

УДК 611.018.26: 612.67+618.11-089.87:57.085.23

Морфофункціональні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини *in vitro* у оваріоектомованих мишей різного віку

Устименко А. М.^{1,2}, Кирик В. М.^{1,2}, Луценко Т. М.^{1,2}, Цупиков О. М.^{1,3}, Бутенко Г. М.^{1,2}¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ, Україна²ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова Національної академії медичних наук України», Київ, Україна³Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ, Українаe-mail: alina.n.ustymenko@gmail.com

РЕЗЮМЕ

В сучасній регенеративній медицині особливий інтерес дослідників та клініцистів привертають мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) з жирової клітковини, які знаходять широке застосування в лікуванні багатьох захворювань. Враховуючи вплив статевих гормонів на функціонування жирової тканини, ключовим аспектом при цьому залишається належна оцінка біологічної безпеки та прогнозування ефективності таких клітинних трансплантатів в умовах асоційованих з віком порушень ендокринної функції яєчників.

МЕТА РОБОТИ: встановити морфофункціональні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини *in vitro* у молодих і старих оваріоектомованих мишей.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. На *in vivo* моделі оваріоектомії у молодих та старих самок мишей лінії CBA/Ca у віці 2 та 14 міс. відтворювали порушення ендокринної функції яєчників. ММСК отримували з жирової тканини, фенотипували методом проточної цитометрії та оцінювали *in vitro* морфологічні характеристики, проліферативний потенціал та здатність до направленої мультилінійної диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках.

РЕЗУЛЬТАТИ. Під впливом оваріоектомії у молодих тварин відмічали зменшення проліферативного, клоногенного потенціалів ММСК-ЖТ *in vitro*, показники яких наближались до рівня показників старих тварин. Крім того, знижувався остеогенний потенціал ММСК-ЖТ *in vitro*, а також посилювалось направлене адипогенне диференціювання при одночасному збільшенні маси тіла тварин.

ВИСНОВКИ. Результати дослідження свідчать про негативний вплив оваріоектомії в молодому віці на функціональну активність ММСК-ЖТ, що проявляється порушенням їх потенціалу до проліферації, колонієутворення та направленої диференціювання.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: оваріоектомія; мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової тканини; направлене диференціювання клітин

На сьогодні актуальним є впровадження нових підходів лікування людей похилого віку, які включають не тільки фармакологічні препарати, а й застосування передових технологій регенеративної медицини з використанням клітинної та тканинної терапії. Особливий інтерес дослідників та клініцистів привертають мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) з жирової клітковини (adipose-derived stem cells – ADSCs) як одного з найбільш безпечних та доступних джерел. Завдяки мультипотентному потенціалу диференціювання

в спеціалізовані клітини різних типів (жирову, кісткову, хрящову) вони знаходять широке застосування в пластичній та реконструктивній хірургії м'яких тканин і опорно-рухового апарату, в усуненні наслідків ендотеліальної дисфункції при критичній ішемії нижніх кінцівок та цукровому діабеті, ішемічній хворобі серця, ендокринних порушеннях тощо.

Враховуючи той факт, що метаболізм жирової тканини значною мірою регулюється статевими гормонами, закономірно можна очіку-

вати на зміни властивостей стовбурових клітин, отриманих з даного джерела, в умовах менопаузи. Зокрема, було показано, що у жінок в постменопаузі стовбурові клітини з жирової клітковини мають підвищений потенціал адипогенного диференціювання під впливом короточасного замісного введення 17 β -естрадіолу. Частим наслідком менопаузи є постменопаузальний остеопороз – захворювання, при якому кістково-резорбуюча активність остеокластів випереджає кістково-формуєчу активність остеобластів, що призводить до втрати переважно трабекулярної кістки [1, 2].

Оскільки більшість патологічних станів, при яких виникає потреба в клітинній терапії з використанням аутологічних стовбурових клітин, зустрічається переважно у людей похилого віку, беззаперечно стає актуальність встановлення критеріїв біологічної безпеки стовбурових клітин жирової клітковини, отриманих в умовах менопаузи та постменопаузальному періоді, які супроводжуються дефіцитом естрогенів.

Загальноприйнятою експериментальною моделлю дефіциту естрогенів, характерного для менопаузи у людини, є оваріоектомія у лабораторних тварин. На моделі оваріоектомії у мишей було продемонстровано, що недостатність естрогенів впливає на кількісні та якісні показники субпопуляцій стовбурових клітин в кістковому мозку. Було показано, що у оваріектомованих (OVx) мишей баланс між остеогенною та адипогенною диференціацією стовбурових клітин кісткового мозку порушений з переважанням адипогенної диференціації [3, 4]. При цьому також змінюється абсолютна кількість прогеніторних клітин іншої локалізації. На сьогодні практично відсутні дані щодо диференціального потенціалу стовбурових клітин жирової клітковини в різних напрямках на фоні дефіциту естрогенів, що становить суттєву наукову проблему щодо безпеки та індивідуальної терапевтичної ефективності клітинних препаратів.

Тому метою нашого дослідження було встановити *in vitro* характеристики морфології, проліферативного потенціалу та здатності до направленої мультилінійної диференціювання ММСК жирової тканини у мишей з моделлю оваріоектомії в порівнянні з нормальними тваринами відповідного віку.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Всі експерименти на тваринах було виконано з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (European convention, Страсбург, 1986) [5], Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2016) [6], а також усіх норм біоетики і біологічної безпеки.

Тварини. В дослідженні використовували молодих (2 міс.) та старих (14 міс.) самиць мишей лінії *CBA/Ca*, які утримувались в стандартних умовах на базі віварію ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України» при фіксованому світловому режимі 12:12 год з вільним доступом до води та їжі *ad libitum*.

Експериментальна модель оваріоектомії. Тварин наркотизували за допомогою внутрішньоочеревинного введення 2,5 % розчину 2,2,2-трибромметанолу (*Sigma*, США) (400 мг/кг) та виконували білатеральну оваріоектомію з дотриманням всіх правил асептики і антисептики [7]. Як контроль слугували тварини відповідного віку, яким виконували лише розріз черевної порожнини та виведення яєчників в рану без їх видалення – псевдооперація. Рани ушивали пошарово,

і тварини перебували під джерелом тепла до виходу з наркозу. Було сформовано 4 експериментальні групи (табл. 1).

Через 60 днів після оваріоектомії тварин виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації після попереднього знеболювання 2,5 % розчином 2,2,2-трибромметанолу (*Sigma*, США) з розрахунку 400 мг/кг. Після евтаназії у мишей в стерильних умовах виділяли підшкірний жир з метою отримання ММСК жирової тканини в культурі *in vitro*.

Отримання ММСК жирової тканини в культурі *in vitro*. З підшкірної жирової клітковини самиць мишей лінії *CBA/Ca* була отримана стромально-васкулярна фракція (СВФ) [8]. Для цього в стерильних умовах фрагменти жирової тканини подрібнювали ножицями та ферментували в 0,1 % розчині колагенази типу 1А (*Sigma*, США) протягом 90 хв при температурі 37 °С при постійному помішуванні на шейкері зі швидкістю обертання 100 об/хв. Отриману суспензію клітин відмивали у поживному середовищі DMEM (*Sigma*, США) шляхом центрифугування при 300 хг, видаляли надосадову рідину із зрілими адипоцитами і дебрисом та пропускали через стерильний нейлоновий фільтр EASYstrainer з діаметром пор 100 мкм (*Greiner bio-one*, Австрія). Отриману СВФ вносили в культуральні флакони для адгезивних клітин площею 25 см² (*Nunc*, США) та культивували в повному поживному середовищі DMEM-F12, яке містило 10 % фетальної сироватки корів (*HyClone*, США), пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, (*Sigma-Aldrich*, США), 1:100 nonessential amino acids (*Sigma-Aldrich*, США), 200 мМ L-glutamine (*Sigma-Aldrich*, США) в CO₂ інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі +37 °С. Заміну поживного середовища проводили кожні 3 дні. По досягненню 80 % конфлюентності моношару клітини переводили в суспензію з використанням суміші 0,25 %-го розчину трипсину (*Sigma-Aldrich*, США) з 0,02 % розчину Версена (*Біо-Тест-Лабораторія*, Україна) та проводили субкультивування до 3-го пасажу. Після кожного пасажу визначали імунофенотип популяції клітин.

