

ВПЛИВ ГЕНОТИПУ МИШЕЙ НА ДЕЯКІ БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ЇХ ЗМІНИ В УМОВАХ МОДУЛЯЦІЇ ЕНДОКРИННОЇ ФУНКЦІЇ ТИМУСУ

Лабунець І. Ф.

ВСТУП

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) кісткового мозку мають високу біологічну активність завдяки своїй здатності до мультилінійного диференціювання, трофічного впливу на пошкоджені тканини, імуномодуючим властивостям¹. Саме тому ММСК є перспективними для клітинної терапії ушкоджень різних органів, підвищення виживання трансплантованого аlogenного матеріалу та зниження ризику розвитку реакції трансплантат проти хазяїна².

Біологічні властивості ММСК кісткового мозку можуть змінюватись під впливом клітинних (цитокіни, ростові фактори) та ендокринних факторів³. Зокрема, встановлено, що високоактивний

¹ Lotfinegar P., Shamsasenjian K., Movassaghpour A., et al. Immunomodulatory nature and site specific affinity of mesenchymal stem cells: a hope in cell therapy. *Adv Pharm Bull.* 2014. V. 4, № 1. P. 5–13. DOI: 10.5681/apb.2014.002

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. V. 59. P. 369–378. DOI: 10.1007/s00005-011-0139-9

Abdelwahab S., Elsebay S., Fouli Gaber M., et al. Comparative study between bone marrow mesenchymal stem cell and their conditioned medium in the treatment of rat model of Parkinsonism. *J Cell Physiol.* 2021. V. 236, № 1. P. 440–457. doi: 10.1002/jcp.29872

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. V. 2. P. 256–264. DOI: 10.1359/JBMR.0301220

Bommie F., Sung-No J. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in Prevention or Treatment of Excessive Scars. *Stem Cells International.* 2016. V. 8. DOI: 10.1155/2016/6937976

Tyndall A., Uccelli A. Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks. *Bone marrow transplantation.* 2009. V. 43, № 11. P. 821–828. DOI: 10.1038/bmt.2009.63

³ Deshpande S., James A. W., Blougha J., et al. Reconciling the effects of inflammatory cytokines on mesenchymal cell osteogenic differentiation. *J Surg Res.* 2013. V. 185, № 1. P. 278–285. DOI: 10.1016/j.jss.2013.06.063

гормон тимусу тимулін або тимічний сироватковий фактор (ТСФ) впливає на диференціювання Т-лімфоцитів у тимусі, їх міграцію та функціональний стан⁴. Нами показано зміну здатності ММСК кісткового мозку до колонієутворення при фізіологічних коливаннях рівня тимуліну в крові мишей лінії СВА/Са, а також після введення їм біологічно активних факторів тимусу⁵. Участь різних субпопуляцій Т-лімфоцитів у диференціюванні ММСК кісткового мозку в остеогенному напрямку та контролі гемопоезу⁶ демонструє можливість впливу й гормонів тимусу на ці властивості ММСК.

Одним з перспективних підходів до вивчення взаємодій тимусу та ММСК кісткового мозку є проведення експериментів на мишах різних ліній, зокрема із різним гаплотипом за системою H-2. Із даних літератури відомо про важливість врахування генотипу тварин при оцінці змін метаболізму, функціонування імунної, ендокринної систем та ММСК кісткового мозку⁷. Є поодинокі дані щодо впливу гаплотипу мишей за системою H-2 на особливості біологічних властивостей ММСК та їх регенераторні ефекти при деяких патологічних станах.

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. V. 23, № 5. P. 649–658. DOI: 10.5713/ajas.2010.90227

⁴ Reggiani P. C., Schwerdt J. I., Console G. M., et al. Physiology and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Curr Pharm Des.* 2014. V. 20, № 29. P. 4690–4696. DOI: 10.2174/1381612820666140130211157

Лабунец І. Ф., Родниченко А. Е., Васильев Р. 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. Т. 12, № 2. С. 97–103. DOI: 10.23868/201707021

Лабунец І. 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. Т. 5, № 2. С. 242.

⁵ Лабунец І. Ф. Эпифиз и ритмы функций иммунной системы при старении. Экспериментальное исследование. Saarbrücken : LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. С. 133.

⁶ Di Rosa F. T-lymphocyte interaction with stromal, bone and hematopoietic cells in the bone marrow. *Cell Biol.* 2009. V. 87, № 1. P. 20–29. DOI: 10.1038/icb.2008.84

Устименко А. М. Вплив постнатальної тимектомії у мишей лінії СВА/Са на клітини-попередники кісткового мозку і формування кістки в зрілому віці. Автореф. дис: к. б. н. Київ, 2006. С. 16.

⁷ Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. Санкт-Петербург : Наука. 2008. Т. 2, № 2. С. 434.

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. V. 103. P. 1662–1668. DOI: 10.1182/blood-2003-09-3070

Так, у мишей лінії CBA/Ca (гаплотип H-2^k) і Balb/c (гаплотип H-2^d) деякі відмінності проліферативного та диференціовального потенціалу ММСК кісткового мозку, синтезу клітинами ростових факторів автори пояснюють впливом цитокінів і гормонів⁸.

Результати наших попередніх досліджень показали, що миші різних ліній із моделями дисфункції тимусу відрізняються здатністю до диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин та проліферативним потенціалом ММСК кісткового мозку⁹.

Мета – оцінити у мишей із різним гаплотипом за системою H-2 здатність ММСК кісткового мозку до колонієутворення, спрямованого диференціювання в умовах зміни вмісту тимуліну/ТСФ в організмі та в культурі клітин.

1. Матеріали та методи

Тварини. Дослідження проводили на мишах-самцях лінії FVB/N (гаплотип H-2^q, n=24) та 129/Sv (гаплотип H-2^p, n=24) віком 3–4 міс. із віварію ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України». Тварини знаходилися при фіксованому світловому режимі (12:12) та вільному доступі до води та їжі. 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), а також закону України «Про захист тварин від жорстокої поведінки» (від 21.02.2006).

Мишей інбредних ліній FVB/N і 129/Sv широко використовують у трансгенних технологіях, нейробиологічних, геронтологічних

⁸ Ooi Y. Y., Rahmat Z., Jose Sh., et al. Immunophenotype and differentiation capacity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from CBA/Ca, JCR and Balb/c mice. *World J. of stem cells (WJSC)*. 2013. Vol. 5, № 1. P. 34–42.

⁹ Лабунец І. Ф., Родниченко А. Е., Васильєв Р. 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. Т. 12, № 2. С. 97–103. DOI: 10.23868/201707021

Лабунец І. Ф., Кучук О. Ф., 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 ЛуганДМУ, 2010. Т. 19. С. 271–281.

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. V. 4, № 2. P. 134–139. DOI: 10.1134/S2079057014020118

дослідженнях¹⁰. У них різний гаплотип за системою H-2 (H-2^q, H-2^b), є певні особливості функціонування імунної системи (синтез цитокінів, антитіл) і надниркових залоз, поведінкових реакцій, темпів старіння, типів вікової патології, реакції на дію деяких вірусів, токсинів. За нашими даними, генотип тварин пов'язаний із особливостями функціонування кісткового мозку, тимусу та Т-ланки імунної системи¹¹.

