

На правах рукописи

ЖИДКОВА ОЛЬГА ВЛАДИМИРОВНА

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ И
ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ПОНИЖЕННОГО
СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОРОДА И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ
АКТИВАЦИИ**

03.03.01 - физиология

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ-ИМБП РАН).

Научный руководитель: Буравкова Людмила Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией клеточной физиологии, ГНЦ РФ-ИМБП РАН.

Официальные оппоненты: Атякшин Дмитрий Андреевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией патоморфологии Центра коллективного пользования (научно-образовательного центра), ФГАОУ ВО "Российский университет дружбы народов".

Еремин Илья Игоревич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития, ФГБНУ "Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии".

Ведущая организация: НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2020 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 002.111.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук по адресу: 123007 г. Москва, Хорошевское шоссе, д.76а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук и на сайте <http://www.imbp.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

С.В. Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) представляют собой популяцию прогениторных клеток, которые можно обнаружить практически во всех тканях организма, они могут быть выделены и культивированы *in vitro*. МСК обладают иммуномодулирующими свойствами, способны дифференцироваться в различные клеточные типы, а также секретируют факторы роста, цитокины и другие растворимые медиаторы (Carlan et al., 2011; Rubina, Tkachuk 2017; Буравкова и др. 2018; Романов и др., 2018). Это позволяет эффективно применять как ауто-, так и аллогенные МСК для дополнительной терапии заболеваний различного генеза (Popov et al. 2010; Kalinina et al., 2011; Dimarino et al., 2013; Marquez-Curtis et al., 2015; Sagaradze et al., 2015; Luo et al., 2019; Shevchenko et al., 2019).

Сосудистый эндотелий является важным фактором микроокружения МСК и может выступать в роли регулятора их функциональной активности (Shi et al., 2003; Парфенова, Ткачук, 2012; Oh et al., 2015). С одной стороны, взаимодействие МСК с эндотелием обусловлено периваскулярным расположением стромальных предшественников в организме (Covas et al., 2005; da Silva et al., 2006; Kolf et al., 2007; Haque et al., 2013; Andreeva et al., 2017). С другой стороны, циркулирующие в крови МСК способны мигрировать в ткань через эндотелий сосудистой стенки, что лежит в основе использования внутрисосудистого пути введения МСК в организм в протоколах клеточной терапии (Leibacher et al., 2016; Zachar et al., 2016; Nitzsche et al., 2017). Таким образом, взаимодействие МСК с эндотелием сосудов происходит как в физиологических условиях в рамках тканевой ниши, так и в патологических условиях, когда возникает необходимость естественной или терапевтической репарации поврежденной ткани. Причем в патологических условиях характер взаимодействия МСК и эндотелиальных клеток (ЭК) может изменяться вследствие провоспалительной активации эндотелия цитокинами, которые секретируются иммунными клетками, а также вследствие кислородной депривации на фоне нарушения кровообращения в области повреждения.

Изучение влияния различных факторов микроокружения на МСК является важной задачей клеточной физиологии и регенеративной медицины. Учитывая, что МСК активно применяют в терапии ишемических заболеваний (Traktuev et al., 2006; Parfenova et al., 2015; Beegle et al., 2016; Konoplyannikov et al., 2018; Yong et al., 2018; Luo et al., 2019), много внимания уделяется исследованию роли молекулярных факторов микроокружения (концентрация O_2 , цитокины и др.) в регуляции биологических свойств стромальных клеток (Buravkova et al., 2014; Choi et al., 2016). В то же время влияние эндотелиальных клеток, как клеточного компонента тканевой ниши на функциональную активность МСК, а также эффекты кислородной депривации на взаимодействие МСК и эндотелия изучены в меньшей степени.

Анализ функциональной активности МСК, интактных и активированных ЭК после взаимодействия при тканевых значениях O_2 (5% O_2) и гипоксическом стрессе (0.1% O_2), позволит оценить, как в условиях, приближенных к физиологическим, изменятся свойства МСК, необходимые для реализации их репаративного потенциала, а также понять, обладают ли МСК модулирующим эффектом в отношении провоспалительной активации эндотелия. Полученные экспериментальные данные могут дополнить представления клеточной физиологии о механизмах регуляции функциональных свойств МСК при сочетанном действии клеточных и молекулярных факторов микроокружения, что важно для разработки эффективных протоколов подготовки и введения МСК с целью восстановительной терапии.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение взаимодействия МСК с интактными и провоспалительно активированными эндотелиальными клетками при пониженном содержании кислорода (5%, 0.1% O_2).

Для достижения цели были сформулированы следующие задачи:

1. оценить клоногенный и дифференцировочный потенциал МСК при взаимодействии с эндотелиальными клетками,
2. охарактеризовать профиль экспрессии молекул адгезии в МСК и эндотелиальных клетках при сокультивировании,
3. изучить влияние эндотелиальных клеток на способность МСК к миграции,
4. оценить эффекты взаимодействия на паракринную активность МСК и эндотелиальных клеток,
5. изучить влияние МСК на провоспалительную активацию эндотелия.

Научная новизна

Впервые установлено, что при взаимодействии с ЭК в МСК изменяется экспрессия генов стволовости (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*) и дифференцировки (*RUNX2*, *SOX9*), что свидетельствует о коммитировании МСК на транскрипционном уровне. Впервые продемонстрировано, что гипоксический стресс (0.1% O_2 , 24 ч) в большей степени способствует коммитированию МСК в присутствии эндотелия по сравнению «физиологической» гипоксией (5% O_2), что выражается в отмене индукции транскрипции *OCT4* и *RUNX2* и подавлении транскрипции *SOX2*. Также показано, что снижение экспрессии *SOX9* в МСК определяется самим взаимодействием с ЭК и не зависит от концентрации O_2 в среде.

Впервые проведена сравнительная оценка эффектов интактных и ФНО- α активированных ЭК на МСК. Показано, что интактный и активированный эндотелий в равной степени модулирует экспрессию молекул межклеточного взаимодействия (интегринов $\alpha 1$, $\alpha 4$, N-кадгерина) и стимулирует направленную миграцию МСК при

различной концентрации O_2 . Активация эндотелия увеличивает направленную и ненаправленную миграцию и экспрессию ICAM-1, интегрина $\alpha V\beta 3$ в МСК, что может указывать на способность стромальных клеток к мобилизации в ответ на эндотелиальную дисфункцию, вызванную провоспалительными цитокинами.

Получены новые данные о том, что взаимодействие МСК и ЭК усиливает продукцию плейотропных цитокинов IL-6 и IL-8 клетками. Впервые установлено, что краткосрочный гипоксический стресс (0.1% O_2 , 24 ч) и провоспалительная активация эндотелия усиливают эффекты взаимодействия на продукцию IL-8 и экспрессию *IL8* в МСК и эндотелиальных клетках. В то же время выявлено ослабление индукции секреции IL-6 и экспрессии гена *IL6* в МСК, интактных и активированных ЭК при взаимодействии в условиях краткосрочного гипоксического стресса.

Впервые продемонстрировано, что при тканевых значениях O_2 (5%, 0.1%) МСК компенсируют эндотелиальную дисфункцию, вызванную провоспалительной активацией, снижая уровень эндогенных активных форм кислорода (NO) и «адгезивность» ФНО-активированного эндотелиального монослоя, что может препятствовать инфильтрации иммунных клеток в поврежденную ткань. Показано негативное влияние краткосрочной депривации O_2 (0.1% O_2 , 24 ч) на способность МСК регулировать адгезию иммунных клеток к активированному эндотелию.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенное исследование демонстрирует возможность создания модели *in vitro* для оценки межклеточных взаимодействий МСК и эндотелия в условиях, близких к физиологическим. В рамках модели контактного сокультивирования клеток *in vitro* показано, что молекулярные факторы микроокружения, такие как гипоксическое воздействие и активация провоспалительными цитокинами, влияют на конечные эффекты межклеточного взаимодействия. Данный методический подход можно использовать для изучения сигнальных каскадов, регулирующих взаимодействие мезенхимальных стромальных и эндотелиальных клеток, и поиска способов модификации свойств МСК с целью улучшения их терапевтического потенциала для лечения различных заболеваний.

Результаты исследования показали, что взаимодействие эндотелиальных клеток и периваскулярных стромальных предшественников при «физиологической» гипоксии (5% O_2) обеспечивает некоммитированное «покоящееся» состояние МСК и целостность эндотелиального монослоя. В то же время МСК частично компенсируют эффекты провоспалительной активации эндотелия, которая может привести к его дисфункции. Короткий гипоксический стресс (0.1% O_2 , 24 ч) негативно влияет на взаимодействие МСК и эндотелия, так как увеличивает адгезивные свойства эндотелиальных клеток, отменяет индукцию генов «стволовости» в МСК и суммарную продукцию IL-6 клетками, что может приводить к ухудшению скоординированного ответа клеток периваскулярной ниши на

повреждающее воздействие. Эти данные указывают на необходимость проведения клеточной терапии ишемических заболеваний на фоне фармакологической коррекции нарушений кровообращения в органах и тканях для снижения негативного влияния депривации O₂ на репаративные свойства МСК.