Імунофенотипування клітин методом проточної цитометрії. Фенотипування отриманих клітин у динаміці культивування за маркерами CD44, CD73, CD90, CD45 було виконано на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (*Becton Dickinson*, США). Зразки по 2•10⁵ клітин в 50 мкл буферу CellWash (*BD*, США) інкубували з rat anti-mouse моноклональними антитілами, міченими фікоеритрином, в робочій концентрації 0,5 мкг/10⁶ клітин протягом 30 хв та відмивали в буфері CellWash (*BD Bioscience*, США) шляхом центрифугування при 300хг протягом 5 хв. Дані аналізували з використанням програмного забезпечення BD FACSDiva 6.2.1 (*Becton Dickinson*, США), реєструючи не менше 2•10⁴ клітин на зразок [9].

Визначення колонієутворюючого потенціалу ММСК-ЖТ. Колонієутворюючий потенціал ММСК оцінювали за допомогою CFU-тесту (colony forming unit assay). Клітини 2-го пасажу висівали зі щільністю 300 клітин в чашки Петрі з площею культуральної поверхні 9,5 см² в поживному середовищі α -MEM (*Sigma*, США), яке містило 20 % фетальної сироватки корів (*HyClone*, США), пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, (*Sigma-Aldrich*, США), 1:100 nonessential amino acids (*Sigma-Aldrich*, США), 200 мМ L-glutamine (*Sigma-Aldrich*, США) та культивували в CO₂ інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі +37 °С. Через 14 днів чашки Петрі з адгезивними колоніями промивали фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) та фарбували за Романовським-Гімза. Під бінокулярним мікроскопом рахували колонії, які містили мінімум 50 клітин. Ефективність колонієутворення (plating efficiency – PE) визначали за формулою [10]:

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ГРУПА	МОЛОДІ (YOUNG)	СТАРІ (OLD)
	ВІК ТВАРИН НА МОМЕНТ ОПЕРАЦІЇ (міс.); КІЛЬКІСТЬ (n)	
Оваріоектомія (OVx)	2 міс. (n = 17)	14 міс. (n = 14)
Контроль – псевдооперація (Ctrl)	2 міс. (n = 11)	14 міс. (n = 12)

Табл. 1. Розподіл тварин по експериментальних групах

$$(PE, \%) = \frac{\text{кількість сформованих колоній}}{\text{загальна кількість посаджених клітин}} \cdot 100\%$$

Проліферативний потенціал клітин. Клітини в кількості $1 \cdot 10^5$ вносили в чашку Петрі 35 мм та культивували в поживному середовищі DMEM-F12 (*Sigma*, США), яке містило 10 % фетальної сироватки корів (*HyClone*, США), пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, (*Sigma-Aldrich*, США), 1:100 nonessential amino acids (*Sigma-Aldrich*, США), 200 mM L-glutamine. Після досягнення конфлюенту клітини моношару переводили в суспензію за допомогою суміші 0,25 % розчину трипсину та 0,02 % розчину Версена (1:3), отриману суспензію клітин центрифугували в поживному середовищі, яке містило 10 % фетальної сироватки корів (*HyClone*, США) при 380 xg 10 хв. Після підрахунку кількості клітин в гемоцитометрі Ньюбауера знову вносили клітини в кількості $1 \cdot 10^5$ в чашку Петрі з площею культуральної поверхні 9,5 см² та культивували в поживному середовищі, склад якого вказано вище. Субкультивування припиняли, коли кількість клітин, отримана після останнього пасажу, була менше $1 \cdot 10^5$. Кількість пасажів коливалась від 2 до 5.

Показник часу подвоєння клітинної популяції (population doubling time – PDT) розраховували для кожного пасажу за формулою [11]:

$$PDT = T / 3,31 \lg (X_k / X_0), \text{ де:}$$

T – час культивування клітин; X_k – кількість клітин, отриманих після субкультивування; X_0 – кількість клітин на початку пасажу.

Спрямоване остеогенне диференціювання культур клітин. Для спрямованого остеогенного диференціювання клітини вносили в 24 лунковий планшет в кількості $5 \cdot 10^4$ на лунку та культивували в повному поживному середовищі DMEM-F12 (*Sigma*, США), яке містило 10 % фетальної сироватки корів (*HyClone*, США), пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, (*Sigma-Aldrich*, США), 1:100 nonessential amino acids (*Sigma-Aldrich*, США), 2 mM L-glutamine. Після досягнення культурою субконфлюентного стану замінювали повне поживне середовище для культивування на остеоіндуктивне, яке складалося з поживного середовища DMEM-F12 (*Sigma*, США) з додаванням 10 % фетальної сироватки корів, L-аскорбінової кислоти 2-фосфату (0,05 мМ), дексаметазону (100 нМ) та β-гліцерофосфату (10 мМ) [12]. Заміну остеоіндуктивного середовища проводили кожні три-чотири доби. Через 21 добу моношар клітин промивали ФСБ, фіксували 4 % охолодженим розчином параформальдегіду протягом 15 хв та фарбували за допомогою алізаринового червоного для виявлення відкладень солей кальцію в позаклітинному матриксі. Активність лужної фосфатази як маркера функціональної активності остеобластів визначали після нанесення BCIP/NBT (*Sigma*, США) на зафіксований 4 % розчином параформальдегіду моношар. Через 30 хв інкубації в темному місці культури відмивали дистильованою

водою та оцінювали інтенсивність забарвлення за методом Karlow [13]. Напівкількісний аналіз відкладень солей кальцію проводили за методом Gregory [14]. Інтенсивність забарвлення оцінювали шляхом вимірювання оптичної щільності на фотометрі Multiskan EX (*Thermo Scientific*, США) при довжині хвилі 405 нм.

Спрямоване адипогенне диференціювання культур клітин. Для спрямованого адипогенного диференціювання клітини в кількості $5 \cdot 10^4$ на лунку вносили в 24 лунковий планшет та культивували в повному поживному середовищі DMEM-HG (*Sigma*, США), яке містило 10 % фетальної сироватки корів (*HyClone*, США), пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, (*Sigma-Aldrich*, США), 1:100 nonessential amino acids (*Sigma-Aldrich*, США), 200 mM L-glutamine. Після досягнення культурою субконфлюентного стану міняли повне поживне середовище для культивування на адипогенне, яке складалося з поживного середовища DMEM-HG (*Sigma*, США) з додаванням 10 % фетальної сироватки корів, дексаметазону (1 мкМ), індометацину (200 мкМ), ізобутилметилксантину (500 мкМ) та інсуліну (5 мкг/мл). Заміна адипогенного середовища відбувалася кожні 3 дні. Через 14 днів культивування клітини промивали ФСБ, фіксували 4 % охолодженим розчином параформальдегіду та фарбували розчином Oil Red S (*Sigma*, США) для візуалізації ліпідних гранул в цитоплазмі клітин [15]. Після візуалізації гранул додавали 100 % ізопропанол до кожної лунки та інкубували 10 хв при кімнатній температурі на шейкері, відбирали по 250 мкл із кожної лунки та аналізували оптичну щільність при довжині хвилі 500 нм на планшетному спектрофотометрі Multiskan EX (*Thermo Scientific*, США). Ступінь диференціації виражали в умовних одиницях оптичного поглинання.

