

*Materials and methods.* It was conducted studying the antigenic properties of the vaccine on the induction of specific antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, viral diarrhea, parainfluenza-3 viruses and pasteurellosis, as well as histomorphological research of spleen, liver, kidney, small intestine and lymph nodes.

*Results.* As a result of studies it was found the antigenic activity of the combined inactivated virus-and-bacterial vaccine against infectious rhinotracheitis, viral diarrhea, parainfluenza-3, pasteurellosis of cattle, as well as its immunobiological safety and immunogenicity. So, it was established the induction of specific antibodies at 3,0-6,0 log<sub>2</sub> to IBR virus in neutralization test, and to PI-3 at 6,5-7,5 log<sub>2</sub> hemagglutination inhibition test. Immunogenicity of vaccine is confirmed by morphological studies: increase in the number and size of lymphoid periarterial follicles in spleen, germinative centers, increasing the number of lymphatic nodules and diffuse lymphoid tissue in the cortical and paracortical areas.

*Prospects for further research.* The obtained results are the basis for preparation testing. The obtained results are the basis for the testing of the inactivated viral and bacterial vaccines against infectious bovine rhinotracheitis, viral diarrhea, parainfluenza-3 and pasteurellosis in cattle.

**Keywords:** immunity, vaccine, infectious rhinotracheitis, viral diarrhea, parainfluenza-3, pasteurellosis, histomorphology of immune protection organs.

УДК 602:614.9/636.09

### СУЧАСНЕ І МАЙБУТНЄ ВИКОРИСТАННЯ КЛІТИННИХ ТЕХНОЛОГІЙ У ВІТЧИЗНЯНІЙ ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ

Мазуркевич А.Й.

Національний університет біоресурсів і природокористування України,  
м. Київ, e-mail: amazurkevich@mail.ua

*Наведені результати досліджень ефективності використання аутогенних, алогенних і ксеногенних стовбурових клітин для відновлення структури та функції експериментально ушкоджених шкіри, хряща, паренхіми нирок та печінки у лабораторних і дрібних домашніх тварин, а також імунної сумісності трансплантованих МСК в організмі тварин-реципієнтів.*

**Ключові слова:** аутогенні, алогенні та ксеногенні мезенхімальні стовбурові клітини, імунна сумісність, регенерація шкіри, хряща паренхіми нирок, печінки; перспективи використання клітинних технологій у ветеринарній медицині.

Протягом життя в дорослому організмі постійно відбувається відновлення клітинного матеріалу. На зміну загиблих клітин у процесі їх природного відмирання (апоптозу), як і після різноманітних ушкоджень з послідуочим їх некрозом, приходять новоутворені клітини. Таке самовідновлення забезпечує повноцінну життєдіяльність організму протягом всього життя тварини залежно від сили і характеру процесів компенсації та адаптації.

Джерелом «будівельного матеріалу» для оновлення структури тканин служать стовбурові клітини. Це первинні клітини багатоклітинних організмів, здатні *самовідновлюватися* шляхом поділу з подальшим диференціюванням у спеціалізовані типи клітин, кількість яких в організмі сягає 350 видів. Саме завдяки цьому явищу в організмі забезпечується стабільний рівень процесів самовідновлення.

Особливість поділу стовбурової клітини полягає в тому, що вона дає початок не двом дочірнім клітинам, а лише *одній дочірній та одній стовбуровій*. Завдяки такому *асиметричному поділу* кожна стовбурова клітина повертається до стану спокою, а дочірня проліферує, продовжуючи ділитись симетрично певну кількість разів, тим самим забезпечуючи клітинний гомеостаз спеціальних клітин у тканинах і органах.

Таким чином, стовбурові клітини забезпечують постійне відновлення клітинного складу тканин впродовж усього життя організму.

В останні 20 років досить інтенсивно вивчаються можливості використання стовбурових клітин (СК) для відновлення структури ушкоджених або патологічно змінених тканин. Бурхливий розвиток регенеративної медицини століття припав на кінець XX – початок XXI століття. Основним завданням її є стимуляція процесів відновлення втрачених структури і функцій тканин за рахунок мобілізації активності стовбурових клітин самого організму або ж додаткового введення клітинного матеріалу, культивованого поза організмом *in vitro*.

