

УДК 612.438.1:612.413-018.46 (076.5)
doi:10.22494/cot.v6i1.82

Влияние разных доз тимулина *in vivo* и *in vitro* на некоторые биологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга у мышей разных линий



Лабунец И. Ф., Родниченко А. Е.

ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины Национальной академии медицинских наук Украины», Киев, Украина

e-mail: irina_labunets@ukr.net

РЕЗЮМЕ

Перспективным источником для клеточной терапии являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), биологические свойства которых могут изменяться в условиях дисфункции иммунной системы центрального характера.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ. Исследовать у мышей с разным генотипом способность ММСК костного мозга к колониообразованию, направленной дифференцировке и иммуносупрессивному действию в условиях изменения содержания тимического сывороточного фактора (ТСФ, тимулин) в организме и в культуре клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Культуры ММСК получали из костного мозга бедренных костей мышей линии FVB/N и 129/Sv. Проводили исследование клоногенного потенциала клеток костного мозга, их фенотипирование, оценивали остеогенный и адипогенный потенциал, определяли иммуномодулирующие свойства ММСК после удаления тимуса и при внесении в систему *in vitro* тимического сывороточного фактора.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Установлено, что уровень тимулина выше у контрольных мышей линии FVB/N, чем у мышей линии 129/Sv. Способность стволовых клеток-предшественников костного мозга к колониообразованию у контрольных и тимэктомированных мышей зависит от их генотипа. В условиях добавления в культуру костномозговых клеток тимэктомированных мышей обеих линий ТСФ в концентрациях 1 нг/мл и 10 нг/мл изменение количества колоний стромальных клеток-предшественников фибробластов наблюдалось только при добавлении высокой дозы гормона. Тимэктомия у мышей линии FVB/N приводит к усилению дифференцировки ММСК в остеогенном направлении и к снижению адипогенной дифференцировки, которая восстанавливается после добавления в культуру ТСФ. У тимэктомированных мышей линии 129/Sv наблюдалось снижение дифференцировки ММСК в остеогенном направлении и ее восстановление после инкубации клеток с тимическим гормоном. Установлен иммуносупрессивный эффект ММСК костного мозга у мышей обеих линий. При этом линейные различия этого эффекта проявляются в степени иммуносупрессии.

ВЫВОДЫ. Способность ММСК костного мозга мышей линии FVB/N и 129/Sv к колониообразованию, направленной дифференцировке и иммуносупрессивному действию в условиях изменения содержания тимического сывороточного фактора в организме и в культуре клеток связаны с функционированием тимуса и изменяются после его удаления.

Реакция ММСК костного мозга на удаление тимуса зависит от генотипа мышей. Показано, что тимический гормон оказывает восстанавливающий эффект на сниженный клоногенный и остеогенный потенциал ММСК костного мозга у мышей обеих линий и адипогенный потенциал у мышей линии 129/Sv.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга; тимэктомия; тимический сывороточный фактор; тимулин

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга обладают широким спектром биологической активности благодаря своей способности к мультилинейной дифференцировке, трофическому влиянию на поврежденные ткани, а также иммуномодулирующим свойствам [1]. Именно поэтому ММСК являются перспективными для клеточной терапии повреждений различных органов, повышения выживаемости трансплантированного аллогенного материала и снижения риска развития реакции трансплантат против хозяина [2-6].

Биологические свойства ММСК костного мозга могут изменяться под влиянием клеточных и эндокринных факторов [7, 8]. Среди последних вызывает интерес высокоактивный гормон тимуса тимулин (тимический сывороточный фактор – ТСФ), который влияет на дифференцировку Т-лимфоцитов в тимусе, их миграцию и функциональное состояние [9-11]. Ранее нами показано изменение колониеобразующей способности ММСК костного мозга при физиологических колебаниях уровня тимулина в крови мышей линии СВА/Са и после введения им биологически активных факторов тимуса [12]. Участие разных субпопуляций Т-лимфоцитов в реализации таких свойств ММСК костного мозга, как дифференцировка в остеогенном направлении и контроль гемопоэза [13, 14], не исключает возможность влияния гормонов тимуса и на эти свойства ММСК.

Одним из перспективных подходов к изучению взаимодействий тимуса и ММСК костного мозга может быть проведение экспериментов на мышах разных линий. В литературе есть данные о важности учета генотипа животных при оценке изменений метаболизма, функционирования иммунной, эндокринной систем и ММСК костного мозга [15, 16]. Результаты предыдущих наших исследований показали, что мыши разных линий с моделями дисфункции тимуса отличаются способностью к дифференцировке гемопоэтических стволовых клеток и пролиферативным потенциалом ММСК костного мозга [10, 17, 18].

Цель работы – исследовать у мышей с разным генотипом способность ММСК костного мозга к колониеобразованию, направленной дифференцировке и иммуносупрессивному действию в условиях изменения содержания тимулина в организме и в культуре клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследования проводили на мышах-самцах линии FVB/N (генотип H-2q, n = 24) и 129/Sv (генотип H-2, n = 24) в возрасте 3-4 мес. разведения ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН». Выбор данных линий мышей для исследований объясняется линейными особенностями функционирования костного мозга, тимуса и Т-звена иммунной системы [15, 17, 18]. Животные находились при фиксированном световом режиме (12:12) и свободном доступе к воде и пище. Все работы с экспериментальными животными выполняли с соблюдением законодательства и принципов «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и другой научной целью» (Страсбург, 1986), а также Закона Украины «О защите животных от жестокого поведения» (от 21.02.2006).

Экспериментальные группы мышей. Гипофункцию тимуса у мышей моделировали с помощью удаления тимуса под наркозом (2,5 % раствор авертина, 125 мг/кг, внутривентриально). Контрольная группа – ложнопериорированные животные обеих линий. Биологический материал получали после декапитации мышей под эфирным наркозом в утреннее время суток (9.00 - 10.00) через 4 недели после операции.

Этапы эксперимента. У экспериментальных мышей в опытах *in vivo* оценивали эндокринную функцию тимуса. В опытах *in vitro* изучали клоногенный потенциал клеток костного мозга, проводили фенотипирование ММСК, оценку остеогенного и адипогенного потенциала ММСК, иммуномодулирующих свойств ММСК и возможность непосредственного влияния тимулина на биологические свойства ММСК тимэктомированных животных.