Статистична обробка даних. Статистичну обробку даних проводили методами параметричної (t-критерій Стьюдента, критерій Фішера) та непараметричної (U-критерій Вілкоксона-Манна-Вітні) статистики з використанням програмного забезпечення Statistica 7.0 (*StatSoft Inc.*, США). Дані представлено у вигляді $M \pm SEM$. Статистичну різницю показників між групами порівняння вважали достовірною при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР ЖИРОВОЇ КЛІТКОВИНИ МИШЕЙ

На першому етапі дослідження була отримана первинна стромально-васкулярна фракція жирової тканини, з якої в процесі субкультивування була отримана однорідна популяція стромальних клітин. Встановлено, що первинна культура адгезивних клітин жирової тканини як молодих, так і старих тварин, незалежно від впливу ова-

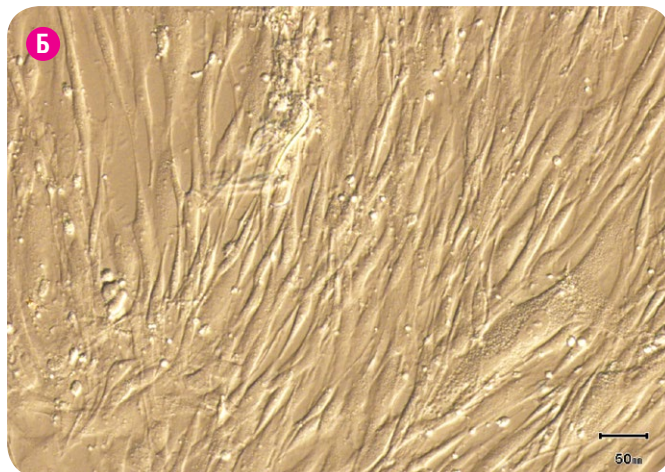
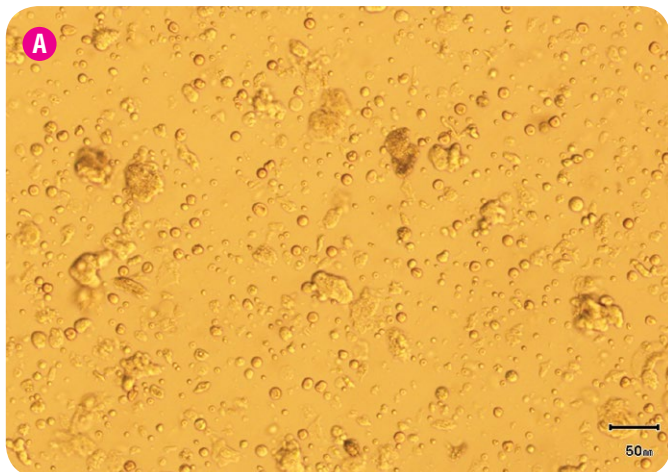


Рис. 1. Мікрофото первинної культури СВФ мишей. А – 1-а доба культивування клітин СВФ. Б – 12-а доба культивування клітин СВФ. Світлова мікроскопія. Шкала – 50 мкм.

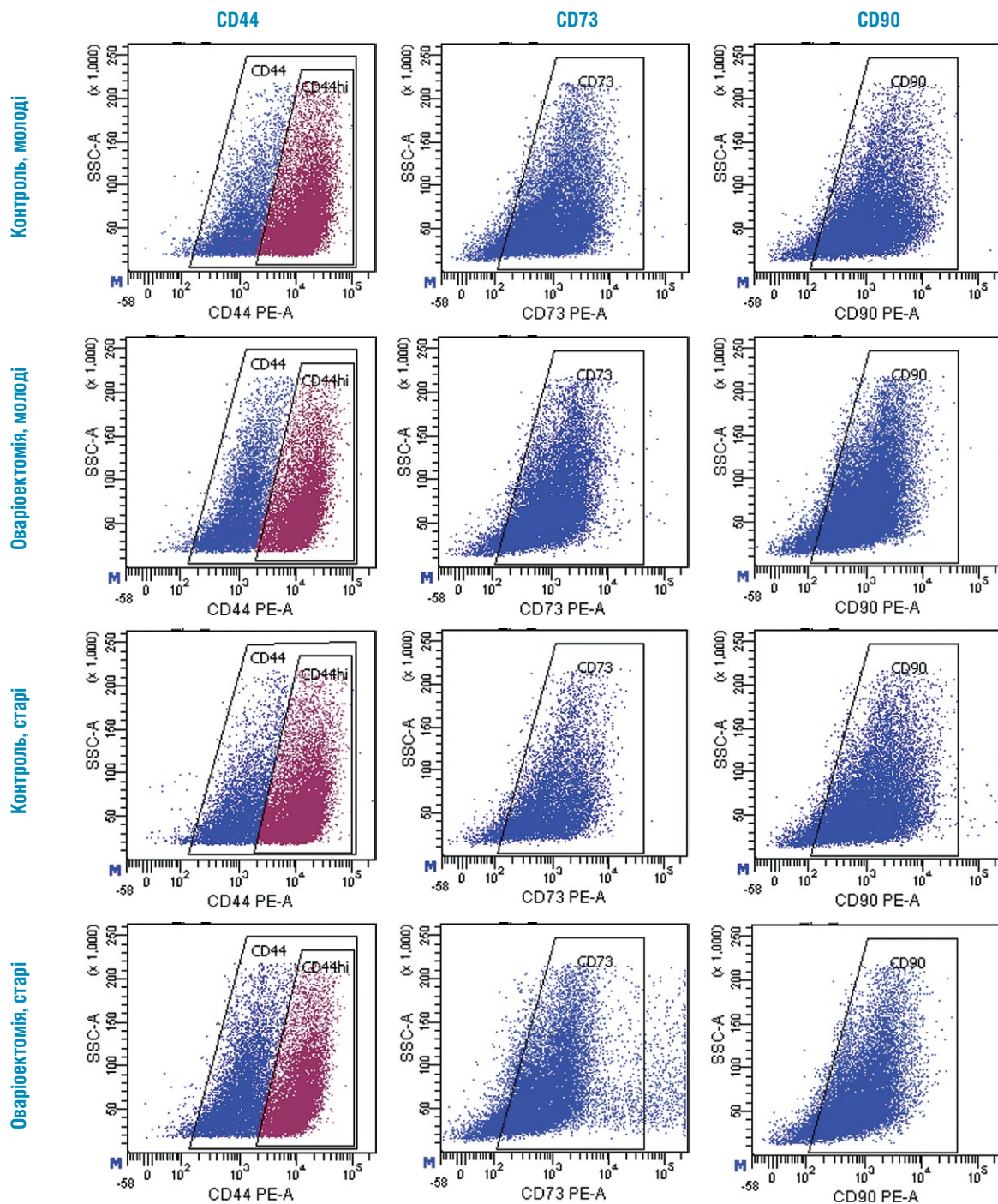


Рис. 2. Гістограми експресії стромальних маркерів CD44, CD73 і CD90 в культурі ММСК жирової клітковини мишей експериментальних груп за даними проточної цитометрії, 2-й пасаж.

ріоектомії, складається з клітин, різних за морфологією, розмірами, що пов'язано з різноманітністю вихідної популяції клітин в складі СВФ (рис. 1 А).

СВФ складається з декількох типів клітин, включаючи циркулюючі клітини крові, фібробласти, перицити, ендотеліальні клітини. При заміні поживного середовища в процесі культивування слабоадгезивні та неадгезивні клітини елімінувались. На 5-7-у добу культивування кількість і розмір клітин збільшувались, завдяки чому спостерігалась велика площа адгезії та швидкість досягнення конфлюенту по всій поверхні культуральних флаконів. У прикріпленому до поверхні флакону вигляді діаметр клітин варіював від 10 до 250 мкм, при цьому спостерігались певні характерні форми клітин: фібробластоподібні,

веретенноподібні, зірчато-подібні, деколи з кількома відростками, з чітко візуалізованими ядрами. В середньому через 12-14 діб культивування адгезивні клітини СВФ формували до 90 % конфлюентного моношару (рис. 1 Б). Після субкультивування культура клітин досягла субконфлюентного стану в середньому на 3-ю добу та складалась переважно з популяції фібробластоподібних клітин.

