

the activity level of antioxidant protection in animals of all types of HNA. Animals severe types of HNA enzyme activity in erythrocytes within 5 days after exposure to stressors returns to normal and the animals weak type HNA likely not change. Animals severe types of HNA, regardless of the physiological state, glutathione link antioxidant defense system balanced. Action stressors contributes index glutathione balance of antioxidant protection in pigs HNA weak type, indicating the imbalance of antioxidant protection. So, swine weak type HNA set to low-level activity glutathione antioxidant, indicating that the low adaptive capacity and stress animals.

Key words: glutathione peroxidase, glutathione reductase, higher nervous activity, pigs, stress.

УДК 612.014: 576.3:602.018.26.9

РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ ЯДЕРНОГО БІЛКА Кі-67 МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ З ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ СОБАКИ ЗА РІЗНИХ ПАСАЖІВ КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO

Кладницька Л. В., к. вет. н., доцент,

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

Анотація. Визначено рівень експресії ядерного білка Кі-67 стовбуровими клітинами з жирової тканини собаки за різних і пізніх пасажів культивування, що характеризується високими показниками маркера проліферації – $299,3 \pm 0,77$ та $250,7 \pm 12^*$ балів відповідно. Швидкість формування моношару зі збільшенням кількості пасажів знижується, що засвідчує достовірне зниження рівня експресії у культурі клітин Кі 67 на 17%. Встановлено достовірні обернені кореляційні зв'язки кількості пасажів культури стовбурових клітин з жирової тканини з експресією маркерів проліферації $r = -0,78^*$ ($p < 0,05$). Досліджено достовірний вплив процесу культивування культури стовбурових клітин з жирової тканини собаки *in vitro* на їх проліферативну активність – $r^2 = 0,83^*$.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, собаки, жирова тканина, проліферативна активність, Кі 67.

Актуальність проблеми. Відомо, що стовбурові і ракові клітини не підпадають під ефект Хейфліка, за яким кількість поділів соматичних клітин обмежена. У процесі культивування відбувається вплив на культуру клітин різних факторів, зокрема, хімічних реагентів за пасажування та культивування, перебування клітин поза межами організму, часу, тобто кількості мітотичних циклів. Ядерний білок Кі-67 експресується на стадіях клітинного циклу в G1, S, G2 і M-фазах, окрім G0, і використовується в якості маркера клітинної проліферації [4, 6].

Отже, дослідження антигену Кі-67 на різних етапах культивування стовбурових клітин дасть можливість охарактеризувати біологічні особливості культури за різних пасажів культивування.

Завдання дослідження. Дослідити проліферативну активність мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини собаки на різних пасажах культивування.

Матеріал і методи дослідження. 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 (оваріогістероектомія, 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 [1, 2, 5]. Процес формування моношару клітин здійснювали візуально за допомогою мікроскопа Axiovert 40.

Для дослідження експресії маркера проліферації Кі 67 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°C, 5 % вмісту CO₂ у середовищі DMEM (Sigma) з додаванням 10-

15% ембріональної сироватки бичків, 1 % антибіотика-антимікотика. Коли конфлюєнтність моношару 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°C , промивали фосфатнобуферним розчином, після чого інкубували 20 хв. з 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну (BSA). На зафіксовані клітини наносили моноклональні антитіла anti Ki-67 (RB-9043-PO) Neo Markers Fremont та витримували 1 годину. Після цього застосовували систему візуалізації Ultra Vision LPValue Detection system, 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: $S=1xA+2xB+3xC$, де S – показник «H-Score», значення якого знаходяться у межах від 0 (білок не експресується) до 300 (сильна експресія у 100% клітин); A- % слабо «зафарбованих» клітин, B - % помірно «зафарбованих» клітин, C - % сильно «зафарбованих» клітин [3].

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 проліферації 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 дослідження. Первинний матеріал для культивування – жирову тканину отримували при проведенні планових оперативних втручань (ушивання грижі, овариоектомія) у собак віком до 12-ти місяців. В процесі обробки та культивування первинного матеріалу було отримано культуру мезенхімальних стовбурових клітин за різних пасажів культивування. При дослідженні моношару культури стовбурових клітин ранніх і пізніх пасажів було зареєстровано більш швидке його формування за IV-го пасажу (рис.1). Клітини на ранніх і пізніх пасажах мали морфологію фібробластів.

