Ф А 2.2.1-32-367

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН НА КЛІТИННИХ КУЛЬТУРАХ»**

Виконав: здобувач вищої освіти 2 курсу групи ПБтм22(1,6д)-01а
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія
Анастасія ЧАРКОВА
Керівник: доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології, к. фарм. н., с.н.с.
Наталія ДВІНСЬКИХ
Рецензент:
Старший науковий співробітник Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, к. мед. н., с.н.с.
Володимир ПРОКОПЮК

Харків – 2024 рік

АНОТАЦІЯ

В роботі досліджено токсичний вплив хімічної речовини (доксорубіцину) на життєздатність та метаболічну активність живих тваринних клітин - фібробластів. На підставі аналізу отриманих результатів встановлено, що доксирубіцин у концентрації вище 5 мкг/мл знижує метаболічну та міграційну активність фібробластів, зменшує адгезивні властивості та впливає на піноцитоз. Результати підтверджують актуальність та перспективність проведення подальших робіт з визначення порогових токсичних концентрацій доксорубіцину для розуміння механізмів ймовірних побічних ефектів, для підвищення безпеки застосування ліків з токсичними властивостями. Робота складається з вступу, трьох розділів, висновку. Загальний обсяг роботи – 65 стор., кількість таблиць 14, рисунків 20, джерел літератури 50, додатків 1.

Ключові слова: фібробласти, моношар, доксорубіцин, життєздатність, метаболічна активність.

ANNOTATION

The work investigated the toxic effect of a chemical substance (doxorubicin) on the viability and metabolic activity of living animal cells - fibroblasts. Based on the analysis of the obtained results, it was established that doxyrubicin at a concentration higher than 5 μg/ml reduces the metabolic and migratory activity of fibroblasts, reduces adhesive properties and affects pinocytosis. The results confirm the relevance and perspective of conducting further work on determining the threshold toxic concentrations of doxorubicin to understand the mechanisms of possible side effects, to increase the safety of the use of drugs with toxic properties. The work consists of an introduction, three sections, a conclusion. Total volume of work 65, number of tables 14, figures 20, sources of literature 50, appendices 1.

Key words: fibroblasts, monolayer, doxorubicin, viability, metabolic activity.

ЗМІСТ

Вступ…….. 3

Розділ 1 Огляд літератури……..….. 8

1.1 Історія клітинних культур …….. 8

1.2 Види клітинних ліній …….. 9

1.3 Типи культур клітин …… 14

1.4 Цінність методів клітинних культур…… 17

1.5 Культуральні середовища для вирощування тваринних клітин … 22

1.6 Культуральні середовища для використання з плюрипотентними стовбуровими клітинами ……. 28

Розділ 2 Об'єкти та методи досліджень…….……. 31

2.1. Об'єкти досліджень……. 31

2.2. Методи досліджень……..... 37

Розділ 3 Експериментальна частина…… 45

3.1 Отримання клітинної лінії з кріоконсервованої культури …… 45

3.2 Отримання моношарової культури ……. 46

3.3 Пасаж культури клітин ……. 47

3.4 Пересів клітин для дослідження на планшети …… 49

3.5 Додавання досліджуваної речовини-токсиканту (доксорубіцин)…. 47

3.6 Проведення тесту МТТ для визначення метаболічної активності ... 51

3.7 Визначення метаболічної активності фібробластів L929 за допомогою тесту з нейтральним червоним……..... 52

3.8 Проведення скретч-тесту……. 54

3.9 Аналіз морфології клітин……. 56

3.10 Аналіз проліферативної активності…… 57

Висновки……..…… 59

Список використаних джерел…….. 60

Додаток. Публікації за темою роботи……. 66

ВСТУП

Актуальність теми. Одним з найсучасніших методів біотехнологічних досліджень в сучасних лабораторіях є клітинне культивування. Перші кроки культивування клітин поза їх природного середовища існування почалися з кінця 19-го століття. Але активно застосовувати такі технології почали з 60-х років двадцятого сторіччя. В даний час культури клітин людини і тварин стали важливим інструментом, що використовується в багатьох сферах природничих наук. Вони знаходять все більше застосування у наукових дослідженнях, практичній та регенераторній медицині, сучасних біотехнологіях.

Завдяки своїм перевагам, таким як можливість визначення впливу тієї чи іншої сполуки на конкретний вид клітин чи тканин, нівелюючі вплив нервової, ендокринної та імунної системи, метод клітинного культивування затребуваний та актуальний для досліджень прямого впливу екзогенних (факторів поза організмом) агентів, включаючи клітинні токсини, фармакологічні речовини, такі як ліки, тощо, на певні групи клітин.

Наприклад, клітини серцевого м’яза можуть бути використані для вивчення фізіологічних процесів та дії ліків серцево-судинної дії у контрольованих умовах. Більш того, всі шари рогівки людини можуть бути відтворені в пробірці, що надає унікальну можливість тестування крапель для очей.

Система, виготовлена із клітин печінки людини, підходить для тестування нових лікарських речовин. Так, протиракові засоби тестують паралельно у клінічному дослідженні на людях, щурах та системі клітин печінки людини. Є дані, що результати експериментів на людях та на клітинах печінки збігаються.

Для вивчення дії різних речовин на організм можуть застосовуються культури, які відрізняються походженням в залежності від ступеня спеціалізації тканини (культури клітин, отримані з дорослих тварин або

ембріонів), від фізіологічного стану (нормальні або пухлинні тканини), органотипові культури (культури, які повторюють складне клітинне середовище тканини, з якої походять).

Дослідження на культурах клітин різного походження в залежності від типу вихідної тканини, як-то культури клітин фібробластів (як компонент строми будь-якого органа), нервових клітин, гепатоцитів, клітин нирки, спленоцитів та клітин кісткового мозку, мають свої особливості.

Фібробласти добре ростуть в культурі, ці клітини гарно виділяються з ембріонів миші та щура ферментативним методом та методом експлантів. Клітинні лінії фібробластів є одними з найпоширеніших культур для тестування токсичності *in vitro.*

Отже, використання клітинної лінії фібробластів для дослідження впливу на тваринний організм певних хімічних речовин, використання яких відоме в терапевтичній практиці, але потребує подальших досліджень з метою визначення механізмів їхнього токсичного впливу для його попередження або зниження, є важливим напрямком та є сучасним та актуальним. Також актуальним є дослідження нових синтезованих речовин, які мають теоретично потенціал як лікарські речовини, але їх вплив на клітини тварин та людини повинен бути досліджений.

Мета дослідження. Дослідити вплив хімічної речовини (доксорубіцину) на життєздатність та метаболічну активність фібробластів клітинної лінії L929.

Завдання дослідження:

- огляд досліджень із використанням клітинних культур тварин та людини, їх особливостей та методів роботи із даними системами;
- провести аналіз видів клітин тварин та клітинних ліній, які використовують в клітинних технологіях, щодо перспектив їх застосування у власних дослідженнях;
- провести вибір об’єктів дослідження: клітинної лінії та хімічної речовини як факторів впливу;

- визначити прийоми культивування тваринних клітин для дослідження;
- визначити методи, якими буде оцінюватися стан клітин;
- дослідити вплив хімічного чинника на тваринні клітини;
- провести аналіз результатів досліджень впливу хімічної речовини (доксорубіцину) на життєздатність та метаболічну активність вибраної клітинної лінії;
- визначити перспективні напрямки та пропозиції до подальших досліджень.

Об'єкти дослідження: культура клітин фібробластів щурів L929, доксорубіцин, показники життєздатності та метаболічної активності клітин фібробластів.

Предметом дослідження є токсичний вплив хімічної речовини (доксорубіцину) на життєздатність та метаболічну активність живих тваринних клітин - фібробластів.

Методи дослідження. Методи опрацювання інформації щодо теоретичних основ та практичних методів застосування культур тваринних клітин для прижиттєвого дослідження токсичності речовин різної природи, які використовуються або можуть бути використані в складі лікарських засобів.

Культивування клітин здійснювали поверхневим способом в культуральних флаконах у рідкому живильному середовищі DMEM, для відокремлення клітин при пересівах на планшети використовували 0,25% трипсин-ЕДТА. Трипсин інактивували 10% FBS, відмивання клітин проводили фосфатним буферним розчином pH 7,0. Інкубування здійснювали в CO_2-інкубаторі.

Для оцінки метаболічної активності фібробластів використовували тест МТТ, який базується на здатності живих клітин метаболізувати тетразолієвий барвник у формазан. За тестом поглинання нейтрального червоного визначали життєздатність та піноцитозну активність фібробластів після впливу досліджуваних речовин. Міграційну активність визначали за скретч-тестом. Визначення змін морфології клітин (форми, конфлюентності,

адгезії, цілісності мембран) проводили мікроскопічним методом за допомогою інвертованого мікроскопу. При дослідженні проліферативної активності проводили підрахунок клітин на гемоцитометрі.

На проточному цитометрі виконували аналіз клітинної популяції з оцінкою кожної клітини (живі, апоптотичні, некротичні клітини, неживі), визначали розмір та щільність клітин.

Практичне значення отриманих результатів. Виявлений вплив доксорубіцину на життєздатність та метаболічну активність живих тваринних клітин - фібробластів, в залежності від концентрації цієї токсичної речовини, дозволяє визначити граничні межі, які не надають цитотоксичний ефект на досліджувані клітини, що необхідно для розуміння механізмів ймовірних негативних побічних ефектів, для підвищення безпеки використання ліків, які небезпечні, але є препаратами вибору при терапії пухлинних захворювань.

Апробація результатів дослідження і публікації.

Результати досліджень опубліковані в матеріалах конференцій:

1. Чаркова А.П. Особливості досліджень на клітинних культурах тварин / Чаркова А.П., наук. кер.: Двінських Н.В. // Youth Pharmacy Science: мат. IV Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю (6-7 грудня 2023 р., м. Харків). – Харків: НФаУ, 2023. – С. 169-170.

Результати досліджень опубліковані в доповіді:

1. Чаркова А.П. Наук. керівн. Двінських Н.В. Особливості досліджень на клітинних культурах / Секційне засідання СНТ каф. біотехнології на IV Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Youth Pharmacy Science», 6-7 грудня 2023 р., НФаУ.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи.

Робота складається з вступу, трьох розділів - огляду літератури, об’єктів та методів дослідження, експериментальної частини, висновку. Загальний обсяг роботи 65 стор., кількість таблиць 14, рисунків 20, джерел літератури 50, додатків 1.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Історія клітинних культур

Перш за все, клітинні культури – це популяції клітин, які за своєю структурою генетично однорідні. Їхній рост відбувається при підтримані постійних умов в оточуючому середовищі. До цих культур відносять лінії таких клітин:

- нормальні клітини людини
- клітини тварин
- клітини рослин
- клітини злоякісних пухлин.

Перші кроки культивування клітин поза природного середовища почалися з кінця 19-го століття. Але активне застосовування почалося з 60-х років двадцятого сторіччя [1].

Перші цитологічні спостереження культивування рослинних тканин *in vitro* проводив французький дослідник Роже Готре [2-4]. Період 1960-х років можна охарактеризувати дослідами на такі теми, як визначення цитологічних та цитогенетичних властивостей культур тканин і клітин рослин. Вдосконалення методів та отримання значних результатів привело до збільшення уваги до культур клітин як до об’єкту нових серій дослідів, вирішення таких загальнобіологічних проблем, як механізми диференціювання-дедиференціювання-редиференціювання і регенерації, неорганізованого росту тощо. Також з’явилися перспективи використання культури тканин рослин у таких напрямках та галузях:

- як джерела біологічно активних речовин;
- для мікроклонального розмноження рослин;
- для оздоровлення рослин від вірусної та інших інфекцій;
- для отримання нових видів рослин;
- у фармацевтичній промисловості;
- у харчовій промисловості;

- у косметичній промисловості
- у сільському господарстві тощо.

Дослідження 60-х років, які представлені у найвідоміших наукових виданнях, показують значні цитологічні порушення в клітинах культури тканин та її генетичну нестабільність [2, 5-6].

Основні дослідження, які можуть охарактеризувати 1970-ті роки, - це отримання ліній клітин та тканин рослин в культурі *in vitro* як можливого джерела нових сортів рослин. В дослідженнях використовували незрілі пиляки і пилок (гаплоїди і подвоєні гаплоїди), здійснювали гібридизацію протопластів та вивчали сомаклональну мінливість [2, 8].

У 1980-ті роки на основі результатів подальшого вивчення біологічної дії похідних азотистих основ і їх аналогів було розроблено підходи до отримання культур тканин рослин заданих рівнів плоїдності, зокрема на прикладі цитогенетично стабільної міксоплоїдної з триплоїдним модальним класом культури тканин раувольфії зміїної.

У дослідах з горохом було отримано калюсні тканини і рослини-регенеранти у різних сортів і ліній з генетичними маркерами за всіма групами зчеплення. Вперше було підібрано умови, що індукували пагоневий органогенез у тривалокультивованій (до 3 років) культурі тканин гороху. Встановлено, що плоїдність калюсних тканин гороху залежить від тканинної приналежності вихідного експланту і складу живильного середовища і мало залежить від сорту/лінії рослини. [6-8].

1.2 Види клітинних ліній

Клітинні культури поділяють на наступні види [9, 10] :

- Первинні клітинні лінії;
- Вторинні клітинні лінії;
- Постійні («безсмертні») клітинні лінії.

Первинні культури клітин беруть безпосередньо з організму. Їх отримують, утворюючи клітинну суспензію завдяки ферментативної дезагрегації шматочків матеріалу трипсином або використовуючи фрагменти

інтактних тканин чи органів. Приготування первинних культур складне та малоефективне. На початку культури мають гетерогенну ознаку. Саме в них найбільш представленні ті типи клітин, з яких вони були отримані. Через деякий час над гетерогенними клітинами починають домінувати фібропласти, так як ці клітини мають найвищий проліферативний потенціал. Але первинні клітини існують небагато часу, проте, незважаючи на це, вони в цей проміжок часу зберігають основні характеристики диференційованих клітин *in vivo* [9, 10].

Вторинні культури – це однотипні клітини, які мають чітки, відносно постійні властивості і характеристики. Культивують їх тривалий час або безкінечно. Такі клітинні лінії, які мають обмежений час існування в більшості складаються з нормальних диплоїдних клітин. В середньому їхня тривалість життя триває 50-60 популяційних подвоєнь (клітинних поділів). За своїми ознаками вони підтримують окрему ступінь диференціації та дають обмежену кількість генерацій. Через деякий час нормальні диплоїдні клітини набувають ознаки, які вже не можна обратити (незворотні зміни), що є ознаками старіння *in vitro* [11, 12]. В табл. 1.1 наведено ознаки старіння культивованих клітин ссавців.

Таблиця 1.1

Ознаки старіння культивованих клітин ссавців

№ ознаки	**Опис ознаки**
1	**2**
1.	Зростає тривалість клітинного поділу
2.	Зменшується кількість клітин у клітинному циклі
3.	Зменшується щільність насичення клітин у культуральному посуді
4.	Зростає відсоток поліплоїдії
5.	Зменшується адгезія клітин до субстрату
6.	Знижується ДНК-синтез

Продовження таблиці 1.1

1	2
7.	Знижується чутливість до факторів росту
8.	Змінюється організація цитоскелету
9.	Зменшується поглинання амінокислот з культурального середовища
10.	Сповільнюється білковий обмін

Постійні («безсмертні») клітинні ліні виділяють з пухлин або трансформують вторинні клітини *in vitro*, використовуючи іонізуюче опромінення, хімічні канцерогени чи онкогени (генетичний матеріал). Для того, щоб перенести генетичний матеріал, застосовують вектори, такі як віруси, плазміди, фаги, епісоми тощо. Але для проведення трансформації ссавців зазвичай зручніше використовувати ретровіруси та пухлинні ДНК-віруси. [13, 14].

Дослідники установили характеристики постійних ліній трансформованих клітин за своїми морфологічними змінами (зменшення розміру клітин, збільшення ядерно-цитоплазматичного співвідношення, зниження адгезивності), за зміною швидкості росту (час подвоєння клітин у культурі знижується з 36-48 до 12 годин), за збільшенням ефективності клонування тощо (див. табл. 1.2). Незважаючи на це, трансформовані культури мають деякі недоліки. До недоліків відносять змінений каріотип клітин. Він не дозволяє повністю екстраполювати результати експериментів на нормальні клітини людського чи тваринного організму (див. табл. 1.3)[1, 9, 10].

Слід звернути увагу на те, що тільки ті трансформовані клітини, які здатні до формування інвазивних пухлин, будуть злоякісно-трансфомованими клітинами. Та через те, що не всі трансформовані клітини набувають злоякісних ознак, вони можуть не бути еквівалентним раковим клітинам *in vivo* [12, 13].

Таблиця 1.2

Порівняльні характеристики нормальних і трансформованих клітин у культурі

Нормальні клітини	Трансформовані клітини
1. Обмежений термін життя 2. Залежність росту клітин від прикріплення до субстрату 3. Обернено пропорційна залежність швидкості проліферації від щільності клітин 4. Зміна властивостей клітин в процесі старіння *in vitro*	1. Здатність до необмеженого культивування 2. Незалежність росту клітин від прикріплення до субстрату 3. Висока швидкість проліфераці (час подвоєння зменшується в 3-4 рази) 4. Знижена залежність проліфераці від щільності клітин 5. Невимогливість до якості субстрату, факторів росту 6. Зменшення залежності клітин від додавання сироватки 7. Зменшення адгезивної здатності 8. Генетична нестабільність (гетероплоїдність, анеуплоїдність) 9. Здатність формувати колоні в м'якому агарі

Таблиця 1.3

Властивості трансформованих клітин

Переваги	Недоліки
1. Велика швидкість росту 2. Висока щільність клітинної культури 3. Здатність рости в суспензії	1. Підвищена хромосомна нестабільність 2. Відхилення від фенотипу 3. Втрата специфічних тканинних маркерів

Окрім вище перелічених клітинних культур, ще й бувають іммортализовані культури. Вони мають здатність до безмежного культивування, але це не відбувається безконтрольно. На розростання клітин (проліферацію) впливають багато яких факторів, які відносяться й до нормальних клітин: прикріплення до субстрату, щільність клітин в культуральному посуді, контактне інгібування та ін. [12]. Дивлячись на властивості, які мають іммортализовані клітини, вони займають місце між трансформованих та культивованих клітин.

