

## ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ СОМАТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРОЛИКА НА РАННИХ ПАССАЖАХ *in vitro*

Мазуркевич А.И., Малюк Н.А., Безденежных Н.А., Харкевич Ю.А., Адаменко И.Н., Кудрявец Ю.И.  
Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев, Украина

*Проведенные иммуноцитохимические исследования подтверждают, что некоммитированные соматические стволовые клетки, которые выделены из костного мозга трубчатых костей кролика и культивируются в стандартной питательной среде, на ранних пассажах экспрессируют маркеры мезенхимальных, мышечных, эпителиальных, нервных клеток, что характеризует гетерогенность выделенной фракции мультипотентных соматических стволовых клеток.*

*Conducted immunocytochemical studies confirm that uncommitted somatic stem cells of rabbit, which were isolated from the bone marrow and cultured in standard medium during the early passages express markers of mesenchymal, muscle, epithelial, nerve cells that characterizes the heterogeneity of the obtained fraction of multipotent somatic stem cells.*

**Введение.** Как известно, костный мозг содержит три типа региональных стволовых клеток: гемопоэтические, мезенхимальные и эндотелиальные [8]. Есть данные о том, что гемопоэтические и эндотелиальные стволовые клетки (СК) могут мигрировать из костного мозга в кровотоки и циркулировать в крови [2].

В разных лабораториях используются разные методы изоляции и очистки этих клеток, основанные на селекции по размеру, плавучей плотности, способности прикрепляться к субстратам, экспрессии определенных поверхностных антигенов и т.д., в результате чего получаемые клеточные популяции существенно отличаются по своим характеристикам. В связи с этим выделение и характеристика СК костного мозга требует разработки системы специфических маркерных антигенов. С этой целью наработано много моноклональных антител, однако до настоящего времени получение «чистых» популяций мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на основании одного маркера остается несбывшейся мечтой.

Выделение «чистых» популяций мультипотентных МСК в нынешних условиях может быть осуществлено по выявлению на поверхности клеток определенной комбинации специфических белков, носящих название маркеры. Сам процесс изучения этих свойств с помощью выявления маркеров получил название фенотипизация. Как известно, культуры МСК при световой микроскопии представляются в виде однородных популяций веретенообразных фибробластоподобных клеток (ФБПК). В эмбриональной телячьей сыворотке (ЭТС) они образуют колонии, состоящие из 30-100 клеток. Фенотипический анализ, проведенный на 14 день культивирования, показал, что эти клетки дают положительное окрашивание на антигены SH<sub>2</sub>, SH<sub>3</sub>, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124 и другие поверхностные белки [11]. В работах ряда исследователей отмечена экспрессия на поверхности МСК костного мозга (КМ) человека антигенов CD34 и CD90, тогда как предполагаемые СК плодов экспрессировали только CD90 [12]. Отмечено, что изменение фенотипических свойств МСК с возрастом сопровождается снижением общего количества экспрессии специфических маркеров.

Ценная информация была получена авторами работ при системном анализе молекул клеточной поверхности МСК [9,10]. При этом было установлено, что МСК экспрессируют широкий спектр молекул клеточной адгезии, которые имеют значение в осуществлении клеточного взаимодействия и «хоуминга». МСК проявляют высокую экспрессию интегринов  $\alpha 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ (CD29); низкую экспрессию –  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 2$ , и  $\beta 4$  и не экспрессируют –  $\alpha 4$ ,  $\alpha L$  и  $\beta 2$ . Эти данные, указывающие на некоторые ключевые механизмы взаимодействия МСК с другими типами клеток, к сожалению, пока не получены в системе *in vivo*.

