

УДК 576.31:611.127

КОВПАК О.С.\*, e-mail: kovpak8887@gmail.com

Національний університет біоресурсів і природокористування України

## ФЕНОТИПОВІ ТА МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ КУЛЬТУРИ КЛІТИН МІОКАРДА В ПРОЦЕСІ ЇХ КУЛЬТИВУВАННЯ

Дослідження первинної культури клітин міокарда показали, що вона морфологічно гетерогенна. Серед домінуючих епітеліоподібних клітин відмічали незначну кількість веретеноподібних. У процесі культивування відсотковий склад клітин змінювався у бік збільшення веретеноподібних клітин. Як наслідок відбувався процес переходу від гетерогенної культури на нульовому пасажі до найбільш гомогенної культури на 4 пасажі. Методом імунофенотипування популяції культури клітин, отриманих з міокарда щура, було виявлено високий рівень експресії маркерів CD10, CD66e, тропоніну I; помірний рівень – CD34, CD95; низький рівень – CD326; відсутність експресії – CD38, CD45, CD227, CD48, CD54, CD56, пан-кератину.

**Ключові слова:** культура клітин, міокард, імунофенотипування, культивування, морфологія.

**Вступ.** Як відомо, інфаркт міокарда – розвивається в результаті різкого звуження просвіту магістральних гілок коронарних артерій. Оскільки кардіоміоцити дуже чутливі до недостачі кисню, то в короткі терміни відбувається їх некротичне пошкодження [1]. Міокард дорослої тварини характеризується вкрай низьким рівнем мітотичної активності, тому не може перешкодити заміщенню м'язової тканини сполучною [2]. Сполучна тканина, як менш чутлива до нестачі кисню, заміщає уражені ділянки, компактизується і утворює сполучнотканинний рубець, який перешкоджає повноцінному скороченню серцевого м'яза. Через особливості анатомії та функцій пошкоджений міокард ніколи не відновлює своєї початкової структури [3]. Це спричинює розвиток серцевої недостатності через ряд ускладнень (аритмії, аневризми, розрив міокарда тощо) з важкими наслідками, що загрожують життю тварини.

Досягнення сучасної клітинної регенеративної терапії – нового методу лікування хвороб, пов'язаних з порушенням структури тканин внаслідок загибелі клітинних елементів, вже на сучасному етапі дає можливість використати стовбурові клітини та інші продукти клітинних технологій як ефективний засіб для відновлення втраченої структури і функцій ушкодженого органа. Сфера використання клітинних технологій постійно розширюється. В кардіології за інфаркту міокарда та кардіоміопатій методи клітинних технологій вже активно використовуються на експериментальному рівні [4, 5].

Використання клітинних матеріалів на експериментальних моделях ушкодженого міокарда показало позитивний вплив на репарацію тканини і відновлення серцевої діяльності. В якості агентів клітинної терапії інфаркту

\* Аспірант, науковий керівник – д-р вет. наук, проф. А.Й. Мазуркевич

міокарда використовували різні види клітин у тому числі і фетальні кардіоміоцити [6–9]. Однак проведені дослідження не охоплюють весь спектр проблем, пов'язаних з клітинною терапією інфаркту міокарда.

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* [10, 11]. Виникають питання, зокрема, щодо класифікації клітин міокарда залежно від способу їх отримання та ступеня зрілості. З огляду на останнє, фенотипування культури видається актуальним та своєчасним.

**Мета дослідження:** дослідити морфологічні та фенотипові зміни клітин міокарда в процесі їх культивування *in vitro* з першого до четвертого пасажу.

