

Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.

Series: Veterinary sciences

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.32718/nvlvet11120
<https://nvlvet.com.ua/index.php/journal>

UDC 577.125

Content of fatty acids in lipids of adipose derived mesenchymal stem cells

L. V. Kladnytska¹✉, V. S. Velychko¹, V. A. Tomchuk¹, V. Z. Salata², S. V. Velychko¹, N. V. Dyshlyuk¹,
T. A. Mazurkevich¹, S. V. Midyk¹, R. R. Bokotko¹, T. L. Savchuk¹

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Ukraine

Article info

Received 26.06.2023

Received in revised form

27.07.2023

Accepted 28.07.2023

National University of Life and
Environmental Science of Ukraine,
Heroiv Oborony Str., 15,
Kyiv, 03041, Ukraine.
Tel.: +38-063-186-62-33
E-mail: Kladlarisa@ukr.net

Stepan Gzhytskyi National
University of Veterinary Medicine
and Biotechnologies Lviv,
Pekarska Str., 50, Lviv,
79010, Ukraine.

Kladnytska, L. V., Velychko, V. S., Tomchuk, V. A., Salata, V. Z., Velychko, S. V., Dyshlyuk, N. V., Mazurkevich, T. A., Midyk, S. V., Bokotko, R. R., & Savchuk, T. L. (2023). Content of fatty acids in lipids of adipose derived mesenchymal stem cells. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 25(111), 124–130. doi: 10.32718/nvlvet11120

The content of fatty acids in the lipids of mesenchymal stem cells of dog adipose tissue culture was studied. Mesenchymal stem cells of dog adipose tissue culture were obtained by culturing the primary material in a CO₂ incubator with a content of 5 % CO₂, at a temperature of 37 °C in DMEM medium with the addition of 10–15 % fetal bovine serum and 1 % antibiotic-antimycotic. When the confluency of the monolayer reached 70–80 %, the cells were transferred to a suspension and subcultivated in order to reduce the heterogeneity of the culture and obtain a sufficient amount of biological material. The lipids of the obtained stem cells were analyzed for the content of fatty acids by the method of thin-layer gas-liquid chromatography. Determination of the content of lipids of fatty acids in FSK of a cat was carried out by the Folch method. A mixture of fatty acid methyl esters was analyzed on a Trace GC Ultra gas chromatograph with a flame ionization detector on a capillary column SPTM –2560, 100 m x 0.25 mm ID, 0.20 μm film (Supelco). Identification of fatty acids was carried out using a standard sample of Supelco 37 Component FAME Mix. Quantitative assessment of the LC spectrum was carried out by the method of normalization of the peak planes of methylated LC derivatives and their content was determined as a percentage of the total content of all LC. The conducted study of the content of fatty acids in lipids made it possible to reveal certain features of the lipid metabolism of mesenchymal stem cells cultured in dog adipose tissue. A high content of oleic acid, characteristic of cells resistant to apoptosis and with high proliferative potential, was determined; a high ratio of unsaturated linoleic to saturated stearic acid (C18:1/C18:0), which reflects the high activity of the stearyl-coenzyme-desaturase enzyme and, indirectly, the active state of the Wnt/β-catenin signaling pathway; inability to lengthen the chain of saturated fatty acids; lack or low activity of de novo synthesis of omega-6 polyunsaturated fatty acids. 18 fatty acids were found in the composition of lipids of fetal stem cells of a cat, of the saturated ones - the most palmitic acid (33.70 ± 0.02 %), of the monounsaturated ones - oleic acid (21.63 ± 0.03 %), of the polyunsaturated ones - linoleic acid (6.45 ± 0.07 %). The least amount of cis-,11,14-eicosadienoic acid (0.04 ± 0.01 %) was found in the composition of cell lipids. The total amount of saturated fatty acids in dog mesenchymal stem cell lipids was 65.65 ± 0.02 %, unsaturated fatty acids - 34.35 ± 0.02 %. Monoene fatty acids were determined in the amount of 24.46 ± 0.02 %, and polyene - 9.89 ± 0.02 %. The ratio index of polyunsaturated fatty acids ω 3 to ω 6 is 0.40. Lipids of mesenchymal stem cells of adipose tissue culture were characterized by a lower content of monoene unsaturated fatty acids 24.46 ± 0.02; (P < 0.05), with a higher content of ω3 fatty acids 3.04 ± 0.02 %; (P < 0.05), with a lower content of ω6 fatty acids 6.86 ± 0.02 %; (P < 0.05) in contrast to lipids of red bone marrow stem cells.

Key words: mesenchymal stem cells of adipose tissue culture, dogs, fatty acids, lipids, saturated, unsaturated.

