

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- $\alpha$  активированных ЭК на МСК. Показано, что интактный и активированный эндотелий в равной степени модулирует экспрессию молекул межклеточного взаимодействия (интегринов  $\alpha1$ ,  $\alpha4$ , 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 O<sub>2</sub> на репаративные свойства МСК.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. После взаимодействия с интактными и ФНО-активированными эндотелиальными клетками в условиях «физиологической» гипоксии (5% O<sub>2</sub>) 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  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ V/ $\beta$ 3, N-кадгерина, ICAM-1), причем активированные эндотелиальные клетки оказывают более выраженный эффект на миграционную активность и экспрессию интегрин  $\alpha$ V/ $\beta$ 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 O<sub>2</sub>, подавляя продукцию оксида азота и способность эндотелиальных клеток адгезировать мононуклеары периферической крови.
3. Краткосрочный гипоксический стресс (0.1% O<sub>2</sub>, 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% O<sub>2</sub>, 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 ( $\alpha$ -MEM, 10% ФТС, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 100% влажность) при 20% и 5% O<sub>2</sub>. 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% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>). 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 ( $\text{NO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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  $2 \times 10^4$  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 $\beta$  (R&D Systems, США) согласно инструкциям производителей.

Для оценки адгезивных свойств эндотелия в монокультуру активированных ФНО- $\alpha$  ЭК и сокультуру ЭК ФНО- $\alpha$ +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- $\alpha$  в группе интактных клеток и с добавлением ФНО- $\alpha$  (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  $\text{O}_2$  (20%  $\text{O}_2$ ), в условиях «физиологической» гипоксии (5%  $\text{O}_2$ )

и короткого гипоксического стресса (0.1% O<sub>2</sub>). 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).

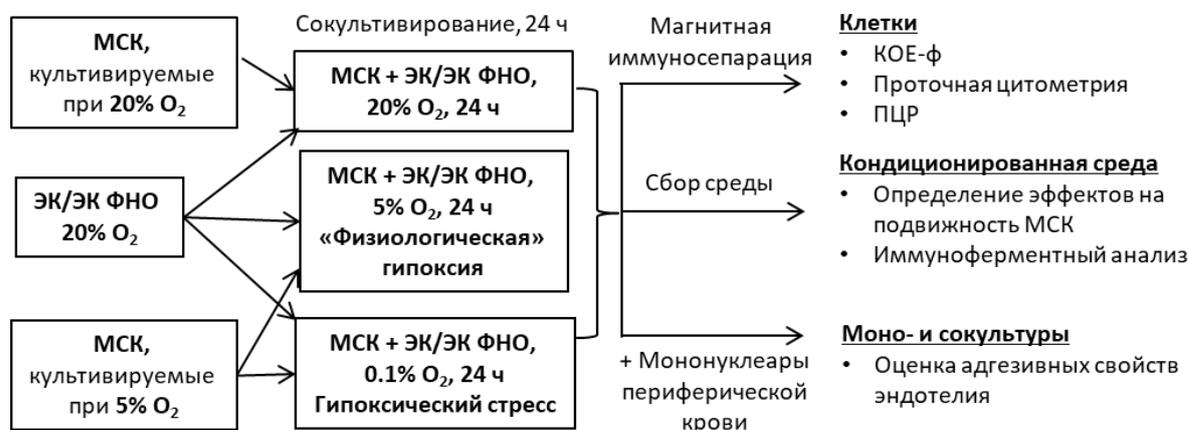


Рисунок 1. Схема эксперимента

## Результаты исследования

### Характеристика МСК и ЭК в монокультуре

Прежде чем проводить оценку влияния депривации O<sub>2</sub> разной степени выраженности и провоспалительной активации на взаимодействие клеток, мы изучили эффекты этих факторов микроокружения на МСК и эндотелий в монокультуре.

#### *Влияние депривации O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub> также не оказывало влияния на эти параметры.