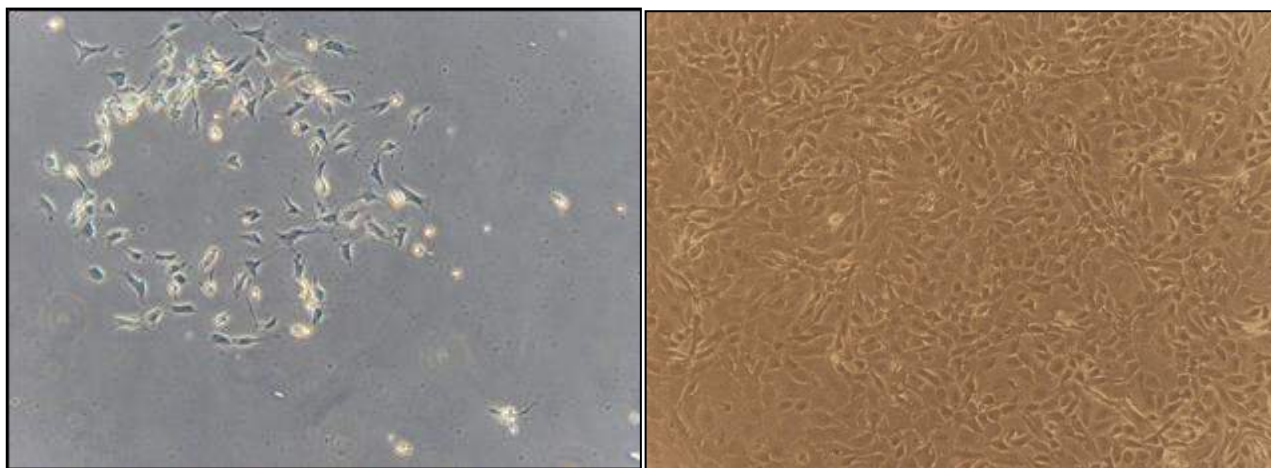
**Матеріали і методи дослідження:** експерименти на тваринах були проведені з дотриманням вимог Загальних етичних експериментів над тваринами», схвалених Національним конгресом з біоетики і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року).

У досліді використали 9 нелінійних щуренят 12-денного віку. Евтаназію дослідних тварин здійснювали шляхом декапітації під ефірним наркозом. Серце виймали з грудної порожнини, звільняли від перикарду і переносили в стерильну чашку Петрі, де декілька разів його промивали фосфатно-буферним розчином (PBS) («Sigma», США). Далі серце (без перикарду) подрібнювали ножицями на шматочки 1-2мм. Пасажування здійснювали методом експланту [12] з розрахунку 10 шматочків на чашку (d=3см) (рис. 1). Культивування проводили у стандартному культуральному середовищі: 80 % – середовище Ігла модифіковане Дульбекко (DMEM) («Sigma», США); 20% – фетальна сироватка телят (FBS) («Sigma», США); 10 мкл/см<sup>3</sup> – антибіотика-антимікотика («Sigma», США); у CO<sub>2</sub> інкубаторі за 37 °C та 5% концентрації CO<sub>2</sub>, 8 днів до утворення моношару (рис. 2).

Клітини знімали за стандартною методикою (розчином 0,25% трипсин/ЕДТА) [13]. 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, пан-кератин) та специфічного для кардіоміоцитів білка – тропоніну I («Invitrogen», США). 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), t -4°C протягом 2 годин. Далі промивали тричі у PBS. Скельця переносили на 20 хвилин у 1% розчин бичачого сироваткового альбуміну на PBS. Потім 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 PBS, на скельця наносили гліцерин та закріплювали на них покривні скельця [13]. Дослідження зразків здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа Leica DMR (Німеччина).



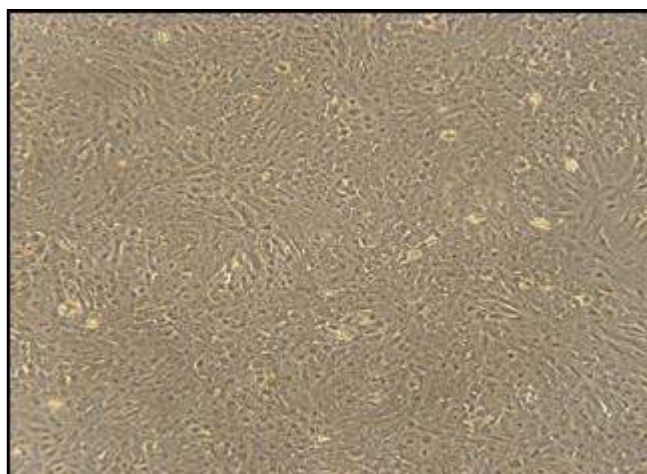
**Рис. 1.** Мікрофотографія колонії культури клітин міокарда *in vitro*, 4 доба культивування. Нативний препарат. 3б. ×50.

