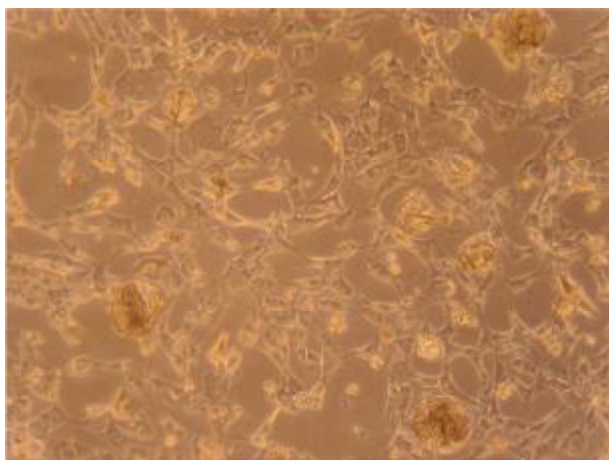


Рис. 1. Мікрофотографія колонії культури клітин жирової тканини *in vitro*, 7 доба культивування. Нативний препараток. $\times 10$, об. $\times 10$

Клітини знімали за стандартною методикою (розчином 0,25 % трипсин/ЕДТА) [10]. 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, CD326b, CD пан-кератин). Для цього клітини вирощували на покривних скельцях. Скельця з клітинами промивали тричі у PBS після чого фіксували розчином метанол/оцтова кислота (1:1) ("Sigma", США), Т – 4°C протягом 2 годин. Далі промивали тричі у PBS. Скельця переносили на 20 хвилин у 1 % розчин бичачого сироваткового альбуміну на PBS. Далі скельця струшували від рідини та наносили первинні антитіла (розведення 1:100), експозиція 1 година. Після чого скельця промивали двічі у PBS та наносили вторинні антитіла Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) (розведення 1:500) ("Invitrogen", США), експозиція 1 год. Далі скельця промивали тричі у

рібнювали ножицями на шматочки 1-2мм та поміщали у стерильну пробірку з розчином колагенази (тип I): 1 mg колагенази I типу ("Sigma", США) 1 ml середовища Ігла модифіковане Дульбекко (DMEM) ("Sigma", США) з додаванням 4 % бичачого сироваткового альбуміну (BSA) ("Sigma", США) та інкубували зразок у CO₂-інкубаторі за 37 °C та 5 % концентрації CO₂ протягом 1 години. Нейтралізували активність колагенази шляхом додавання 5мл DMEM + 20 % фетальної сироватки телят (FBS) ("Sigma", США). Після нейтралізації проводили повну заміну середовища і подальше культивування проводили у стандартному культуральному середовищі: 80 % – DMEM; 20 % – FBS; 10 мкл/см³ – антибіотика-антимікотика ("Sigma", США) (рис.1); у CO₂ інкубаторі за 37 °C та 5% концентрації CO₂ [10], 14 днів до утворення моношару (рис. 2).

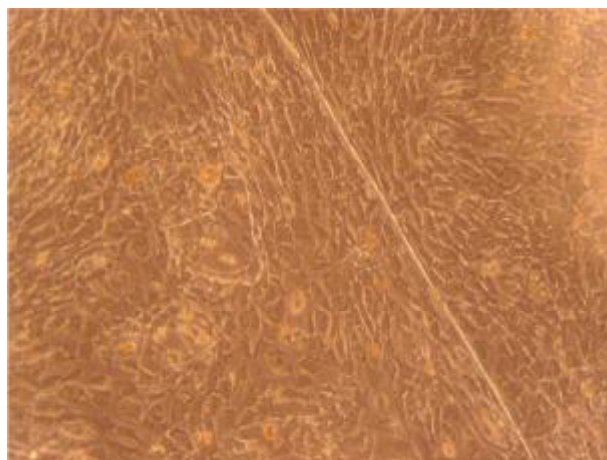


Рис. 2. Мікрофотографія колонії культури клітин жирової тканини *in vitro*, 14 доба культивування. Нативний препараток. $\times 10$, об. $\times 10$

PBS, на скельця наносили гліцерин та закріплювали на них покривні скельця [10]. Аналіз результатів проводили за кількістю клітин з експресією (зелене свічення 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); А – клітини з слабкою експресією; В – відсоток клітин з помірною експресією білка; С – 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 [11]. Дослідження здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа Leica DMR (Німеччина).

Результати власних досліджень. Морфологічна характеристика культури клітин жирової тканини.

