

rats effect of the  $\beta_3$ -adrenoceptor agonist SR58611A / V. Vasina [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2012. – N.167. – P. 1137-1147. 16. Wenting Li *Mest attenuates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway* / Li Wenting [et al.] // *Gut and Liver*. – 2014. – Vol. 8, N.3. – P. 282-291. 17. Zhang J.J. *Development of a new animal model of liver cirrhosis in swine* / J.J. Zhang [et al.] // *EurSung Res*. – 2009. – Vol. 42, N.1. – P. 35-9.

Статья передана в печать 16.04.2015 г.

УДК 602.9:611.018.46:636.1:612.017

## ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЛОШАДИ НА РАННИХ ПАССАЖАХ INVITRO

\*Малюк Н.А., \*\*Безденежных Н.А., \*\*Адаменко И.Н.

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

\*\*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев, Украина

*Проведенные иммуноцитохимические исследования подтверждают, что мезенхимальные стволовые клетки костного мозга лошади во время культивирования invitro на втором пассаже являются гетерогенными. Они экспрессируют маркеры мезенхимальных, эпителиальных и гемопоэтических клеток, тогда как на пятом пассаже культура клеток является иммунофенотипически гомогенной фракцией и экспрессирует маркеры мезенхимального происхождения.*

*Immunocytochemical studies confirm that mesenchymal stem cells of horse bone marrow during cultivation invitro at the second passage are heterogeneous, they express markers of mesenchymal, epithelial and hematopoietic cells, whereas at the fifth passage cell culture becomes immunophenotypic homogeneous, that express markers of mesenchymal origin.*

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, моноклональные антитела, иммуноцитохимический анализ, E-кадгерин, N-кадгерин, актин, виментин.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, monoclonal antibodies, immunocytochemical analysis, E-cadherin, N-cadherin, actin, vimentin.

**Введение.** Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) находят все более широкое применение в разных областях биологии, гуманной и ветеринарной медицины благодаря их высокой способности дифференцироваться в разные типы клеток и низкой иммуногенности. Известно, что МСК присутствуют во многих органах и тканях взрослого организма: костном мозге (КМ), коже, жировой и мышечной ткани. Тем не менее, в качестве “золотого стандарта” при изучении биологических свойств данного типа клеток является костный мозг.

Анализ фенотипа в последние годы широко используется для идентификации и выделения разных клеточных популяций. Этот метод основан на выявлении специфических мембранных молекул с помощью моноклональных антител. В данный момент учеными описано много мембранных антигенов, которые характеризуют соответственные стадии дифференцировки клеток в том или другом направлении. Выявление экспрессии этих поверхностных маркеров является очень перспективным и продуктивным подходом в исследовании стволовых и прогениторных клеток.

О принадлежности клеток к этой категории надо оценивать исходя из наличия нескольких поверхностных антигенов, потому что обнаружить один универсальный маркер, который позволяет четко идентифицировать популяцию МСК, не возможно. МСК человека, например, после экспансии должны быть позитивными на CD105, CD73, CD90. Одновременно МСК не должны экспрессировать CD45, CD14, CD11b, CD79a и CD11[5].

Вышеописанный профиль экспрессии поверхностных молекул представляет лишь минимальные критерии к антигенному фенотипу МСК. На их поверхности присутствуют и много других антигенных маркеров, таких как CD49c, CD51, CD54, CD59, CD 71 и CD166.

Возможно, в дальнейшем на поверхности МСК будут обнаружены и другие специфические молекулы, которые будут пригодны для использования в качестве антигенных маркеров, что приведет к уточнению данного критерия [6, 7, 8].

Детальная характеристика антигенного профиля усложняется теми обстоятельствами, что набор экспрессирующих молекул не одинаков у разных клонов МСК и меняется в процессе культивирования, даже если эти клоны сходны морфологически своими потенциями.

