

АНАТОМІЯ, НОРМАЛЬНА ТА ПАТОЛОГІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ, МОРФОЛОГІЯ

УДК 612.014:576.3:602.018.26.9

ЕКСПРЕСІЯ ЯДЕРНИХ БІЛКІВ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ З ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ СОБАКИ НА РІЗНИХ ПАСАЖАХ КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO

Л. В. Кладницька¹, к.вет.н., доцент
А. Й. Мазуркевич¹, д.вет.н., професор
Н. О. Безденєжних², к.біол.н., ст. наук. співр.
В.Ф.Чехун², д.мед.н., академік НАНУ
С. В. Величко³, к.вет.н.
М.О. Малюк¹, д.вет.н., професор
Т. В. Козицька⁴, к.біол.н.
В. В. Ковпак¹, к.вет.н., доцент
В. Б. Данілов¹, к.вет.н., доцент
Ю.О. Харкевич¹, к.вет.н., ст. викл.

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України

²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

³Лікарня ветеринарної медицини м.Києва, Голосіївський проспект, 105 б

⁴Київський Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

Досліджено експресію ядерних білків мезенхімальних стовбурових клітин з жирової тканини собаки за різних пасажів культивування. Мезенхімальні стовбурові клітини отримували з жирової тканини собаки методом культивування у CO₂ інкубаторі за температури 37° С, 5 % вмісту CO₂ у середовищі DMEM (Sigma) з додаванням 10-15 % ембріональної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma). Експресію ядерних білків стовбурових клітин з жирової тканини собаки отриманих культур IV та X-го пасажів досліджували імуноцитохімічним методом за допомогою моноклональних антитіл.

Встановлено, що жирова тканина собаки містить мультипотентні стовбурові клітини, які характеризуються експресією ядерних, характерних для проліферуючих клітин. Стовбурові клітини жирової тканини собаки IV-го пасажу характеризуються максимальними показниками рівня експресії PCNA – 274,7±9,1, Ki-67 – 299,3±0,77 балів, що засвідчує високий рівень клітинної проліферації та сигналізації. Рівень експресії вказаних білків залишається високим у культурі стовбурових клітин X-го пасажу, хоча і є достовірно нижчим від таких IV-го пасажу.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, собаки, жирова тканина, імуноцитохімічні дослідження, ядерні білки.

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями. Застосування стовбурових клітин у регенеративній медицині та лікуванні патологій набирає все більші оберти в тому числі у ветеринарній медицині, визначення біологічних особливостей стовбурових клітин, отриманих з різного первинного матеріалу, зокрема, кістковий мозок, жирова тканина, з огляду на імуногенні характеристики, має теоретичне і практичне значення. Однією з біологічних характеристик стовбурових клітин є експресія ядерних білків. Ядерний антиген проліферуючих клітин (PCNA) спочатку був охарактеризований як компонент, що відіграє роль у в реплікації і репарації ДНК. В останні кілька років стало очевидним, що PCNA взаємодіє з білками, які беруть участь в прогресії клітинного циклу, які не є частиною ДНК-полімерази [3, 5, 6].

Ядерний антиген Ki-67 вперше описаний Gerdes і співавторами в 1983 році, він складається з двох поліпептидних ланцюгів з молекулярною масою 345 і 395 кДа. Це основна частина

нуклеарного матриксу, протягом інтерфази асоційована з хромосомами фази мітозу. Ki-67-дімерна молекула, що має тісний зв'язок з 10-ю хромосомою, конкретна роль цього протеїну в процесі клітинного ділення досі точно не з'ясована. Експресія Ki-67 дозволяє виділити клітини, що знаходяться в активній фазі клітинного циклу (G1-, S-, G2- і M-фази) окрім G0 [2].

Мета досліджень. Дослідити експресію ядерних білків мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини собаки на різних пасажах культивування.

Матеріали і методи досліджень. Робота виконувалась на кафедрі фізіології, патофізіології та імунології Національного університету біоресурсів і природокористування України. Усі дослідження на тваринах були проведені з дотриманням закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та принципів «Міжнародної Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986). У стерильних умовах під час