Основные положения, выносимые на защиту

1. После взаимодействия с интактными и ФНО-активированными эндотелиальными клетками в условиях «физиологической» гипоксии (5% O₂) МСК сохраняют стромальный фенотип и клоногенную активность. При этом происходит разнонаправленное изменение транскрипции генов стволовости МСК (\uparrow *OCT4*, \downarrow *NANOG*) и коммитирования (\uparrow *RUNX2*, \downarrow *SOX9*). Помимо этого, эндотелий стимулирует увеличение подвижности МСК и изменение экспрессии молекул адгезии (интегринов α 1, α 4, α V/ β 3, N-кадгерина, ICAM-1), причем активированные эндотелиальные клетки оказывают более выраженный эффект на миграционную активность и экспрессию интегрин α V/ β 3, ICAM-1 в МСК, что *in vivo* может способствовать мобилизации МСК из периваскулярных ниш.
2. МСК частично отменяют ФНО-индуцированную активацию эндотелия вне зависимости от уровня O₂, подавляя продукцию оксида азота и способность эндотелиальных клеток адгезировать мононуклеары периферической крови.
3. Краткосрочный гипоксический стресс (0.1% O₂, 24 ч) модулирует взаимодействие мезенхимальных стромальных и эндотелиальных клеток, отменяя наблюдаемое в МСК возрастание экспрессии *OCT4* и *RUNX2*, а также ослабляя способность МСК снижать адгезивные свойства эндотелия.
4. Межклеточное взаимодействие стимулирует паракринную активность МСК, интактных и ФНО-активированных эндотелиальных клеток, индуцируя экспрессию генов плеiotропных интерлейкинов *IL6*, *IL8* и их суммарную продукцию. Краткосрочный гипоксический стресс (0.1% O₂, 24 ч) усиливает эффекты взаимодействия на содержание IL-8 при сокультивировании МСК и неактивированного эндотелия и транскрипцию гена *IL8* в МСК, интактных и активированных эндотелиальных клетках.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на V Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Россия, Санкт-Петербург, 2016), Конференции с международным участием "Клеточная биология: проблемы и перспективы" (Россия, Санкт-Петербург, 2017), XVI Конференции молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённой 60-летию запуска первого искусственного спутника Земли (Россия, Москва, 2017), Международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (Беларусь, Минск, 2017), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Россия, Москва, 2017), на

Международной конференции «Cell Technologies At The Edge: From Research To Practice (СТЕРР) «Translational Research In Cell Therapy» (Россия, Москва, 2018), XVII Конференции молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённой 100-летию со дня рождения академика О.Г. Газенко (Россия, Москва, 2018).

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых изданиях из перечня ВАК РФ и баз данных Scopus/Web of Science, 7 тезисов докладов.

Результаты диссертационной работы были обсуждены и рекомендованы к защите на секции «Космическая физиология и биология» Учёного совета ГИЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 2 от 25 февраля 2020 г.).

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-15-00693 и грантов РФФИ 16-04-01244, 16-04-01377.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Текст диссертации изложен на 143 страницах, содержит 33 рисунка и 19 таблиц. Список литературы состоит из 425 цитируемых источников, из которых 13 - на русском и 412 - на иностранном языке.

Основное содержание работы

Материалы и методы

МСК, полученные из стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека по стандартной методике (Zuk et. al., 2001) с модификациями (Buravkova et. al., 2009), культивировали в ростовой среде (α -МЕМ, 10% ФТС, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 5% CO₂, 37°C, 100% влажность) при 20% и 5% O₂. Эндотелиальные клетки (ЭК) выделяли из пупочной вены по методу Gimbrone et. al. (1974) в модификации Антонова и соавт. (Антонов и др., 1981), и культивировали при стандартных условиях (среда 199, 10% ФТС, 200 мкг/мл ECGF, 2 mM L-глутамин, 100 мкг/мл гепарина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 5% CO₂, 20% O₂). Для экспериментов использовали МСК 2-6 пассажей и эндотелиальные клетки 2-5 пассажей, достигшие 80% конfluence. Мононуклеары (МНК) выделяли из периферической крови практически здоровых добровольцев на градиенте плотности ($\rho=1,077$ г/л) (Histopaque 1077), согласно стандартному протоколу с использованием среды RPMI-1640 с 5% инактивированной ФТС, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин.

Разделенные путём магнитной иммуносепарации клетки центрифугировали и подвергали анализу методом проточной цитофлуориметрии и ПЦР в реальном времени, оценивали клоногенную активность, подвижность клеток.

МСК и ЭК лизировали реагентом Trizol (Qiagen, США), выделяли мРНК, на ее матрице синтезировали кДНК с использованием Quantitech Reverse Transcription Kit (Qiagen, США). Методом количественной ПЦР проводили оценку уровня экспрессии генов с помощью соответствующих праймеров (Qiagen, США).

Стромальный иммунофенотип МСК и экспрессия молекул межклеточного взаимодействия в МСК и ЭК были охарактеризованы методом проточной цитофлуориметрии после окрашивания соответствующими антителами (BD Bioscience, США), продукцию АФК (NO , H_2O_2) в ЭК и МСК определяли после окрашивания флюоресцентными зондами (DAF-FM Diacetate, CM-H2DCFDA, Thermo Fisher Scientific, США).

Ненаправленную миграцию МСК оценивали в модели «раны». Наносили «рану» на монослой МСК стерильным наконечником ($V=10$ мкл) и фотографировали сразу после повреждения и через 24 ч. Площадь миграции подсчитывали с использованием программного обеспечения NIS-elements AR версии 3.21 (Nikon, Германия). Для оценки направленной миграции 2×10^4 МСК добавляли в трансвелл и помещали в лунку 24 луночного планшета, содержащего среду от ЭК. Через 24 ч клетки на мембране фиксировали, окрашивали йодидом пропидия, фотографировали и подсчитывали в 5 полях зрения с использованием программного обеспечения ImageJ (Wayne Rasband, США).

Концентрацию цитокинов в среде определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов для определения IL-6, IL-8, MCP-1 (BD Bioscience, США), VEGF, TGF β (R&D Systems, США) согласно инструкциям производителей.

Для оценки адгезивных свойств эндотелия в монокультуру активированных ФНО- α ЭК и сокультуру ЭК ФНО- α +МСК после 24 ч культивирования добавляли МНК в концентрации 1 млн/мл и помещали в инкубатор на 30 минут. Затем культуры отмывали от МНК, фиксировали и окрашивали по Гимза азур-эозином. Количество прикрепившихся моноклеаров подсчитывали в 10 случайных полях зрения.

Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

Дизайн эксперимента

В работе использовали модель контактного сокультивирования клеток *in vitro*. ЭК выращивали до состояния предмонослоя, производили смену среды без добавления ФНО- α в группе интактных клеток и с добавлением ФНО- α (10 нг/мл) в группе активированных клеток, через 24 ч среду убрали и добавляли суспензию МСК. Монокультуры МСК, интактных и активированных ЭК использовали как контроль. Культуры инкубировали 24 ч при стандартном содержании O_2 (20% O_2), в условиях «физиологической» гипоксии (5% O_2)

и короткого гипоксического стресса (0.1% O₂). Кондиционированную среду собирали для изучения паракринной активности клеток и ее влияния на подвижность МСК. Сокультуру разделяли методом магнитной иммуносепарации и подвергали дальнейшему анализу одновременно с монокультурами клеток (рис. 1).

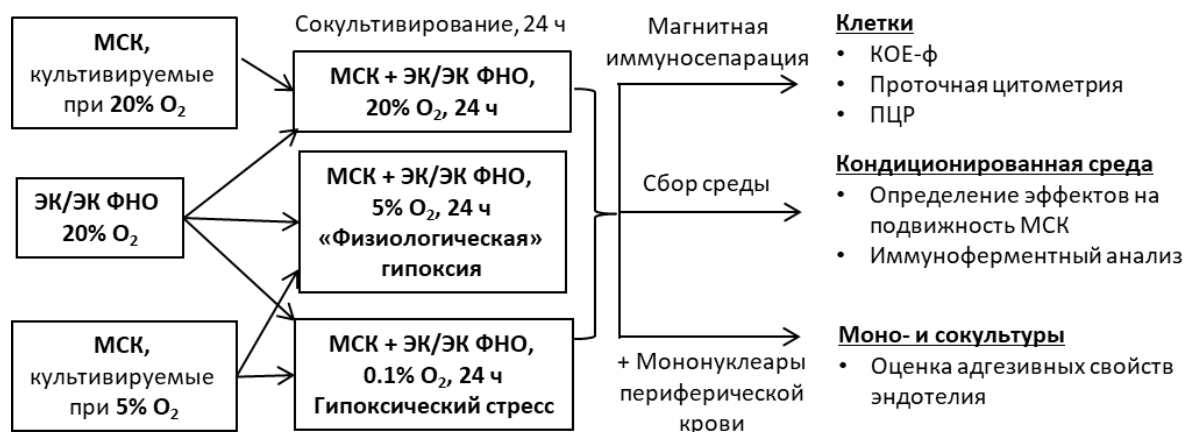


Рисунок 1. Схема эксперимента

Результаты исследования

Характеристика МСК и ЭК в монокультуре

Прежде чем проводить оценку влияния депривации O₂ разной степени выраженности и провоспалительной активации на взаимодействие клеток, мы изучили эффекты этих факторов микроокружения на МСК и эндотелий в монокультуре.

