

УДК 602:611.018.46:636.92

ІМУНОФЕНОТИПОВИЙ ПРОФІЛЬ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ КРОЛІВ НА ПІЗНІХ ПАСАЖАХ *IN VITRO*

М. О. Малюк
nikolai_malyuk@mail.ru

Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв оборони, 15; Київ, 03041, Україна

Незважаючи на велику зацікавленість щодо соматичних стовбурових клітин кісткового мозку тварин у зв'язку з їх мультипотентністю, пластичністю, простотою отримання і використання, загальноприйнятих методів їх виділення із тканин не існує. У різних лабораторіях використовують різні методи отримання і очистки стовбурових клітин, які ґрунтуються на селекції за розміром, властивістю прикріплюватися до пластику і скла, експресією відповідних поверхневих антигенів, у зв'язку із чим отриманні клітинні популяції суттєво відрізняються за своїми біологічними характеристиками.

Виділення і характеристика стовбурових клітин кісткового мозку потребує розробки специфічних маркерних антигенів. У цьому напрямі проведена велика робота, в результаті якої напрацьовано багато моноклональних антитіл. Незважаючи на це, отримання «чистих» популяцій мультипотентних стовбурових клітин за допомогою одного маркеру залишається нездійсненою мрією.

Разом з тим, залишається відкритим питання про те, чи є стовбурові клітини тваринного організму гетерогенними на пізніх пасажах під час *in vitro* культивування, оскільки практично всі дослідження, які стосуються CD-рецепторного апарату стовбурових клітин, проведені під час культивування клітин на ранніх пасажах.

Для проведення експериментальних досліджень мультипотентні стовбурові клітини отримували із кісткового мозку

трубчатих кісток кроля. Одержану клітинну масу культивували у стандартному середовищі. Мікроскопічний аналіз культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

При проведенні імуноцитохімічних досліджень з метою вивчення експресії специфічних маркерів, використовували мультипотентні СК кісткового мозку кроля на сьомому, дванадцятому і вісімнадцятому пасажах. Для вивчення імунофенотипового профілю визначали експресію білків асоційованих із проліферацією і клітинним циклом, апоптозом, а також клітинної адгезії і цитоскелету.

Проведені імуноцитохімічні дослідження свідчать, що мультипотентні стовбурові клітини кісткового мозку кролів, які культивуються у стандартному поживному середовищі, на пізніх пасажах експресують маркери мезенхімальних і епітеліальних клітин, що підтверджує їх гетерогенність та пластичність. Встановлено, що на пізніх пасажах домінують клітини, які експресують маркери мезенхімального походження.

Ключові слова:
МУЛЬТИПОТЕНТНІ СТОВБУРОВІ
КЛІТИНИ, КІСТКОВИЙ МОЗОК,
МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА,
ІМУНОЦИТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ,
ЯДЕРНІ БІЛКИ, Е-КАДГЕРИН, N-
КАДГЕРИН, АКТИН, ВІМЕНТИН

IMMUNOPHENOTYPIC PROFILE OF STEM CELLS FROM THE BONE MARROWS OF RABBITS AT THE LATER PASSAGES *IN VITRO*

М. Maliuk
nikolai_malyuk@mail.ru

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Heroiv Oborony str., 15; Kyiv, 03041, Ukraine

Despite the great interest in somatic stem cells from bone marrow of animals due to their multipotency, flexibility, simplicity of their obtaining and using, generally accepted methods for their isolation from tissues does not exist. In different laboratories use different methods of isolation and purification of stem cells, based on their size, adhesive properties, expression of surface antigens and in connection with this reason the receiving cell populations significantly differ in their biological characteristics.

Isolation and characterization of stem cells from bone marrow requires the development of specific marker antigens. A grate work has been done in this way, resulting in appearances of many monoclonal antibodies. However, obtaining of a «pure» populations of multipotent stem cells due to a single marker remains a distant dream.

However, remains the question whether the stem cells of animal origin are heterogeneous at later passages during in vitro cultivation, because all studies related to CD-receptors system of stem cells conducted during their cultivation at early passages.

Multipotent stem cells for experimental studies were obtained from bone marrow of tubular bones of rabbit. Obtained cells was cultured in standard growth medium. Microscopic

analysis was carried out using inverted microscope Axiovert 40 (Carl Zeiss).

During immunocytochemical studies for the reason of examination the expression of specific markers, were used multipotent stem cells from bone marrow of rabbit at seventh, twelfth and eighteenth passages. For study of immunophenotype profile of stem cells were determined the expression of proteins associated with proliferation and cell cycle, apoptosis, cell adhesion and cytoskeleton.