**Рис. 2.** Мікрофотографія моношару культури клітин міокарда, 8 доба культивування (0 пасаж). Нативний препарат. 3б. ×50.

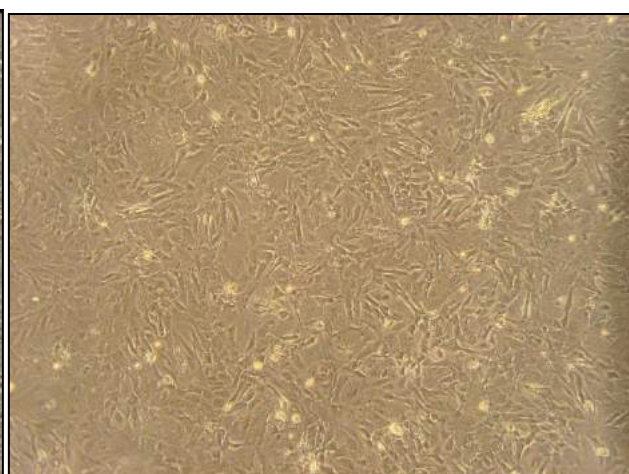
Оцінку проводили напівкількісно (метод H-Score), були обрані 20 полів у випадковому порядку при збільшенні x400. Середній бал вираховували за формулою:  $S=1xA+2xB+3xC$ , де S – показник «H-Score», значення якого знаходяться у межах від 0 (білок не експресується) до 300 (сильна експресія у 100% клітин); 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 [14].

**Результати досліджень та їх обговорення. Морфологічна характеристика культури клітин міокарда щура.** Дослідження первинної культури клітин показали, що вона була морфологічно гетерогенна, серед домінуючих епітеліоподібних клітин відмічали незначну кількість веретеноподібних (рис. 3).

У процесі культивування з кожним пасажем відбувалось збільшення кількості веретеноподібних клітин (рис. 4).



**Рис. 3. Мікрофотографія моношару культури клітин міокарда, 1 пасаж. Нативний препарат. 36. ×50**



**Рис. 4. Мікрофотографія моношару культури клітин міокарда, 4 пасаж. Нативний препарат. 36. ×50**

Таким чином під час пасажування відбувався процес переходу від гетерогенної культури 0 пасажу до більш гомогенної – 4 пасаж. Це може бути пояснене більшою швидкістю проліферації веретеноподібних клітин, що додатково підтверджується, під час наших досліджень, змінами фенотипового профілю клітин.

*Характеристика культури клітин міокарда за поверхневими маркерами.* Імунофенотипування популяції культури клітин, отриманих з міокарда щура, дозволило виявити високий рівень експресії маркерів CD10, CD66e, тропоніну I; помірний рівень – CD34, CD95; низький рівень – CD326; відсутність експресії – CD38, CD45, CD227, CD48, CD54, CD56, пан-кератину (табл. 1).

Таблиця 1.

**Зміна експресії поверхневих маркерів у популяції клітин виділених з міокарду щура з першого до четвертого пасажу,  $M \pm m$ ,  $n=3$**

Поверхневі маркери	Пасаж			
	I	II	III	IV
	<b>Оцінка в балах за методом H-Score (від 0 до 300)</b>			
10	235,7±35,6	190,0±39,9	171,0±39,4	170,3±27,7
34	8,3±5,6	53,7±14,9*	122,0±15,7**	170,0±19,7**
38	22,7±4,5	21,7±5,6	20,7±6,1	18,7±5,0
45	3,3±3,9	15,7±8,3	21,7±7,7	23,7±6,8
48	0±0,0	0±0,0	0±0,0	0±0,0
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	185,3±35,8	223,7±29,8	261,0±12,8	287,0±5,8*
95	164,0±13,4	147,3±7,7	121,3±6,6*	108,3±8,9*
227	0±0,0	0±0,0	11,7±6,7	22,7±8,9
326	6,3±3,7	10,7±1,9	21±3,5*	54,0±8,7**
Пан-кератин	0±0,0	0±0,0	14,3±5,4	41,3±9,1*
Тропонін I	257,0±23,2	231±22,1	200,7±14,3	181±9,9*

