

УДК 612.014:576.3:602.018.26.9

ЭКСПРЕССИЯ АПОПТОЗ-АССОЦИИРОВАННОГО БЕЛКА BCL-2 МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ СОБАКИ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO**Патафеев В.А., **Кладницкая Л.В., **Мазуркевич А.Й., **Безденежных Н.А.,
**Чехун В.Ф., **Величко С.В., **Козицкая Т.В., **Данилов В.Б., **Харкевич Ю.О.*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь»

**Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев, Украина

Исследован уровень экспрессии апоптоз-ассоциированного белка Bcl-2 мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани собаки на разных пассажах культивирования in vitro. Установлено, что жировая ткань собаки содержит мультипотентные стволовые клетки, которые характеризуются экспрессией антиапоптотического ядерного белка Bcl-2. Уровень экспрессии Bcl-2 клетками жировой ткани собаки II пассажа характеризуется высоким показателем – 103,67±6,78 балла. Экспрессия Bcl-2 стволовыми клетками XII пассажа достоверно снижается до 66,67±5,03 баллов, но все же удерживается на высоких показателях, что обуславливает незначительный уровень апоптоза клеток культуры. Установлена обратная корреляционная зависимость между процессом культивирования, то есть количеством пассажей и экспрессией антиапоптотического белка Bcl-2, показатель которой составляет $r=-0,94$, $p\leq 0,001$. Также подтверждена высокая сила влияния процесса культивирования на содержание белка Bcl-2 мезенхимальными стволовыми клетками культуры из жировой ткани собаки – $\eta^2x=0,85$; $p\leq 0,01$. **Ключевые слова:** апоптоз-ассоциированный белок, стволовые клетки, жировая ткань, ядерный белок, апоптоз.*

THE APOPTOSIS-ASSOCIATED PROTEIN BCL-2 EXPRESSION BY DOG ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS IN CULTIVATION *IN VITRO**Patafeev V.A., **Kladnitska L.V., **Mazurkevich A.Y., **Bezdeneznych O.N.,
**Chehun V.F., **Velychko S.V., **Karpovskiy V.I., **Kozytska T.V., **Danilov V.B., **Kharkevich Y.A.

*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

**National university of life and environmental sciences of Ukraine, Kiev, Ukraina

*The level of expression of apoptosis-associated protein Bcl-2 by dog adipose-derived mesenchymal stem cells was studied at different passages of in vitro culture. It was found that the fatty tissue of the dog contains multipotent stem cells, which are characterized by the expression of the anti-apoptotic nuclear protein Bcl-2. The level of expression of Bcl-2 cells of adipose tissue in the dog of the II passage is characterized by a high index – 103.67±6.78 points. Expression of Bcl-2 in stem cells of the XII passage significantly decreases to 66.67±5.03 * points, but it is still retained at high rates, which causes an insignificant level of apoptosis of the culture cells. An inverse correlation was established between the cultivation process, that is, the number of passages and the expression of the anti-apoptotic Bcl-2 protein, the index of which is $r=-0.94$, $p\leq 0.001$. A high effect of the cultivation process on the protein content of Bcl-2 by dog adipose-derived mesenchymal stem cells was also confirmed – $\eta^2x=0.85$; $p\leq 0.01$. **Keywords:** apoptosis-associated protein, stem cells, adipose tissue, nuclear protein, apoptosis.*

Введение. Ветеринария зародилась в глубокой древности в недрах медицины, ведь веками больных животных и людей лечили одни и те же целители. И лишь немногим более 200 лет назад она окончательно обособилась от медицины, превратившись в самостоятельную науку, при этом оставшись навсегда «сестрой медицины». Для успешного развития ветеринарной медицины необходимо использовать все резервы и возможности [11]. Эффективная работа с животными невозможна без совершенствования ветеринарного обслуживания, для чего необходимо использовать современные лечебно-профилактические мероприятия [12]. От ветеринарных специалистов требуется гибкое и оперативное управление всеми звеньями ветеринарии, изменение отношения специалистов к профессиональным обязанностям, существенное повышение отдачи их труда, действенность ветеринарного контроля, усиление интеграции науки с производством. Исходя из этого, каждый ветеринарный специалист обязан тщательно анализировать свою работу и постоянно улучшать и совершенствовать ее. Повышение качества проводимых ветеринарных мероприятий возможно лишь при хорошей осведомленности специалистов об успехах отечественной и зарубежной науки.