Влияние депривации O₂ и провоспалительной активации на свойства МСК

МСК в монокультуре *in vitro* имели фибробластоподобную форму, длительно пролиферировали, демонстрировали высокую экспрессию стромальных маркеров (CD73, CD90, CD105) и не экспрессировали маркер гемопоэтических клеток CD45.

По данным цитофлуориметрического анализа МСК при 20% и 5% O₂ не отличались по жизнеспособности и экспрессии молекул межклеточного взаимодействия (интегрины α1, α4, α5, αVβ3, N-кадгерин, ICAM-1), что соотносится с экспериментальными данными, полученными ранее (Буравкова и др. 2009; Жамбалова и др. 2009; Basciano et al., 2011; Yang et al., 2012; Рылова и др. 2013). Наши результаты свидетельствуют, что кратковременное культивирование МСК при 0.1% O₂ также не оказывало влияния на эти параметры.

Культивирование при 5% O₂ способствовало повышению клоногенной активности, транскрипции *OCT4* и *RUNX2* и снижению уровня активных форм кислорода (АФК) в МСК по сравнению с 20% O₂. Короткий гипоксический стресс индуцировал возрастание АФК более, чем в 2,5 раза, и отменял стимулирующее действие «физиологической» гипоксии (5% O₂) на клоногенную активность МСК, при этом сохранялся высокий уровень мРНК *OCT4*. Обработка IFNγ МСК, культивируемых при 5% O₂, вызывала увеличение уровня АФК, экспрессии ICAM-1, секреции IL-6, MCP-1 и снижение продукции IL-8.

Ранее продемонстрировано увеличение доли КОЕ-ф, индукция экспрессии *OCT4* и снижение уровня окислительного стресса в МСК при 5% O₂ по сравнению со стандартными условиями культивирования (20% O₂) (Basciano et al., 2011; Ranera et al., 2012; Yang et al., 2012; Рылова и др. 2013), что соотносится с нашими результатами. Также показано, что гиперэкспрессия *OCT4* стимулирует, а индукция окислительного стресса негативно влияет на пролиферативный потенциал МСК (Yagi et al., 2013; Denu et al., 2016; Lu et al., 2019). Вероятно, одним из факторов, повлиявший на увеличение колониеобразования при 5% O₂, может быть возрастание транскрипции *OCT4*. Гипоксический стресс (0.1% O₂) индуцирует увеличение АФК в МСК, что может отменять позитивный эффект *OCT4* на пролиферацию клеток. IFN γ не оказывал негативного действия на клоногенную активность МСК, однако вызывал изменения паракринного профиля клеток, характерного для действия провоспалительных факторов, что может быть связано с активацией сигнального пути JAK/STAT (Schroder et al., 2004; Gough et al., 2008; Liu et al., 2017; Song et al., 2019).

Эффекты краткосрочной депривации O₂ и активации ФНО- α на свойства ЭК

Эндотелиальные клетки пупочной вены *in vitro* имели характерную полигональную и округлую форму, плотно прилегали друг к другу в монослое, экспрессировали высокий уровень VE-кадгерина и низкий – VCAM-1, ICAM-1, E-селектина. Краткосрочная депривация O₂ (5% O₂ или 0.1% O₂, 24 ч) не влияла на жизнеспособность и экспрессию эндотелиальных маркеров ЭК, однако при 0.1% O₂ наблюдалось повышение уровня АФК. При различном содержании O₂ активированные ФНО- α ЭК демонстрировали увеличение экспрессии ICAM-1 и уровня внутриклеточных АФК. Активированные ЭК при 20% и 0.1% O₂ характеризовались более высоким уровнем NO.

Следовательно, краткосрочный гипоксический стресс и активация ФНО- α увеличивала продукцию АФК и NO в эндотелии, что может указывать на развитие окислительного стресса. Активация ФНО- α также индуцировала экспрессию ICAM-1, что соответствует экспериментальным данным других авторов (Kim et al., 2008; Fontani et al., 2016). Ранее показано, что ЭК отвечают на депривацию O₂ и действие ФНО- α повышением уровня АФК, которые в свою очередь, активируют различные сигнальные пути, в частности HIF, необходимые для адаптации клеток к изменяющимся условиям среды (Tang et al., 2004; Zhang et al., 2010; Finkel et al., 2011; Schieber et al., 2014). Возможно, вследствие механизмов, описанных выше, культивируемые ЭК демонстрировали устойчивость к краткосрочному действию депривации O₂ и добавлению ФНО- α .

Взаимодействие МСК и ЭК при нормоксии и «физиологической» гипоксии

Уровень коммитирования МСК

МСК после взаимодействия с ЭК были охарактеризованы по экспрессии стромальных маркеров, клоногенной активности и транскрипции генов, отвечающих за самоподдержание и дифференцировку.

Сокультивирование с ЭК в условиях 20% и 5% O₂ не повлияло на экспрессию стромальных маркеров и клоногенную активность МСК (табл. 1). Анализ экспрессии генов, ответственных за самоподдержание (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*), и генов, регулирующих дифференцировку МСК в остеогенном (*RUNX2*), адипогенном (*PPAR γ*) и хондрогенном (*SOX9*) направлении (табл. 2), показал, что после взаимодействия с интактными и активированными ЭК при 20% O₂ снижалась транскрипция *NANOG* и *SOX9*, а транскрипционная активность *RUNX2* возрастала. При 5% O₂ сокультивирование с интактными и активированными ЭК вызывало изменения в экспрессии *NANOG*, *SOX9* и *RUNX2*, подобные таковым при 20% O₂, и увеличение мРНК *OCT4*.

Таблица 1. Стромальный иммунофенотип и клоногенная активность МСК до и после взаимодействия с эндотелиальными клетками

O ₂	Схема культивирования	CD90	CD73	CD105	CD44	CD45	КОЕ-ф
20%	МСК	98,1 ± 1,4	99,9 ± 0,1	99,3 ± 0,0	100,0	0,9 ± 0,2	208 ± 60
	МСК+ЭК	97,0 ± 0,1	97,3 ± 2,0	96,9 ± 0,5	99,0±1,0	0,9 ± 0,1	155 ± 50
	МСК+ЭК ФНО	95,9 ± 1,6	97,8 ± 0,9	97,6 ± 2,6	99,0±1,0	1,3 ± 0,2	180 ± 70
5%	МСК	96,0 ± 3,2	99,3 ± 0,3	98,5 ± 1,0	100,0	0,8 ± 0,2	213 ± 30
	МСК+ЭК	95,7 ± 4,0	98,7 ± 0,5	98,8 ± 0,8	100,0	0,8 ± 0,3	233 ± 80
	МСК+ЭК ФНО	95,4 ± 3,1	98,5 ± 0,7	98,3 ± 1,0	99,0±2,0	1,0 ± 0,1	215 ± 50

МСК – монокультура МСК, МСК+ЭК / МСК+ЭК ФНО – МСК после сокультивирования с ЭК/ЭК ФНО. Указана доля положительно окрашенных МСК (%). Для КОЕ-ф указано количество колоний на 1000 клеток. М±SD, n=3.

Таблица 2. Изменение экспрессии генов «стволовости» и регуляторов дифференцировки в МСК после взаимодействия с эндотелиальными клетками

O ₂	Схема культивирования	<i>OCT4</i>	<i>SOX2</i>	<i>NANOG</i>	<i>RUNX2</i>	<i>SOX9</i>	<i>PPARγ</i>
20%	МСК+ЭК	0,9±0,3	0,9±0,4	0,3±0,1*	3,9±1,6*	0,3±0,3*	0,8±0,2
	МСК+ЭК ФНО	0,8±0,2	0,7±0,3	0,4±0,1*	3,4±1,6*	0,3±0,2*	0,7±0,2
5%	МСК+ЭК	1,6±0,3**	0,7±0,2	0,4±0,1**	2,1±1,0**	0,6±0,1**	0,6±0,4
	МСК+ЭК ФНО	1,8±0,5**	0,9±0,3	0,5±0,1**	2,0±0,8**	0,4±0,1**	0,6±0,4

МСК – монокультура МСК, МСК+ЭК – МСК после 24 ч сокультивирования с ЭК, МСК+ЭК ФНО – МСК после 24 ч сокультивирования с активированными ФНО- α ЭК. Данные представлены как кратность изменений по сравнению с монокультурой МСК, М±SEM, n=3. *- p<0,05 по сравнению с МСК 20% O₂; ** - p<0,05 по сравнению с МСК 5% O₂.

Литературные данные свидетельствуют об изменении транскрипции генов-регуляторов миогенной и остеогенной дифференцировки в МСК после длительного взаимодействия с эндотелием (7-14 дней) (Bidarra et al., 2011; Merfeld-Clauss et al., 2014; Li et al., 2015). Мы наблюдали подавление экспрессии *SOX9* на фоне возрастания *RUNX2*, что

характерно для дифференцировки МСК в остеогенном направлении (Cheng et al., 2010), при этом снижение транскрипции одного из факторов (*NANOG*), отвечающих за поддержание недифференцированного состояния МСК (Tsai et al., 2012), также может говорить в пользу коммитирования МСК. МСК сохраняли стромальный фенотип и пул клонально активных клеток, несмотря на признаки коммитирования, что соотносится с данными Lin и соавт. о сохранении мультилинейного дифференцировочного потенциала при изменении транскрипционного профиля после длительного взаимодействия с ЭК (Lin et al., 2014).

