

УДК 577. 125

## СОДЕРЖАНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЛИПИДАХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ СОБАКИ

**Л. В. Кладницкая, А. Й. Мазуркевич, В. В. Данчук, С. В. Величко,  
С. В. Мидык, В. Б. Данилов**

Национальный университет биоресурсов и природопользования  
Украины

г. Киев, Украина (Украина, 03041, г.Киев, ул. Героев Обороны, 15  
e-mail: kladlarisa@yandex.ru)

***Ключевые слова:** стволовые клетки, жировая ткань, насыщенные, ненасыщенные жирные кислоты, собака.*

***Аннотация.** Исследован жирнокислотный состав липидов мезенхимальных стволовых клеток (МСК) жировой ткани собаки. Стволовые клетки получали из жировой ткани собаки возрастом до 12 мес. Жировую ткань отбирали при плановых оперативных вмешательствах. Стволовые клетки культивировали при стандартных условиях в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 5% содержании CO<sub>2</sub>, при температуре 37 °С в среде культивирования Игла, модифицированной Дюльбекко. Для снижения гетерогенности культуры проводили субкультивирование 3-4 раза. Полученные стволовые клетки исследовали методом газовой хроматографии на содержание жирных кислот в липидах. Стволовые клетки жировой ткани собаки содержат в липидах коротко-, средне- и длинноцепочечные жирные кислоты. Суммарное количество насыщенных жирных кислот в МСК собаки составляло 65,65, ненасыщенных жирных кислот – 34,35%. Моноеновые жирные кислоты составляют 24,46, а полиеновые – 9,89%. Индекс насыщенности – 1,91. Индекс соотношения n3 к n6 жирных кислот липидов МСК жировой ткани собаки составляет 0,46.*

## THE CJNTENT OF FATTY ACIDS IN LIPIDS ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS IN DOG

**L. V. Kladnytskaya, A. I. Mazurkiewicz, V. V. Danchuk, S. V. Velichko,  
S. V. Midyk, V. B. Danilov**

National University of life and environmental sconces of Ukraine  
Kyev, Ukraine (Ukraine, 03041, .Kyev, st. Heroes Defense, 15  
e-mail: kladlarisa@yandex.ru)

***Key words:** stem cells, adipose tissue, saturated, unsaturated fatty acids, dog.*

***Summary.** The fatty acid composition of lipids of dog mesenchymal stem cells from adipose derived (MSC AD) was studied. Stem cells obtained from adipose tissue in dogs age to 12 months. The adipose tissue was collected during elective surgery. The stem cells were cultivated in standard conditions in a CO<sub>2</sub> incubator at 5% CO<sub>2</sub> content at 37 ° C in Eagle medium, modified Dulbecco. To reduce the heteroge-*

neity of the culture it was subcultivated 3-4 times. The MSC AD were examined by gas chromatography method and determined the percentage of fatty acids in the lipids. Dog MSC AD contain in lipid short-, medium- and long-chain fatty acids. The total amount of saturated fatty acids in dog MSCs was 65.65, unsaturated fatty acids - 34.35%. Monoenic fatty acids comprise 24,46, and polyene - 9.89%. The index of the ratio of saturated and polyunsaturated fatty acids is 1.91. Ratio index n3 to n6 fatty acid in lipids of adipose tissue MSCs is 0.46.

(Поступила в редакцию 01.06.2016 г.)

**Введение.** Потенциал стволовых клеток по способности корректировать и восстанавливать структуру и функции клеток, систем и органов в настоящее время вызывает слишком большой интерес, как в гуманной, так и в ветеринарной медицине. Успешное применение стволовых клеток в терапевтических целях зависит от многих факторов, в частности, от свойств биологического материала, таких как пролиферативная активность, выживаемость, целенаправленная дифференциация, а также среды, в которой они находятся [1, 2, 3]. Разработка стратегий для решения указанных вопросов должно способствовать лучшему пониманию биологии стволовых клеток.