Первинна культура адгезивних клітин жирової тканини щурів характеризувалася морфологічною гетерогенністю, що пояснюється різноманітністю клітин, які входять до складу SVF [3,

12]. Протягом декількох днів, після висівання спостерігали значну кількість слабоадгезивних округлих клітин, які видалялись у процесі пасажування. Починаючи з 5-го дня відмічали рівномірний ріст клітин отриманих з жирової тканини. Первинна ККЖТ досягала конфлюентності 90-100 % у середньому за 14 днів.

В процесі субкультивування час досягнення конфлюентності 70-80 % становив 4 доби протягом

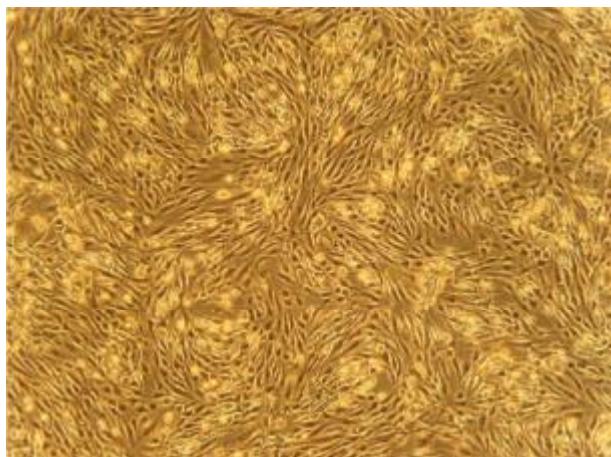


Рис. 3. Мікрофотографія моношарукультуриклітин жирової тканини *in vitro*, 1 пасаж. Нативний препарат. ок.×10, об×5

Характеристика культури клітин жирової тканини за CD – маркерами. Імунофенотипування популяції культури клітин жирової тканини, дозволило виявити (табл. 1) негативний ступінь експресії CD10, CD54, CD56 на всіх пасажах. При дослідженні CD34, CD38, CD45, CD48 спостерігали зниження ступеня прояву від низького до негативного, у той же час у CD227 та CD326 відмічали зворотну залежність. Експресію панкератину характеризували як низьку упродовж всього часу дослідження. CD66e характеризувався високим рівнем прояву на початку культивування та низьким у кінці дослідження. Експресія CD95 збільшувалася з пасажами від низького до

4 пасажів. На першому пасажі відмічали гетерогенність культури, ККЖТ щурів складалася з невеликої кількості клітин полігональної форми, оточених фібробластоподібними клітинами (рис. 3). З кожним пасажем кількість клітин полігональної форми зменшувалась. На четвертому пасажі відмічали найбільший гомогенний склад культури. Морфологія ККЖТ на 4 пасажі характеризувалася переважно фібробластоподібною структурою (рис. 4).

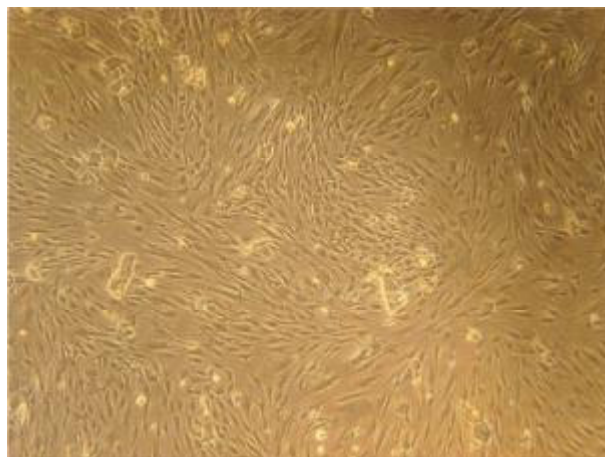


Рис. 4. Мікрофотографія моношарукультуриклітин жирової тканини *in vitro*, 4 пасаж. Нативний препарат. ок.×10, об×5

помірного рівня.

CD34 – трансмембранний мономернийглікопротеїн I типу, що опосередковує процеси міжклітинної адгезії. Він є маркером гемопоетичних стовбурових клітин, ендотеліальних клітин судин, ембріональних фібробластів [13]. Гістологічний аналіз жирової тканини, показав, що CD34-позитивні клітини рівномірно розміщені в тканині і розміщуються між адипоцитами [14], чим пояснюється експресія CD34. З пасажами рівень експресії знижується, що свідчить про зміну відсоткового вмісту клітин у культурі, отримані результати перекликаються з даними інших авторів [12, 15].