В экспериментах, проведенных Pittenger M. в конце 20-го века, было установлено, что мультипотентные клетки-предшественники не имеют специфического, только им характерного фенотипа. Они экспрессируют комплекс маркеров, характерных для мезенхимальных, эндотелиальных, мышечных клеток при отсутствии экспрессии иммунофенотипических антигенов гемопоэтических клеток – CD45, CD34 и CD14 [11]. МСК не являются гомогенной популяцией. Только 10 % всей популяции МСК проявляют клоногенные свойства. Характеристика поверхностных маркеров показала, что такие МСК экспрессируют CD29 (интегрин  $\beta 1$ ), CD44 (рецептор для гиалуроновой кислоты и фибронектина), CD90 (Thy-1-антиген), CD105 (эндоглин), CD106 (VCAM), CD166 (ALCAM), HLA класса I. Одновременно эти МСК не экспрессируют маркеры кроветворных клеток, например CD45. Таким образом, по экспрессии маркеров они характеризуются как клетки, подобные фибробластам. Маркеры? специфических для такого класса МСК, пока не найдено. [6].

Некоторые авторы считают, что МСК все же поддаются характеристике с помощью стандартного, но весьма длинного списка идентификационных маркеров. Однако несмотря на предположительное «очищение» и подробную характеристику, конечная популяция отсортированных стромальных клеток оказывается не более «чистой», чем поликлональные линии, выделенные в ходе простой кратковременной адгезии к пластику, поскольку конечные индивидуальные клоны характеризовались разной степенью мультипотентности. Кроме того, характеристика экспрессируемых маркеров даже в клональных линиях, способных полностью регенерировать костный мозг *in vivo*, не является идентичной *in vitro*, поскольку изменяется в культуре как функция времени. Согласно образному выражению Bianco P., идентификация МСК по «фенотипическим следам» напоминает стрельбу по бегущей мишени, поскольку МСК пребывают в постоянном активном развитии, направление которого определяется условиями микросреды. [2] Для

облегчения сопоставления данных, полученных разными исследователями, Комитет по мезенхимальным и тканевым стволовым клеткам Международного сообщества клеточной терапии в 2006 г. предложил набор минимальных критериев для отнесения клеток к мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам [7]. Однако эти критерии иммунофенотипической характеристики относятся только к мультипотентным мезенхимальным стволовым клеткам (ММСК) человека. В связи с этим изучение фенотипической характеристики ММСК животных является очень актуальным, поскольку они необходимы для характеристики клеточных культур, культивируемых *in vitro*.

**Цель исследования** – выделение мультипотентных СК из костного мозга кроликов породы шиншилла, культивирование выделенных стволовых клеток *in vitro*, иммуноцитохимический анализ с использованием моноклональных антител (МКАт) для исследования ядерных и цитоплазматических специфических белков в клетках с высокими пролиферативными свойствами на ранних пассажах.

**Материал и методы исследований.** Стволовые клетки выделяли из костного мозга бедренной кости кроликов [4]. Выделенную клеточную массу культивировали в стандартной среде: DMEM – 80 %, сыворотка эмбрионов телят – 20 % производства “Sigma” (США) с добавлением 10 мкл/см<sup>3</sup> среды антибиотика-антимикотика. Культивирование проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С и 5 % концентрации CO<sub>2</sub>. При этом МСК оседали, прикреплялись к дну чашок 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% ЭДТА [4]. 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 50 – 70 % монослоя). Фиксировали клетки в растворе метанола и ацетона в соотношении 1:1 в течение 2 часов при t - 20 °С, затем инкубировали их с 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA). Для выявления специфических маркеров наносили 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), bcl-2 (clone 10/D5, ThermoScientific) на 30–60 минут (согласно инструкции производителя). После чего 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 окрашивали гематоксилином и эозином (15–30 с), после чего их заключали в Faramount Aqueous Mounting Medium. Анализ результатов проводили по количеству «положительных» клеток – 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.** В таблице 1 и рис. 2–5 приведены данные по иммунофенотипированию некоммутированных СК костного мозга кролика на первом, третьем и седьмом пассажах. С помощью иммуноцитохимического анализа мы установили, что на первом пассаже СК кролика количество PCNA (proliferative cell nuclear antigen) -положительных клеток существенно больше, чем на третьем (табл. 1, рис. 2, 3-а).