Следует знать, что при иммунофенотипическом анализе МСК лабораторных животных, их CD-рецепторный аппарат отличается от рекомендованного для клеток человека, а протоколов исследований по изучению иммуноферментного профиля лошадей на разных пассажах культивирования в доступных литературных источниках не обнаружено.

Таким образом, изучение иммунофенотипического профиля мультипотентных стволовых клеток лошадей имеет как теоретическое, так и практическое значение. При этом, изучение CD рецепторов мезенхимальных стволовых клеток костного мозга лошадей во время культивирования *in vitro* на ранних пассажах является актуальным заданием для характеристики клеточной культуры.

**Цель исследования** – изучить экспрессию ядерных и цитоплазматических специфических белков мезенхимальных стволовых клеток костного мозга лошадей на разных пассажах с помощью иммуноцитохимического анализа.

**Материал и методы исследований.** Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) выделяли из костного мозга (КМ) лошади. Выделенную клеточную массу культивировали в стандартной среде: DMEM – 80 %, сыворотка эмбрионов телят – 20 % (“Sigma”, США) с добавлением 10 мкл/см<sup>3</sup> среды антибиотика-антимикотика. Культивирование проводили в СО<sub>2</sub>-инкубаторе при t 37 °С и 5 % концентрации СО<sub>2</sub>. При этом МСК оседали, прикреплялись ко дну чашек Петри и распластывались. Суспензионную культуру кроветворных клеток удаляли, после чего продолжали культивировать клетки с адгезивными свойствами. С целью получения суспензии клеток использовали 0,5% раствор трипсина и 0,2% ЕДТА [1, 2]. Микроскопический анализ культуры проводили с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Для проведения иммуноцитохимического анализа исследуемые клетки выращивали на покровных стеклах 48 – 72 часа (при условии 50 – 70 % монослоя). Фиксировали клетки в растворе метанола и ацетона в соотношении 1:1 в течение 2 часов при t -20 °С, после чего инкубировали их с 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA). Для выявления специфических маркеров наносили на фиксированные клетки МКАт (anti: PCNA (clone PC-10, NeoMarkers), Ki-67 (clone RB-9043-PO, Neomarkers), CD44 (clone 156-3C11, DiagnosticBioSystems), PanMuscleActin (clone 1a45C5, DiagnosticBioSystems), E-cadherin (clone SPM 471, ThermoScientific), N-cadherin (clone CD325, ThermoScientific), виментин (V9, DiagnosticBioSystems), CD24 (SN3b, NeoMarkers) на 30–60 минут (согласно инструкции производителя). После этого использовали систему визуализации PolyVue (ThermoScientific), конъюгированную с пероксидазой, выявляли активность фермента с использованием в качестве субстрата диаминобензидин (ThermoScientific). После проведения иммуноцитохимической реакции препараты промывали водой и докрашивали HematoxylinSolution according to Mayer (Sigma) (15–30 с), после чего их заключали в FaramountAqueousMountingMedium. Анализ результатов проводили по количеству «положительных» клеток с экспрессией (коричневый цвет) и оценивали с использованием классического метода H-Score: S=1xA+ 2xB + 3xC, где S – показатель «H-Score», значение которого находится в пределах от 0 (белок не экспрессируется) до 300 (сильная экспрессия в 100 % клеток); А – процент слабо «окрашенных» клеток; В – процент умеренно «окрашенных» клеток; С – процент сильно «окрашенных» клеток.

**Результаты исследований.** Во время культивирования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга коня было установлено, что на II пассаже клетки были морфологически гетерогенные, между доминирующими веретенообразных клеток встречались клетки кубической и овальной формы, тогда как на V пассаже культивированные клетки приобретали гомогенную веретенообразную морфологию.

Проведенные иммуноцитохимические исследования CD-рецепторного аппарата стволовых клеток костного мозга лошади на ранних пассажах свидетельствуют, что набор специфических белков существенно отличается у разных клонов культивирующих клеток и меняется в процессе культивирования.