Експериментальні групи мишей. Гіпофункцію тимусу у мишей моделювали за допомогою видалення органу під авертиновим наркозом (2,5 % розчин, по 125 мг/кг, внутрішньоочеревино). Контрольна група – псевдооперовані тварини обох ліній. Біологічний матеріал отримували після декапітації мишей під ефірним наркозом у ранковий час доби (9.00 – 10.00) через 4 тижні після операції.

Етапи експерименту. У тварин в досліді *in vivo* оцінювали ендокринну функцію тимусу; в досліді *in vitro* вивчали клонотичний потенціал клітин кісткового мозку, проводили фенотипування ММСК, оцінювали їх остеогенний, адипогенний потенціали, імуномодулюючі властивості та можливість безпосереднього впливу тимуліну на біологічні властивості ММСК тимектомованих тварин.

Ендокринну функцію тимусу оцінювали за рівнем у крові тимуліну/ТСФ¹². Метод заснований на здатності тимуліну відновлювати чутливість розеткоутворювальних клітин селезінки дорослих тимектомованих мишей до азатіоприну (Sigma, США). Сироватку крові тварин пропускали через ультрафільтр системи Centriflo CF-50A (Amicon, США) для видалення високомолекулярного інгібітору гормону. Титром тимуліну вважали останнє розведення сироватки, що викликає 50 % редукцію числа розеткоутворювальних

¹⁰ 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. V. 14, № 1. P. 46–55. DOI: 10.4161/15384101.2014.973308

Eltokhi A., Kurpiers B., Pitzer C. Behavioral tests assessing neuropsychiatric phenotypes in adolescent mice reveal strain- and sex specific effects. *Scientific receptors*. 2020. Vol. 10, № 11263. DOI: 10.1038/s41598-020-67758-0

¹¹ Лабунец І. Ф., Кучук О. Ф., Родниченко А. Е. і 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 ЛуганДМУ, 2010. Т. 19. С. 271–281.

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. V. 4, № 2. P. 134–139. DOI: 10.1134/S2079057014020118

¹² Bach J. F., Bach M. A., Blanot D., et al. Thymic serum factor (FTS). *Bull Inst Pasteur (Paris)*. 1978. V. 76. P. 325–398.

клітин щодо контрольних значень. Результати виражали як \log_2 титру гормону. У мишей з повністю видаленим тимусом вміст тимуліну в крові має бути нульовими.

Клітини кісткового мозку отримували шляхом його вимивання з стегнових кісток мишей живильним середовищем RPMI-1640. Культивування проводили у флаконах з площею поверхні 25 см² в живильному середовищі RPMI-1640, яке містить 10 % телячої ембріональної сироватки, 2 мМ L-глутаміну, 100 МОд/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину (всі реактиви – *Sigma*, США).

Оцінку фенотипу ММСК кісткового мозку проводили за допомогою моноклональних антитіл до наступних маркерів: Sca-1, CD44, CD73, CD90, CD45 (*Becton Dickinson*, США). Як контроль використовували зразки клітин без антитіл (unstaining control). Визначення рівня флюоресценції у зразках після додавання моноклональних антитіл проводили з кожним з антитіл окремо (single staining sample). Аналіз проводили на проточному лазерному цитофлуориметр-сортері BD FACSAria (*Becton Dickinson*, США).

Дослідження клоногенного потенціалу клітин кісткового мозку. Відомо, що при культивуванні в моношарових культурах популяція клітин кісткового мозку формує *in vitro* колонії, що складаються з клітин-попередників, що утворюють колонії фібробластів (КУК-Ф)¹³. Клітини кісткового мозку з щільністю посіву 2×10^5 /см² культивували в живильному середовищі, що містить 85 % RPMI, 15 % ембріональної телячої сироватки, 2 мМ L-глутаміну (*Sigma*, США), протягом 12 діб при +37 °С у зволоженій атмосфері, що містить 5 % CO₂. Під бінокулярним мікроскопом підраховували кількість колоній, що складаються з не менше ніж 50 клітин. Результат виражали у кількості колоній на $1 \cdot 10^6$ клітин кісткового мозку.

Для оцінки остеогенного потенціалу ММСК клітини кісткового мозку 3-го пасажу культивували в остеоіндуктивному середовищі, яке складалося з середовища DMEM (вміст глюкози 1,0 г/л), 10 % ембріональної телячої сироватки, 100 нМ дексаметазону, 0,5 мМ L-аскорбат-2-фосфату (всі реактиви – *Sigma*, США)¹⁴. Через 21 добу моношар клітин промивали фосфатно-сольовим буфером, фіксували 10 % розчином параформальдегіду, а потім фарбували 2 % розчином

¹³ 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. V. 3. P. 393–403.

¹⁴ Li J., Mareddy S., 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. V. 15, № 9. P. 2481–2490. DOI: 10.1089/ten.TEA.2008.0463

Alizarin Red S (*Sigma*, США). Напівкількісний аналіз ступеня мінералізації забарвлених культур проводили колориметричним методом С. Gregory¹⁵. Для цього барвник, що зв'язався з кальцифікованим позаклітинним матриксом, екстрагували оцтовою кислотою і доводили значення рН до 4,1 за допомогою гідроксиду амонію. Ступінь забарвлення оцінювали на мікропланшетному фотометрі LabSystems Multiskan EX (*Thermo Scientific*, США) при довжині хвилі 405 нм.

Для оцінки адипогенного потенціалу ММСК клітини кісткового мозку 3-го пасажу культивували в адипоіндуктивному середовищі, яке складалося з середовища DMEM (вміст глюкози 4,5 г/л), 5 % кінської сироватки, 10 % ембріональної телячої сироватки, 1 мкМ дексаметазону, 200 мкМ індометацину, 500 мкМ ізобутилметилксантину і 5 мкг/мл інсуліну (*Sigma*, США). Через 14 діб культура промивалась фосфатно-сольовим буфером, фіксувалась 10 % розчином параформальдегіду, після чого фарбувалась розчином Oil Red O (*Sigma*, США) для виявлення ліпідних включень¹⁶. Під інвертованим мікроскопом Olympus IX71 (*Olympus*, Japan) проводили підрахунок клітин, які містили або не містили ліпідні включення в 10 випадкових полях зору. Результати виражали у відсотках.

Імуномодулюючий вплив ММСК кісткового мозку 3-го пасажу на мітоген-стимульовану проліферацію сингенних спленоцитів мишей вивчали в реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) під дією фітогеммаглютиніну (ФГА, 0,01 мг/мл) з допомогою МТТ-тесту¹⁷. Спленцити інкубували з мітогеном впродовж 72 год без клітин та з додаванням ММСК у різних дозах: $1,5 \cdot 10^4$, $3,0 \cdot 10^4$ і $6,0 \cdot 10^4$ ММСК на 10^6 спленоцитів. За 2 год до кінця інкубації додавали по 0,01 мл 0,5 % розчину МТТ (3-(4,5-диметилгіазол)-2,5-дифенілтетразол бромід), а після її завершення – 0,04 М розчин НСІ в ізопропіловому спирті. Оптичну щільність надосаду вимірювали на мікропланшетному фотометрі фірми LabSystems Multiskan EX (*Thermo Scientific*, США) при довжині хвилі 492 нм. Результати надавали у вигляді умовних одиниць індекса проліферації (ІП): ІП = оптична щільність

¹⁵ 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. *Analytical biochemistry*. 2004. V. 329. P. 77–84. DOI: 10.1016/j.ab.2004.02.002

¹⁶ 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

¹⁷ Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983. V. 65, № 1. P. 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

мітогенактивованих культур спленоцитів з ММСК/оптична щільність культур спленоцитів без ММСК. Контроль – ПП = оптична щільність мітогенактивованих культур спленоцитів/оптична щільність культур спленоцитів без мітогену.