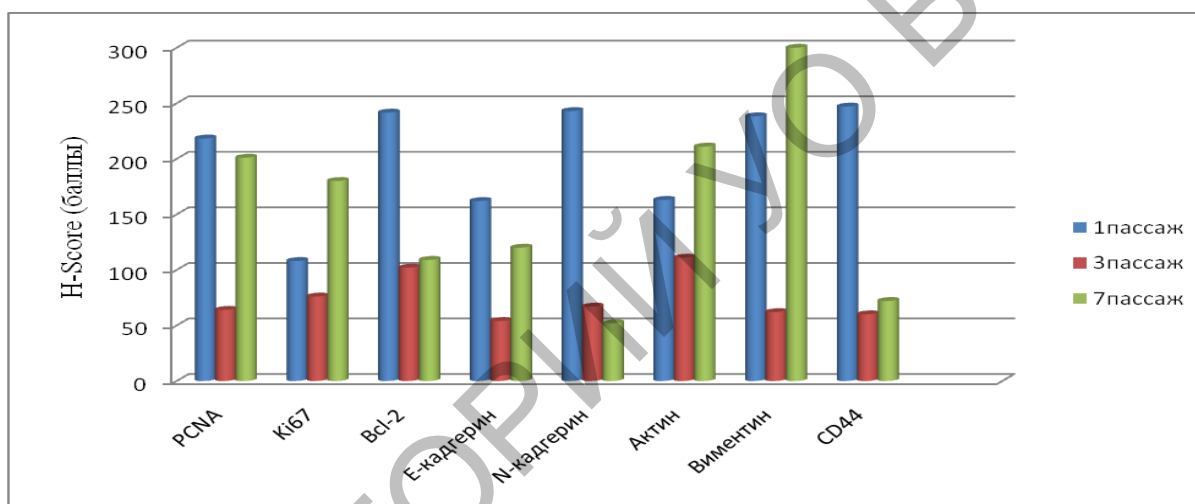
**Таблица 1 – Иммунофенотипический профиль мультипотентных стволовых клеток костного мозга кролика на ранних пассажах (M±m, n=3)**

№	Исследуемый антиген	Пассаж клеток из костного мозга кролика <i>in vitro</i>		
		1	3	7
Оценка в баллах по методу H-Score (от 0 до 300)				
Ядерные белки				
1	PCNA	218,3±4,8	64±11 <sup>***</sup>	201±20
2	Ki67	108±8,7	76±9 <sup>**</sup>	180±16 <sup>**</sup>
Цитоплазматические белки				
3	Bcl-2	241,6±10,6	102±14 <sup>***</sup>	109±11 <sup>***</sup>
Белки адгезии				
4	Е-кадгерин	162±12,6	54±11 <sup>***</sup>	120±10 <sup>**</sup>
5	Н-кадгерин	243±13,5	67±12 <sup>***</sup>	52±7 <sup>***</sup>
Белки цитоскелета				
6	Виментин	238,3±18,4	62±4 <sup>***</sup>	300±0 <sup>**</sup>
7	Актин	163±10	111±18 <sup>**</sup>	211±22 <sup>*</sup>
Молекулы межклеточной адгезии				
8	CD44	247±10	60±15 <sup>***</sup>	72±13 <sup>***</sup>