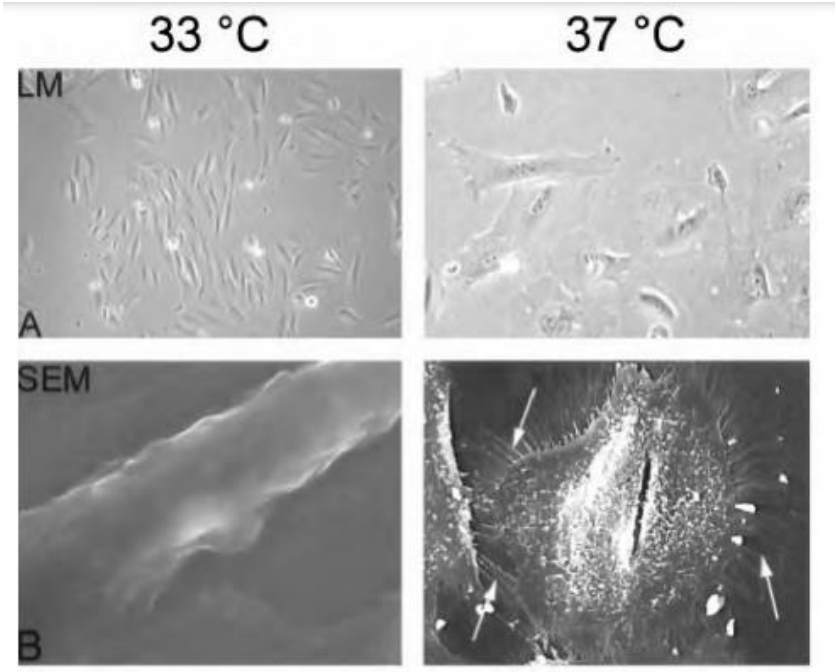


Рис 1.1. Морфологія культивованих подоцитів: А. Світлова мікроскопія. Недиференційовані (ліворуч, при 33 °C) та диференційовані (праворуч, 37 °C) культивовані подоцити; В. Скануюча електронна мікроскопія: недиференційована клітина без відростків та диференційована клітина з тонкими відростками (показано стрілками) з інтердигітаціями між клітинами та структурами, подібними до фільтраційних щілин [15].

На рис. 1.1 наведено такий приклад. На ньому показана постійна лінія подоцитів, які є основним компонентом фільтраційного бар’єру в клубочках нирки. Техніка, що застосовується тут, дозволяє отримувати ці лінії у пацієнтів, які мають різні хвороби нирок, використовуючи трансфекцію ретровірусу pZipN eoSV(X)1 [15]. В підсумку отримали дуже зручну модель.

Завдяки цьому легше вивчати властивості подоцитів, їх здатність до диференціації, дедиференціації, відновлення після пошкодження, експресії різноманітних генів та локалізації структурних білків, реакції на різноманітні біологічно активні речовини тощо. [15, 16]

1.3 Типи культур клітин

Також клітині культури поділяють на наступні типи:

1) Первинно-трипсинізовані — отримують із подрібнених тканин людини та тварин шляхом їх обробки трипсином чи іншими ферментами. Витримують лише 5-10 поділів (пасажів).
2) Перещеплювані — клітини, які набули здатності до безмежного розмноження, оскільки є похідними пухлин людини та тварин.
3) Напівперещеплювані (диплоїдні) — можуть витримувати до 100 пасажів, зберігаючи при цьому вихідний диплоїдний набір хромосом.[1]

Перелік деяких найбільш розповсюджених ліній клітин людини та тваринних наведено в табл. 1.4.

Таблиця 1.4

Найбільш розповсюджені лінії клітин [1]

Лінія клітин	**Розшифровка скорочення**	**Організм**	**Тканина**	**Морфологія**
1	**2**	**3**	**4**	**5**
293-T		людина	Нирка (ембріональна)	
3T3 cells	«3-day transfer, inoculum 3 x 105 cells»	миша	ембріональні фібробласти	
721		людина	меланома	
A2780		людина	яєчник	рак яєчника
A172		людина	гліобластома	злоякісна гліома

Продовження таблиці 1.4

1	2	3	4	5
A431		людина	шкіряний епітелій	плоскоклітинна карцинома
bEnd.3	brain endothelial	миша	кора головного мозку	ендотелій
BHK-21	«Baby Hamster Kidney»	хом'як	нирка	фібробласти
BR 293		людина	молочна залоза	рак
BxPC3	Biopsy xenograph of pancreatic carcinoma line 3	людина	панкреатична аденокарцинома	епітелій
COS-7	Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40	мавпа	нирка	фібробласти
CML T1	Chronic Myelod Leukaemia T-lymphocyte 1	людина	хронічна міелоїдна лейкемія	Т-клітинна лейкемія
CMT	canine mammary tumor	собака	молочна залоза	епітелій
DuCaP	Dura mater Cancer of the Prostate	людина	метастазуючий рак простати	епітелій
HL-60	human leukemia	людина	мієлобласти	клітини крові
HMEC	human mammary epithelial cell	людина		епітелій
KYO1	Kyoto 1	людина	лімфобласти	хронічна мієлоїдна лейкемія

Продовження таблиці 1.4

1	2	3	4	5
LNCap	Lymph node Cancer of the Prostate	людина	аденокарцинома простати	епітелій
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7	людина	молочна залоза	інвазивна карцинома протоків молочної залози
CF-10A	Michigan Cancer Foundation	людина	молочна залоза	епітелій
MDCK II	Madin Darby canine kidney	собака	нирка	епітелій
NIH-3T3	National Institutes of Health, 3-day transfer, inoculum 3 x 105 cells	миша	ембріон	фібробласти
RenCa	Renal Carcinoma	миша		карцинома нирки
Sf-9	Spodoptera frugiperda	метелик Spodoptera frugiperda	яєчник	
T2		людина		гібридома В-клітин та Т-клітинної лейкемії
Vero	'Vera Reno' / 'Vero' ('істина')	африканська зелена мартишка	епітелій нирки	

1.4 Цінність методів клітинних культур

Культивування клітин відкрило двері для виявлення та вивчення таких процесів, як метаболізм, диференціація, міграція, дозволило вивчити конкретні хімічні регулятори клітинного поділу, визначити молекулярні механізми їхньої дії. [1, 16, 17]

Розвиток методів культури клітин дуже розширив можливості їх діагностики та дослідження. Завдяки цьому маємо можливість спостерігати не тільки за біохімічними та морфологічними змінами клітин, але й їхніми особливостями поведінки, коли вони взаємодіють з різними реагентами. Завдяки таким ознакам, як повторюваність і несуперечливість, експерименти з використанням клонів мають велику перевагу в методі культури клітин порівняно з іншими методами. Для того щоб провести вивчення механізму дії різних речовин та протестувати їх використовують клітинні лінії. Такі дослідження проводять для перевірки, наприклад: лікарських препаратів, детергентів, косметичних засобів, інсектицидів, консервантів тощо. Отримані результати дії вивчаємої речовини на культури клітин, які не несуть негативної відповіді на культурних лініях, не гарантують того, що це застосовно для цілого організму. Але маючи негативний вплив – не слід чекати сприятливого ефекту і на організм людини. [18]

Фібробласти – це група клітин сполученої тканини, яка має різний ступень диференціації (див. рис 1.2). У них широкі відростки, добре виражена зерниста (гранулярна) ендоплазматична сітка (близько 35 % об'єму клітини) та Комплекс Гольджі (близько 10 %) [19]. Саме культури фібробластів найбільш поширені у використанні в методі культивування клітин. Їх широко використовують для патогенезу та для діагностики спадкових хвороб. Це зумовлене тим, що сполучна тканина складає значну масу тіла, де головним елементом є клітини фібробласти, також їх не важко культивувати. Ще однією особливістю фібробластів є те, що вони входять до складу багатьох органів, приймають участь в морфогенезі. Саме вони – ті, хто створює умови мікрооточення, яке важливо для наступних процесів -

диференціювання і функціонування спеціалізованих клітин, таких як кардіоміоцити, епідермоцити, стовбурові клітини тощо. [20-22]

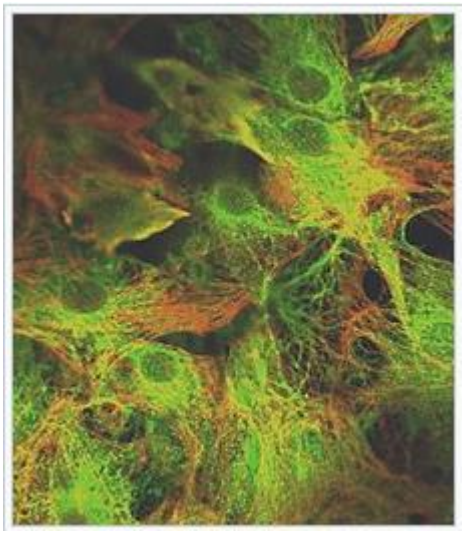


Рис. 1.2 Імунофлуоресцентне зображення культивованих (міо-) фібробластів серця щура.

Фібробласти містять фермент моноамінокси дазу. Спостерігаючи за його змінами в активності, вчені виявили риси, які характерні при деяких нервових і психічних захворюваннях. Також те, що вони мають в складі рецептори доглюкокортикоїдних гормонів, інсуліну, деяких нейромедіаторів, робить їх дуже зручною моделлю для вивчення загальнобіологічних внутрішньоклітинних процесів, до яких відноситься зміни експресії генів, репрограмування клітин та ін. [20-23] .

Тканинна та органна інженерія – на сьогодення це новітні галузі у біотехнології, де активно використовують метод культивування клітин. Для прикладу можна навести те, як створюють штучну шкіру, використовуючи як основу культури фібробластів та кератиноцитів [22, 24].

У біотехнології використовують різні види клітин для виготовлення біопрепаратів (гормонів, факторів росту, антитіл тощо) [18].

Гібридоми – це штучно створена «безсмертна» гібридна клітинних лінія, завдяки якій отримують моноклональні антитіла. Дані клітинні лінії є одним із найцінніших досягнень клітинної інженері. Їх виготовляють при злитті В-лімфоцитів, імунізованих конкретним антигеном, та плазмоцитів

(пухлинно-трансформованих лімфоїдних клітин). Завдяки гібридомній технології науковці можуть виготовляти дуже багато різних моноклональних антитіл, які надалі використовуються як препарати, наприклад, діагностики або лікування [26].

В дослідженні стовбурових клітин та у подальшому їх застосуванні за останні роки був зроблений великий крок. Стовбурова клітина – це первинні, недиференційовані клітини, які мають здатність до самовідновлення. При диференціації можуть стати зрілими спеціалізованими клітинами (кардіоміоцити, нейроцити, хондроцити тощо) [27].

Стовбурові клітини за походженням класифікують на:

1. Ембріональні стовбурові клітини;
2. Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини;
3. Тканиноспецифічні (дорослі) стовбурові клітини;
4. Фетальні стовбурові клітини.

Ембріональні стовбурові клітини – це клітини, які виділяють з внутрішньої клітинної маси ембріону стадії бластоцисти, яка проходить на ранніх ембріональних стадіях. Вони мають дуже широкий потенціал завдяки своїй плюрипотентності. Ембріональні стовбурові клітини мають здатність перетворюватися у всі види клітин, які є в організмі. Завдяки останньої здібності вони можуть інтегрувати в уражені ділянки. Це робить дані стовбурові клітини ідеальними для медицини, де потрібні регенеративні здібності клітин. Незважаючи на це, дослідники більшості країн не можуть отримати та потім використовувати їх у клінічних дослідженнях через етичні проблеми, пов’язані з отриманням ембріональних стовбурових клітин. На сьогоднішній день вчені вивчають наступне: процес диференціації, її керованість; виділення чистих типів клітин під час селекції, а саме первинних спеціалізованих клітин; одержувані соматичні клітини випробують на пухлинну активність; гістологічну сумісність соматичних клітин з клітинами організму, на якому їх випробують [27-28].

Ще одна можливість отримати стовбурові клітини - це їхнє виділення з дорослого організму. Дані тканиноспецифічні (дорослі) стовбурові клітини є недиференційованими та знаходяться у спеціалізованих тканинах. Їхнє місце знаходження дає важливу перевагу порівняно з ембріональними стовбуровими клітинами, тому дорослі стовбурові клітини не входять в етичне табу. Але вони можуть диференціювати лише в обмежену кількість типів спеціалізованих клітин.

Розглядаючи терапію аутологічними стовбуровими клітинами, виділяють наступні етапи:

1) виділення дорослих стовбурових клітин;
2) культивування *in vitro* з метою нарощування клітинної маси;
3) диференціювання отриманої маси в уражені тканини клітин;
4) використання для трансплантації.

Як приклад можливо привести введення ін’єкції з клітинами в пошкоджену м’язову ділянку серця за для її відновлення [27-30].

Отримання дорослих стовбурових клітин має низьку технічних причин, які ускладнюють їхнє отримання, а одержання ембріональних стовбурових клітин взагалі не є етичним. Тому дослідники вимушені шукати інші, більш вигідні джерела для отримання стовбурових клітин. Одне з досягнень дослідників це зворотне перетворення дорослих диференційованих клітин. За своїми ознаками вони аналогічні ембріональним стовбуровим клітинам, що дало можливість для нових дослідів в сфері клітинної терапії.

У 2006 році японські вчені Ткащі та Яманака з університету Кіото першими змогли створити індуковані плюрипотентні стовбурові клітини. Вони змогли визначити чотири плюрипотентних гени. Ці гени мають здібність до експресованості у ембріональні стовбурові клітини: Oct3/4, Sox2, Klf4 та c-Myc. Використовуючи ретровірусний вектор, їх вводять в культивовані фібробласти миші [31]. Вже у 2007 році експеримент був повторно успішно проведений, але з використанням фібробластів дорослої людини [31-32]. Незважаючи на це, даний метод має свої недоліки, які

підвищували онкогенність одержуваних індукованих плюрипотентних стовбурових клітин. Це відбувалося через те, що у дослідах було використано системи вірусної транфекції, ген вбудовувався у випадково обрані ділянки генів організму клітини. У 2009 році три непов'язані між собою групи провели досліди, за результатом яких з'явилася можливість отримання стовбурових клітин безвекторним шляхом, завдяки цьому геном клітин залишався незмінним [33-35]. Незважаючи на те, що завдяки цім відкриттям вчені можуть використовувати індуковані плюрипотентні стовбурові клітини в клініці, процеси генерування таких клітин є малопродуктивним, тому пошуки підвищення їхньої ефективності ще тривають. На даний час дослідники виявили, що при помірній гіпоксії та додаванні аскорбінової кислоти можна значно підвищити відсоток успішно репрограмованих мишачих та людських фібробластів. Гіпоксія - тимчасове зниження концентрації кисню в культуральному середовищі до 5 % та додавання аскорбінової кислоти здатні суттєво підвищити відсоток успішно репрограмованих мишачих та людських фібробластів [36, 37].

Отже, одна з найгарячіших тем у дослідженні стовбурових клітин сьогодні - дослідження індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (ІПСК). Ці клітини штучно створюють в лабораторіях із спеціалізованих клітин людини, таких як клітини шкіри, під дією суміші хімічних сполук. ІПСК по ряду характеристик відповідають ембріональним стовбуровим клітинам, а саме мають здатність утворювати всі типи клітин. Дані клітини за ознаками є полі- (чи оліго-) потентними. За відкриття технології отримання ІПСК John B. Gurdon та Shinya Yamanaka в 2012 році були удостоєні Нобелівської премії з фізіології або медицини. Переваги ІПСК і причина, чому дослідники дуже зацікавлені у їх вивченні – отримання стабільної лінії клітин, пацієнт-специфічної, для вивчення механізмів розвитку захворювань (напр. хвороба Паркінсона, Альцгеймера), одночасно виступаючи потужним інструментом для тестування лікарських засобів для індивідуалізованої терапії. З іншого боку, використання похідних ІПСК у якості лікарських

засобів викликає ряд пересторог, а саме висока вартість технології отримання культури ІПСК з наступною її спеціалізацією у конкретний тип клітин та використання конструкцій на основі вірусів для репрограмування зрілих клітин у ІПСК. [29, 30].

1.5 Культуральні середовища для вирощування тваринних клітин

Одним з найважливіших факторів, від якого залежить ефективне культивування клітин – середовище, в якому вони зростають. Саме від середовища залежить якість вирощуваної клітинної культури, що надали впливатиме на кінцеві результати досліджень. Завдяки середовищу клітини підтримують свої виживання, проліферацію та функції клітин. Тому для тих, хто працює з культурами клітин дуже важливо підібрати середовище, яке буде відповідати обраним клітинам для певних цілей досліду. Іноді дослідникам потрібно модифікувати середовища. У випадках, коли це потрібно для досліду, або при стиканні з якимось проблемами в експерименті знання про властивості середовища допомогають визначити причину [38].

Середовища поділяють на два види:

- Природні середовища
- Синтетичні середовища

На сьогодення синтетичні середовища ділять в залежності від добавок. Наприклад, середовища з білком, середовища з певним хімічним складом, середовища з сироваткою або без сироватки тощо (табл. 1.5, 1.6). При додаванні сироватки до середовища його склад стає невизначеним, тобто через наявність природних речовин, які міститься в сироватці, концентрація готового середовища коливається від партії до партії. Дана особливість впливає на відтвореність, тобто неможливо повторно відтворити склад, а також підвищується ризик мікробного зараження. Але, не зважаючи на це, такі середовища дуже ефективні для вирощування різноманітних типів клітин, тому що у сироватці міститься багато активних речовин, які благотворно впливають на зростання тваринних клітин [38].