У системі *in vitro* ММСК кісткового мозку тимектомованих мишей інкубували з тимуліном/ТСФ (*Sigma*, США), який у разі дослідження клоногенного потенціалу клітин кісткового мозку додавали одноразово, у концентраціях 1 нг/мл і 10 нг/мл безпосередньо в день постановки методики; при вивченні впливу гормону на спрямоване диференціювання клітин його додавали в концентрації 1 нг/мл при кожній зміні диференціовального середовища; при вивченні імуномодуючих властивостей ММСК гормон тимусу додавали в концентрації 1 нг/мл при кожній зміні живильного середовища. У всіх дослідах значення показників порівнювали з контролем, яким вважались клітини кісткового мозку тимектомованих мишей без інкубації *in vitro* із ТСФ.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistika 7 (*StatSoft Inc.*, США). Достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Результати представлені у вигляді середнього арифметичного та похибки середнього ($M \pm m$). Різниця між показниками вважалась статистично значущою при значенні $p < 0,05$ ¹⁸.

2. Результати та їх обговорення

При дослідженні рівня тимічного гормону в крові тварин встановлено, що у контрольних (псевдооперованих) мишей лінії FVB/N рівень тимуліну вище, ніж у мишей лінії 129/Sv і становить відповідно $5,3 \pm 0,3$ та $4,3 \pm 0,2 \log_2$ титру ($p < 0,05$). У тимектомованих мишей обох досліджених ліній гормон у крові не визначався.

Кількість ядровмісних клітин у кістковому мозку мишей експериментальних груп обох ліній суттєво не відрізнялася. Так, кількість ядровмісних клітин у кістковому мозку псевдооперованих мишей лінії FVB/N була $(14,1 \pm 2,5) \cdot 10^6$, а у мишей лінії 129/Sv – $(12,8 \pm 3,8) \cdot 10^6$. Тимектомія не призвела до статистично значущих змін цього показника: кількість ядровмісних клітин у кістковому мозку мишей лінії FVB/N становила $(13,8 \pm 2,0) \cdot 10^6$, а у мишей лінії 129/Sv – $(12,9 \pm 1,4) \cdot 10^6$.

Кількість КУК-Ф у кістковому мозку контрольної групи мишей (псевдооперовані) лінії FVB/N вища ($p < 0,05$), ніж у мишей лінії 129/Sv (рис. 1).

¹⁸ Лакін Г. Ф. Биометрия. Москва : Высшая школа. 1990. С. 350.

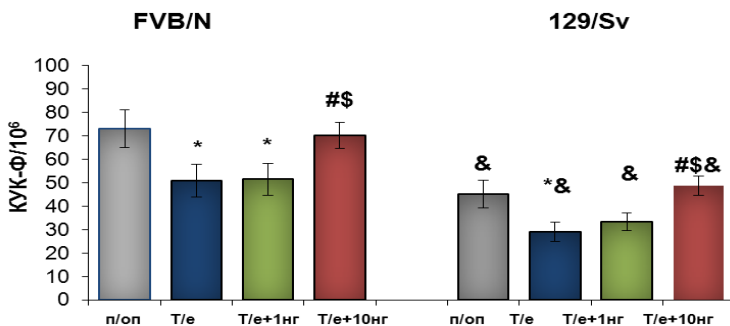


Рис. 1.

Гістограми колонієутворюючої активності ММСК кісткового мозку мишей ліній FVB/N та 129/Sv після псевдооперації, під впливом тимектомії та додавання ТСФ *in vitro*, M±m; p/op – псевдооперовані миші, T/e – тимектомовані миші, T/e+1 нг – тимектомовані миші + ТСФ у концентрації 1 нг/мл *in vitro*, T/e+10 нг – тимектомовані миші + ТСФ у концентрації 10 нг/мл *in vitro*.

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з псевдооперованими мишами; # – $p < 0,05$ порівняно з тимектомованими мишами; \$ – $p < 0,05$ порівняно з тимектомованими + ТСФ у концентрації 1 нг/мл *in vitro*; & – $p < 0,05$ порівняно з мишами лінії FVB/N.

У тимектомованих мишей обох ліній значення досліджених показників менше ($p < 0,05$), ніж у контрольних тварин (рис. 1). При цьому різниця між значеннями показників у досліджуваних групах більш виражена у мишей лінії FVB/N (в 1,9 разів), ніж лінії 129/Sv (в 1,4 рази).

Отже, здатність стовбурових клітин-попередників до колонієутворення у контрольних псевдооперованих і тимектомованих мишей залежить від їхнього генотипу. Після додавання в культуру кісткомозкових клітин тимектомованих мишей обох ліній тимуліну в концентрації 10 нг/мл збільшилась кількість КУЕ-Ф порівняно з клітинами кісткового мозку тимектомованих тварин, а також тимектомованих мишей після додавання *in vitro* тимуліну в концентрації 1 нг/мл (рис. 1).

Перед вивченням здатності ММСК кісткового мозку до спрямованого диференціювання оцінювали фенотип цих клітин. Культивовані ММСК кісткового мозку 3-го пасажу обох ліній мишей експресують характерні для ММСК маркери – CD44, CD73, CD90, Sca-1 та не експресують панлейкоцитарний маркер CD45 (табл. 1).

Таблиця 1

**Фенотиповий аналіз поверхневих маркерів ММСК
кісткового мозку мишей лінії FVB/N та 129/Sv, M±m**

Лінія мишей	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

Встановлено, що остеогенний потенціал ММСК кісткового мозку у контрольних псевдооперованих мишей лінії FVB/N вищий, ніж у мишей лінії 129/Sv, тоді як адипогенний – навпаки, нижчий (рис. 2, 3). Після тимектомії у мишей лінії FVB/N спостерігається посилення диференціювання ММСК в остеогенному напрямку, а у мишей лінії 129/Sv – його зниження (рис. 2).

Здатність ММСК до адипогенного диференціювання зменшується лише у тимектомованих мишей лінії FVB/N і не змінюється у мишей лінії 129/Sv (рис. 3).