Экспрессия молекул адгезии в МСК

Методом проточной цитометрии было показано, что взаимодействие с интактным эндотелием при 20% и 5% O₂ сходным образом вызывало снижение доли МСК, экспрессирующих интегрин $\alpha 4$ и N-кадгерин, и увеличение доли клеток, экспрессирующих интегрин $\alpha 1$, $\alpha V\beta 3$. Активированные ЭК по сравнению с интактными клетками индуцировали увеличение экспрессии $\alpha V\beta 3$ и ICAM-1 в МСК (рис. 2).

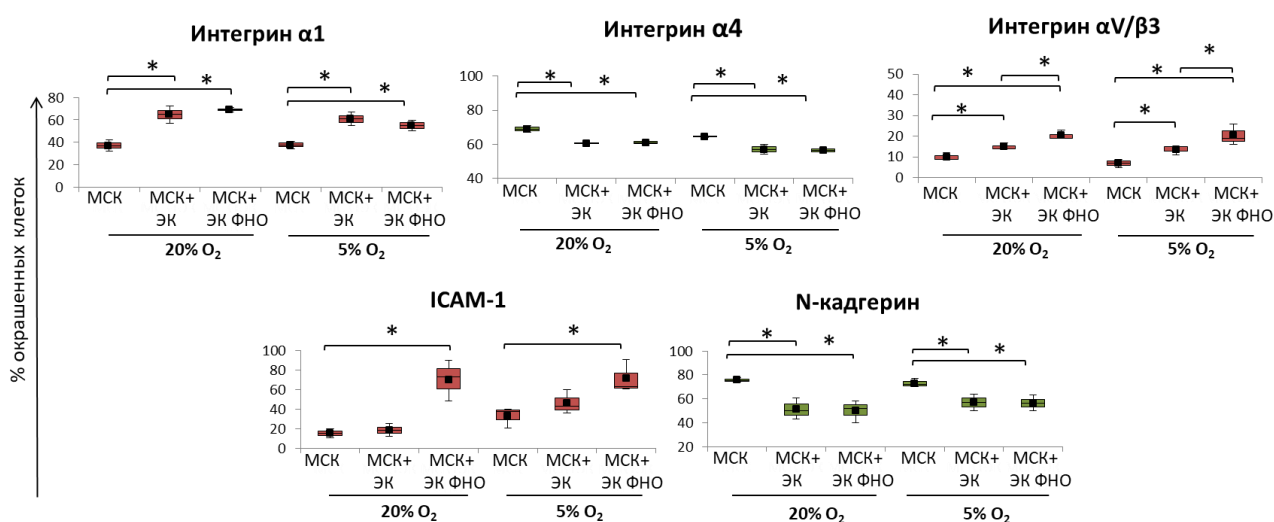


Рисунок 2. Экспрессия молекул межклеточных контактов на поверхности МСК после взаимодействия с интактными и ФНО- α активированными эндотелиальными клетками. Представлено среднее значение доли окрашенных клеток, медиана, межквартильный разброс, максимальные и минимальные значения, n=3. *- p<0,05.

Ранее было показано, что паракринное взаимодействие с эндотелием вызывает снижение экспрессии интегрина $\alpha 4$ на МСК (Choi et al., 2016), наши наблюдения говорят об уменьшении экспрессии этого белка в модели контактного взаимодействия МСК с эндотелием. Показано, что интегрин $\alpha 1$ опосредует адгезию МСК к ЭК, интегрин $\alpha 4$, $\alpha V\beta 3$ участвуют в процессах хоуминга и миграции стромальных клеток (Teo et al., 2012; Choi et al., 2016), ICAM-1 опосредует взаимодействие МСК и иммунных клеток (Kota et al., 2014), N-кадгерин позволяет МСК контактировать с другими клетками мезенхимного ряда,

обеспечивая связь между компонентами цитоскелета соседних клеток (Shapiro et al., 1995; Gumbiner et al., 2005). В МСК снижалась экспрессия белков, отвечающих за образование гомотипических межклеточных контактов (N-кадгерин) и контактов клетка-матрикс (интегрин $\alpha 4$), увеличивалась экспрессия белков, опосредующих процессы миграции и образование контактов МСК-ЭК (интегрин $\alpha 1$, интегрин $\alpha V\beta 3$, ICAM-1). Возрастание экспрессии ICAM-1 на МСК при сокультивировании, вероятно, связана с продукцией эндотелием в ответ на действие ФНО- α медиаторов (в частности, IL-1 α), которые обладают провоспалительным эффектом (Sanchez et al., 2019).

Паракринная регуляция при взаимодействии МСК и ЭК

После 24 ч культивирования определяли концентрацию цитокинов IL-6, IL-8, MCP-1, TGF β , VEGF в среде от моно- и сокультур методом иммуноферментного анализа. Концентрация MCP-1, VEGF, TGF β в сокультурах соответствовала сумме концентраций этих цитокинов в среде от монокультур ЭК и МСК (рис. 3). Сокультивирование с интактными ЭК приводило к увеличению содержания IL-6, превышающему сумму концентраций этого цитокина в среде от монокультур. Взаимодействие с активированными ЭК вызывало достоверное возрастание IL-6 и IL-8. Изменения паракринной активности были схожи при 20% и 5% O₂. Анализ экспрессии *IL6*, *IL8* в ЭК и МСК показал, что сокультивирование увеличивало транскрипцию этих генов, что соответствовало возрастанию концентрации IL-6 и IL-8 в кондиционированной среде (табл. 3, 4). Ранее было показано, что взаимодействие стромальных и эндотелиальных клеток изменяет уровень мРНК некоторых цитокинов и факторов роста в МСК, однако практически отсутствуют данные о влиянии ЭК на секреторный профиль МСК (Luu et al., 2013; Bartaula-Brevik et al., 2017). Мы впервые продемонстрировали, что взаимодействие МСК и ЭК стимулировало значительное возрастание продукции IL-6 и IL-8, что было вызвано активацией транскрипции соответствующих генов.

Для оценки миграционной активности МСК проанализировано паракринное влияние ЭК на скорость ненаправленной миграции в модели «раны» и направленной миграции МСК в системе трансвелл (модифицированная камера Бойдена). Кондиционированная среда, полученная от неактивированных ЭК при 20% и 5% O₂, стимулировала направленную миграцию МСК, в то же время среда от активированных ЭК вызывала достоверное увеличение скорости направленной и ненаправленной миграции МСК (рис. 4). Данные литературы свидетельствуют о стимулирующем влиянии IL-8 на миграцию стволовых клеток периоста, подобных МСК по иммунофенотипу (Stich et al., 2008). Методом ИФА мы определили, что активированные ЭК продуцировали больше IL-6 в 1,5 – 3,5 раза и IL-8 - в 7.9 – 15,9 раз по сравнению с интактными клетками. Возможно, более значимые эффекты активированного эндотелия на подвижность МСК вызваны отличием в паракринной активности интактных и активированных эндотелиальных клеток.

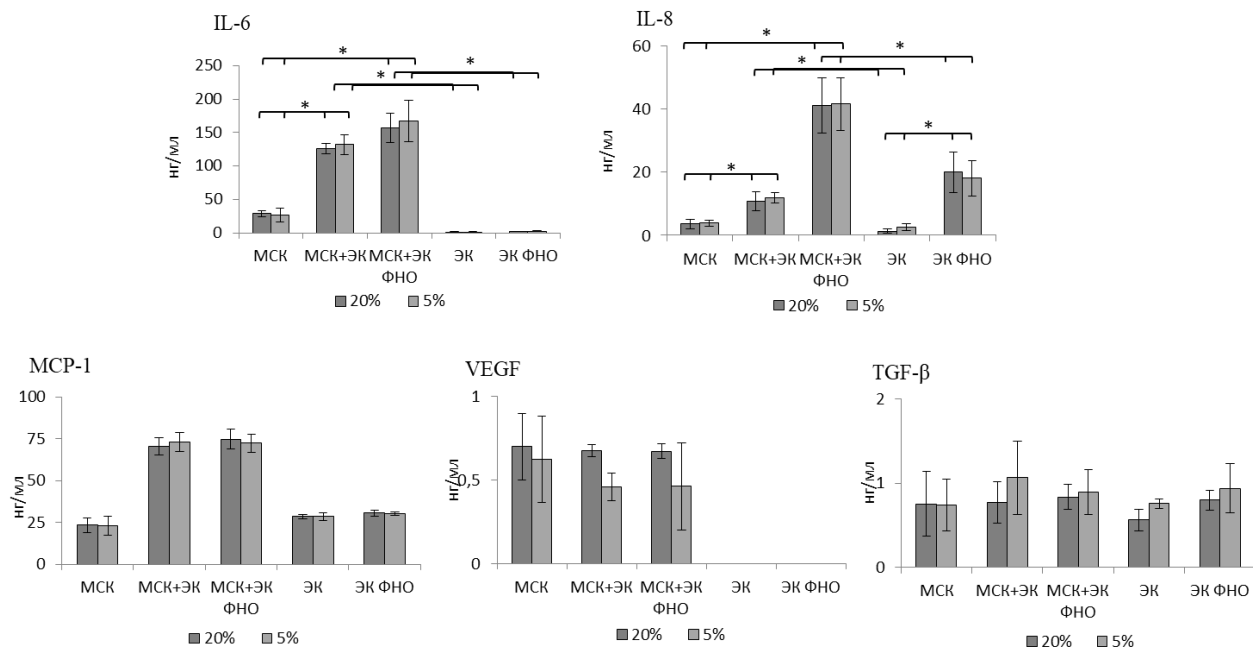


Рисунок 3. Содержание растворимых медиаторов в кондиционированной среде от моно- и сокультур МСК и ЭК. Данные представлены как $M \pm SD$, $n=4$. * – $p < 0,05$.