Эндокринную функцию тимуса оценивали по уровню в крови тимулина [19]. Метод основан на способности тимулина восстанавливать чувствительность спонтанных розеткообразующих клеток селезенки взрослых тимэктомированных мышей к азатиоприну (*Sigma*, США). Сыворотку крови животных пропускали через ультрафильтр системы Centrifo CF-50A (*Amicon*, США) для удаления высокомолекулярного ингибитора гормона. Титром тимулина считали последнее разведение сыворотки, вызывающее 50 % редукцию числа розеткообразующих клеток по отношению к контролю. Результаты выражали в виде \log_2 титра гормона. У мышей с полностью удаленным тимусом значения тимулина в крови должны быть нулевыми.

Клетки костного мозга получали путем его вымывания из бедренных костей мышей питательной средой RPMI-1640 (*Sigma*, США). Культивирование проводили во флаконах с площадью поверхности 25 см² в питательной среде RPMI-1640, которая содержала 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (все – *Sigma*, США).

Оценку фенотипа ММСК костного мозга проводили методом проточной цитометрии с помощью моноклональных антител к маркерам Sca-1, CD44, CD73, CD90, CD45 (*Becton Dickinson*, США). В качестве негативного контроля использовали образцы клеток без антител (unstaining control). Также определяли уровень флюоресценции в образцах с каждым из антител отдельно (single staining controls). Анализ проводили на проточном лазерном цитофлуориметре-сортере BD FACSAria (*Becton Dickinson*, США).

Исследование клоногенного потенциала клеток костного мозга. Известно, что при культивировании в монослойных культурах популяция клеток костного мозга формирует *in vitro* колонии, состоящие из колониеобразующих клеток-предшественников фибробластов (КОЕ-Ф) [20]. Клетки костного мозга с плотностью посева $2 \cdot 10^5$ /см² культивировали в питательной среде, содержащей 85 % RPMI-1640, 15 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, (все – *Sigma*, США) в течение 12 суток при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Под бинокулярным микроскопом подсчитывали количество колоний, состоящих не менее чем из 50 клеток. Результат выражали в количестве колоний на $1 \cdot 10^6$ клеток костного мозга.

Для оценки остеогенного потенциала ММСК клетки костного мозга 3-го пассажа культивировали в остеоиндуктивной среде, которая состояла из среды DMEM с содержанием глюкозы 1,0 г/л, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 100 нМ дексаметазона, 10 мМ β-глицерофосфата, 0,05 мМ L-аскорбат-2-фосфата, (все – *Sigma*, США) [21]. Через 21 день монослой клеток промывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали 10 % раствором параформальдегида, а затем окрашивали 2 % раствором Alizarin Red S (*Sigma*, США). Полуколичественный анализ степени минерализации окрашенных культур проводили колориметрическим методом по Gregory [22]. Для этого связавшийся с кальцифицированным внеклеточным матриксом краситель экстрагировали уксусной кислотой и доводили значения pH до 4,1 с помощью гидроксида аммония. Степень окраски оценивали на микропланшетном фотометре Multiskan EX (*Thermo Scientific*, США) при длине волны 405 нм.

Для оценки адипогенного потенциала ММСК клетки костного мозга 3-го пассажа культивировали в адипоиндуктивной среде, которая состояла из среды DMEM с глюкозой 4,5 г/л, 5 % лошадиной сыворотки, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 мкМ дексаметазона, 200 мкМ индометацина, 500 мкМ изобутилметилксантина и 5 мкг/мл инсулина (все – *Sigma*, США). Через 14 дней культуры промывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали 10 % раствором параформальдегида и затем окрашивали раствором Oil Red O (*Sigma*, США) для выявления липидных включений [23]. Под инвертированным микроскопом IX71 (*Olympus*, Япония) проводили подсчет клеток, которые содержали и не содержали липидные включения в 10 случайных полях зрения. Результаты выражали в процентах.

Иммуномодулирующее влияние ММСК костного мозга 3-го пассажа на митоген-стимулированную пролиферацию сингенных спленоцитов мышей изучали в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) под влиянием 0,01 мг/мл фитогеммаглютинаина с помощью МТТ-теста [24]. Спленоциты инкубировали с митогеном в течение 72 часов в отсутствие и с ММСК в разных дозах: $1,5 \cdot 10^4$, $3,0 \cdot 10^4$ и $6,0 \cdot 10^4$ ММСК на 10^6 спленоцитов. За 2 часа до конца инкубации добавляли по 0,01 мл 0,5 % раствора МТТ (3-(4,5-диметилтиазол)-2,5-дифенилтетразол бромид), а по ее завершении – 0,04 М раствор HCl в изопропиловом спирте. Оптическую плотность надосадка измеряли на микропланшетном фотометре Multiskan EX (Thermo Scientific, США) при длине волны 492 нм. Результаты подавали в виде условных единиц индекса пролиферации (ИП): ИП = оптическая плотность митогенактивированных культур спленоцитов с ММСК/оптическая плотность культур спленоцитов без ММСК. В качестве контроля – ИП = оптическая плотность митогенактивированных культур спленоцитов/оптическая плотность культур спленоцитов без митогена.

В системе *in vitro* ММСК костного мозга тимэктомированных мышей инкубировали с тимулином (Sigma, США), который в случае исследования клоногенного потенциала клеток костного мозга добавляли однократно, в концентрациях 1 нг/мл и 10 нг/мл непосредственно в день постановки методики. При изучении влияния гормона на направленную дифференцировку его добавляли в концентрации 1 нг/мл при каждой смене дифференцировочной среды. При изучении иммуномодулирующих свойств ММСК тимулин добавляли в концентрации 1 нг/мл при каждой смене питательной среды. Во всех опытах значения показателей сравнивали с контролем – клетки костного мозга тимэктомированных мышей без инкубации *in vitro* с ТСФ.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 7 (StatSoft Inc., США). Достоверность различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде средних арифметических и ошибок средних ($M \pm m$). Разница между показателями считалась статистически значимыми при значении $p < 0,05$ [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ВЛИЯНИЕ ТИМЭКТОМИИ НА УРОВЕНЬ ТИМУЛИНА У МЫШЕЙ ЛИНИЙ FVB/N И 129/SV. Нами установлено, что у контрольных ложноперирированных мышей линии FVB/N уровень тимулина выше, чем у мышей линии 129/Sv и составляет, соответственно, $5,3 \pm 0,3$ и $4,3 \pm 0,2 \log_2$ титра ($p < 0,05$). У тимэктомированных мышей исследованных линий гормон в крови не определялся.