Безсироваткові середовища, порівняно з середовищами з сироваткою мають певний склад, що дає більший контроль в процесі культивування. Також вони мають такі переваги, як зниження ризику мікробного зараження та кращу ідентифікацію клітинних метаболітів. Але вони важкі в приготуванні, безсироваткові середовища застосовують лише для деяких типів клітин. Ці середовища поділяють на декілька підгруп [38, 39]:

- безбілкові середовища - взагалі не містять білка;
- середовища з певним хімічним складом - не містять невизначених інгредієнтів.

Таблиця 1.5.

Види культуральних середовищ для культивування клітин тварин

Категорія	**Склад**	**Тип**	**Приклад**
1	**2**	**3**	**4**
Природні середовища	Природні біологічні речовини, як плазма, сироватка та екстракт ембріона	Коагулянт або згустки	Плазма, відділена від гепаринізованої крові, сироватки та фібриногену
		Тканинні екстракти	Екстракти курячих ембріонів, печінки, селезінки та екстракт кісткового мозку
		Біологічні рідини	Плазма, сироватка, лімфа, амніотична рідина та плевральна рідина
Синтетичні середовища	Основне середовище та добавки, як сироватка, фактори росту та гормони	Середовища, що містять сироватку	Як добавка використовується людська, бичача, коняча або інша сироватка
		Середовище без сироватки	Сирі білкові фракції, такі як бичачий сироватковий альбумін або α- чи β-глобулін, використовуються як добавки
		Середовище без ксенобіотиків	Компоненти людського походження, такі як людський сироватковий альбумін, використовуються як добавки, але компоненти тваринного походження не допускаються як добавки

Продовження таблиці 1.5

1	2	3	4
		Безбілкові середовища	В якості добавок використовуються невизначені компоненти, такі як пептидні фракції (гідролізати білка)
		Хімічні середовища	Невизначені компоненти, такі як сирі білкові фракції, гідролізати та тканинні екстракти, не підходять як добавки, але високоочищені компоненти, такі як рекомбінантні білки, є підхожими добавками

Таблиця 1.6

Види та характеристика основних середовищ

Вид	**Назва (автор, рік)**	**Особливості**
1	**2**	**3**
Середовище CMRL (Connaught Medical Research Laboratories)	Середовище 199 (Morgan et al. 1950)	Розроблене для культивування курячих ембріональних клітин у безбілкових умовах, готується шляхом послідовного додавання амінокислот, вітамінів (включаючи жиророзчинні вітаміни) і попередників нуклеїнових кислот. Його склад надзвичайно складний, оскільки до середовища додають компоненти, які вважаються необхідними на теоретичних підставах, включаючи неактивні компоненти. Часто використовується для органної культури
	CMRL1066 (Parker et al. 1957)	Створено шляхом внесення змін до середовища 199 для культивування мишачих L-клітин у безбілкових умовах. Модифікації включали підвищення рівня відновлюючих речовин (цистеїну, глутатіону та аскорбінової кислоти), усунення жиророзчинних вітамінів, зміни типів нуклеїновокислотних попередників та додавання коферментів
Середовище Ігла	Базове середовище Ігла (BME) (Eagle 1955)	Доповнений мінімальними компонентами, необхідними L-клітинам миші та людським HeLa-клітинам для досягнення індексу проліферативної здатності, а також містить 13 амінокислот і вісім вітамінів, воно не підходить для клітин, культури яких вимагають багато компонентів через його простий склад

Продовження таблиці 1.6

1	2	3
	Мінімальна необхідна середа (MEM) (Eagle 1959)	BME, модифіковане відповідно до клітинної потреби в амінокислотах, тому концентрації більшості амінокислот є подвійними порівняно з BME. Незамінні амінокислоти, які клітини можуть біосинтезувати, не були включені до оригінальної формули MEM; однак дослідники можуть додавати незамінні амінокислоти, щоб зменшити біосинтетичне навантаження
	Модифіковане MEM Дульбекко (DMEM) (Dulbecco and Freeman 1959)	Модифіковане, щоб мати чотириразову концентрацію амінокислот і вітамінів, які присутні в BME, і розроблене для вивчення здатності вірусу поліоми утворювати бляшки в ембріональних клітинах миші. З тих пір були зроблені різні модифікації з додаванням, наприклад, незамінних амінокислот, гліцину та серину, заліза та пірувату. Концентрація глюкози також може бути збільшена до 25 ммоль/л, щоб забезпечити клітини з високими потребами в живленні. У разі підозри на зміни pH через метаболіти, бікарбонат натрію подвоюють у концентрації, врівноважують і потім використовують як 10% CO_2
	α-MEM (Stanners et al. 1971)	MEM, модифікований для досліджень гібридних клітинних ліній на мишах і хом’яках. В його складі MEM доповнений незамінними амінокислотами та вітамінами (аскорбіновою кислотою, біотином і ціанокобаламіном), піруватом, ліпоєвою кислотою та нуклеозидами.
	Модифікована Ісковом DMEM (IMDM) (Iscove and Melchers 1978)	Доповнено декількома незамінними амінокислотами та вітамінами, яких немає в DMEM (ціанокобаламін і біотин), а також додатковими селенітом, піруватом і HEPES. Трансферин, бичачий сироватковий альбумін і соєві ліпіди додають як замінники сироватки. Завдяки високим концентраціям амінокислот і вітамінів IMDM підходить для культур високої щільності та культур швидко проліферуючих клітин
Середовище NCTC (секція культури тканин Національного інституту	NCTC109 (McQuilkin et al. 1957)	Розроблене для культивування L-клітин у безбілкових умовах, його амінокислотний склад базується на результатах компонентного аналізу сполук, які були ультрафільтровані з кінської сироватки та екстракту курячих ембріональних тканин. Його склад досить складний, до нього входять не тільки коферменти, нуклеотидні основи

Продовження таблиці 1.6

1	2	3
раку)		та відновники, але й велика кількість вітамінів (тобто A, C, D, E та K, на додаток до вітамінів групи B). Цистеїн був включений в оригінальний склад, але після того, як було виявлено, що він негативно впливає на клітини, була розроблена версія, з якої цистеїн був видалений (NCTC135).
Середовище Хема	F-10 Хема (Хем 1963)	Дозволяє утворювати колонії з однієї клітини яєчника китайського хом'яка (CHO) у безсироваткових умовах, отриманих шляхом додавання двох типів очищених сироваткових білків (сироваткового альбуміну та фетуїну) замість сироватки, а також шляхом детального вивчення типів і концентрацій амінокислот та мікроелементів. Це середовище було першим, що містило мікроелементи, мідь і цинк (залізо вже включене в інші середовища). Клітини CHO мають нижчу проліферативну здатність в цьому середовищі лише порівняно з тим, до якого додана сироватка. Крім того, культура клітинних ліній, відмінних від CHO, вимагає додавання сироватки
	F-12 Хема (Хем 1965)	Сироватковий альбумін і фетуїн (які використовуються в Хема F-10) замінені двома сполуками з певним хімічним складом: лінолевою кислотою і путресцином, що дозволяє утворювати колонії однією клітиною CHO в умовах без білка. , Інші середовища, які часто називають першими у світі середовищами із визначеним хімічним складом, мають рівні кількох амінокислот вищими, ніж у F-10 Хема, тоді як рівні вітамінів (крім холіну та інозиту) та фосфату калію знижені. Його склад необхідно модифікувати (наприклад, шляхом зменшення концентрації цинку) для безбілкової культури клітин, відмінних від клітин CHO. MCDB301, до якого було додано 20 мікроелементів, було пізніше розроблено, після того, як стало очевидно, що мікроелементи, що забруднюють воду або сировину, необхідні для безбілкової культури клітин CHO у F-12 Хема.
	Модифіковане Кайном F-12 (Хем F-12K)	Концентрації амінокислот, пірувату, біотину, кальцію, магнію, путресцину та фенолового червоного збільшені порівняно з концентраціями в Хема F-12, серед інших композиційних модифікацій, щоб підтримувати проліферацію та

Продовження таблиці 1.6

1	2	3
	(Kaign 1974)	диференціювання первинних культивованих клітин
Середовище RPMI (Меморіального інституту Розуелл Парк)	RPMI 1640 (Moore et al. 1966)	На основі середовища 5A (розробленого McCoy et al. 1959) і модифікованого для тривалого культивування лімфоцитів периферичної крові. Характеризується низькими рівнями кальцію та магнію та високими рівнями фосфатів. На шляху до цього середовища було розроблено кілька середовищ (наприклад, RPMI 1629, 1630 і 1634). Широко використовується як середовище для суспензійних культур; наприклад, лейкоцитів, лімфоцитів і гібридом
Середовище MCDB (Молекулярної, клітинної та експериментальної біології).	Наприклад, MCDB202 (McKeehan et al. 1976) MCDB301 (Hamilton et al. 1977) MCDB153 (Peehl et al. 1980) MCDB110 (Bettger et al. 1981) MCDB402 (Shipley et al. 1983) MCDB170 (Hammond et al. 1984) MCDB131 (Knedler et al. 1987)	Серія середовищ на основі Хема F-12, розроблена для вирощування конкретних типів клітин у безсироватковій культурі. Склад кожного середовища MCDB оптимізований для сприяння росту клітин певного типу. Зокрема, MCDB202 є середовищем для безсироваткової культури фібробластів курячих ембріонів; MCDB301 призначений для безсироваткової культури клітин CHO; MCDB153 для кератиноцитів людини; MCDB110 для фібробластів людини; MCDB402 для фібробластів миші; MCDB170 для епітелію молочної залози; і MCDB131 є середовищем для безсироваткової культури ендотеліальних клітин судин людини
Змішані середовища	DMEM/F-12 (Барнс і Сато 1979)	Являє собою суміш 50:50 компонентно-багатого середовища Хема F12 і збагаченого поживними речовинами середовища DMEM і сумісного з вимогами різноманітних типів клітин, найчастіше використовується як базове середовище для безсироваткового культивування.

Продовження таблиці 1.6

1	2	3
	RPMI 1640/DMEM/ F-12 (RDF) (Муракамі 1984)	Розроблене для безсироваткової культури гібридом, це суміш RPMI 1640, DMEM і Хема F-12 у співвідношенні 2:1:1 і зазвичай використовується як безсироваткове середовище з додаванням інсуліну, трансферину, етаноламіну та селеніту
Інші середовища	Веймаута MB752/1 Waymouth's (Waymouth 1959)	Розроблене із максимально простою композицією, щоб можна було культивувати мишачі клітини L929 без додавання сироватки та інших білків, складається загалом із 40 компонентів, включаючи глюкозу, неорганічні солі, амінокислоти, вітаміни, пуринові основи, і гіпоксантин. Характеризується високою концентрацією глюкози, гістидину, лізину, глутаміну, холіну та тіаміну.
	Трувела Т-8 (Trowell 1959)	Призначене для тривалого культивування епітеліальних клітин печінки дорослих щурів. Маючи порівняно простий склад, він не містить незамінних амінокислот і майже не містить вітамінів, але характеризується високою концентрацією глюкози та інсуліну. Використовується для короткочасної культури органів
	L-15 Лейбовіца (Leibovitz 1963)	Буферна здатність забезпечується фосфатами та вільними основними амінокислотами замість бікарбонату натрію, тому pH культури підтримується в навколишньому повітрі без використання CO_2 інкубатора. Замість глюкози додається піруват (і галактоза) у високій концентрації, щоб контролювати падіння pH через молочну кислоту, яка виробляється під час метаболізму глюкози, і сприяти вивільненню CO_2 з дихального ланцюга. Іншою важливою характеристикою є те, що кожна зі складових амінокислот додається приблизно у відповідній максимальній концентрації. Колись воно використовувалося для транспортування клітин і тканин та первинних культур, його популярність знизилася, оскільки дослідники почали використовувати HEPES як буферний агент і, крім того, вони зрозуміли, що певна кількість бікарбонату натрію необхідна для оптимальної клітинної проліферації.
	Середовище Фішера (Fischer and Sartorelli 1964)	Містить високу концентрацію фолієвої кислоти, оскільки це середовище було розроблено з використанням фолатзалежних клітин лімфоми L5178Y

1.6 Культуральні середовища для використання з плюрипотентними стовбуровими клітинами

В період дослідів 2007 року, які проводили японські вчені на стовбурових клітинах, стало питання наявності недорогого, продуктивного та простого середовища для даного типу клітин. Ці клітини спочатку культивували на шарі фідерних клітин у середовищі з додаванням сироватки або KSR. В процесі дослідів увага вчених змістилася з клінічних досліджень на розробку умов культивування, які будуть більш придатними для стовбурових клітин, тобто які не містять фідера та ксенобіотиків (табл. 1.7) [40]. Як приклад можна навести середовище розроблене Гіокаі Чен - E8 [41]. Маючи простий склад, воно дає клітинам iPS людини рости тривалий час. До складу середовища входять такі компоненти, як DMEM/F-12 із додаванням інсуліну, селеніту натрію, трансферину, аскорбінової кислоти (стабільна форма), FGF2, TGF-β1 (або Nodal) і бікарбонату натрію. Також декілька останніх років триває розробка культуральних середовищ, що містять низькомолекулярні сполуки, якими можно замінити фактори росту, такі як FGF2 і TGF-β, які дорого коштують (табл. 1.7) [40-44].

Таблиця 1.7

Безсироваткові культуральні середовища для ембріональних стовбурових/індукованих плюрипотентних стовбурових клітин

Назва (автори, рік)	Базове середовище	Добавки	Примітки
1	2	3	4
Knockout DMEM (Аміт та ін. 2000)	DMEM	Амінокислоти, bFGF, 2-меркаптоетанол і Knockout Serum Replacement (KSR)	Середовище з нижчим осмотичним тиском, ніж DMEM, і доданим замінником сироватки, що містить компоненти тваринного походження (KSR), призначене для використання з ембріональними стовбуровими клітинами миші. Культурам потрібні живильні клітини

Продовження таблиці 1.7

1	2	3	4
TeSR (Людвіг та ін. 2006)	DMEM /F-12	Вітаміни, мікроелементи (V, Mn, Ni, Si, Sn, Mo, Cd, Cr, Ag, Al, Ba, Co, Ge, Br, I, F, Rb, Zr), селеніт, LiCl, інсулін, трансферин, людський сироватковий альбумін (HSA), bFGF, трансформуючий фактор росту (TGF)-β1, γ-аміномасляна кислота, піпеколінова кислота, глутатіон, 2-меркаптоетанол, ліпіди (жирні кислоти, холестерин), Pluronic F-68 і Tween 80	Середовище, що не містить ксено, не потребує живильних клітин
E8 (Chen та ін. 2011)	DMEM /F-12	Аскорбат-2-фосфат, селеніт, інсулін, трансферин, bFGF, TGF-β1 або NODAL і $NaHCO_3$	Середовище на основі TeSR. HSA (який призводить до великої варіації між партіями) і 2-меркаптоетанол (який негативно впливає на клітини) були видалені, а добавки були вдосконалені до необхідного мінімуму
(назви немає) (Хасега ва та ін. 2012)	DMEM /F-12	Амінокислоти, аскорбат, селеніт, інсулін, трансферин, Wnt3a та похідне індолу (ID)-8 (інгібітор DYRK)	Дорогі bFGF і TGF-β замінені на Wnt3a і низькомолекулярну сполуку ID-8. Зростання повільне, порівняно зі звичайними середовищами
(назви немає) (Хасега ва та ін. 2015)	DMEM /F-12	Аскорбат, селеніт, інсулін, трансферин, ID-8, інгібітор GSK3β (наприклад, 1-азакенпаулон) та інгібітор NFAT (наприклад, такролімус)	Wnt замінюється інгібітором GSK3β та інгібітором NFAT (сполука з низькою молекулярною масою), його можна виготовити дешево, а управління якістю просте

Примітка. bFGF, основний фактор росту фібробластів; DYRK, кіназа, регульована фосфорилюванням тирозину подвійної специфічності; GSK, глікогенсинтаза кіназа; NFAT, ядерний фактор активованих Т-клітин.

Висновок до 1 розділу: проведено аналіз літературних джерел щодо історії отримання, вивчення та використання культур тваринних клітин,

наведено класифікації клітинних ліній та обговорено їхні відмінності, наведено приклади використання клітин та клітинних ліній, описано кілька найбільш уживаних клітинних ліній, проаналізовано склад культуральних середовищ для вирощування тваринних клітин різних видів.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкти досліджень.

Як об'єкт досліджень було обрано культуру клітин фібробластів щурів L929, як фактор впливу – доксорубіцин. Також об'єктами досліджень були показники життєздатності та метаболічної активності клітин фібробластів, які визначали за результатами тестів (МТТ, поглинання нейтрального червоного, скетч-тест), зміни у морфології клітин (форма, конфлюентність, адгезія, цілісність мембран), проліферативна активність, стан клітин.

2.1.1. Клітинна лінія L929 [L-929, клітина L, похідна штаму L]

Дослідження виконані на перещеплюваній лінії клітин L929, отриманої з кріоконсервованої культури, що зберігалася при температурі –196 ^{o}C у кріобанку ІПКіК НАН України.