Культивирование при 5% O<sub>2</sub> способствовало повышению клоногенной активности, транскрипции *OCT4* и *RUNX2* и снижению уровня активных форм кислорода (АФК) в МСК по сравнению с 20% O<sub>2</sub>. Короткий гипоксический стресс индуцировал возрастание АФК более, чем в 2,5 раза, и отменял стимулирующее действие «физиологической» гипоксии (5% O<sub>2</sub>) на клоногенную активность МСК, при этом сохранялся высокий уровень мРНК *OCT4*. Обработка IFNγ МСК, культивируемых при 5% O<sub>2</sub>, 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% O<sub>2</sub> по сравнению со стандартными условиями культивирования (20% O<sub>2</sub>) (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% O<sub>2</sub>, может быть возрастание транскрипции *OCT4*. Гипоксический стресс (0.1% O<sub>2</sub>) индуцирует увеличение АФК в МСК, что может отменять позитивный эффект *OCT4* на пролиферацию клеток. IFN $\gamma$  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 O<sub>2</sub> и активации ФНО- $\alpha$ 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 O<sub>2</sub> (5% O<sub>2</sub> или 0.1% O<sub>2</sub>, 24 ч) не влияла на жизнеспособность и экспрессию эндотелиальных маркеров ЭК, однако при 0.1% O<sub>2</sub> наблюдалось повышение уровня АФК. При различном содержании O<sub>2</sub> активированные ФНО- $\alpha$  ЭК демонстрировали увеличение экспрессии ICAM-1 и уровня внутриклеточных АФК. Активированные ЭК при 20% и 0.1% O<sub>2</sub> характеризовались более высоким уровнем NO.

Следовательно, краткосрочный гипоксический стресс и активация ФНО- $\alpha$  увеличивала продукцию АФК и NO в эндотелии, что может указывать на развитие окислительного стресса. Активация ФНО- $\alpha$  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 O<sub>2</sub> и действие ФНО- $\alpha$  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 O<sub>2</sub> и добавлению ФНО- $\alpha$ .

#### **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% O<sub>2</sub> 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 $\gamma$* ) и хондрогенном (*SOX9*) направлении (табл. 2), показал, что после взаимодействия с интактными и активированными ЭК при 20% O<sub>2</sub> снижалась транскрипция *NANOG* и *SOX9*, а транскрипционная активность *RUNX2* возрастала. При 5% O<sub>2</sub> сокультивирование с интактными и активированными ЭК вызывало изменения в экспрессии *NANOG*, *SOX9* и *RUNX2*, подобные таковым при 20% O<sub>2</sub>, и увеличение мРНК *OCT4*.

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

O <sub>2</sub>	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. M±SD, n=3.

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

O <sub>2</sub>	Схема культивирования	<i>OCT4</i>	<i>SOX2</i>	<i>NANOG</i>	<i>RUNX2</i>	<i>SOX9</i>	<i>PPAR<math>\gamma</math></i>
20%	МСК+ЭК	0,9±0,3	0,9±0,4	<b>0,3±0,1*</b>	<b>3,9±1,6*</b>	<b>0,3±0,3*</b>	0,8±0,2
	МСК+ЭК ФНО	0,8±0,2	0,7±0,3	<b>0,4±0,1*</b>	<b>3,4±1,6*</b>	<b>0,3±0,2*</b>	0,7±0,2
5%	МСК+ЭК	<b>1,6±0,3**</b>	0,7±0,2	<b>0,4±0,1**</b>	<b>2,1±1,0**</b>	<b>0,6±0,1**</b>	0,6±0,4
	МСК+ЭК ФНО	<b>1,8±0,5**</b>	0,9±0,3	<b>0,5±0,1**</b>	<b>2,0±0,8**</b>	<b>0,4±0,1**</b>	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- $\alpha$  ЭК. Данные представлены как кратность изменений по сравнению с монокультурой МСК, M±SEM, n=3. \*- p<0,05 по сравнению с МСК 20% O<sub>2</sub>; \*\* - p<0,05 по сравнению с МСК 5% O<sub>2</sub>.

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% O<sub>2</sub> 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).