**Примітки:** \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  порівняно з контролем (контролем для кожного CD маркера виступав перший пасаж)

CD10 або ж нейтральна ендопептидаза відноситься до родини металопротеїназ [15]. У літературних джерелах описано виявлення різних груп металопротеїназ у серцевій тканині [16]. Даний факт може пояснювати наявність експресії даного маркера в отриманій культурі міокарда у межах від 235,7 (I пасаж) до 170,3 (IV пасаж) балів.

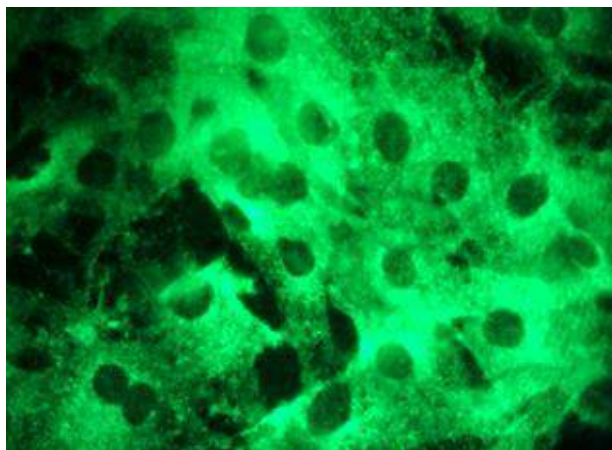
CD34 – трансмембранний мономерний глікопротеїн I типу, що опосередковує процеси міжклітинної адгезії. Він є маркером гемопоетичних стовбурових клітин, ендотеліальних клітин судин, ембріональних фібробластів [17]. Упродовж культивування відмічали достовірне збільшення CD34, що може пояснюватися зміною морфології культури упродовж пасажувань. Наші результати підтверджуються даними отриманими інших авторів [17], які виявляли CD34 у серцевій тканині. Вони пояснюють наявність CD34 експресією його ендотеліальними клітинами, що містяться у серці.

CD66e – глікозольований глікопротеїд поверхневої мембрани епітеліальних клітин [18]. Маркер клітинної адгезії [19], клітинної міграції, збудник зв'язування та активації сигнальних шляхів [20], експресується епітеліальними клітинами, чим пояснюється виявлення CD66e у більшості органів [18]. Нормальні клітини зазвичай піддаються апоптозу за відсутності адгезивних взаємодій з CD66e, явище, відоме як «аноїкіс» (anoikis). Стійкість до аноїкісу характерна для пухлинних клітин. [20]. У досліджуваній культурі клітин достовірно збільшується з першого (185,3 балів) до четвертого (287,0 балів) пасажу (рис. 5). Отриманні дані можуть вказувати на відсутність активної неопластичної трансформації культури клітин міокарда.

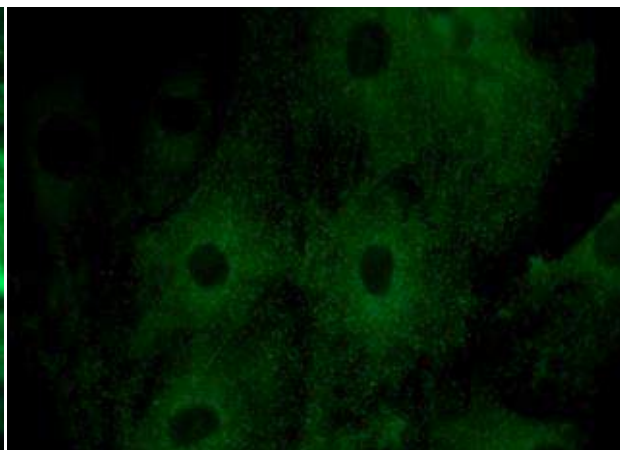
CD95 – трансмембранний глікопротеїд I типу, опосередковує сигнал, що ініціює апоптоз [21], також він експресований на клітинах серця. Починаючи з першого пасажу інтенсивність експресії даного маркера достовірно знижується з 164,0 до 108,3 балів відповідно. Зменшення експресії CD95 пропорційно зменшенню кількості тропоніну I в культурі клітин міокарда. Це можна пояснити значним зменшенням кількості епітеліоподібних клітин внаслідок апоптозу або низького рівня проліферації.