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

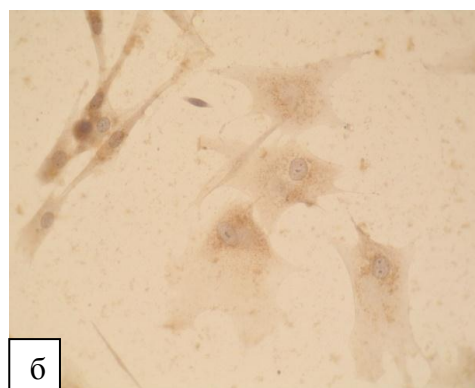
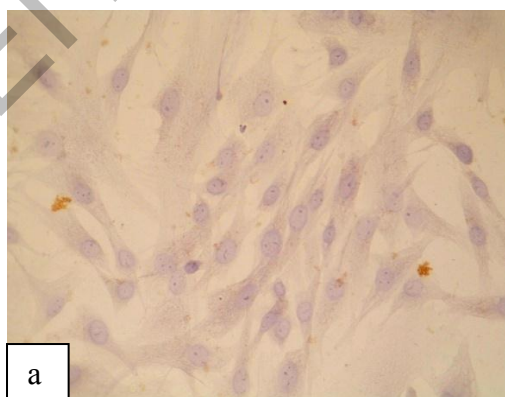
Это свидетельствует о высокой пролиферативной активности клеток на первом пассаже, достоверном замедлении активности их деления на третьем пассаже, что, вероятно происходит в связи с недостаточной концентрацией специфических цитокинов, которые активируют пролиферацию во время адаптации культивируемых клеток к новой культуральной среде. На седьмом пассаже мы наблюдали увеличение количества PCNA-положительных клеток, что свидетельствует об активации митотического деления. Тенденция к замедлению пролиферации клеток на третьем пассаже установлена и при анализе популяции клеток на наличие маркера Ki-67, который также является маркером пролиферирующих клеток. Следует отметить, что на седьмом пассаже уровень экспрессии Ki-67 (табл.1, рис. 2, 3-б) в культивированных клетках существенно увеличился не только по сравнению с клетками третьего пассажа, но и клетками первого пассажа. Видимо, увеличение PCNA-и Ki-67-положительных клеток на седьмом пассаже в условиях культивирования *in vitro* свидетельствует об адаптации клеток к культуральной среде на протяжении 4-6 пассажей.

Белок Bcl-2 (табл.1, рис.1, 2-б) принадлежит к большой группе генов, продукты которых имеют как антиапоптотические (Bcl-2, Bcl-XL), так и проапоптотические свойства (Bax, Bad, Bcs и др.). Он находится в составе митохондриальных мембран, эндоплазматическом ретикулуме, перинуклеарной мембране и даже в митотических хромосомах. Уровень экспрессии Bcl-2 в клетках кролика на первом пассаже составляет 241,6 балла. На третьем пассаже наблюдается уменьшение количества Bcl-2- положительных клеток. Видимо, снижение уровня экспрессии этого белка свидетельствует о замедлении роста культуры СК кроликов на третьем пассаже не только в результате уменьшения их пролиферации, но и активации апоптотических процессов в клеточных популяциях. На седьмом пассаже наблюдается незначительное увеличение количества Bcl-2- положительных клеток, что, вероятно, нужно расценивать, как активизацию антиапоптотического действия Bcl-2.