Поскольку применение стволовых клеток в регенеративной медицине и лечении патологий набирает все большие обороты, определение биологических особенностей стволовых клеток, полученных из различного первичного материала, в частности костного мозга, жировой ткани, имеет теоретическое и практическое значение. Одной из биологических характеристик стволовых клеток является экспрессия поверхностных, цитоплазматических и ядерных белков, исследование которых на разных сроках культивирования может охарактеризовать клеточную культуру [6].

Известно, что процесс культивирования оказывает существенное влияние на биологические характеристики клеточной культуры. При этом апоптоз клеток в культуре, который характеризуется уровнем экспрессии ядерного белка Bcl-2, играет важную роль. Роль белков семейства BCL-2 в клеточном апоптозе и онкогенезе широко изучалась [4, 5]. Различные члены семейства белков BCL-2 имеют про- и антиапоптотические функции, причем их основной функцией является регуляция проницаемости мембраны митохондрий [2, 3]. Белок Bcl-2 задерживает клеточный апоптоз, подавляя высвобождение из митохондрий апоптоз-

индуцирующего фактора и цитохрома-С. BCL-2 непосредственно ингибирует приток адениновых нуклеотидов через наружную митохондриальную мембрану. Это уменьшает гидролиз АТФ и ингибирует выделение цитохрома-С. Также следует отметить, что BCL-2 поддерживает клетки в фазе G0 в отсутствие факторов роста, что является мощным онкогенным механизмом для опухолевых клеток. Проведены некоторые исследования по определению экспрессии белков стволовыми клетками из костного мозга [7], пупочного канатика [8].

Однако данные об экспрессии апоптоз-ассоциированного белка мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани собаки в литературных данных освещены недостаточно.

Цель работы – изучить уровень экспрессии апоптоз-ассоциированного белка Bcl-2 стволовыми клетками из жировой ткани собаки на разных пассажах при культивировании *in vitro*.

Материалы и методы исследований. Исследования проведены на кафедре физиологии, патофизиологии и иммунологии животных Национального университета биоресурсов и природопользования Украины. Все исследования на животных были проведены с соблюдением закона Украины «О защите животных от жестокого обращения» (от 21.02.2006 г.) и принципов «Международной Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых с экспериментальной и другой научной целью» (Страсбург, 1986).

Во время плановых операций (овариогистерэктомия, ушивание грыжи) у собак в возрасте до 12 месяцев отбирали 10-20 г жировой ткани. Из первичного материала путем культивирования в CO₂ инкубаторе при температуре 37°C, 5% содержании CO₂ в среде DMEM (Sigma) с добавлением 10-15% эмбриональной сыворотки бычков, 1% антибиотика-антимикотика получали культуру стволовых клеток [6, 9]. Клетки полученной культуры II и XII пассажей высаживали на покровные стекла в чашках Петри, культивировали при стандартных условиях в CO₂ инкубаторе. За 2-3-е суток конfluenceность монослоя клеток на покровных стеклах достигала около 70%. Клетки на стеклах фиксировали раствором метанола с ацетоном в соотношении 1:1 в течение двух часов при температуре -20°C, промывали фосфатнобуферным раствором, после чего инкубировали 20 мин. с 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА). На зафиксированные клетки наносили моноклональные антитела anti: bcl-2 alfa Ab-1 (clone 100/D5) (REF-MS-123-PO), Neo Markers Fremont, CA, и выдерживали 1 час. После этого применяли систему визуализации Ultra Vision LP Value Detection system, которая содержит детекционные антитела, конъюгированные с пероксидазой, активность которой выявляли с помощью субстрата диаминобензидина (DAB, Thermo-Scientific). После проведения иммуноцитохимической реакции препараты промывали проточной водой и докрашивали раствором гематоксилин-эозина (1-2 минуты), после чего препараты заключали в Faramount Aqueous Mounting Medium. Анализ результатов проводили по подсчету клеток с экспрессией (коричневую окраску клеток) с помощью светового микроскопа и оценивали с помощью классического метода H-Score: $S=1xA+2xB+3xC$, где S - показатель «H-Score», значения которого находятся в пределах от 0 (белок не экспрессируется) до 300 (сильная экспрессия в 100% клеток), A - % слабо окрашенных клеток, B - % умеренно окрашенных клеток, C - % сильно окрашенных клеток [1, 10].

