



УДК 577. 125

Вміст жирних кислот в ліпідах фетальних стовбурових клітин kota

Л.В. Кладницька, А.Й. Мазуркевич, В.В. Данчук, С.В. Величко, С.В. Мідик
kladlarisa@yandex.ru

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

Визначено вміст жирних кислот в ліпідах стовбурових клітин kota, отриманих з фетального первинного матеріалу. Фетальні стовбурові клітини (ФСК) kota отримували шляхом культивування первинного матеріалу в CO₂ інкубаторі з вмістом 5% CO₂, за температури 37 °C у середовищі DMEM з додаванням 15 – 20% фетальної сироватки бичків та 1% антибіотика–антимікотика. Коли конфлюентність моношару сягала 70 – 80%, клітини знімали з культурального посуду та проводили субкультивування з метою зниження гетерогенності культури. Отримані стовбурові клітини досліджували на вміст жирних кислот методом газорідинної хроматографії.

Визначення вмісту ліпідів жирних кислот ФСК kota проводили згідно ДСТУ ISO 5508–2001. Підготовку проби проводили згідно ДСТУ 150 5509–2002 у нашій модифікації. Суміш метилових ефірів жирних кислот аналізували на газовому хроматографі Trace GC Ultra з полум'яно–іонізаційним детектором на капілярній колонці SPTM –2560, 100 m x0,25 mm ID, 0,20 μm film (Supelco). Ідентифікування жирних кислот проводили за допомогою стандартного зразка Supelco 37 Component FAME Mix. Кількісну оцінку спектру ЖК проводили методом нормування площин піків метильованих похідних ЖК і визначали їхній вміст у відсотках від сумарного вмісту усіх ЖК.

Досліджено, що в ліпідах ФСК kota містяться коротко-, середньо- та довголанцюгові жирні кислоти. У складі ліпідів фетальних стовбурових клітин kota виявлено 18 жирних кислот, з насичених – найбільше пальмітинової кислоти (34,53 ± 0,58%), з мононенасичених – олеїнової кислоти (20,20 ± 0,93%), з поліненасичених – лінолевої кислоти (6,27 ± 0,01%). Найменше у складі ліпідів клітин виявлено цис–8,11,14–ейкозатрієнової кислоти (0,03 ± 0,01%).

Сумарна кількість насичених жирних кислот у ліпідах ФСК kota становить 67,75, ненасичених жирних кислот – 32,25%. Коефіцієнт насиченості становить 2,10. Моноені жирні кислоти визначено у кількості 23,19%, а поліені – 9,06%. Індекс співвідношення поліненасичених жирних кислот n3 до n6 ФСК kota становить 0,35.

Ключові слова: фетальні стовбурові клітини, насичені та ненасичені жирні кислоти, ліпіди, kota.

Содержание жирных кислот в липидах фетальных стволовых клеток kota

Л.В. Кладницкая, А.И. Мазуркевич, В.В. Данчук, С.В. Вельчко, С. Мидык
kladlarisa@yandex.ru

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Оборони, 15, г. Киев, 03041, Украина

Определено содержание жирных кислот в липидах стволовых клеток kota, полученных из фетального первичного материала. Фетальные стволовые клетки (ФСК) kota получали путем культивирования первичного материала в CO₂ инкубаторе с содержанием 5% CO₂ при температуре 37 °C в среде DMEM с добавлением 15 – 20% фетальной сыворотки бычков и 1% антибиотика–антимикотика. Когда конфлюентность монослоя достигала 70 – 80%, клетки снимали с культуральной посуды и проводили субкультивированием с целью снижения гетерогенности культуры. Полученные стволовые клетки исследовали на содержание жирных кислот методом газожидкостной хроматографии.

Определение содержания липидов жирных кислот ФСК kota проводили согласно ГСТУ ISO 5508–2001. Подготовку проб проводили по ГОСТ 150 5509–2002 в нашей модификации. Смесь метиловых эфиров жирных кислот анализировали на газовом хроматографе Trace GC Ultra с пламенно–ионизационным детектором на капиллярной колонке SPTM –2560, 100 m

Citation:

Kladnitskaya L.V., Mazurkiewicz A.J., Danchuk V.V., Velichko S.V., Midyk S.V. (2016). Fatty acids in the lipids of cat fetal stem cells. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18, 3(70), 136–140.

x 0,25 mm ID, 0,20 μm film (Supelco). Идентификации жирных кислот проводили с помощью стандартного образца Supelco 37 Component FAME Mix. Количественную оценку спектра ЖК проводили методом нормирования плоскостей пиков метилированных производных ЖК и определяли их содержание в процентах от суммарного содержания всех ЖК.