Значение насыщенных (НЖК), мононенасыщенных (МНЖК) и полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) для функционирования клеток, их мембран и целостного организма известно давно и переоценить его трудно [4]. Данные литературы свидетельствуют о влиянии жирных кислот и их метаболитов на пролиферативную активность и дифференциацию стволовых клеток. Доказано, что повышение содержания ненасыщенных жирных кислот и их метаболитов в среде культивирования приводит к повышению коэффициента пролиферации и процесса дифференциации стволовых клеток различных типов [5]. Наряду с этим известны результаты исследования влияния насыщенных жирных кислот в культуральной среде на жизнеспособность и апоптоз мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга человека. Выяснено, что пальмитиновая кислота снижает пролиферацию и индуцирует апоптоз МСК костного мозга человека, а также вызывает цитотоксический стресс кардиальных миоцитов. Эти результаты позволяют предположить, что насыщенные жирные кислоты снижают выживание МСК костного мозга в естественных условиях, т. е. *in vivo* [6].

Незаменимые жирные кислоты и их метаболиты могут оказывать свое биологическое действие через несколько механизмов. ПНЖК могут быть легко включены в мембранные фосфолипиды, изменяя химические и физические свойства клеточных мембран и, таким образом, модулировать активность ассоциированных с мембранами функцио-

нальных белков, таких как ионные каналы и рецепторы [7]. Простагландин E (2), образованный из арахидоновой кислоты, может связываться с рецепторами, которые обеспечивают активацию путей, индуцирует рост клеток и пролиферацию [8]. Также известны данные, что эйкозаноиды и липидные медиаторы могут служить в качестве лигандов или коактиваторами для ряда ключевых транскрипционных факторов, таких как активатора пролиферации пероксисом рецепторов [9], ядерных белков [10], и активаторов протеина-1 [11]. Активация этих факторов транскрипции оказывает глубокое влияние на пролиферацию и дифференцировку клеток.

ПНЖК могут влиять на структуру липидов в клеточной мембране, а затем модифицировать клеточные процессы, например, рецептор-опосредованную сигнальную трансдукцию. Липидные рафты клеточной мембраны играют важную роль в регуляции стволовых клеток к самообновлению, клеточного цикла, выживании и индукции апоптоза [12, 13]. Модификация липидного состава клеток влияет на интенсивность обменных процессов и является компенсаторным механизмом, обеспечивающим функциональные возможности мембран при изменившихся условиях. Учитывая изложенное выше, актуальность этого вопроса не вызывает сомнения.

**Цель работы:** исследовать содержание жирных кислот в липидах мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани собаки.

**Материал и методика исследований.** Исследования проводились на кафедре физиологии, патофизиологии и иммунологии животных Национального университета биоресурсов и природопользования Украины. В исследованиях были использованы мезенхимальные стволовые клетки, полученные из жировой ткани собаки [14]. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых с экспериментальной и другой научной целью». Культивирование первичного материала из жировой ткани собаки проводили при стандартных условиях в CO<sub>2</sub> инкубаторе с содержанием CO<sub>2</sub> 5%, при температуре 37°C в среде Игла, модифицированной Дюльбекко с добавлением 15-20% фетальной сыворотки бычков и 1% антибиотика-антимикотика. Визуальную оценку процесса пролиферации клеток осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 40 (Carl Zeiss).

Определение жирнокислотного спектра липидов мезенхимальных стволовых клеток собаки проводилось согласно ДСТУ ISO 5508-2001 [15]. Подготовка проб проводилась по ДСТУ ISO 5509-2002 [16, 17]. Смесь метиловых эфиров жирных кислот анализировали на газовом

хроматографе Trace GC Ultra с пламенно-ионизационным детектором на капиллярной колонке SPTM-2560, 100 m x0,25 mm ID, 0,20  $\mu$ m film (Supelco). Идентификацию жирных кислот проводили с помощью стандартного образца Supelco 37 Component FAME Mix. Количественную оценку спектра ЖК проводили методом нормирования плоскостей пиков метилированных производных ЖК и определяли их содержание в процентах от суммарного содержания всех ЖК.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили общепринятыми методами вариационной статистики. Достоверность разницы показателей оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия между показателями сравнивали, считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты исследований и их обсуждение.** Через 10-12 сут культивирования первичного материала из жировой ткани собаки было зарегистрировано 70-90% конfluenceности культурального пластика клетками (рис. 1).