В інтактному контролі клітини культури L929 утворюють щільний моношар, побудований з типових фібробластоподібних клітин веретеновидної, округлої або овальної форми. Площа проекції клітин варіює від 250 до 750 мкм^2. Більшість клітин має два відростки. Цитоплазмі цих клітин притаманні світлі вакуолі та маленькі гранули. Ядра клітин відносно великі, зустрічаються окремі двоядерні, а також гіперхромні клітини. Ядерця мають розмір від 5 до 10 мкм^2. У полі зору спостерігаються 2-3 клітини на стадії поділу. [45]

Характеристики клітин L929 наведено у табл. 2.1. [46]

Таблиця 2.1

Характеристики клітинної лінії L929

Назва показника	Ознаки та характеристики
1	**2**
Нормальність / пухлинність	Нормальний жировий фібробласт

Продовження таблиці 2.1

1	2
Походження	Батьківський штам L був отриманий з нормальної підшкірної ареолярної та жирової тканини 100-денного самця миші C3H/An WR Earle у 1940 році. NCTC-клон 929 Клон штаму L (також відомий як L929) був згодом отриманий у березні 1948 року. Штам L був одним із перших штамів клітин, які були створені в безперервній культурі, а клон 929 був першим створеним клонованим штамом. Клон 929 був створений (капілярною технікою виділення одиночної клітини) з 95-го покоління субкультури батьківського штаму. Клітини APRT+ і HPRT+
Організм	*Mus musculus*, миша
Тканина	Підшкірна сполучна тканина; ареолярна і жирова
Морфологія	фібробласт
Властивості	Адгерентні
Цитогенні дані	Модальне число хромосом = 66; діапазон = 65-68. У кожній метафазі були присутні приблизно від 20 до 30 маркерних хромосом. Високий відсоток цих маркерів був загальним для більшості аналізованих клітин. Довга метацентрична хромосома з вторинною перетяжкою відзначена в 77/100 клітинах
Штам	Самець, C3H/An, 100 днів
Живильне середовище	MEM Ігла + 10% сироватки (кінська)
Субкультивування	Пересаджують субконфлюентну культуру (клітинна культура з характеристиками, близькими до зливного зростання) (85%) у співвідношенні від 1:2 до 1:8, використовуючи 0,25% (маса/об’єм) розчин трипсину з 0,53 мМ розчином ЕДТА. Культивують при 5% CO_2, 37 °C

Продовження таблиці 2.1

1	2
Середовище заморожування	Повне культуральне середовище для росту з додаванням 7,5% (об./об.) ДМСО
Рівень біобезпеки	1

2.1.2. Доксорубіцин

Як фактор впливу на клітини фібробластів було вибрано Доксорубіцин-Віста концентрат для розчину для інфузій 2мг/мл флакон 25мл (50мг). Виробник: Актавіс Італія С.п.А. (Італія), Сіндан Фарма С.Р.Л. (Румунія). Зовнішній вигляд препарату наведено на рис. 2.1, сертифікат якості – на рис. 2.2.

Рис. 2.1 – Зовнішній вигляд торгової упаковки препарату «Доксорубіцин-Віста».

Загальні відомості про препарат, які є важливими для даного дослідження, наведено в табл. 2.2 [47].

Таблиця 2.2

Доксорубіцин-Віста концентрат для розчину для інфузій 2мг/мл

Показник	**Ознаки та характеристики**
1	**2**
Склад	діюча речовина: doxorubicin; 1 мл концентрату містить 2 мг доксорубіцину гідрохлориду; допоміжні речовини: натрію хлорид, розчин кислоти хлористоводневої 0,1 М, вода для ін'єкцій
Лікарська форма	Концентрат для розчину для інфузій
Основні фізико-хімічні властивості	прозорий розчин червоного кольору
Фармакотерапевтична група	Антинеопластичні та імуномодулюючі засоби. Цитотоксичні антибіотики та споріднені речовини. Код АТХ L01D B01
Фармакологічні властивості *Фармакодинаміка*	Д. - цитотоксичний антрациклiновий антибіотик, виділений із культури *Streptomyces peucetius var. caesius.* Тепер доксорубіцин виробляють напівсинтетично з даунорубіцину. Точний механізм дії остаточно не з'ясований. Припускається, що доксорубіцин виявляє свій протипухлинний ефект через цитотоксичні механізми дії, особливо шляхом інтеркаляції ДНК, пригнічення ферменту топоізомерази II, а також утворення активних форм кисню (АФК). Специфіка токсичності доксорубіцину, очевидно, пов'язана насамперед із проліферативною активністю здорової тканини. Таким чином, кістковий мозок, шлунково-кишковий тракт і статеві залози є основними пошкодженими нормальними тканинами.

Продовження табл.. 2.2

1	2
Фармакокінетика	Після внутрішньовенного введення доксорубіцин швидко виводиться з крові і широко розповсюджується по тканинах, включаючи легені, печінку, серце, селезінку, лімфатичні вузли, кістковий мозок та нирки. Об'єм розподілу становить приблизно 25 л/кг. Ступінь зв'язування з білками плазми крові становить 60-70 %. Д. не проникає крізь гематоенцефалічний бар'єр, хоча за наявності метастазів головного мозку або лейкозної церебральної дисемінації у ліквор можуть досягатися більш високі рівні препарату. Доксорубіцин швидко поширюється в асцит, де він досягає більш високих концентрацій, ніж у плазмі. Доксорубіцин виділяється у грудне молоко.
Показання	Лікування широкого спектра неопластичних захворювань, у тому числі гострої лейкемії, лімфоми, злоякісних новоутворень у дітей та солідних пухлин у дорослих, зокрема карциноми молочної залози та легень
Особливі заходи безпеки	Доксорубіцин є сильнодіючим цитотоксичним лікарським засобом, який можуть призначати, підготовлювати та вводити тільки фахівці, які пройшли підготовку щодо безпечного застосування лікарського засобу. Вміст флакона знаходиться під від'ємним тиском для зменшення утворення аерозолю при відновленні розчину, тому слід дотримуватися особливої обережності при введенні голки. Слід уникати вдихання аерозолю, що утворюється при відновленні розчину. *Приготування:* Персонал, який працює з доксорубіцином, повинен використовувати захисний одяг: окуляри, халат, одноразові рукавички і маски. Для розчинення препарату слід

Продовження табл.. 2.2

1	2
	використовувати відповідну зону (краще під ламінарним потоком повітря). Робочу поверхню необхідно вкрити одноразовим абсорбуючим папером із пластиковою основою. Всі матеріали, що використовуються для розчинення, введення або прибирання, включаючи рукавички, слід зібрати в пакети, призначені для високотоксичних відходів, з метою подальшої високотемпературної утилізації (700 °С). Завжди необхідно мити руки після зняття рукавичок
Канцерогенез, мутагенез, порушення фертильності	Доксорубіцин проявляв генотоксичні та мутагенні властивості у тестах *in vitro* та *in vivo*.
Несумісність	Доксорубіцин не слід змішувати з гепарином, оскільки може утворюватися осад. Доксорубіцин несумісний з амінофіліном, цефалотином, флуороурацилом, гідрокортизоном. Слід уникати контакту з алюмінієм. Слід уникати тривалого контакту з будь-яким розчином лужного pH, оскільки це призведе до гідролізу препарату. За відсутності досліджень сумісності цей лікарський засіб не слід змішувати з іншими лікарськими засобами
Термін придатності	2 роки
Умови зберігання	Зберігати при температурі від 2 до 8 °С в оригінальній упаковці

teva | sindan pharma

СЕРТИФІКАТ ЯКОСТІ СЕРІЇ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ
№: S/PF/0459/23
Виданий: 04 квітня, 2023

Найменування продукту (дозування, лікарська форма, розмір та тип пакування)	**ДОКСОРУБІЦИН-ВІСТА, концентрат для розчину для інфузій, 50мг/25мл (2мг/мл) № 1 у флаконах**
Діюча речовина	Доксорубіцину гідрохлорид
Найменування та країна виробника	Сіндан Фарма С.Р.Л, Румунія
Номер реєстраційного посвідчення	UA/14710/01/01
Номер серії та її розмір	**DN23003A**/ 4000 флаконів
Дата виготовлення	03.2023
Придатний до	03.2025
Адреса та номер ліцензії виробничої дільниці	Сіндан Фарма С.Р.Л, бул. Іона Михалаче, 11, сектор 1, 011171, Бухарест, Румунія 14F видано 23.07.2018
GMP сертифікат або посилання на EudraGMP	027/2018/RO

Тест	**Специфікація**	**Результат**
Опис	Прозорий розчин червоного кольору	Відповідає
Прозорість	Розчин повинен бути прозорим	Відповідає
pH	2,5 – 3,5	3,2
Об'єм, що витягається **Для дозування 50 мг/25 мл**	Не менше 25 мл	Відповідає
Механічні включення. Видимі частки	Розчин повинен бути вільним від видимих часток	Відповідає
Механічні включення. Невидимі частки **- ≥ 10 мкм** **- ≥ 25 мкм**	 Не більш ніж 6000 Не більш ніж 600	 10 0
Ідентифікація **метод ВЕРХ** **метод УФ**	 Відповідність значень Rt піків на Хроматограмах випробуваного і стандартного розчинів Відповідність максимумів поглинання спектра випробуваного розчину	 Відповідає Відповідає
Вміст	1,90-2,10 мг/мл (2,0 мг/мл ± 5 %)	2,02
Продукти розкладання		
- доксорубіцинон	Не більш ніж 2,0 %	0,1
- RRT 1.4 домішка	Не більш ніж 0,8 %	0,18
Будь-яка окрема домішка	Не більш ніж 0,5 %	0,02
Сума домішок	Не більш ніж 3,0 %	0,3
Бактеріальні ендотоксини	Не більш ніж 2,2 МЕ/мг доксорубіцину гідрохлориду	< 2,2
Стерильність	Розчин повинен бути стерильним	Стерильний

Серія відповідає вимогам МКЯ до РП № UA/14710/01/01.

Цим я підтверджую, що наведена вище інформація є достовірною і точною. Ця серія продукції була виготовлена (включаючи упаковку / маркування) і проведений контроль якості на зазначеному виробничому майданчику у повній відповідності до вимог GMP, встановленими місцевим регуляторним органом, а також у відповідності зі специфікацією до РП на препарат. Протоколи виробництва, упаковки та аналізів були переглянуті і встановлено відповідність вимогам GMP (Сертифікат GMP № 027/2018/RO).

Підготовлено
Контроль якості:
Габріель Діану/підпис/
Дата: *04.04.2023*

Затверджено
Уповноважена особа:
Барток Аміла /підпис/
Дата: *04.04.2023*

Рис. 2.2 – Сертифікат якості серії препарату, взятого для досліджень.

2.2 Методи досліджень.

Культивування клітин здійснювали поверхневим способом в культуральних флаконах у рідкому живильному середовищі DMEM, для відокремлення клітин при пересівах на планшети використовували 0,25% трипсин-ЕДТА. Трипсин інактивували 10% FBS, відмивання клітин

проводили фосфатним буферним розчином pH 7,0. Інкубування здійснювали в CO_2-інкубаторі.

Для оцінки метаболічної активності фібробластів використовували тест МТТ, який базується на здатності живих клітин метаболізувати тетразолієвий барвник у формазан. За тестом поглинання нейтрального червоного визначали життєздатність та піноцитозну активність фібробластів після впливу досліджуваних речовин. Міграційну активність визначали за скретч-тестом. Визначення змін морфології клітин (форми, конфлюентності, адгезії, цілісності мембран) проводили мікроскопічним методом за допомогою інвертованого мікроскопу. При дослідженні проліферативної активності проводили підрахунок клітин на гемоцитометрі.

На проточному цитометрі виконували аналіз клітинної популяції з оцінкою кожної клітини (живі, апоптотичні, некротичні клітини, неживі), визначали розмір та щільність клітин.

2.2.1 Методика підрахунку клітин на гемоцитометрі.

Гемоцитометр — широко використовувана камера для підрахунку клітин, яка зазвичай використовується для ручного підрахунку клітин крові та інших клітин, в тому для підрахунку клітин у зразках культури клітин, що дозволяє оцінити життєздатність і проліферацію клітин. [48]

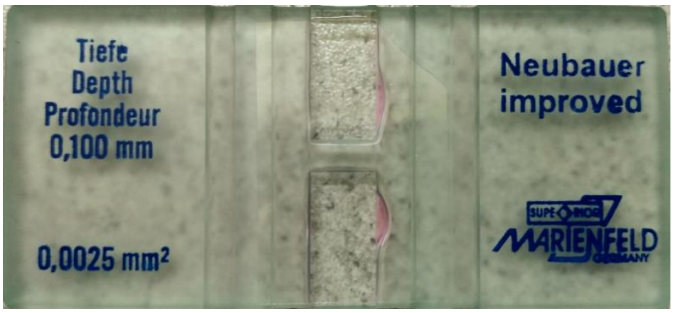
Перед роботою гемоцитометр очищують 70% етанолом і папером для лінз. Потім накривне скельце обережно поміщають на лічильну камеру. Накривне скло розташовано правильно, якщо спостерігається явище, відоме як кільця Ньютона. Невеликий зразок клітинної суспензії береться за допомогою піпетки, і піпетка розташовується біля краю камери, дозволяючи клітинній суспензії потрапити в лічильну камеру за допомогою капілярної дії. Якщо необхідно визначити життєздатність клітин, до суспензії клітин слід додати трипановий синій (у співвідношенні 1:1) перед додаванням у камеру.

Гемоцитометри розроблені спеціально для отримання точного підрахунку клітин. Квадрати спеціальної камери мають розміри 1 мм x 1 мм і

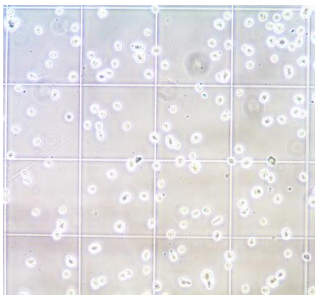
далі поділяються на квадрати 0,05 мм х 0,05 мм. Краї камери призначені для утримання спеціального накривного скла на 0,1 мм над позначеною сіткою, таким чином створюючи розмежовані ділянки відомого об'єму.

Потім мікроскоп фокусується на ділянці лічильної камери, і клітини підраховуються. Зазвичай це робиться з використанням лічильної камери площею 1 мм^2, площею 100 нл і об'єктивом 4х або 10х, але точна площа й об'єктив залежатимуть від розміру клітин і їх щільності в суспензії. Цей процес зазвичай повторюється з використанням чотирьох різних ділянок площею 1 мм^2, а результати усереднюються. При визначенні життєздатності клітин слід проводити окремі підрахунки для живих і мертвих клітин, причому мертві клітини виглядають синіми через проникність їх пошкоджених мембран для трипанового синього. [48]

На рис. 2.3 наведено загальний вигляд та основні характеристики гемоцитометра.



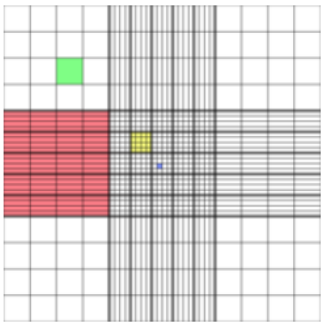
А



Б

Dimensions	Area	Volume at 0.1 mm depth
1 x 1 mm	1 mm^2	100 nL
0.25 x 0.25 mm	0.0625 mm^2	6.25 nL
0.25 x 0.20 mm	0.05 mm^2	5 nL
0.20 x 0.20 mm	0.04 mm^2	4 nL
0.05 x 0.05 mm	0.0025 mm^2	0.25 nL

С



Д

Рис. 2.3 – Гемоцитометр. А – загальний вигляд, Б – поле з клітинами для підрахунку (вид в окулярі мікроскопу), С – характеристики лічильних камер, Д – схема розташування камер.

Для підрахунку фібробластів в камеру гемоцитометра поміщають піпет-дозатором на 20 мкл мікробну суспензію, притирають накривне скельце та здійснюють підрахунок клітин в 16 квадратах об'ємом 6,25 мкл. Визначення повторюють кілька разів та обчислюють середнє значення. Результат помножують на 10^4 для переводу на 1 мл.

2.2.2 Визначення метаболічної активності клітин L929 за МТТ тестом

Метаболічну активність клітин L929 оцінювали за допомогою МТТ-тесту. Це колориметричний тест, який дозволяє оцінювати життєздатність і метаболічну активність клітин. Розчинний у воді тетразолієвий барвник 3-(4,5–диметилтіазол–2–іл)–2,5–дифенілтетразоліум бромід (МТТ) легко проникає крізь мембрани живих клітин і відновлюється у пурпурний нерозчинний у воді формазан. У відновленні МТТ, як і всіх тетразолієвих барвників, беруть участь НАД(Ф)Н/ФАДН-залежні оксидоредуктазні ферменти, локалізовані переважно в мітохондріях, а також цитозолі клітин. Таким чином, МТТ-тест є інтегральним показником клітинного метаболізму [11дис].

У досліді до моношару клітин L929 в планшеті на 96 лунок в кожну лунку, окрім 1 ряду (контроль), вносили 15 мкл розчину МТТ (5 мг/мл) і витримували протягом 3 годин при 37 °С, 5% CO_2.

Потім додавали в кожну лунку диметилсульфоксид (ДМСО) та витримували протягом 1 години при 37 °С, 5% CO_2.

Рис. 2.4 - PLATE READER - восьмиканальний фотометр для послідовного та одночасного зчитування стрипів мікропланшетів з 96 лунками.

За допомогою ІФА-аналізатора (плейт-рідера) «Elisa» вимірювали оптичну густину сумішей в лунках планшету при 570 нм. Результати оброблювали за допомогою ресурсу Exel.

2.2.3 Методика проведення тесту поглинання нейтрального червоного.

За тестом поглинання нейтрального червоного визначають життєздатність та піноцитозну активність фібробластів після впливу досліджуваних речовин.

Проведення тесту передбачає наявність моношарової культури клітин, розчину нейтрального червоного в середовищі DMEM в концентрації 0,003% -0,01 % (не менше 30 мкг/мл або 3 мг/100 мл).

Розчин нейтрального красного додають до моношару в лунки планшету на 96 лунок, інкубують 10-15 хв при 37 ^{o}C в CO_2-інкубаторі. Клітини промивають сироваткою (PBS), потім сумішшю підкисленого спирта (вода:етанол 1:1, додати 1 % оцтової кислоти конц., або суміш 50 мл спирта, 10 мл оцтової кислоти конц. та 40 мл води).

За допомогою зчитувача «Elisa» (рис. 2.4) вимірюють оптичну густину сумішей в лунках планшету при 540 нм. Результати оброблюють за допомогою ресурсу Exel.