ВЛИЯНИЕ ТИМЭКТОМИИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ММСК КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ЛИНИЙ FVB/N И 129/SV.

Клоногенный потенциал стволовых клеток-предшественников костного мозга. Количество ядросодержащих клеток в костном мозге мышей экспериментальных групп обеих линий существенно не различалось. Так, количество ядросодержащих клеток костного мозга у ложноперирированных мышей линии FVB/N составляло $14,1 \pm 2,5 \cdot 10^6$, у мышей линии 129/Sv – $12,8 \pm 3,8 \cdot 10^6$ клеток. Тимэктомия не привела к статистически значимым изменениям этого показателя: количество ядросодержащих клеток в костном мозге у мышей линии FVB/N составляло $13,8 \pm 2,0 \cdot 10^6$ клеток, у мышей линии 129/Sv – $12,9 \pm 1,4 \cdot 10^6$.

Количество КОЕ-Ф в костном мозге контрольных ложноперирированных мышей линии FVB/N было выше ($p < 0,05$), чем у мышей линии 129/Sv (рис. 1). У тимэктомированных мышей обеих линий значения исследованных показателей меньше ($p < 0,05$),

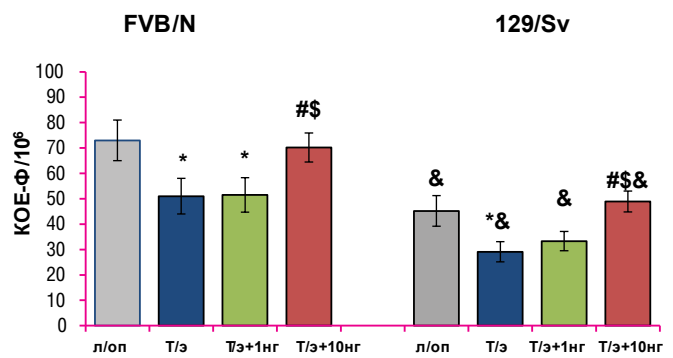


Рис. 1. Гистограммы колониеобразующей активности ММСК костного мозга мышей линий FVB/N и 129/Sv под влиянием тимэктомии и добавления ТСФ в условиях *in vitro*, $M \pm m$; л/оп – ложноперирированные мыши, T/э – тимэктомированные мыши, T/э+1 нг – тимэктомированные мыши + ТСФ в концентрации 1 нг/мл *in vitro*, T/э+10 нг – тимэктомированные мыши + ТСФ в концентрации 10 нг/мл *in vitro*.

Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с ложноперирированными мышами; # – $p < 0,05$ по сравнению с тимэктомированными мышами; \$ – $p < 0,05$ по сравнению с тимэктомированными + ТСФ в концентрации 1 нг/мл *in vitro*; & – $p < 0,05$ по сравнению с мышами линии FVB/N.

чем у контрольных животных (рис. 1). При этом разница между исследованными группами более выражена у мышей линии FVB/N (в 1,9 раза), чем линии 129/Sv (в 1,4 раза).

Таким образом, можно сделать вывод, что способность стволовых клеток-предшественников костного мозга к колониеобразованию у контрольных ложноперирированных и тимэктомированных мышей зависит от их генотипа. После добавления в культуру костномозговых клеток тимэктомированных мышей обеих линий тимулина в концентрации 10 нг/мл увеличивается количество КОЕ-Ф по сравнению с клетками костного мозга тимэктомированных и тимэктомированных с добавлением в систему *in vitro* тимулина в концентрации 1 нг/мл (рис. 1).

Способность ММСК костного мозга к направленной дифференцировке. Перед изучением способности ММСК костного мозга к направленной дифференцировке проводили характеристику фенотипа ММСК. Культивированные ММСК костного мозга 3-го пассажа обеих линий мышей экспрессируют характерные для ММСК маркеры – CD44, CD73, CD90 и Sca-1 и не экспрессируют панлейкоцитарный маркер CD45 (табл. 1).

Установлено, что остеогенный потенциал ММСК костного мозга у контрольных ложноперирированных мышей линии FVB/N выше, чем у мышей линии 129/Sv, тогда как адипогенный, наоборот, ниже (рис. 2, 3). Если после тимэктомии у мышей линии FVB/N наблюдается усиление дифференцировки ММСК в остеогенном направлении, то у мышей линии 129/Sv – ее снижение (рис. 2).

Способность ММСК к адипогенной дифференцировке уменьшается у тимэктомированных мышей линии FVB/N и не изменяется у мышей линии 129/Sv (рис. 3). Таким образом, у мышей как с интактным, так и с удаленным тимусом выявлены линейные различия в способности к направленной дифференцировке ММСК костного мозга.

ЛИНИЯ МЫШЕЙ	CD44, %	SCA-1, %	CD73, %	CD90, %	CD45, %
FVB/N	96,2 ± 2,4	97,0 ± 1,9	15,8 ± 5,3	96,2 ± 1,2	1,9 ± 0,7
129/Sv	91,0 ± 1,9	81,5 ± 0,4	22,6 ± 13,0	95,1 ± 1,3	2,6 ± 0,3

Таблица 1. Фенотипический анализ поверхностных маркеров ММСК мышей линий FVB/N и 129/Sv, $M \pm m$.

