УДК: 612.438:576.364:57.085.23
doi:10.22494/cot.v4i2.59

Потенціювання направленого остеогенного диференціювання мультипотентних стромальних клітин тимусу попереднім співкультивуванням з тимоцитами

Нікольський І. С., Нікольська В. В., Демченко Д. Л., Зубов Д. О.
ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

e-mail: chekhdariia@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Відомо, що мультипотентні стромальні клітини (МСК) і тимоцити володіють мембранною спорідненістю і взаємодіють між собою в тимусних нішах, що має суттєве значення для диференціювання тимоцитів. Проте практично відсутні дані про можливе розповсюдження впливу контакту у зворотному напрямку: від тимоцитів до МСК.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. *МСК отримували з тимусів мишей лінії C57BL методом експлантатів та культивували за стандартних умов протягом 8-12 пасажів. До $4 \cdot 10^4$ МСК додавали 10^6 тимоцитів або клітин кісткового мозку на 24 год. Через 1 добу після їх видалення стандартне культуральне середовище замінювали на остеогенне або адипогенне та культивували протягом 10 діб. Після фіксації цитопрепарати фарбували 1 % розчином алізаринового червоного S або 0,2 % розчином масляного червоного O відповідно. Після екстрагування барвників 10 % розчином оцтової кислоти або ізопропіловим спиртом відповідно, вимірювали оптичну щільність при 520 нм.*

РЕЗУЛЬТАТИ. *Показано, що мультипотентні стромальні клітини тимусу мишей C57BL ефективно диференціюються in vitro за остеогенним та адипогенним напрямками у відповідних диференціювальних середовищах, що виявляється по забарвленню клітинних культур алізариновим червоним та масляним червоним. За результатами вимірювання оптичної щільності екстрактів барвників виявлено, що під впливом короткочасного попереднього співкультивування з тимоцитами ефективність диференціювання МСК тимусу в остеогенному напрямку підвищується.*

ВИСНОВКИ. *Попередній добовий контакт стромальних клітин тимусу з тимоцитами, але не клітинами кісткового мозку, потенціює остеогенне диференціювання і не впливає на дозрівання адипогенних клітин.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: *мультипотентні стромальні клітини; тимоцити; тимус; кістковий мозок; остеогенне диференціювання; адипогенне диференціювання*

Взаємодія мультипотентних стромальних клітин (МСК) з гемопоетичними клітинами інтенсивно вивчається вже кілька десятиліть. В 1978 році вперше була сформульована гіпотеза про існування мікрооточення для гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) в кістковому мозку (КМ), що складається з різних клітинних та тканинних компонентів, які формують ніші [1]. Наразі наявність таких функціональних елементів не викликає сумнівів. В кістковому мозку виділяють ендостальні та судинні ніші, в яких завдяки складним міжклітинним взаємодіям, молекулам адгезії, цитокінам та позаклітинному матриксу забезпечується збереження ГСК у стані спокою, їх самопідтримка та реалізація мультипотентності. В композиції судинних ніш одним із головних учасників є МСК, їх периваскулярні нащадки та ендотеліальні клітини, в ендостальних нішах – клітини остеогенної лінії. Вони можуть активно впливати на ГСК шляхом як прямого контакту, так і гуморального [2]. Постулюється також існування тимусних ніш, в яких за участю МСК створюються умови для диференціювання попередників Т-клітин, які надходять в орган із кісткового мозку [3]. Мезенхіма тимусу необхідна для його ембріонального

морфогенезу та відіграє безпосередню роль у лімфопоезі та міграції клітин в тимусі [4].

Таким чином, очевидно, що на території центральних органів імунної системи взаємодія МСК і ГСК відіграє ключову роль. Проте МСК важливі при взаємодії з гемопоетичними клітинами і на периферії. Вони супресують трансплантаційні реакції і стимулюють продуктивну фазу синтезу антитіл [5], а також пригнічують процеси, пов'язані з проліферацією Т-лімфоцитів в різних системах *in vitro* [6]. Отже МСК впливають не тільки на ГСК, а і на різні популяції і субпопуляції лімфоцитів [7-10]. Тобто взаємодія МСК-ГСК в організмі є необхідною і, мабуть, має місце як у фізіологічних умовах, так і при розвитку патологічних процесів.