Розраховують життєздатність за формулою:

$$К = \frac{\text{кільк. забарвлених клітин} * \% \text{ адгезованих клітин}}{\text{вихідна кільк. клітин}}$$

2.2.4 Оцінка здатності клітин до проліферації та міграції у тесті «подряпина» (скетч-тест).

Для оцінки проліферативного та міграторного потенціалу клітин використовували тест «подряпина» (scratch assay) [71дис]. Для цього за допомогою пластикового наконечнику діаметром 0,8 мм для піпет-дозатору (об’єм 200 мкл) наносять вертикальну подряпину на моношар клітин зі 100% конфлюентністю в кожній лунці планшету на 24 лунки. Обережно видаляють

живильне середовище, додають свіже та поміщають в умови культивування. За допомогою світлооптичного мікроскопа AmScope XYL-403 («AmScope» КНР) з цифровою камерою роблять мікрофотознімки вихідної подряпини (0 годин) та її змінення через 24 та 48 годин. Площу подряпини оцінюють за допомогою програми «Axio Vision Rel. 4.8». Результати представляють як співвідношення площі подряпини на 24 або 48 годину до площі вихідної подряпини, виражене у відсотках.

2.2.5 Мікроскопічні дослідження клітин.

Інвертований біологічний мікроскоп AmScope XYL-403 («AmScope» КНР) - спеціально розроблений для дослідження культури клітинних тканин, мікроскоп з високою контрастністю і дозволом, що підкреслює контури і внутрішню структуру клітин, відповідає потребам фундаментальних лабораторних досліджень.

Головною формальною відмінністю інвертованого мікроскопа від звичайного (прямого) і те, що оптична схема інвертованого мікроскопа розташовується під об'єктом, а не «над» ним.

Оптична система, що є основою для дизайну інвертованого мікроскопа представлена на рис. 2.5.

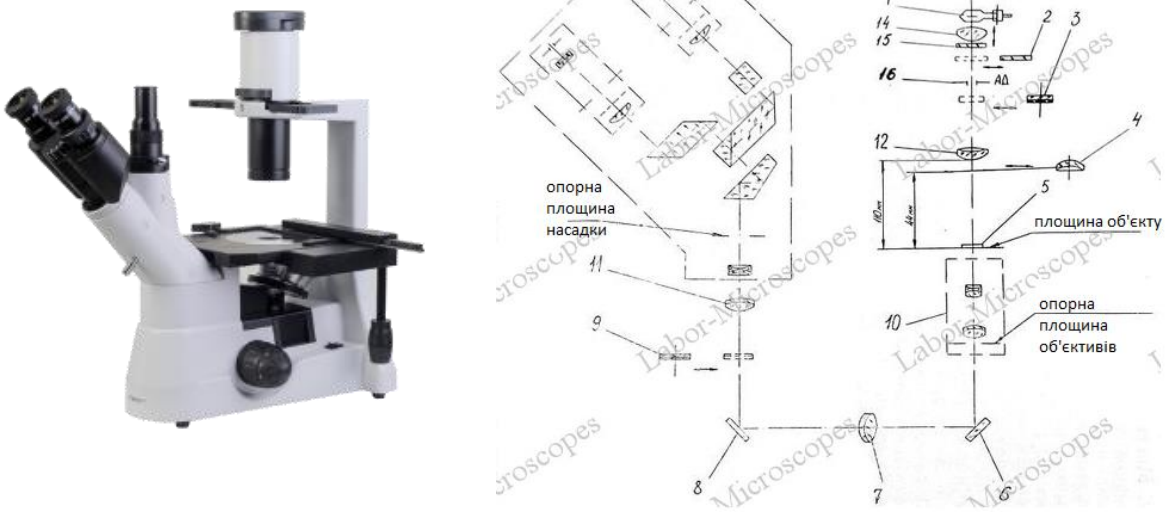


Рис. 2.5 – Загальний вигляд та принципова оптична схема інвертованого біологічного мікроскопа.

Тут видно, що такий мікроскоп відрізняється від звичайного, так званого «прямого» - розташуванням основних функціональних вузлів і приладдя, таких як об'єктиви, предметний столик і освітлювальна система. Але, також, основною відмінністю мають досліджувані об'єкти, точніше, їх розташування щодо освітлювальної проходить світла системи (конденсора) і об'єктива. У звичайному «прямому» мікроскопі освітлювальна система забезпечує проходження світла крізь досліджуваний об'єкт, перебуваючи знизу безпосередньо перед об'єктом, а об'єктив «дивиться на об'єкт» зверху. В інвертованому мікроскопі, навпаки, об'єктив знаходиться під об'єктом, що досліджується, а освітлювальна система (світла, що проходить) розташовується зверху від нього.

Джерело світла 1 проектується колектором 14 в площину апертурної діафрагми 16 і за допомогою лінзи 12 рівномірно висвітлює досліджуваний об'єкт 5. При роботі з об'єктами, що знаходяться в лабораторному посуді, висота стінок якого не перевищує 45 мм, в хід променів вводиться спеціальна лінза 4, яка підвищує числову апертуру освітлювальної системи. В оптичній схемі також використовують теплозахисний фільтр 15, матове скло 2 (яке вводиться в хід променів при використанні об'єктивів малого збільшення). Зображення об'єкта виходить шляхом проекції об'єктивом 10, лінзами 7 та 11, дзеркалами 6 та 8 у площину польової діафрагми окулярів, встановлених у візуальну насадку 13.

Конструктивне виконання такого мікроскопа, а також принцип роботи на ньому обумовлені специфічними особливостями об'єкта, що досліджується; об'єкт розташований у спеціальному посуді, він досить «товстий та пухкий». Мікроскоп дозволяє як фіксувати зображення об'єкта у статичному стані, так і спостерігати зміну форми і морфології об'єкта під впливом деяких зовнішніх чинників (відповідно до наукової методики досліджень).

2.2.6 Аналіз клітинної популяції на проточному цитометрі.

Дослідження клітинної популяції після впливу токсичної речовини проводили на проточному цитометрі марки BD FACS Canto II в Науково-дослідному інституті експериментальної та клінічної медицини Харківського національного медичного університету. На цьому приладі виконують:

1. аналіз клітинної популяції з оцінкою кожної клітини;
2. роботу з клітинною суспензією;
3. визначення розмірів і щільності клітин;
4. визначення будь-якої молекули на поверхні або всередині клітини (в якій є метка);
5. визначення всіх типів клітин, що входять в популяцію (в якій є метка);
6. розділення клітинної популяції (живі неапоптотичні клітини, апоптотичні живі, некроз, некроз та апоптоз).

Висновок до 2 розділу:

Були розглянуті властивості та характеристики клітин фібробластів щурів (лінія L929) та токсиканту доксорубіцину. Були вибрані методи досліджень показників життєздатності та метаболічної активності клітин фібробластів, як тест МТТ, тест поглинання нейтрального червоного, скетч-тест. Для досліджень змін у морфології клітин (форма, конфлюентність, адгезія, цілісність мембран) вибрано мікроскопію (інвертований мікроскоп). Дослідження проліферативної активності, стану клітин запропоновано проводити на проточному цитометрі.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Перед початком робіт було складено план проведення експериментів з визначення впливу хімічної речовини (доксорубіцину) на клітини фібробластів лінії L929 та досліджень параметрів функціональної активності клітин. План складався з таких етапів:

1. Підготовка лабораторії (створення асептичних умов), реактивів, посуду та обладнання, стерилізація (за необхідністю).
2. Отримання клітин з банку, транспортування в лабораторію, розморожування.
3. Підрахунок клітин, посів клітин на флакони.
4. Пересів клітин для дослідження на планшети.
5. Додавання досліджуваної речовини-токсиканту (доксорубіцин).
6. Проведення скетч-тесту.
7. Проведення тестів МТТ, та з нейтральним червоним.
8. Аналіз морфології клітин.
9. Аналіз проліферативної активності.

3.1 Отримання клітинної лінії з кріоконсервованої культури.

Культуру клітин фібробластів L929 отримали в кріобанку ІПКіК НАНУ. Пробірку з культурою в транспортувальному боксі перенесли в лабораторію, помістили у водяну баню при 37 °С та витримали 5 хв.

Рис. 3.1 – Отримання клітин фібробластів L929 з кріобанку ІПКіК НАНУ.

Всі роботи з клітинами проводили з дотриманням правил асептики.

Вміст пробірки з розмороженими клітинами кількісно перенесли в стерильну центрифужну пробірку та додали стерильне середовище МЕМ в кількості 1:1 до об'єму мікробної суспензії. Перемішали за допомогою пікет-дозатору та помістили в центрифугу ОПн-3. Режим центрифугування: 1500 об/хв., тривалість 3 хв.

Супернатант видалили, осад ресуспендували в середовищі DMEM з розрахунку на 1 млн. клітин – 1 мл середовища. В отриманій з кріобанку пробірці було 1 млн. клітин. Отже, до осаду додали 1 мл середовища.

Провели контроль отриманої суспензії мікроскопічним методом за допомогою інвертованого мікроскопу. Визначали морфологію клітин, візуально визначали чистоту (відсутність сторонньої мікрофлори). Морфологія клітин відповідає опису (див. розділ 2), не відмічено бактеріальну флору у полі спостереження.

3.2. Отримання моношарової культури

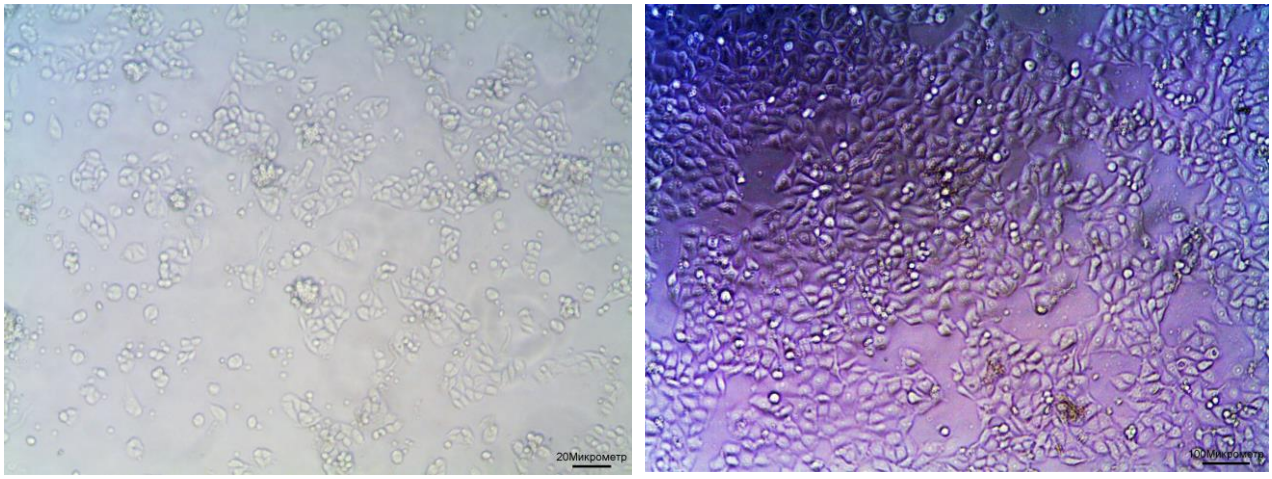
Для культивування моношарової культури використовували пластикові флакони («SPL Life Sciences», Корея). Посівна концентрація фібробластів для моношарової культури становила $1 \cdot 10^6$ кл/мл.

Клітини культивували при 37 ^{o}C в атмосфері з 5% CO_2 у живильному середовищі DMEM з додаванням антибіотиків (200 Од/мл бензилпеніциліну («Arterium», Україна), 200 мкг/мл стрептоміцину («Arterium», Україна) та 10% FBS.

Культура клітин лінії L929 за умов росту в адгезивних умовах характеризується фібробластоподібною морфологією (рис. 3.2).

Після перенесення клітин в умови культивування на адгезивну поверхню, вони змінювали форму з округлої на овальну з одним або більше короткими відростками. На наступну добу морфологія клітин в основному характеризувалася веретеноподібною формою. Клітини мали одне добре помітне ядро з одним або декількома ядерцями. У цитоплазмі клітин були

добре помітні гранули і світлі вакуолі. Також у полі зору спостерігались декілька (2–5) клітин на стадії мітозу (рис. 3.1).



А Б

Рис. 3.2. Моношар клітин лінії L929, утворений в адгезивних умовах. Світлова мікроскопія. А - початок культивування, Б – друга доба культивування.

На цьому етапі роботи нами було перевірено здібність клітин лінії L929 до формування моношару у адгезивних умовах, отримано моношарову культуру, здійснено розмноження клітин для подальших досліджень.

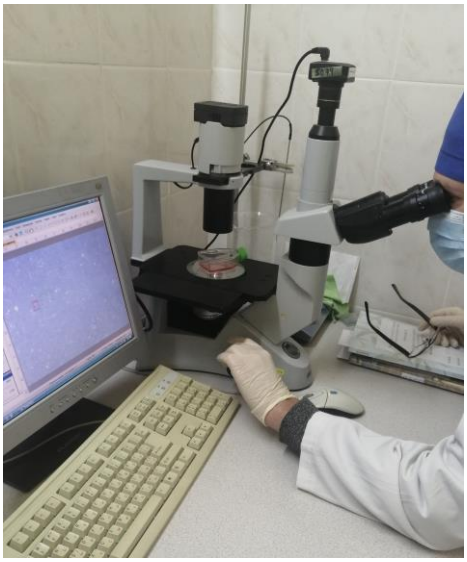
3.3. Пасаж культури клітин

Через 2 доби культивування провели контроль утворення моношару в культуральному флаконі за допомогою інвертованого світлооптичного мікроскопа AmScope XYL-403 («AmScope» КНР) з цифровою камерою (рис. 3.3, А).

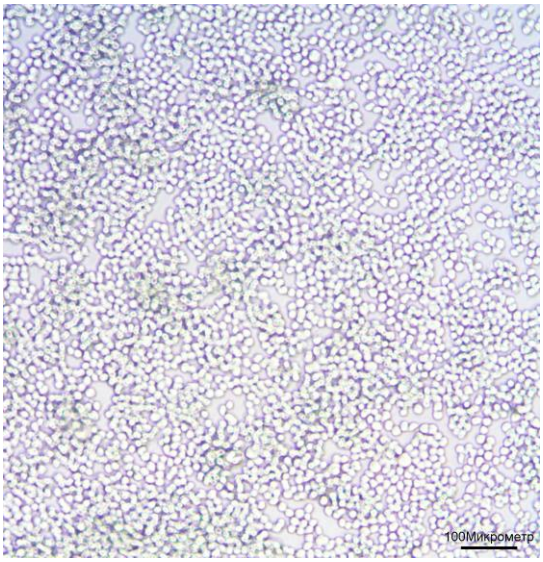
Наступним завданням було здійснення пересіву клітин на планшети для проведення досліджень.

Для цього виснажене середовище культивування з флакону зливали. Промивали тричі фосфатним буферним розчином pH 7,0 для видалення залишків живильного середовища, тому що воно здатне інактивувати фермент трипсин. Моношарову культуру клітин лінії L929 відкріпляли від поверхні культивування шляхом обробки сумішшю розчинів 0,5% трипсину («Sigma», США) та Версену («PAA», США) у співвідношенні 1:1.

Витримували 4 хв. при температурі 37 ^{o}C в CO_2-інкубаторі. Контролювали зняття клітин з поверхні флакону мікроскопіюванням (рис. 3.3, Б).



А



Б

Рис. 3.3 – Контроль утворення моношару (А) та зняття клітин (Б).

Після інкубування у флакон додавали 5 мл середовища DMEM для інактивації трипсина. Далі вміст флакона розділяли порівну на 2 центрифужні пробірки та осаджували клітини шляхом центрифугування (центрифуга ОПН-3). Режим центрифугування: 1200 об/хв., тривалість 3 хв.

Супернатант видалили, осад ресуспендували в середовищі DMEM з розрахунку 0,5 мл на 1 пробірку. Проводили підрахунок клітин на гемоцитометрі (див. розділ 2). Результати наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Результати підрахунку клітин в гемоцитометрі

№ повторювання	**Кількість клітин в 16 квадратах 0,25х0,25 мм**	**Середнє значення**	**Кількість в 1 мл (х 10^4)**
1	170	217	$2,17x10^6$
2	176		
3	360		
4	268		
5	220		
6	110		

Отже, за час культивування кількість клітин збільшилася в 2,17 рази.

3.4 Пересів клітин для дослідження на планшети

Для визначення впливу речовини-токсиканту здійснили пересівання клітин в лунки планшетів на 24 та 96 лунок. Об'єм лунок – 1 мл та 0,2 мл.

Кількість клітин на 1 лунку для планшету на 96 лунок – 25 тис., на 24 лунки - 150 тис. Розрахували кількість клітин:

- на планшет 96 лунок – $2,4*10^6$,
- на планшет 24 лунки – $3,6*10^6$.

Для досліджень заповнювали повністю планшет 96 лунок та 12 лунок планшету на 24 лунки, тобто треба було помістити 2,4 млн. клітин та 1,8 млн. клітин у відповідні планшети.

Розрахували розведення вихідної суспензії ($2,17*10^6$ кл./мл) для 48 лунок:

2,17 млн. кл. – в 1 мл

2,4 млн кл – в X мл.

X=2,4 / 2,17 = 1,11 мл. Треба 1,11 мл вихідної суспензії.

В лунку додають 50 мкл середовища, тобто на 96 лунок - 4800 мкл або 4,8 мл. Тому до 1,11 мл вихідної суспензії додавали середовища DMEM до загального об'єму 4,8 мл.

За допомогою піпет-дозатора з 10 мл наконечником додавали в лунки планшета на 96 лунок по 200 мкл свіжого середовища DMEM. Потім за допомогою 5-мл наконечника додавали в ці ж лунки по 50 мкл середовища з клітинами.