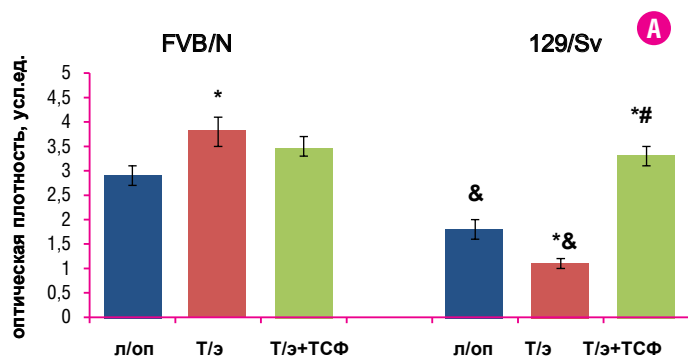
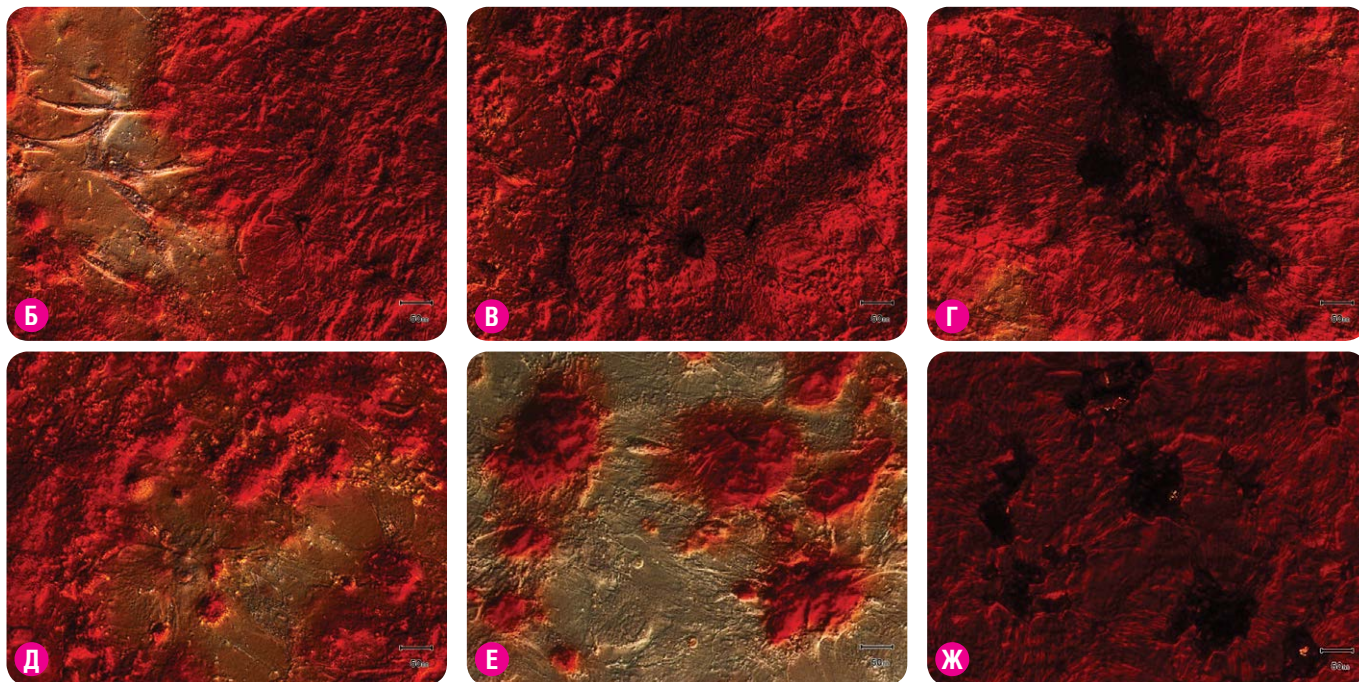


Рис. 2. Влияние тимэктомии и добавления в системе *in vitro* ТСФ на направленную остеогенную дифференцировку ММСК костного мозга мышей линий FVB/N и 129/Sv.

А – гистограммы полуколичественного анализа степени минерализации окрашенных культур (колориметрический метод), $M \pm m$; л/оп – ложнооперированные мыши, Т/э – тимэктомированные мыши, Т/э+ТСФ – тимэктомированные мыши + ТСФ в концентрации 1 нг/мл *in vitro*.



Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированными мышами; # – $p < 0,05$ по сравнению с тимэктомированными мышами; & – $p < 0,05$ по сравнению с мышами линии FVB/N. Б-Ж – микрофотографии препаратов культур ММСК костного мозга мышей линий FVB/N (Б-Г) и 129/Sv (Д-Ж) после направленной дифференцировки в остеогенной среде: Б, Д – ложнооперированные мыши, В, Е – тимэктомированные мыши, Г, Ж – тимэктомированные мыши + ТСФ в концентрации 1 нг/мл; окраска Alizarin Red S, фазовый контраст.

Таким образом, при оценке влияния ТСФ *in vitro* на остеогенный потенциал ММСК костного мозга тимэктомированных мышей показано его существенное повышение у мышей линии 129/Sv и отсутствие изменений у мышей линии FVB/N (рис. 2). Показатель адипогенной дифференцировки после инкубации ММСК с ТСФ не изменился у мышей линии 129/Sv и повышался у мышей линии FVB/N.

Иммуномодулирующее влияние ММСК костного мозга на митоген-стимулированную пролиферацию спленоцитов. Установлено, что ММСК костного мозга мышей всех исследованных экспериментальных групп проявляют иммуносупрессивный эффект на пролиферативный ответ спленоцитов, активированных Т-клеточным митогеном фитогемагглютинином в ММТ-тесте (рис. 4, 5, см. с. 63). Так, ММСК костного мозга контрольных ложнооперированных мышей линии FVB/N в дозах $1,5 \cdot 10^4$, $3,0 \cdot 10^4$ и $6,0 \cdot 10^4$ клеток снижают показатель РБТЛ соответственно в 3,7, 4,5 и 4,9 раза, а у мышей линии 129/Sv в тех же дозах – в 2,6, 2,7 и 3,6 раза соответственно. У тимэктомированных мышей линии FVB/N степень снижения РБТЛ на дозы ММСК $1,5 \cdot 10^4$, $3,0 \cdot 10^4$ и $6,0 \cdot 10^4$ клеток усиливается до 5,2, 6,1 и 6,8 раз (рис. 4).

У тимэктомированных мышей линии 129/Sv иммуносупрессивный эффект ММСК в дозах $1,5 \cdot 10^4$, $3,0 \cdot 10^4$ и $6,0 \cdot 10^4$ клеток уменьшается соответственно до 2,3, 2,5 и 2,3 раза (рис. 5). При этом показатели РБТЛ у мышей линии 129/Sv существенно превышают таковые у мышей линии FVB/N (рис. 4, 5).

Установлено, что пролиферативный потенциал спленоцитов в реакции бласттрансформации лимфоцитов практически не изменялся после инкубации с ММСК мышей обеих линий, предварительно культивированных с ТСФ ($p > 0,05$).

Итак, нами установлен иммуносупрессивный эффект ММСК костного мозга у мышей обеих линий. При этом линейные различия этого эффекта проявляются в степени иммуносупрессии, а в случае удаления тимуса – и в направленности его изменений. Тимулин *in vitro* способен изменить клоногенный и остеогенный потенциал ММСК костного мозга тимэктомированных мышей обеих линий, при этом адипогенный потенциал восстанавливался у мышей линии FVB/N, иммуносупрессивный эффект ММСК оставался без изменений.