Доказано, що в ліпідах ФСК kota содержится коротко-, средне- и длинноцепочечные жирные кислоты. В составе липидов фетальных стволовых клеток kota обнаружены 18 жирных кислот, из насыщенных – больше всего пальмитиновой кислоты (34,53 ± 0,58%), из мононенасыщенных – олеиновой кислоты (20,20 ± 0,93%), из полиненасыщенных – линолевой кислоты (6,27 ± 0,01%). Меньше в составе липидов клеток обнаружено цис-8,11,14-эйкозатриеновой кислоты (0,03 ± 0,01%).

Суммарное количество насыщенных жирных кислот в липидах ФСК kota составляет 67,75, ненасыщенных жирных кислот – 32,25%. Коэффициент насыщенности составляет 2,10. Моноеновые жирные кислоты определены в количестве 23,19%, а полиеновые – 9,06%. Индекс соотношения полиненасыщенных жирных кислот n3 к n6 ФСК kota составляет 0,35.

Ключевые слова: фетальные стволовые клетки, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, липиды, коты.

Fatty acids in the lipids of cat fetal stem cells

L.V. Kladnitskaya, A.J. Mazurkiewicz, V.V. Danchuk, S.V. Velichko, S.V. Midyk
kladlarisa@yandex.ru

*National university of life and environmental sciences of Ukraine,
Heroyiv Oborony Str., 11, Kyiv, 03041, Ukraine*

Defined content of fatty acids in lipids cat stem cells derived from fetal primary material. Fetal stem cells (FSCs) cat treated by culturing primary material in the CO₂ incubator containing 5% CO₂, at a temperature 37°C in DMEM medium with the addition of 15 – 20% fetal bulls serum and 1% antibiotic-antimycotic. When confluent monolayer reached 70 – 80%, the cells are removed from the culture dishes and held subcultivation to reduce the heterogeneity of culture. The resulting stem cells are tested for fatty acid content by gas-liquid chromatography.

Determination of fatty acids in lipids fetal stem cells conducted under SOST ISO 5508–2001. Sample preparation was performed according to ISO 150 5509–2002 in our modification. A mixture of methyl esters of fatty acids were analyzed on the gas chromatograph Trace GC Ultra with flame ionization detector for capillary column SPTM –2560, 100 m x 0.25 mm ID, 0.20 μm film (Supelco). Identification of fatty acids was performed using a standard sample Supelco 37 Component FAME Mix. Performed quantitative assessment by spectrum of crystal planes valuation peaks methylated derivatives LCD and determine their content as a percentage of the total content of all the LCD.

Investigated that the lipids contained cat FSCs short-, medium- and long-chain fatty acids. In the lipid fetal stem cells found cat 18 Number fatty acids from saturated – most of palmitate (34.53 ± 0.58%), with monounsaturated – oleate (20.20 ± 0.93%), with polyunsaturated – linoleic acid (6.27 ± 0.01%). Least composed of lipids of cells found cis-8.11.14-eykozatriyenovoyi acid (0.03 ± 0.01%).

The total content of saturated fatty acids in the lipid cat FSCs is 67.75, unsaturated fatty acids – 32.25%. Saturation ratio is 2.10. Monoyenic fatty acids identified in the number of 23.19%, and polyenic – 9,06%. The index value n3 fatty acids to n6 in lipids cat FSCs is 0.35.

Key words: fetal stem cells, saturated and unsaturated fatty acids, lipids, cats.