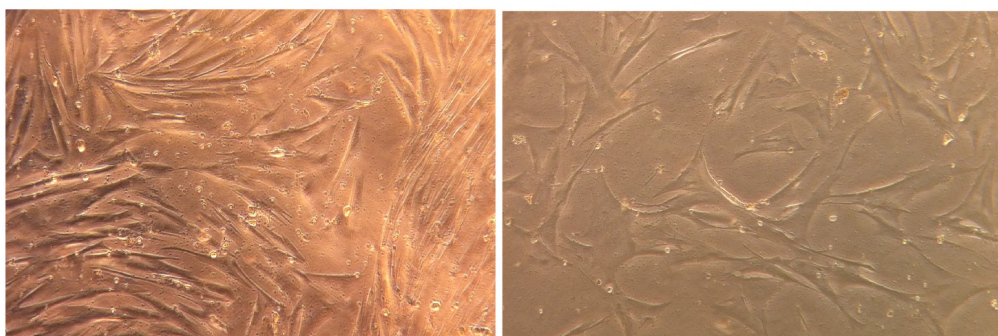


Рис. 1. Проліферативна активність культури мультипотентних стовбурових клітин жирової тканини собаки IV та X-го пасажів, x 100

Для визначення активності процесу проліферації стовбурових клітин з жирової тканини IV та X-го пасажів дослідили експресію маркера проліферації Ki 67. Результати досліджень засвідчують достовірні зміни рівня експресії Ki-67 при культивуванні стовбурових клітин за IV та X-го пасажів (табл.1).

Таблиця 1

Експресія маркера проліферації мультипотентними стовбуровими клітинами жирової тканини собаки IV та X-го пасажів, ($M \pm m$, n=3), у балах H-Score (від 0 до 300)

Антиген	Рівень експресії маркера проліферації Ki-67	
	IV пасаж	X пасаж
	Ядерні білки	
Ki-67	299,3±0,77	250,7±12*

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

Слід відмітити, що за IV- та X-го пасажів зафіксовано високий рівень експресії Ki 67. Але на десятому пасажі процес проліферації клітин достовірно знизився, що засвідчує зниження рівня експресії Ki 67 на 17 %. Це засвідчує зниження процесів активності реплікації і репарації ДНК та прогресії клітинного циклу (рис.2).

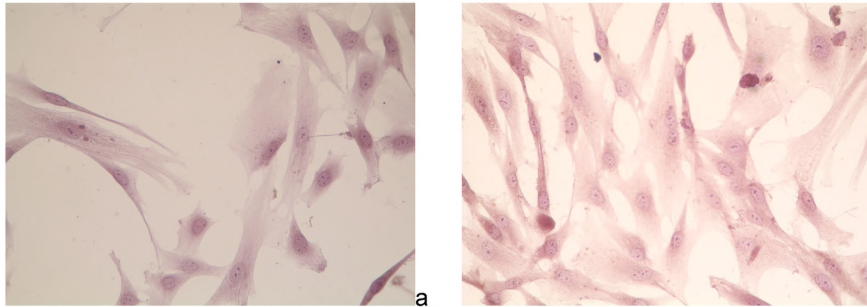


Рис. 2. Експресія проліферативного маркера Ki-67 стовбуровими клітинами жирової тканини собаки: а – контроль, б –Ki-67-позитивні клітини, х 400

В ході досліджень встановлено достовірні обернені кореляційні зв'язки кількості пасажів культури стовбурових клітин із експресією маркерів проліферації $r = -0,78^*$ ($p < 0,05$). Для дослідження причинно-наслідкової залежності було проведено дисперсійний аналіз рівня експресії проліферативного маркера стовбурових клітин за різних пасажів культивування. Було визначено, що $\eta^2=0,83^*$, що характеризує достовірний вплив процесу культивування культури стовбурових клітин з жирової тканини собаки *in vitro* на проліферативну активність. На нашу думку такі зміни проліферації клітин при культивуванні пов'язані з багаторазовим впливом на них хімічних та фізичних факторів та біологічними віковими змінами самих клітин.

Висновки

1. Досліджено високий рівень проліферації стовбурових клітин з жирової тканини собаки за ранніх і пізніх пасажів культивування, що характеризується високими показниками маркера проліферації – $299,3 \pm 0,77$ та $250,7 \pm 12^*$ балів відповідно.
2. Швидкість формування моношару зі збільшенням кількості пасажів знижується, що засвідчує достовірне зниження рівня експресії Ki 67 на 17% у культурі клітин та візуальне дослідження культури.
3. Встановлено достовірні обернені кореляційні зв'язки кількості пасажів культури стовбурових клітин з жирової тканини з експресією маркерів проліферації $r = -0,78^*$ ($p < 0,05$).
4. Визначено достовірний вплив процесу культивування культури стовбурових клітин з жирової тканини собаки *in vitro* на їх проліферативну активність – $\eta^2=0,83^*$.

Література

1. Кладницька Л. В. Отримання культури стовбурових клітин із жирової тканини собаки/ Л. В.Кладницька, А. Й. Мазуркевич, В. С. Величко, О. В. Жигунова/ Вісник Сумського національного аграрного університету. – Серія "Ветеринарна медицина". - Випуск 6 (38. – 2016. – С.19-24.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Yerushalmi R. Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential/ R Yerushalmi., R.Woods, P.Ravdin // Lancet Oncol. 2010. Vol. 11 (2). P. 174–183.