Таким образом, результаты наших исследований *in vivo* и *in vitro* позволили установить определенную связь между изменениями биологических свойств ММСК костного мозга и эндокринной функцией тимуса, которая проявляет линейные особенности.

При оценке клоногенного потенциала оказалось, что у контрольных ложнооперированных мышей линии FVB/N колониеобразующая способность клеток костного мозга значительно превышает таковую у мышей линии 129/Sv и при этом сочетается с более высоким уровнем тимулина в крови. Восстановление у тимэктомированных мышей сниженной способности популяции костного мозга к колониеобразованию

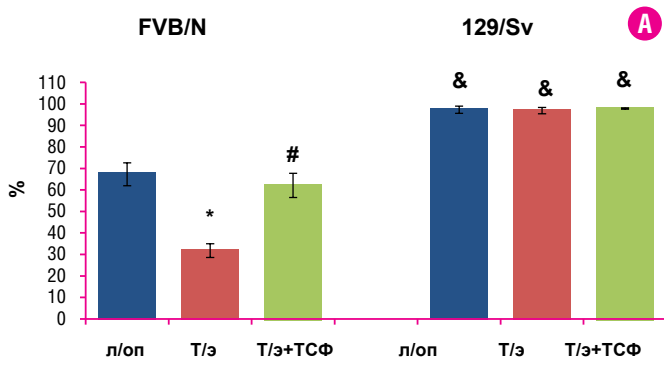
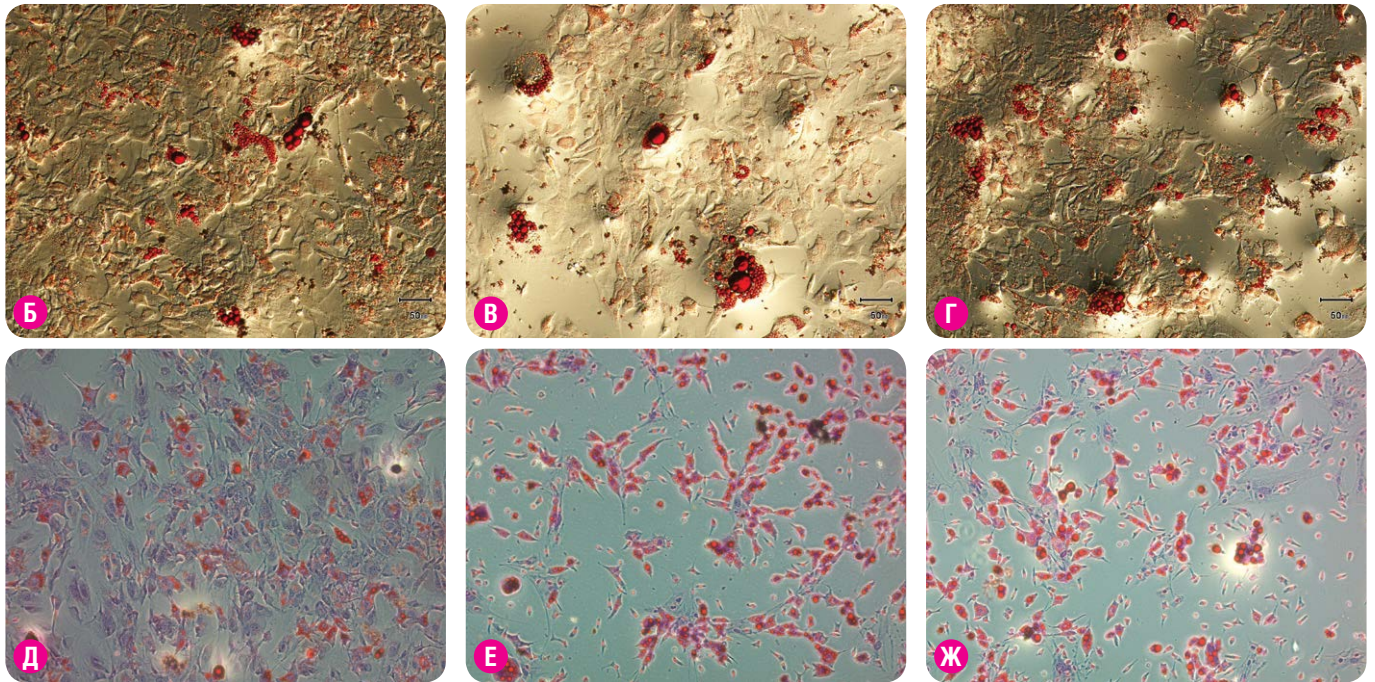


Рис. 3. Влияние тимэктомии и добавления в систему *in vitro* ТСФ на направленную адипогенную дифференцировку ММСК костного мозга мышей линий FVB/N и 129/Sv. А – гистограммы относительного содержания ММСК костного мозга, которые содержали липидные вакуоли, М ± m; л/оп – ложноперирированные мыши, Т/э – тимэктомизированные мыши, Т/э+ТСФ – тимэктомизированные мыши + ТСФ в концентрации 1 нг/мл *in vitro*.



Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с ложноперирированными мышами; # – $p < 0,05$ по сравнению с тимэктомизированными мышами; & – $p < 0,05$ по сравнению с мышами линии FVB/N. Б-Ж – микрофотографии препаратов культур ММСК костного мозга мышей линий FVB/N (Б-Г) и 129/Sv (Д-Ж) после направленной дифференцировки в адипогенной среде: Б, Д – ложноперирированные мышам, В, Е – тимэктомизированные мышам, Г, Ж – тимэктомизированные мышам + ТСФ в концентрации 1 нг/мл; окраска Oil Red O, фазовый контраст; x400 (Б, В, Г), x200 (Д, Е, Ж).

после инкубации с ТСФ может быть связано с повышением экспрессии в клетках ростовых факторов под влиянием этого гормона. Исследованиями Land и др. [26] показано, что в культуре фетальной ткани легкого тимулин в дозе 1,0 нг/мл повышает экспрессию факторов роста фибробластов 9 и 10 (FGF9, FGF10), что ассоциируется с массивной пролиферацией недифференцированной мезенхимальной ткани.