Вступ

Здатність стовбурових клітин коректувати та відновлювати структуру і функції клітин, систем і органів сьогодні не викликає сумніву. Успішне застосування стовбурових клітин з терапевтичною метою залежить від багатьох факторів, зокрема від властивостей біологічного матеріалу, таких як проліферативна активність, виживаність, цілеспрямована диференціація, імуногенність. Дотепер остаточно не з'ясовані біологічні характеристики стовбурових клітин отриманих шляхом культивування *in vitro* з різного первинного матеріалу – кісткового мозку, жирової тканини, ембріональної тканини, плода різних термінів гестації. Сучасні дослідження засвідчують, що стовбурові клітини різного походження мають неоднакову проліферативну активність, енергетичний обмін, цитокіновий спектр, і як наслідок різну імуногенність, що призводить до кардинальних змін в імунній системі організму реципієнта. Отже, розробка стратегій для вирішення вказаних питань має сприяти кращому розумінню біології стовбурових клітин. Одним з ас-

пектів цієї біології, є дослідження енергетичного обміну, що має значення у проліферації клітин та їх важливих біологічних характеристик. (Vander Heiden et al., 2001; Chung et al., 2007, 2010; Rushdia and David, 2012). Було визначено, що високий рівень гліколізу, навіть у аеробних умовах, позитивно корелює з високою виживаністю і проліферацією клітин раку. Деякі автори наголошують, що ембріональні стовбурові клітини і клітини ембріональної карциноми хоча й не ідентичні, але мають аналогічні рівні метаболітів, особливо тих, які беруть участь у гліколізі, та стверджують що високий рівень гліколізу і низький окиснювальний метаболізм у стовбурових клітинах важливий для виживання і проліферації клітини (Abu Dawud et al., 2012; Sarah et al., 2012).

Відомі дані, що обробка клітин раку за допомогою дихлорацетату, препарату, який активує піруватдегідрогеназу шляхом інгібування активності кінази піруватдегідрогенази, не тільки підвищує окиснення глюкози, але також знижує гліколіз, зменшує проліферацію і посилює апоптоз (Kang et al., 2014). Значення насичених (НЖК), мононенасичених (МНЖК) та

поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) для функціонування клітин, їх мембран та цілісного організму відомо давно і переоцінити його важко. У сучасній літературі є дані про жирнокислотний склад тканин щура, зокрема головного мозку, печінки, серця, скелетних м'язів, еритроцитів, плазми крові, жирової тканини, мітохондрій та його залежність від балансу насичених та n3, n6 ненасичених жирних кислот у раціоні.

Визначено вплив жирних кислот і їх метаболітів на проліферативну активність та диференціацію стовбурових клітин, і доведено, що підвищення вмісту ненасичених жирних кислот та їх метаболітів у середовищі культивування призводить до підвищення коефіцієнту проліферації та процесу диференціації стовбурових клітин різних типів (Fillmore et al., 2015).

Поряд з цим є результати дослідження впливу насичених жирних кислот у культуральному середовищі на життєздатність та апоптоз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку людини. З'ясовано, що пальмітинова кислота знижує проліферацію та індукує апоптоз МСК кісткового мозку людини, а також спричинює цитотоксичний стрес кардіальних міоцитів. Ці результати дають можливість припустити, що насичені жирні кислоти знижують життєздатність МСК кісткового мозку в природних умовах, тобто *in vivo* (Lu et al., 2012). Незамінні жирні кислоти і їх метаболіти можуть чинити свою біологічну дію через кілька механізмів. ПНЖК можуть бути легко включені в мембранні фосфоліпіди, змінюючи хімічні та фізичні властивості клітинних мембран і, таким чином, модулювати активність асоційованих з мембранами функціональних білків, таких, як іонні канали та рецептори. Простагландин E(2), утворений з арахідонової кислоти, може зв'язуватись з рецепторами, що забезпечують активацію шляхів, які індукують ріст клітин і проліферацію. Важливим є дані, що ейкозаноїди і ліпідні медіатори можуть служити в якості лігандів або коактиваторами для ряду ключових транскрипційних факторів, таких як активатора проліферації пероксисом рецепторів і ядерних білків. Активація цих факторів транскрипції чинить глибокий вплив на проліферацію і диференціювання клітин. ПНЖК можуть також впливати на структуру ліпідів в клітинній мембрані, а потім модифікувати клітинні процеси, такі як рецептор–опосередковану сигнальну трансдукцію. Ліпідні рафти клітинної мембрани відіграють важливу роль у регуляції стовбурових клітин до самооновлення, клітинного циклу, виживання та індукції апоптозу (Iwahashi et al., 2000). Модифікація ліпідного складу клітин впливає на інтенсивність обмінних процесів і є тим компенсаторним механізмом, що забезпечує функціональні можливості мембран за змінених умов.