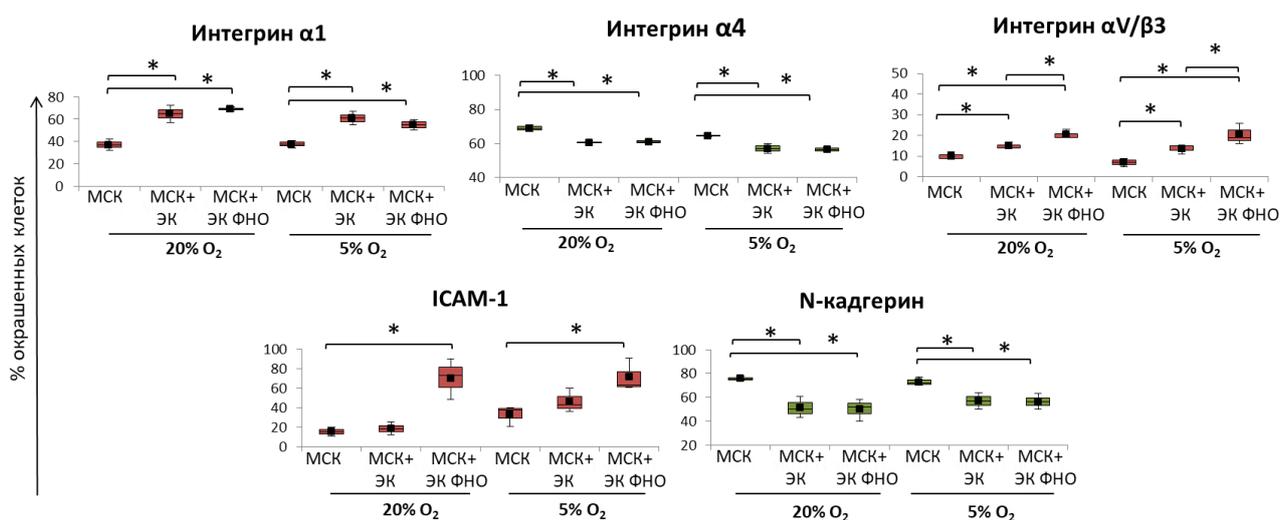


Рисунок 2. Экспрессия молекул межклеточных контактов на поверхности МСК после взаимодействия с интактными и ФНО- $\alpha$  активированными эндотелиальными клетками. Представлено среднее значение доли окрашенных клеток, медиана, межквартильный разброс, максимальные и минимальные значения, n=3. \*- p<0,05.

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- $\alpha$  медиаторов (в частности, IL-1 $\alpha$ ), 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 $\beta$ , VEGF в среде от моно- и сокультур методом иммуноферментного анализа. Концентрация MCP-1, VEGF, TGF $\beta$  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% O<sub>2</sub>. 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% O<sub>2</sub>, 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.