Conducted immunocytochemical studies indicate that multipotent stem cells of the bone marrow of rabbits, which cultivates in standard growth media at later passages express markers of mesenchymal and epithelial cells, which confirms their heterogeneity and plasticity. At later passages dominates cells which express markers of mesenchymal origin was found.

Keywords: MULTIPOTENT STEM CELLS, BONE MARROW, MONOCLONAL ANTIBODIES IMMUNOCYTOCHEMICAL ANALYSIS, NUCLEAR PROTEINS, E-CADHERIN, N-CADHERIN, ACTIN, VIMENTIN

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРОЛЕЙ НА ПОЗДНИХ ПАССАЖАХ *IN VITRO*

М. О. Малюк
nikolai_malyuk@mail.ru

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, ул. Героев Обороны, 15; Киев, 03041, Украина

Несмотря на большой интерес к соматическим стволовым клеткам костного мозга животных в связи с их мультипотентностью, пластичностью, простотой выделения и использования, общепринятых методов их выделения из тканей не существует. В разных лабораториях применяют разные протоколы изоляции и очистки этих клеток, основанные на селекции по размеру, способности прикрепляться к пластику и стеклу,

экспрессии определенных поверхностных маркеров, в связи с чем получаемые клеточные популяции существенно отличаются по своим биологическим характеристикам.

Выделение и характеристика стволовых клеток костного мозга требует разработки специфических поверхностных маркеров. В этом направлении проведена большая работа, в результате которой получено много моноклональных антител. Несмотря на это, получение «чистых»

популяций мультипотентных стволовых клеток с помощью одного маркера остается несбывшейся мечтой.

Однако, остается открытым вопрос, являются ли стволовые клетки животного организма гетерогенными на поздних пассажах при *in vitro* культивировании, поскольку практически все исследования по CD-рецепторному аппарату стволовых клеток проведены при культивировании клеток на поздних пассажах.

Для проведения экспериментальных исследований мультипотентные стволовые клетки получали из костного мозга трубчатых костей кроля. Выделенную клеточную массу культивировали в стандартной среде. Микроскопический анализ культуры проводили с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Для иммуноцитохимических исследований с целью изучения экспрессии специфических маркеров, использовали мультипотентные СК костного мозга кролей на седьмом, двенадцатом и восемнадцатом пассажах. Иммунофенотипический профиль изучали по экспрессии белков, ассоциированных с пролиферацией и клеточным циклом, апоптозом, а также клеточной адгезией и цитоскелета.

Проведенные иммуноцитохимические исследования показывают, что мультипотентные стволовые клетки костного мозга кролей, культивированные в стандартной питательной среде, на поздних пассажах экспрессируют маркеры мезенхимальных и эпителиальных клеток, что подтверждает их гетерогенность клеточной популяции. Установлено, что на поздних пассажах доминируют клетки, которые экспрессируют маркеры мезенхимального происхождения.

Ключевые слова:
МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, КОСТНЫЙ МОЗГ, МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, ЯДЕРНЫЕ БЕЛКИ, Е-КАДГЕРИН, N-КАДГЕРИН, АКТИН, ВИМЕНТИН

З часу відкриття стовбурових клітин питання щодо присутності факторів, які дозволяють цим клітинам асинхронно і одночасно ціленаправлено диференціюватися у ті чи інші типи клітин, на сьогоднішній день остаточно не з'ясовані. Як відомо, здатність стовбурових клітин до диференціації та проліферації залежить від дії зовнішніх факторів, що підтверджується у дослідах *in vitro*. Залежно від факторів мікрооточення вони здатні диференціюватися у ті чи інші типи клітин, а додавання у культуральне середовище факторів росту (наприклад, фактору росту фібробластів) призводить до активації мітотичної активності стовбурових клітин [1, 2]. Здатність стовбурових клітин диференціюватися у більше ніж одному напрямку свідчить про гетерогенність їх популяції. Разом з цим, залишається відкритим питання про те, чи є стовбурові клітини тваринного організму гетерогенними на пізніх пасажах під час *in vitro* культивування, оскільки практично всі дослідження, які стосуються CD-рецепторного апарату стовбурових клітин, проведені під час культивування клітин на ранніх (2–4) пасажах [3–5]. Отже, встановлення специфічних маркерів, які асоційовані із проліферацією, клітинним циклом та апоптозом, а також маркерів цитоскелету і клітинної адгезії під час культивування *in vitro* стовбурових клітин кісткового мозку тварин на пізніх пасажах обґрунтовує доцільність та актуальність досліджень.