Таблица 3. Изменение транскрипции *IL6*, *IL8* в ЭК после сокультивирования с МСК при 20% и 5% O_2

Гены	20% O_2			5% O_2		
	ЭК+МСК	ЭК ФНО	ЭК ФНО+МСК	ЭК+МСК	ЭК ФНО	ЭК ФНО+МСК
<i>IL8</i>	4,6±0,7*	3,9±1,2*	7,9±1,2**	3,6±0,5[#]	6,2±1,0[#]	10,5±1,3^{##}
<i>IL6</i>	7,1±0,9*	4,5±0,5*	7,1±0,6**	7,4±0,5[#]	5,1±0,8[#]	8,5±0,7^{##}

Показана кратность изменений по сравнению с ЭК 20% O_2 . $M \pm SEM$, $n=4$. * – $p < 0,05$ по сравнению с ЭК 20% O_2 , ** – $p < 0,05$ по сравнению с ЭК 5% O_2 , [#] – $p < 0,05$ по сравнению с ЭК ФНО 20% O_2 , ^{##} – $p < 0,05$ по сравнению с ЭК ФНО 5% O_2 .

Таблица 4. Изменение транскрипции *IL6*, *IL8* в МСК после сокультивирования с ЭК при 20% и 5% O_2

Гены	20% O_2		5% O_2	
	МСК+ЭК	МСК+ЭК ФНО	МСК+ЭК	МСК+ЭК ФНО
<i>IL8</i>	1,6±0,2	7,1±1,3*	2,5±0,4**	6,4±0,9**
<i>IL6</i>	3,8±0,3*	6,5±0,6*	5,8±0,4**	6,3±1,0**

Показана кратность изменений по сравнению с МСК 20% O_2 . $M \pm SEM$, $n=4$. * – $p < 0,05$ по сравнению с МСК 20% O_2 , ** – $p < 0,05$ по сравнению с МСК 5% O_2 .

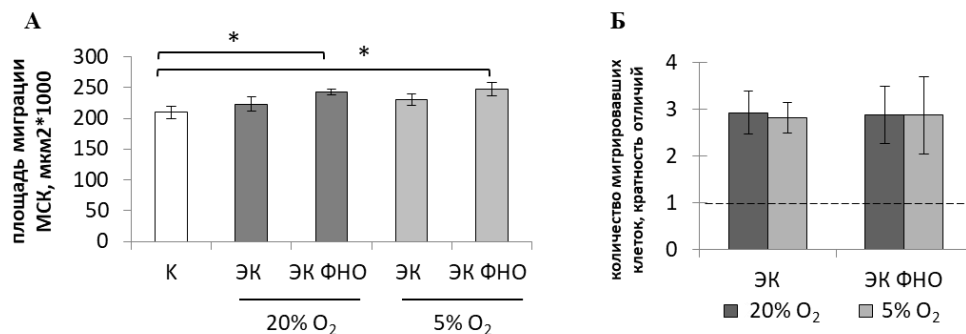


Рисунок 4. Миграция МСК. А - ненаправленная миграция МСК в модели «рана». Б – направленная миграция в системе трансвелл. К/пунктир - миграция МСК в ростовой среде. ЭК – миграция МСК в среде от ЭК, ЭК ФНО – миграция МСК в среде от активированных ЭК. $M \pm SD$, $n=3$. * – $p < 0,05$.

Таким образом, при 20% и 5% O₂ в результате взаимодействия с интактными и активированными ЭК наблюдался сдвиг транскрипционного профиля МСК в сторону коммитирования. Увеличивалась экспрессия белков, опосредующих процессы миграции стромальных клеток, возрастала подвижность МСК в кондиционированной среде от ЭК, что свидетельствует о мобилизирующем действии эндотелия на МСК. При этом паракринная активность клеток увеличивалась за счет индукции транскрипции *IL6*, *IL8* в МСК и ЭК и возрастания суммарной продукции IL-6, IL-8 при сокультивировании.

Взаимодействие МСК и ЭК при гипоксическом стрессе

В организме эндотелий и МСК взаимодействуют в широком диапазоне концентраций O₂ (1-15% O₂), что обусловлено разным уровнем кровоснабжения тканей в зависимости от органа (Ivanovic et al., 2009; Naque et al., 2013). С учетом применения МСК для лечения ишемических заболеваний необходимо понимать, какой эффект окажет значительная депривация O₂ (менее 1%) на взаимодействие МСК и ЭК.

Характеристика уровня коммитирования и экспрессии молекул адгезии МСК

Гипоксический стресс (0.1% O₂, 24 ч) не влиял на характер экспрессии стромальных маркеров и клоногенную активность МСК после сокультивирования с ЭК по сравнению с 5% O₂ (табл. 5). На транскрипционном уровне гипоксический стресс отменял увеличение экспрессии *OCT4* и *RUNX2*, наблюдаемое после сокультивирования с интактными и активированными ЭК при 5% O₂. Взаимодействие с интактным эндотелием вызывало снижение транскрипции генов стволовости *NANOG* и *SOX2* и гена-регулятора хондрогенной дифференцировки *SOX9*. Сокультивирование с активированными ЭК при 0.1% O₂, помимо описанных выше изменений, также вызывало снижение мРНК *PPARγ* (табл. 6).

Таким образом, взаимодействие с эндотелием в условиях гипоксического стресса не повлияло на клоногенный потенциал и стромальный иммунофенотип МСК, хотя наблюдалось снижение экспрессии не только *NANOG*, но и *SOX2*, что может

свидетельствовать о большем сдвиге транскрипционного профиля клеток в сторону коммитирования (Liu et al., 2015, Swistowska et al., 2019). При этом наблюдаемая нами отмена увеличения транскрипции *RUNX2* после взаимодействия может быть связана с негативным влиянием повышения уровня АФК в клетках при действии гипоксического стресса (0.1% O₂) на транскрипцию этого фактора (Salim et al., 2004; Atashi et al., 2015).

Таблица 5. Характеристика экспрессии стромальных маркеров МСК до и после взаимодействия с эндотелием в условиях короткого гипоксического стресса (0.1% O₂, 24 ч)

Схема культивирования	CD90	CD73	CD105	CD44	CD45	КОЕ-ф
МСК	98,1 ± 0,9	99,5 ± 0,5	98,9 ± 0,8	100,0	0,9 ± 0,1	173 ± 80
МСК+ЭК	95,7 ± 1,5	96,9 ± 1,3	97,0 ± 2,0	99,0±1,0	1,0 ± 0,1	195±100
МСК+ЭК ФНО	95,6 ± 2,8	96,8 ± 1,5	98,8 ± 0,5	100,0	0,9 ± 0,5	220 ± 100

МСК – монокультура МСК, МСК+ЭК / МСК+ЭК ФНО – МСК после сокультивирования с ЭК/ЭК ФНО. Указана доля положительно окрашенных клеток (%). Для КОЕ-ф указано количество колоний на 1000 клеток. M±SD, n=3.

Таблица 6. Изменение экспрессии генов «стволовости» и регуляторов дифференцировки в МСК после взаимодействия с эндотелием в условиях гипоксического стресса (0.1% O₂, 24 ч)

Схема культивирования	<i>OCT4</i>	<i>SOX2</i>	<i>NANOG</i>	<i>RUNX2</i>	<i>SOX9</i>	<i>PPARγ</i>
МСК+ЭК	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1[#]	0,7± 0,2	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1[#]	1,0 ± 0,4
МСК+ЭК ФНО	1,0 ± 0,2	0,3 ± 0,1[#]	0,5 ± 0,3[#]	1,0 ± 0,2	0,5 ± 0,2[#]	0,6 ± 0,1[#]

МСК – монокультура МСК, МСК+ЭК – МСК после 24 ч сокультивирования с ЭК, МСК+ЭК ФНО – МСК после 24 ч сокультивирования с активированными ФНО-α ЭК. Данные представлены как кратность изменений по сравнению с монокультурой МСК при 0.1% O₂. M±SEM, n=3. # - p<0,05 по сравнению с монокультурой МСК 0.1% O₂, 24 ч.

После краткосрочного сокультивирования с интактными и активированными ЭК в МСК возрастала экспрессия интегрин α1, αVβ3 и снижалась экспрессия интегрин α4 и N-кадгерина как при 5%, так и при 0.1% O₂. После взаимодействия с активированным эндотелием также наблюдалось увеличение доли МСК, экспрессирующих ICAM-1, и более выраженное увеличение экспрессии интегрин αVβ3 (рис. 5), причем в условиях гипоксического стресса плотность экспрессии ICAM-1 (средняя интенсивность флюоресценции) на поверхности клеток была выше. Можно сделать вывод, что короткий гипоксический стресс (0.1% O₂) практически не влияет на характер изменений экспрессии молекул интегрин α1, α4, αVβ3 и N-кадгерина в МСК после взаимодействия с эндотелиальными клетками, однако потенцирует влияние активированного эндотелия на экспрессию ICAM-1 в стромальных клетках. Возможно более выраженная индукция ICAM-1 в МСК связана с накоплением АФК при 0.1% O₂, что ведет к дополнительной активации

сигнального пути NFκB за счет усиления протеасомной деградации его цитоплазматического ингибитора (IκB) (Zünd et al., 1997).