Встановлено, що на самих ранніх стадіях свого розвитку зародок повністю складається із стовбурових клітин, з яких потім формуються тканини і органи організму. У новонародженого 1 стовбурова клітина приходиться приблизно на 10 000 звичайних клітин, у зрілому віці це співвідношення змінюється в бік зменшення СК – 1 на 300 000 клітин. Отже вікові зміни поступово приводять до виснаження джерел СК, внаслідок чого знижуються можливості тканин в організмі до самовідновлення його тканин.

З кожним роком поповнюється перелік тканин, в яких виявлені джерела стовбурових клітин у дорослому організмі: кістковий і головний мозок, дентальна пульпа, кровоносні судини, скелетні м'язи,

епітелій шкіри і травного тракту, жирова тканина, рогівка, печінка, підшлункова залоза, тканини молочної залози. Очевидно, кожна тканина організму має у своєму складі певну кількість стовбурових клітин, які необхідні їй для підтримання постійного клітинного складу тканин.

Доведено наявність так званих регіональних (або тканино специфічних) стовбурових клітин, які здатні відтворювати клітини не тільки тканин свого типу, а й диференціюватись у клітини інших видів тканин завдяки своїй пластичності. Це явище, яке носить назву трансдиференціація, має великий біологічний смисл і доводить, що в організмі існує можливість у випадку значних руйнувань тканинного матеріалу використовувати для його відновлення стовбурові клітини інших тканин.

У 2012 році лауреатами Нобелівської премії в області медицини стали два дослідники за відкриття нових властивостей стовбурових клітин. Так, британський біолог Джон Гердон вперше використав ДНК із спеціалізованих клітин жаби для створення нових пуголовків. Ця ідея була використана шотландськими вченими у 1997 році для клонування нового організму овечки Доллі.

Японський вчений Сінъя Яманакі у 2006 році вперше у світі отримав із дорослих клітин індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPS-клітини), подібні за властивостями до ембріональних стовбурових клітин (ЕСК).

Ці відкриття, як і цілий ряд інших результатів досліджень вчених різних країн останніх років доводять, що біологія клітини, зокрема стовбурової, до кінця ще не розкрита, що переконує нас у необхідності продовжувати дослідження в цьому напрямку задля успішного та безпечного застосування клітинного матеріалу

У ветеринарній медицині особливої уваги потребують дослідження можливості використання з лікувальною метою алогенних і ксеногенних клітин.

Застосуванню аутогенних клітин присвячено вже достатньо переконливого матеріалу. Успішне використання аутогенних стовбурових клітин у гуманній та ветеринарній медицині за умови вмілого їх застосування дає позитивні, а іноді, й приголомшливі результати. Проте можливості застосування цього типу клітин обмежені, особливо в гуманній медицині, через недостатність джерел їх отримання. Спірним можна назвати і результативність застосування цих клітин у випадку їх отримання від вже хворого донора для послідувального лікування цього самого хворого донора, який вже стає реципієнтом. Потрібні дуже великі зусилля та вміння, щоб отримати культуру СК з високою біологічною активністю. Саме цей фактор, з нашого погляду, є основним, лімітуючим, у забезпеченні достатньої кількості високоефективного клітинного матеріалу для широкого використання аутогенних стовбурових клітин.

У ветеринарній медицині використання аутогенних стовбурових клітин має ті ж проблеми, що і в гуманній медицині. Тому закономірним є пошук альтернативних джерел отримання клітинного матеріалу.

Зважаючи на високу актуальність цього питання науковцями проблемної наукової лабораторії загальної фізіології та експериментальної патології тварин НУБіП України досліджена ефективність застосування алогенних і ксеногенних стовбурових клітин для відновлення структури і, відповідно, функції експериментально ушкоджених тканин у різних тварин. Поряд із дослідженням ефективності застосування стовбурових клітин на процеси відновлення експериментально уражених тканин залежно від їх дози, способу введення та характеру патологічного процесу в організмі вивчалась сумісність введеного клітинного матеріалу з організмом тварини-реципієнта.

У досліджах на лабораторних і дрібних домашніх тваринах вивчалась ефективність алогенних і ксеногенних клітин, застосованих для відновлення експериментально ушкоджених шкіри, суглобового хряща та паренхіматозних органів (печінки та нирок).