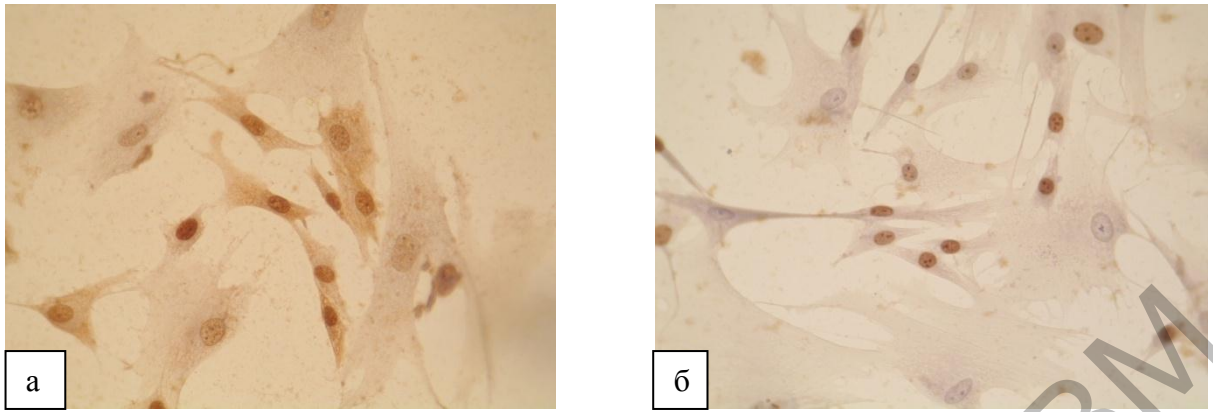


**Рисунок 1 - Иммунофенотипический профиль специфических белков некоммутированных стволовых клеток кролика**

Особый интерес представляло исследование кадгеринов – протеинов, которые отвечают за  $Ca^{2+}$ -зависимое межклеточное взаимодействие, особенно в процессе эмбриогенеза и дифференцирования тканей. В частности, E- кадгерин, характерный для эпителиальных клеток взрослого организма, и N-кадгерин, который находится преимущественно на поверхности нервных и скелетных клеток (клеток мезенхимального происхождения). Количество E-и N-кадгерин - положительных клеток (табл.1, рис 2, 5-а, 5-б) существенно уменьшается в культуре СК костного мозга кролика на третьем и седьмом пассажах, что свидетельствует о снижении экспрессии белков, которые характерны для эпителиальных, нервных и скелетных клеток взрослого организма и, как следствие, об инактивации межклеточных взаимодействий.



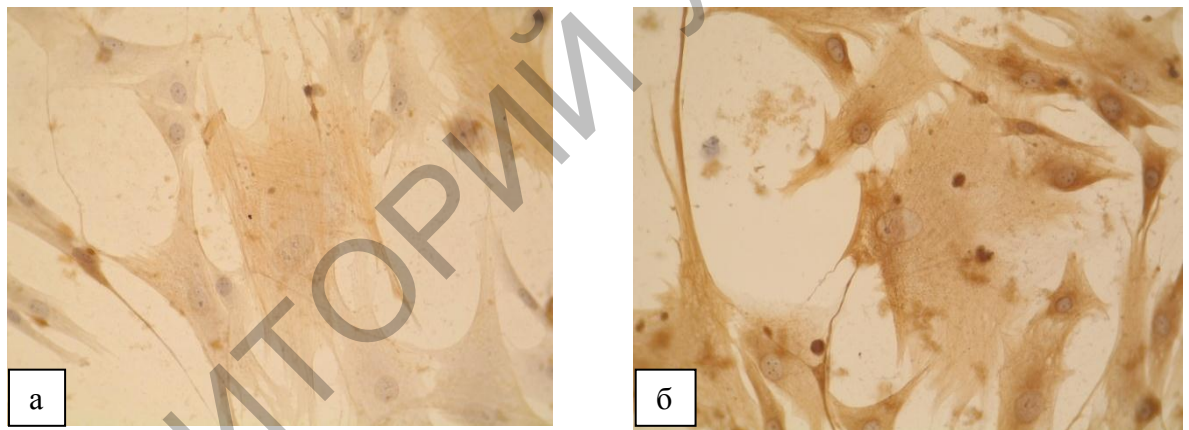
**Рисунок 2 - Контроль клеток (а). Bcl-2-положительные клетки (б) на 7 пассаже (увеличение x400).**