Таблиця 1

Зміна експресії CD-маркерів у популяції клітин виділених з жирової тканини щура з першого до четвертого пасажу (M±m, n=3)

Поверхневі маркери	Пасаж			
	I	II	III	IV
	Оцінка в балах за методом H-Score (від 0 до 300)			
10	0±0,0	0±0,0	11,3 ±5,0	45,0 ±14,5*
34	92,7±4,5	72,7±7,3	40,7±10,6*	8,3±4,8***
38	74,7±9,0	54,7 ±3,3	37,0±4,6*	14,0 ±5,2**
45	74,3±6,0	51,7±4,8*	23,3±6,8**	5,0±2,9***
48	98,3±13,5	76,3±15,3	58,7±12,4	26,3±2,5**
54	0±0,0	0±0,0	0±0,0	0±0,0
56	0±0,0	0±0,0	0±0,0	0±0,0
66e	247,7±10,2	201,3±16,7	103,0±15,7**	66,3±7,1***
95	61,7±6,8	91,3±21,9	101±5,2*	126,3±13,2*
227	27,7±6,5	46,3±15,3	72,7±10,8*	49,7±9,0
326	0±0,0	15,0±2,9**	86,3±5,6***	86,6±7,1***
Кератин	82,0±7,0	84,7±4,8	71,0±3,5	83,0±4,6

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

CD38 – одноланцюговий трансмембранний глікопротеїд II типу [16], його молекула виявляється посередником кількох різних видів діяльності, включаючи передачу сигналу, клітинної адгезії і синтезу циклічної АДФ-рибози [17]. На першому пасажі відмічали низьку експресію CD38, що може свідчити про наявність у культурі клітин попередників. У подальшому рівень прояву даного маркера знижувався до негативного, що збігається з показниками інших авторів [12, 18].

CD45 -трансмембранний глікопротеїн I типу, що належить до родини протеїнів тирозин фосфатаз і експресується на всіх гемопоетичних клітинах, за винятком еритроцитів та тромбоцитів [19]. Під час дослідження на перших пасажах відмічали наявність клітин, що експресують CD45, що відмічалось і в літературних даних [18]. З пасажами його рівень знижувався до негативного.

CD48 – трансмембранний глікопротеїн I типу, зв'язаний з клітинною мембраною за допомогою глікозит фосфатидилінозита [20]. CD48 експресований на деяких гемопоетичних та ендотеліальних клітинах. Приймає участь у активації і шляхах диференціації вказаних клітин. Під час дослідження відмічали достовірне зниження експресії CD48 від 98,3 (I пасаж) до 26,3 балів (IV пасаж).

CD66e – глікозольований глікопротеїд поверхневої мембрани епітеліальних клітин, чим пояснюється його виявлення у більшості органів [21]. У досліджуваній культурі клітин достовірно знижувалась з першого до четвертого пасажу.

CD95 – трансмембранний глікопротеїд I типу, опосередковує сигнал, що ініціює апоптоз [22]. Починаючи з першого пасажу інтенсивність експресії даного маркера достовірно збільшується з 61,7 до 126,3 балів відповідно.

CD326 – трансмембранний глікопротеїн першого типу – маркер епітеліальних клітин, за нормальних умов опосередковує ріст та диференціювання [23]. Відмічали його достовірне збільшення починаючи з другого пасажу.

Кератин – входить до складу проміжних філаментів цитоскелета епітеліальних клітин [24]. Наявність позитивної реакції з даними антитілами свідчить про епітеліальне походження клітин [25], цитокератин був виявлений у жировій тканині [3, 26]. Експресія пан-кератину характеризувалася як низька упродовж всього часу дослідження.

Результати наших досліджень показали, що первинна культура адгезивних клітин жирової тканини складається з різноманітних клітин, що пов'язано з різноманітністю вихідного спектра клітин стромально-васкулярну фракції. Впродовж пасажування морфологія і фенотип культури клітин жирової тканини змінювалась. Так, наприклад відмічали зниження експресію маркерів характерних для гемопоетичних стовбурових клітин (CD34, CD38, CD45) [12, 18, 15]. Культура набувала рис характерних для стовбурових клітин жирової тканини описаних у опрацьованих нами літературних джерелах.

Висновки. 1. Первинна культура клітин жирової тканини щура – гетерогенна, домінуюча кількість клітин має фібробластоподібну морфологію.

2. З пасажами відсотковий вміст фібробластоподібних клітин у культурі клітин жирової тканини збільшується.