планових операцій (оваріогістеректомія, ушивання грижі) у собак віком до 12-ти місяців відбирали 10-20 г жирової тканини. Зі зразків жирової тканини шляхом культивування у CO₂ інкубаторі отримували культуру стовбурових клітин [7]. Клітини отриманої культури IV та X-го пасажів висаджували на покривні скельця у чашках Петрі та культивували за стандартних умов у CO₂ інкубаторі за температури 37° С, 5 % вмісту CO₂ у середовищі DMEM (Sigma) з додаванням 10-15 % ембріональної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика. За 2-3 доби конfluентність моношару клітин на покривних скельцях сягала близько 70 %. Клітини на скельцях фіксували розчином метанолу з ацетоном у співвідношенні 1:1 впродовж 2-ох годин за температури -20° С, промивали фосфатнобуферним розчином, після чого інкубували 20 хв. з 1 % розчином бичачого сироваткового альбуміну (BCA). На зафіксовані клітини наносили моноклональні антитіла antiKi-67 RabbitPAb (RB-9043-PO) NeoMarkersFremont, PCNAAb-1 (MouseMAbMS-106-PO) NeoMarkersFremont, CA, та витримували 1 годину. Після цього застосовували систему візуалізації UltraVisionLPValueDetectionsystem, яка містить детекційні антитіла, кон'юговані з пероксидазою, активність якої виявляли за допомогою субстрату діамінобензидину (DAB, Thermo-Scientific). Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивали проточною водою та дофарбовували розчином гематоксилін-еозину (1-2 хвилини), після чого препарати заключали в Faramount Aqueous Mounting Medium. Аналіз результатів проводили за підрахунком клітин з експресією (коричневе забарвлення клітин)

за допомогою світлового мікроскопу та оцінювали за допомогою класичного методу H-Score: $S = 1 \times A + 2 \times B + 3 \times C$, де S – показник «H-Score», значення якого знаходяться у межах від 0 (білок не експресується) до 300 (сильна експресія у 100 % клітин); A - % слабо «зафарбованих» клітин, B - % помірно «зафарбованих» клітин, C - % сильно «зафарбованих» клітин [1, 8].

Статистичну обробку отриманих експериментальних результатів проводили за Н. А. Плохинським та з використанням пакету аналізу даних Microsoft Excel. Визначали середні арифметичні величини та їх похибки, встановлювали вірогідність різниці паралельних масивів даних. Для визначення взаємозв'язків пасажування та експресії маркерів відповідних білків проводили кореляційний аналіз та встановлювали вірогідність коефіцієнтів кореляції. Для встановлення ступеня впливу (η^2_x) пасажу на експресію маркерів відповідних білків та вірогідності такого впливу був проведений однофакторний дисперсійний аналіз. В усіх випадках різницю вважали достовірною при $p \leq 0,05$.

Результати власних досліджень. Первинний матеріал для культивування – жирову тканину отримували при проведенні планових оперативних втручань (ушивання грижі, оваріогістеректомія) у собак віком до 12-ти місяців. В процесі обробки та культивування первинного матеріалу було отримано культуру мультипотентних стовбурових клітин за різних пасажів. Для проведення імуноцитохімічного скринінгу було використано стовбурові клітини IV та X-го пасажів (рис. 1).

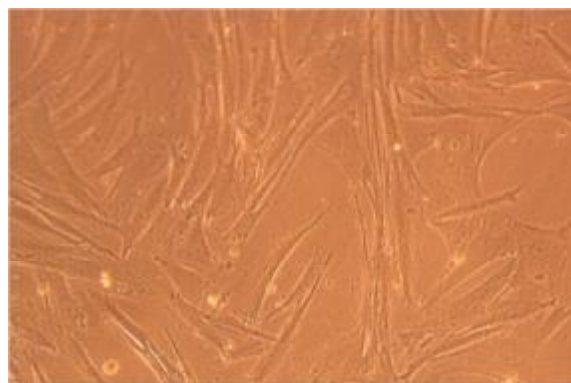


Рис. 1. Культура мультипотентних стовбурових клітин жирової тканини собаки IV та X-го пасажів, x 100

В ході імуноцитохімічних досліджень визначали рівень експресії ядерних і апоптоз-асоційованих білків мультипотентних стовбурових клітин жирової тканини собаки. Результати

досліджень засвідчують достовірні зміни рівня експресії білків при культивуванні стовбурових клітин за IV та X-го пасажів (табл. 1).

Таблиця 1

Експресія ядерних і цитоплазматичних білків мультипотентних стовбурових клітин жирової тканини собаки IV та X-го пасажів ($M \pm m$, n=3), у балах H-Score (від 0 до 300)

Антиген	Рівень експресії білків	
	IV пасаж	X пасаж
	Ядерні білки	
PCNA	274,7±9,1	208,3±10,6**
Ki-67	299,3±0,77	250,7±12*

Примітка * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (порівняно з рівнем експресії IV-го пасажа)

Слід відмітити, що за IV-го пасажу зафіксовано високий рівень експресії внутрішньоядерних. Нами було встановлено, що кількість PCNA-позитивних стовбурових клітин жирової тканини собаки на IV та X-мупасажах достовірно відрізнялась. Так, на десятому пасажі відбувалося достовірне зниження рівня експресії цього білку на 24 %. Це засвідчує зниження процесів активності

реплікації і репарації ДНК та прогресії клітинного циклу.