Результаты исследований обрабатывали согласно общепринятым методам статистики с помощью программы Microsoft Excel с использованием t- критерия Стьюдента.

Результаты исследований. Первичный материал для культивирования – жировую ткань - получали при проведении плановых оперативных вмешательств (ушивание грыжи, овариогистерэктомия) у собак в возрасте до 12 месяцев. В процессе первичной обработки и культивирования первичного материала была получена культура мультипотентных стволовых клеток различных пассажей. Для проведения иммуноцитохимического скрининга были использованы стволовые клетки IV и X пассажей, которые имели фибробластоподобную морфологию (рисунок 1).

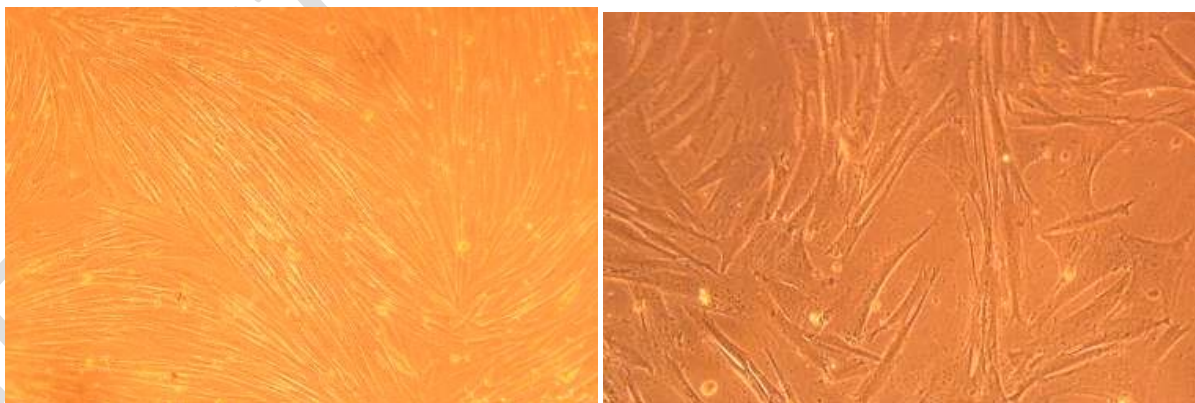


Рисунок 1 - Культура мультипотентных стволовых клеток из жировой ткани собаки II и XII пассажей, x 100

В ходе иммуноцитохимических исследований определяли уровень экспрессии апоптоз-ассоциированного ядерного белка мультипотентных стволовых клеток из жировой ткани собаки. Результаты исследований свидетельствуют о достоверных изменениях уровня экспрессии при культивировании стволовых клеток на IV и X пассажах (таблица 1).

Таблица 1 – Экспрессия апоптоз-ассоциированного ядерного белка мультипотентными стволовыми клетками жировой ткани собаки II и XII пассажей, ($M \pm m$, $n=3$), в баллах H-Score (от 0 до 300)

Антиген	Уровень экспрессии	
	II пассаж	XII пассаж
Bcl-2	103,67±6,78	66,67±5,03*

Примечание. * $p < 0,05$ – в сравнении с уровнем экспрессии Bcl-2 клетками II пассажа.

Антиапоптотический белок Bcl-2 экспрессируется в значительном количестве стволовыми клетками на втором пассаже культивирования и составляет 103,67±6,78 балла, что свидетельствует о низком уровне запрограммированной гибели клеток (рисунок 2)

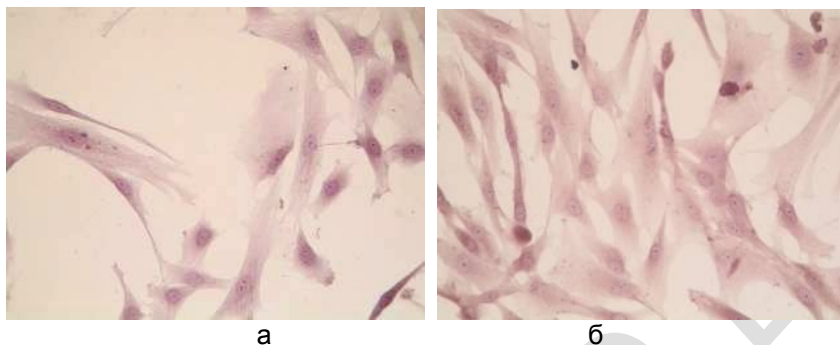


Рисунок 2 - Экспрессия апоптоз-ассоциированного белка Bcl-2 мультипотентными стволовыми клетками жировой ткани собаки: а – контроль, б – Bcl-2 - положительные клетки, х 400