З огляду на вище викладене актуальність цього питання не викликає сумніву. Метою нашої роботи було дослідження вмісту жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин kota, отриманих шляхом культивування первинного матеріалу з плода kota.

Матеріал і методи досліджень

Експерименти проводили відповідно до вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою». У дослідженнях було використано стовбурові клітини, отримані з плода kota. Культивування первинного матеріалу з плода kota проводили за стандартних умов у CO₂ інкубаторі з вмістом 5% CO₂, за температури 37 °C у середовищі DMEM з додаванням 15 – 20 % фетальної сироватки бичків та 1% антибіотика–антимікотика (Kladnuc'ka et al., 2016). Оцінку процесу проліферації клітин здійснювали візуально за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Carl Zeiss).

Визначення жирнокислотного спектру проводили згідно ДСТУ ISO 5508–2001. Пробопідготовку проводили згідно ДСТУ 150 5509–2002 у нашій модифікації (DSTU ISO 5508–2001; DSTU 150 5509–2002; Sinjak et al., 1976). Суміш метилових ефірів жирних кислот аналізували на газовому хроматографі Trace GC Ultra з полум'яно–іонізаційним детектором на капілярній колонці *SPTM–2560, 100 m x0,25 mm ID, 0,20 μm film (Supelco)*. Ідентифікування жирних кислот проводили за допомогою стандартного зразка Supelco 37 Component FAME Mix. Кількісну оцінку спектру ЖК проводили методом нормування площин піків метильованих похідних ЖК і визначали їхній вміст у відсотках від сумарного вмісту усіх ЖК.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці показників оцінювали за t–критерієм Стьюдента. Відмінності між показниками, що порівнювались, вважали вірогідними за рівня значимості P < 0,05.

Результати та їх обговорення

За 10 – 12 днів культивування первинного матеріалу з плода kota (рис.1) було зареєстровано 70 – 90% конфлюентності культурального пластика (рис. 2).

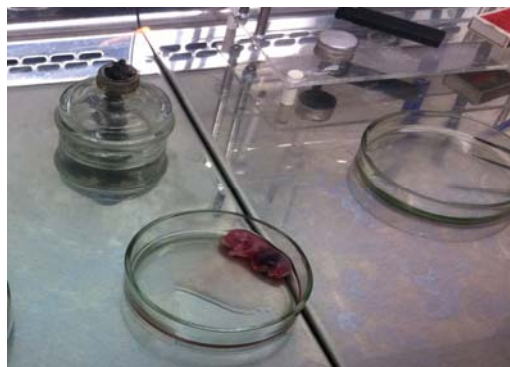


Рис.1. Первинний матеріал для отримання фетальних стовбурових клітин (плід kota)

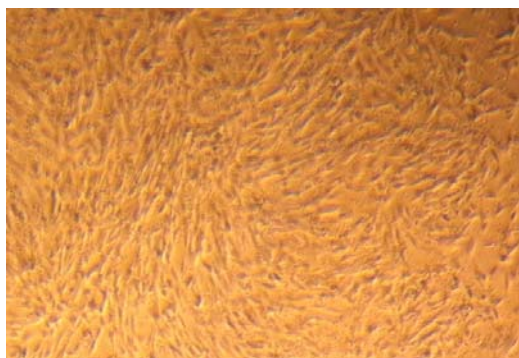


Рис.2. Моношар фетальних клітин kota

Культуру клітин знімали дна культурального посуду за допомогою розчину трипсину з етилендіамінтетраоцтової кислоти та пасажували декілька разів з метою зниження гетерогенності культури. Підготовлені стовбурові клітини досліджували на вміст жирних кислот.

На хроматографі виходу піків ліпідів фетальних стовбурових клітин kota виявлено коротко-, середньо- та довголанцюгові ЖК.

Насичені жирні кислоти (НЖК) екстрактів ліпідів мезенхімальних стовбурових клітин kota представлені в діапазоні від C6:0 до C18:0 (табл. 1). Їх концентрація у екстракті зростала в ряді: C8:0 < C15:0 < C6:0 < C10:0 < C12:0 < C14:0 < C18:0 < C16:0. Цікаво відзна-

чити наявність в біологічному матеріалі пентадеканової кислоти, вона відноситься до жирних кислот з непарною кількістю атомів Карбону в ланцюгу. Значення C15:0 для організму мало розкриті, хоча її визначають у різних біологічних об'єктах, в тому числі і у молоці корів.