Вміст жирних кислот в ліпідах мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини

Л. В. Кладницька^{1✉}, В. С. Величко¹, В. А. Томчук¹, В. З. Салата², С. В. Величко¹, Н. В. Дишлюк¹, Т. А. Мазуркевич¹, С. В. Мідик¹, Р. Р. Бокотько¹, Т. Л. Савчук¹

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна

²Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів, Україна

Досліджено вміст жирних кислот в ліпідах мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини собаки. Мезенхімні стовбурові клітини культури жирової тканини собаки отримували шляхом культивування первинного матеріалу в CO₂ інкубаторі з вмістом 5 % CO₂, за температури 37 °C у середовищі DMEM з додаванням 10–15 % фетальної сироватки великої рогатої худоби та 1 % антибіотика-антимікотика. Коли конфлюєтність моношару сягала 70–80 %, клітини переводили в суспензію та проводили субкультивування з метою зниження гетерогенності культури та отримання достатньої кількості біологічного матеріалу. Ліпіди отриманих стовбурових клітин досліджували на вміст жирних кислот методом тонкошарової газорідної хроматографії. Визначення вмісту ліпідів жирних кислот ФСК kota проводили методом Фолча. Суміші метилових ефірів жирних кислот аналізували на газовому хроматографі Trace GC Ultra з полум'яно-іонізаційним детектором на капілярній колонці SPTM–2560, 100 m × 0,25 mm ID, 0,20 μm film (Supelco). Ідентифікацію жирних кислот проводили за допомогою стандартного зразка Supelco 37 Cotrolent FAME Mix. Кількісну оцінку спектру ЖК проводили методом нормування площин піків метильованих похідних ЖК і визначали їхній вміст у відсотках від сумарного вмісту усіх ЖК. Проведене дослідження вмісту жирних кислот в ліпідах дало можливість виявити певні особливості ліпідного обміну мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини собаки. Визначено високий вміст олеїнової кислоти, характерний для клітин, резистентних до апоптозу та з високим проліферативним потенціалом; високе співвідношення ненасиченої лінолевої до насиченої стеаринової кислоти (C18:1/C18:0), яке відображає високу активність фермента стеарол-коензим-десатурази та опосередковано – активний стан Wnt/β-катенін сигнального шляху; нездатність до подовження ланцюга насичених жирних кислот; відсутність або низьку активність синтезу de novo омега-6 поліненасичених жирних кислот. У складі ліпідів фетальних стовбурових клітин kota виявлено 18 жирних кислот, з насичених – найбільше пальмітинової кислоти (33,70 ± 0,02 %), з мононенасичених – олеїнової кислоти (21,63 ± 0,03 %), з поліненасичених – лінолевої кислоти (6,45 ± 0,07 %). Найменше у складі ліпідів клітин виявлено ціс-,11,14-ейкозадієнової кислоти (0,04 ± 0,01 %). Сумарна кількість насичених жирних кислот у ліпідах мезенхімній стовбурових клітин собаки становила 65,65 ± 0,02%, ненасичених жирних кислот – 34,35 ± 0,02 %. Моноеніві жирні кислоти визначено у кількості 24,46 ± 0,02%, а полієнові – 9,89 ± 0,02%. Індекс співвідношення поліненасичених жирних кислот ω 3 до ω 6 становить 0,40. Ліпіди мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини характеризувалися нижчим умістом моноєнових ненасичених жирних кислот 24,46 ± 0,02; (P < 0,05), більшим вмістом ω3 жирних кислот 3,04 ± 0,02 %; (P < 0,05), меншим вмістом ω6 жирних кислот 6,86 ± 0,02 %; (P < 0,05) на противагу ліпідам стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку.

Ключові слова: мезенхімні стовбурові клітини культури жирової тканини, собаки, жирні кислоти, ліпіди, насичені, ненасичені.

Вступ

Мезенхімні стовбурові клітини за спрямованістю свого енергетичного метаболізму в значній мірі нагадують неопластичні клітини.

Концепція щодо асоціації енергетичного метаболізму з проліферативною активністю клітин була запропонована ще Отто Варбургом у 1956 році. Для МСК, як і для інших клітин з ознаками “стовбуровості”, характерним є активізація гліколізу замість окиснення субстратів у циклі Кребса. Хоча гліколіз менш енергетично вигідний шлях, він супроводжується активізацією пентозо-фосфатного шунту і синтезу макромолекул, необхідних для швидко проліферуючих клітин. Аналогічну функцію у стовбурових клітинах виконує активізація процесу окиснення жирних кислот (Ishida et al., 2020).