Мета дослідження: дослідити експресію екстра- та інтрацелюлярних специфічних білків мультипотентних стовбурових клітин кісткового мозку кроля на пізніх пасажах за допомогою імуноцитохімічного аналізу.

Матеріали і методи

Мультипотентні стовбурові клітини (МСК) отримували з кісткового мозку (КМ) кроля. Одержану клітинну масу культивували у стандартному середовищі DMEM («Sigma», США) з 20 % FBS та

додаванням антибіотика-антимікотика у кількості 10 мкл/см³. Культивування клітин проводили в СО₂-інкубаторі за t 37 °С та концентрації СО₂ — 5 %. При цьому МСК осідали, прикріплюючись і розпластувались на дні чашок Петрі. Суспензовану незалежну фракцію кровотворних клітин видаляли і продовжували культивувати клітини, що мають адгезивні властивості. З метою одержання суспензій клітин, що ростуть прикріпленими до культуральних чашок Петрі, застосовували суміш розчинів 0,5 % трипсину та 0,2 % ЕДТА (версену) [6]. Мікроскопічний аналіз культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

При проведенні імуноцитохімічного аналізу досліджувані клітини вирощували на покривних скельцях впродовж 48–72 години. За умови 50–70 % моношару клітини фіксували у фіксуючому розчині (метанол + ацетон: 1:1) впродовж 2 годин при 20 °С, інкубували з 1 % розчином бичачого сироваткового альбуміну (BSA) та 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 CD 325, ThermoScientific), віментин (V9, DiagnosticBioSystems), bcl-2 (clone 10/D5, ThermoScientific) на 30–60 хвилин (згідно з інструкцією до антитіла), після чого застосовували систему візуалізації PolyVue (ThermoScientific), кон'юговану з пероксидазою та виявляли активність ферменту із застосуванням в якості субстрату діамінобензидину (ThermoScientific). Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивали водою та дофарбовували Hematoxylin Solution according to Mayer (Sigma) (15–30 с) та заключали у Faramount Aqueous Mounting Medium. Аналіз

результатів проводили за кількістю клітин з експресією (коричневе забарвлення клітин) та оцінювали за допомогою класичного метода 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); А — відсоток слабо «зафарбованих» клітин; В — відсоток помірно «зафарбованих» клітин; С — відсоток сильно «зафарбованих» клітин.

Результати й обговорення

Проведені імуноцитохімічні дослідження CD-рецепторного апарату стовбурових клітин кісткового мозку кроля на пізніх пасажах підтверджують їх гетерогенність. Дані щодо імунофенотипового профілю мультипотентних СК кісткового мозку кроля на сьомому, дванадцятому і вісімнадцятому пасажах приведені в таблиці 1 і рисунках 1–4.

Як відомо, експресія клітинами PCNA (proliferative cell nuclear antigen) корелює з їх здатністю до мітотичної активності: чим вона вища, тим клітини проліферують активніше. За допомогою імуноцитохімічного аналізу встановлено, що на 7 і 12-му пасажах кількість PCNA-позитивних клітин була високою, що вказує на їх високу проліферативну активність, проте суттєво знижувалась на 18 пасажі (табл. 1, рис. 1-а). Слід відмітити, що експресія ще одного білка, який характеризує проліферативний потенціал клітин — Ki-67 суттєво знижувалась уже на дванадцятому пасажі (табл. 1, рис. 1-б). Очевидно, зниження кількості Ki-67-позитивних клітин на дванадцятому і, особливо, на вісімнадцятому пасажах в умовах культивування *in vitro* свідчить про зниження проліферативної активності клітин.



Рис. 1. Експресія маркерів, що характеризують проліферативну активність стовбурових клітин кроля на 18 пасажі: PCNA (а) та Ki-67 (б) (збільшення x400)

Білок Bcl-2 належить до великої групи генів, продукти яких мають як антиапоптичні (Bcl-2, Bcl-XL), так і проапоптичні властивості (Bax, Bad, Bic). Він локалізується на мітохондріальних мембранах, ендоплазматичному ретикулумі, перинуклеарній мембрані і, навіть, в мітотичних хромосомах. Встановлено, що вірогідне збільшення відсотка Bcl-2-позитивних клітин

відбувається на дванадцятому і вісімнадцятому пасажах порівняно із числом позитивних клітин на сьомому пасажі (табл. 1, рис. 2-б). Очевидно, збільшення рівня експресії Bcl-2 у клітинах на пізніх пасажах свідчить про активацію антиапоптичної дії цього білка, одночасно із зниженням проліферативної активності мультипотентних СК КМ кроля.