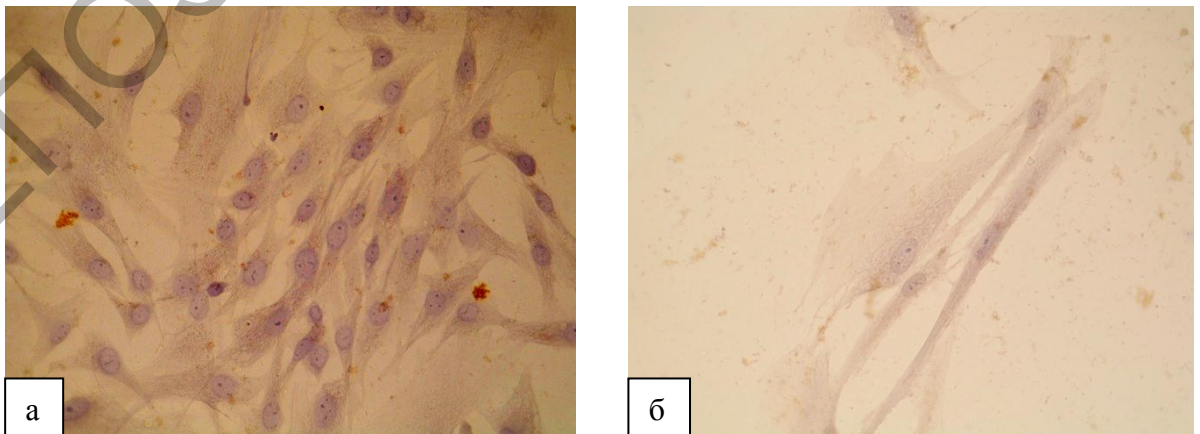
**Рисунок 3 - Экспрессия маркеров, которые характеризуют пролиферативную активность клеток: PCNA (а) и Ki-67 (б) на 7 пассаже (иммуноцитохимический препарат, увеличение x400).**

Снижение количества этих клеток приводит к снижению гетерогенности культуры клеток на третьем и седьмом пассажах. Кроме того, установленное нами существенное уменьшение количества N-кадгерин – положительных клеток на седьмом пассаже, скорее всего, свидетельствует о селективном доминировании клеток с мезенхимальными характеристиками над клетками с эпителиальными характеристиками в ходе пассирования соматических СК.

При исследовании соматических стволовых клеток костного мозга кролика мы также акцентировали внимание на экспрессии виментина – белка промежуточных филаментов цитоскелета клеток, который является характерным маркером мезенхимальных клеток. Нами было установлено снижение экспрессии этого белка на третьем пассаже и максимальное количество актин-положительных клеток (300 баллов) на седьмом пассаже, что является еще одним подтверждением доминирования в культуре клеток мезенхимального происхождения.



**Рисунок 4 - Статус мезенхимальных (актин, виментин) маркеров в клетках: актин- (а), виментин- (б) положительные клетки в иммуноцитохимических препаратах клеток из КМ кролика на седьмом пассаже (увеличение x400).**



**Рисунок 5 - Контроль клеток (а). Статус эпителиального (Е-кадгерин) маркера в клетках: Е-кадгерин- (б) положительные клетки в иммуноцитохимических препаратах клеток из КМ кролика седьмого пассажа (увеличение x400).**

При исследовании актин-положительных клеток нами было установлено, что уровень экспрессии этого белка в культуре клеток на третьем пассаже имеет тенденцию к снижению, а на седьмом пассаже количество актин-положительных клеток существенно больше, чем на третьем пассаже.

Белок системы клеточной адгезии – CD44, является главным рецептором клеточной поверхности для гиалуроната и принимает активное участие в образовании физического контакта между клетками стромы и ранними предшественниками В-клеток, а также в других формах межклеточной адгезии и процессах клеточной миграции. В наших экспериментах выявлено большое количество CD44-позитивных клеток на первых пассажах МСК, с тенденцией к снижению экспрессии этого антигена на более поздних пассажах.

**Заключение.** Исследуемые соматические стволовые клетки кролика на ранних пассажах являются гетерогенными, с наличием клеток, которые способны к широкому потенциалу цитодифференцирования. Установлено, что в культуре некоммутированных стволовых клеток костного мозга на более поздних пассажах культивирования происходит доминирование клеток мезенхимального происхождения. Впервые с высокой вероятностью установлено, что экспрессия разных функциональных молекул культивируемых мультипотентных стволовых клеток костного мозга кролика на ранних пассажах характеризует их пластичность, то есть способность клеток принимать при соответствующих условиях необычный функциональный фенотип, например, эпителиальный фенотип множественной клеточной специфичности, включающий фенотип клеток эпителия кожи, яичников, плаценты, почек, лёгких и т.д.