Широко досліджується вплив жирних кислот і їх метаболітів на проліферативну активність та диференціацію стовбурових клітин. Насамперед, увага приділяється незамінним жирним кислотам. Незамінні жирні кислоти і їх метаболіти можуть чинити свою біологічну дію через кілька механізмів. Перш за все, поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) можуть бути включені в склад фосфоліпідів поверхневих мембран, що змінює їх хімічні та фізичні властивості і, таким

чином, модулює активність асоційованих з мембранами функціональних білків, насамперед, рецепторів біологічно активних молекул (Bi et al., 2019). Простагландин E₂, утворений з арахідонової кислоти, може зв'язуватись з рецепторами, які забезпечують активацію шляхів, що індукують ріст клітин і проліферацію. За рахунок зв'язування з рецептором E, простагландин E₂, що секретують МСК, підтримує їх проліферацію аутокринним способом (Wu et al., 2019). Важливими є дані, що ейкозаноїди і ліпідні медіатори можуть служити в якості лігандів або коактиваторами для ряду ключових транскрипційних факторів, таких як рецептори, що активуються пероксисомним проліфератором ядерного фактору Каппа В тощо (Cornacchia et al., 2019). Активація зазначених сигнальних шляхів сприяє високій проліферативній активності клітин. Досліджено, що терапевтична ефективність МСК при лікуванні травматичних пошкоджень головного мозку корелює з рівнем секреції ними простагландину E₂. Особливо простагландин E₂ впливає на життєздатність дофамінергічних нейронів і з цим пов'язують ефективність застосування МСК (які секретують простагландини) у пацієнтів на хворобу Паркінсона (Clémot et al., 2020). Є дані, що секреція простагландину E₂ – основний механізм репрограмування макрофагів з M1 до M2 фенотипу під

впливом МСК (Yamamoto et al., 2019), підвищення вмісту Т-регуляторних клітин (Snodgrass & Brune, 2019). ПНЖК можуть також впливати на структуру ліпідів у клітинній мембрані, а потім модифікувати клітинні процеси, такі як рецептор-опосередковану сигнальну трансдукцію. Ліпідні рафти клітинної мембрани відіграють важливу роль у регуляції стовбурових клітин до самооновлення, клітинного циклу, виживання та індукції апоптозу. Зокрема, саме у ліпідних рафтах локалізується білок CD133, який вважається одним із основних біомаркерів стовбурових клітин, що опосередковує їх здатність до самопідтримання і диференціювання у різних напрямках. Модифікація ліпідного складу клітин впливає на інтенсивність обмінних процесів і є тим компенсаторним механізмом, що забезпечує функціональні можливості мембран за змінених умов (Austin Pickens et al., 2019).

Доведено, що підвищення вмісту ненасичених жирних кислот та їх метаболітів у середовищі культивування призводить до підвищення коефіцієнту проліферації та процесів диференціації стовбурових клітин різних типів (Dec et al., 2023).

Поряд з цим є результати, які свідчать щодо негативного впливу насичених жирних кислот на життєздатність та підвищення чутливості до індукції апоптозу мезенхімних стовбурових клітин кісткового мозку людини. Так, з'ясовано, що пальмітинова кислота знижує проліферацію та індукує апоптоз МСК кісткового мозку людини, а також спричинює цитотоксичний стрес кардіальних міоцитів (Yaghooti et al., 2019). Ефект обумовлений тим, що пальмітинова кислота здатна підвищувати концентрацію в мітохондріях клітин реактивних форм кисню, пошкоджувати мітохондріальну ДНК та активувати каспазно-залежний шлях індукції апоптозу. Ці результати дають можливість припустити, що насичені жирні кислоти знижують виживання МСК кісткового мозку в природних умовах, тобто *in vivo*. Це припущення знаходить підтвердження. Так, встановлено, що у хворих на цукровий діабет 2 типу та ожиріння концентрація пальмітинової кислоти значно підвищена, що має негативний вплив на життєздатність та функціональні властивості трансплантованих МСК (Alsaqati et al., 2020). Водночас Boland et al. показали, що негативний вплив пальмітату може бути нівельований за введення IFN- γ і TNF- α (Boland et al., 2018).

Інший аспект впливу жирних кислот на фізіологічні властивості МСК – участь у синтезі біологічно активних молекул і речовин.

В експериментах, проведених Smith A. et al. (2012) до культур МСК кісткового мозку людини додавали 20 ммоль ненасичених жирних кислот – ліноленової або олеїнової. Культуральне середовище змінювали через день, кожний раз додаючи нову порцію жирної кислоти. За 7 днів культивування в культуральному середовищі МСК під впливом олеїнової кислоти майже втричі збільшувалась концентрація ключових медіаторів ангіогенезу: фактора росту ендотелію судин, інтерлейкінів ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, а також нітриту нітрогену. Під впливом олеїнової кислоти відбувалось підвищення тільки секреції фактора росту ендотелію судин (Smith et al., 2012).

Yaghooti et al. (2019) показали, що пальмітинова кислота не тільки знижує проліферативну активність МСК кісткового мозку людини, але і сприяє їх диференціюванню і підвищенню секреції ІЛ-6, фактора росту ендотелію судин. Цей процес супроводжується активацією сигнальних шляхів трансдукції і підвищенням фосфорилування кінази р38 і кінази позаклітинного матриксу. Обробка МСК КМ бутановою (масляною) кислотою індукувала їх спонтанне диференціювання у хондроцити (Kang et al., 2014).