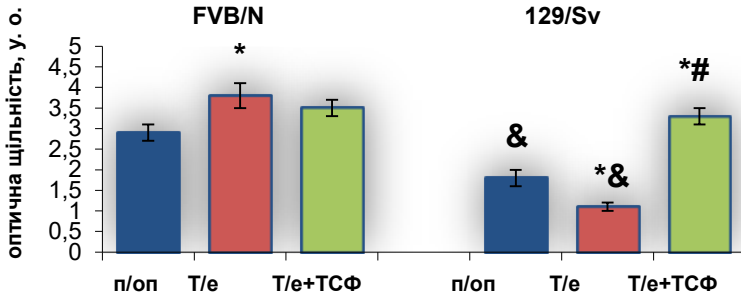
Отже, у мишей із різним гаплотипом за системою H-2 як з інтактним, так і з видаленим тимусом виявляються лінійні відмінності у здатності до спрямованого диференціювання ММСК кісткового мозку.

Таким чином, при оцінці впливу ТСФ *in vitro* на остеогенний потенціал ММСК кісткового мозку тимектомованих мишей встановлено суттєве його збільшення у мишей лінії 129/Sv та відсутність змін у мишей лінії FVB/N (рис. 2). Показник адипогенного диференціювання після інкубації ММСК з ТСФ не змінювався у мишей лінії 129/Sv та підвищувався у мишей лінії FVB/N.

Встановлено, що ММСК кісткового мозку мишей усіх дослідних груп мають імуносупресивний ефект на проліферативну відповідь спленоцитів, активованих Т-клітинним мітогеном фітогеммаглютиніном (ММТ-тест) (рис. 4, 5). Так, ММСК кісткового мозку контрольних псевдооперованих тварин лінії FVB/N у дозах $1,5 \cdot 10^4$, $3,0 \cdot 10^4$ та $6,0 \cdot 10^4$ клітин знижують показники РБТЛ відповідно у 3,7, 4,5 та 4,9 рази, а у мишей лінії 129/Sv – у 2,6, 2,7 і 3,6 разів, відповідно. У тимектомованих мишей лінії FVB/N міра зниження РБТЛ на дози ММСК $1,5 \cdot 10^4$, $3,0 \cdot 10^4$ та $6,0 \cdot 10^4$ клітин посилюється до 5,2, 6,1 та 6,8 разів (рис. 4).

У тимектомованих мишей лінії 129/Sv імуносупресивний ефект ММСК у дозах $1,5 \cdot 10^4$, $3,0 \cdot 10^4$ та $6,0 \cdot 10^4$ клітин зменшується відповідно до 2,3, 2,5 та 2,3 разів (рис. 5). При цьому показники РБТЛ у мишей лінії 129/Sv істотно перевищують аналогічні у тварин лінії FVB/N (рис. 4, 5).

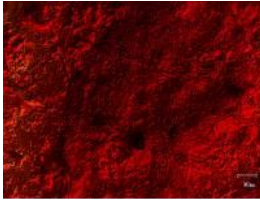
A



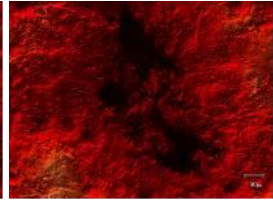
Б



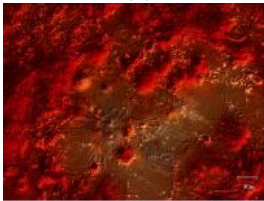
В



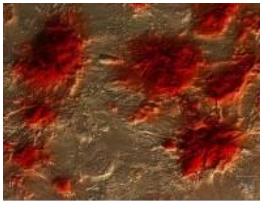
Г



Д



Е



Ж

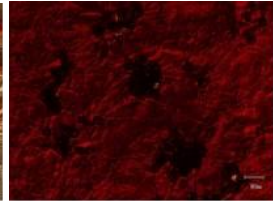


Рис. 2.

Вплив тимектомії та додавання в системі *in vitro* ТСФ на спрямоване остеогенне диференціювання ММСК кісткового мозку мишей ліній FVB/N та 129/Sv.

А – гістограми напівкількісного аналізу ступеня мінералізації фарбованих культур (колориметричний метод), $M \pm m$; п/оп – псевдооперовані миші, Т/е – тимектомовані миші, Т/е+ТСФ – тимектомовані миші + ТСФ у концентрації 1 нг/мл *in vitro*.

Примітки до рис. 2: * – $p < 0,05$ порівняно з псевдооперованими мишами; # – $p < 0,05$ порівняно з тимектомованими мишами; & – $p < 0,05$ порівняно з мишами лінії FVB/N. Б–Ж – мікрофотографії препаратів культур ММСК кісткового мозку мишей ліній FVB/N (Б–Г) і 129/Sv (Д–Ж) після спрямованого диференціювання в остеогенному середовищі: Б, Д – псевдооперовані миші, В, Е – тимектомовані миші, Г, Ж – тимектомовані миші+ТСФ у концентрації 1 нг/мл *in vitro*); забарвлення Alizarin Red S, фазовий контраст.

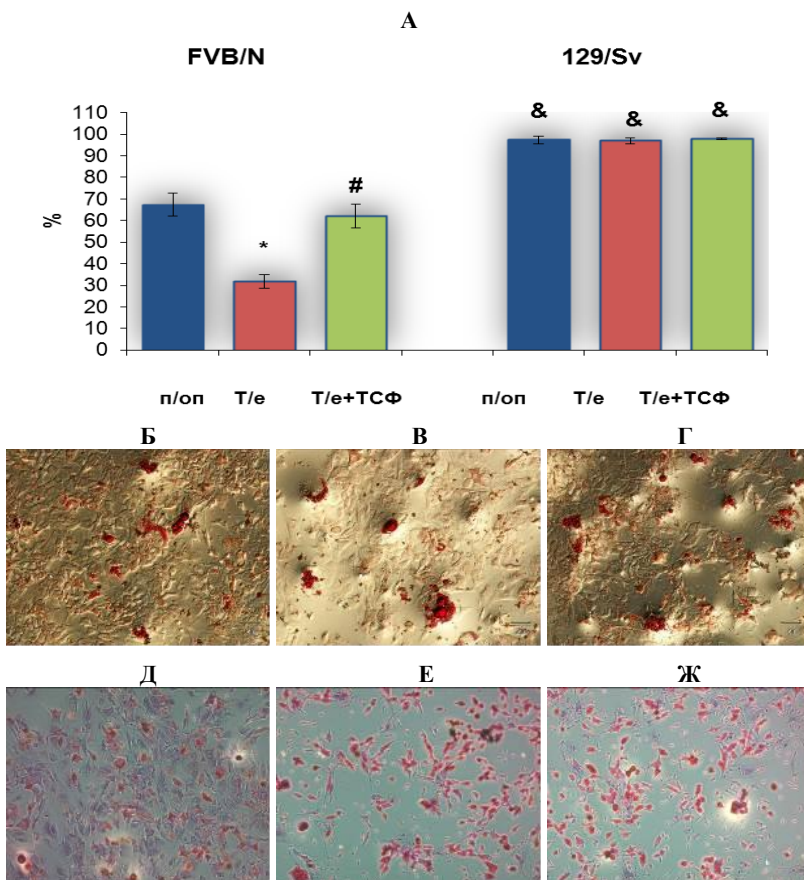


Рис. 3.