3. Зміна експресії поверхневих маркерів змінюється з кожним пасажем.

4. Впродовж пасажування культура набувала характеристик стовбурових клітин жирової тканини, описаних у літературних джерелах.

Список використаної літератури:

1. 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.
2. Урбанович А.М. Гормони жирової тканини та їх клінічне значення / А.М. Урбанович // *Endokrynologia*, 2013. – vol.18, №1. – С.69-72.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Aurich H. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. / H. Aurich, M. Sgodda, P. Kaltwasser, et al. // *Gut.*, 2009. – № 58. – P. 570–581.
7. Ruiz J. C. Differentiated human adipose-derived stem cells exhibit hepatogenic capability in vitro and in vivo. / J. C. Ruiz, J. W. Ludlow, S. Sherwood, et al. // *J Cell Phys.*, 2010. – № 225. – P.429–436.
8. Ian Freshney R. Culture of animal cells: a manual of basic technique / R. Ian Freshney. – [5th ed.] - USA: John Wiley & Sons, 2005. – 642p.
9. Bunnell B. A. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation / B. A. Bunnell, M. Flaate, Ch. Gagliardi, et al. // *Methods.*, 2008. – № 45 (2). – P.115–120.

10. Мазуркевич А.Й., Ковпак В.В., Данілов В.Б. Клітинні технології у ветеринарній медицині // Навчальний посібник – К.: КОМПРИНТ, 2014. – 132с.
11. Упоров А.В. Иммуногистохимическое изучение клеток рака молочной железы с использованием разных маркеров пролиферации / А.В. Упоров, В.Ф. Семиглазов, К.М. Пожарисский // Арх. патологии, 2000. – № 2. – С. 26–30.
12. Петренко А. Ю. Стволовые клетки из жировой ткани / А. Ю. Петренко, Э. Н. Иванов, Ю. А. Петренко // Биотехнология., 2008. – Том 1, № 4. – С. 39-48.
13. 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.
14. Трактуев Д.О. Стромальные клетки жировой ткани — пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом / Д. О. Трактуев, Е. В. Парфенова, В. А. Ткачук, К. Л. Марч // Цитология. – 2006. – Том 48, №2. – С. 83-94.
15. Mitchell J. B. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers / J. B. Mitchell, K. McIntosh, S. Zvonic, et al // Stem Cells. – 2006. – №24 (2). – P.376-385.
16. Alessio M. CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes, and plasmacells / M.Alessio, S. Roggero, A. Funaro et al // Immunol. – 1990. – vol. 3. – P. 878-884.
17. 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.
18. 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.
19. Trowbridge L.S. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development / L.S. Trowbridge, M.L. Thomas // Annu. Rev. Immunol. – 1994. – №12. – P. 85-116.
20. Shin J.S. Glycosyl phosphatidylinositol-anchored receptor-mediated bacterial endocytosis / J.S. Shin, S.N. Abraham // FEMS Microbiol Lett. – 2001. – vol. 197, № 2. – P. 131-138.
21. 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.
22. Yonehara S. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-down regulated with the receptor of tumor necrosis factor / S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara // Exp. Med., 1989. – Vol.169, № 5. – P. 1747-1756.
23. Münz M. The carcinoma-associated antigen EpCAM up regulates c-myc and induces cell proliferation / M. Münz, C. Kieu, B. Mack, B. Schmitt, et al // Oncogene, 2004. – Vol. 23, № 24 – P. 5748-5758.
24. Chang L. Intermediate filaments mediate cytoskeletal cross talk / L. Chang, R.D. Goldman // Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2004. – Vol.5, № 8 – P. 601-613.
25. 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.
26. 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.

References:

1. 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. – R.203-214.
2. Urbanovych A.M. Hormony žyrovoy tkany ta ich klinične značennja / A.M. Urbanovych // Endokrynologija, 2013. – vol.18, # 1. – S. 69-72.
3. Kyryk V.M. Stvolovye kletky yz žyrovoy tkany: osnovnyye charakterystyky y perspektyvy klyučeskoho prymerenenyja v reheneryvnoj medycyne (obzor lyteratury) / V. M. Kyryk, Butenko H. M. // Žurn. AMN Ukraïny, 2010. – Tom 16, # 4. – S. 576-604.
4. 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. – R. 211–228.
5. 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. – R. 229–237.
6. Aurich H. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. / H. Aurich, M. Sgodda, P. Kaltwasser, et al. // Gut., 2009. - #58. – R.570–581.
7. Ruiz J. C. Differentiated human adipose-derived stem cells exhibit hepatogenic capability in vitro and in vivo. / J. C. Ruiz, J. W. Ludlow, S. Sherwood, et al. // J Cell Phys., 2010. – # 225. – R.429–436.

