

DOI <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-226-5-64>

**SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF BONE MARROW-
DERIVED MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS
IN MICE OF DIFFERENT STRAIN**

**ДЕЯКІ БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО
МОЗКУ У МИШЕЙ РІЗНИХ ЛІНІЙ**

Labunets I. F.

*Doctor of Medical Sciences, Senior
Research Officer,
Head of the Experimental
Modeling Laboratory
Cell and Tissue Technologies Department
Institute of Genetic and Regenerative
Medicine of the National Academy
of Medical Sciences of Ukraine
Kyiv, Ukraine*

Лабунець І. Ф.

*доктор медичних наук,
старший науковий співробітник
завідувачка лабораторії
експериментального моделювання
відділу клітинних та тканинних
технологій
Інститут генетичної та
регенеративної медицини
Національної академії медичних
наук України
м. Київ, Україна*

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) кісткового мозку мають високу біологічну активність завдяки своїм імуномодуючим властивостям та здатності до мультилінійного диференціювання, трофічного впливу на пошкоджені тканини [1]. Саме тому ММСК кісткового мозку є перспективними засобами для: клітинної терапії при ушкодженнях різних органів, підвищення виживання трансплантованого аlogenного матеріалу та зниження ризику розвитку реакції відторгнення трансплантата.

Одним з перспективних підходів до вивчення біологічних властивостей ММСК кісткового мозку є проведення експериментів на мишах різних ліній. У літературі існують дані про важливість врахування генотипу тварин при оцінці функціонування ММСК кісткового мозку [2]. Нами раніше показано, що миші різних ліній відрізняються проліферативним потенціалом ММСК кісткового мозку [3; 4].

Мета – дослідити у мишей з різним генотипом здатність ММСК кісткового мозку до колонієутворення, спрямованого диференціювання та імуносупресивної дії.

Матеріали та методи.

Тварини. Дослідження проводили на мишах-самцях лінії FVB/N (генотип H-2q, n=24) та 129/Sv (генотип H-2, n=24) віком 3-4 міс. Тварини знаходилися при фіксованому світловому режимі (12:12) та вільному доступі до води та їжі. Біологічний матеріал отримували після декапітації мишей під ефірним наркозом у ранковий час доби (9.00–10.00). Усі роботи з експериментальними тваринами виконували з дотриманням законодавства та принципів «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, що використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986).

Клітини кісткового мозку отримували шляхом його вимивання з стегнових кісток мишей живильним середовищем RPMI-1640.

Оцінку фенотипу ММСК кісткового мозку проводили за допомогою моноклональних антитіл до наступних маркерів: Sca-1, CD44, CD73, CD90, CD45 (Becton Dickinson, США) [4]. Аналіз проводили на проточному лазерному цитофлуориметр-сортері BD FACSAria («Becton Dickinson», США).

Колонієутворююча здатність ММСК. Відомо, що при культивуванні в моношарових культурах популяція клітин кісткового мозку формує *in vitro* колонії, що складаються з колонієутворюючих клітин-попередників фібробластів (КУО-Ф). Під бінокулярним мікроскопом підраховували кількість колоній, що складаються з не менше, ніж 50 клітин [3;4]. Результат виражали у кількості колоній на 1×10^6 клітин кісткового мозку.

Для оцінки остеогенного потенціалу ММСК клітини кісткового мозку 2 пасажу культивували в остеоіндуктивному середовищі і надалі фарбували розчином Alizarin Red S. Напівкількісний аналіз ступеня мінералізації форбованих культур проводили колориметричним методом С. Gregory [4]. Ступінь забарвлення оцінювали на мікропланшетному фотометрі LabSystems Multiskan EX (Thermo Scientific, США) при довжині хвилі 405 нм і виражали в умовних одиницях.

Для оцінки адипогенного потенціалу ММСК клітини кісткового мозку 2 пасажу культивували в адипоіндуктивному середовищі. Після фарбування культур розчином Oil Red O під інвертованим мікроскопом Olympus IX71 підраховували (%) клітини, які містили або не містили ліпідні включення.

Імуномосупресивну дію ММСК кісткового мозку 2 пасажу на мітоген-стимульовану проліферацію сінгенних спленоцитів мишей вивчали в реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) під впливом

фітогеммаглютиніну (ФГА, 0,01 мг/мл) з допомогою МТТ-тесту [4]. Спленоцити інкубували з мітогеном без та з додаванням ММСК у різних дозах: $1,5 \times 10^4$, $3,0 \times 10^4$ та $6,0 \times 10^4$. Оптичну щільність надосаду вимірювали на мікропланшетному фотометрі Labsystem Multiskan EX. Результати наводили як індекс проліферації (ІП) (ум. од) мітогенактивованих культур спленоцитів в присутності ММСК і без них.