Серед НЖК у кількісному відношенні переважає пальмітинова кислота, яка в середньому становить 34,53% від суми всіх жирних кислот. Стеаринова і міристинова кислоти становлять відповідно 13,45 та 9,88%. Четверте місце за кількістю серед насичених жирних кислот займає лауринова кислота 3,07%. Відомо, що вона, на відміну від попередніх, знижує концентрацію холестерину в крові, та володіє тромбогенними властивостями.

Концентрація моноєнових жирних кислот у екстрактах мезенхімальних стовбурових клітин kota зростала в ряді: C20:1 < C16:1n9c < C18:1n9c. При чому, вміст олеїнової кислоти складав $23,15 \pm 0,05\%$ від загальної кількості виявлених кислот, а цис-11-ейкозенової – $0,99 \pm 0,01\%$.

Процентний вміст поліненасичених жирних кислот у екстрактах мезенхімальних стовбурових клітин kota підвищувався в ряді: C20:3n6 < C20:2n6 < C20:4n6 < C22:6n3 < C22:5n3 < C20:3n3 < C18:2n6c. Серед полієнових ННЖК переважає лінолева (8,51%), найнижчий вміст спостерігався у цис-8,11,14-ейкозатрієнової кислоти (0,01%).

Таблиця 1

Показники вмісту жирних кислот у ліпідах фетальних стовбурових клітин kota, % (n=3, M±m)

Найменування показників	Масова частка жирної кислоти,
масляна кислота (C6:0)	1,87± 0,05
капронова кислота(C8:0)	1,21± 0,05
капринова кислота (C10:0)	2,28± 0,08
лауринова кислота (C12:0)	3,07± 0,08
міристинова кислота (C14:0)	9,88± 0,06
пентадеканова кислота (C15:0)	1,51± 0,01
пальмітинова кислота (C16:0)	34,53± 0,58
пальмітолеїнова кислота (C16:1n9c)	2,04± 0,04
стеаринова кислота (C18:0)	13,45± 0,06
олеїнова кислота (C18:1n9c)	20,20± 0,93
лінолева кислота (C18:2n6c)	6,27± 0,01
цис-11-ейкозенова кислота (C20:1)	0,95± 0,05
цис-11,14-ейкозадієнова кислота (C20:2n6)	0,05± 0,01
цис-8,11,14-ейкозатрієнова кислота (C20:3n6)	0,03± 0,01
цис-11,14,17-ейкозатрієнова кислота (C20:3n3)	0,55± 0,03
цис-13,16-докозадієнова кислота (C22:2n6)	0,52± 0,00
цис-7,10,13,16,19-докозапентаєнова кислота (C22:5n3)	1,07± 0,06
цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаєнова кислота (C22:6n3)	0,58± 0,01
масляна кислота (C6:0)	1,87± 0,05
∑ НЖК, %	67,75
∑ ННЖК, %	32,25
∑ Моноєнові ННЖК, %	23,19
∑ Полієнові ННЖК, %	9,06
НЖК/ННЖК	2,10
ω3/ω6	0,35

Сумарний рівень НЖК вищий такого ННЖК, коефіцієнт насиченості становить 2,10. Загальна кількість НЖК у досліджуваних зразках становила 67,75, тоді як ННЖК – 32,25%. Моноеннові жирні кислоти визначено у кількості 23,19, а полієнові – 9,41%.

Слід відмітити, що транс-ізомери жирних кислот у ФСК kota відсутні. Наявність у харчових продуктах транс-ізомерів ненасичених жирних кислот давно пов'язують із негативним впливом на організм. Доведено, що транс-жирні кислоти суттєво підвищують імовірність виникнення серцево-судинних захворювань. Серед омега-6 кислот у досліджених зразках переважала лінолева кислота, середній вміст якої становив $6,27 \pm 0,01\%$; виявлено також ейкозодієнову, ейкозотрієнову та докозагексаєнову кислоти.