**Таблица 1 - Иммунофенотипический профиль мезенхимальных стволовых клеток костного мозга лошади на ранних пассажах (M±m, n=3)**

Исследуемый антиген	Пассаж клеток из костного мозга лошади <i>invitro</i>	
	II	V
	Оценка в баллах по методу H-Score (от 0 до 300)	
	Ядерные белки (связанные с пролиферацией и клеточным циклом)	
PCNA	0	242±22
Ki-67	142±11	0
Белки клеточной адгезии и цитоскелета		
Виментин	229±21	274±11*
Актин	128±11	221±27**
Е-кадгерин	138±12	0
Н-кадгерин	109±18	0
CD24	94±6	0
CD44	46±9	0

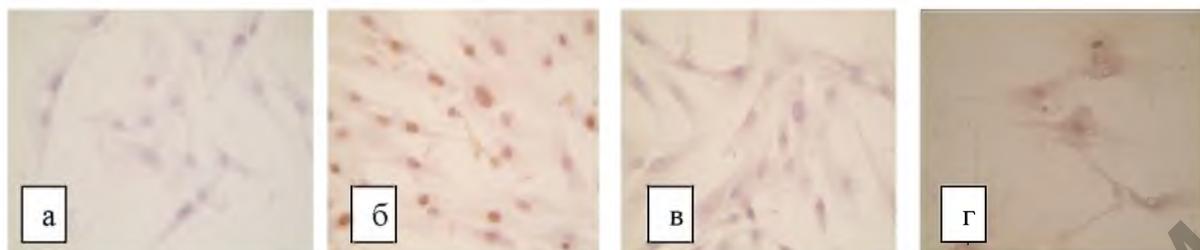
Примечание: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Данные относительно иммунофенотипического профиля мезенхимальных СК костного мозга лошади на втором и пятом пассаже приведены в таблице 1 и рисунках 1- 4.

Во время проведения иммунофенотипической характеристики мезенхимальных стволовых клеток костного мозга коня, особое внимание уделяли ядерным белкам, которые связаны с пролиферацией и клеточным циклом.

С помощью иммуноцитохимического анализа нами было установлено, что количество PCNA-положительных (proliferativecellnuclearantigen) клеток лошади на II и V пассажах существенно отличалось (таблица 1, рисунок 1). Так, на втором пассаже PCNA-положительных клеток не выявлено, тогда как на пятом пассаже происходило увеличение уровня экспрессии этого белка до 242 баллов. Следует отметить, что экспрессия еще одного белка, который характеризует пролиферативный потенциал клеток – Ki-67 на втором

пассаже была умеренная и составляла 142 балла, тогда как на пятом пассаже положительных клеток относительно этого белка не выявлено.



**Рисунок 1 –Иммунофенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток костного мозга лошади: а – контроль, б – PCNA-положительные клетки; в – Ki-67-отрицательные клетки (V пас.); г – Ki-67-положительные клетки (II пас.), x 400**

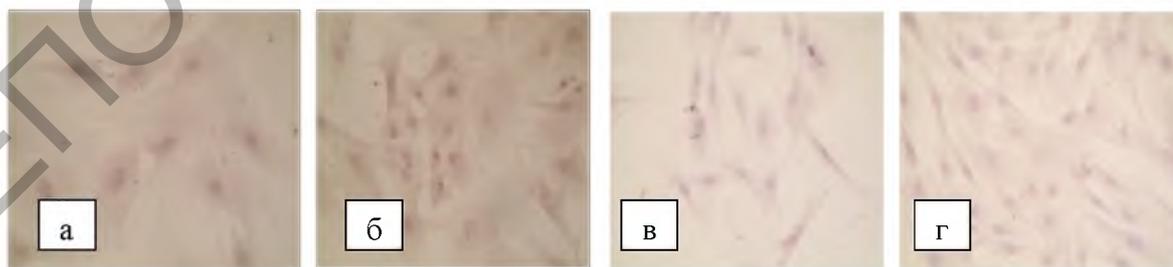
Вероятно, костный мозг лошадей содержит несколько клонов мезенхимальных стволовых клеток, которые отличаются экспрессией специфических ядерных маркеров, присутствующих в пролиферирующих клетках. Наши исследования согласовываются с исследованиями Coltera[3, 4].