Таблиця 1

Імунофенотиповий профіль мультипотентних стовбурових клітин кісткового мозку кроля на пізніх пасажах (M±m, n=3)

№ п/п	Досліджувані антиген	Пасаж стовбурових клітин кроля <i>in vitro</i>		
		7	12	18
		Показники H-Score (бали)		
		<i>Ядерні білки (асоційовані з проліферацією і клітинним циклом)</i>		
1	PCNA	201±20	227±14	82±13
2	Ki67	180±16	89±11	18±5
		<i>Білки асоційовані із апоптозом</i>		
3	Bcl-2	109±11	146±28	194±22
		<i>Білки клітинної адгезії і цитоскелету</i>		
4	Е-кадгерин	120±10	136±11	132±19
5	Н-кадгерин	52±7	76±4	141±16
6	Віментин	300±0	264±26	271±24
7	Актин	211±22	68±11	246±19
8	CD44	72±13	89±10	19±4

Примітка: *— p<0,05; **— p<0,01; ***— p<0,001

Цікавим є дослідження кадгеринів — глікопротеїнів, які відповідають за Ca²⁺-залежну міжклітинну взаємодію, особливо в процесі ембріогенезу і диференціювання тканин. Зокрема, Е-кадгерин характерний для епітеліальних клітин дорослого організму, Н-кадгерин — нервових і м'язових клітин (клітин мезенхімального

походження). Кількість Е-кадгерин-позитивних клітин у культурі СК кісткового мозку кроля на сьомому, дванадцятому і вісімнадцятому пасажах є стабільно помірною, що вказує на присутність на пізніх пасажах клітин з епітеліальними маркерами (табл.1, рис 3-б).

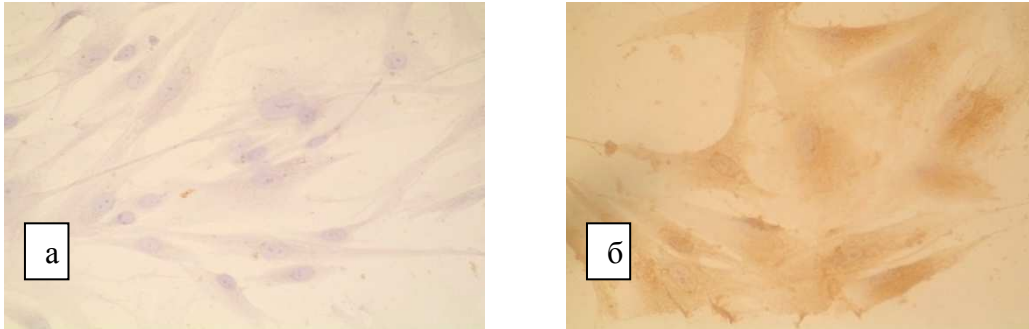


Рис. 2. Експресія білків, асоційованих із апоптозом стовбурових клітинах кроля на 18 пасажі: контроль (а), Bcl-2-позитивні клітини (б), x400

Також виявлено невелику кількість N-кадгерин-позитивних клітин на сьомому пасажі і значне збільшення їх числа на дванадцятому і вісімнадцятому пасажах, що свідчить про активацію міжклітинної взаємодії і стабільну експресію білків, які характерні для нервових і м'язових клітин, та підтверджує гетерогенний статус мультипотентних СК КМ кроля (табл. 1).

При дослідженні актин-позитивних клітин встановлено високу експресію цього білка на сьомому і вісімнадцятому пасажах і дещо нижча на дванадцятому

пасажі (табл. 1, рис. 4-а). Очевидно, ступінь активності актин-позитивних клітин на різних пасажах змінюється в культурі з часом. Згідно з висловлюванням відомого дослідника Р. Bianco «Ідентифікація стовбурової стромальної клітини по фенотипових слідах нагадує стрільбу по бігучій мішені, оскільки МСК перебувають в постійно активному розвитку, направлення якого визначається умовами мікрооточення як *in vivo*, так і *in vitro*» [1].



Рис. 3. Експресія епітеліальних (Е-кадгерин) маркерів стовбурових клітин кроля на 18 пасажі: контроль (а), Е-кадгерин (б) -позитивні клітини, x 400

При дослідженні СК кроля також акцентували особливу увагу на експресію віментину — білка проміжних філаментів цитоскелету, що є характерним маркером мезенхімальних клітин. Встановлено стабільно високу експресію клітинами цього білка на сьомому, дванадцятому і вісімнадцятому пасажах, що є підтвердженням домінування у культурі клітин мезенхімального походження

(табл. 1, рис. 4-б). Відомо, що білок CD44, який відповідає за клітинну адгезію, є також головним рецептором клітинних мембран для гіалуроната та бере активну участь в утворенні фізичного контакту між клітинами строми і ранніми попередниками В-клітин, а також в інших формах міжклітинної адгезії і процесах клітинної міграції.