Виникає питання: в парі «МСК - гемопоетичні клітини» здійснюється вплив тільки у напрямку останніх, чи дія розповсюджується і на стромальні клітини? Виходячи з того, що однією з головних властивостей МСК є здатність до лінійного диференціювання, можна припустити, що взаємодія з гемопоетичними клітинами, перш за все, впливає саме на ці процеси. Прямих даних щодо впливу гемопоетичних клітин на процеси диференціювання МСК обмаль. Отримано дані, що неадгезивні клітини КМ, а також LSK клітини (Lin-Sca-1$^+$c-kit$^+$), співкультивовані з МСК КМ і розділені міліпоровою мембраною, прискорюють проліферацію і диференціювання МСК, що реєструвалось по збільшенню кількості колонієутворюючих одиниць фібробластів та остеобластів. Ефект був пов'язаний з дією цитокінів та ростових факторів (IL-6, SDF-1, остеокальцин), секреція котрих значно підсилювалась остеобластами у присутності гемопоетичних клітин [11]. Щодо МСК тимусу є лише поодинокі роботи, що ці клітини здатні до лінійного диференціювання [12], але вплив на цей процес гемопоетичних клітин не досліджений.

З урахуванням викладеного було поставлено завдання вивчити можливість диференціювання МСК тимусу за остеогенним і адипогенним напрямками *in vitro* та вплив на ці процеси контактної взаємодії МСК тимусу з тимоцитами та клітинами кісткового мозку.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти проведено на самцях мишей лінії C57BL віком 6-8 тижнів з розплідника ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України, які отримували збалансоване харчування та мали вільний доступ до води. Всі роботи з експериментальними тваринами проводились з дотриманням вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986 р.).

Після евтаназії тварин методом цервікальної дислокації під ефірним наркозом в стерильних умовах виділяли тимус та стегнові кістки. Культуру стромальних клітин тимусу отримували методом експлантатів за стандартною методикою [13]. Культивування проводили в поживному середовищі DMEM/F12, 1:1, (*Sigma*, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (*Sigma*, США), 10 мМ L-глютаміну (*Sigma*, США) та по 100 МО/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (*Дарниця*, Україна), в CO_2-інкубаторі (*Jouan*, Франція) при 37 °С і 5 % атмосфері CO_2. Субкультивування клітин у співвідношенні 1:3 проводили з використанням суміші розчинів 0,05 % трипсину (*Біотестмед*, Україна) та 0,02 % ЕДТА (*Sigma*, США). Тимоцити для співкультивування отримували шляхом препарування тимусу голками, клітини кісткового мозку – шляхом його вимивання із кістковомозкового каналу діафізу стегнової кістки поживним середовищем. Процедура додатково включала 30-хвилинне витримування виділеної суспензії в скляному не обробленому силіконом посуді при 37 °С з метою видалення адгезуючих клітин.

В лунки 24-лункового планшету вносили по $4 \cdot 10^4$ МСК тимусу (МСКт) 8-12 пасажів, в яких не спостерігали ознаки старіння. Через 1 добу клітини утворювали моношар, до якого додавали тимоцити або клітини кісткового мозку (10^6 на лунку). Через 24 год. їх видаляли шляхом промивання культури та продовжували культивувати МСК тимусу в звичайному поживному середовищі. Ще через 1 добу у відповідних групах лунок середовище замінювали або на звичайне, або на остеогенне чи адипогенне для направленого диференціювання.

Остеогенне диференціювання індукували культивуванням у середовищі DMEM/F12, 1:1, (*Sigma*, США) з додаванням 15 % ембріональної телячої сироватки (*Sigma*, США), 10 мМ L-глютаміну (*Sigma*, США), 50 мкг/мл L-аскорбінової кислоти (*Sigma*, США), 10 мМ β-гліцерофосфату (*Sigma*, США), 0,1 мкМ дексаметазону (*Sigma*, США) та 100 МО/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину (*Дарниця*, Україна). Адипогенне диференціювання індукували культивуванням у середовищі DMEM-HG (*PAA*, Німеччина) з високим вмістом глюкози