ФЕНОТИП КУЛЬТУРИ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ПІДШКІРНОЇ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ МИШЕЙ

За допомогою імунофенотипування методом проточної цитометрії у адгезивних клітин з жирової тканини всіх груп першого пасажу була встановлена експресія мезенхімальних маркерів CD44 ($86,85 \pm 4,40$ %),

CD73 ($38,9 \pm 11,9\%$) та CD90 ($40,85 \pm 13,7\%$), яка після наступних пасажів наростала та відповідала типовому для ММСК фенотипу (рис. 2) [16]. При цьому відмічалася низька експресія гемопоетичного маркера CD45 ($< 3\%$).

Слід зазначити, що статистично значущих відмінностей за жодним із маркерів між групами контролю обох вікових груп виявлено не було, як і відмінностей між групами тварин, оваріоектомованих в молодому та старому віці.

КОЛОНІЄУТВОРЮЮЧИЙ ПОТЕНЦІАЛ ММСК-ЖТ ОВАРІОЕКТОМОВАНИХ МИШЕЙ

Ефективність утворення колоній є важливим показником якості клітинних препаратів, оскільки демонструє як їх здатність до самопідтримання клітинної популяції, так і до розвитку в певному напрямку [17, 18].

За результатами CFU-тесту показано статистично значущу різницю між колонієутворюючою здатністю ММСК-ЖТ у молодих і старих мишей. Так, на 300 ММСК-ЖТ в середньому за 14 діб утворилося $31,0 \pm 7,24$ колоній (PE = 10 %) в групі молодих тварин з оваріоектомією (n = 9); та $43 \pm 6,84$ колоній (PE = 14 %) в групі контрольних псевдооперованих тварин (n = 6) відповідного віку (p < 0,05). В той же час показана відсутність відмінностей між показниками CFU-тесту в групах старих оваріоектомованих ($31,28 \pm 12,57$; n = 7) та псевдооперованих тварин ($30,25 \pm 10,07$; n = 4), але спостерігалось суттєве зниження клоногенного потенціалу ММСК-ЖТ порівняно із групою молодих контрольних тварин (p < 0,05) (рис. 3).

ПРОЛІФЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ММСК-ЖТ ОВАРІОЕКТОМОВАНИХ МИШЕЙ

Визначення кінетики росту клітин в культурі *in vitro* показало, що ММСК-ЖТ молодих тварин з оваріоектомією (n = 7) проліферують майже в два рази повільніше у порівнянні з контрольними тваринами (n = 5) відповідного віку ($6,44 \pm 2,26$ та $3,12 \pm 1,02$ дні відповідно;

p < 0,05). У той же час у старих мишей з оваріоектомією (n = 8) та псевдооперованих (n = 3) теж відбувалось збільшення часу подвоєння популяції ($6,82 \pm 2,5$ та $10,86 \pm 4,22$ днів відповідно) і, як наслідок, сповільнення проліферації клітин порівняно із групою молодого контролю (рис. 4).

ПОТЕНЦІАЛ ММСК-ЖТ МИШЕЙ ДО АДИПОГЕННОГО ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ *IN VITRO*

Мультипотентні властивості культур клітин жирової тканини мишей було підтверджено здатністю до направлено диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках.

Показано, що на 14-у добу адипогенне диференціювання *in vitro* відбулось в культурах ММСК ЖТ усіх експериментальних груп (рис. 5).

Показано статистично значущу відмінність між контрольною і оваріоектомованою групами молодих мишей за результатами показників оптичної щільності: оваріоектомія сприяла посиленню адипогенного потенціалу *in vitro*. Ступінь диференціації в групах старих мишей статистично не відрізнявся від такого у групі молодих оваріоектомованих тварин (табл. 2).

Можна припустити, що посилена адипогенна диференціація ММСК-ЖТ *in vitro* є причиною збільшення адипогенезу *in vivo* і подальшого ожиріння, що підтверджується вірогідним збільшенням маси тіла оваріоектомованих тварин ($25,04 \pm 1,64$ г; n = 17) порівняно з контрольною групою ($22,53 \pm 1,15$ г; n = 11) того ж віку (p < 0,0001) (рис. 5).

Показано, що остеогенна диференціація *in vitro* відбулася в культурах ММСК-ЖТ усіх експериментальних груп. У відповідь на остеогенну індукцію ММСК-ЖТ на 21-у добу культивування спостерігали високу активність лужної фосфатази (рис. 6) та мінералізацію міжклітинного матриксу солями кальцію (рис. 7, 8).

Слід зазначити, що оваріоектомія у молодих тварин сприяла зниженню потенціалу до остеогенного диференціювання, що проявилось у зниженні інтенсивності мінералізації солями кальцію позаклітинного матриксу у порівнянні з відповідною за віком контрольною

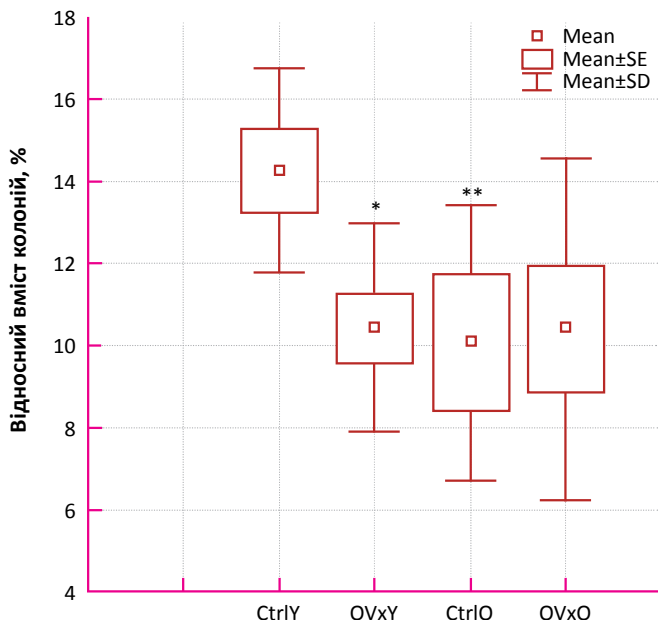


Рис. 3. CFU-тест. Ефективність колонієутворення ММСК-ЖТ у експериментальних тварин. CtrlY – контроль, молоді (n = 6); OVxY – оваріоектомія, молоді (n = 9); CtrlO – контроль, старі (n = 4); OVxO – оваріоектомія, старі (n = 7).

Примітки: * – p < 0,05 – порівняно з контрольною групою молодих тварин; ** – p < 0,05 – порівняно з контрольною групою молодих тварин.