Одним из основных свойств ММСК является их способность дифференцироваться в различные клеточные типы соединительной ткани [27, 28]. В нашей работе мы оценивали способность ММСК костного мозга мышей линий FVB/N и 129/Sv дифференцироваться в остеогенном и адипогенном направлениях. Показано, что баланс между этими направлениями дифференцировки контролируется взаимосвязанными между собой клеточными факторами и может изменяться в условиях дисфункции Т-клеточного звена иммунной системы [13, 29]. Так, у мышей с возрастным Т-иммунодефицитом в костном мозге снижается количество клеток, экспрессирующих остеобласт-специфические факторы транскрипции Runx2 и Dlx5, маркеры остеобластов, коллаген и остеокальцин, и, наоборот, повышается количество клеток, экспрессирующих адипоспецифический фактор транскрипции PPARγ2, который стимулирует дифференцировку адипоцитов и наработку ими препятствующих остеогенезу аутокринных и паракринных факторов [29].

В нашем эксперименте у ложноперирированных мышей линии FVB/N с более высоким уровнем тимулина в крови дифференцировка ММСК была преимущественно в остеогенном направлении, в отличие от мышей линии 129/Sv, у которых мы наблюдали сдвиг дифференцировки в сторону адипогенеза. По данным Оксимец и др. [30], цитокинам (IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α), которые секретируются трансплантированными ММСК, принадлежит важная роль в остеорепарации травмированных конечностей. Показано вовлечение транскрипционного фактора NF-κB в реализацию эффекта тимулина в тканях *in vivo* и *in vitro* путем изменения синтеза провоспалительных (TNF-α, IL-1β, IL-6) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов [31].

Не исключено также, что различия в дифференцировочном потенциале ММСК исследованных контрольных мышей могут быть связаны с линейными особенностями функционального состояния нейроэндокринной системы. Так, у мышей линии FVB/N уровень тироксина (Т4) в крови почти в 3 раза превышает таковой у мышей линии 129/Sv, а у крыс с дефицитом Т4 существенно угнетается дифференцировка ММСК в остеогенном направлении [32-34]. Показано, что мелатонин стимулирует дифференцировку предшественников остеобластов, повышает активность остеобластов и экспрессию коллагена 1 типа, остеопонтина и остеокальцина [11, 35, 36]. По нашим данным, уровень мелатонина в крови мышей линии FVB/N [18] превышает таковой у мышей линии 129/Sv (неопубликованные данные).

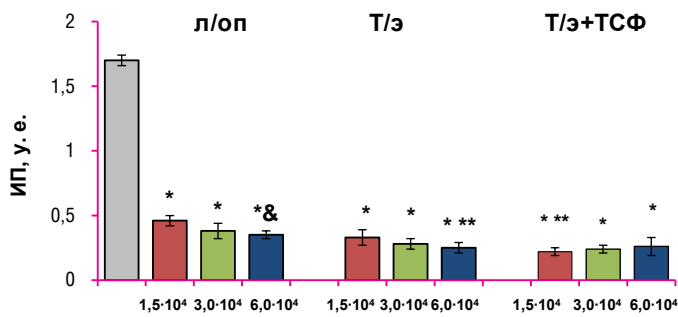


Рис. 4. Гистограммы индекса пролиферации (ИП) спленцитов мышей линии FVB/N в условиях инкубации с ММСК костного мозга по результатам МТТ теста, $M \pm m$; л/оп – ложнооперированные мыши, Т/э – тимэктомированные мыши, Т/э+ТСФ – тимэктомированные мыши + ТСФ в концентрации 1 нг/мл *in vitro*.

Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с ИП спленцитов (серый столбик); ** – $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированными мышами; & – $p < 0,05$ по сравнению с ИП спленцитов при совместном культивировании с $1,5 \cdot 10^4$ ММСК.

Результаты опытов с инкубацией ММСК тимэктомированных мышей линии 129/Sv с ТСФ позволили получить новое представление о возможных путях влияния гормона на сниженный остеогенный потенциал ММСК костного мозга. Ранее мы показали, что остеобластообразование, сниженное в условиях дефицита гормонов тимуса (в частности, тимулина), можно восстановить с помощью введения биологически активных факторов тимуса [37].

В то же время, у мышей линии FVB/N и так достаточно высокая степень минерализации внеклеточного матрикса культур ММСК еще больше усиливается после удаления тимуса и не изменяется после инкубации с ТСФ *in vitro*. Известно, что регулирующее влияние гормонов тимуса на клетки-мишени зависит от их исходного состояния [38]. Поэтому мы не исключаем, что полученные результаты, скорее всего, отражают линейные особенности реакции ММСК на изменения уровня тимулина в крови и в культуре клеток. Ранее нами уже было показано отличие реакции ММСК костного мозга мышей линии FVB/N от мышей других линий на изменение уровня тимулина в крови в условиях стресса [17]. По мнению *Nikolskiy и др.* [39], дисбаланс и нарушение функций стромальных клеток (в частности, активация линейной дифференцировки ММСК в остеогенном направлении) может быть опосредовано количественными и функциональными расстройствами в субпопуляциях иммунных клеток, в частности тимоцитов.

Установлено, что в физиологических условиях Т-лимфоциты играют протективную роль в метаболизме костной ткани, а у животных с дефицитом в костном мозге $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток снижается остеогенез [13]. Вместе с тем, в костном мозге тимэктомированных мышей линии FVB/N наблюдается дисбаланс $CD4^+/CD8^+$ -клеток, характеризующийся существенным снижением числа $CD8^+$ клеток и повышением числа $CD4^+$ клеток [10]. Сдвиг в сторону обогащения костного мозга таких мышей $CD4^+$ клетками сочетается с усилением дифференцировки ММСК в остеогенном направлении. Показано, что $CD4^+$ Т-клетки продуцируют IL-17, который является мощным ростовым фактором для ММСК [13]. Одновременное снижение адипогенной дифференцировки у тимэктомированных мышей линии FVB/N дает нам основание предположить, что у них ММСК преимущественно дифференцируется в остеогенном направлении, чем и объясняется усиление минерализации внеклеточного матрикса клеточных культур.