У дослідженнях науковців проблемної наукової лабораторії фізіології та експериментальної патології тварин НУБіП України використані аутогенні, алогенні та ксеногенні стовбурові клітини, отримані із біоптату кісткового мозку, а також із пуповини новонароджених тварин. В усіх випадках тварини були клінічно здоровими. В експериментах патологічні процеси моделювали на майбутніх реципієнтах на лабораторних тваринах – щурах і кролях, на дрібних домашніх тваринах – собаках і котах; у коней лікували клінічні форми ушкоджень [1,2].

Дослідження виконані відповідно до вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006) та положень «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (1986).

Отримані результати в усіх випадках були позитивними. Під впливом СК активізувались процеси регенерації експериментально чи спонтанно ушкоджених тканин, які приводили до повного відновлення ушкоджених тканин, що підтверджено клінічними, біохімічними та гістологічними дослідженнями.

Разом з тим проявлялись і особливості впливу введених клітин як на місцевому рівні, так і на рівні цілісного організму. Ці особливості залежали в першу чергу від дози введеного матеріалу, способу його введення, виду клітин, а також від індивідуальних і видових особливостей організму тварин-реципієнтів. Важливим є також високий професійний рівень дослідників та якість використовуваних реактивів, приладів і матеріалів. Отримання активної фракції МСК включає низку високопрофесійних прийомів на стадії відбору у тварин клітинної маси, отримання чистої культури МСК, їх культивування, зберігання та застосування. Основними вимогами до цих прийомів є забезпечення високої біологічної активності застосовуваних МСК. Від того, в якій мірі дослідники зможуть впевнено керувати диференціюванням

стовбурових клітин у специфічні типи клітин, залежить ефективність застосування їх для лікування тварин.

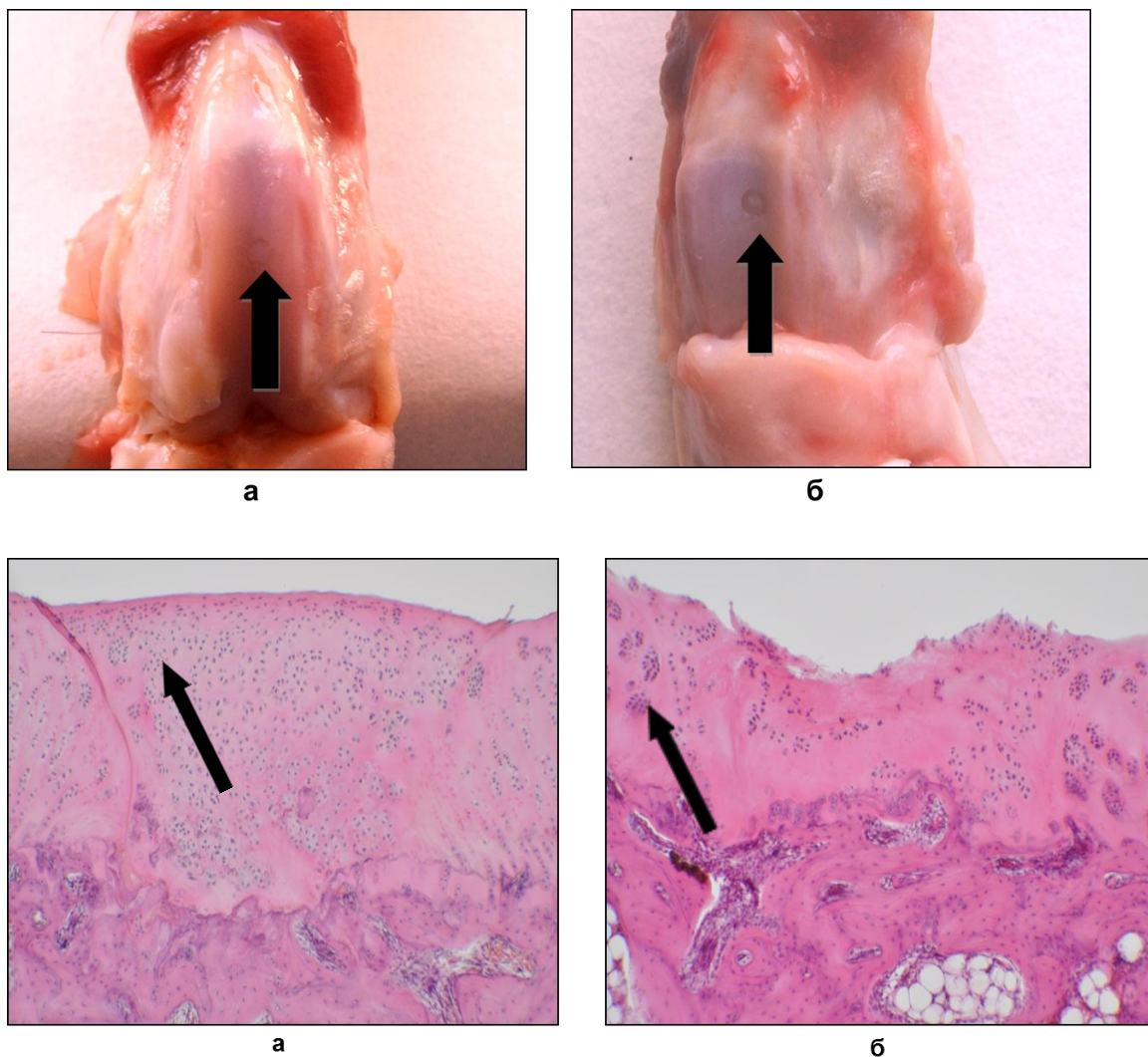
У досліджах із застосування МСК для відновлення експериментально ушкодженої шкіри показано, що пересажені клітини стимулюють заживлення рани шкіри шляхом прискореного синтезу останніми екстрацелюлярного матриксу, факторів росту, стимуляції проліферації епітелію, направлених на відновлення як епідермального, так і дермального компоненту шкіри.