Розрахували розведення вихідної суспензії ($2,17*10^6$ кл./мл) для 12 лунок:

2,17 млн. кл. – в 1 мл

1,8 млн кл – в X мл.

X=1,8 / 2,17 = 0,83 мл. Треба 0,83 мл вихідної суспензії.

В лунку додають 0,25 мл середовища, тобто на 12 лунок - 3 мл. Тому до 0,83 мл вихідної суспензії додавали середовища DMEM до загального об’єму 3 мл.

За допомогою піпет-дозатора з 10 мл наконечником додавали в два ряди планшета по 500 мкл свіжого середовища DMEM. Потім за допомогою 5-мл наконечника додавали в ці ж лунки по 0,25 мл середовища з клітинами.

При проведенні засіву флакон з суспензією клітин періодично струшували, щоб клітини були розподілені рівномірно і не агрегували. Залишок середовища з клітинами залишили для подальшого зростання і дослідження.

3.5 Додавання досліджуваної речовини-токсиканту (доксорубіцин).

Розчин доксорубіцину має концентрацію 2 мг/мл. Для проведення досліджень токсичної дії на клітинах лінії L929 проводили його розведення в 4 рази. Для цього 2 мл розчину додавали в пробірку та розводили в 8 мл води очищеної, перемішували піпетуванням. Отримали розчин 0,5 мг/мл.

Розраховані кількості доксорубіцину для додавання в лунки наведено в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Розрахунок кількостей доксорубіцину для досліджень

№ рядка	Досліджувана концентрація, мкг/мл	Кількість на 1 лунку (0,2 мл), мкг	Кількість на 1 лунку (0,2 мл), мкл
1, 7 (контроль)	0	0	0
2, 8	0,25	0,05	1
3, 9	1	0,2	5
4, 10	25	5	10
5, 11	50	10	20
6, 12	100	20	40

Використовуючи 8-канальний піпет-дозатор, додали необхідні кількості доксорубіцину в лунки планшету (96 лунок). Планшети поставили в інкубатор на добу при температурі 37 ^{o}C та 5 % CO_2.

3.6 Проведення тесту МТТ для визначення метаболічної активності фібробластів L929.

МТТ-тест слід розпочинати за 70% заповненості поверхні дна лунок. Тому спочатку перевірили наявність монослоя в лунках планшету.

МТТ-тест проводили, як наведено в розділі 2, на шести рядках.

Отримані результати після вимірювання оптичної густини на ІФА-аналізаторі (планшетному рідері) наведено в табл. 3.3, на рис. 3.4. та 3.5.

Таблиця 3.3

Результати контролю метаболічної активності (МТТ тест)

№ стовпця	Клітини		Рядки / Концентрація доксорубіцину, мкг/мл				
	Живі	Мертві	0,25	1	25	50	100
1	0,32	0,063	0,4	0,417	0,375	0,334	0,288
2	0,312	0,068	0,354	0,425	0,462	0,347	0,281
3	0,308	0,068	0,438	0,49	0,475	0,397	0,321
4	0,31	0,062	0,412	0,487	0,475	0,329	0,306
5	-	-	0,38	0,497	0,44	0,427	0,322
6	-	-	0,33	0,427	0,471	0,363	0,334
7	-	-	0,335	0,451	0,497	0,407	0,345
8	-	-	0,329	0,437	0,356	0,315	0,293
1*	0,3125	0,06525	0,37225	0,453875	0,443875	0,364875	0,31125
2*	0,00526	0,003202	0,041592	0,032669	0,051137	0,040913	0,022939

Примітки. 1 - середнє значення, 2 – стандартне відхилення.

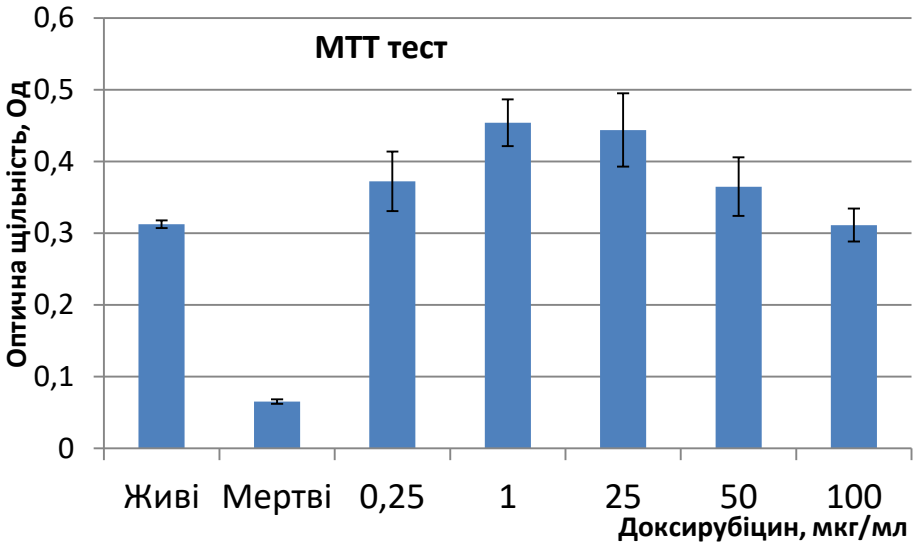


Рис. 3.4 – Залежність метаболічної активності за МТТ-тестом від концентрації доксирубіцину.

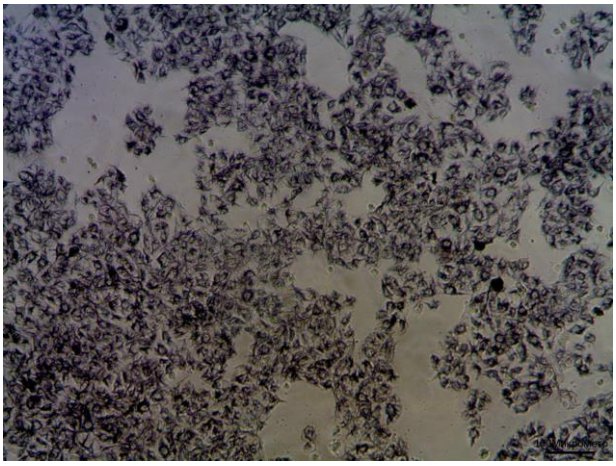


Рис. 3.5 – Мікроскопія результатів МТТ-тесту.

З отриманих даних можна зробити висновок, що концентрація доксирубіцину, починаючи з 25 мкг/мл, знижує метаболічну активність досліджуваних фібробластів.

3.7 Визначення метаболічної активності фібробластів L929 за допомогою тесту з нейтральним червоним.

Тест з нейтральним червоним проводили, як наведено в розділі 2, на шести рядках планшету.

Отримані результати після вимірювання оптичної густини на ІФА-аналізаторі (планшетному рідері) наведено в табл. 3.4, на рис. 3.6. та 3.7.

Таблиця 3.4

Результати контролю метаболічної активності (тест з нейтральним червоним)

№ стовпця	Клітини		Рядки / Концентрація доксорубіцину, мкг/мл				
	Живі	Мертві	0,25	1	25	50	100
1	0,188	0,08	0,187	0,328	0,184	0,218	0,193
2	0,172	0,088	0,151	0,347	0,242	0,19	0,197
3	0,194	0,095	0,229	0,288	0,238	0,181	0,188
4	0,185	0,085	0,17	0,249	0,238	0,186	0,196
5			0,161	0,261	0,241	0,171	0,19
6			0,195	0,289	0,255	0,231	0,18
7			0,164	0,26	0,254	0,143	0,138
8			0,163	0,267	0,226	0,196	0,163
1*	0,18475	0,087	0,1775	0,286125	0,23475	0,1895	0,180625
2*	0,009287	0,006272	0,025276	0,034906	0,022506	0,027166	0,020452

Примітки. 1 - середнє значення, 2 – стандартне відхилення.

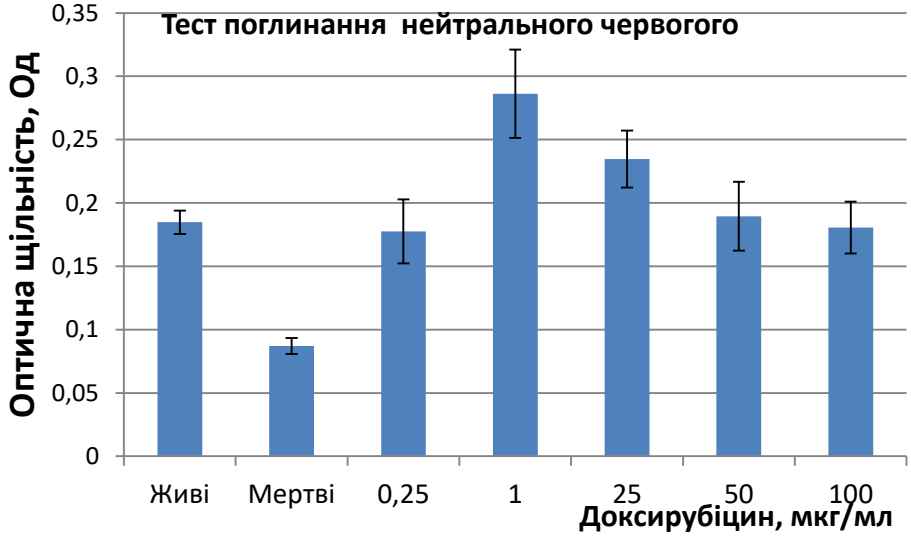


Рис. 3.6 – Залежність метаболічної активності (тест з нейтральним червоним) від концентрації доксирубіцину.

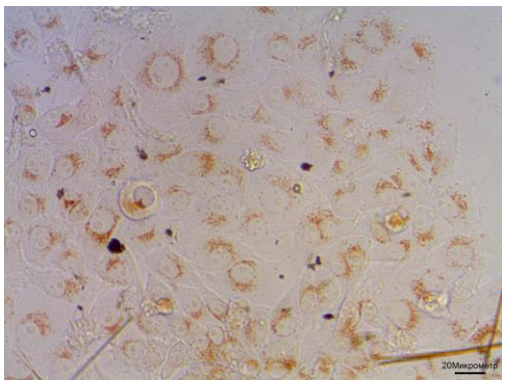
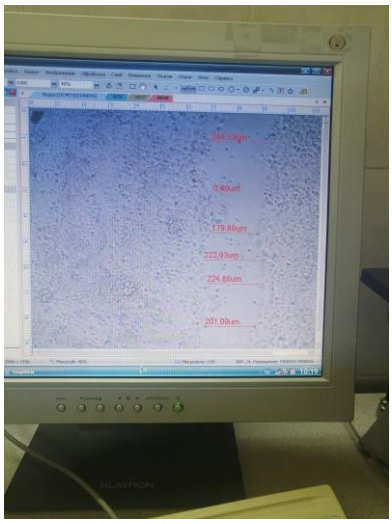


Рис. 3.7 – Мікроскопія результатів тест з нейтральним червоним.

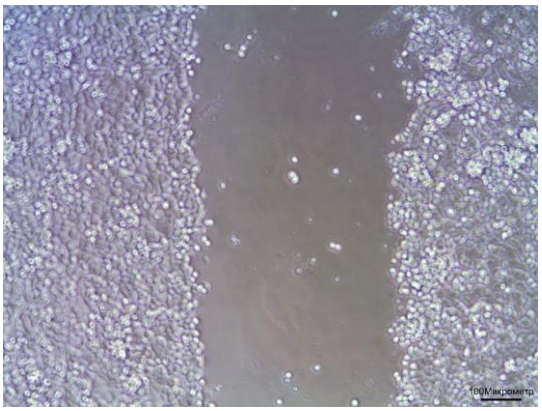
З отриманих даних можна зробити висновок, що концентрація доксирубіцину, починаючи з 25 мкг/мл, знижує метаболічну активність досліджуваних фібробластів.

3.7 Проведення скретч-тесту.

Для визначення змін міграційної активності виконували скетч-тест на моношарі клітин в планшеті на 24 лунки, в 12 лунок якого додавали різні концентрації доксирубіцину, мкг/мл: 0 (контроль), 5, 10, 25, 50, 100. Методику випробування наведено в розділі 2. Планшет помістили в інкубатор на добу при температурі 37 ^{o}C та 5 % CO_2. Результати мікроскопіювання наведено на рис. 3.8 та 3.9, результати розрахунків у вигляді графіку – на рис. 3.10.

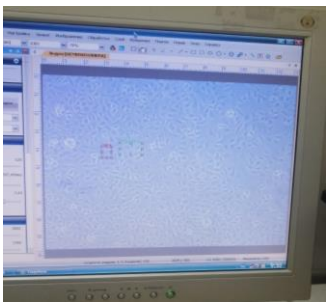


А

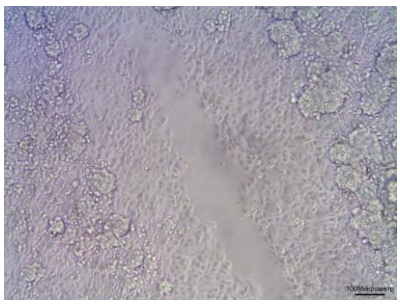


Б

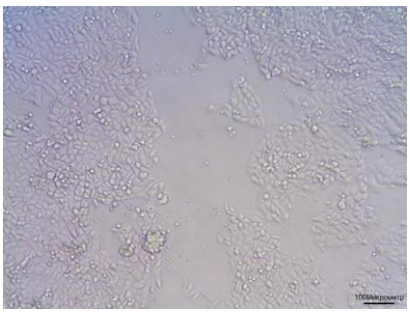
Рис. 3.8 – Приклад вимірювань результатів скетч-тесту (А) та початковий вигляд подряпини (Б).



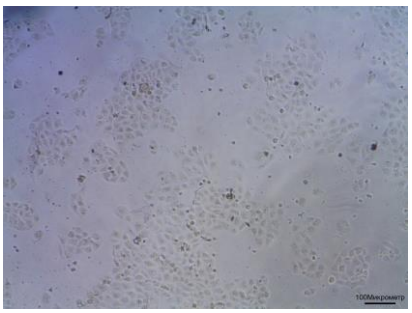
0 мкг/мл



5 мкг/мл



10 мкг/мл



25 мкг/мл

Рис. 3.9 - Мікроскопія результатів скетч-тесту через добу.

З рис. 3.9 видно, що в контролі відновився моношар повністю, в лунці з концентрацією доксирубіцину 25 мгк/мл моношар майже не відновлений та спостерігається загибель частини клітин. В решті лунок (50 та 100 мкг/мл) клітини загиблі.

Дані кількісних результатів візуалізовано на рис. 3.10.

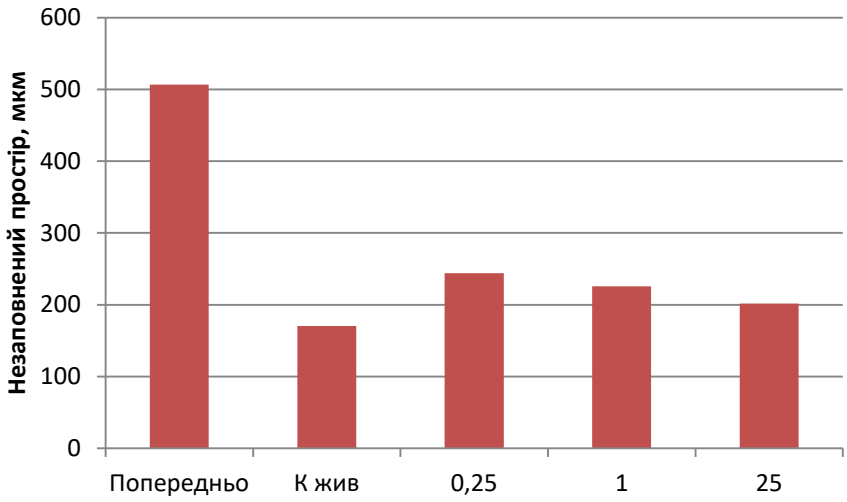


Рис. 3.10. – Результати обчислювання даних скетч-теста для концентрацій 2, 10, 25 мкг/мл.

З отриманих даних зроблено висновок про зниження міграційної активності клітин при концентрації вище 25 мкг/мл.

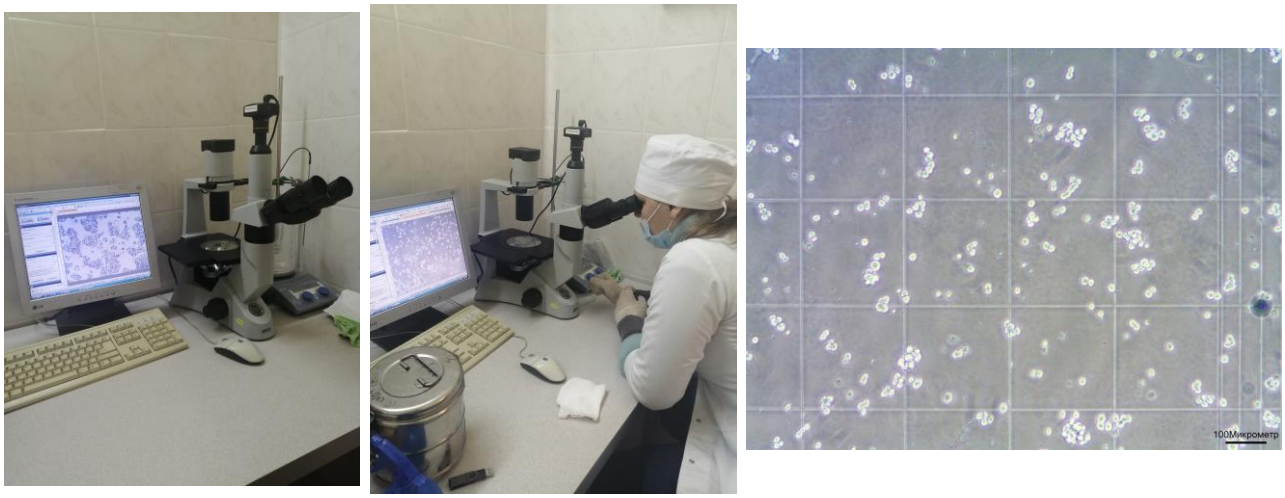
3.9 Аналіз морфології клітин.