Полученные нами результаты могут свидетельствовать о перспективности использования мышей линий FVB/N и 129/Sv, в том числе с дисфункцией тимуса, для изучения влияния факторов как

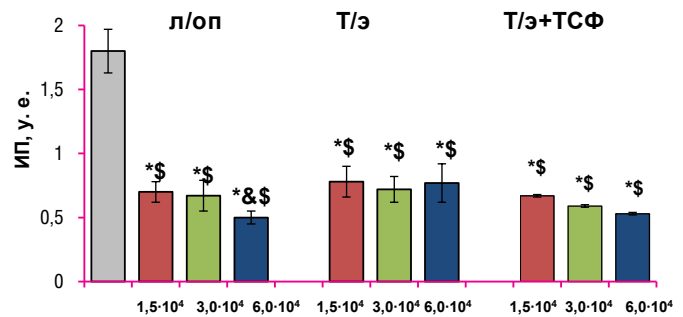


Рис. 5. Гистограммы индекса пролиферации (ИП) спленцитов мышей линии 129/Sv в условиях инкубации с ММСК костного мозга по результатам МТТ-теста, $M \pm m$; л/оп – ложнооперированные мыши, Т/э – тимэктомированные мыши, Т/э+ТСФ – тимэктомированные мыши + ТСФ в концентрации 1 нг/мл *in vitro*.

Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с ИП спленцитов (серый столбик); & – $p < 0,05$ по сравнению с ИП спленцитов при совместном культивировании с $1,5 \cdot 10^4$ ММСК; \$ – $p < 0,05$ по сравнению с мышами линии FVB/N (см. рис. 4).

с угнетающим, так и активирующим влиянием на остеогенную дифференцировку ММСК костного мозга. Кроме того, мыши этих линий могут быть полезными при изучении влияния разных субпопуляций Т-лимфоцитов на функционирование ММСК костного мозга.

Также нами установлено, что у мышей обеих линий ММСК костного мозга оказывают иммуносупрессивный эффект на митоген-активированные Т-лимфоциты. При этом интенсивность эффекта ММСК зависит от линии мышей и не связана с особенностями пролиферативного потенциала Т-лимфоцитов. Из данных литературы известно, что влияние ММСК на Т-клетки связано с угнетением их активации путем снижения экспрессии рецептора к IL-2, снижением пролиферации активированных Т-клеток в ранней G1 фазе клеточного цикла и, кроме того, индукцией апоптоза активированных Т-клеток [40–42]. Одним из путей иммуносупрессивного действия ММСК на Т-клетки может быть секреция ряда цитокинов – TGF β (трансформирующий фактор роста β), HGF (фактор роста гепатоцитов), PGE2 (простагландин E2) [43].

В нашем эксперименте более выраженный иммуносупрессивный эффект ММСК контрольных мышей линии FVB/N может быть связан с большей интенсивностью продукции клетками этих животных цитокинов/медиаторов, супрессирующих Т-лимфоциты [18]. Изменение же иммуносупрессивного эффекта ММСК после тимэктомии (от его усиления у мышей линии FVB/N до снижения у мышей линии 129/Sv), по-видимому, можно объяснить линейными особенностями изменений не только интенсивности, но и спектра продуцируемых этими клетками цитокинов. Также могут иметь значение линейные различия взаимодействия ММСК и некоторых гормонов, в частности реакции этих клеток на влияние глюкокортикоидов [44]. Ранее мы показали повышение уровня глюкокортикоидов в крови тимэктомированных мышей, а также отсутствие их супрессорного эффекта на клетки и медиаторы иммунной системы у мышей линии FVB/N, в отличие от мышей других линий [17].

Таким образом, нами получены данные, свидетельствующие о важной роли тимуса в проявлении биологических свойств ММСК костного мозга. При этом влияние тимуса и его гормона тимулина на эти клетки зависит от генотипа мышей. Полученные результаты могут быть полезными при разработке индивидуализированной клеточной терапии поврежденных разного генеза, в частности опорно-двигательного аппарата, в условиях дисфункции иммунной системы центрального характера.

ВЫВОДЫ

- 1. Клоногенный потенциал, способность к направленной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлении, иммуносупрессивный эффект ММСК костного мозга мышей линии FVB/N и 129/Sv связаны с функциональной активностью тимуса и изменяются после его удаления.**
- 2. Показана возможность прямого восстанавливающего эффекта тимулина на сниженный клоногенный и остеогенный потенциал ММСК костного мозга мышей обеих линий и адипогенный потенциал у мышей линии FVB/N.**
- 3. Иммунодефицитные состояния центрального характера изменяют биологические свойства ММСК костного мозга и могут таким образом влиять на эффективность клеточной терапии с их использованием.**