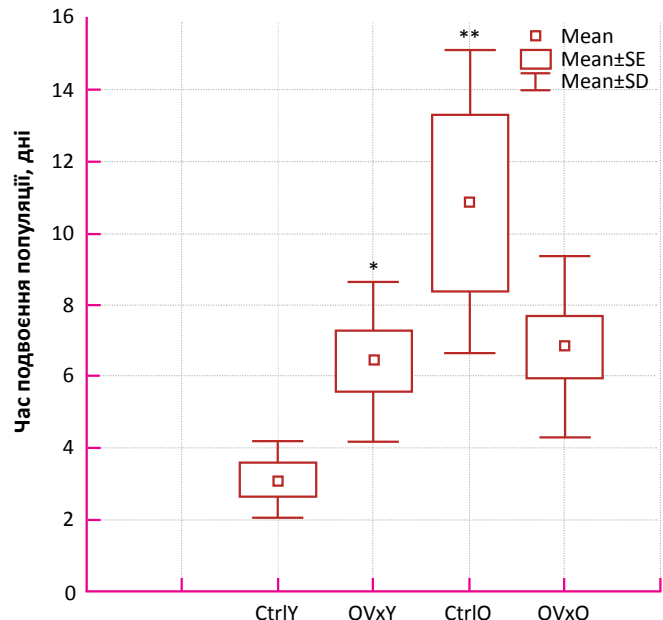


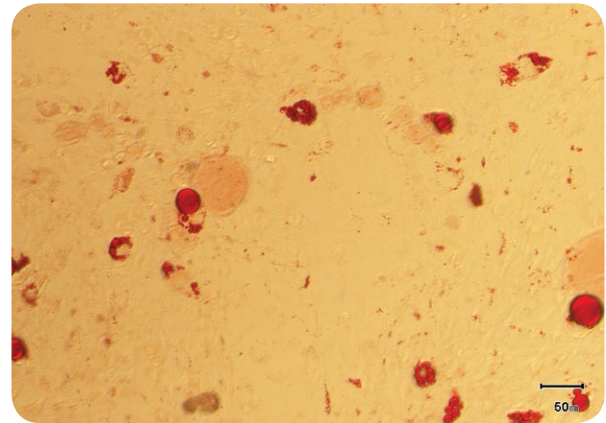
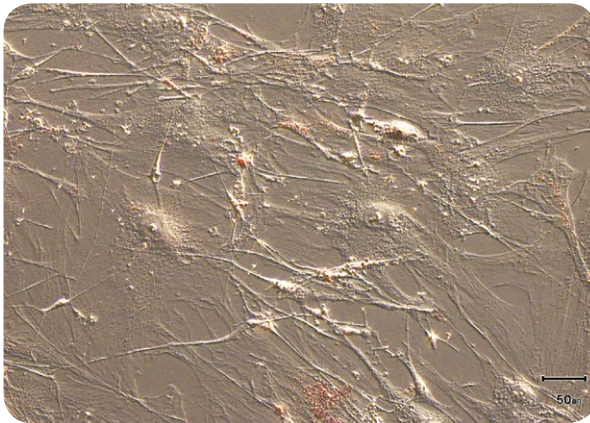
Рис. 4. Результати PDT тесту. Кількість днів, необхідна для подвоєння популяції клітин в культурі *in vitro*. CtrlY – контроль, молоді (n = 5); OVxY – оваріоектомія, молоді (n = 7); CtrlO – контроль, старі (n = 3); OVxO – оваріоектомія, старі (n = 8).

Примітки: * – p < 0,05 – порівняно з контрольною групою молодих тварин; ** – p < 0,05 – порівняно з контрольною групою молодих тварин.

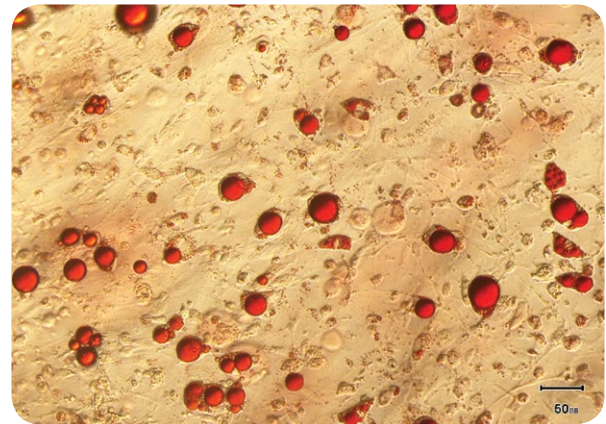
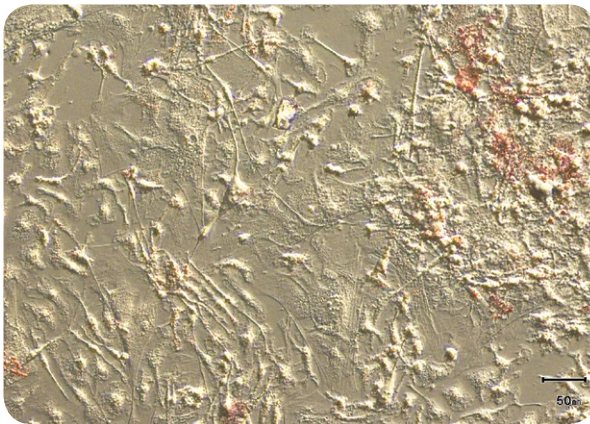
Стандартне ростове середовище

Ростове середовище з факторами адипогенного диференціювання

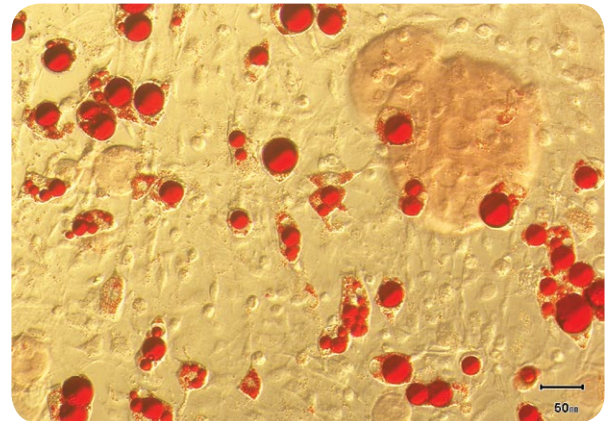
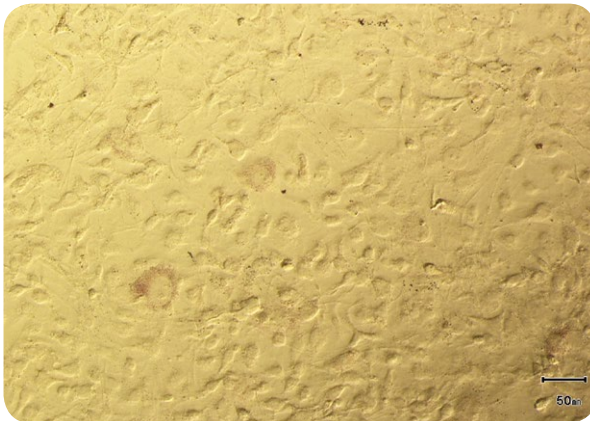
Контроль, молоді



Оваріоектомія, молоді



Контроль, старі



Оваріоектомія, старі

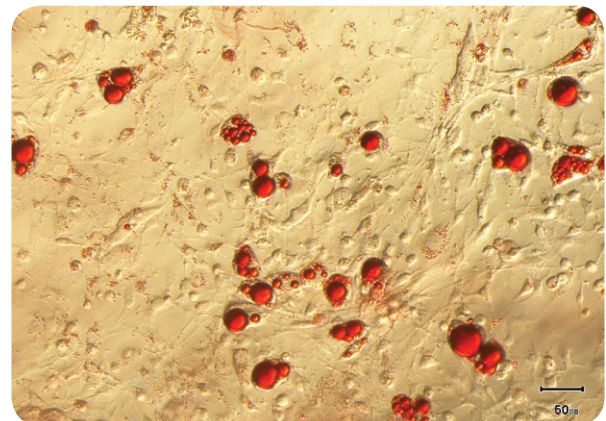


Рис. 5. Мікрофото препаратів культур ММСК жирової тканини мишей після спрямованого адипогенного диференціювання. Клітини з ліpidними включеннями забарвлені барвником Oil Red (червоний колір). Світлова мікроскопія, шкала – 50 мкм.

Табл. 2. Показники оптичного поглинання середовища після фарбування барвником Oil Red культури ММСК-ЖТ, направлено диференційованих в адипогенному напрямку, у. о.; довжина хвилі 500 нм.