Вплив тимектомії та додавання в системі *in vitro* ТСФ на спрямовану адипогенне диференціювання ММСК кісткового мозку мишей ліній FVB/N та 129/Sv,

А – гістограми відносного вмісту ММСК кісткового мозку, що містили ліпідні вакуолі, $M \pm m$; п/оп – псевдооперовані миші, Т/е – тимектомовані миші, Т/е+ТСФ – тимектомовані миші + ТСФ у концентрації 1 нг/мл *in vitro*. Примітки до рис. 3: * – $p < 0,05$ порівняно з псевдооперованими мишами; # – $p < 0,05$ порівняно з тимектомованими мишами; & – $p < 0,05$ порівняно з мишами лінії FVB/N. Б–Ж – мікрофотографії препаратів культур ММСК кісткового мозку мишей ліній FVB/N (Б–Г) і 129/Sv (Д–Ж) після спрямованого диференціювання в адипогенному середовищі: Б, Д – псевдооперовані миші, В, Е – тимектомовані миші, Г, Ж – тимектомовані миші+ТСФ у концентрації 1 нг/мл *in vitro*; забарвлення Oil Red O, фазовий контраст, $\times 400$ (Б, В, Г), $\times 200$ (Д, Е, Ж).

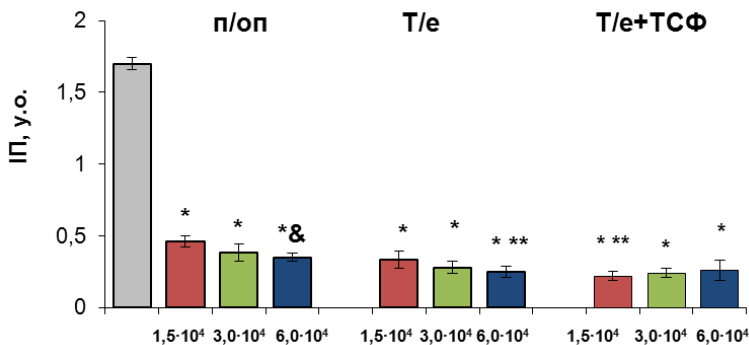


Рис. 4.

Гістограми індекса проліферації (ІП) спленоцитів мишей лінії FVB/N за умов інкубації з ММСК кісткового мозку за результатами МТТ-тесту, $M \pm m$; п/оп – псевдооперовані миші, Т/е – тимектомовані миші, Т/е+ТСФ – тимектомовані миші + ТСФ у концентрації 1 нг/мл *in vitro*.

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з ІП спленоцитів (сірий стовпчик); ** – $p < 0,05$ порівняно з псевдооперованими мишами (п/оп); & – $p < 0,05$ порівняно з ІП спленоцитів при спільному культивуванні з $1,5 \cdot 10^4$ ММСК.

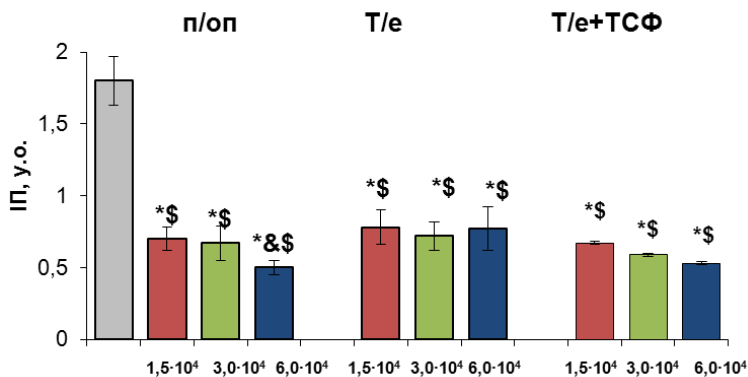


Рис. 5.

Гістограма індекса проліферації спленоцитів (ІП) мишей лінії 129/Sv за умов інкубації з ММСК кісткового мозку за результатами МТТ-тесту, $M \pm m$; п/оп – псевдооперовані миші, Т/е – тимектомовані миші, Т/е+ТСФ – тимектомовані миші + ТСФ у концентрації 1 нг/мл *in vitro*.

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з ІП спленоцитів (сірий стовпчик); & – $p < 0,05$ порівняно з ІП спленоцитів при спільному культивуванні з $1,5 \cdot 10^4$ ММСК; \$ – $p < 0,05$ порівняно з мишами лінії FVB/N (див. рис. 4).

Встановлено, що проліферативний потенціал спленоцитів в реакції бласттрансформації лімфоцитів практично не змінився після інкубації з ММСК мишей обох ліній, які попередньо культивувались з ТСФ ($p > 0.05$).

Результати свідчать про існування імуносупресивного ефекту ММСК кісткового мозку у мишей обох ліній. При цьому лінійні відмінності цього ефекту виявляються у ступені імуносупресії, а за умов видалення тимусу- й у спрямованості його змін. Тимічний гормон *in vitro* здатний змінювати клоногенний та остеогенний потенціали ММСК кісткового мозку тимектомованих мишей обох ліній, при цьому адипогенний потенціал відновлювався у мишей лінії FVB/N, імунодепресивний ефект ММСК залишався незмінним.

Таким чином, результати наших досліджень *in vivo* та *in vitro* дозволили встановити зв'язок між змінами біологічних властивостей ММСК кісткового мозку та ендокринною функцією тимусу, який виявляє лінійні особливості.

При оцінці клоногенного потенціалу виявилось, що у контрольних псевдооперованих мишей лінії FVB/N колонієутворююча здатність клітин кісткового мозку значно перевищує аналогічну у мишей лінії 129/Sv і при цьому співпадає з вищим рівнем тимуліну в крові. Відновлення у тимектомованих мишей зниженої здатності клітин кісткового мозку до колонієутворення після інкубації з ТСФ може бути пов'язане з підвищенням експресії в клітинах ростових факторів під впливом цього гормону. Дослідження Land et al.¹⁹ демонструють, що в культурі фетальної тканини легень тимулін у дозі 1,0 нг/мл підвищує експресію факторів росту фібробластів 9 та 10 (FGF9, FGF10), що асоціюється з істотною проліферацією недиференційованої мезенхімальної тканини.

Однією з основних властивостей ММСК є їх здатність диференціюватися в різні клітинні типи сполучної тканини²⁰. У нашій роботі ми оцінювали здатність ММСК кісткового мозку мишей ліній FVB/N та 129/Sv диференціюватися в остеогенному та адипогенному напрямках. Показано, що баланс між цими напрямками

¹⁹ Land S. C., Darakhshan F. Thymulin evokes IL-6-C/EBP β regenerative repair and TNF- α silencing during endotoxin exposure in fetal lung explants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004. V. 286. P. 473–487. DOI: 10.1152/ajplung.00401.2002

²⁰ Abdelwahab S., Elsebay S., Fouli Gaber M., et al. Comparative study between bone marrow mesenchymal stem cell and their conditioned medium in the treatment of rat model of Parkinsonism. *J Cell Physiol.* 2021. V. 236, № 1. P. 440–457. doi: 10.1002/jcp.29872

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. V. 2. P. 256–264. DOI: 10.1359/JBMR.0301220

диференціювання контролюється взаємопов'язаними між собою клітинними факторами та може змінитися в умовах дисфункції Т-клітинної ланки імунної системи²¹. Так, у мишей з віковим Т-імунодефіцитом у кістковому мозку знижується кількість клітин, що експресують остеобласт-специфічні фактори транскрипції Runx2 і Dlx5, маркери остеобластів, колаген і остеокальцин, і, навпаки, підвищується кількість клітин, що експресують адипоспецифічний фактор транскрипції PPAR γ 2, який стимулює диференціювання адипоцитів й подальше вироблення ними аутокринних і паракринних факторів, що перешкоджають можливому остеогенезу²².