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 [22]. Під час культивування нами відмічалось прискорення утворення моношару з пасажами та зміну морфології клітин, що у свою чергу пояснює достовірне збільшення експресії CD326 від 6,3 до 54,0 з першого до четвертого пасажу відповідно.

Пан-кератин – входить до складу проміжних філаментів цитоскелета епітеліальних клітин [23]. Наявність позитивної реакції з даними антитілами свідчить про епітеліальне походження клітин [24]. Під час дослідження відмічали достовірне збільшення експресії від 0 (I пасаж) до 41,3 балів (IV пасаж) (рис. 6).



**Рис. 5. Рівень експресії CD66e у культурі клітин міокарда, 4 пасаж. Флюоресцентна мікроскопія. Зб. ×2000**



**Рис. 6. Рівень експресії пан-кератину у культурі клітин міокарда, 4 пасаж. Флюоресцентна мікроскопія. Зб. ×2000**

Тропонін I – специфічний білок м'язової тканини серця [25]. Протягом культивування відмічали його достовірне зменшення з першого (257,0 балів) до четвертого (181,0 балів) пасажу, що свідчить про зміну фенотипу культури клітин міокарда.

Експресію CD227, CD45, CD38, CD48, CD54, CD56 впродовж всього терміну дослідження відносили до категорії «відсутність експресії».

Дослідження культури клітин показало, що експресія маркерів, характерних для серцевого м'яза (CD10, CD95, CD 38, тропонін I), в процесі культивування знижується. У той час, маркери, характерні для гемопоетичних (CD34, CD45) та епітеліальних (CD66e, CD326, пан-кератин) клітин, збільшують інтенсивність своєї експресії з кожним пасажем. Дані, отримані від імунофенотипового аналізу культури клітин міокарда, підтверджуються зміною морфології моношару за рахунок фібробластоподібних клітин.

#### **Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1. Первинна культура клітин міокарда щура – гетерогенна, домінуюча кількість клітин має епітеліоподібну морфологію.
2. У процесі культивування культура клітин змінює епітеліоподібну морфологію на фібробластоподібну за рахунок вищого індексу проліферації клітин з фібробластоподібною морфологією.
3. Зміна експресії поверхневих маркерів змінюється з кожним пасажем, достовірно збільшується CD34, CD66e, CD326, пан-кератин; достовірно зменшується CD95 та тропонін I.
4. Під час культивування відмічали появу експресії нових поверхневих маркерів (CD227 та пан-кератин), що свідчить про диференціацію культури та набування клітинами інших властивостей та ознак.

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Philip R. Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice / Philip R. Fox, David Sisson, N. Sydney Moise. – [2nd ed.] – Philadelphia: W.B.SAUNDERS COMPANY, 1999. – 955 p.