МОЛОДІ				СТАРІ			
К		OVx		К		OVx	
PC	PC+ФАД	PC	PC+ФАД	PC	PC+ФАД	PC	PC+ФАД
0,096 ± 0,10 (n = 6)	0,148 ± 0,10* (n = 6)	0,128 ± 0,12 (n = 14)	0,287 ± 0,10** (n = 8)	0,132 ± 0,04 (n = 8)	0,232 ± 0,10* (n = 8)	0,114 ± 0,01 (n = 8)	0,183 ± 0,01* (n = 12)

Примітки: PC – стандартне ростове середовище; PC+ФАД – ростове середовище з факторами адипогенного диференціювання.

* – p < 0,05 у порівнянні з контрольними культурами (без додавання ФАД) тварин відповідного віку; # – p < 0,05 у порівнянні з молодими тваринами відповідного віку і умов культивування.

Табл. 3. Показники оптичного поглинання середовища після фарбування барвником Alizarin Red S культури ММСК-ЖТ мишей, направлено диференційованих в остеогенному напрямку, у. о.; довжина хвилі 405 нм.

МОЛОДІ				СТАРІ			
К		OVx		К		OVx	
PC	PC+ФОД	PC	PC+ФОД	PC	PC+ФОД	PC	PC+ФОД
0,35 ± 0,10 (n = 4)	0,59 ± 0,14* (n = 4)	0,29 ± 0,06 (n = 8)	0,37 ± 0,09** (n = 8)	0,26 ± 0,07 (n = 7)	0,38 ± 0,07*α (n = 7)	0,28 ± 0,09 (n = 8)	0,39 ± 0,09*α (n = 8)

Примітки: PC – стандартне ростове середовище; PC+ФОД – ростове середовище з факторами остеогенного диференціювання;

* – p < 0,05 у порівнянні з культурами, культивованих без додавання ростових остеогенних факторів; # – p < 0,05 у порівнянні з контрольною групою відповідного віку і умов культивування; α – p < 0,05 у порівнянні з контрольною групою молодих тварин і умов культивування.

групою. У старих тварин обох груп статистично значущих відмінностей за даним показником не відбувалося, але спостерігалось зменшення оптичної щільності у порівнянні з контрольною групою молодих тварин (табл. 3).

Таким чином, з жирової тканини експериментальних мишей лінії CBA/Ca обох вікових груп з оваріоектомією та псевдооперацією було виділено стромально-васкулярну фракцію та культивовано ММСК, які проліферували в культурі *in vitro* в стандартних умовах культивування та з додаванням специфічних факторів диференціювання. Показано, що гетерогенна СВФ містить популяцію клітин, які характеризуються високими адгезивними властивостями, фенотипом, характерним для ММСК і здатністю до мультилінійного диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках.

Так, за результатами імунофенотипування отримані популяції клітин відповідають імунофенотипу ММСК завдяки високому рівню експресії CD73, CD90 та CD44 та низькому рівню експресії CD45 [16]. При цьому статистично значущих відмінностей за жодним із маркерів між групами псевдооперованих та оваріоектомованих мишей обох вікових груп, а також відмінностей між OVxY та OVxO групами виявлено не було [19]. Але слід зазначити, що оваріоектомія саме у молодому віці призводить до зменшення проліферативного, клоногенного потенціалів ММСК-ЖТ до рівня показників старих тварин [20, 21]. При цьому відбувається посилення адипогенного диференціювання *in vitro* у порівнянні з контрольною групою відповідного віку, що може бути причиною посилення адипогенезу *in vivo* та збільшення маси тіла після оваріоектомії у молодих тварин [22, 23, 24]

Нами показано, що оваріоектомія призводить до зниження остеогенного потенціалу ММСК-ЖТ у мишей лінії CBA/Ca, оваріоектомованих у молодому віці у порівнянні з ММСК-ЖТ контрольних тварин відповідного віку, що цілком підтверджує провідну роль естрогенів у остеогенній диференціації МСК, зокрема ролі 17β-естрадіолу у підтримці росту та диференціювання через рецептор ERα [25]. Крім того, 17β-естрадіол стимулює МСК до експресії остеогенних генів лужної фосфатази, колагену I і TGF-β1 [26, 27].

Таким чином, результати дослідження дозволяють припустити, що оваріоектомія та пов'язаний з нею дефіцит естрогену впливає на функціональні характеристики ММСК-ЖТ *in vitro* у молодих мишей, а в про-

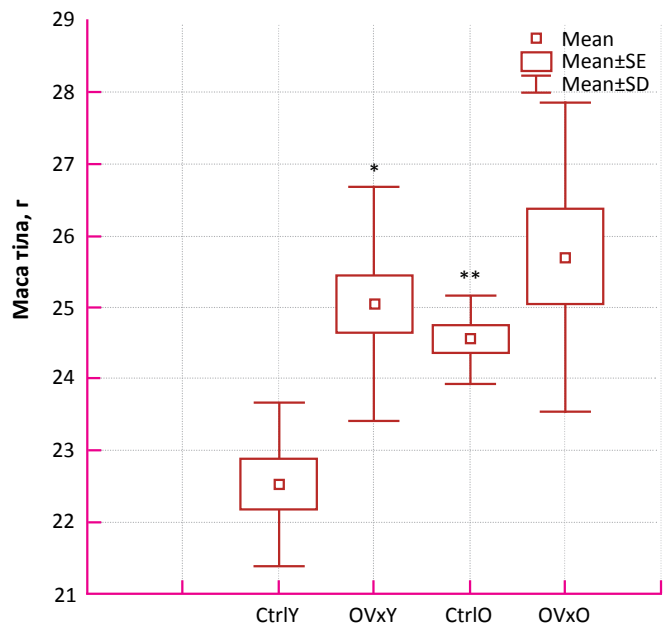


Рис. 6. Маса тіла експериментальних тварин. CtrlY – контроль, молоді (n = 11); OVxY – оваріоектомія, молоді (n = 17); CtrlO – контроль, старі (n = 12); OVxO – оваріоектомія, старі (n = 11).

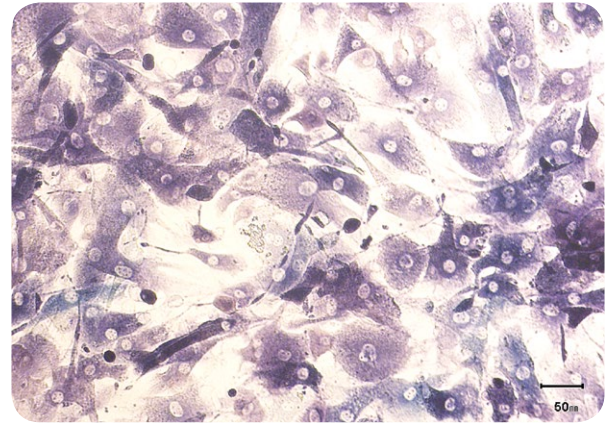
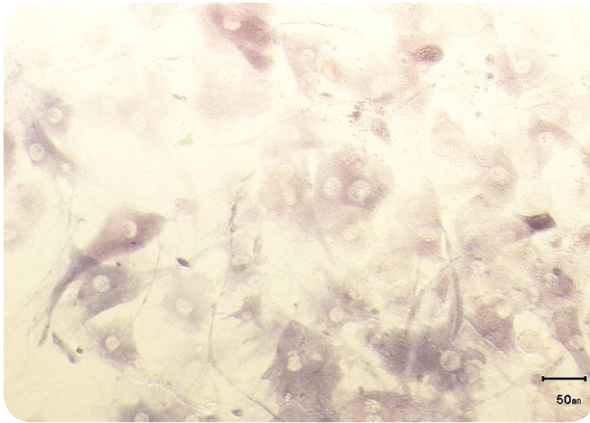
Примітки: * – p < 0,0001 у порівнянні з контрольною групою відповідного віку; ** – p < 0,002 у порівнянні з контрольними тваринами молодого віку.