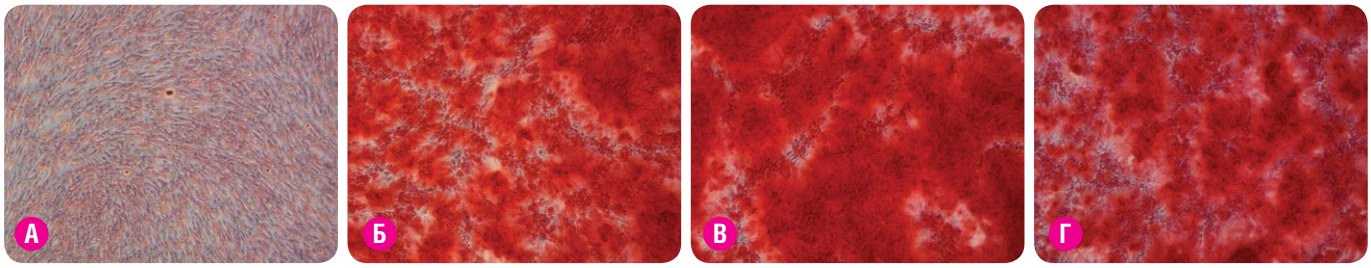

Рис. 1. Мікрофотографії цитопрепаратів культур МСК тимусу, 10-а доба культивування в звичайному (А) або остеогенному (Б, В, Г) середовищі після контакту протягом 24 год. з тимоцитами (В) або клітинами кісткового мозку (Г). Забарвлення алізариновим червоним. Ок. х10, об. х10.

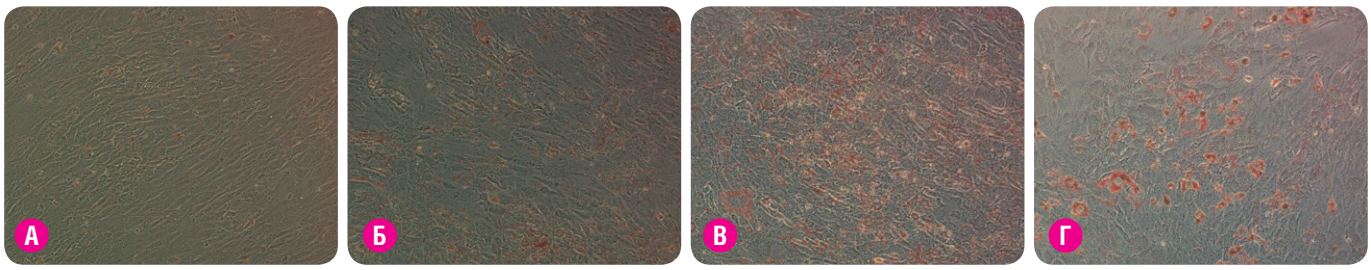

Рис. 2. Мікрофотографії цитопрепаратів культур МСК тимусу, 10-а доба культивування в звичайному (А) або адипогенному (Б, В, Г) середовищі після контакту протягом 24 год. з тимоцитами (В) або клітинами кісткового мозку (Г). Забарвлення масляним червоним. Ок. х10, об. х10.

СТАТИСТИЧНІ ПОКАЗНИКИ	КУЛЬТУРА МСК ТИМУСУ В ПОЖИВНОМУ СЕРЕДОВИЩІ			
	ЗВИЧАЙНОМУ	ОСТЕОГЕННОМУ		
	-	-	КТ	ККМ
M ± m, од.	0,022 ± 0,003	0,344 ± 0,013	0,391 ± 0,019	0,349 ± 0,008
n	5	6	6	5
min	0,018	0,299	0,335	0,331
max	0,034	0,384	0,463	0,378
$p(t)_1$	-	< 0,05	< 0,05	< 0,05
$p(t)_2$		-	< 0,05	> 0,05
$p(t)_3$			-	< 0,05

Таблиця 1. Оптична щільність екстрактів пофарбованих алізариновим червоним культур стромальних клітин тимусу.

Примітки:
КТ – попереднє співкультивування з тимоцитами;
ККМ – попереднє співкультивування з клітинами кісткового мозку;
$p(t)_1$ – порівняно з МСКт, культивованими в поживному середовищі без додавання факторів диференціювання;
$p(t)_2$ – порівняно з МСКт, культивованими в остеогенному диференціювальному середовищі;
$p(t)_3$ – порівняно з МСКт, культивованими в диференціювальному середовищі після попереднього співкультивування з тимоцитами.

СТАТИСТИЧНІ ПОКАЗНИКИ	КУЛЬТУРА МСК ТИМУСУ В ПОЖИВНОМУ СЕРЕДОВИЩІ			
	ЗВИЧАЙНОМУ	АДИПОГЕННОМУ		
	-	-	КТ	ККМ
M ± m, од.	0,196 ± 0,003	0,315 ± 0,013	0,286 ± 0,003	0,377 ± 0,010
n	5	6	5	6
min	0,190	0,267	0,278	0,346
max	0,208	0,356	0,297	0,414
$p(t)_1$	-	< 0,05	< 0,05	< 0,05
$p(t)_2$		-	> 0,05	< 0,05
$p(t)_3$			-	< 0,05

Таблиця 2. Оптична щільність екстракту забарвлених масляним червоним культур стромальних клітин тимусу.