Характерным маркером мезенхимальных клеток является виментин –белок промежуточных филаментов цитоскелета клеток. Во время проведения иммуноцитохимической реакции относительно активности экспрессии виментина, нами было установлено значительное количество позитивных клеток с высокой активностью экспрессии этого белка на втором (229 б.) и увеличение его активности на 16% на пятом пассажах до 274 баллов, что свидетельствует о мезенхимальной природе культивированных клеток лошади (таблица1, рисунок 2-б). Во время иммунофенотипирования МСК лошади мы установили умеренное количество актин-положительных клеток на втором пассаже (128 б) изначително больше актинпозитивных клеток на пятом пассаже (221 б). Что также свидетельствует об их мезенхимальной природе, при этом наблюдался интересный факт клональной специфичности: высокая интенсивность экспрессии актина в некоторых клеточных популяциях (рисунок 2-а).



**Рисунок 2 –Иммунофенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток костного мозга лошади (V пассаж): а – актин - положительные клетки, б – виментин - положительные клетки, x 400**

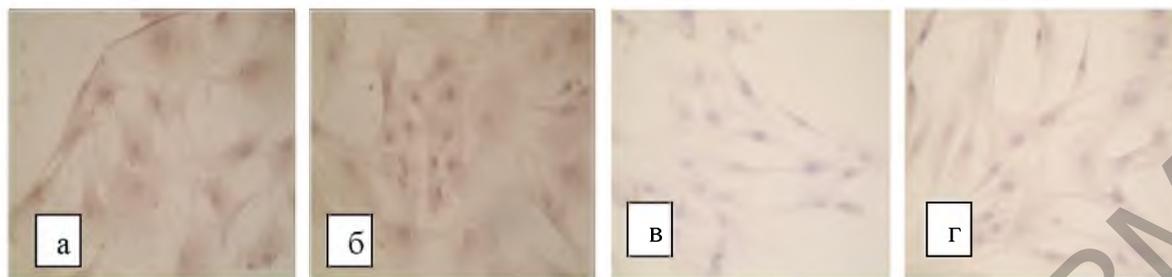
В характеристике мезенхимальных стволовых клеток костного мозга коня на ранних пассажах особое внимание акцентировали на исследование кадгеринов – протеинов, которые отвечают за  $Ca^{2+}$  - зависимое межклеточное взаимодействие, особенно в процессе эмбриогенеза и дифференцировки тканей, в частности E-кадгерин, который характерен для эпителиальных клеток взрослого организма и N-кадгерин, который находится преимущественно на поверхности нервных и мышечных клеток. Количество E – и N- кадгерин-положительных клеток на втором пассаже составляло соответственно 138 и 109 баллов, тогда как на пятом пассаже E- кадгерин и N-кадгерин – положительных клеток не наблюдалось (таблица 1, рисунок 3).



**Рисунок 3 –Иммунофенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток костного мозга лошади: а – N-кадгерин - положительные клетки, б – E-кадгерин - положительные клетки (II пассаж); в – E-кадгерин - отрицательные клетки, г – N-кадгерин - отрицательные клетки (V пассаж), x 400**

Во время иммунофенотипирования клеток лошади, после экспансии *in vitro*, мы уделяли особое внимание маркеру CD24, который принадлежит В-лимфоцитам на всех этапах диферинцирования к плазматическим клеткам, зрелым гранулоцитам, эпителию почек, а также принимает участие в процессах адгезии лейкоцитов. Так, нами было выявлено незначительное количество CD24 – положительных клеток на втором пассаже и полное отсутствие экспрессии этого белка на пятом пассаже (таблица 1, рисунок 4).