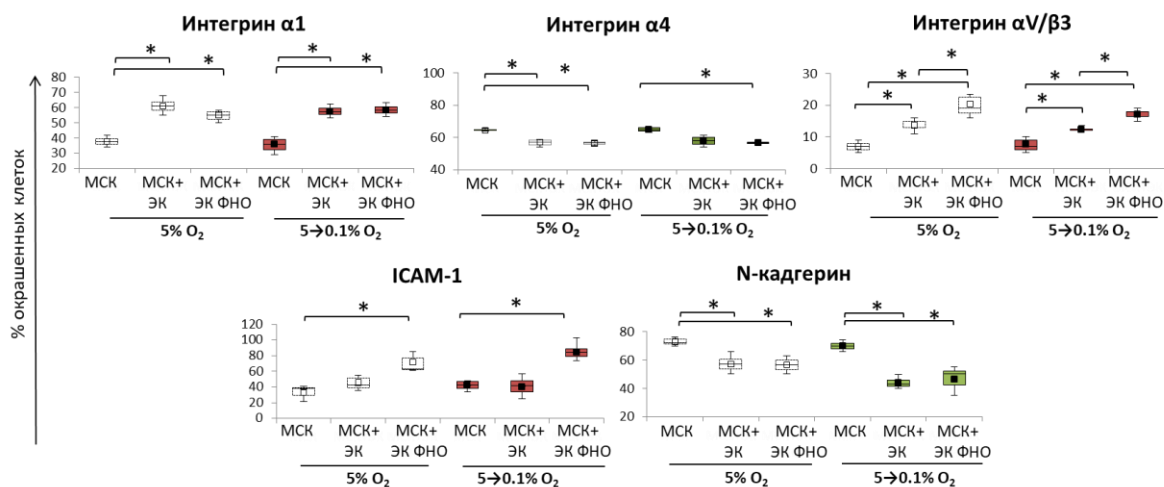


Рисунок 5. Экспрессия молекул межклеточных контактов в МСК после взаимодействия с интактными и ФНО-α активированными ЭК. Представлено среднее значение доли окрашенных клеток, медиана, межквартильный разброс, максимальные и минимальные значения, n=3. *- p<0,05.

Паракринная регуляция при взаимодействии МСК и ЭК при гипоксическом стрессе

Сокультивирование МСК и ЭК при 0.1% O₂ приводило к увеличению концентрации цитокинов IL-6, IL-8 и MCP-1 в среде по сравнению с монокультурами МСК и ЭК. При этом концентрация MCP-1 при сокультивировании соответствовала сумме концентраций этого цитокина в среде от монокультур МСК и ЭК, а концентрация IL-6 и IL-8 значительно превышала сумму концентраций этих цитокинов в среде от монокультур. Стоит отметить, что при 0.1% O₂ концентрация IL-6 в среде после взаимодействия МСК и неактивированных ЭК была достоверно ниже, а IL-8 – достоверно выше по сравнению с таковой при 5% O₂. Концентрации IL-6 и IL-8 в сокультуре МСК и активированных ЭК при 5% O₂ и 0.1% O₂ не отличались (рис. 6). Анализ транскрипционной активности генов цитокинов показал, что в условиях гипоксического стресса (0.1% O₂) увеличение экспрессии *IL6* в МСК, интактных и активированных ЭК после взаимодействия была менее выражена, а возрастание экспрессии *IL8* более выражено по сравнению с «физиологической» гипоксией (5% O₂) (табл. 7). Таким образом, гипоксический стресс изменял характер взаимодействия МСК и интактных ЭК, увеличивая суммарную продукцию IL-8 и индукцию экспрессии *IL8*. При этом ослаблялся стимулирующий эффект сокультивирования на продукцию IL-6 и транскрипцию гена *IL6*. После взаимодействия МСК и активированных ЭК при 0.1% O₂ такого эффекта не наблюдалось, что может свидетельствовать о ведущей роли самого взаимодействия с ЭК по сравнению с депривацией O₂ на регуляцию паракринной активности клеток.

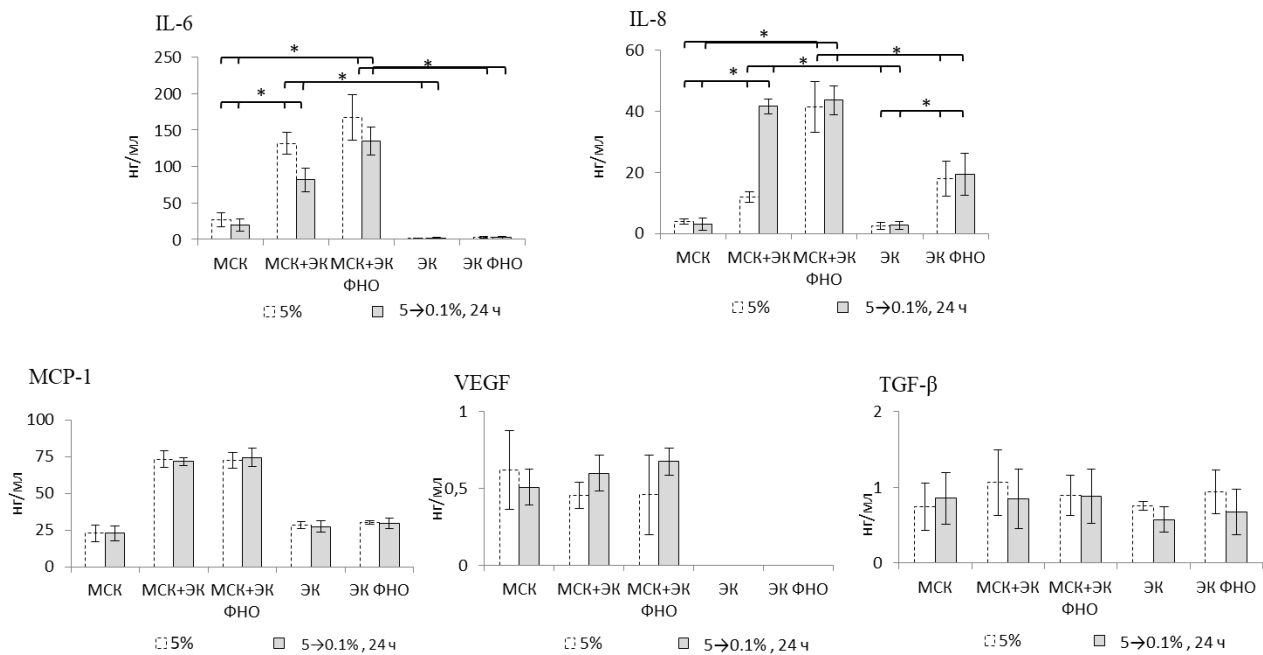


Рисунок 6. Содержание растворимых медиаторов в кондиционированной среде от моно- и сокультуры МСК и ЭК при пониженном содержании O_2 . $M \pm SD$, $n=4$. * – $p < 0,05$.

Таблица 7. Изменение транскрипции *IL6*, *IL8* в ЭК и МСК после сокультивирования при 0.1% O_2

Гены	ЭК+МСК	ЭК ФНО	ЭК ФНО+МСК	МСК+ЭК	МСК+ЭК ФНО
<i>IL8</i>	11,7±1,9*	12,9±1,2*	18,6±1,2**	9,7±1,0[#]	11,9±1,9[#]
<i>IL6</i>	4,4±0,6*	4,3±0,2*	4,7±0,9	3,1±0,3[#]	3,9±0,4[#]

Указана кратность изменений по сравнению с ЭК 20% O_2 и МСК 20% O_2 . $M \pm SEM$, $n=4$.

* – $p < 0,05$ по сравнению с ЭК 0.1% O_2 , ** – $p < 0,05$ по сравнению с ЭК ФНО 0.1% O_2 ,

[#] – $p < 0,05$ по сравнению с МСК 0.1% O_2 .

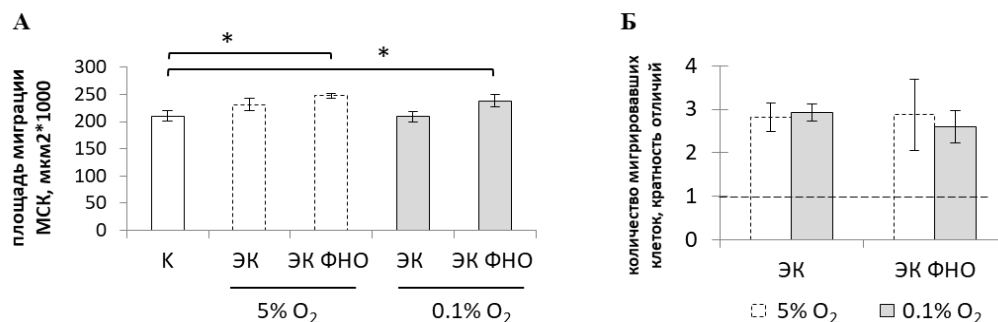


Рисунок 7. Миграция МСК. А - ненаправленная миграция МСК в модели «рана». Б – направленная миграция в системе трансвелл, пунктиром обозначена миграция МСК в культуральной среде. К/пунктир - миграция МСК в ростовой среде. ЭК – миграция МСК в кондиционированной среде от ЭК, ЭК ФНО – миграция МСК в кондиционированной среде от активированных ЭК. $M \pm SD$, $n=3$. * – $p < 0,05$.