Примітки:
КТ – попереднє співкультивування з тимоцитами;
ККМ – попереднє співкультивування з клітинами кісткового мозку;
$p(t)_1$ – порівняно з МСКт, культивованими в поживному середовищі без додавання факторів диференціювання;
$p(t)_2$ – порівняно з МСКт, культивованими в остеогенному диференціювальному середовищі;
$p(t)_3$ – порівняно з МСКт, культивованими в диференціювальному середовищі після попереднього співкультивування з тимоцитами.

(4,5 г/л) з додаванням 10 % конячої сироватки (*PAA,* Німеччина), 10 мМ L-глютаміну (*Sigma*, США), 0,5 мкМ дексаметазону (*Sigma*, США), 6 мкг/мл інсуліну (*Sigma*, США) та 100 МО/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину (*Дарниця*, Україна). Культивування проводили в CO_2-інкубаторі (*Jouan*, Франція) при 37°С і 5 % CO_2 протягом 10 діб.

Для визначення ефективності диференціювання використовували фарбування індукованих в остеогенному напрямку культур на відкладення солей кальцію 1 % розчином алізаринового червоного S (*Sigma*, США) та індукованих в адипогенному напрямку культур на ліпідні вакуолі – 0,2 % розчином масляного червоного О (*Sigma*, США) [13]. Алізариновий червоний та масляний червоний екстрагували 10 % розчином оцтової кислоти або ізопропіловим спиртом відповідно. Інтенсивність забарвлення отриманих розчинів оцінювали в лунках 96-лункового планшету, що містили по 200 мкл екстракту, вимірюючи оптичну густину на спектрофотометрі Sunrise (*Tecan*, Австрія) при довжині хвилі 520 нм.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення MS Office Excel (*Microsoft*, США), використовуючи критерій Шовене [14] для виявлення аномальних результатів вимірювань та критерій Стьюдента (t) для визначення достовірності відмінностей між групами порівняння.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Клітини строми тимусу, культивовані в остеогенному чи адипогенному середовищі, добре забарвлювались алізариновим червоним та масляним червоним відповідно, на відміну від клітин, культивованих у поживному середовищі без додавання факторів диференціювання, що свідчить про ефективні процеси остеогенного та адипогенного диференціювання МСК тимусу (**рис. 1, А-Б; 2, А-Б**, див. с. 217).

Як можна побачити на фото, під впливом короткочасного попереднього співкультивування з тимоцитами ефективність диференціювання в остеогенному напрямку підвищується (**рис. 1-В,** див. с. 217), що також підтверджено результатами вимірювання оптичної щільності екстрактів барвника (**табл. 1**). Таким чином, встановлено, що *in vitro* МСК тимусу диференціюються в остеогенному напрямку, а тимоцити потенціюють цей процес. *In vivo* такі явища поки що не описані.

Більш очікувано виявлено ефективне адипогенне диференціювання МСК тимусу (**табл. 2**), оскільки здатність МСК тимусу до адипогенного диференціювання може розглядатись в аспекті їх участі у віковому жировому переродженні органу. Отримані дані свідчать про велику схожість властивостей МСК, які походять із різних органів, і підтверджують, що головною з них є можливість мультилінійного диференціювання.

Таким чином, ми продемонстрували, що попередній добовий контакт МСК тимусу з тимоцитами, але не ККМ, достовірно потенціє їх остеогенне диференціювання (**табл. 1**). Навпаки, співкультивування МСК тимусу з ККМ, а не з тимоцитами, супроводжувалось інтенсифікацією ознак адипогенного диференціювання (**табл. 2**). Але потрібно зазначити, що разом з ККМ в культуру МСК тимусу можуть бути внесені в незначній кількості адипогенні ККМ різного ступеня диференціювання, які, на відміну від остеобластів, іноді присутні майже вільно в паренхімі кістковомозкового каналу і які, мабуть, можуть не адгезуватись до скла в процесі виділення і швидко проліферувати в адипогенному середовищі. Тому слід з обережністю приймати до уваги отримані дані як такі, що характеризують активність адипогенного диференціювання саме МСК тимусу. Для вирішення цього питання необхідні інші методичні підходи. В зв'язку з цим висновок щодо ефективності адипогенного диференціювання МСК тимусу можна робити лише по впливу тимоцитів.

В умовах експерименту, коли МСК тимусу і тимоцити знаходяться у безпосередньому контакті 24 години, певну роль в потенціюванні

індукції остеогенного диференціювання може відігравати контактна взаємодія. Але не виключено, що за цей час тимоцити продукують певні цитокіни, що теж вносять вклад у зміну властивостей МСК з підсиленням їх здатності до диференціювання.