цесі старіння активуються певні механізми зниження клоногенного та проліферативного потенціалів стовбурових клітин, що робить їх менш залежними від яєчників. Розуміння впливу статевих гормонів на стовбурові клітини дозволить дослідникам і клініцистам модулювати функції цих клітин *in vitro* з метою отримання максимального терапевтичного ефекту для лікування різних хвороб та уникнення побічних ефектів.

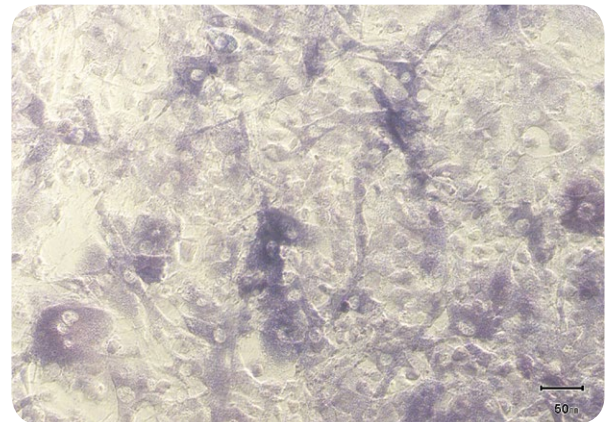
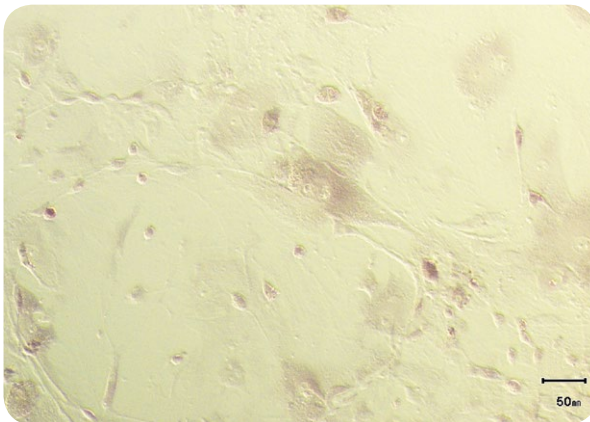
Стандартне ростове середовище

Ростове середовище з факторами
остеогенного диференціювання

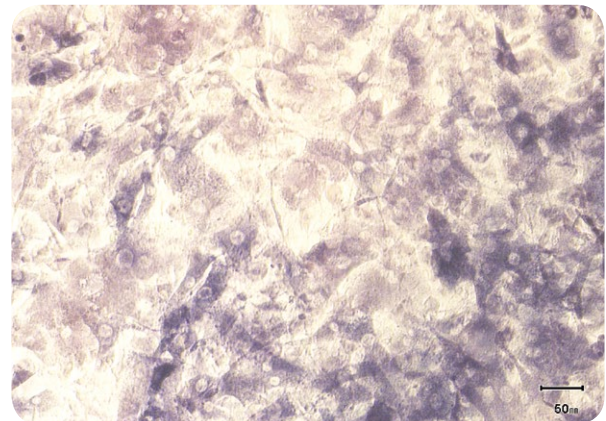
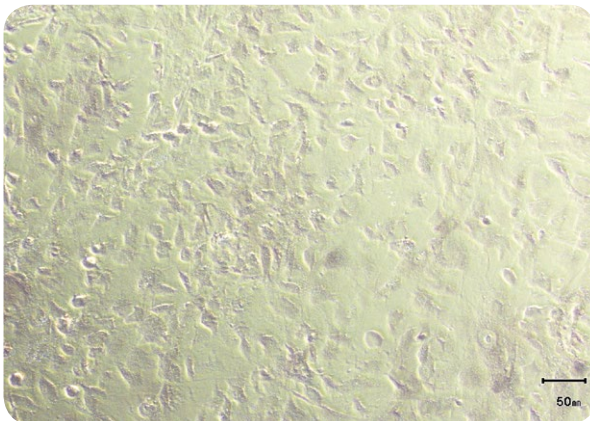
Контроль, молоді



Оваріоектомія, молоді



Контроль, старі



Оваріоектомія, старі

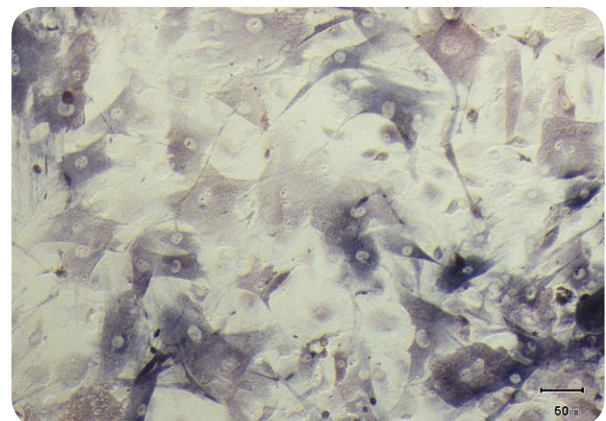
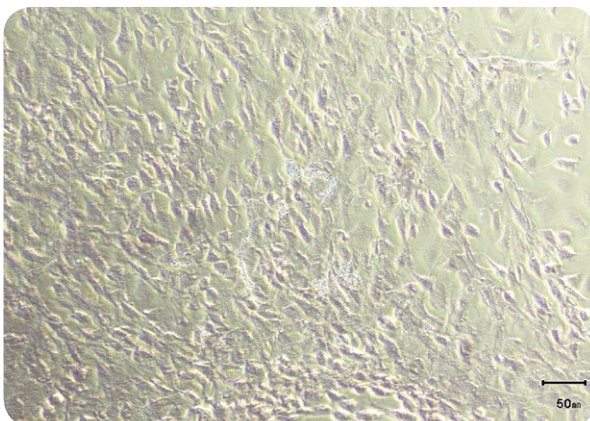


Рис. 7. Мікрофотографії культур клітин ММСК-ЖТ на 21-у добу культивування в ростовому середовищі без факторів диференціювання (контроль) та з факторами остеогенного диференціювання. Цитохімічне визначення активності лужної фосфатази; забарвлення ВСІР-NBT. Світлова мікроскопія, шкала – 50 мкм.