2. Rumyantsev P.P. Ultrastructural reorganization, DNA synthesis, and mitotic division of myocytes in atria of rats with left ventricle infarction / Rumyantsev P.P. // *Virchows Arch.*, 1974. – № 15. – P.357–378.
3. Frangogiannis N.G. The inflammatory response in myocardial infarction / Frangogiannis N.G., Smith C.W., Entman M.L. // *Cardiovasc Res.*, 2002. – № 53(1). – P. 31–47.
4. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up / Smits P.C., van Geuns R.J. Poldermans D. et al // *J Am Coll Cardiol.*, 2003. – №42. – P. 2063–2069.
5. Hill J.M. Outcomes of granulocyte colony-stimulating factor administration to patients with severe coronary artery disease / Hill J.M., Syed M.A., Arai A.E. et al // *Circulation*, 2004. – Vol. 110 (suppl III). – P. 352.
6. Atkins B.Z. Myogenic cell transplantation improves in vivo regional performance in infarcted rabbit myocardium / Atkins B.Z., Hueman M.T., Meuchel J.M. et al // *J. Heart Lung Transpl.*, 1999. – Vol.18Ю – №12. – P. 1173–1180.
7. Kawamoto A. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia / Kawamoto A., Tkebuchava T., Yamaguchi J. et al // *Circulation.*, 2003. – Vol. 107, №3 – P. 461–468.
8. Leobon B. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host / Leobon B., Garcin I., Menasche P. et al // *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2003. – Vol.100, №13. – P. 7808–7811.
9. Skobel E. Transplantation of fetal cardiomyocytes into infarcted rat hearts results in long-term functional improvement / Skobel E., Schuh A., Schwarz E.R. et al // *Tissue Eng.* – 2004. – Vol.10, №5(6). – P. 849–864.
10. И.Б. Бродский Применение мезенхимальных стволовых клеток для восстановления структуры и функции поврежденных тканей и органов / И.Б. Бродский, С.А. Брянцева, О.Н. Жаппарова и др. // *Эфферент. и физ.-хим. мед.* – 2011. – № 1. – С. 4–10.
11. Цымбалюк В.И. Нейрогенные стволовые клетки: между прошлым и будущим / В.И. Цымбалюк, В.В. Медведев // *Лекарь.* – 2008. – № 7. – С. 36–42.
12. Ian Freshney R. Culture of animal cells: a manual of basic technique / R. Ian Freshney. – [5<sup>th</sup> ed.] – USA: John Wiley & Sons, 2005. – 642p.
13. Мазуркевич А.Й. Клітинні технології у ветеринарній медицині / А.Й. Мазуркевич, В.В. Ковпак, В.Б. Данілов // *Навчальний посібник* – К.: КОМПРИНТ – 2014. – 132 с.
14. Упоров А.В. Иммуногистохимическое изучение клеток рака молочной железы с использованием разных маркеров пролиферации / А.В. Упоров, В.Ф. Семиглазов, К.М. Пожариский // *Арх патологии.* 2000. – №2. – С. 26–30
15. Shipp M.A. Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): direct evidence by cDNA transfection analysis / M.A. Shipp, J. Vijayaraghavan, E.V. Schmidt et al // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989. – №86(1). – P. 297–301.
16. Гринь В.К. Роль системи матриксних металопротеїназ та їх тканинних інгібіторів у формуванні постінфарктного ремоделювання серця (аналітичний огляд літератури) / В.К. Гринь, О.І. Бассов, М.Т. Ватутін, А.С. Воробйов // *Буковинський медичний вісник*, 2012. – Том 16. – № 2 (62). – С. 152–155.
17. 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.
18. 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.
19. Zhang G. Tissue specific cytotoxicity of colon cancer cells mediated by nanoparticle-delivered suicide gene in vitro and in vivo / Zhang G., Liu T., Chen Y.H., Chen Y., et al // *Clin Cancer Res.*, 2009. – Vol.15, №1. – P. 201–207.

20. Blumenthal R.D. Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen) / R.D. Blumenthal, H.J. Hansen, D.M. Goldenberg // *Cancer. Res.*, 2005. – Vol.65. – №19. – P. 8809–8817.
21. 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 // *J Exp Med.*, 1989. – Vol.169. – №5. – P. 1747–1756.
22. Münz M. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation / Münz M., Kieu C., Mack B. et al // *Oncogene*, 2004. – Vol. 23. – №24 – P. 5748–5758.
23. Chang L. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk / L. Chang, R.D. Goldman // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004. – Vol. 5. – №8. – P. 601–613.
24. Moll R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells / Moll R., Franke W.W., Schiller D.L. et al // *Cell*, 1982. – Vol.31. – №1. – P. 11–24.
25. Filatov V.L. Epitope mapping of anti-troponin I monoclonal antibodies / V.L. Filatov, A.G. Katrukha, A.V. Bereznikova et al // *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1998. – Vol.45. – №6. – P. 1179–1187.