Таким чином, жирні кислоти впливають на різні аспекти фізіологічного стану мезенхімальних стовбурових клітин, визначаючи їх життєздатність, проліферативну активність, імуномодулюючі і ангіогенні властивості. З огляду на вищевикладене актуальність визначення вмісту жирних кислот у складі ліпідів МСК різного походження не викликає сумніву.

Мета дослідження

Мета роботи – дослідження жирних кислот ліпідів мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини.

Матеріал і методи досліджень

Експерименти проводили відповідно до вимог “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою” (Страсбург, 1986 р.).

Мезенхімні стовбурові клітини культури жирової тканини собаки отримували модифікованим методом експланта. Для цього жирову тканину обробляли фосфатно-буферним розчином з додаванням антибіотика-антимікотика, механічно подрібнювали на фрагменти розміром 1–3 мм³ і вносили їх у одноразові пластикові чашки Петрі, додавали середовище культивування DMEM, фетальну сироватку великої рогатої худоби, 1 % антибіотика-антимікотика (Sigma, США). Культивування первинного проводили в CO₂ інкубаторі з вмістом 5 % CO₂, за температури 37 °С. Адаптацію, утворення колоній та проліферацію клітин здійснювали з використанням інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Carl Zeiss).

Визначення вмісту жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин проводили за ДСТУ ISO 5508-2001. Підготовку проб проводили за ДСТУ 150 5509-2002 (Folch et al., 1957; Siniak et al., 1976). Суміш метилових ефірів жирних кислот аналізували на газовому хроматографі Trace GC Ultra з полум'яно-іонізаційним детектором на капілярній колонці SPTM –2560, 100 m x 0,25 mm ID, 0,20 μ m film (Supelco). Ідентифікування жирних кислот проводили за допомогою стандартного зразка Supelco 37 Component FAME Mix. Кількісну оцінку спектру жирних кислот проводили методом нормування площин піків метильованих похідних жирних кислот і визначали їхній вміст у відсотках від сумарного вмісту усіх жирних кислот.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Достовірність різниці показників оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Відмінності між пока-

зниками, що порівнювались, вважали достовірними за рівня значимості $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Первинний матеріал культивували упродовж 8–10 діб (рис. 1). На 8–10 добу культивування первинного матеріалу було зареєстровано 70–90 % конфлюєнтності моношару (рис. 3).

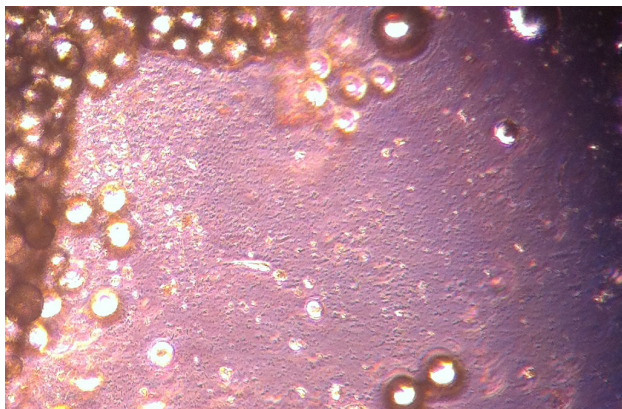


Рис. 1. Первинний матеріал – жирова тканина собаки. Нативний препарат, х 100

На 3–4 добу культивування реєстрували прикріплення клітин до культурального посуду та формування колоній навколо колонієутворюючих одиниць (рис. 2).

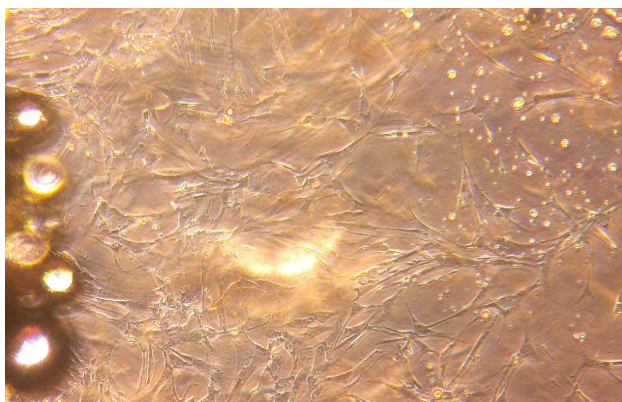


Рис. 2. Формування колоній стовбурових клітин культури жирової тканини собаки. Нативний препарат, х 100

Кожні три доби середовище культивування змінювали на нове, або частково замінювали на нове для збереження необхідної кількості факторів росту в мікрооточенні клітин.

На 8–10 добу культивування культуру клітин знімали з дна культурального посуду з використанням розчину 0,25 % трипсину з 0,02 % етилендіамінтетраоцтової кислоти (трипсин/ЕДТК). Контроль відшарування клітин з поверхні культуральних чашок проводили за допомогою інвертованого мікроскопа. Дію трипсину/ЕДТК нейтралізували внесенням у суспензію фетальної сироваткою великої рогатої худоби.