8. Ian Freshney R. Culture of animal cells: a manual of basic technique / R. Ian Freshney. – [5th ed.] - USA: John Wiley & Sons, 2005. – 642 p.
9. Bunnell B. A. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation / B. A. Bunnell, M. Flaate, Ch. Gagliardi, et al. // *Methods.*, 2008. – #45(2). – R.115–120.
10. Mazurkevych A.J., Kovpak V.V., Danilov V.B. Klitynni tehnolohii u veterynarnij medycyni // *Navchal'nyj posibnyk* – K.: KOMPRYNT, 2014. – 132s.
11. Uporov A.V. Ymmunohystochemyčeskoe yzučenyje kletok raka moločnoj železy s yspol'zovanyem raznych markerov prolyferacyj / A.V. Uporov, V.F. Semyhlazov, K.M. Požarysskij // *Arch. patolohy*, 2000. – #2. – S.26–30.
12. Petrenko A. Ju. Stvolovye kletky yz žyrovoy tkany / A. Ju. Petrenko, Э. N. Yvanov, Ju. A. Petrenko // *Biotechnolohija.*, 2008. – Tom 1, #4. – st. 39-48.
13. 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.
14. Traktuev D.O. Stromal'nye kletky žyrovoy tkany — plastyčeskyj typ kletok, obladajuščyč vysokym terapevtyčeskyj potencyalom / D. O. Traktuev, E. V. Parfenova, V. A. Tkačuk, K. L. Marč // *Cytolohyja.*, 2006. – Tom 48, #2. – st. 83-94.
15. Mitchell J. B. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers / J. B. Mitchell, K. McIntosh, S. Zvonic, et al // *StemCells.* – 2006. – #24 (2). – R.376-385.
16. Alessio M. CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes, and plasmacells / M. Alessio, S. Roggero, A. Funaro et al // *Immunol.* – 1990. – vol. 3 – R.878-884.
17. Malavasi F. Human CD38: a glycoprotein in search of a function / F. Malavasi, A. Funaro, S. Roggero et al // *Immunol. Today.* – 1994. – #3. – R.95-97.
18. 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. – R.55.
19. Trowbridge L.S. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development / L.S. Trowbridge, M.L. Thomas // *Annu. Rev. Immunol.* – 1994. – #12. – R.85-116.
20. Shin J.S. Glycosyl phosphatidylinositol-anchored receptor-mediated bacterial endocytosis / J.S. Shin, S.N. Abraham // *FEMS Microbiol Lett.* – 2001. – vol.197, #2. – 131-138.
21. 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.
22. Yonehara S. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-down regulated with the receptor of tumor necrosis factor / S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara // *Exp. Med.*, 1989. – Vol.169, #5. – P. 1747-1756.
23. Münz M. The carcinoma-associated antigen EpCAM up regulates c-myc and induces cell proliferation / M. Münz, C. Kieu, B. Mack, B. Schmitt, et al // *Oncogene*, 2004. - Vol.23, #24 – P. 5748-5758.
24. Chang L. Intermediate filaments mediate cytoskeletal cross talk / L. Chang, R.D. Goldman // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004. - Vol.5, #8 – P.601-613.
25. 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.
26. 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.

Ковпак В.В., Ковпак О.С. Фенотипические и морфологические изменения в культуре клеток жировой ткани в процессе культивирования.

Исследование морфологии первичной культуры клеток жировой ткани (КЖТ) показали, что она морфологически гетерогенная, среди доминирующих фибробластоподобных клеток отмечали незначительное количество полигональных. С пассажами процент фибробластоподобных клеток увеличивался. Иммунофенотипирование популяции культуры клеток жировой ткани, позволило выявить негативную степень экспрессии CD10, CD54, CD56 и низкую - пан-кератина, в течение всего периода исследования. Отмечали снижение экспрессии CD34, CD38, CD45, CD48, CD66e и обратную зависимость касательно CD95, CD227 и CD326, с первого по четвертый пассаж.

Ключевые слова: культура клеток, жировая ткань, морфология клеток, иммунофенотипирование, CD-маркеры.

Kovpak V.V., Kovpak O.S. Phenotypic and morphological changes in adipose tissue cells culture

during cultivation.