Враховуючи стале уявлення про значну роль стромальних клітин у функціонуванні гемопоетичних, наведені в роботі дані свідчать про можливість існування іншої ситуації, коли міжклітинна взаємодія названих клітин одночасно індукує активні зміни в обох типах контактуючих клітин. Потрібно зазначити, що активація лінійного диференціювання МСК гемопоетичними клітинами може мати велике значення у розвитку патології, коли дисбаланс і порушення функцій стромальних клітин можуть бути опосередковані кількісними і функціональними розладами в субпопуляціях імунних клітин. Роботи в цьому напрямку будуть сприяти прогресу у вивченні патологічних процесів системного і місцевого характеру у сполучній тканині.

ВИСНОВКИ

1. ***МСК тимусу проявляють характерну для МСК з інших джерел здатність до лінійного остеогенного або адипогенного диференціювання при культивуванні у відповідних диференціювальних середовищах.***
2. ***Попередній добовий контакт МСК тимусу з тимоцитами суттєво потенціює їх наступне остеогенне диференціювання, що свідчить про можливість впливу тимоцитів на функціональну активність МСК тимусу.***

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Schofield R.* The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell [Text] / *R. Schofield* // Blood Cells. – 1978. – **Vol. 4, № 1-2**. – P. 7-25.
2. *Arai F.* Tie2/Angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche [Text] / *F. Arai, A. Hirao, M. Ohmura, et al.* // Cell. – 2004. – **№ 118**. – P. 149-161.
3. *Banwell C. M.* Studies on the role of IL-7 presentation by mesenchymal fibroblasts during early thymocyte development [Text] / *C. M. Banwell, K. M. Partington, E. J. Jenkinson, et al.* // Eur J Immunol. – 2000. – **Vol. 30, № 8.** – P. 2125-2129.
4. *Suniara R. K.* An essential role for thymic mesenchyme in early T Cell development [Text] / *R. K.Suniara, E. J. Jenkinson, J. J. Owen* // J Exp Med. – 2000. – **Vol. 191, № 6**. – P. 1051-1056.
5. *Никольский И. С.* Влияние внутривенного введения мультипотентных стромальных клеток тимуса на иммунный ответ [Текст] / *И. С. Никольский, В. В. Никольская, В. О. Савинова* // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – **№ 4**. – С. 55-56.
6. Selective adhesion of immature thymocytes to bone marrow stromal cells: relevance to T cell lymphopoiesis [Text] / *M. Barda-Saad, L. A. Rozenszajn, A. Globerson, et al.* // Exp Hematol. – 1996. – **Vol. 24, № 2**. – P. 386-391.
7. Immunomodulatory nature and site specific affinity of mesenchymal stem cells: a hope in cell therapy [Text] / *P. Lotfinegar, K. Shamsasenjian, A. Movassaghpour, et al.* // Adv Pharm Bull. – 2014. – **Vol. 4, № 1**. – P. 5-13.
8. Mesenchymal stem cells: a double-endged sword in regulating immune responses [Text] / *W. Li, G. Huang, J. Su, et al.* // Cell Death Differ. – 2012. – **Vol. 19, № 9**. – P. 1505-1513.
9. *Le Blank K.* Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system [Text] / *K. Le Blank, D. Mougiakakos* // Nat Rev Immunol. – 2012. – **Vol. 12, № 5**. – P. 383-396.
10. Immune modulation by mesenchymal stem cells [Text] / *F. Birari, V. Lisi, A. Pasini, et al.* // Transfus Med Hemother. – 2008. – **Vol. 35, № 3**, P. 194-204.
11. Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche [Text] / *Y. Jung, J. Song, Y. Shiozawa, et al.* // Stem Cells. – 2008. – **Vol. 26, № 8**. – P. 2042-2051.
12. Label retention identifies a multipotent mesenchymal stem cell-like population in the postnatal thymus [Text] / *M. Osada, V. J. Singh, K. Wu, et al.* // PLoS One. – 2013. **Vol. 8, № 12**. – P. e83024. doi: 10.1371/journal.pone.0083024.eCollection 2013
13. *Prockop D.J.* Mesenchymal stem cells: methods and protocols [Text] / *D. J. Prockop, D. G. Phinney, B. A. Bunnell* // Totowa, NJ: Humana Press, 2008. – 192 p.
14. *Викулин И.М.* Оценка пригодности результатов измерений и исключение аномальных значений [Текст] / *И. М. Викулин, В. Э. Горбачев, Б. В. Коробицын и др.* // Наукові праці ОНАЗ ім. О. С. Попова. – 2007. – **№ 2.** – С. 106-111.

СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 27.04.2016 р.
Прийнята до друку 26.10.2016 р.