#### **ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК МИОКАРДА В ПРОЦЕССЕ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ / Ковпак О.С.**

*Исследование первичной культуры клеток миокарда показало, что она морфологически гетерогенная. Среди доминирующих эпителиоидных отмечали незначительное количество веретенообразных клеток. В процессе культивирования процентный состав клеток изменялся в сторону веретенообразных клеток. В результате происходил процесс перехода от гетерогенной культуры 0 пассажа к наиболее гомогенной культуре 4 пассажа. Во время иммунофенотипирования популяции культуры клеток, полученных из миокарда крысы, отмечали высокий уровень экспрессии маркеров CD10, CD66e, тропонина I; умеренный уровень – CD34, CD95; низкий уровень – CD326; отсутствие экспрессии – CD38, CD45, CD227, CD48, CD54, CD56, пан-кератина.*

**Ключевые слова:** культура клеток, миокард, иммунофенотипирование, культивирование, морфология.

#### **PHENOTYPIC AND MORPHOLOGICAL CHANGES OF MYOCARDIAL CELLS CULTURE DURING CULTIVATION / Kovpak O.S.**

**Introduction.** *The current practice of cell therapy implementation requires meticulous expert analysis of source material, careful detalization each of the stages of the using cells material and tracking the fate of the last one in vitro or in vivo. Therefore phenotyping of the cell culture seems to be relevant and timely.*

**Goal of the work.** *Investigate morphological and phenotypic changes of myocardial cells during their cultivation in vitro from the first to the fourth passage.*

**Materials and methods.** *Culture of the rats myocardial cells of the first to the fourth passages were used in this research. Control of phenotype changes were performed by detection of CD-markers (CD10, CD38, CD34, CD45, CD48, CD54, CD56, CD66e, CD96, CD227, CD326, pan keratin) and cardiomyocyte-specific protein – troponin I. Morphological changes of culture myocardial cells were evaluated visually.*

**Results of research and discussion.** *Our research revealed that the expression of cardiac muscle marker (CD10, CD95, CD 38, troponin I) decreased during cultivation. Meantime the intensity of markers expression, which characterized by hematopoietic (CD34, CD45) and epithelial (CD66e, CD326, pan keratin) cells increased of each passage. The data which obtained*



from immunophenotyping analysis culture myocardial cells were confirmed change morphology monolayer through fibroblast cells.

**Conclusion and prospects for further research:**

1. Primary culture of the rats myocardial cells heterogeneous and the dominant cell quantity epithelioid morphology.
2. During the cultivation cell culture changed epithelial-like cell morphology to fibroblast-like through a higher proliferation index of fibroblast-like cell.
3. Change of the expression of surface markers varies in each passage CD34, CD66e, CD326, pan-keratin increased significantly; SD95 and troponin I reduced significantly
4. During the cultivation we observed the emergence of expression of new surface markers (CD227 and pan-keratin), which indicate about the differentiation of cells culture and its acquisition of other properties and characteristics.