Визначення змін морфології клітин (форми, конфлюентності, адгезії, цілісності мембран) проводили мікроскопічним методом за допомогою інвертованого мікроскопу (див. розділ 2). Результати наведено в табл. 3.5.

З отриманих даних зроблено висновок про погіршення стану клітин вже при концентрації доксорубіцину 25 мкг/мл та значні зміни морфології клітин при концентраціях 50 та 100 мкг/мл.

3.9 Аналіз проліферативної активності.

Досліджували загальну кількість та збереженість фібробластів за стандартною методикою за допомогою забарвлення 0,4 %-м розчином трипанового синього. Проводили визначення життєздатності культури клітин та проліферативної активності із застосуванням трипанового синього. Для цього суспензію пофарбованих клітин фібробластів змішували з 0,5% розчином трипанового синього у співвідношенні 1:1 і виконували підрахунок кількості незабарвлених (життєздатних) клітин з допомогою гемоцитометра (рис. 3.11).

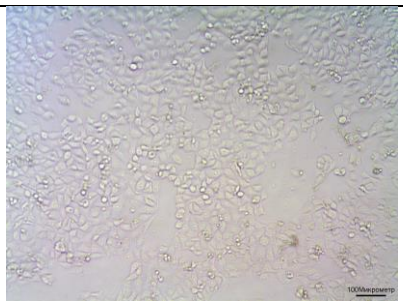
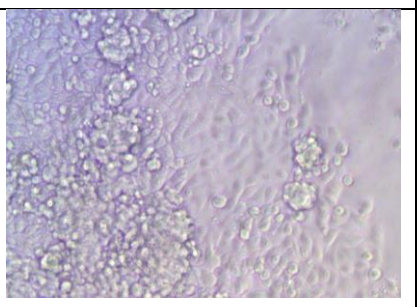
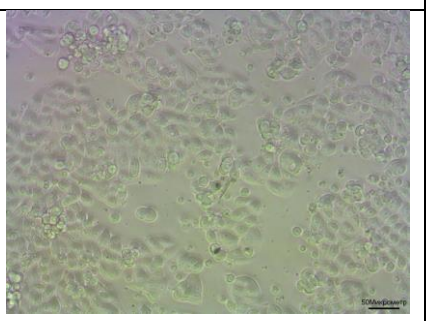
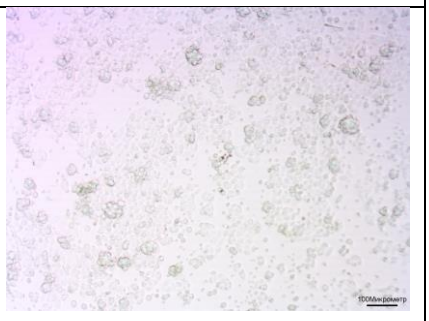


А Б В

Рис. 3.11 – Аналіз проліферативної активності. А – мікроскопіювання забарвленої культури, Б – підрахунок клітин в гемоцитометрі, В – сітка гемоцитометра.

Таблиця 3.5

Дослідження змін морфології клітин фібробластів від концентрації доксорубіцину

Концентрація доксорубіцину, мкг/мл	**Морфологія клітин**	**Зовнішній вигляд**
0	Конфлюентність близько 100%, форма клітин типова, веретеновидна	Рис. 3.2, Б
0,25	Конфлюентність близько 100%, форма клітин типова, веретеновидна	
1	Конфлюентність близько 90%, форма клітин типова, веретеновидна	
25	Конфлюентність близько 50%, є простір між клітинами, зменшена адгезія, частина клітин відшарована	
50	Всі клітини відшаровані, округлої форми, багато відмерлих	
100	Не спостерігаються живі клітини	

Дані результатів підрахунку клітин візуалізовано на рис. 3.12. Для розрахунків використовували ресурс https://www.doubling-time.com/compute.php.

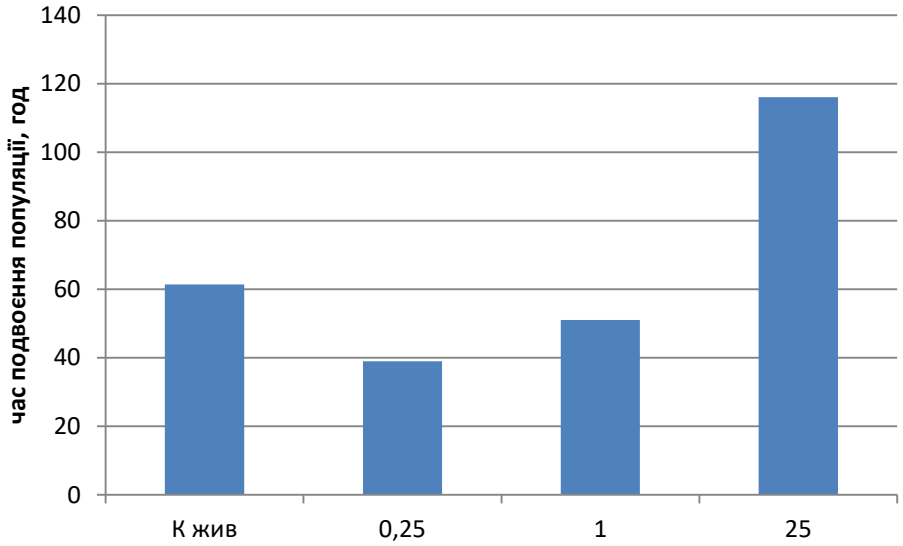


Рис. 3.12 – Зміна проліферативної активності клітин в залежності від концентрації доксорубіцину.

З отриманих даних зроблено висновок про зниження проліферативної активності клітин при концентрації доксорубіцину до 25 мкг/мл та майже повну її відсутність при концентраціях 50 та 100 мкг/мл.

Висновок до 3 розділу:

В розділі наведено опис етапів експериментальних робіт, які включали отримання клітинної лінії з кріоконсервованої культури, отримання моношарової культури у флаконі, субкультивування клітин у планшети на 96 та 24 лунки, додавання досліджуваної речовини-токсиканту (доксорубіцин). Наведено необхідні розрахунки кількостей середовищ. Реактивів, речовини-токсиканту. Отримані результати змін метаболічної активності (тест МТТ та з нейтральним червоним), міграційної активності (скетч-тест), змін морфології клітин (форми, конфлюентності, адгезії, цілісності мембран), проліферативної активності опрацьовані та представлені у таблицях та на рисунках.

ВИСНОВКИ

1. Культури клітин тварин, на яких проводять дослідження, є не просто заміною експериментів на тваринах, а й новаторськими системами, здатними зробити революцію у медицині та наукових дослідженнях. І, на відміну від традиційних експериментів, приносять значний прогрес.
2. В роботі досліджено токсичний вплив хімічної речовини (доксорубіцину) на життєздатність та метаболічну активність живих тваринних клітин - фібробластів. На підставі аналізу отриманих результатів встановлено, що доксирубіцин у концентрації вище 25 мкг/мл знижує метаболічну та міграційну активність фібробластів, зменшує адгезивні властивості та впливає на піноцитоз.
3. Також відмічено погіршення стану клітин при концентрації доксорубіцину вже при 25 мкг/мл та значні зміни морфології клітин при концентраціях 50 та 100 мкг/мл
4. Зниження проліферативної активності клітин спостерігалося при концентрації доксорубіцину до 25 мкг/мл, а при концентраціях 50 та 100 мкг/мл - майже повна її відсутність.
5. Результати підтверджують актуальність та перспективність проведення подальших робіт з визначення порогових токсичних концентрацій доксорубіцину для розуміння механізмів ймовірних побічних ефектів, для підвищення безпеки застосування ліків з токсичними властивостями.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Культура клітин: *Wikiwand.* URL: https://www.wikiwand.com/uk/Культура_клітин (дата звернення 10.09.2023 р.)
2. Рудишин С. Д. Біотехнологія рослин : навч. посіб. Суми : «Корпункт», 2024. 200 с.
3. Gautheret R.J. Histogenesis in plant tissue cultures. J. Nat. Cancer Inst. 1957. Vol. 19. P. 555-564.
4. Gautheret R.J. La culture des tissues vegetaux. Techniques et realistions. Paris, 1959. 868 p.
5. Макрушин М.М. Фізіологія рослин. / М.М. Макрушин, Є.М, Макрушина, Н.В. Петерсон, М.М. Мельников. Вінниця: Нова книга, 2006. 413 с.
6. Твардовська М.О., Андрєєв І.О., Кунах В.А. Введення в культуру *in vitro* та цитогенетичний аналіз рослин *Iris attica* та *Iris pseudopumila Tineo*. / Твардовська М.О., Андрєєв І.О., Кунах В.А. // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2018. Т.16, № 2. С. 203-211.
7. Подгаєцький А.А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія / А.А. Подгаєцький, В. В. Мацкевич, А.Ан. Подгаєцький. – Біла Церква : БНАУ, 2018. 209 с.
8. Кунах В.А. Відділ генетики клітинних популяцій інституту молекулярної біології і генетики НАН України: історія та головні наукові здобутки (до 30-річчя від часу заснування) // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2019. № 17. С. 57-114. http://dspace.tnpu.edu.ua/bitstream/123456789/9055/1/Kunakh_bibl.pdf
9. Альтернативи експериментам на тваринах: *сайт організації «Лікарі проти експериментів на тваринах»* URL: https://gumanna-osvita.org/uk/doslidzhennia/naukovi-doslidzhennia-bez-strazhdan-tvaryn (дата звернення 10.09.2023 р.)

10. Довгалюк АІ, Трач-Росоловська СВ. Перспективи використання методу культивування клітин для теоретичної та клінічної медицини. *Вісник наукових досліджень*. 2010; 1: 101 – 04.
11. Корчан Н.О. Культивування тваринних клітин *in vitro* як один з пріорітетних напрямів сучасних біологічних наук / Н.О. Корчан, І.В. Начас // Методика навчання природничих дисциплін у середній та вищій школі : матер. Міжн. наук.-практ. конф. (XXI КАРИШИНСЬКІ ЧИТАННЯ) (м. Полтава, 29–30 травня 2014 р.) / за заг. ред. проф. М. В. Гриньової. Полтава, 2014. С. 132-134.
12. Cell Culture Basics: Companion Handbook. URL: https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf (дата звернення 10.09.2023 р.)
13. Cell Growth & Maintenance: *Website Merck*. URL: https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/applications/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-culture-by-technique/cell-growth-and-maintenance (дата звернення 10.09.2023 р.)
14. Кладницька Л.В. Вплив мезенхімних стовбурових клітин на пухлинний процес на моделі метастазуючої карциноми легені льюїс: Монографія / Л. В. Кладницька, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко, Р. Р. Бокотько, Т. Л. Савчук. Київ: Видавничий центр НУБіП України, 2021. 245 с.
15. Saleem M. A. Conditionally Immortalized Human Podocyte Cell Line Demonstrating Nephrin and Podocin Expression / Saleem M. A., O'H are M.J., Reiser J., Coward R.J., Inward C. D., Farren T., Xing C.Y., Ni L., Mathieson P.W., Mundel P.A // J. Am. Soc. Nephrol. 2002. № 13. P. 630-638.
16. Krtil J., Plбtennk J., Kazderovb M., Tesa V., Zima T. Culture Methods of Glomerular Podocytes / / Kidney Blood Press Res. - 2007. - 30. - P. 162-174.
17. Salauddin, Md. (2022). A Brief Concept of Cell Culture: Challenges, Prospects and Applications. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.99387
18. Культура клітин: *The Science Creative Quarterly*. URL: http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/ (дата звернення 10.09.2023 р.)

19. Фібробласт: Вікіпедія. URL: https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D1%96%D0%B1%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%BB%D0%B0%D1%81%D1%82 (дата звернення 10.09.2023 р.)
20. Твердохліб І.В. Фібробласти шкіри: термінологія, гетерогенітет субпопуляцій і загальні властивості / І.В. Твердохліб, Ю.В. Сілкіна // Morphologia. 2020. Том 14. № 4. С. 108-114. DOI: https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.4.108-114.
21. Jahoda CAB, Reynolds AJ. Hair follicle dermal sheath cells: unsung participants in wound healing. Lancet. 2019;358:1445-8.
22. Вільхова О. В. Структурна організація пухкої волокнистої сполучної тканини // Вісник проблем біології і медицини. 2020. Вип. 2 (156). С. 14-18. DOI 10.29254/2077-4214-2020-2-156-14-18.
23. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The Developing Human. Clinically Oriented Embryology, 10th Edition. Philadelphia: Elsevier; 2016. 540 p.
24. Петренко О. М. Роль клітинних технологій в пластичному закритті дефектів шкіри та м’яких тканин / Петренко О. М., Бадзюх С. В., Зубов Д. О., and Безродний Б. Г. // Вісник проблем біології і медицини. Т. 1, № 3. 2017. С. 197-201. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/rol-klitinnih-tehnologiy-v-plastichnomu-zakritti-defektiv-shkiri-ta-m-yakih-tkanin (дата звернення: 27.10.2023).
25. Michael Sela "Концепция использования синергии моноклональных антител для создания лекарственных препаратов" Biotechnologia Acta, vol. 6, no. 4, 2013.
26. Зайченко Г. В. Спектр фармакологічної активності моноклональних антитіл / Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Шумейко О. В., Клименко О. В., Ходаківська О. В. // УЖМБС. 2019. Вип. 4, № 5. С. 17–32. https://doi.org/10.26693/jmbs04.05.017
27. Проняєв Д.В. Досвід прикладного застосування стовбурових клітин / Д.В. Проняєв, В.Л. Волошин, В.В. Мельник та ін. // Буковинський медичний

вісник. 2021. Т. 25, № 4 (100). С. 123-132. DOI: https://doi.org/10.24061/2413-0737.XXV.4.100.2021.21

28. Спринсян, Г. С. Стовбурові клітини як перспективний терапевтичний напрям лікування тяжких захворювань // Infusion & Chemotherapy. 2020. № 2. С. 5-10. DOI: 10.32902/2663-0338-2021-2-5-10
29. Geng T. Epigenetic Regulation of Transition Among Different Pluripotent States: Concise Review / Geng T, Zhang D, Jiang W. // Stem Cells. 2019 Nov. № 37(11). P. 1372-1380. doi: 10.1002/stem.3064
30. Гордієнко І. Що таке стовбурові клітини та які їх типи бувають? 29.11.2022 : сайт «GOOD CELLS». URL: https://goodcells.com/blog/cho-take-stovburovi-klityny (дата звернення: 27.10.2023)
31. Takahashi K. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors / Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S // Cell. 2007. № 131 (5). P. 861-872.
32. Junying Y. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells / Junying Y., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K. et al. // Science. 2007. № 318 (5858). P. 1917-1920.
33. Woltjen K. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells / Woltjen K., Michael I.P., Mohseni P. et al. // Nature. 2009. № 458. P. 766-770.
34. Kaji K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors / Kaji K., Norrby K., Paca A. et al. // Nature. 2009. № 458. P. 771-775.
35. Yu J. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences / Yu J, Hu K, Smuga-Otto K. et al. // Science. 2009 May 8. № 324(5928). P. 797-801. doi: 10.1126/science.1172482.
36. Moy AB, Kamath A, Ternes S, Kamath J. The Challenges to Advancing Induced Pluripotent Stem Cell-Dependent Cell Replacement Therapy. Med Res Arch. 2023 Nov;11(11):4784. doi: 10.18103/mra.v11i11.4784.

37. Shi Y. Powering Reprogramming with Vitamin C / Shi Y., Zhao Y., Deng H. // Cell Stem Cell. 2010. № 6 (1). P. 1-2.
38. Tatsuma Yao, Yuta Asayama Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*. Vol. 16, Issue 2, April 2017. P. 99-117. URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/rmb2.12024 (дата звернення: 27.10.2023).
39. Serum-free media: ask the experts. 11 apr 2022 : сайт «RegMedNet». URL: https://www.regmednet.com/serum-free-media-ask-the-experts/ (дата звернення: 27.10.2023).
40. Amit M. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture / Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. // Dev. Biol. 2000. № 227. P. 271–278.
41. Chen G. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture / Chen G., Gulbranson D.R., Hou Z., et al. // Nat Methods. 2011. № 8. P. 424–429.
42. Hasegawa K. Wnt signaling orchestration with a small molecule DYRK inhibitor provides long-term xeno-free human pluripotent cell expansion / Hasegawa K, Yasuda S, Teo J, et al. // Stem Cells Transl Med. 2012. № 1. P. 18–28.
43. Nakagawa M. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells / Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, et al. // Sci Rep. 2014. № 4. P. 3594.
44. Culture medium for pluripotent stem cells. Hasegawa K, Yasuda S, Shahsavarani H, Yoshida N. International Patent Application. 2015. WO 2015/147047 A1.
45. Моісєєв А.І. Оптимізація режимів кріоконсервування клітинних сфероїдів різних термінів культивування : дис. … д-ра філософії : 091, 09. Харків, 2023. 163 с.