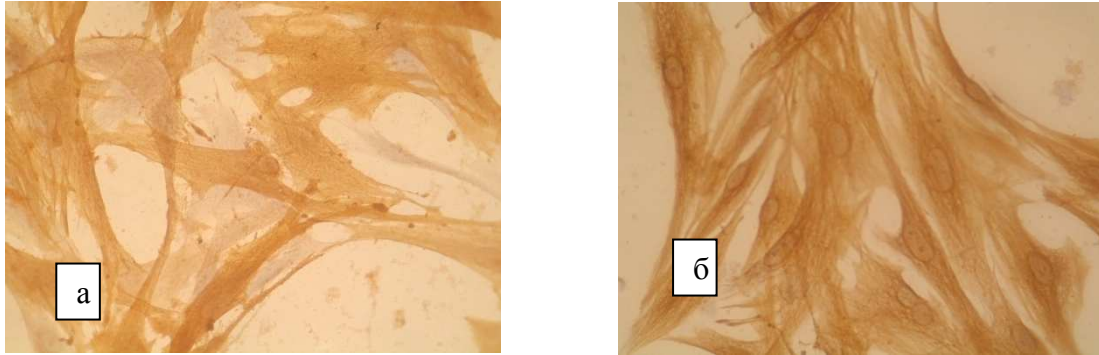


Рис. 4. Експресія мезенхімальних (актин, віментин) маркерів стовбурових клітин кроля на 18 пасажі: Актин (а), Віментин (б) — позитивні клітини, х 400

У наших експериментах виявлено помірну кількість CD44-позитивних клітин на сьомому та дванадцятому пасажах і зниження відсотка позитивних клітин на вісімнадцятому пасажі (табл. 1).

Висновки

1. Досліджено, що на пізніх пасажах культивування мультипотентні стовбурові клітини кісткового мозку кроля знижують експресію ядерних білків, які асоційовані з проліферацією і клітинним циклом.

2. Встановлено, що мультипотентні стовбурові клітини кролів на пізніх пасажах інтенсивно продукують білок, який володіє антиапоптичними і проапоптичними властивостями.

3. Мультипотентні стовбурові клітини кроля на пізніх пасажах експресують мезенхімальні та епітеліальні маркери із домінуванням клітин мезенхімального походження.

Перспективи подальших досліджень. Проведені імуноцитохімічні дослідження щодо визначення CD-рецепторного апарату мультипотентних стовбурових клітин кісткового мозку тварин, підтверджують їх гетерогенний статус і дають можливість використовувати фактори ціленаправленого цитодиференціювання цих клітин у клінічній практиці.

1. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001. Vol. 19. P. 180–192.

2. Castro-Malaspina H., Gay R. E., Resnick G. et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980. Vol. 56. P. 289–301.

3. Kuharchuk O.L., Radchenko V.V., Sirman V.M. Stvolovyie kletki: eksperiment, teoria, klinika. Embrionalnye, mezenhimalnye, neiralnye hemopoeticheskie stvolovyie cketki. [Stem cells: experiment, theory, clinic. Mesenchymal, neural and haemopoetic stem cells] *Meditsynskie tekhnologii — Medical technology*, 2004. 505 p. (in Russian)

4. Petrenko A. I., Hunov I. A., Ivanov E. N. Stvolovyie kletki. Svoistva i perspektivy klinicheskogo primienienia cells. [Stem cells. Properties and prospects of clinical application], Lugansk «Press ekspress» — «Press Express», 2011. pp. 36–39. (in Russian)

5. Popov B. V. Vvedenie v klietochniu biologiiu stvolovykh kletok [Introduction in cell biology of stem cells], *Sankt Peterburg: izdatielstvo «SpetsLit» — St. Petersburg: publisher «SpecLit»*, 2010. 19 p. (in Russian)

6. Mazurkevych A. I., Danilov V. B., Maliuk M. O., Kovpak V. V., Kharkevych I. O., Metodychni rekomendacii «Vykorustannia mезenkhimalnykh stovbyrovykh klityn dlia korekcii reparatyvnykh procеciv v organizmi tvaryn-recypientiv». [Guidelines «Use of mesenchymal stem cells for correction of reparative processes in the organism of recipient animal»], Kyiv, 2012. 42 p. (in Ukrainian).