У нашому експерименті у псевдооперованих мишей лінії FVB/N з вищим рівнем тимуліну в крові диференціювання ММСК було переважно в остеогенному напрямку, на відміну від мишей лінії 129/Sv, у яких ми спостерігали зсув диференціювання у бік адипогенезу. За даними Оксимець²³, цитокинам (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α), що секретуються трансплантованими ММСК, належить важлива роль в остеорепації травмованих кінцівок. Показано залучення транскрипційного фактора NF- κ B в реалізацію ефекту тимуліну в тканинах *in vivo* та *in vitro* шляхом змінення синтезу прозапальних (TNF- α , IL-1 β , IL-6) та протизапальних цитокинів (IL-10)²⁴.

Не виключено також, що відмінності у диференціювальному потенціалі ММСК досліджуваних контрольних псевдооперованих мишей можуть бути пов'язані з лінійними особливостями функціонального стану нейроендокринної системи. Так, у мишей лінії FVB/N рівень тироксину (T4) у крові майже втричі перевищує аналогічний показник у мишей лінії 129/Sv, а у щурів з дефіцитом T4 теж суттєво пригнічується диференціювання ММСК в остеогенному

²¹ Rosa F. T-lymphocyte interaction with stromal, bone and hematopoietic cells in the bone marrow. *Cell Biol.* 2009. V. 87, № 1. P. 20–29. DOI: 10.1038/icc.2008.84

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. V. 6, № 1. P. 2–12. DOI: 10.2174/1381612820666140130211157

²² 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. V. 6, № 1. P. 2–12. DOI: 10.2174/1381612820666140130211157

²³ Оксимець В. М. Роль мезенхимальних стромальних кліток в остеоимунних процесах. Український журнал клінічної та лабораторної медицини. 2011. Т. 6, № 1. С. 94–98.

²⁴ 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. V. 1, № 2. P. 41–49.

напрямку²⁵. Показано, що мелатонін стимулює диференціювання попередників остеобластів, підвищує активність остеобластів та експресію колагену І типу, остеопонтину та остеокальцину²⁶. За нашими даними, рівень мелатоніну в крові мишей лінії FVB/N вищий, ніж у мишей лінії 129/Sv²⁷.

Результати дослідів з інкубацією ММСК тимектомованих мишей лінії 129/Sv з ТСФ дозволили отримати нове уявлення про можливі шляхи впливу гормону на знижений остеогенний потенціал ММСК кісткового мозку. Раніше ми показали, що остеоутворення, знижене в умовах дефіциту гормонів тимусу (зокрема, тимуліну), можна відновити за допомогою ін'єкцій біологічно активних факторів тимусу²⁸.

У той же час, у мишей лінії FVB/N і так досить високий рівень мінералізації позаклітинного матриксу культур ММСК ще більше посилюється після видалення тимусу і не змінюється після інкубації з ТСФ *in vitro*. Відомо, що регулюючий вплив гормонів тимусу на клітини-мішені залежить від їхнього вихідного стану²⁹. Тому ми не

²⁵ 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. V. 14, № 1. P. 46–55. DOI: 10.4161/15384101.2014.973308

Boeloni J. N., Ocarino M., Silva J. F., et al. Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of ovariectomized and nonovariectomized female rats with thyroid dysfunction. *Pathol Res Pract*. 2013. V. 209, № 1. P. 44–51. DOI: 10.1016/j.prp.2012.10.004

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

²⁶ Лабунец І. 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 органна трансплантологія*. 2017. Т. 5, № 2. С. 242.

Liu J., Huang F., He H. W. Melatonin effects on Hard tissue: bone and tooth. *Int J Mol Sci*. 2013. V. 14. P. 10063–10074. DOI: 10.3390/ijms140510063

Літовка І. Г., Мазепа-Крижанівська У. О., Березовський В. Я. Вплив мелатоніну на метаболізм кісткової тканини. *Фізіологічний журнал*. 2014. Т. 60, № 2. С. 102–109.

²⁷ 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. V. 4, № 2. P. 134–139. DOI: 10.1134/S2079057014020118

²⁸ Бутенко Г. М., Поворознюк В. В., Лабунец І. Ф. Влияние пептидных факторов тимуса и эпифиза на структурно-функциональное состояние костной ткани при старении: экспериментально-клиническое исследование. *Пробл Osteол*. 2001. Т. 4, № 3. С. 4–10.

²⁹ Иммунология гормонов тимуса / редакторы Ю. А. Гриневич, В. Ф. Чеботарев // Киев : Здоров'я. 1989. С. 160.

виключаємо того, що отримані результати, швидше за все, відображають лінійні особливості реакції ММСК на зміни рівня тимуліну в крові та культурі клітин. Раніше нами вже була показана відмінність реакції ММСК кісткового мозку саме мишей лінії FVB/N на зміну рівня тимуліну в крові за стресових умов³⁰. На думку Nikolskiy та ін.³¹ дисбаланс та порушення функцій стромальних клітин (зокрема, активація диференціювання ММСК в остеогенному напрямку) може опосередковуватись кількісними та функціональними розладами у субпопуляціях імунних клітин, зокрема тимоцитів.

Відомо, що у фізіологічних умовах Т-лімфоцити відіграють протективну роль у метаболізмі кісткової тканини, а у тварин із дефіцитом у кістковому мозку CD4⁺ та CD8⁺ Т-клітин знижується остеогенез³². Разом з тим, у кістковому мозку тимектомованих мишей лінії FVB/N спостерігається дисбаланс CD4⁺/CD8⁺ – клітин, який характеризується істотним зменшенням кількості CD8⁺ клітин і підвищенням числа CD4⁺ клітин³³. Зсув у напрямку збагачення кісткового мозку таких мишей CD4⁺ клітинами співпадає з посиленням диференціювання ММСК в остеогенному напрямку. Показано, що CD4⁺ Т-клітини продукують ІЛ-17, який є потужним ростовим фактором для ММСК³⁴. Одночасне зниження адипогенного диференціювання у тимектомованих мишей лінії FVB/N дає нам підставу для припущення, що у них ММСК переважно диференціюються в остеогенному напрямку, чим і пояснюється посилена мінералізація позаклітинного матриксу клітинних культур.

Отримані нами результати можуть свідчити про перспективність використання мишей ліній FVB/N та 129/Sv, у тому числі з дисфункцією тимусу, для вивчення впливу факторів, що пригнічують

³⁰ Лабунец И. Ф., Кучук О. Ф., 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 ЛуганДМУ, 2010. Т. 19. С. 271–281.