Таким образом, в процессе культивирования иммунофенотипическая гетерогенность МСК КМ лошади снижается. Так, на пятом пассаже в селективной среде с ЭТС, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга лошади имели морфологическую и фенотипическую гомогенность и не содержали клеток, которые экспрессируют эндотелиальные и гемопоэтические маркеры.



**Рисунок 4 –Иммунофенотипическая характеристика мезенхимальных стволовых клеток костного мозга лошади: а – CD24 – положительные клетки; б – CD44 - положительные клетки (II пассаж); в – CD24-отрицательные клетки; г – CD44- отрицательные клетки (V пассаж); х 400**

Известно, что белок клеточной адгезии – CD44 является рецептором клеточных мембран для гиалуроната и принимает активное участие в образовании физического контакта между клетками стромы и ранними предшественниками В-клеток. В наших экспериментах выявлено незначительное количество CD44-положительных клеток на втором пассаже и полное отсутствие положительных клеток на пятом пассаже.

**Заключение.** Установлено, что костный мозг лошадей содержит несколько клонов мезенхимальных стволовых клеток, которые отличаются экспрессией специфических ядерных маркеров, характерных для пролиферирующих клеток. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга лошади на пятом пассаже проявляют морфологическую и фенотипическую гомогенность и не содержат клеток, которые экспрессируют эндотелиальные и гемопоэтические маркеры.

**Литература.** 1. Мазуркевич А.Й. До методики отримання кісткового мозку та культивування стовбурових клітин поні. / Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Харкевич Ю.О., Бруско Є.П. // Науково-технічний бюлетень інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. - 2013. Вип. 14, № 3,4. □ С. 308 – 313. 2. Методичні рекомендації “Використання мезенхімальних стовбурових клітин для корекції репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів” / Мазуркевич А.Й., Данілов В.Б., Малюк М.О. та ін. - К., 2012. - С. 42. 3. Colter D.C. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow / D.C. Colter, R. Class., C.M. DiGirolamo et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2000. - Vol. 97. - P. 3213–3218. 4. Colter D.C. Identification of a subpopulation rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells / Colter D.C., Sekiya I., Prockop D.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – P. 7841 – 7845. 5. Dominici M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller et al. // Cytoterapy. – 2006. – Vol. 8, 4. – P. 315 – 317. 6. Lin J.R. In vitro culture of human bone marrow mesenchymal stem cell clones and induced differentiation into neuron-like cells. / Lin J.R., Guo K.Y., Li J.O. Yan D.A. // Di Yi Jun Yi Da Xue Bao. – 2003. – Vol. 23. – P. 251 – 253, 264. 7. Xu W. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. / Xu W., Zhang X., Oian H. et al. // Exp. Biol. Med. – 2004. Vol. 229. – P. 623 – 631. 8. Zhou Z. Comparative study on various subpopulations in mesenchymal stem cells of adult bone marrow / Zhou Z., Jiang E. L., Wang M. et al. // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. – 2005. – Vol. 13. – P. 54 – 58.

Статья передана в печать 07.04.2015 г.

УДК 619: 616. 34-008. 314. 4 – 084

#### **АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КРОВИ (АОА) И ЕЕ ВЗАИМОСВЯЗЬ С СОДЕРЖАНИЕМ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В КРОВИ У ОВЕЦ**

**Маценович А.А.**

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

*Дисбаланс микроэлементов в организме овец всех возрастных групп и характерные для условий Белорусской биогеохимической провинции микроэлементозы приводят к нарушению прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме животных, проявляющегося снижением АОА плазмы крови у животных. В статье также приведена динамика АОА плазмы крови у овец при применении разных препаратов микроэлементов с профилактической целью.*

*Infringement trace elements in an organism of sheep of all age groups and characteristic for conditions of the Belarus biogeochemical province microelementosis lead to infringement oxidizing-antioxidizing balance in an organism of the animals, shown decrease AOA of plasma of blood at animals. In clause as dynamics AOA of plasma of blood at large horned livestock is resulted at application of different preparations of trace elements with the preventive purpose.*