При статистичній обробці результатів використовували t-критерій Стюдента. Результати представлені у вигляді середнього арифметичного та похибки середнього ($M \pm m$).

Результати та їх обговорення.

Колонієутворююча активність ММСК кісткового мозку мишей різних ліній. Кількість ядровмісних клітин у кістковому мозку мишей обох ліній суттєво не відрізнялась. Так, кількість клітин у кістковому мозку мишей лінії FVB/N була $14,1 \pm 2,5$, а у мишей лінії 129/Sv – $12,8 \pm 3,8$.

Кількість КУ0-Ф в кістковому мозку мишей лінії FVB/N вища ($p < 0,05$), ніж у мишей лінії 129/Sv і складала відповідно $72,1 \pm 10,4 / 10^6$ і $45,1 \pm 8,5 / 10^6$.

Отже, здатність стовбурових клітин-попередниць фібробластів до колонієутворення залежить від генотипу мишей.

Здатність ММСК кісткового мозку мишей різних ліній до спрямованого диференціювання. Одночасно з вивченням здатності ММСК кісткового мозку до спрямованого диференціювання оцінювався їх фенотип. Встановлено, що культивовані ММСК кісткового мозку 2 пасажу тварин обох ліній експресують характерні для ММСК маркери – CD44, CD73, CD90, Sca-1 (більше 95-96%) та не експресують панлейкоцитарний маркер CD45.

При дослідженні остеогенного потенціалу ММСК кісткового мозку показано, що у мишей лінії FVB/N він вищий, ніж у мишей лінії 129/Sv. При цьому ступінь мінералізації пофарбованих культур ММСК кісткового мозку у мишей лінії FVB/N складала $2,9 \pm 0,3$ ум.од., тоді як у мишей лінії 129/Sv $1,5 \pm 0,2$ ум.од.

При дослідженні адипогенного потенціалу ММСК кісткового мозку встановлено, що у мишей лінії FVB/N він нижче, ніж у мишей лінії 129/Sv. Так, відносна кількість ММСК кісткового мозку мишей цих ліній, які вміщували ліпідні вакуолі, складала відповідно $68 \pm 3\%$ і $91 \pm 5\%$ ($p < 0,05$).

Таким чином, у мишей досліджуваних ліній виявляються відмінності у реалізації остеогенного і адипогенного диференціювання ММСК кісткового мозку.

Імуномодулюючий вплив ММСК кісткового мозку мишей різних ліній на мітоген-стимульовану проліферацію спленоцитів. Встановлено, що ММСК кісткового мозку мишей обох ліній виявляють імуносупресивний ефект на проліферативну відповідь спленоцитів, активованих Т-клітинним мітогеном ФГА (ММТ-тест). Так, ММСК кісткового мозку мишей лінії FVB/N у дозах $1,5 \times 10^4$, $3,0 \times 10^4$ та $6,0 \times 10^4$ клітин знижують показники РБТЛ відповідно у 3,7, 4,5 та 4,9 рази й у 2,6, 2,7 і 3,6 разів у тварин лінії 129/Sv.

Отже, нами встановлено імуносупресивний ефект ММСК кісткового мозку мишей лінії FVB/N і 129/Sv, лінійні відмінності якого виявляються у ступені імуносупресії.

Висновки. Таким чином, отримані результати свідчать про вплив генотипу тварин на біологічні властивості ММСК кісткового мозку, зокрема їх здатність до колонієутворення, спрямованого диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках, а також прояв імунодепресивного ефекту. Отримані дані можуть бути корисними при розробці індивідуальної клітинної терапії ушкоджень різного генезу.

Література:

1. Laroni A., Kerlego de Rosbo N., Uccelli A. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurological diseases: immunoregulation beyond neuroprotection. *Immunology letter*. 2015. Vol. 168. P. 183-190.
2. Peister A., Mellad J. D., 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. Vol. 103. P. 1662-1668.
3. 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. Vol. 4, № 2. P. 134-139.
4. Лабунец И. Ф., Родниченко А. Е. Влияние разных доз тимудина *in vivo* и *in vitro* на некоторые биологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга у мышей разных линий. *Клітинна та органна трансплантологія*. 2018. Т. 6, № 1. С. 58-65.