Вже на 24 добу після формування дефекту шкіри у тварин, яким застосовували МСК, візуально було відмічено спадання струпу, під яким була регенована ділянка, яка являла собою ділянку шкіри рожевого кольору, без волосяного покриву, діаметром 2–3 мм. При мікроскопічному дослідженні цієї ділянки було виявлено завершену епітелізацію дефекту. У тварин контрольної групи на цей час відновлення відбулось лише на 86,4 % площі. Причому, дефект шкіри був заповнений значною кількістю клітин рубцевої тканини.

Застосування алогенних МСК для відновлення експериментально ушкодженого гіалінового хряща через 45 днів приводило до повного заживлення хряща із заповненням дефекту клітинами хрящової тканини. Тканина була щільна на дотик. Суміжний хрящ блискучого відтінку, без візуальних ознак ерозії та розволокнення.

У тварин контрольної групи заживлення хряща відбувалось заповненням дефекту клітинами, але поверхня регенерату була нерівна, переривчаста, хрящ пористої пухкої структури, що свідчить про недостатнє його відновлення.

При застосуванні ксеногенних МСК через 45 днів виявлено лише часткове відновлення суглобового хряща; дефект лише частково заповнений нещільною речовиною бурого кольору. Суміжна ділянка хряща набула тьмяного відтінку (рис. 1, б).



**Рис. 1.** Загальний вигляд і мікроскопічна будова суглобового хряща стегнової кістки кроля через 45 днів після механічного нанесення дефекту та введення МСК (автор: В.І. Журба): **а** – після застосування алогенних МСК; **б** – після застосування ксеногенних МСК. Стрілками показано ділянки ураження. Гістопрепарат, фарбування гематоксиліном і еозином (x 75).

При гістологічному дослідженні виявлено, що дефект заповнений переважно гіаліновою тканиною. Хондроцити у ній розташовані хаотично, без збереження (рисунк 1), характерних для суглобового хряща у тварин після застосування алогенних МСК (відсутня організація хондроцитів у ізогенні групи та розміщення їх у вигляді поздовжніх колонок). Хондроцити округло-овальної форми, ядерно-цитоплазматичне співвідношення зміщене у сторону ядра, зрідка зустрічалися двоядерні клітини. Висота хряща у зоні регенерації була меншою, порівняно з неушкодженими ділянками суглобового хряща.

Вивчення сумісності введених алогенних МСК з організмом тварини-реципієнта показало відсутність цитотоксичного ефекту лімфоцитів крові тварин-реципієнтів по відношенню до введених алогенних МСК. Очевидно, має місце описане іншими авторами явище толерантності організму тварини-реципієнта на введені алогенні клітини, яке зумовлюється здатністю алогенних МСК проявляти імунотулюючий вплив *in vivo*.