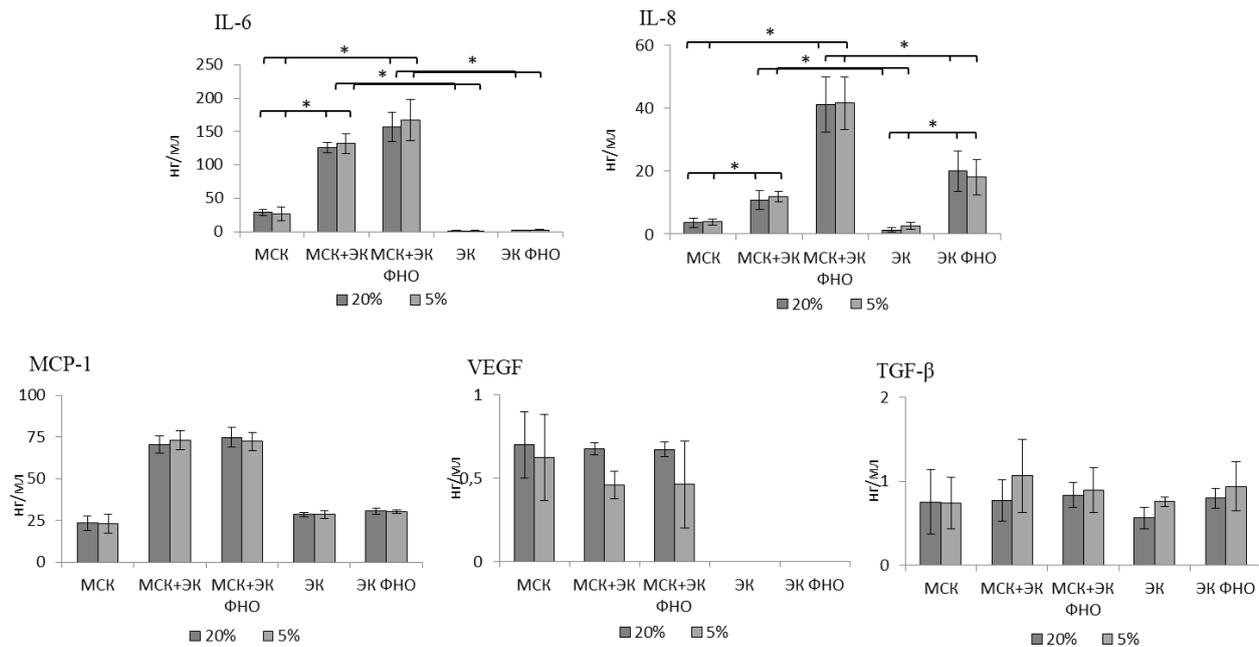


Рисунок 3. Содержание растворимых медиаторов в кондиционированной среде от моно- и сокультур МСК и ЭК. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n=4$ . \* –  $p < 0,05$ .

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>	<b>4,6±0,7*</b>	<b>3,9±1,2*</b>	<b>7,9±1,2**</b>	3,6±0,5 <sup>#</sup>	6,2±1,0 <sup>#</sup>	10,5±1,3 <sup>##</sup>
<i>IL6</i>	<b>7,1±0,9*</b>	<b>4,5±0,5*</b>	<b>7,1±0,6**</b>	7,4±0,5 <sup>#</sup>	5,1±0,8 <sup>#</sup>	8,5±0,7 <sup>##</sup>

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%  $O_2$ , <sup>#</sup> –  $p < 0,05$  по сравнению с ЭК ФНО 20%  $O_2$ , <sup>##</sup> –  $p < 0,05$  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	<b>7,1±1,3*</b>	<b>2,5±0,4**</b>	<b>6,4±0,9**</b>
<i>IL6</i>	<b>3,8±0,3*</b>	<b>6,5±0,6*</b>	<b>5,8±0,4**</b>	<b>6,3±1,0**</b>

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%  $O_2$ .

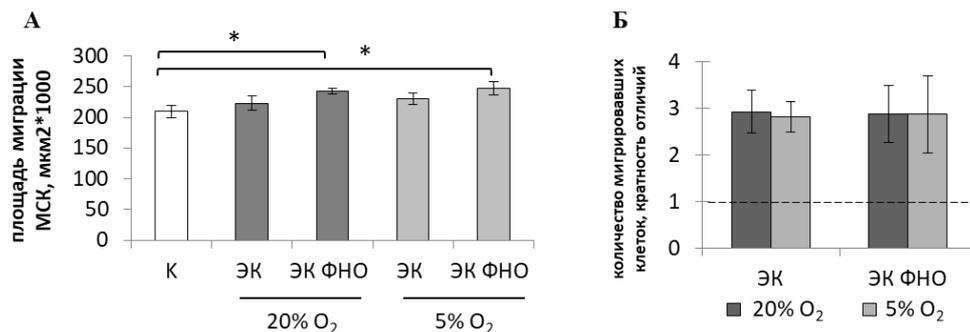


Рисунок 4. Миграция МСК. А - ненаправленная миграция МСК в модели «рана». Б – направленная миграция в системе трансвелл. К/пунктир - миграция МСК в ростовой среде. ЭК – миграция МСК в среде от ЭК, ЭК ФНО – миграция МСК в среде от активированных ЭК.  $M \pm SD$ ,  $n=3$ . \* –  $p < 0,05$ .

Таким образом, при 20% и 5% O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> (1-15% O<sub>2</sub>), 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 O<sub>2</sub> (менее 1%) на взаимодействие МСК и ЭК.

#### Характеристика уровня коммитирования и экспрессии молекул адгезии МСК

Гипоксический стресс (0.1% O<sub>2</sub>, 24 ч) не влиял на характер экспрессии стромальных маркеров и клоногенную активность МСК после сокультивирования с ЭК по сравнению с 5% O<sub>2</sub> (табл. 5). На транскрипционном уровне гипоксический стресс отменял увеличение экспрессии *OCT4* и *RUNX2*, наблюдаемое после сокультивирования с интактными и активированными ЭК при 5% O<sub>2</sub>. 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% O<sub>2</sub>, 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% O<sub>2</sub>) 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% O<sub>2</sub>, 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% O<sub>2</sub>, 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	<b>0,3 ± 0,1<sup>#</sup></b>	0,7± 0,2	0,8 ± 0,2	<b>0,4 ± 0,1<sup>#</sup></b>	1,0 ± 0,4
МСК+ЭК ФНО	1,0 ± 0,2	<b>0,3 ± 0,1<sup>#</sup></b>	<b>0,5 ± 0,3<sup>#</sup></b>	1,0 ± 0,2	<b>0,5 ± 0,2<sup>#</sup></b>	<b>0,6 ± 0,1<sup>#</sup></b>