³¹ 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. V. 4, № 2. P. 220–223. DOI: 10.22494/cot.v4i2.59

³² Di Rosa F. T-lymphocyte interaction with stromal, bone and hematopoietic cells in the bone marrow. *Cell Biol.* 2009. V. 87, № 1. P. 20–29. DOI: 10.1038/icb.2008.84

³³ Лабунец И. Ф., Родниченко А. Е., Васильев Р. 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. Т. 12, № 2. С. 97–103. DOI: 10.23868/201707021

³⁴ Di Rosa F. T-lymphocyte interaction with stromal, bone and hematopoietic cells in the bone marrow. *Cell Biol.* 2009. V. 87, № 1. P. 20–29. DOI: 10.1038/icb.2008.84

або активують остеогенне диференціювання ММСК кісткового мозку. Крім того, миші цих ліній можуть використовуватись для вивчення впливу різних субпопуляцій Т-лімфоцитів на функціонування ММСК кісткового мозку.

Нами також встановлено, що у мишей обох ліній ММСК кісткового мозку чинять імуносупресивний ефект на мітоген-активовані Т-лімфоцити. При цьому інтенсивність подібного ефекту ММСК залежить від лінії мишей та не пов'язана з особливостями проліферативного потенціалу Т-лімфоцитів. З даних літератури відомо, що вплив ММСК на Т-клітини пов'язаний із пригніченням їх активації шляхом зниження експресії рецептора до IL-2, зниженням проліферації активованих Т-клітин у ранній G1 фазі клітинного циклу і, крім того, індукцією апоптозу активованих Т-клітин³⁵. Одним із шляхів імуносупресивного впливу ММСК на Т-клітини може бути секреція низки цитокінів – TGF β (трансформуючий фактор росту β), HGF (фактор росту гепатоцитів) та PGE2 (простагландин E2)³⁶.

У нашому експерименті більш виражений імуносупресивний ефект ММСК контрольних псевдооперованих мишей лінії FVB/N може бути пов'язаний із високою інтенсивністю продукції клітинами цих мишей цитокінів/медіаторів, що супресують Т-лімфоцити³⁷. Зміна ж імуносупресивного ефекту ММСК після тимектомії від його посилення у мишей лінії FVB/N до зниження у мишей лінії 129/Sv, очевидно, можна пояснити лінійними особливостями змін як інтенсивності, так і спектра продукованих цими клітинами цитокінів. Також можуть мати значення лінійні відмінності взаємодії ММСК та деяких гормонів –

³⁵ 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. V. 99, № 10. P. 3838–3843. DOI: 10.1182/blood.v99.10.3838

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. V. 57, № 1. P. 11–20. DOI: 10.1046/j.1365-3083.2003.01176.x

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. V. 25, № 11. P. 2739–2749. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0197

³⁶ Kyurkchiev D., Bochev I., Ivanova-Todorova E., et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014. V. 6, № 5. P. 552–570. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i5.552

³⁷ 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. V. 4, № 2. P. 134–139. DOI: 10.1134/S2079057014020118

зокрема реакція цих клітин на вплив глюкокортикоїдів³⁸. Раніше нами продемонстровано підвищення рівня глюкокортикоїдів у крові тимектомованих мишей та відсутність їх супресорного ефекту на клітини та медіатори імунної системи у мишей лінії FVB/N, на відміну від мишей інших ліній³⁹.

Таким чином, ми отримали дані, що свідчать про існування лінійних відмінностей досліджуваних біологічних властивостей ММСК. Крім того, показана важлива роль тимусу в проявах біологічних властивостей ММСК кісткового мозку. При цьому вплив тимусу та гормону тимуліну на функціонування ММСК залежить від генотипу мишей. Отримані результати можуть бути корисними для розробки індивідуалізованої клітинної терапії пошкоджень різного генезу, зокрема, опорно-рухового апарату, в умовах дисфункції імунної системи центрального характеру.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що біологічні властивості ММСК кісткового мозку (клоногенний потенціал, здатність до спрямованого диференціювання в остеогенному або адипогенному напрямках) відрізняються у мишей із різним гаплотипом за системою H-2 (миші лінії FVB/N та 129/Sv).

2. Клоногенний потенціал, здатність до спрямованого диференціювання в остеогенному і адипогенному напрямках, імуносупресивний ефект ММСК кісткового мозку мишей ліній FVB/N та 129/Sv пов'язані з функціональною активністю тимусу та зазнають змін після його видалення.

3. Продемонстрована можливість безпосереднього відновлюючого впливу тимуліну/ТСФ на знижений клоногенний і остеогенний потенціали ММСК кісткового мозку мишей обох ліній та адипогенний потенціал у мишей лінії FVB/N.

4. Імунодефіцитні стани центрального характеру змінюють біологічні властивості ММСК кісткового мозку і таким чином можуть впливати на ефективність клітинної терапії з їх використанням.

³⁸ Stolzing A., Sethe S., Scutt A. M. Stressed stem cells: temperature response in aged mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 2006. V. 15. P. 478–487. DOI: 10.1089/scd.2006.15.478

³⁹ Лабунец І. Ф., Кучук О. Ф., 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 Луганского государственного университета, 2010. Т. 19. С. 271–281.

АНОТАЦІЯ

Перспективним джерелом для клітинної терапії є мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК), біологічні властивості яких можуть залежати від гаплотипу за системою Н-2 і змінитися при дисфункції імунної системи центрального характеру.

Мета роботи – оцінити у мишей із різним гаплотипом за системою Н-2 здатність ММСК кісткового мозку до колонієутворення, спрямованого диференціювання в умовах зміни вмісту тимуліну/ТСФ в організмі та в культурі клітин.

Методи. Культури ММСК отримувались з кісткового мозку стегнових кісток мишей лінії FVB/N та 129/Sv, які відрізняються за гаплотипом Н-2. Проводили дослідження клоногенного потенціалу клітин кісткового мозку, фенотипування, оцінку остеогенного та адипогенного потенціалу ММСК, визначали імуномодуючі властивості ММСК після видалення тимусу та при внесенні в систему *in vitro* тимічного сироваткового фактора (ТСФ).

Результати. Встановлено, що рівень тимуліну вище у контрольних псевдооперованих мишей лінії FVB/N та лінії 129/Sv. Здатність стовбурових клітин-попередників кісткового мозку до утворення колоній у псевдооперованих і тимектомованих мишей залежить від їх гаплотипу за системою Н-2. При додаванні в культуру кістковомозкових клітин від тимектомованих мишей обох ліній ТСФ у концентраціях 1 нг/мл та 10 нг/мл зміна кількості колоній стромальних клітин-попередників фібробластів спостерігалася лише при додаванні високої дози гормону. Тимектомія у мишей лінії FVB/N приводить до посилення диференціювання ММСК в остеогенному напрямку та зниження адипогенного диференціювання, яке відновлюється після додавання в культуру ТСФ. У тимектомованих мишей лінії 129/Sv спостерігалася зниження диференціювання в остеогенному напрямку та його відновлення після інкубації клітин з тимічним гормоном. Встановлено імуносупресивний ефект ММСК кісткового мозку для мишей обох ліній. При цьому лінійні відмінності цього ефекту виявляються мірою імуносупресії.