В процессе культивирования показатель уровня экспрессии Bcl-2 достоверно снижается до 66,67±5,03* баллов, но все же удерживается на высоких значениях. Таким образом, можно сделать вывод о высокой пролиферативной активности и низком уровне апоптоза клеток культуры XII пассажа. Установлена обратная корреляционная зависимость между процессом культивирования и экспрессией антиапоптотического белка Bcl-2, показатель которой составляет $r = -0,94$, $p \leq 0,001$.

Также подтверждена высокая сила влияния процесса культивирования на содержание белка Bcl-2 мезенхимальными стволовыми клетками культуры – $\eta^2 \chi = 0,85$; $p \leq 0,01$.

Заключение. Таким образом, установлено, что жировая ткань собаки содержит мультипотентные стволовые клетки, которые характеризуются экспрессией антиапоптотического ядерного белка Bcl-2. Уровень экспрессии Bcl-2 клетками жировой ткани собаки II пассажа характеризуется высоким показателем – 103,67±6,78 балла. Экспрессия Bcl-2 в стволовых клетках XII пассажа достоверно снижается до 66,67±5,03* баллов, но все же удерживается на высоких показателях, что обуславливает незначительный уровень апоптоза клеток культуры. Установлена обратная корреляционная зависимость между процессом культивирования и экспрессией антиапоптотического белка Bcl-2, показатель которой составляет $r = -0,94$, $p \leq 0,001$. Также подтверждена высокая сила влияния процесса культивирования на содержание белка Bcl-2 мезенхимальными стволовыми клетками культуры из жировой ткани собаки – $\eta^2 \chi = 0,85$; $p \leq 0,01$.

Литература. 1. Detre, S. A. "Quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas / S. A. Detre, G. Jotti, M. Dowsett // *Clin Pathol.* - 1995. - № 48. - P. 876-878. 2. Foight, G. W. Locating herpesvirus Bcl-2 homologs in the specificity landscape of anti-apoptotic Bcl-2 proteins / G. W. Foight, A. E. Keating // *J. Mol. Biol.* - 2015. - № 427(15). - P. 2468-2490. 3. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell / D. S. McClintock [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* - 2002. - Vol. 22(1). - P. 94-104. 4. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells / M. Neupane [et al.] // *Tissue Eng Part A.* - 2008. - №14 (6). - P. 1007. 5. Tsujimoto, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? / Y. Tsujimoto // *Genes Cells.* - 1998. - Vol. 3(11). - P. 697-707. 6. Отримання культури стовбурових клітин із жирової тканини собаки / Л. В. Кладницька [та інш.] // *Вісник Сумського Нац. аграрн. унів. Серія "Ветеринарна медицина"*. - 2016. - № 6 (38). - С. 19-24. 7. Імунофенотипова характеристика та цитогенетичний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку коня на ранніх пасажах культивування *in vitro* / А. Й. Мазуркевич [і др.] // *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва»*. - 2014. - Вип. 201, Ч. 1. - С. 100-108. 8. Мезенхімальні стовбурові клітини пупкового канатика лоша на ранніх пасажах культивування *in vitro* / А. Й. Мазуркевич [і др.] // *Тваринництво України*. - 2014. - № 12. - С. 43-47. 9. Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин із жирової тканини собаки : пат. №109148 України на корисну модель. / 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*. 10. Франко, Г. А. Иммуногистохимические методы : руководство / Г. А. Франко, П. Г. Мальков. - М., 2011. - 224 с. 11. Ятусевич, И. А. Эффективность некоторых препаратов при чесотках плотоядных и кроликов / И. А. Ятусевич, Ю. А. Столярова, Л. И. Рубина // *Ученые записки Учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»*. - 2008. - Т. 44, вып. 1. - С. 48-51. 12. Столярова, Ю. А. Эффективность акарибила и акаригела при гиподерматозе крупного рогатого скота / Ю. А. Столярова // *Ученые записки Учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»*. - 2013. - Т. 49, вып. 1, часть 1. - С. 71-72.

Статья передана в печать 29.03.2018 г.