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% O<sub>2</sub>. M±SEM, n=3. # - p<0,05 по сравнению с монокультурой МСК 0.1% O<sub>2</sub>, 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% O<sub>2</sub>. 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% O<sub>2</sub>) 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% O<sub>2</sub>, что ведет к дополнительной активации

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

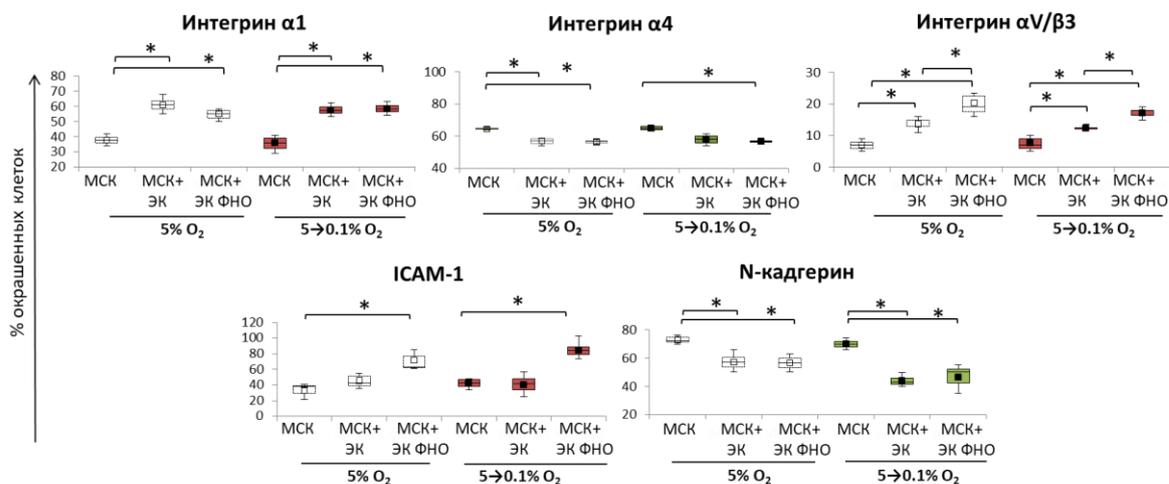


Рисунок 5. Экспрессия молекул межклеточных контактов в МСК после взаимодействия с интактными и ФНО-α активированными ЭК. Представлено среднее значение доли окрашенных клеток, медиана, межквартильный разброс, максимальные и минимальные значения, n=3. \*- p<0,05.

#### Паракринная регуляция при взаимодействии МСК и ЭК при гипоксическом стрессе

Сокультивирование МСК и ЭК при 0.1% O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub>. Концентрации IL-6 и IL-8 в сокультуре МСК и активированных ЭК при 5% O<sub>2</sub> и 0.1% O<sub>2</sub> не отличались (рис. 6). Анализ транскрипционной активности генов цитокинов показал, что в условиях гипоксического стресса (0.1% O<sub>2</sub>) 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% O<sub>2</sub>) (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% O<sub>2</sub> такого эффекта не наблюдалось, что может свидетельствовать о ведущей роли самого взаимодействия с ЭК по сравнению с депривацией O<sub>2</sub> на регуляцию паракринной активности клеток.