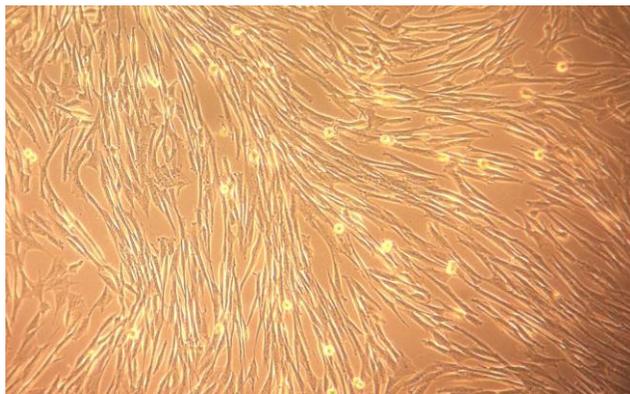


Рисунок 1 – Монослой стволовых клеток жировой ткани собаки

Клетки снимали с дна культуральной посуды с помощью раствора 0,25 трипсина с 0,02% этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA), рассеивали в соотношении 1:2 и пассажировали несколько раз с целью снижения гетерогенности культуры. Подготовленные стволовые клетки исследовали на содержание жирных кислот.

В спектре ЖК МСК собаки обнаружено коротко-, средне- и длинноцепочечные ЖК (рис. 2)

Насыщенные жирные кислоты (НЖК) экстрактов липидов мезенхимальных стволовых клеток собаки представлены в диапазоне от C6: 0 до C18: 0 (табл. 1). Их концентрация в экстракте росла в ряду: C8: 0

<C15: 0 <C6: 0 <C10: 0 <C12: 0 <C14: 0 <C18: 0 <C16: 0. Интересно отметить наличие в биологическом материале пентадекановой кислоты, которая относится к жирным кислотам с нечетным числом атомов углерода в цепи. Значение C15:0 для организма мало раскрыто, хотя ее определяют в различных биологических объектах, в том числе и в молоке коров.

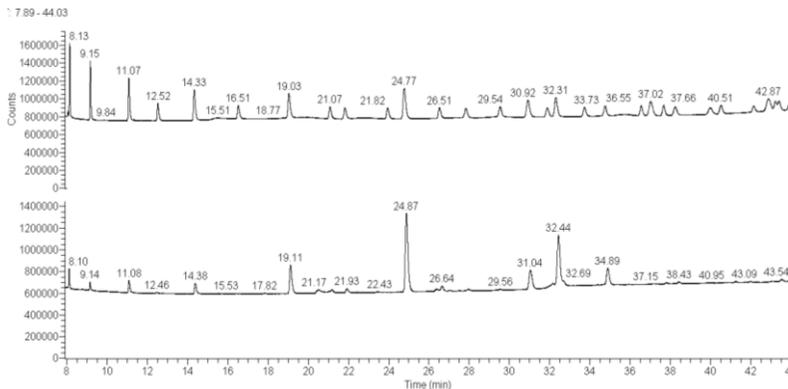


Рисунок 2 – Хроматограмма выхода пиков жирных кислот стандарта (а) и липидов мезенхимальных стволовых клеток собаки (б) (а – верхняя – стандарт, б – нижняя – проба)

Среди НЖК в количественном отношении преобладает пальмитиновая кислота, которая в среднем составляет 33,68% от суммы всех жирных кислот. Стеариновая и миристиновая кислоты составляют соответственно 11,12 и 10,18%. Четвертое место по количеству среди насыщенных жирных кислот занимает лауриновая кислота 3,08%. По данным авторов [18], она, в отличие от выше указанных, снижает концентрацию холестерина в крови и обладает тромбогенными свойствами.

Концентрация моноеновых жирных кислот в экстрактах мезенхимальных стволовых клеток собаки росла в ряду: C20 1 < C16: 1n9с < C18: 1n9с. Причем содержание олеиновой кислоты составляло  $21,63 \pm 0,05\%$  от общего количества выявленных кислот, а цис-11-эйкозеновой –  $0,81 \pm 0,01\%$ .

Процентное содержание полиненасыщенных жирных кислот в экстрактах мезенхимальных стволовых клеток собаки повышалось в ряду: C20: 2n6 < C20: 3n6 < C22: 2n6 < C20: 3n3 < C22: 6n3 < C22: 5n3 < C18: 2n6с. Среди полиеновых ННЖК преобладает линолевая (6,45%), низкое содержание наблюдалось в цис-11,14-эйкозатриеновой кислоте (0,04%).