**Keywords:** cell culture, myocardium, immunophenotyping, culturing, morphology.

**REFERENCE**

1. Fox, P.R., Sisson, D., & Moise, N.S. (1999). Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice. *Philadelphia, W.B.SAUNDERS COMPANY*.
2. Romyantsev, P.P. (1974). Ultrastructural reorganization, DNA synthesis, and mitotic division of myocytes in atria of rats with left ventricle infarction. *Virchows Arch.* 15, 357-378.
3. Frangogiannis, N.G., Smith, C.W., & Entman, M.L. (2002). The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.*, 53(1), 31-47.
4. Smits, P.C., van Geuns, R.J., & Poldermans, D. et al (2003). Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 42, 2063-2069.
5. Hill, J.M., Syed, M.A., & Arai, A.E. et al (2004). Outcomes of granulocyte colony-stimulating factor administration to patients with severe coronary artery disease. *Circulation*, 110, 352.
6. Atkins B.Z., Hueman M.T., & Meuchel J.M. et al (1999). Myogenic cell transplantation improves in vivo regional performance in infarcted rabbit myocardium. *J. Heart Lung. Transpl.*, 18 (12), 1173-1180.
7. Kawamoto A., Tkebuchava T., & Yamaguchi J. et al (2003). Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation.*, 107 (3), 461-468.
8. Leobon B., Garcin I., & Menasche P. et al (2003). Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100 (13), 7808-7811.
9. Skobel, E., Schuh, A., & Schwarz, E.R. et al (2004). Transplantation of fetal cardiomyocytes into infarcted rat hearts results in long-term functional improvement. *Tissue Eng.* 10 (6), 849-864.
10. Brodskiy, I.B., Bryantseva, I.A., & Zhaparova, O.N. et al (2011). Primeneniye mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok dlya vosstanovleniya struktury i funktsii povrezhdennykh tkaney i organov [Use of mesenchymal stem cells for repair of damaged structure and function of tissues and organs]. *Efferent. i fiz.-khim. med. – Efferent and phys.-chem. med.*, 1,4-10 [in Russian].
11. Tsymbalyuk, V.I., & Medvedev, V.V. (2008). Neyrogennyye stvolovyye kletki : mezhdru proshlym i budushchim [Neurogenic Stem cells: between past and future]. *Lekar' – Healer.* 7, 36-42 [in Russian].
12. Ian, Freshney R. (2005) Culture of animal cells: a manual of basic, 5<sup>th</sup> ed. USA: *John Wiley & Sons*.
13. Masurkewitsch, A.J., Kowpak, W.W., & Danilow, W.B. (2014). *Klitinni tehnologii u weterinarnij medizini. Nawtschal'nij pocibnik. [Cellular technologies in veterinary medicine. Study Guide]*. Kyev : KOMPRINT [in Ukrainian].

14. Uporov, A.V., Semihlazov, V.F., & Pozharis, K.M. (2000). Immunohystokhymicheskoe 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].
15. 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.
16. Grin', V.K., Basov, O.I., & Vatutin, M.F. (2012). Pol' sistemi matriksnikh metaloproteinaz ta ikh tkaninnikh ingibitoriv u formuvanni postinfarktnogo remodelyuvannya sertsya (analitichniy oglyad literaturi) [Role system of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the formation of postinfarction cardiac remodeling (analytical literature review)]. *Bukovins'kiy medichniy visnik – Bukovina medical journal*, 16; 2(62), 152-155 [in Ukrainian].
17. Krause, D.S., Fackler, M.J., & Civin, C.I. et al (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87 (1), 1-13.
18. Hammarström, S. (1999). The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer. Biol.*, 9, 67-81.
19. Zhang, G., Liu, T., & Chen, Y.H. et al. (2009). Tissue specific cytotoxicity of colon cancer cells mediated by nanoparticle-delivered suicide gene in vitro and in vivo. *Clin. Cancer. Res.*, 15 (1), 201-207.
20. Blumenthal, R.D., Hansen, H.J., & Goldenberg, D.M. (2005). Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 Carcinoembryonic Antigen. *Cancer. Res.*, 65 (19), 8809-8817.
21. 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. *J. Exp. Med.*, 169 (5), 1747-1756.
22. Münz, M., Kieu, C., & Mack, B. et al (2004). The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene*, 23 (24) 5748-5758.
23. Chang, L., & Goldman, R.D. (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5 (8), 601-613.
24. Moll, R., Franke, W.W., & Schiller, D.L. et al (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured. *Cell*, 31 (1), 11-24.
25. Filatov, V.L., Katrukha, A.G., & Bereznikova, A.V. et al (1998). Epitope mapping of anti-troponin I monoclonal antibodies. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 45 (6), 1179-1187.

**УДК 636.09:579.62:579.88:001.891:577.213**

**КУДРЯВЧЕНКО О.П.**, канд. вет. наук, e-mail:

kudryavchenko@biocontrol.com.ua

**РОМАНЕНКО О.А.**, канд. вет. наук, e-mail: romanenko.oleg15@gmail.com

**ПУСТОВІТ Н.А.**, e-mail: nadiapustovit@gmail.com.

**РОМАНИШИНА Ю.Р.**, e-mail: yuliaromanyshyna@gmail.com

*Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів*

## **КУЛЬТИВУВАННЯ ЗБУДНИКА *TOXOPLASMA GONDII* В КУЛЬТУРІ КЛІТИН**

*В статті наведені результати визначення динаміки змін кількості тахізоїтів *Toxoplasma gondii* за різних умов зараження перещеплювальних ліній культур клітин Vero,*