Известно, что МСК продуцируют VEGF, который как показано, усиливает экспрессию *IL6*, *IL8* в других клетках (Hao et al., 2009). С другой стороны, интактный эндотелий синтезирует *IL-1α*, который может вызывать усиление продукции *IL-6* и *IL-8* в соседних клетках (Di Paolo et al., 2016). Гипоксия и активация провоспалительными цитокинами оказывают стимулирующее действие на синтез *IL-1α* в ЭК (Mai et al., 2013), что может объяснять наблюдаемую нами индукцию экспрессии *IL-8* в клетках при гипоксическом стрессе и при взаимодействии с активированными ФНО-α ЭК. Гипоксический стресс (0.1% O₂) по сравнению с «физиологической» гипоксией (5% O₂) не влиял на способность ЭК паракринно стимулировать подвижность МСК. Кондиционированная среда от интактных ЭК вызывала возрастание скорости направленной миграции МСК, а среда от активированного эндотелия увеличивала скорость ненаправленной и направленной миграции МСК (рис. 7, А, Б) по сравнению с ростовой средой. Следовательно, мобилизирующее действие эндотелия на МСК не менялось в зависимости от концентрации O₂, но возрастало при провоспалительной активации ЭК.

Влияние МСК на провоспалительную активацию ЭК при пониженном содержании O₂

Активация эндотелия вследствие депривации O₂ и действие провоспалительных факторов выступает сигналом для адгезии и миграции клеток иммунной системы, а также способствует развитию окислительного стресса, нарушающего нормальное функционирование клеток, что негативно влияет на процессы репарации и является элементом патогенеза многих заболеваний (Min et al., 2005; Kryczka et al., 2015; de Oliveira et al., 2016; Al-Soudi et al., 2017). Для оценки эффектов МСК на активацию эндотелия при 5% O₂, что близко к физиологическим условиям, и при 0.1% O₂, как при ишемических заболеваниях, мы изучили влияние взаимодействия на экспрессию молекул адгезии, способность адгезировать лейкоциты, и уровень окислительного стресса (продукция NO) в эндотелии.

Активность NO-синтазы в ЭК

Методом проточной цитофлуориметрии показано, что воздействие ФНО-α при 5% O₂ и гипоксический стресс (0.1% O₂) достоверно повышали продукцию NO в ЭК, однако активация на фоне гипоксического стресса не вызывала дополнительного увеличения уровня NO (рис. 8, А). Депривация O₂ (0.1%), но не активация ФНО-α, индуцировало транскрипцию гена эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*) (рис. 10, Б). Взаимодействие с МСК частично отменяло повышение уровня NO в эндотелии после депривации O₂ и активации, а также снижало индуцированную гипоксическим стрессом транскрипцию *NOS3* в эндотелиальных клетках, что соотносится с данными проточной цитометрии (рис. 8, А, Б). В литературе отсутствуют данные относительно эффектов МСК на активность NO-синтазы в эндотелии, однако показано, что перциты, из популяции которых происходят МСК, продуцируют растворимые факторы, снижающие продукцию NO в эндотелии (Martin et al., 2000).

Экспрессия молекул адгезии и регуляция адгезивных свойств ЭК

Методом проточной цитофлуориметрии показано, что провоспалительная стимуляция увеличивала долю эндотелиальных клеток, экспрессирующих ICAM-1 и интегрин $\alpha 1$, а также среднюю интенсивность флюоресценции клеток, окрашенных соответствующими антителами. Сокультивирование с МСК не влияло на экспрессию интегрин $\alpha 1$, VE-кадгерина, ICAM-1, VCAM-1, E-селектина и не отменяло эффектов активации (табл. 8).

Также мы проанализировали, могут ли активированные IFN γ МСК выступать в роли провоспалительного стимула для ЭК при «физиологическом» уровне O₂ (5% O₂). Взаимодействие с активированными МСК приводило к возрастанию экспрессии ICAM-1 в 2,9 раз в ЭК, при этом экспрессия VCAM-1 и E-селектина не изменялись (табл. 9).

Таблица 8. Экспрессия молекул адгезии на ЭК

Условия	Схема	VE-кадгерин %	ICAM-1		VCAM-1 %	E-селектин %	Интегрин $\alpha 1$	
			%	СИФ, *10 ³			%	СИФ, *10 ³
5% O ₂ , 24 ч	ЭК	90,6±10,6	59,9±8,6	41±10	43,3±6,1	46,1±0,8	38,9±13,9	14±3
	ЭК+МСК	89,5±8,5	60,8±10,8	52±14	42,2±11,2	39,8±5,7	33,6±5,5	13±1
	ЭК ФНО	91,7±9,1	99,9±0,1[#]	417±73[#]	36,8±9,4	42,8±5,7	52,7±10,1	20±1[#]
	ЭК ФНО + МСК	90,3±5,4	99,5±0,6	489±72	38,3±12,3	48,0±4,0	46,4±10,6	21±3
0.1% O ₂ , 24 ч	ЭК	87,5±10,9	61,9±4,9	46±11	47,6±12,3	40,4±1,5	38,3±7,8	15±3
	ЭК+МСК	89,0±9,0	69,7±10,4	60±10	41,0±13,4	37,2±1,0	33,7±7,7	15±0,1
	ЭК ФНО	94,6±8,0	99,9±0,1^γ	578±90^γ	55,0±12,9	41,9±10,8	60,1±6,9^γ	21±1^γ
	ЭК ФНО + МСК	92,8±6,9	99,7±0,4	609±100	50,4±18,7	40,8±6,3	48,2±5,8	20±1

ЭК – монокультура ЭК, ЭК ФНО – монокультура активированных ФНО- α ЭК, ЭК+МСК/ЭК ФНО+МСК – ЭК/ЭК ФНО после 24 ч сокультивирования с МСК. M±SD, n=3. * - p<0,05 по сравнению с ЭК 20% O₂, [#] - p<0,05 по сравнению с ЭК 5% O₂, ^γ - p<0,05 по сравнению с ЭК 0.1% O₂. СИФ – средняя интенсивность флюоресценции окрашенных клеток.

Таблица 9. Экспрессия молекул адгезии на ЭК после сокультивирования с активированными МСК при 5% O₂ (доля окрашенных клеток)

Схема культивирования	ICAM-1	VCAM-1	E-селектин
ЭК	18,1±4,8	50,5±3,5	43,9±4,3
ЭК+МСК IFN γ	52,8±0,1*	54,4±4,6	48,1±5,7

M±SD, n=3. * - p<0,05 по сравнению с монокультурой ЭК.

Таким образом, при взаимодействии интактные МСК практически не влияли на экспрессию молекул адгезии в эндотелиальных клетках, однако индукция ICAM-1 может

свидетельствовать о переходе ЭК в активированное состояние. Показано, что праймирование МСК стимулирует продукцию растворимых факторов с плеiotропным действием (IL-6, MCP-1) и провоспалительных цитокинов, например IL-1 β (Liu et al., 2017; Song et al., 2019). Следовательно, изменение паракринной активности праймированных МСК может вызывать активацию интактных эндотелиальных клеток при взаимодействии.

Активация ЭК увеличивала их способность адгезировать МНК в 8,4 раза при 5% O₂ и в 9,3 раз при 0.1% O₂. По сравнению с монокультурой активированных ЭК иммунные клетки в меньшей степени адгезировали к сокультуре. Гипоксический стресс (0.1% O₂) усиливал адгезивные свойства ЭК по сравнению с «физиологической» гипоксией (5% O₂), как в моно-, так и в сокультуре с МСК (рис. 8, В).

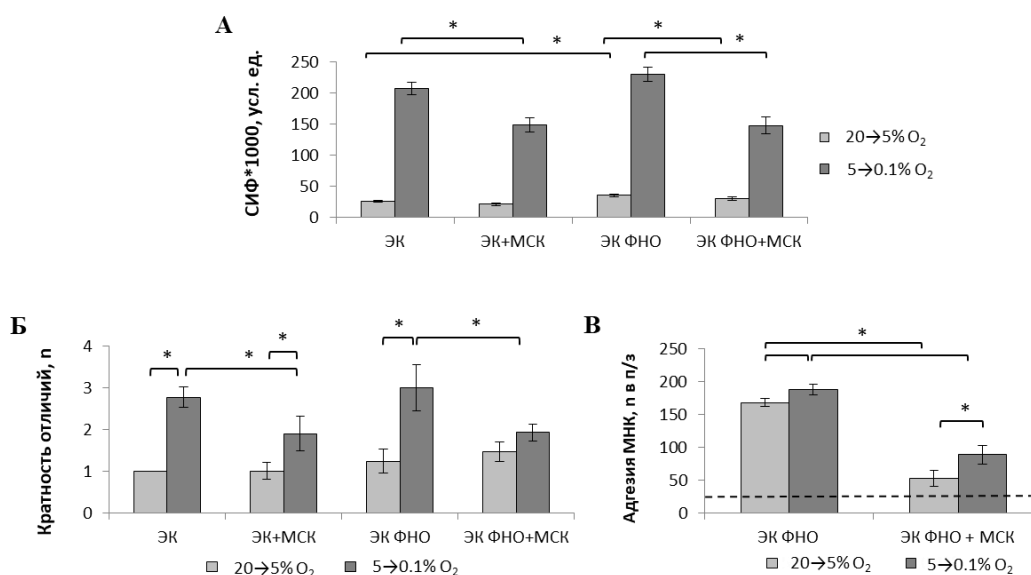


Рисунок 8. Изменение активности NO-синтазы и адгезивных свойств эндотелия после взаимодействия с МСК. А – продукция NO в ЭК; Б – экспрессия NOS3 в ЭК; В – адгезия мононуклеаров периферической крови к активированному эндотелию в моно- и сокультуре, пунктиром обозначена адгезия МНК к неактивированным ЭК. M \pm SD, n=3. * - p<0,05.