Експресія Ki-67, який характеризує проліферативний потенціал клітин, на четвертому пасажі була максимальною, тоді як на десятому пасажі позитивно реагуючих клітин щодо цього білку було достовірно менше на 17 %.

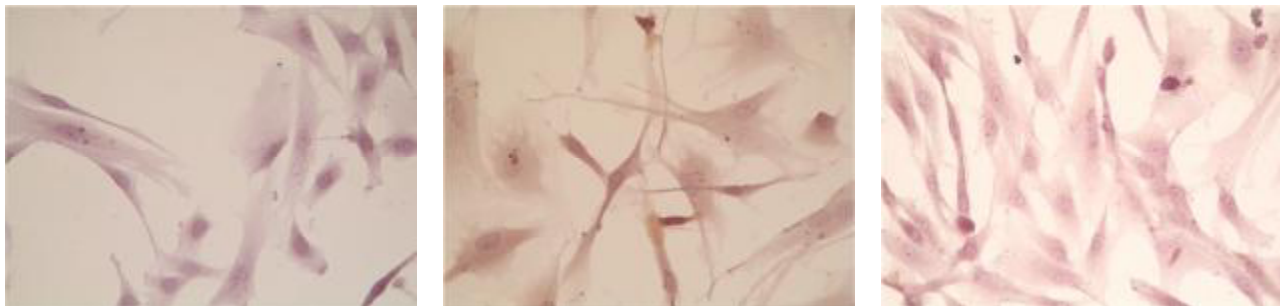


Рис. 2. Експресія PCNA, Ki-67 стовбуровими клітинами жирової тканини собаки: а – контроль, б – PCNA-позитивні клітини, в – Ki-67-позитивні клітини, х 400

Висновки. 1. Визначено, що жирова тканина собаки містить мультипотентні стовбурові клітини, які характеризуються експресією ядерних білків, характерних для проліферуючих клітин.

2. Ствобурові клітини жирової тканини собаки IV-го пасажу характеризуються максимальними показниками рівня експресії PCNA – 274,7±9,1 Ki-67 – 299,3±0,77 балів.

3. Рівень експресії ядерних білків залиша-

ється високим в культурі стовбурових клітин X-го пасажу, хоча і є достовірно нижчим від таких IV-го пасажу.

Перспективи подальших досліджень. З метою визначення зміни імуногенності стовбурових клітин культури за різних пасаживпланується у подальшому визначити імунофенотип клітин ще на більш пізніх пасажах культивування та за різних умов культивування.

Список використаної літератури:

1. Detre S. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas / S.Detre, G. Jotti, M.Dowsett // Clin Pathol. – 1995. - № 48. – P. 876-878.
2. Gerdes J. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67/ J.Gerdes, H.Lemke, H.Baisch, H.Wacker, U.Schwab // J Immunol. – 1984. – Vol. 133 (4). – P. 1710-1715.
3. Maga G. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners/ M.Giovanni, U. Hübscher // Journal of Cell Science. – 2003. – № 116. – P. 3051-3060. doi:10.1242/jcs.
4. Neupane M. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells./ M.Neupane, C. Chang, M. Kiupel, V. Yuzbasiyan-Gurkan / Tissue Eng Part A. – 2008. – № 14(6):1007. – P.15. doi: 10.1089/tea.2007.0207.
5. Pedley A.M./Flexibility of PCNA-protein interface accommodates differential binding partners / A.M. Pedley, M.A. Lill, V.J. Davisson // PLoS One. – 2014(Jul.18). – P. 9(7):.doi: 10.1371/journal.pone.0102481. eCollect ion 2014.
6. Zvi K. PCNA: structure, functions and interactions// Oncogene. – 1997. – № 14. – P. 629 – 640.
7. Патент України на корисну модель № 109148. Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин із жирової тканини собаки / Л.В. Кладницька, А.Й. Мазуркевич, С.В. Величко. Заявник і власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № у 201602329; заявл. 11.03.2016; опубл. 10.08.2016, бюл. № 15.
8. Франко Г.А. Иммуногистохимические методы: руководство / Г.А. Франко, П.Г. Мальков – М., 2011. – 224 с.

References:

1. Detre S. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas / S.Detre, G. Jotti, M.Dowsett //Clin Pathol. - 1995. - №48. – P. 876-878.
2. Gerdes J.Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67/ J.Gerdes, H.Lemke, H.Baisch, H.Wacker, U.Schwab // J Immunol. – 1984. – Vol. 133 (4). – P. 1710–1715.
3. Maga G. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners/ M.Giovanni, U.

Hübscher // Journal of Cell Science. – 2003. – № 116. – P. 3051-3060. doi:10.1242/jcs.