Morphological examination of primary adipose cell culture (ACC) showed that it was morphologically heterogenic; among the dominant fibroblast-like cells, a minor quantity of polygonal ones was observed. Throughout the passages, the percentage of polygonal cells increased. Immunophenotyping of adipose cell culture allowed for detection of negative expression rate of CD10, CD54, CD56 and low one of pan-keratin throughout the entire research period. Reduced expression was noted for CD34, CD38, CD45, CD48, CD66e, and inverse relation regarding CD95, CD227 i CD326 from the first to the forth passages.

Keywords: cell culture, adipose tissue, cell morphology, immunophenotypin, CD markers.

Дата надходження до редакції: 22.02.2017 р.

Рецензент: к.вет.н., доцент Нечипоренко О.Л.

УДК 612.3.636.2.

ФОРМУВАННЯ РУБЦЕВОГО ТРАВЛЕННЯ У ТЕЛЯТ

М. Д. Камбур, д.вет.н., професор

А. А. Замазій, д.вет.н., професор

А. В. Колечко, аспірант

Сумський національний аграрний університет

В статті наведені результати проведених досліджень, які доводять, що подразнення рецепторів слизової оболонки ротової порожнини розчинами різних речовин у телят з 6-ти денного віку не однаково впливає на прояв рубцевої моторики. Встановлено, що подразнення хеморецепторів слизової оболонки ротової порожнини телят 2 % розчином соляної кислоти сприяло підвищенню прояву рубцевих скорочень залежно від пори року та маси тіла при народженні телят на 8,22 доби. Доведено, що в зимово-весняний період народжуються телята із більш низькими адаптивними можливостями організму. Це в повній мірі демонструє час прояву жуйного процесу у даних телят на 42 добу після народження, що на 4,2 доби довше ніж у телят, яких отримано у осінньо-зимовий період.

Про більш низький рівень життєздатності даних телят свідчить коефіцієнт катаболізму. У телят, у яких рубцеве травлення починається раніше коефіцієнт катаболізму коливається в межах від $0,98 \pm 0,08$ до $1,04 \pm 0,06$, а проба Мак Кляр Олдріча триває від $45 \pm 1,0$ до $58 \pm 1,0$ хв. У телят з більш тривалим періодом формування рубцевого травлення коефіцієнт катаболізму знижується в 1,15 рази, а проба Мак Кляр Олдріча протікає в середньому за $28 \pm 2,0$ хв.

Ключові слова: рубцева ферментація, телята, слина, жуйний процес.

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими та практичними завданнями. Важливу роль у життєдіяльності організму відіграє система травлення. Вона забезпечує надходження в організм поживних речовин з метою їх подальшого використання для забезпечення енергетичних затрат організму, його пластичних і ростових процесів, підтримання градієнта концентрації іонів. Однак, поживні речовини в організмі тварин можуть використовуватись лише після попередньої механічної та хімічної обробки, в процесі якої вони де полімеризуються втрачають свою видову специфічність. У цьому плані значну роль у жуйних тварин відіграє рубцеве травлення. Однак, дослідження з даної проблеми практично залишились поза увагою дослідників та свідчать про актуальність вивчення процесів формування рубцевого травлення у телят.

Зв'язок з важливими науковими і практичними завданнями. Проведені дослідження були складовою частиною тематичного плану «Розробка мультипараметричної системи виробництва молока на основі секретуючої функції молочної залози, пре- та постнатального

розвитку тваринного організму і методів їх корекції» № державної реєстрації 0108U010281 (Розділ 2. «Фізіолого-біохімічні параметри пре- та постнатального розвитку тварин та їх корекція» (2010-2018 рр.).

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми. Травлення – це сукупність фізичних, хімічних і фізіологічних процесів, забезпечуючих обробку і перетворення харчових продуктів хімічної сполуки, здатні засвоюватися клітинами організму.

У телят при народженні, як і у дорослих тварин, шлунок складається із чотирьох камер. При цьому функціонує в основному тільки сичуг, або четвертий шлунок, маючи об'єм приблизно у 2 рази більше, ніж усі останні відділи шлунку. В рубці одноденного теляти травних мас фактично немає, є лише невелика кількість слизу. На другий день крім слизу в рубці з'являється деяка кількість молочної рідини. Сітка приблизно в 2 рази менша за рубець. Книжка теж майже сформована, але розміри її до 10-денного віку дуже невеликі. Сичуг у новонароджених телят добре розвинений і по розмірах переважає над всіма