Стандартне ростове середовище

Ростове середовище з факторами
остеогенного диференціювання

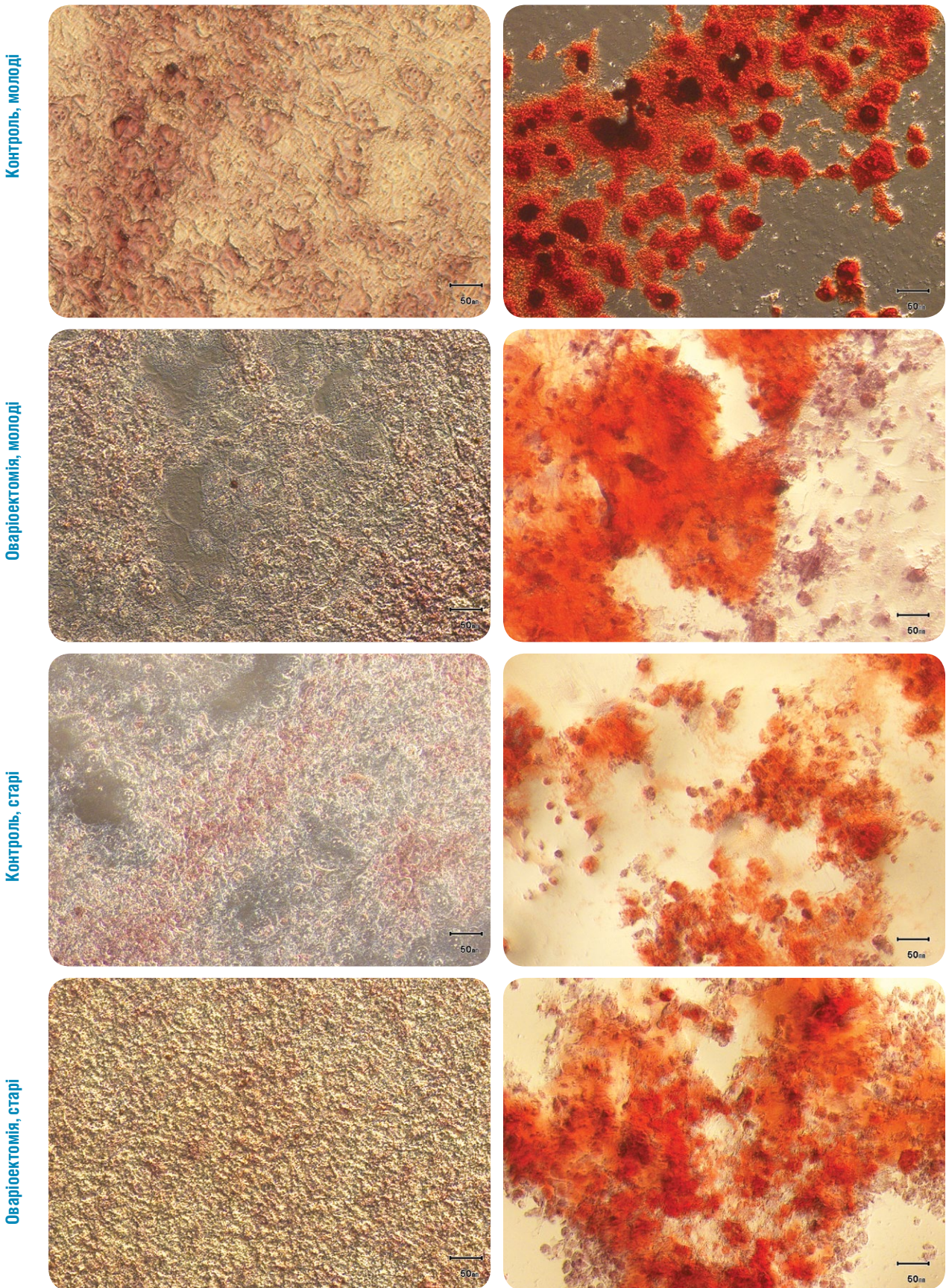


Рис. 8. Мікрофотографії культур клітин ММСК-ЖТ на 21-у добу культивування в ростовому середовищі без факторів диференціювання (контроль) та з факторами остеогенного диференціювання. Інтенсивність мінералізації позаклітинного матриксу солями кальцію. Забарвлення Alizarin Red S. Світлова мікроскопія, шкала – 50 мкм.

ВИСНОВКИ

1. В умовах оваріоектомії у молодих мишей лінії СВА/Са збільшується час подвоєння популяції ММСК ЖТ *in vitro* в порівнянні з псевдооперованими тваринами того ж віку.
2. Оваріоектомія мишей лінії СВА/Са в молодому віці сприяє вірогідному збільшенню накопичення ліпідів у вакуолях клітин при адипогенному диференціюванні *in vitro* в порівнянні з контрольною групою тварин відповідного віку.
3. Більш виражений потенціал до адипогенного диференціювання ММСК-ЖТ *in vitro* у молодих оваріоектомованих тварин може свідчити про посилення адипогенезу *in vivo* і індукції подальшого ожиріння, що підтверджується вірогідним збільшенням маси тіла у молодих оваріоектомованих тварин порівняно з контрольною групою того ж віку.

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Eastell R., O'Neill T. W., Hofbauer L. C., Langdahl B., Reid I. R., Gold D. T., et al. Postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016. **2**. P. 16069. DOI: 10.1038/nrdp.2016.69.
2. Clowes J. A., Riggs B. L., Khosla S. The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. *Immunol Rev*. 200. **208**. P. 207-227.
3. Nuttall M. E., Gimble J. M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol*. 2004. **4**. P. 290-294.
4. Rodriguez J. P., Astudillo P., Rios S., Pino A. M. Involvement of adipogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in osteoporosis. *Curr Stem Cell Res*. 2008. **3**. P. 208-218.
5. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg, 18.III.1986. URL: <https://rm.coe.int/168007a67b>.
6. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
7. Standard operating procedure #206. Rodent ovariectomy. McGill. URL: https://www.mcgill.ca/research/files/research/206_-_rodent_ovariectomy.pdf.
8. Gang Yu, Xiyang Wu, Gail Kilroy, et al. Isolation of Murine Adipose-Derived Stem Cells. *Adipose-Derived Stem Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. DOI 10.1007/978-1-61737-960-4_3.
9. Maecker H. T., Trotter J. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry A*. 2006. **69**, № 9. P. 1037-42.
10. Plating Efficiency. Adapted from Mather J. P., and Roberts P. E., 1998. *Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique*. Plenum Press. New York and London. URL: https://fscimage.fishersci.com/webimages_FSC/downloads/HyClone_Protocol_5.pdf.
11. Freshney R. I. *Culture of Animal Cells*, 5th ed. New York: Wiley-Liss; 2005.
12. Li J., Mareddy S., Tan D. M., Crawford R., 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*. 2009. **15**, № 9. P.2481-2490.
13. Kaplow L. A. Histochemical Procedure for Localizing and Evaluating Leukocyte Alkaline Phosphatase Activity in Smears of Blood and Marrow. *Blood*. 1955. **10**. P. 1023-1029.
14. Gregory C. A., Gunn W. G., Peister A., et al. An alizarin red-based assay of mineralisation by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004. **329**. P. 77-84.
15. Ruiz-Ojeda F., Rupérez A., Gomez-Llorente C., et al. Protocols for Adipogenic Differentiation Assays for Characterization of ASC. *Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity: A Review*. *Int J Mol Sci*. 2016. **17**, № 7. P. 1040. DOI:10.3390/ijms17071040.
16. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006. **8**, № 4. P. 315-17.
17. Friedenstein A. J., Chailakhyan R. K., Latsinik N. V., Panasyuk, A. F., Keiliss-Borok I. V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplantation*. 1974. **17**. P. 331-340.
18. Prockop D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997. **276**. P. 71-74.
19. Pachon-Pena G., Yu G., Tucker A., Wu X., Vendrell J., Bunnell B. A., et al. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *J Cell Physiol*. 2010. **226**. P. 843-851. DOI: 10.1002/jcp.22408.
20. Meichen Liu, Hua Lei, Ping Dong, et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from the Elderly Exhibit Decreased Migration and Differentiation Abilities with Senescent Properties. *Cell Transplantation*. 2017. **26**, № 9. P. 1505-1519;
21. Chen H. T., Lee M. J., Chen C. H., et al. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J Cell Mol Med*. 2012. **16**. P. 582-592. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01335.x
22. Fu Y., Li R., Zhong J., Fu N., Wei X., et al. Adipogenic differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells from ovariectomized mice. *Cell Prolif*. 2014. **47**. P. 604-614. DOI: 10.1111/cpr.12131.
23. Justesen J., Stenderup K., Ebbesen E., Mosekilde L., Steiniche T., Kassem M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology*. 2001. **2**. P. 165-171.
24. Hong L., Colpan A., Peptan I. A. Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 2006. **12**. P. 2747-53.
25. Wang Q., et al. Temporal expression of estrogen receptor alpha in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006. **347**. P. 117-23.
26. Zhou S., et al. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J Cell Biochem*. 2001. **36**. P. 144-55.
27. Leskela H. V., et al. Estrogen receptor alpha genotype confers interindividual variability of response to estrogen and testosterone in mesenchymal-stem-cell-derived osteoblasts. *Bone*. 2006. **39**. P. 1026-34.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори заявили про відсутність потенційного конфлікту інтересів щодо дослідження, авторства та/або публікації даної статті.

Надійшла до редакції 23.09.2019 р.

Прийнята до друку 30.11.2019 р.