Рис. 3. Моношар стовбурових мезенхімних клітин культури жирової тканини. Нативний препарат, х 100

З метою зниження гетерогенності культури та для отримання необхідної кількості клітин для проведення дослідження вмісту жирних кислот в ліпідах проводили пасажування декілька разів. Досліджували вміст жирних кислот в ліпідах мезенхімних стовбурових клітин 4 і 5 пасажів.

На хроматографі виходу піків ліпідів фетальних стовбурових клітин культури жирової тканини собаки виявлено коротко-, середньо- та довголанцюгові жирні кислоти.

Насичені жирні кислоти (НЖК) екстрактів ліпідів мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини собаки були представлені в діапазоні від C6:0 до C18:0 Їх кількість в екстракті зростала в ряді в наступній послідовності: C8:0 < C15:0 < C6:0 < C10:0 < C12:0 < C14:0 < C18:0 < C16:0 (табл. 1).

Із групи НЖК у кількісному відношенні переважала пальмітинова кислота, яка в середньому становила $33,70 \pm 0,02$ % від суми всіх жирних кислот. Міристинова і стеаринова кислоти становили відповідно $10,18 \pm 0,04$ % та $11,12 \pm 0,07$ %. Четверте місце за кількістю серед насичених жирних кислот займала лауринова кислота – $3,08 \pm 0,01$ %.

Кількість моноєнових жирних кислот у екстрактах ліпідів мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини зростала в ряду в наступному порядку: C20:1 < C16:1n9c < C18:1n9c. При чому, вміст олеїнової кислоти становив $21,63 \pm 0,03$ % від загальної кількості виявлених кислот, а вміст цис-11-ейкозенової – $0,81 \pm 0,01$ %.

Відсотковий вміст поліненасичених жирних кислот у екстрактах ліпідів мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини підвищувався в ряду в наступному порядку: C20:2n6 < C20:3n3 < C22:2n6 < C20:3n3 < C20:6n3 < C22:5n3 < C18:2n6c.

Серед полієнових ненасичених жирних кислот (ННЖК) переважала ліолева – $6,45 \pm 0,07$ %, а найменша кількість – цис-8,11,14-ейкозадієнової кислоти – $0,04 \pm 0,01$ %.

Сумарна кількість НЖК вища за такий ННЖК, коефіцієнт насиченості становить 1,91.

Загальна кількість НЖК у досліджуваних зразках становила $65,65 \pm 0,02$ %, тоді як ННЖК – $34,35 \pm 0,02$ %. Моноєнові жирні кислоти визначено у кількості $24,46 \pm 0,02$ %, а полієнові – $9,89 \pm 0,02$ %.

Таблиця 1

Уміст жирних кислот у ліпідах стовбурових клітин культури жирової тканини, % ($M \pm m, n = 3$)

Найменування показників	Масова частка жирної кислоти,
Масляна кислота (C6:0)	2,08 ± 0,01
Капронова кислота (C8:0)	1,26 ± 0,02
Капринова кислота (C10:0)	2,76 ± 0,01
Лауринова кислота (C12:0)	3,08 ± 0,01
Міристинова кислота (C14:0)	10,18 ± 0,04
Пентадеканова кислота (C15:0)	1,51 ± 0,02
Пальмітинова кислота (C16:0)	33,70 ± 0,02
Пальмітолеїнова кислота (C16:1n9c)	2,02 ± 0,01
Стеаринова кислота (C18:0)	11,12 ± 0,07
Олеїнова кислота (C18:1n9c)	21,63 ± 0,03
Лінолева кислота (C18:2n6c)	6,45 ± 0,07
Ціс-11-ейкозенова кислота (C20:1)	0,81 ± 0,01
Ціс-11,14-ейкозадієнова кислота (C20:2n6)	0,04 ± 0,01
Ціс-8,11,14-ейкозатрієнова кислота (C20:3n6)	0,06 ± 0,01
Ціс-11,14,17-ейкозатрієнова кислота (C20:3n3)	0,69 ± 0,02
Ціс-13,16-докозадієнова кислота (C22:2n6)	0,31 ± 0,01
Ціс-7,10,13,16,19-докозапентаєнова кислота (C22:5n3)	1,49 ± 0,01
Ціс-4,7,10,13,16,19-докозагексаєнова кислота (C22:6n3)	0,86 ± 0,04
∑ НЖК, %	65,65 ± 0,02
∑ ННЖК, %	34,35 ± 0,02
НЖК/ННЖК	1,91
∑ Моноєнові ННЖК, %	24,46 ± 0,02
∑ Полієнові ННЖК, %	9,89 ± 0,02
n 3/ n 6	1,91

Важливо зазначити, що транс-ізомери жирних кислот у МСК культури жирової тканини були відсутні.

Уміст полієнної лінолевої кислоти C18:2n6c був достовірно нижчий в зразках стовбурових клітин нейтрального походження та в МСК культури жирової тканини порівняно з МСК культури кісткового мозку. В зазначених зразках він становив $6,27 \pm 0,01$ %, $6,45 \pm 0,07$ % та $8,51 \pm 0,04$ %, відповідно ($P < 0,05$).