**Литература.** 1. Владимирская Е.Б. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками / Владимирская Е.Б., Майорова О.А., Румянцев С.А., Румянцева А.Г. // Медпрактика-М, Москва 2005. 391с. 2. Кухарчук О.Л. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки / Кухарчук О.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. // КРС Медицинские технологии, 2004, 505 с. 3. Методичні рекомендації "Використання мезенхімальних стовбурових клітин для корекції репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів". Мазуркевич А.І., Данілов В.Б., Малюк М.О. та ін. – К., 2012. – С. 42. 4. Патент України на корисну модель № 40805, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб прижиттєвого отримання стромальних стовбурових клітин кісткового мозку тварин / Мазуркевич А.І., Малюк М.О., Ткаченко С.М., Ковпак В.В. – № и 2008 13659. Заявл. 26.11.2008. Опубл. 27.04.2009. Бюл. № 8. 5. Петренко А.Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения / Петренко А.Ю., Хунов Ю.А., Иванов Э.Н. // Луганск «Пресс-экспресс» 2011г. С.36-39. 6. Попов Б.В. Введение в клеточную биологию стволовых клеток / Попов Б.В. // Санкт-Петербург. Издательство СпецЛит, 2010 319с. 7. Dominici M., Le Blanc K., Mueller S., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement // Cytotherapy. - 2006. - Vol.8. - P. 315-317. 8. Lanza R.P. Handbook of Stem Cells. – Churchill-Livingston: Elsevier Press, 2004. – 2000 p. 9. Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D., et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells // J. Biomed. Sci – 2003. Vol. 10. – P. 228-241. 10. Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca S.D., et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells // J. Cell Physiol. – 1998. - Vol. 176. – P.57-66. 11. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. - 1999. - Vol. 284. - P.143-147. 12. Waller E.K., Olweus J., Lund-Johansen F., et al. The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors // Blood. – 1995. – Vol. 85. – P.2422 – 2435.

Статья передана в печать 14.08.2013

УДК 619:616-053.2:636.2:615.03

#### **ДИНАМИКА КЛИНИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ЛЕЧЕНИИ У МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА КАТАРАЛЬНОГО КОНЪЮНКТИВИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОИЗВОДНОГО 1,2,4-ТРИАЗОЛА (СУБСТАНЦИИ ВПК-108)**

**Мельничук В.В., Кулинич С.Н.,**

Полтавская государственная аграрная академия, г. Полтава, Украина

Исследованиями, проведенными на базе хозяйств Полтавской области с различными способами содержания установлено, что пораженность молодняка крупного рогатого скота в возрасте до 1-го года катаральной формой конъюнктивита составляет 17,5%. Выяснено, что заболевание имеет определенную сезонность, и чаще его диагностируют в летне-пастбищный период. При этом клинически проявляется гиперемией слизистой оболочки век, светобоязнью и слезотечением. Приведены данные исследований сравнительной эффективности лечения катарального конъюнктивита.

By researches, conducted on the base of economies of the Poltava area it is set with the different ways of maintenance, that staggered of sapling of cattle under age 1th 17,5% makes the catarrhal form of conjunctivitis. It is found out that a disease has certain seasonality, and more frequent than him diagnose in a summer-pasture period. Thus clinically shows up hyperemia of mucous membrane of eyelids, photophobia and flow of tears. Information of researches of comparative efficiency of treatment of catarrhal conjunctivitis is resulted.

**Введение.** Основную часть агропромышленного комплекса Украины занимает животноводство, а именно разведение крупного рогатого скота. Это связано с тем, что Украина имеет оптимальные условия для выращивания сельскохозяйственных животных (хорошая кормовая база, большие пастбищные