4. Neupane M. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells./ M. Neupane, C. Chang, M. Kiupel, V. Yuzbasiyan-Gurkan / Tissue Eng Part A. – 2008. – №14(6):1007. – P.15. doi: 10.1089/tea.2007.0207.

5. Pedley A.M./Flexibility of PCNA-protein interface accommodates differential binding partners/ A.M. Pedley, M.A. Lill, V.J. Davisson // PLoS One. – 2014(Jul.18). – P. 9(7): . doi: 10.1371/journal.pone.0102481. eCollection 2014.

6. Zvi K. PCNA: structure, functions and interactions// Oncogene. – 1997. – № 14. – P. 629 – 640.

7. Patent Ukrainy na korysnu model' #109148. Sposib otrymannja mezenchimal'nych stovburovych klityn iz žyrovoy tkanyny sobaky / L.V.Kladnytska, A.J. Mazurkevych, S.V.Velyčko.; zayavnyk i vlasnyk Nacional'nyj universytet bioresursiv i pryrodokorystuvannja Ukrainy. # u 201602329;zajavl. 11.03.2016; opubl. 10.08.2016, bjul.#15.

8. Franko G.A. Immunogistochicheskie metody: rukovodstvo / G.A. Franko, P.G.Malkov Иммуногистохимические методы: руководство / Г.А. Франко, П.Г. Мальков – М. – 2011. – 224 p.

Кладницкая Л.В., Мазуркевич А.И., Безденежных Н.А., Чехун В.Ф., Величко С.В., Малушок М.А., Козицкая Т.В., Ковпак В.В., Данилов В.Б., Харкевич Ю.О. Экспрессия ядерных белков мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани собаки на разных пассажах культивирования in vitro.

Определен уровень экспрессии ядерных и белков мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани собаки на разных пассажах культивирования. Мезенхимальные стволовые клетки получали из жировой ткани собаки методом культивирования в CO₂ инкубаторе при температуре 37° C, 5 % содержания CO₂ в среде DMEM (Sigma) с добавлением 10-15 % эмбриональной сыворотки бычков, 1 % антибиотика-антимикотика (Sigma). Иммунофенотип стволовых клеток жировой ткани полученных культур IV- и X-го пассажей исследовали иммуноцитохимическим методом с помощью моноклональных антител.

Установлено, что жировая ткань собаки содержит мультипотентные стволовые клетки, которые характеризуются экспрессией ядерных, цитоплазматических и мембранных белков, характерных для пролиферирующих клеток. Стволовые клетки жировой ткани собаки IV -го пассажа характеризуются максимальными показателями уровня экспрессии PCNA – 274,7±9,1, Ki-67 – 299,3±0,77, о чем свидетельствует соответствующий уровень пролиферации, клеточной сигнализации клеток культуры. Уровень экспрессии указанных белков остается высоким в культуре стволовых клеток X-го пассажа, хотя и является достоверно меньшим таких IV-го пассажа.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, собаки, жировая ткань, иммуноцитохимический анализ, ядерные белки.

Kladnytska L.V., Mazurkevich A.I., Bezdyenyehzhnyh N.O., Chehun V.F., Velychko S.V., Maluk M.O., Kozytska T.V., Kovpak V.V., Danilov V.B., Harkevich J.O. The nuclear proteins expression in dogs adipose-derived mesenchymal stem cells on different passage cultivation in vitro.

The level of expression nuclear proteins in dogs adipose-derived mesenchymal stem cells in various passages cultivation are shown in the article. Mesenchymal stem cells obtained from dogs adipose tissue by culturing in CO₂ incubator at a temperature 37° C, 5 % CO₂ in medium DMEM (Sigma) with the addition of 10-15 % fetal bovine serum, 1 % antibiotic-antimycotics (Sigma). Immunophenotype of dogs adipose-derived mesenchymal stem cells in various passages (IV and X-th passages) studied using monoclonal antibodies.

Established that dogs adipose tissue contain multipotent stem cells that are characterized by the expression nuclear proteins specific to proliferating cells. Dogs adipose-derived mesenchymal stem cells of IV-th passage characterized by a maximum performance level of expression of PCNA – 274,7±9,1, Ki-67 – 299,3±0,77, which confirms the high level of cell proliferation and signaling. The level of expression of these proteins remains high in the culture of stem cells X-th passage, although it is significantly lower than the IV-th passage. The results of variance analysis showed significant effect cell cultivation on immunophenotype of dogs adipose-derived stem cells.

Keywords: mesenchymal stem cells, dog, adipose tissue, immunocytochemistry, nuclear proteins.

Дата надходження до редакції: 13.03.2017 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Камбур М.Д.