За результатами наших досліджень високим був вміст $\omega 3$ жирних кислот у ліпідах зразків МСК культури жирової тканини, тоді як вміст $\omega 6$ жирних кислот у цих зразках – навпаки, був достовірно менший ніж в ліпідах МСК культури червоного кісткового мозку та нервової тканини (табл. 2).

Таблиця 2

Сумарний вміст насичених, ненасичених жирних кислот, $\omega 3$ та $\omega 6$ у ліпідах стовбурових клітин культури жирової тканини, % ($M \pm m, n = 3$)

Жирні кислоти	Масова частка жирної кислоти
Сума (∑) насичених жирних кислот (НЖК), %	65,65 ± 0,02
Сума (∑) ненасичених жирних кислот (ННЖК), %	34,35 ± 0,02
Сумарна кількість (НЖК + ННЖК), %	100,00
Сума (∑) моноєнових ненасичених жирних кислот ННЖК, %	24,46 ± 0,02
Сума (∑) полієнових ненасичених жирних кислот ННЖК, %	9,89 ± 0,02
Співвідношення НЖК/ННЖК	1,91
Співвідношення $\omega 3/\omega 6$	0,46
Кількість $\omega 3$, %	3,04 ± 0,02
Кількість $\omega 6$, %	6,86 ± 0,02

Виявлена висока концентрація олеїнової кислоти в МСК культури жирової тканини ранніх пасажів культивування може бути однією з причин високої резистентності до апоптозу, індукованого безсироватковим культивуванням. Відомо, що апоптоз МСК культури кісткового мозку людини індукується підвищенням вмістом у культуральному середовищі пальмітинової кислоти (C16:0), однак він пригнічується при наявності, крім пальмітинової, також і олеїнової кислоти (C18:1). Якщо пальмітинова кислота здатна підвищувати концентрацію в мітохондріях клітин реактивних

форм кисню, пошкоджувати мітохондріальну ДНК та активувати каспазно-залежний апоптоз, то олеїнова кислота нівелює всі зазначені шляхи негативного впливу пальмітинової кислоти.

Ще одним наслідком високого вмісту олеїнової кислоти в МСК культури жирової тканини може бути здатність клітин до синтезу факторів росту судин при подальшому диференціюванні. В експериментах з культурою гладком'язевих клітин судин шурів встановлено, що олеїнова кислота в залежності від дози підвищує експресію мРНК фактору росту ендотелію

судин шляхом активації декількох сигнальних шляхів (Akt, mTOR, ERK-1/2, PKC-beta) (Doronzo et al., 2013).

Ми не виявили у спектрі жирних кислот МСК різного походження присутності насичених жирних кислот з довгим вуглеводним ланцюгом (C20:0, C22:0, C24:0). Аналогічні дані отримали Tigistu-Sahle et al. (2017) при дослідженні МСК культури кісткового мозку людини і зробили висновок про нездатність стовбурових клітин до подовження ланцюга насичених жирних кислот. На наш погляд, така характерна риса ліпідного обміну відображає саме особливості стовбурової клітини.

Наявність незамінних поліненасичених жирних кислот в екстрактах МСК в основному відображає їх присутність у поживному середовищі. Відомо, що в багатьох клітинах може відбуватись синтез поліненасичених жирних кислот із коротколанцюгового попередника. Так, при активному метаболізмі лінолевої кислоти (C18:2n6c) відбувається утворення спочатку гама-лінолевої кислоти (C18:3n6c), потім дігомогамалінолевої кислоти (C20:3n6c), арахідонової (C20:4n6c) і докозатетраєнової (C22:4n6c) омега-6 кислот. Хоча в досліджених зразках МСК в достатній кількості була присутня лінолева кислота, ми не виявили жодного метаболіту зазначеного шляху перетворення. Тому ми вважаємо, що даний шлях не є активним у мезенхімних стовбурових клітинах.

При утворенні Омега-3 жирних кислот первинний метаболіт альфа-ліноленова кислота (C18:3n3c) перетворюється в докозапентаєнову (C22:5n3) і докозагексаєнову (C22:6n3) кислоти (Lo Van et al., 2019). Ми виявили ці кислоти в більшій кількості в МСК культури жирової та нервової тканини порівняно з МСК культури кісткового мозку. Розбіжності в концентрації були достовірні ($P < 0,05$). Крім того, за результатами наших досліджень вміст омега-3 жирних кислот у ліпідах СК жирової та нервової тканини був достовірно вищим, а співвідношення омега-3 і омега-6 – достовірно нижчим порівняно з МСК культури кісткового мозку ($P < 0,05$). Ми пов'язуємо це з особливостями отримання МСК культури жирової і нервової тканин. Як зазначалось у розділі “Матеріали і методи”, клітини цих тканин культивували модифікованим методом експланту. Це дозволяло уникнути ушкоджуючого механічного та хімічного впливу на клітини, зберегти тканинні цитокіни і фактори росту та забезпечити їх надходження з фрагментів тканини у середовище. Такий метод культивування призводить і до підвищення концентрації омега-3 жирних кислот у поживному середовищі, оскільки саме в клітинах нервової і жирової тканини в нормі концентрується переважна кількість омега-3 кислот.