Проте застосування ксеногенних МСК (собаки) викликає аналогічну реакцію у лімфоцитів крові тварини-реципієнта (кроля) лише *in vitro*. Уведені ж у кров кроля (*in vivo*) для відновлення структури експериментально ушкодженого суглобового хряща МСК собаки встановлена наявність цитотоксичності сироватки крові кроля.

Отже, застосування ксеногенних МСК з метою активізації репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів дає нижчий лікувальний ефект і викликає імунну відповідь у вигляді підвищення цитотоксичності сироватки крові.

У досліджах із застосуванням МСК кішкам і щурам із гострою нирковою недостатністю (ГНН) встановлено, що вже на 7–14-у добу в залежності від дози введених клітин відбувається відновлення структури і функції нирок, що підтверджено достовірною динамікою біохімічних показників крові та сечі та гістологічних змін у паренхімі нирок. У порівнянні із традиційними методами лікування ГНН застосування МСК показало достовірно вищий ефект; причому, при традиційному методі лікування статистично достовірної нормалізації біохімічних показників сироватки крові та структури тканин нирок не відмічено.

У досліджах із використанням МСК для відновлення структури і, відповідно, функції печінки у щурів і собак із хронічним експериментальним токсичним гепатитом також встановлено достовірно вищий відновлювальний їх ефект у порівнянні із традиційними методами лікування, на що вказують результати біохімічних і гістологічних досліджень крові та печінки.

Перспективи використання цих технологій як вискоєфективних екологічно чистих і нешкідливих для відновлення господарської цінності та здоров'я тварин дуже привабливі. Такі дослідження вимагають великих затрат на першому етапі. Але згодом вони окупляться сторицею, якщо до проблеми підходити з науково та економічно обґрунтованими методами.

На шляху подальших досліджень виникає цілий ряд ще не зовсім з'ясованих питань щодо встановлення «поведінки» стовбурових клітин у процесі маніпуляції з ними *in vitro* та після трансплантації клітинного матеріалу в організм тварини-реципієнта. Саме вирішення ряду проблем такого характеру відкриває шлях до ефективного та безпечного використання клітинних технологій у регенеративній ветеринарній медицині.

Дуже важливою стороною досліджень в клітинній біології є з'ясування властивостей СК в організмі самого донора і, зокрема, вивчення впливу різних факторів та умов, які безпосередньо та опосередковано негативно чи позитивно впливають на популяцію СК, що у великій мірі впливає на тривалість життя організму. Надзвичайно важливо з'ясувати, яка участь цих клітин в патогенезі раку та інших практично невиліковних хвороб.

Ці та безліч інших важливих питань фундаментального та прикладного характеру ще чекають на дослідників. Їх вирішення – запорука ефективного впровадження в клініку самих сучасних методів лікування як у ветеринарній, так і в гуманній медицині.

**Висновки.** 1. Доклінічні випробування лікувальної ефективності мезенхімальних стовбурових клітин на тваринах дали достовірно високі та обнадійливі результати і відкривають в подальшому нові можливості методів клітинної терапії у ветеринарній медицині для відновлення структури і функції шкіри, суглобових хрящів, лікування тварин із гострою нирковою недостатністю та хронічним токсичним гепатитом.

2. Застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у ветеринарній медицині дає високий лікувальний ефект, подібний до аутологічних МСК.

3. Застосування ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин дає достовірно нижчі результати, а також викликає розвиток імунних реакцій з боку організму тварин-реципієнтів.

4. Дослідження особливостей стовбурових клітин в організмі тварини донора за межами організму (отримання, культивування, зберігання, способу застосування), а також в організмі тварини-реципієнта вкрай – одна із сучасних проблем ветеринарної науки, вирішення якої відкриває шлях до використання безпечних і ефективних методів забезпечення здоров'я тварин, можливого використання клітинного матеріалу тваринного походження як альтернативного джерела клітинної регенераційної гуманної медицини.

Список літератури

1. Стівбукові клітини у ветеринарній медицині. Том перший. Експериментальні дослідження з отримання, зберігання і застосування мезенхімальних стівбурових клітин [Текст]: монографія / А. Й. Мазуркевич [та ін.]. – К.: ТОО ЦП «Компринт», 2013. – 269 с.
2. Використання мезенхімальних стівбурових клітин для корекції репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів [Текст]: метод. реком.; затв. Наук.-метод. радою Держ. вет. та фітосанітар. служби України (протокол № 3 від 30.10.2012 р.) / А. Й. Мазуркевич [та ін.]. – К.: Вид. центр НУБіП України, 2012. – 42 с.