Серед омега-3 кислот виявлено цис-11,14,17-ейкозатрієнову, цис-7,10,13,16,19-докозапентаєнову та цис-4,7,10,13,16,19-докозагесаєнову кислоту. Серед омега-6 кислот встановлено в аналітичних зразках наявність лінолевої, цис-11,14-ейкозадієнної, цис-8, 11,14-ейкозатрієнної та арахідонової кислоти. Індекс співвідношення поліненасичених жирних кислот n3 до n6 становить 0,35.

Висновки

1. У складі ліпідів фетальних стовбурових клітин kota виявлено 18-ть жирних кислот, з насичених – найбільше пальмітинової кислоти ($34,53 \pm 0,58\%$), з мононенасичених – олеїнової кислоти ($20,20 \pm 0,93\%$), з поліненасичених – лінолевої кислоти ($6,27 \pm 0,01\%$). Найменше у складі ліпідів клітин виявлено цис-8,11,14-ейкозатрієнної кислоти ($0,03 \pm 0,01\%$).

2. Сумарна кількість насичених жирних кислот у ФСК kota становила 67,75, ненасичених жирних кислот – 32,25%. Моноеннові жирні кислоти визначено у кількості 23,19%, а полієнові – 9,06%. Індекс співвідношення поліненасичених жирних кислот n3 до n6 ФСК kota становить 0,35.

У подальших наших дослідженнях ми плануємо визначити цитокіновий спектр фетальних стовбурових клітин на різних пасажах культивування.

Бібліографічні посилання

Rushdia, Z.Y, David, T.S. (2012). Fate through Fat: Lipid Metabolism Determines Stem Cell Division Outcome Cell Metab. 16(4), 411–413.
 Chung, S., Arrell, D.K., Faustino, R.S., Terzic, A., Dzeja, P.P. (2010). Glycolytic network restructuring integral

to the energetics of embryonic stem cell cardiac differentiation. J Mol Cell Cardiol. 48, 725–734.
 Chung, S., Dzeja, P.P., Faustino, R.S., Perez–Terzic, C., Behfar, A., Terzic, A. (2007). Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 4, 1, 60–67.
 Vander Heiden, M.G., Plas, D.R., Rathmell, J.C., Fox, C.J., Harris, M.H., Thompson, C.B. (2001). Growth Factors Can Influence Cell Growth and Survival through Effects on Glucose Metabolism. Molecular and Cellular Biology. 21, 5899–5912.
 Abu Dawud, R., Schreiber, K., Schomburg, D., Adjaye, J. (2012). Human embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells have overlapping and distinct metabolic signatures. PLoS One. 7, 39896.
 Sarah, K., Abbott, Paul L., Taleitha, A., Atkins, A.J. (2012). Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Biomembranes. 1818, 5, 1309–1317.
 Kang, J.X., Wan, J.B., He, C. (2014). Concise review: Regulation of stem cell proliferation and differentiation by essential fatty acids and their metabolites. Stem Cells. 32(5):1092–8.
 Fillmore, N., Huqi, A., Jaswal, J.S., Mori, J., Paulin, R., Haromy, A., Onay–Besikci, A., Ionescu, L., Thébaud, B., Michelakis, E., Lopaschuk, G.D. (2015). Effect of fatty acids on human bone marrow mesenchymal stem cell energy metabolism and survival. 13; 10(3).
 Lu, J., Wang, Q., Huang, L., Dong, H., Lin, L., Lin, N. et al. (2012). Palmitate causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human mesenchymal stem cells: prevention by AMPK activator. Endocrinology. 153, 5275–5284.
 Iwahashi, H., Takeshita, A., Hanazawa, S. (2000). Prostaglandin E2 stimulates AP–1–mediated CD14 expression in mouse macrophages via cyclic AMP–dependent protein kinase A. J. Immunol. 164, 5403–5408.
 Kladnyc'ka, L.V., Mazurkevych, A.J., Velychko, S.V., Zhygunova, O.V. (2016). Otrymannja kul'tury stovburovyh klityn iz zhyrovoi' tkanyny sobaky. Visnyk sums'kogo nacional'nogo agaramogo universytetu. Serija "Veterynarna medycyna". 6 (38), 19–24. (in Ukrainian).
 Sinjak, K.M., Orgel', M.Ja., Kruk, V.I. (1976). Metod prigotovlenija lipidov krovi dlja gazohromatograficheskogo issledovanija. Lab. delo. 1, 37–41 (in Russian).

Стаття надійшла до редакції 15.09.2016