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ЯДЕРНОГО БЕЛКА Ki-67 МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ СОБАКИ ПРИ РАЗНЫХ ПАССАЖАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO

Кладницкая Л.В.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

Аннотация. Исследован уровень экспрессии ядерного белка Ki-67 стволовыми клетками из жировой ткани собаки на ранних и поздних пассажах культивирования. Мезенхимальные стволовые клетки получали из жировой ткани собаки по стандартной методике. Клетки полученной культуры IV- и X-го пассажей культивирования исследовали иммуноцитохимическим методом на наличие Ki-67 позитивных клеток.

Установлен уровень ядерного белка Ki-67 в стволовых клетках из жировой ткани собаки IV- и X-го пассажей культивирования, которая характеризуется высокими показателями маркера пролиферации Ki 67 – $299,3 \pm 0,77$ и $250,7 \pm 12^*$ баллов соответственно. Определены достоверные обратные корреляционные связи количества пассажей культуры стволовых клеток из жировой ткани с экспрессией маркера пролиферации $r = -0,78^*$ ($p < 0,05$). Установлено достоверное влияние процесса культивирования культуры стволовых клеток из жировой ткани собаки in vitro на их пролиферативную активность – $\eta^2 = 0,83^*$.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, собаки, жировая ткань, пролиферативная активность, Ki-67.

THE LEVEL OF EXPRESSION OF NUCLEAR PROTEIN Ki-67 IN DOGS ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMALE STEM CELLS ON DIFFERENT PASSAGE CULTIVATION IN VITRO

Kladnytska L.V.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, str. Heroev Oborony, 15, Kiev, 03041, Ukraine

Summary. The level of expression of nuclear protein Ki-67 by adipose-derived mesenchymal stem cells of the dog during early and late cultivation passages was presented in article.

Cells cultivation. The mesenchymal stem cells were obtained from the adipose tissue of the dog. The Petri dishes (d = 35, 60 mm) with adipose tissue were cultured in CO₂ incubator (5% CO₂ and 37.0°C) by standard procedure. The culture media contained 80% of Dulbecco's modified Eagle's medium and 20% of foetal bovine serum with 10 µl/mL of antibiotic-antimycotic solution. The culture medium was replaced every 72 h. When monolayer confluency reached about 80%–90%, the cells were transferred to a suspension using 0.05% trypsin-EDTA solution and reseeded in a ratio of 1 to 3. The cell suspension obtained was filtered through four layers of sterile gauze cloth, centrifuged, resuspended in culture media, and reseeded in Petri dishes in a ratio of 1 to 3. The microscopic examination of cell culture quality and proliferation was conducted every day with inverted microscope Axiovert 40 (Carl Zeiss, Germany).

Immunophenotypic analysis. The cells of IVth and Xth passages were seeded on cover glasses and grew for 48–72 h. After the monolayer reached about 50%–70% confluency, the cells were fixed in fixing solution (methanol + acetone, 1:1) for 2 h at -20°C, washed several times with PBS, incubated with a 1% solution of bovine serum albumin (BSA) for 20 min, and treated with monoclonal antibodies against: anti Ki-67 (RB-9043-PO) Neo Markers Fremont for 30–60 min in accordance with the instructions for monoclonal antibody application. For visualisation of reactions the Ultra Vision LP Value Detection system (ThermoScientific), which contain detecting antibody, conjugated with peroxidase, was used. Enzyme activity was detected by using of diaminobenzidine (ThermoScientific) as a substrate. After conducting an immunocytochemical reaction, the preparations were washed with water and stained with Mayer haematoxylin (Sigma) for 1–2 min, and placed in Faramount Aqueous Mounting Medium. The results were analysed by counting the number of positively stained cells (brown staining) and evaluated by the classical H-Score method.

The high proliferative activity of adipose-derived mesenchymal stem cells of the dog in early and late cultivation passages is established, which is characterized by high marker of proliferation Ki 67 values – 299.3 ± 0.77 and $250.7 \pm 12^*$ scores, respectively. The rate of formation of a monolayer with an increase in the number of passages decreases, which is indicated by a significant decrease in the culture level of the expression level of Ki 67 by 17%. Reliable inverse correlations between the number of passages of the culture of stem cells from adipose tissue and the expression of the proliferation marker $r = -0.78^*$ ($p < 0.05$) were determined. The significant influence of the process of culturing the adipose-derived mesenchymal stem cells of the dog in vitro on their proliferative activity – $\eta^2 = 0.83^*$ was investigated.

Key words: mesenchymal stem cells, dogs, adipose tissue, proliferative activity, Ki-67.