46. L929 [L-929, L cell, derivative of Strain L] cells : *Addexbio*. URL: https://addexbio.com/productdetail?pid=5025 (дата звернення: 27.10.2023).
47. Державний реєстр лікарських засобів України. URL: http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlz1?opendocument&stype=8DD0CD66EC206E61C225891E00338749 (дата звернення: 27.10.2023).
48. Counting Chambers / Hemocytometers : *Logos Biosystems*. URL: https://logosbio.com/how-to-count-cells-an-overview-of-cell-counting-methods/ (дата звернення: 27.10.2023).
49. Tarusin D.N., Kireyev V.A., Kovalenko S.Ye., Kovalenko I.F., Rozanov L.F., Petrenko A.Yu. Selection of protocols to cryopreserve mesenchymal stromal cells in suspension and alginate microspheres by studying their osmotic responses in 1M DMSO. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2016;26(2):133–44. DOI: 10.15407/cryo26.02.133
50. Denker S.P., Barber D.L. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. The Journal of Cell Biology. 2002;159(6):1087–96. DOI: 10.1083/jcb.200208050

ДОДАТОК

Публікації за темою роботи

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

YOUTH PHARMACY SCIENCE

МАТЕРІАЛИ
IV ВСЕУКРАЇНСЬКОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ З МІЖНАРОДНОЮ УЧАСТЮ

6-7 грудня 2023 року
м. Харків

Харків
НФаУ
2023

кислоту бензойну та натрію бензоат. Ефективність дії консервантів досліджували за методикою ДФУ та оцінювали за логарифмом зменшення кількості життєздатних мікроорганізмів. Критерієм оцінки ефективності антимікробних консервантів було визначення логарифму зменшення кількості життєздатних клітин мікроорганізмів за відповідний період зберігання після контамінації зразків.

Висновки. Результати проведених досліджень показали досить високу ефективність усіх обраних антимікробних консервантів. Але з урахуванням більш широкого спектру дії, для подальших досліджень обрано кислоту сорбінову.

ОСОБЛИВОСТІ ДОСЛІДЖЕНЬ НА КЛІТИННИХ КУЛЬТУРАХ ТВАРИН

Чаркова А.П.
Науковий керівник: Двінських Н.В.
Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
begunova1203@gmail.com

Вступ. Одним з найсучасніших методів біотехнологічних досліджень в сучасних лабораторіях є клітинне культивування. Перші кроки культивування клітин поза їх природного середовища існування почалися з кінця 19-го століття. Але активно застосовувати такі технології почали з 60-х років двадцятого сторіччя. В даний час культури клітин людини і тварин стали важливим інструментом, що використовується в багатьох сферах природничих наук. Вони знаходять все більше застосування у наукових дослідженнях, практичній та регенераторній медицині, сучасних біотехнологіях.

Завдяки своїм перевагам, таким як можливість визначення впливу тієї чи іншої сполуки на конкретний вид клітин чи тканин, нівелюючі вплив нервової, ендокринної та імунної системи, метод клітинного культивування затребуваний та актуальний для досліджень прямого впливу екзогенних (факторів поза організмом) агентів, включаючи клітинні токсини, фармакологічні речовини, такі як ліки, тощо, на певні групи клітин.

Мета дослідження. Метою роботи є роботи є огляд досліджень із використанням клітинних культур тварин та людини, їх особливостей та методів роботи із даними системами.

Матеріали та методи. Для виконання поставлених завдань використовували теоретичні методи скринінгу та аналізу літературних даних.

Результати дослідження. Методи досліджень без тварин, які використовують дані від людини або її клітини мають ключову перевагу. Вони дають результати, актуальні для людини і тому стрімко розвиваються. До таких методів належать: культивування клітинних культур, комп'ютерне моделювання, використання мініорганів та складних багатокомпонентних чіпів, а також епідеміологічні дослідження.

Сучасні технології дозволяють «відтворити» навіть складні структури людського тіла у лабораторних умовах. Вченим вже вдалося відтворити людську шкіру з усіма її шарами, а також тривимірні моделі серця, печінки, хрящової тканини та кровоносних судин.

Наприклад, клітини серцевого м’яза можуть бути використані для вивчення фізіологічних процесів та дії препаратів для серця у контрольованих умовах. Більш того, всі шари рогівки людини можуть бути відтворені в пробірці, що надає унікальну можливість тестування крапель для очей.

Система, виготовлена із клітин печінки людини, підходить для тестування нових лікарських речовин. У порівняльному дослідженні протираковий засіб тестували паралельно у клінічному дослідженні на людях, щурах та системі клітин печінки людини. Результати експериментів на людях та на клітинах печінки збіглися.

Для вивчення дії різних речовин на організм можуть застосовуються культури, які відрізняються походженням в залежності від ступеня спеціалізації тканини (культури, що виділяються з дорослих тварин або ембріонів), від фізіологічного стану (нормальні або пухлинні тканини), органотипові культури (культури, які повторюють складне клітинне середовище тканини з якої походять).

Дослідження на культурах клітин різного походження в залежності від типу вихідної тканини, як-то культури клітин фібробластів (як компонент строми будь-якого органа), нервових клітин, гепатоцитів, клітин нирки, спленоцитів та клітин кісткового мозку, мають свої особливості.

Матки та яєчники культивуються органотиповим культивуванням, тому що виділення з них окремих клітин ускладнено.

Фібробласти – добре ростуть в культурі, також є дані, що ці клітини гарно виділяються з ембріонів миші та щура ферментативним методом та методом експлантів.

Нервові клітини та гепатоцити легко виділяють ферментативним шляхом у великій кількості. Кістковий мозок та спленоцити – виділяють механічним шляхом у суспензійній культурі.

Метод парного культивування клітин проводять через напівпроникну мембрану та шляхом культивування однієї культури в середовищі культивованому клітинами іншої.

В залежності від цілей експерименту клітини досліджують при звичайному культивуванні та в моделях патологічних станів (після впливу фізичних або хімічних факторів). Для оцінки стану клітинних культур застосовують імунологічні, генетичні, флюоресцентні методи. В літературних джерелах описано виявлення впливу екзогенних агентів на клітини шляхом дослідження адгезивних властивостей, конфлюентності моношару, морфології, проліферативної активності (подвоєння популяції), метаболічної активності (МТТ-тест, тест відновлення резазурину), міграції (скретч-тест), піноцитозу та життєздатності (тест поглинання нейтрального червоного), цілісності мембрани (забарвленням трипановим синім, етидій бромідом) та генотоксичності (метод мікронуклеосів) тощо.

Висновки. Культури клітин тварин, на яких проводять дослідження, є не просто заміною експериментів на тваринах, а й новаторськими системами, здатними зробити революцію у медицині та наукових дослідженнях. І, на відміну від традиційних експериментів, приносять значний прогрес.

ВИЗНАЧЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЧИСТОТИ ЛІКУВАЛЬНО-КОСМЕТИЧНОГО ЗАСОБУ З ЕКСТРАКТОМ ЧЕРЕДИ

Шафранович О.Ю.
Науковий керівник: Калюжная О.С.
Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
kalyuzhnayao.s@gmail.com

Вступ. Олія (екстракт) череди застосовується у складі лікувально-косметичних засобів у чистому вигляді та у складі сумішей з іншими оліями; як базова олія для створення

Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет

ГРАМОТА

нагороджується

Чаркова Анастасія

у секційному засіданні студентського наукового товариства кафедри біотехнології

IV Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю

YOUTH PHARMACY SCIENCE

6-7 грудня, 2023 р.,
м. Харків, Україна

Ректор НФаУ,
д. фарм. н., проф. Алла КОТВІЦЬКА

Ф А 2.2.1-32-366

Національний фармацевтичний університет

Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
Кафедра біотехнології
Ступінь вищої освіти другий магістерський
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Промислова біотехнологія

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувачка кафедри
біотехнології
Наталя ХОХЛЕНКОВА
_____
« 03 » жовтня 2023 року

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ

Анастасії ЧАРКОВІЙ

1. Тема кваліфікаційної роботи: «Дослідження дії хімічних речовин на клітинних культурах»,

керівник кваліфікаційної роботи: Наталія ДВІНСЬКИХ, к.фарм.н., с.н.с.
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ, науковий ступінь, вчене звання)

затверджений наказом НФаУ від «16» жовтня 2023 року № 229

2. Строк подання здобувачем вищої освіти кваліфікаційної роботи: 05.02.2024 р.

3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: об'єкт дослідження – клітинна культура фібробластів щура L929; мета – виявлення впливу речовини-токсиканту доксорубіцину на життєздатність та метаболічну активність живих тваринних клітин - фібробластів

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): вступ; огляд літератури; об'єкти і методи досліджень; експериментальна частина; висновки

6. Дата видачі завдання: «03» жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів кваліфікаційної роботи	Примітка
1	Формування напряму наукового дослідження, постановка проблеми	жовтень 2023	виконано
2	Аналітичний огляд літератури	жовтень 2023	виконано
3	Вибір об’єктів та методів дослідження	листопад 2023	виконано
4	Проведення досліджень	листопад 2023	виконано
6	Обробка результатів та оформлення кваліфікаційної роботи	грудень-січень 2024	виконано
8	Здача роботи до Екзаменаційної комісії	05 лютого 2024	виконано

Здобувач вищої освіти _____ Анастасія ЧАРКОВА
(підпис) (Ім’я, ПРІЗВИЩЕ)

Керівник кваліфікаційної роботи _____ Наталія ДВІНСЬКИХ
(підпис) (Ім’я, ПРІЗВИЩЕ)

ВИТЯГ З НАКАЗУ № 229
по Національному фармацевтичному університету
від 16 жовтня 2023 року

Про затвердження тем кваліфікаційних робіт

Затвердити теми кваліфікаційних робіт, керівників-консультантів та рецензентів здобувачам вищої освіти **2 курсу,** спеціальність – **162 Біотехнології та біоінженерія**, освітня програма – **Промислова біотехнологія**, ступінь вищої освіти – **магістр**, термін навчання – **1 р. 6 міс.**, **денна** форма здобуття освіти.

Прізвище, ім'я по батькові здобувача вищої освіти	**Тема кваліфікаційної роботи** (українською мовою)	**Тема кваліфікаційної роботи** (англійською мовою)	**Керівник кваліфікаційної роботи**	**Рецензент кваліфікаційної роботи**
Чаркова Анастасія Павлівна	Дослідження дії хімічних речовин на клітинних культурах	Study of the effect of chemicals on cell cultures	Доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології, к.фарм.н, с.н.с. Двінських Н.В.	Провідний науковий співробітник Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, к. мед. н., с.н.с. Прокопюк В.Ю.

В.о. ректора **Алла КОТВІЦЬКА**

Вірно:
Декан факультету фармацевтичних технологій та менеджменту **Наталія ЖИВОРА**

Ф А2.8-47-110

ВИСНОВОК

Комісії з академічної доброчесності про проведену експертизу

щодо академічного плагіату у кваліфікаційній роботі

здобувача вищої освіти

№ 126272 від « 2 » лютого 2024 р.

Проаналізувавши випускну кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти денної форми навчання Чаркової Анастасії Павлівни, 2 курсу, _____ групи, спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія, промислова фармація, на тему: «Дослідження дії хімічних речовин на клітинних культурах / Study of the effect of chemicals on cell cultures», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (компіляції).

Голова комісії,
професор **Інна ВЛАДИМИРОВА**

2%
18%

Ф А 2.2.1-32-353

ВІДГУК

наукового керівника на кваліфікаційну роботу магістерського ступеня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Анастасії ЧАРКОВОЇ

на тему: **«Дослідження дії хімічних речовин на клітинних культурах»**

Актуальність теми. Сьогодні культури клітин використовують для вирішення загальнобіологічних проблем, таких як вивчення процесів диференціювання та проліферації, взаємодії клітин з середовищем, адаптації, старіння, карценогенезу тощо. Однією з основних галузей застосування культур клітин – це використання їх в якості тест-об'єктів при дослідженні фармакологічних субстанцій. Простота використання та висока відтворюваність методу дозволяють стверджувати про відповідність досліджень в культурі клітин загальноприйнятим методам експерименту з тваринами. Тому дослідження впливу на тварині клітини певних хімічних речовин є актуальним для прогнозування їх впливу на клітини людини та весь організм в цілому.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. Виявлений експериментально вплив доксорубіцину на життєздатність та метаболічну активність живих тваринних клітин - фібробластів, в залежності від концентрації цієї токсичної речовини, дозволяє визначити граничні межі, які не надають цитотоксичний ефект на досліджувані клітини, що необхідно для розуміння механізмів ймовірних негативних побічних ефектів, для підвищення безпеки використання ліків, які небезпечні, але є препаратами вибору при терапії пухлинних захворювань.

Оцінка роботи. У роботі розглянуто теоретичні питання та обґрунтовано актуальність досліджень, виконані заплановані дослідження з виявлення впливу речовини-токсиканту доксорубіцину на життєздатність та метаболічну активність живих тваринних клітин - фібробластів, проведені необхідні розрахунки та порівняльний аналіз даних. Зроблено висновки та запропоновано напрямки використання отриманих результатів.

Загальний висновок та рекомендації про допуск до захисту. Дана кваліфікаційна робота містить всі необхідні розділи, виконана якісно, відповідно до вимог до кваліфікаційних робіт магістра та може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії, а її автор заслуговує присвоєння кваліфікації «магістр з біотехнологій та біоінженерії».

Науковий керівник _____ Наталія ДВІНСЬКИХ

(підпис) (Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

« 31 » січня 2024 р .

Ф А 2.2.1-32-356

РЕЦЕНЗІЯ

на кваліфікаційну роботу Анастасії ЧАРКОВОЇ
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)
на тему: **«Дослідження дії хімічних речовин на клітинних культурах».**

Актуальність теми. Сучасні культуральні методи дозволяють виявити механізм дії фармпрепаратів на клітини без перешкод з боку загальних регуляторних, дезинтоксикаційних систем організму, урахування виведення та метаболізму препаратів. На даному етапі розвитку науки методи клітинних технологій проводяться перед дослідженнями на тваринах, що дозволяє отримати більш достовірні дані та знизити кількість тварин з урахуванням міжнародних етичних принципів роботи з ними. Тому дослідження дії хімічних речовин, які є фармацевтичними субстанціями, на культурах клітин є доцільним та актуальним.
Теоретичний рівень роботи. У роботі на достатньому рівні проведено аналіз даних літератури щодо застосування тваринних клітинних культур, їх видів, особливостей роботи з ними. Обґрунтовано доцільність використання клітин як моделей для вивчення впливу токсикантів на їхні властивості та проведено ретельний аналіз результатів експериментальних досліджень.
Пропозиції автора з теми дослідження. В роботі запропоновано використання клітинної культури для визначення концентрацій доксорубіцину, які є критичними для фібробластів та надають цитотоксичну дію, що може бути використано для поглибленого розуміння механізмів токсичності цієї речовини, для визначення більш раціональних шляхів її застосування.
Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. Виявлений вплив доксорубіцину на життєздатність та метаболічну активність живих тваринних клітин, визначено порогову цитотоксичну концентрацію цієї речовини для фібробластів. Рівень проведення досліджень та застосовані методи є достатніми для того, щоб результати можна було вважати обґрунтованими.
Недоліки роботи. В роботі є деякі невдалі вирази, деякі розділи можна було викласти менш докладно.
Загальний висновок і оцінка роботи. Робота містить всі необхідні розділи, розрахунки та дослідження, виконана якісно, відповідно до вимог до кваліфікаційних робіт ступіня вищої освіти «магістр» та може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії НФаУ.

Рецензент,
Старший науковий співробітник
Інституту проблем кріобіології
і кріомедицини НАНУ,
к. мед. н., с.н.с..

Володимир ПРОКОПЧОК

«02» лютого 2024 р.

Особистий підпис
засвідчую:
Завідувач відділу кадрів

ВИТЯГ З ПРОТОКОЛУ № 8

«05» лютого 2024 року м. Харків

Засідання кафедри біотехнології

Голова: завідувачка кафедри, доктор фармацевтичних наук, професор Наталя ХОХЛЕНКОВА.

Секретар: асистент закладу вищої освіти Аліна СОЛОВЙОВА.

ПРИСУТНІ: завідувачка кафедри Наталя ХОХЛЕНКОВА, професор закладу вищої освіти Ольга ФІЛІПЦОВА, професор закладу вищої освіти Лідія КРИЧКОВСЬКА, доцент закладу вищої освіти Ольга КАЛЮЖНАЯ, доцент закладу вищої освіти Наталія ДВІНСЬКИХ, доцент закладу вищої освіти Ольга ШАПОВАЛОВА, асистент закладу вищої освіти Аліна СОЛОВЙОВА.

ПОРЯДОК ДЕННИЙ:

Про представлення до захисту до Екзаменаційної комісії випускних кваліфікаційних робіт.

І. СЛУХАЛИ:

Здобувача вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології і біоінженерія» ОП «Промислова біотехнологія» денної форми 2 курсу 1 групи Анастасію ЧАРКОВУ з доповіддю на тему «Дослідження дії хімічних речовин на клітинних культурах» (керівник доцент закладу вищої освіти Наталія ДВІНСЬКИХ).

УХВАЛИЛИ:

Рекомендувати до захисту кваліфікаційну роботу.

Голова
Завідувачка кафедри,
доктор фармацевтичних наук,
професор _____ Наталя ХОХЛЕНКОВА
(підпис)

Секретар
асистент закладу вищої освіти _____ Аліна СОЛОВЙОВА
(підпис)

Ф А2.2.1-32-042

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ПОДАННЯ
ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ
ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ

Направляється здобувач вищої освіти Анастасія ЧАРКОВА
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)
до захисту кваліфікаційної роботи
за галуззю знань 16 Хімічна та біоінженерія
спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньою програмою Промислова біотехнологія
на тему: «Дослідження дії хімічних речовин на клітинних культурах»

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ Наталія ЖИВОРА

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

Здобувач вищої освіти Анастасія ЧАРКОВА рекомендується до захисту в Екзаменаційній комісії з кваліфікаційною роботою на тему: «Дослідження дії хімічних речовин на клітинних культурах».

Керівник кваліфікаційної роботи _____ Наталія ДВІНСЬКИХ

«31» січня 2024 р.

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувач вищої освіти Анастасія ЧАРКОВА допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

Завідувачка кафедри біотехнології _____ Наталя ХОХЛЕНКОВА

«05» лютого 2024 року

Кваліфікаційну роботу захищено
у Екзаменаційній комісії
«12» лютого 2024 р.
З оцінкою _____
Голова Екзаменаційної комісії,
кандидат сільськогосподарських наук
_____ / Олена ЩЕРБАК /