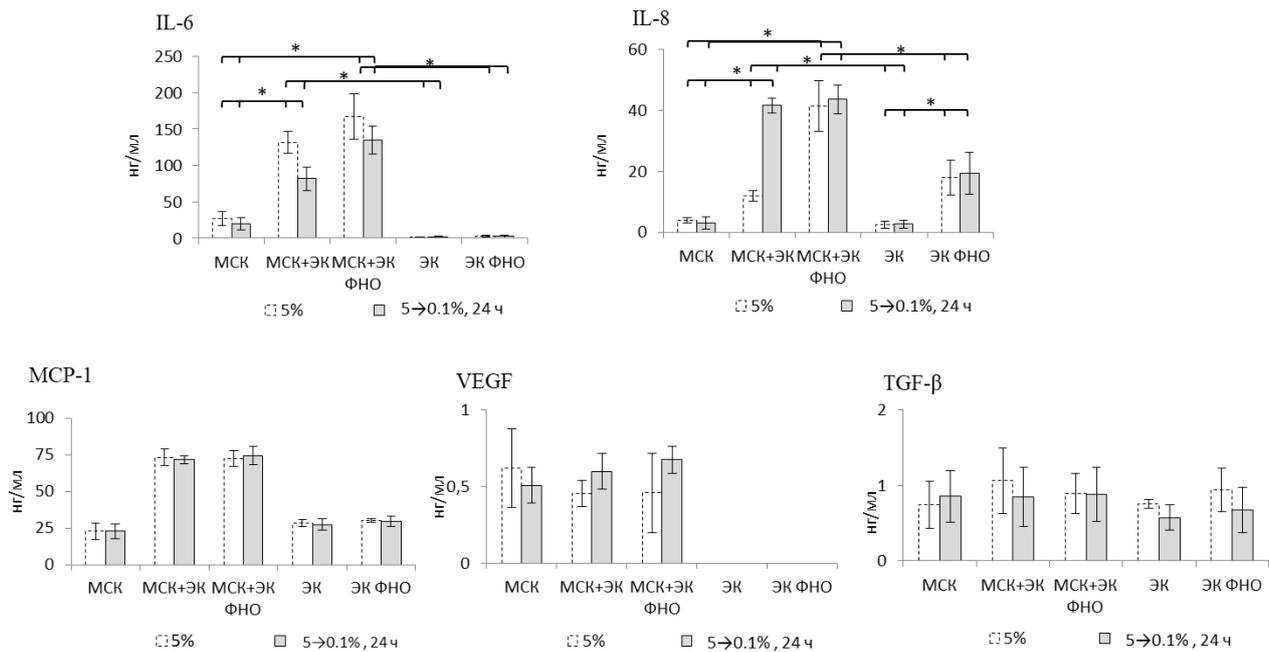


Рисунок 6. Содержание растворимых медиаторов в кондиционированной среде от моно- и сокультур МСК и ЭК при пониженном содержании  $O_2$ .  $M \pm SD$ ,  $n=4$ . \* –  $p < 0,05$ .

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>	<b>11,7±1,9*</b>	<b>12,9±1,2*</b>	<b>18,6±1,2**</b>	<b>9,7±1,0<sup>#</sup></b>	<b>11,9±1,9<sup>#</sup></b>
<i>IL6</i>	<b>4,4±0,6*</b>	<b>4,3±0,2*</b>	4,7±0,9	<b>3,1±0,3<sup>#</sup></b>	<b>3,9±0,4<sup>#</sup></b>

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%  $O_2$ ,

<sup>#</sup> –  $p < 0,05$  по сравнению с МСК 0.1%  $O_2$ .

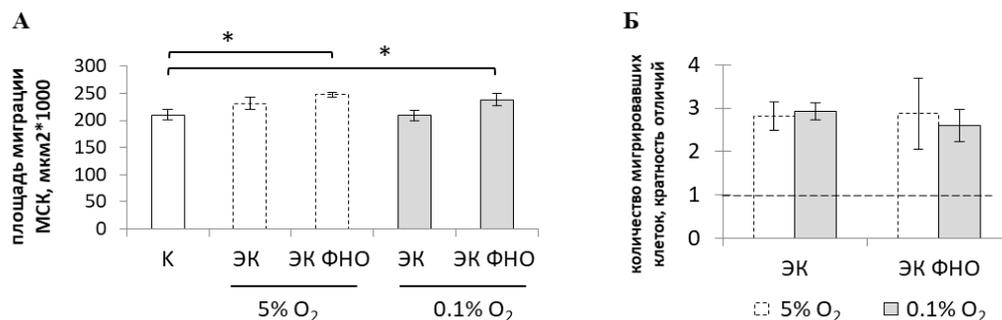


Рисунок 7. Миграция МСК. А - ненаправленная миграция МСК в модели «рана». Б – направленная миграция в системе трансвелл, пунктиром обозначена миграция МСК в культуральной среде. К/пунктир - миграция МСК в ростовой среде. ЭК – миграция МСК в кондиционированной среде от ЭК, ЭК ФНО – миграция МСК в кондиционированной 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% O<sub>2</sub>) по сравнению с «физиологической» гипоксией (5% O<sub>2</sub>) 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 O<sub>2</sub>, но возрастало при провоспалительной активации ЭК.