Ранее было показано, что IL-6, продуцируемый МСК, способствует снижению адгезии иммунных клеток к активированному эндотелию при сокультивировании в стандартных условиях (20% O₂) (Liu et al., 2011, 2013; Munir et al., 2016). В наших экспериментах сокультивирование вызывало увеличение продукции IL-6 обоими типами клеток, и приводило к снижению адгезивных свойств активированного эндотелия, однако при 0.1% O₂ эффект был менее выражен, что может быть связано с более высоким уровнем экспрессии ICAM-1 (молекула адгезии, которая участвует во взаимодействии ЭК и мононуклеаров периферической крови) в этих условиях по сравнению с культивированием при 5% O₂.

Таким образом, активация ФНО- α повышала экспрессию интегрина α 1, ICAM-1, продукцию NO и адгезивные свойства активированных ЭК. Гипоксический стресс вызывал

увеличение уровня NO и экспрессию NOS3 в интактных и активированных ЭК, а также усиливал адгезивные свойства активированного эндотелия в моно- и сокультуре. В то же время МСК смягчали влияние гипоксического стресса и активации на эндотелий.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что аллогенные интактные или активированные ЭК оказывали мобилизирующее действие на МСК, стимулировали их паракринную активность. После взаимодействия с активированным ФНО-α эндотелием изменения в МСК, как правило, были более выражены. МСК, помимо индукции паракринной активности эндотелия, смягчали эффекты депривации O₂ (↓NO, ↓NOS3) и провоспалительной активации (↓NO, ↓адгезия иммунных клеток). Гипоксический стресс (0.1% O₂) по сравнению с «физиологической» гипоксией (5% O₂) повышал адгезивные свойства активированных ЭК в моно- и сокультуре, способствовал еще большему сдвигу транскрипционного профиля МСК в сторону коммитирования. В то же время наблюдались усиление транскрипции IL8 и ослабление экспрессии IL6 в МСК и эндотелии после взаимодействия. Таким образом, взаимодействие стимулирует функциональную активность МСК и ЭК, важную для репаративного ремоделирования тканей при различных заболеваниях. Однако значительная депривация O₂ может ослаблять позитивные эффекты взаимодействия как для МСК, так и для эндотелия (рис. 9).



Рисунок 9. Эффекты взаимодействия МСК и ЭК *in vitro* при пониженном содержании кислорода и провоспалительной активации

Выводы

1. МСК сохраняют свой клоногенный потенциал и стромальный иммунофенотип после краткосрочного сокультивирования с интактными и активированными эндотелиальными клетками при различной концентрации O_2 (5%, 0.1% O_2).
2. Интактные и ФНО-активированные эндотелиальные клетки способствуют сдвигу профиля экспрессии генов стволовости/коммитирования в МСК в сторону коммитирования. При «физиологической» гипоксии (5% O_2) обнаружено снижение экспрессии *NANOG*, *SOX9* и увеличение *OCT4* и *RUNX2* независимо от активации эндотелия. При коротком гипоксическом стрессе (0.1% O_2 , 24 ч) после взаимодействия с интактными эндотелиальными клетками выявлено снижение транскрипции *SOX2*, *SOX9*, а в присутствии ФНО-активированного эндотелия дополнительно подавляется экспрессия *NANOG* и *PPAR γ* .
3. Взаимодействие МСК с эндотелием при различном содержании O_2 (5%, 0.1% O_2) приводит к изменению экспрессии молекул адгезии, участвующих в образовании гетеро- и гомотипических межклеточных контактов и контактов с матриксом. Активация эндотелия стимулирует увеличение экспрессии молекулы адгезии ICAM-1 и интегрина $\alpha V\beta 3$ в МСК, при этом гипоксический стресс потенцирует этот эффект в отношении ICAM-1.
4. Интактные и ФНО-активированные эндотелиальные клетки паракринно стимулируют ненаправленную миграцию МСК. Направленная миграция МСК увеличивается только в присутствии кондиционированной среды от активированных эндотелиальных клеток.
5. Гипоксический стресс (0.1% O_2 , 24 ч) ослабляет стимулирующий эффект межклеточного взаимодействия на транскрипцию и продукцию IL-6, одновременно усиливая транскрипцию и продукцию IL-8 в МСК, интактных и ФНО-активированных эндотелиальных клетках.
6. Гипоксический стресс (0.1% O_2 , 24 ч) вызывает признаки провоспалительной реакции в интактных и потенцирует их в ФНО-активированных эндотелиальных клетках, что выражается в увеличении продукции NO и транскрипции *NOS3*, а также в усилении адгезивных свойств эндотелия при активации.
7. После взаимодействия с МСК признаки активации эндотелия менее выражены. Наблюдается снижение стимулированной ФНО- α продукции NO при 5% O_2 и базальной и стимулированной продукции NO и экспрессии *NOS3* при 0.1% O_2 , а также уменьшение адгезии мононуклеаров периферической крови к активированному эндотелию при различной концентрации O_2 (5%, 0.1% O_2). При этом гипоксический стресс ослабляет способность МСК снижать адгезивные свойства активированного эндотелия.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

Статьи:

1. **О.В. Жидкова**, Е.Р. Андреева, Л.Б. Буравкова. Экспрессия адгезионных молекул в активированном эндотелии после взаимодействия с мезенхимальными стромальными клетками. // БЭБиМ. – 2017. - Т. 164. - №10. - С. 449-452.
2. Е.Н. Князев, Д.В. Мальцева, А.А. Захарянц, Г.С. Захарова, **О.В. Жидкова**, А.А. Полозников. Повышение экспрессии генов транспортных белков, вызванное ФНО- α в клетках HUVEC, ассоциировано с повышением экспрессии генов транскрипционных факторов неканонического пути NF-kB RELB и NFkB2. // БЭБиМ. – 2017. - Т. 164. - №12. - С. 728-733.
3. **О.В. Жидкова**, Е.Р. Андреева, Л.Б. Буравкова. Эндотелиальные клетки модулируют дифференцировочный потенциал и подвижность мезенхимных стромальных клеток. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2018. - №1. - С. 15-19.
4. Andreeva ER, Udartseva OO, **Zhidkova OV**, Buravkov SV, Ezdakova MI, Buravkova LB. IFN-gamma priming of adipose-derived stromal cells at "physiological" hypoxia. // J Cell Physiol. – 2018. - V. 233(2). - P. 1535-1547.

Тезисы докладов:

1. **О.В. Жидкова**, Е.Р. Андреева, Л.Б. Буравкова. «Влияние гипоксического стресса и провоспалительной активации на свойства МСК». Тезисы V Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, 2016 г., стр. 81-82.
2. **О.В. Жидкова**, М.И. Ездакова. Оценка уровня короткоживущих активных форм кислорода в активированных эндотелиальных клетках при взаимодействии с мезенхимальными стромальными клетками. Материалы конференции с международным участием «Клеточная биология: проблемы и перспективы», 2017 г., С. 61-62.
3. **О.В. Жидкова**, М.И. Ездакова Модуляция функциональных свойств мезенхимальных стромальных клеток при взаимодействии с эндотелием сосудов. Сборник тезисов XVI Конференции молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённой 60-летию запуска первого искусственного спутника Земли, 2017 г., С.10-11.
4. **О.В. Жидкова**, М.И. Ездакова, Е.Р. Андреева, Л.Б. Буравкова. Контактное взаимодействие с эндотелиальными клетками модулирует ангиогенный потенциал мезенхимальных стромальных клеток. Журнал «Новости медико-биологических наук», 2017 г., Т.16, № 1, С. 40.
5. **О.В. Жидкова**, М.И. Ездакова. Эндотелиальные клетки как активатор миграционной активности мезенхимальных стромальных клеток. «Гены и Клетки» Т. XII, № 3, 2017, С. 93-94.
6. **O.V. Zhidkova**, E.R. Andreeva, L.B. Buravkova. Paracrine activity of TNF- α -stimulated endothelial cells is enhanced upon interaction with mesenchymal stromal cells. Материалы международной конференции «Cell Technologies At The Edge: From Research To Practice (CTERP) «Translational Research In Cell Therapy», 2018 г., С. 160.
7. **О.В. Жидкова**. Модуляция функциональных свойств мезенхимальных стромальных предшественников при взаимодействии с эндотелиальными клеткам. Материалы XVII Конференции молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённой 100-летию со дня рождения академика О.Г. Газенко, 2018 г., С. 47-50.