Ці результати не виключають також і можливості синтезу *de novo* докозапентаєнової (C22:5n3) і докозагексаєнової (C22:6n3) кислот мезенхімними стовбуровими клітинами культури жирової. Так, в дослідженні Tigistu-Sahle et al. (2017) було показано, що МСК культури кісткового мозку людини за культивування у звичайному поживному середовищі практично не синтезують омега-3 жирні кислоти, але в умовах високої концентрації альфа-ліноленової кислоти такий синтез активується.

Висновки

Таким чином, проведене дослідження складу жирних кислот у ліпідах дало можливість виявити певні особливості ліпідного обміну МСК, а саме: високий вміст олеїнової кислоти $21,63 \pm 0,03$ %, характерний для клітин, резистентних до апоптозу та з високим проліферативним потенціалом; високе співвідношення ненасиченої лінолевої до насиченої стеаринової кислоти (C18:1/C18.0), яке відображає високу активність фермента SCD та опосередковано – активний стан Wnt/ β -катенін сигнального шляху; нездатність до подовження ланцюга насичених жирних кислот; відсутність або низьку активність синтезу *de novo* омега-6 поліненасичених жирних кислот.

У складі ліпідів фетальних стовбурових клітин kota виявлено 18 жирних кислот, з насичених – найбільше пальмітинової кислоти ($33,70 \pm 0,02$ %), з мононенасичених – олеїнової кислоти ($21,63 \pm 0,03$ %), з поліненасичених – лінолевої кислоти ($6,45 \pm 0,07$ %). Найменше у складі ліпідів клітин виявлено ціс-,11,14-ейкозадієнової кислоти ($0,04 \pm 0,01$ %).

Сумарна кількість насичених жирних кислот у ліпідах мезенхімних стовбурових клітин собаки становила $65,65 \pm 0,02$ %, ненасичених жирних кислот – $34,35 \pm 0,02$ %. Моноєнові жирні кислоти визначено у кількості $24,46 \pm 0,02$ %, а полієнові – $9,89 \pm 0,02$ %. Індекс співвідношення поліненасичених жирних кислот $\omega 3$ до $\omega 6$ становить 0,40.

Ліпіди мезенхімних стовбурових клітин культури жирової тканини характеризувалися нижчим вмістом моноєнових ненасичених жирних кислот $24,46 \pm 0,02$; ($P < 0,05$), більшим вмістом $\omega 3$ жирних кислот $3,04 \pm 0,02$ %; ($P < 0,05$), меншим вмістом $\omega 6$ жирних кислот $6,86 \pm 0,02$ %; ($P < 0,05$) на противагу ліпідам стовбурових клітин культури червоного кісткового мозку.

Відомості про конфлікт інтересів

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів в даній роботі.

References

- Abu-Remaih, M., Gerson, A., Farago, M., Nathan, G., Alkalay, I., Zins Rousso, S., et al. (2010). Oct-3/4 regulates stem cell identity and cell fate decisions by modulating Wnt/ β -catenin signalling. *EMBO J.*, 29(19), 3236–3248. DOI: 10.1038/emboj.2010.200.
- Alsaqati, M., Heine, V., & Harwood, A. (2020). Pharmacological intervention to restore connectivity deficits of neuronal networks derived from ASD patient iPSC with a TSC2 mutation. *Mol. Autism*, 11(1), 80. DOI: 10.1186/s13229-020-00391-w
- Austin Pickens, C., Yin, Z., Sordillo, L. M., & Fenton, J. I. (2019). Arachidonic acid-derived hydroxyecosatetraenoic acids are positively associated with colon polyps in adult males: a cross-sectional study. *Sci Rep*, 9, 12033. DOI: 10.1038/s41598-019-48381-0.
- Bi, J., Ichu, T.-A., Zanca, C., Furnari, F. B., Cravatt, B. F., Mischel, P. S. (2019). Oncogene Amplification in Growth Factor Signaling Pathways Renders Cancers De-