### **Влияние МСК на провоспалительную активацию ЭК при пониженном содержании O<sub>2</sub>**

Активация эндотелия вследствие депривации O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub>, что близко к физиологическим условиям, и при 0.1% O<sub>2</sub>, 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% O<sub>2</sub> и гипоксический стресс (0.1% O<sub>2</sub>) достоверно повышали продукцию NO в ЭК, однако активация на фоне гипоксического стресса не вызывала дополнительного увеличения уровня NO (рис. 8, А). Депривация O<sub>2</sub> (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 O<sub>2</sub> 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 $\gamma$  МСК выступать в роли провоспалительного стимула для ЭК при «физиологическом» уровне O<sub>2</sub> (5% O<sub>2</sub>). 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 <sup>3</sup>			%	СИФ, *10 <sup>3</sup>
5% O <sub>2</sub> , 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	<b>99,9±0,1<sup>#</sup></b>	<b>417±73<sup>#</sup></b>	36,8±9,4	42,8±5,7	52,7±10,1	<b>20±1<sup>#</sup></b>
	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 <sub>2</sub> , 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	<b>99,9±0,1<sup>γ</sup></b>	<b>578±90<sup>γ</sup></b>	55,0±12,9	41,9±10,8	<b>60,1±6,9<sup>γ</sup></b>	<b>21±1<sup>γ</sup></b>
	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- $\alpha$  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% O<sub>2</sub>, <sup>#</sup> - p<0,05 по сравнению с ЭК 5% O<sub>2</sub>, <sup>γ</sup> - p<0,05 по сравнению с ЭК 0.1% O<sub>2</sub>. СИФ – средняя интенсивность флюоресценции окрашенных клеток.

Таблица 9. Экспрессия молекул адгезии на ЭК после сокультивирования с активированными МСК при 5% O<sub>2</sub> (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 $\gamma$	<b>52,8±0,1*</b>	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 $\beta$  (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% O<sub>2</sub> и в 9,3 раз при 0.1% O<sub>2</sub>. По сравнению с монокультурой активированных ЭК иммунные клетки в меньшей степени адгезировали к сокультуре. Гипоксический стресс (0.1% O<sub>2</sub>) усиливал адгезивные свойства ЭК по сравнению с «физиологической» гипоксией (5% O<sub>2</sub>), как в моно-, так и в сокультуре с МСК (рис. 8, В).

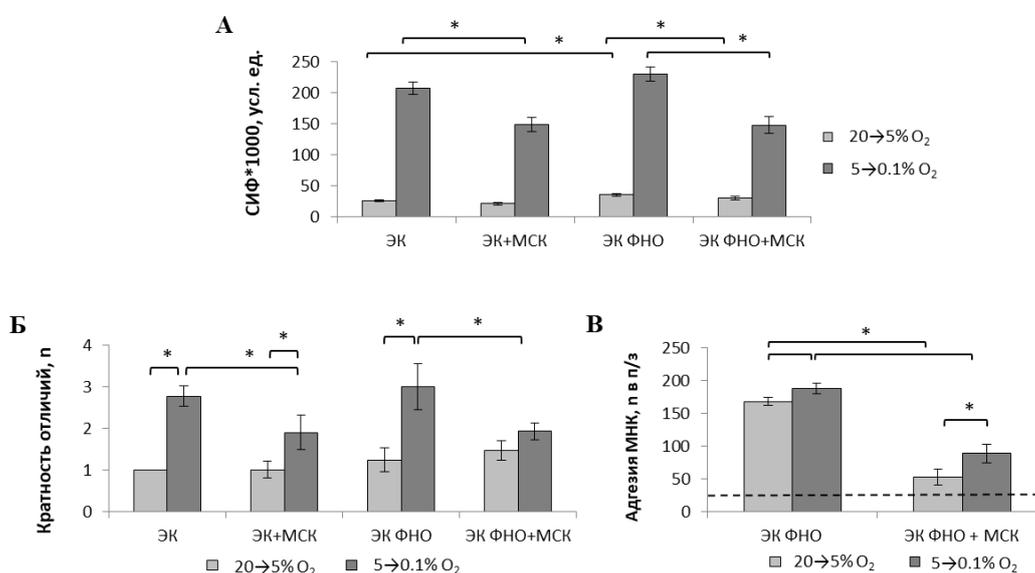


Рисунок 8. Изменение активности NO-синтазы и адгезивных свойств эндотелия после взаимодействия с МСК. А – продукция NO в ЭК; Б – экспрессия NOS3 в ЭК; В – адгезия мононуклеаров периферической крови к активированному эндотелию в моно- и сокультуре, пунктиром обозначена адгезия МНК к неактивированным ЭК. 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% O<sub>2</sub>) (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% O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub>.