**MODERN AND FUTURE USING OF THE CELLULAR TECHNOLOGY  
IN THE DOMESTIC VETERINARY MEDICINE**

**Mazurkewich A.J.**

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

*These results effective use of autologous, allogeneic and xenogeneic stem cells to restore the structure and function of experimentally damaged skin, cartilage, kidney and liver parenchyma in the laboratory and small animals, as well as the immune compatibility of transplanted MSCs in animals recipient.*

**Keywords:** autologous, allogeneic and xenogeneic mesenchymal stem cells, immune compatibility, regeneration of skin, cartilage parenchyma of the kidney, liver, prospects of cellular technology in veterinary medicine.

УДК 575:602:611.013.8/018:636.1

**ДОСЛІДЖЕННЯ КАРІОТИПУ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТВІБУРОВИХ КЛІТИН ПУПКОВОГО  
КАНАТИКУ ЛОШАТ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO***

**Мазуркевич А.Й., Малюк М.О.**

Національний університет біоресурсів і природокористування України,  
м. Київ, e-mail: amaz@nauu.kiev.ua

**Стародуб Л.Ф., Копилов К.В.**

Інститут розведення і генетики тварин НААН України, м. Бровари

*Наведені результати цитогенетичного аналізу мезенхімальних стівбурових клітин пупкового канатика лоша залежно від тривалості їх культивування *in vitro*. Встановлено, що при культивуванні МСК із збільшенням числа пасажів, збільшується кількість клітин із зміненним геномом, яке характеризується збільшенням частки метафазних пластинок із анеуплоїдією та наявністю в клітинах тетраплоїдного каріотипу. Також встановлено підвищені межі параметрів мікроядерного тесту. Отримані результати свідчать про необхідність проведення генетичного моніторингу мезенхімальних стівбурових клітин, які використовуються у відновлювальній клітинній терапії.*

**Ключові слова:** *in vitro*, цитогенетичний аналіз, мікроядерний тести.

Мезенхімальні стівбукові клітини (МСК) – це група недиференційованих клітин, які знаходяться у багатьох тканинах організму тварин і людей, однак найчастіше їх отримують із кісткового мозку та жирової тканини, а також позазародкових тканин (пупковинного канатика, плаценти). Під час культивування *in vitro* стівбукові клітини здатні до активної проліферації, що дає можливість отримувати їх в необхідній кількості, при цьому вони можуть диференціюватися в остеогенному, хондрогенному та адипогенному напрямках [3, 9].

МСК в останні роки стали об'єктом особливої уваги багатьох дослідників. Найбільший інтерес пов'язаний з можливістю використання цих клітин у ветеринарній і гуманній медицині. Вважається, що вони за своїми характеристиками являються самим перспективним біологічним матеріалом для клітинно-регенеративної терапії (КРТ) [9].

Разом з тим, застосування МСК для КРТ повинно визначатися даними щодо їх онкогенної безпеки [2, 19]. Питання онкогенної безпеки стівбурових клітин залишається маловивченим, але вкрай важливим, по суті справи визначаючим розвиток клітинно-регенеративної терапії.

З літературних джерел відомо, що довготривале культивування стівбурових клітин призводить до значних змін геному як на молекулярному, так і на хромосомних рівнях його організації. Так, Maitra та співавтори виявили хромосомні відхилення при довготривалому культивуванні практично у 50 % досліджуваних ліній [16].

Цінна інформація була отримана авторами робіт при дослідженні каріотипової мінливості ліній ЕСК людини під час культивування *in vitro*. Так, під час цитогенетичного аналізу цих клітин були виявлені хромосомні анаомалії: трисомії та моносомії 22, 17 і 18 хромосом [15].

Окрім цього в літературі описані структурні та чисельні анаомалії хромосомного набору клітин [1]. Цілком ймовірно, що такі зміни геному культивуємих клітин можуть викликати селективну проліферацію (клоноутворення) генетично анаомальних клітин, що може відобразитись на потенціалі диференціювання