Таблица – Показатели жирнокислотного состава липидов мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани собаки, %

n = 3, M ± m

C6:0	2,07 ± 0,02
C8:0	1,26 ± 0,02
C10:0	2,76 ± 0,03
C12:0	3,08 ± 0,04
C14:0	10,18 ± 0,03
C15:0	1,51 ± 0,04
C16:0	33,68 ± 0,03
C16:1	2,02 ± 0,04
C18:0	11,12 ± 0,05
C18:1n9c	21,63 ± 0,06
C18:2n6c	6,45 ± 0,05
C20:1	0,81 ± 0,02
C20:2n6	0,04 ± 0,01
C20:3n6	0,06 ± 0,01
C20:3n3	0,69 ± 0,04
C22:2	0,31 ± 0,02
C22:5n3	1,49 ± 0,02
C22:6n3	0,86 ± 0,03
Сума (Σ) насич. (НЖК)	65,65
Σ Ненасич (ННЖК)	34,35
НЖК+ННЖК	100,00
Σ Моноенові ННЖК	24,46
Σ Поліенові ННЖК	9,89
НЖК/ННЖК	1,91
ω3/ω6	0,46

Суммарный уровень НЖК выше суммарного уровня ННЖК, коэффициент насыщенности составляет 1,91. Общее количество НЖК в исследуемых образцах составляло 65,65%, тогда как ННЖК – 34,35%. Моноеновые жирные кислоты определены в количестве 24,46%, а полиеновые – 9,89%.

Следует отметить, что трансизомеры жирных кислот в МСК собаки отсутствуют. Наличие в пищевых продуктах трансизомеров ненасыщенных жирных кислот давно связывают с негативным влиянием на организм. Доказано, что трансжирные кислоты существенно повышают вероятность возникновения сердечно-сосудистых заболеваний. Среди омега-6 кислот в исследованных образцах преобладала линолевая кислота, среднее содержание которой составляло 6,45 ± 0,05%; обнаружены также эйкозатриеновая и докозагексаеновая кислоты.

Среди омега-3 кислот обнаружены цис-8,11,14-эйкозатриеновая, цис-7,10,13,16,19-докозапентаеновая и цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая кислоты. Среди омега-6 кислот установлено в аналитических

образцах наличие линолевой, цис-11,14-эйкозодиеновой, цис-8, 11,14-эйкозатриеновой кислот. Индекс соотношения полиненасыщенных жирных кислот п3 к п6 составляет 0,46.

**Заключение.** Таким образом, в составе липидов стволовых клеток, полученных из жировой ткани собаки, обнаружено 18 жирных кислот. Стволовые клетки содержат в липидах коротко-, средне- и длинноцепочечные жирные кислоты. Суммарное количество насыщенных жирных кислот в МСК собаки составляет 65,65%, среди которых преобладает пальмитиновая кислота – 33,68±0,03%. Суммарное количество ненасыщенных жирных кислот – 34,35, с преобладанием линолевой – 6,45±0,05%. Моноеновые жирные кислоты составляют 24,46%, а полиеновые – 9,89%. Коэффициент насыщенности составляет 1,91. Индекс соотношения п3 к п6 жирным кислотам липидов МСК жировой ткани составляет 0,46.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Copland I. B. Death and inflammation following somatic cell transplantation / I. B. Copland, J. Galipeau // *Semin Immunopathol.* 2011; 33: 535-550. doi: 10.1007 / s00281-011-0274-8
2. Mangi A. A. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts/ A. A. Mangi, N. Noiseux, D. Kong, H He, M. Rezvani, J. S. Ingwall // *Nat Med.* 2003; 9: 1195-1201.
3. Toma C. Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics / C. Toma, W.R., B. S Wagner., A. Schwartz, F. Villanueva // *Circ Res.* 2009; 104: 398-402. doi: 10.1161 / CIRCRESAHA.108.187724
4. Sarah K. Abbott Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance K. A. Sarah, L.E. Paul, A.A. Taleitha, A.J.Hulberta // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* Volume 1818, Issue 5, May 2012, Pages 1309-1317
5. Kang J. X. Concise review: Regulation of stem cell proliferation and differentiation by essential fatty acids and their metabolites / J. X. Kang, J. B. Wan, C. He // *Stem Cells.* 2014 May; 32 (5): 1092-8. doi: 10.1002 / stem.1620.
6. Fillmore N. Effect of fatty acids on human bone marrow mesenchymal stem cell energy metabolism and survival / N. Fillmore, A. Huqi, J.S. Jaswal, J. Mori // *PLoS One.* 2015 Mar 13, 10 (3): e0120257. doi: 10.1371 / journal.pone.0120257. eCollection 2015.
7. Turk H. F. Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids // H. F. Turk, R. S. Chapkin *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013; 88: 43-47.
8. Yun S. P. Interaction of profiling-1 and F-actin via a beta-arrestin-1 / JNK signaling pathway involved in prostaglandin E (2) -induced human mesenchymal stem cells migration and proliferation // S. P. Yun, J.M. Ryu, M.W. Jang // *J Cell Physiol* 2011; 226: 559-571
9. Rajasingh J. 15-Deoxy-delta (12,14) -prostaglandin J (2) regulates leukemia inhibitory factor signaling through JAK-STAT pathway in mouse embryonic stem cells / J. Rajasingh, J.Bright // *Exp Cell Res* 2006; 312: 2538-2546.], [2424 Liu Q, Merkler KA, Zhang X et al. Prostaglandin F2alpha suppresses rat steroidogenic acute regulatory protein expression via induction of Yin Yang 1 protein and recruitment of histone deacetylase 1 protein. *Endocrinology* 2007; 148: 5209-5219.
10. Chapkin R. S. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation/ R. S. Chapkin, W. Kim, J.R. Lupton // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009; 81: 187-191.