Таким образом, активация ФНО- $\alpha$  повышала экспрессию интегрина  $\alpha$ 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- $\alpha$  эндотелием изменения в МСК, как правило, были более выражены. МСК, помимо индукции паракринной активности эндотелия, смягчали эффекты депривации O<sub>2</sub> ( $\downarrow$ NO,  $\downarrow$ NOS3) и провоспалительной активации ( $\downarrow$ NO,  $\downarrow$ адгезия иммунных клеток). Гипоксический стресс (0.1% O<sub>2</sub>) по сравнению с «физиологической» гипоксией (5% O<sub>2</sub>) 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 O<sub>2</sub> может ослаблять позитивные эффекты взаимодействия как для МСК, так и для эндотелия (рис. 9).

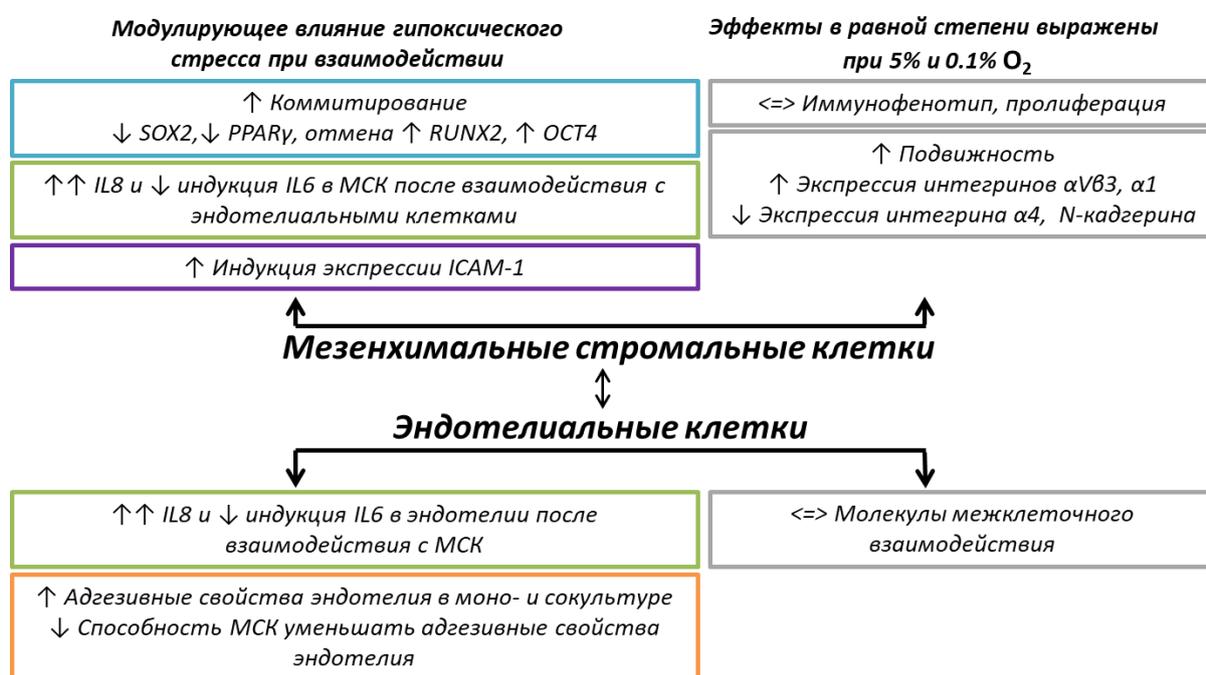


Рисунок 9. Эффекты взаимодействия МСК и ЭК *in vitro* при пониженном содержании кислорода и провоспалительной активации

## 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 $\gamma$* .
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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$ -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.