- pendent on Membrane Lipid Remodeling. *Cell Metabolism*, 30(3), 525–538. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.06.014.
- Boland, L., Burand, A. J., Brown, A. J., et al. (2018). IFN- γ and TNF- α pre-licensing protects mesenchymal stromal cells from the pro-inflammatory effects of palmitate. *Mol. Ther.*, 26(3), 860–873. DOI: 10.1016/j.yth.2017.12.013.
- Clémot, M., Sênos Demarco, R., & Jones, D. L. (2020). Lipid Mediated Regulation of Adult Stem Cell Behavior. *Front Cell Dev Biol*, 8, 115. DOI: 10.3389/fcell.2020.00115.
- Cornacchia, D., Zhang, C., Zimmer, B., Chung, S. Y., Fan, Y., Soliman, M. A., Tchieu, J., Chambers, S. M., Shah, H., Paull, D., Konrad, C., Vincendeau, M., Noggle, S. A., Manfredi, G., Finley, L. W. S., Cross, J. R., Betel, D., & Studer, L. (2019). Lipid Deprivation Induces a Stable, Naive-to-Primed Intermediate State of Pluripotency in Human PSCs. *Cell Stem Cell*, 25(1), 120–136. DOI: 10.1016/j.stem.2019.05.001.
- Dec, K., Alsaqati, M., Morgan, J., Deshpande, S., Wood, J., Hall, J., & Harwood, A. J. (2023). A high ratio of linoleic acid (n-6 PUFA) to alpha-linolenic acid (n-3 PUFA) adversely affects early stage of human neuronal differentiation and electrophysiological activity of glutamatergic neurons *in vitro*. *Front Cell Dev Biol*, 11, 1166808. DOI: 10.3389/fcell.2023.1166808.
- Doronzo, G., Viretto, M., Barale, C., Russo, I., Mattiello, L., Anfossi, G., & Trovati, M. (2013). Oleic acid increases synthesis and secretion of VEGF in rat vascular smooth muscle cells: role of oxidative stress and impairment in obesity. *Int J Mol Sci.*, 14(9), 18861–18880. DOI: 10.3390/ijms140918861.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497–509. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13428781>.
- Ishida, T., Nakao, S., Ueyama, T., Harada, Y., & Kawamura, T. (2020). Metabolic remodeling during somatic cell reprogramming to induced pluripotent stem cells: involvement of hypoxia-inducible factor 1. *Inflamm Regen*, 40, 8. DOI: 10.1186/s41232-020-00117-8.
- Kang, J. X., Wan, J. B., & He, C. (2014). Concise review: Regulation of stem cell proliferation and differentiation by essential fatty acids and their metabolites. *Stem Cells*, 32(5), 1092–1098. DOI: 10.1002/stem.1620.
- Kladnytska, L. V., Mazurkevych, A. Y., Velychko, S. V., & Zhyhunova, O. V. (2016). Otrymannia kultury stovburo-vykh klityn iz zhyrovoi tkanyny sobaky. *Visnyk Sumskoho natsionalnoho aharnoho universytetu. Seriiia "Veterynarna medytsyna"*, 6(38), 19–24 (in Ukrainian).
- Lo Van, A., Hachem, M., Lagarde, M., & Bernoud-Hubac, N. (2019). Omega-3 Docosahexaenoic Acid Is a Mediator of Fate-Decision of Adult Neural Stem Cells. *Int J Mol Sci.*, 20(17), 4240. DOI: 10.3390/ijms20174240.
- Siniak, K., Orgel', M., & Kruk, V. (1976). Method of preparation of blood lipids for gaschromatographic analysis. *Lab. Delo*, 1, 37–41.
- Smith, A. N., Muffley, L. A., Bell, A. N., Numhom, S., & Hocking, A. M. (2012). Unsaturated fatty acids induce mesenchymal stem cells to increase secretion of angiogenic mediators. *J Cell Physiol*, 227(9), 3225–3233. DOI: 10.1002/jcp.24013.
- Snodgrass, R. G., & Brune, B. (2019). Regulation and Functions of 15-Lipoxygenases in Human Macrophages. *Front Pharmacol*, 10, 719. DOI: 10.3389/fphar.2019.00719.
- Tigistu-Sahle, F., Lampinen, M., Kilpinen, L., Holopainen, M., Lehenkari, P., Laitinen, S., & Käkälä, R. (2017). Metabolism and phospholipid assembly of polyunsaturated fatty acids in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *J Lipid Res.*, 58(1), 92–110. DOI: 10.1194/jlr.M070680.
- Wu, Y., Chen, K., Xing, G., Li, L., Ma, B., Hu, Z., Duan, L., & Liu, X. (2019). Phospholipid remodeling is critical for stem cell pluripotency by facilitating mesenchymal-to-epithelial transition. *Sci Adv*, 5(11), eaax7525. DOI: 10.1126/sciadv.aax7525.
- Yaghooti, H., Mohammadtaghvaei, N., & Mahboobnia, K. (2019). Effects of palmitate and astaxanthin on cell viability and proinflammatory characteristics of mesenchymal stem cells. *Int. Immunopharmacol*, 68, 164–170. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.12.063.
- Yamamoto, T., Hatabayashi, K., Arita, M., Yajima, N., Takenaka, C., Suzuki, T., Takahashi, M., Oshima, Y., Hara, K., Kagawa, K., & Kawamata, S. (2019). Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor maintains the undifferentiated state of human embryonic stem cells. *Sci Signal*, 12(587), eaaw3306. DOI: 10.1126/scisignal.aaw3306.