11. Iwahashi H. Prostaglandin E2 stimulates AP-1-mediated CD14 expression in mouse macrophages via cyclic AMP-dependent protein kinase A / H. Iwahashi, A. Takeshita, S. Hanazawa // J Immunol 2000; 164: 5403-5408.].
12. Lee M. Y. Lipid rafts play an important role for maintenance of embryonic stem cell self-renewal / M. Y. Lee, J. M. Ryu, S. H. Lee// J Lipid Res 2010; 51: 2082-2089.
13. Yamazaki S. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells / S. Yamazaki, A. Iwama, S. Takayanagi // EMBO J 2006; 25: 3515-3523.
14. Кладницька Л. В. Получение культуры стволовых клеток из жировой ткани собаки / Л. В. Кладницькая, А. Й. Мазуркевич, С. В. Величко, О. В. Жигунова// Вестник Сумского национального аграрного университета; серия «Ветеринарная медицина», выпуск 6(38), – Сумы 2016, – С.19-24
15. ДСТУ ISO 5508-2001 Жири тваринні і рослинні та олії. Аналіз методом газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот.
16. ДСТУ ISO 5509-2002 Жири тваринні і рослинні та олії. Приготування метилових ефірів жирних кислот.
17. Синяк К. М. Метод приготовления липидов крови для газохроматографического исследования / К. М. Синяк, М. Я. Оргела, В. И. Крук // Лаб. дело. Киев, 1976; 1: – С. 37-41.
18. Grundy S. M. What is the desirable ratio of saturated, polyunsaturated, and monounsaturated fatty acids in the diet? / S. M. Grundy // Am. J. Clin. Nutr. - 1997. - Vol.66. -P. 988-990.

УДК 636:612.33

## **КИШЕЧНЫЙ ТРАНСПОРТ ЖЕЛЕЗА В СОЛЕВОЙ И ХЕЛАТНОЙ ФОРМАХ КИШЕЧНИКОВ ЖВАЧНЫХ В УСЛОВИЯХ IN VITRO**

**Ю. К. Ковалёнок**

УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины»

г. Витебск, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 210026, г. Витебск, ул. Доватора 7/11

e-mail: uovgavm@vitebsk.by)

**Ключевые слова:** железо, всасываемость, биодоступность, телята.

**Аннотация.** В условиях модельного эксперимента *in vitro* установлены значимые ( $P < 0,001$ ) различия механизмов кишечного транспорта Fe, находящихся в солевых и хелатных формах. Предполагается, что хелатирование Fe этилендиаминтетраацетатом приводит к всасыванию элемента по парацеллюлярному пути.

## **TRANSPORT OF IRON IN SALT AND CHELATE FORMS BY INTESTINE OF RUMINANTS IN VITRO**

**Y. K. Kovalionok**