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Lotfinegar P., Shamsasenjan K., Movassaghpour A., et al. Immunomodulatory nature and site specific affinity of mesenchymal stem cells: a hope in cell therapy. *Adv Pharm Bull.* 2014. **4**, № 1. P. 5-13.
2. Kuroda Y., Kitada M., Wakao S., et al. Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and they really stem cells? *Arch Immunol Ther Exp.* 2011. **59**. P. 369-378.
3. Orlic D., Kajstura J., Ciment S. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2011. **410**. P. 701-705.
4. Sekiya I., Larson B. L., Vuoristo J. T., et al. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res.* 2004. **2**. P. 256-264.
5. Bommie F., Sung-No J. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in Prevention or Treatment of Excessive Scars. *Stem Cells International.* 2016. 8 p. URL: <https://dx.doi.org/10.1155/2016/6937976>.
6. Tyndall A., Uccelli A. Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks. *Bone Marrow Transplant.* 2009. **43**, № 11. P. 821-828.
7. Deshpande S., James A. W., Blougha J., et al. Reconciling the effects of inflammatory cytokines on mesenchymal cell osteogenic differentiation. *J Surg Res.* 2013. **185**, № 1. P. 278-285. DOI:10.1016/j.jss.2013.06.063.
8. Lee E. J., Bajracharya P., Jang E. J., et al. Effect of sex steroid hormones on bovine myogenic satellite cell proliferation, differentiation and lipid accumulation in myotube. *Asian-Aust J Anim Sci.* 2010. **23**, № 5. P. 649-658.
9. Reggiani P. C., Schwerdt J. I., Console G. M., et al. Physiology and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Curr Pharm Des.* 2014. **20**, № 29. P. 4690-4696.
10. Лабунец И. Ф., Родниченко А. Е., Васильев П. Г. Способность клеток-предшественниц гранулоцитов и макрофагов костного мозга мышей разных линий к образованию колоний *in vitro* при изменении содержания тимулина в организме и в культуре клеток. *Genes&Cells.* 2017. **12**, № 2. С. 97-103. DOI: 10.23868/201707021.
11. Лабунец И. Ф., Родниченко А. Е. Влияние мелатонина и тимулина на биологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток костного мозга мышей разных линий. *Клітинна та органа трансплантологія.* 2017. **5**, № 2. С. 242.
12. Лабунец И. Ф. Эпифиз и ритмы функций иммунной системы при старении. Экспериментальное исследование. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. 133 с.
13. Di Rosa F. T-lymphocyte interaction with stromal, bone and hematopoietic cells in the bone marrow. *Cell Biol.* 2009. **87**, № 1. P. 20-29.
14. Устименко А. М. Вплив постнатальної тимектомії у мишей лінії CBA/Ca на клітини-попередники кісткового мозку і формування кістки в зрілому віці. Автореф. дис. ...к.б.н. Київ, 2006. 16 с.
15. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. Санкт-Петербург: Наука, 2008. Т. 2, 2-е изд., перераб. и доп. 434 с.
16. Peister A., Mellad J. A., Larson B.L., et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood.* 2004. **103**. P. 1662-1668.
17. Лабунец И. Ф., Кучук О. В., Родниченко А. Е., и др. Генетические особенности функционального состояния иммунной системы у интактных мышей и в условиях стрессовых влияний. Актуальные проблемы акушерства и гинекологии, клинической иммунологии и медицинской генетики. Сборник научных трудов. Киев-Луганск: Издательство ЛугДМУ, 2010. Выпуск 19. С. 271-281.
18. Labunets I. F. The peculiarities of age-related changes in the cellular composition of bone marrow, pineal melatonin-forming function, and thymus endocrine function in mice of different strains. *Adv. Gerontol.* 2014. **4**, № 2. P. 134-139.
19. Bach J. F., Bach M.A., Blanot D., et al. Thymic serum factor (FTS). *Bull Inst Pasteur.* 1978. **76**. P. 325-398.
20. Friedenstein A.J., Chailakhian R. K., Lalykina K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen colonies. *Cell Tissue Kinet.* 1970. **3**. P. 393-403.
21. Li S., Mareddy J., Tan D. M., et al. A minimal common osteochondrocytic differentiation medium for the osteogenic and chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells in the construction of osteochondral graft. *Tissue engineering Part A.* 2009. **15**, № 9. P. 2481-2490.
22. Gregory C. A., Gunn W. G., Peister A., et al. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004. **329**. P. 77-84.
23. Fernando A. A., Dominique B. Isolation, culture, and differentiation potential of mouse marrow stromal cells. *Curr Prot Stem Cell Biol.* 2008. DOI: 10.1002/9780470151808.sc02b03s7.
24. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983. **65**, № 1. P. 55-63.
25. Лакин Г. Ф. Биометрия. Москва: Высшая школа. 1990. 350 с.
26. Land S. C., Darakhshan F. Thymulin evokes IL-6-C/EBPβ regenerative repair and TNF-α silencing during endotoxin exposure in fetal lung explants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004. 286. P. L473-L487.
27. Orlic D., Kajstura J., Ciment S. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2011. **410**. P. 701-705.
28. Sekiya I., Larson B. L., Vuoristo J. T., et al. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J. Bone Miner Res.* 2004. **2**. P. 256-264.
29. Pardo J., Schwerdt J. I., Reggiani P. C., et al. Physiology, molecular biology and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Physiol Mini Reviews.* 2012. **6**, № 1. P. 2-12.

30. *Оксимец В. М.* Роль мезенхимальных стромальных клеток в остеоиммунных процессах. Український журнал клінічної та лабораторної медицини. 2011. **6**, № 1. С. 94-98.
31. *Haddad J. J., Hanbali L. H.* The anti-inflammatory and immunomodulatory activity of thymulin peptide is NF- κ B dependent and involves the downregulation of I κ B- α . Am J Med. Biol Res. 2013. 1, № 2. P. 41-49.
32. *Boeloni J. N., Ocarino N. M., Goes A. M., et al.* Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of ovariectomized and nonovariectomized female rats with thyroid dysfunction. Pathol Res Pract. 2013. **209**, № 1. P. 44-51.
33. *Panchenko A. V., Popovich I. G., Trashko A. P., et al.* Biomarkers of aging, life span and spontaneous carcinogenesis in the wild type and HER-2 transgenic FVB/N female mice. Biogerontology. 2015. DOI: 10.1007/s10522-015-9611-y.
34. *Anisimov V. N., Popovich I. G., Zabezhinski M. A., et al.* Sex differences in aging, life span and spontaneous tumorigenesis in 129/Sv mice neonatally exposed to metformin. Cell Cycle. 2015. **14**, № 1. P. 46-55.
35. *Liu J., Huang F., He H.W.* Melatonin effects on Hard tissue: bone and tooth. Int J Mol Sci. 2013. **14**. P. 10063-10074.
36. *Літовка І. Г., Мазепа-Крижанівська У. О., Березовський В. Я.* Вплив мелатоніну на метаболізм кісткової тканини. Фізіологічний журнал. 2014. **60**, № 2. С. 102-109.
37. *Бутенко Г. М., Поворознюк В. В., Лабунец І. Ф. и др.* Влияние пептидных факторов тимуса и эпифиза на структурно-функциональное состояние костной ткани при старении: экспериментально-клиническое исследование. Пробл. Остеол. 2001. **4**, № 3. С. 4-10.
38. Иммунобиология гормонов тимуса. Под ред. Ю. А. Гриневича, В. Ф. Чеботарева. Киев: Здоровье, 1989. 160 с.
39. *Nikolskiy I. S., Nikolskaya V.V., Demchenko D. L., et al.* Potentiation of direct osteogenic differentiation of thymic multipotent stromal cells by prior co-cultivation with thymocytes. Cell and Organ Transplantation. 2016. **4**, № 2. P. 220-223.
40. *Di N. M., Carlo-Stella C., Magni M., et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood. 2002. **99**, № 10. P. 3838-3843.
41. *Le Blanc K., Tammik L., Sundberg D., et al.* Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. Scand J Immunol. 2003. **57**, № 1. P. 11-20.
42. *Chamberlain G., Fox J., Ashton B., et al.* Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells. 2007. **25**, № 11. P. 2739-2749.
43. *Kyurkchiev D., Bochev I., Ivanova-Todorova E., et al.* Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. World J Stem Cells. 2014. **6**, № 5. P 552-570.
44. *Stolzinger A., Sethe S., Scutt A. M.* Stressed stem cells: temperature response in aged mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2006. **15**. P. 478-487.



СТАТТЯ НА САЙТЕ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Поступила в редакцію 02.04.2018 г.

Прийнята к печати 30.05.2018 г.