Висновки. Клоногенний потенціал ММСК кісткового мозку та їх здатність до спрямованого диференціювання в остеогенному або адипогенному напрямках відрізняються у мишей лінії FVB/N та 129/Sv. Здатність ММСК кісткового мозку мишей обох ліній до колонієутворення, спрямованого диференціювання та імуносупресивної дії за умов змін вмісту тимічного сироваткового фактору в організмі та в культурі клітин пов'язані з функціонуванням тимусу та зазнають змін після його видалення. Реакція ММСК кісткового мозку на видалення тимусу залежить від генотипу мишей. Показано, що тимічний гормон

має відновлювальний ефект на знижений клоногенний та остеогенний потенціал ММСК кісткового мозку у мишей обох ліній та адипогенний потенціал у мишей лінії 129/Sv.

ЛІТЕРАТУРА

1. Lotfinegar P., Shamsasenjian K., Movassaghpour A., et al. Immunomodulatory nature and site specific affinity of mesenchymal stem cells: a hope in cell therapy. *Adv Pharm Bull.* 2014. V. 4, № 1. P. 5–13. DOI: 10.5681/apb.2014.002

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. V. 59. P. 369–378. DOI: 10.1007/s00005-011-0139-9

3. Abdelwahab S., Elsebay S., Fouli Gaber M., et al. Comparative study between bone marrow mesenchymal stem cell and their conditioned medium in the treatment of rat model of Parkinsonism. *J Cell Physiol.* 2021. V. 236, № 1. P. 440–457. doi: 10.1002/jcp.29872

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. V. 2. P. 256–264. DOI: 10.1359/JBMR.0301220

5. Bommie F., Sung-No J. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in Prevention or Treatment of Excessive Scars. *Stem Cells International.* 2016. V. 8. DOI: 10.1155/2016/6937976

6. Tyndall A., Uccelli A. Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks. *Bone marrow transplantation.* 2009. V. 43, № 11. P. 821–828. DOI: 10.1038/bmt.2009.63

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. V. 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. V. 23, № 5. P. 649–658. DOI: 10.5713/ajas.2010.90227

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. V. 20, № 29. P. 4690–4696. DOI: 10.2174/1381612820666140130211157

10. Лабунец И. Ф., Родниченко А. Е., Васильев Р. 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. Т. 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 органна трансплантологія. 2017. Т. 5, № 2. С. 242.

12. Лабунец И. Ф. Эпифиз и ритмы функций иммунной системы при старении. Экспериментальное исследование. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. С. 133.

13. Di Rosa F. T-lymphocyte interaction with stromal, bone and hematopoietic cells in the bone marrow. *Cell Biol.* 2009. V. 87, № 1. P. 20–29. DOI: 10.1038/icb.2008.84

14. Устименко А. М. Вплив постнатальної тимектомії у мишей лінії СВА/Са на клітини-попередники кісткового мозку і формування кістки в зрілому віці. Автореф. дис: к. б. н. Київ. 2006. С. 16.

15. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. Санкт-Петербург : Наука. 2008. Т. 2, № 2. С. 434.

16. 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. V. 103. P. 1662–1668. DOI: 10.1182/blood-2003-09-3070

17. Ooi Y. Y., Rahmat Z., Jose Sh., et al. Immunophenotype and differentiation capacity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from CBA/Ca, JCR and Balb/c mice. *World J. of stem cells (WJSC).* 2013. Vol. 5, № 1. P. 34–42.

18. Лабунец И. Ф., Кучук О. Ф., 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. Т. 19. С. 271–281.

19. 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. V. 4, № 2. P. 134–139. DOI: 10.1134/S2079057014020118

20. 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. V. 14, № 1. P. 46–55. DOI: 10.4161/15384101.2014.973308

21. Eltokhi A., Kurpiers B., Pitzer C. Behavioral tests assessing neuropsychiatric phenotypes in adolescent mice reveal strain- and sex specific effects. *Scientific receptors.* 2020. Vol. 10, № 11263. DOI: 10.1038/s41598-020-67758-0

22. Bach J. F., Bach M. A., Blanot D., et al. Thymic serum factor (FTS). *Bull Inst Pasteur (Paris).* 1978. V. 76. P. 325–398.

23. 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. V. 3. P. 393–403.

24. Li J., Mareddy S., 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. V. 15, № 9. P. 2481–2490. DOI: 10.1089/ten.TEA.2008.0463

25. 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. *Analytical biochemistry.* 2004. V. 329. P. 77–84. DOI: 10.1016/j.ab.2004.02.002

26. 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

27. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983. V. 65, № 1. P. 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

28. Лакин Г. Ф. Биометрия. Москва : Высшая школа. 1990. С. 350.

29. Land S. C., Darakhshan F. Thymulin evokes IL-6-C/EBP β regenerative repair and TNF- α silencing during endotoxin exposure in fetal lung explants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004. V. 286. P. 473–487. DOI: 10.1152/ajplung.00401.2002

30. 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. V. 6, № 1. P. 2–12. DOI: 10.2174/1381612820666140130211157

31. Оксимец В. М. Роль мезенхимальных стромальных клеток в остеоиммунных процессах. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини.* 2011. Т. 6, № 1. С. 94–98.

32. 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. V. 1, № 2. P. 41–49.

33. Boeloni J. N., Ocarino M., Silva J. F., et al. Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of ovariectomized and nonovariectomized female rats with thyroid dysfunction. *Pathol Res Pract.* 2013. V. 209, № 1. P. 44–51. DOI: 10.1016/j.prp.2012.10.004

34. 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

35. Liu J., Huang F., He H. W. Melatonin effects on Hard tissue: bone and tooth. *Int J Mol Sci.* 2013. V. 14. P. 10063–10074. DOI: 10.3390/ijms140510063

36. Літовка І. Г., Мазепа-Крижанівська У. О., Березовський В. Я. Вплив мелатоніну на метаболізм кісткової тканини. Фізіологічний журнал. 2014. Т. 60, № 2. С. 102–109.

37. Бутенко Г. М., Поворознюк В. В., Лабунец І. Ф. Влияние пептидных факторов тимуса и эпифиза на структурно-функциональное состояние костной ткани при старении: экспериментально-клиническое исследование. Пробл Остеол. 2001. Т. 4, № 3. С. 4–10.

38. Иммунобиология гормонов тимуса / редакторы Ю. А. Гриневич, В. Ф. Чеботарев // Киев: Здоров'я. 1989. С. 160.

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. V. 4, № 2. P. 220–223. DOI: 10.22494/cot.v4i2.59

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. V. 99, № 10. P. 3838–3843. DOI: 10.1182/blood.v99.10.3838

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. V. 57, № 1. P. 11–20. DOI: 10.1046/j.1365-3083.2003.01176.x

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. V. 25, № 11. P. 2739–2749. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0197

43. Kyurkchiev D., Bochev I., Ivanova-Todorova E., et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. World J Stem Cells. 2014. V. 6, № 5. P. 552–570. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i5.552

44. Stolzing A., Sethe S., Scutt A. M. Stressed stem cells: temperature response in aged mesenchymal stem cells. Stem cells and development. 2006. V. 15. P. 478–487. DOI: 10.1089/scd.2006.15.478

Information about the author:

Labunets Irina Fedorivna,

Doctor of Medical Sciences, PhD, DSc,
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
67, Vyshhorodska Str., Kyiv, 04114, Ukraine