

УДК 57.085.23

ВЛИЯНИЕ СЕКРЕТОРНЫХ ФАКТОРОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ И МИГРАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

¹Лыков А.П., ¹Бондаренко Н.А., ²Сахно Л.В., ²Шевела Е.Я., ¹Повещенко О.В.,
¹Ким И.И., ¹Никонорова Ю.В., ¹Коненков В.И.

¹ФГБУ «НИИКЭМ» СО РАМН, Новосибирск, e-mail: lykovalex@freemail.ru.;

²ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, Новосибирск, e-mail: lsahno53@mail.ru

Стволовые/прогениторные клетки, в том числе и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, используются для клеточной терапии при различных патологических процессах в организме человека и животных, в частности при хронической сердечной недостаточности для активации процессов репарации/регенерации поврежденного миокарда и активации неоангиогенеза. О взаимодействии между эндотелиальными клетками и мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками известно недостаточно. Проведено исследование функциональной активности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека в режиме реального времени под влиянием ростовых факторов, содержащихся в кондиционной среде от клеток эндотелиальной линии человека EA.Hy926. Показано, что в присутствии кондиционной среды от клеток эндотелиальной линии человека EA.Hy926 мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки быстрее пролиферируют и мигрируют и что данный эффект обусловлен продукцией биологически активных веществ клетками эндотелиальной линии.

Ключевые слова: мультипотентные стромальные мезенхимальные клетки из жировой ткани, пролиферация, миграция, в режиме реального времени, цитокины и ростовые факторы, эндотелиальные клетки

THE IMPACT OF SECRETORY FACTORS ENDOTHELIAL CELLS ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF HUMAN MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS

¹Lykov A.P., ¹Bondarenko N.A., ²Sakhno L.V., ²Shevela E.Y., ¹Poveschenko O.V.,
¹Kim I.I., ¹Nikonorova Y.V., ¹Konenkov V.I.

¹FSBI «Institute Clinical and Experimental Lymphology» SB RAMS, Novosibirsk,
e-mail: lykovalex@freemail.ru;

²FSBI «Institute of Clinical Immunology» SB RAMS, Novosibirsk, e-mail: lsahno53@mail.ru

Stem/progenitor cells, including multipotent mesenchymal stromal cells are used for cellular therapy of different pathological processes in humans and animals, in particular in chronic heart failure to activate the process of repair/regeneration of damaged myocardium and activation of neoangiogenesis. About the interaction between endothelial cells and multipotent mesenchymal stromal cells known enough. The research of functional activity of multipotent mesenchymal stromal cells from human adipose tissue in real time under the influence of growth factors contained in the conditioned environment from human endothelial line EA.Hy926 cells. It is shown that in the presence of the conditional environment from human endothelial line EA.Hy926 cells the multipotent mesenchymal stromal cells from human adipose tissue faster proliferate and migrate and that this effect is due to the production of biologically active substances by endothelial cells line.

Keywords: the bone marrow – multipotent stromal mesenchymal cells, proliferation, migration, in real time, cytokines and growth factors, endothelial cells

Использование аутологичных стволовых/прогениторных клеток, в том числе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) в клинической практике рассматривается как перспективный метод терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы, в том числе и при хронической сердечной недостаточности [6, 8–9]. Известно, что ЭПК принимают активное участие в процессах репарации/регенерации поврежденных стенок сосудов. Формирование новых сосудов в постнатальном периоде осуществляется как за счет развития коллатеральных сосудов (артериогенез), новых капилляров

(неоангиогенез) путем миграции и пролиферации предсуществующих дифференцированных эндотелиальных клеток, так и васкулогенеза, когда сосуды образуются из ЭПК [4]. Также показано, что резидентные прогениторные клетки, через продукцию биоактивных веществ, стимулируют миграцию в зону повреждения зрелых эндотелиальных клеток и ЭПК из других зон, программируя их дифференцировку в зрелые клетки и способствуя тем репарации повреждений [4]. Использование ММСК, в том числе и из жировой ткани (ЖТ), в медицине связано с противовоспалительной активностью, способностью стимулировать процессы васкуляризации в зоне

ишемии тканей и органов, а также дифференцировкой в адипогенном, остеогенном, хондрогенном и миогенном направлениях, в том числе и в кардиомиоциты [2–4, 6, 9]. Функциональная активность ММСК регулируется различными биологически активными веществами, в том числе цитокинами и ростовыми факторами, продуцируемыми микроокружением. Известно, что ЭПК продуцируют ряд биологически активных веществ, способных оказывать влияние на окружающие их ткани и клетки [2]. В доступной литературе имеются единичные исследования, посвященные взаимодействию ММСК с ЭПК, в которых главная роль отводится именно биологически активным веществам, продуцируемым данными клетками [4–5].

Целью данного исследования было изучение эффекта цитокинов и ростовых факторов, продуцируемых эндотелиальными клетками на функциональную активность ММСК.

Материалы и методы исследования

ММСК из ЖТ от условно здоровых лиц получали при проведении процедуры липосакции. ЖТ подвергали ферментативной диссоциации с использованием 0,1% раствора коллагеназы I типа (Sigma-Aldrich, США). Для получения ЖТ-ММСК клетки ЖТ инкубировали в пластиковых флаконах для культур тканей (TPP, Швейцария) в питательной среде α MEM (Биолот, СПб), дополненной 100 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Хабаровск), 2 ммоль L-глутамина (ICN, США) и 20%FCS, при 37°C в CO₂-инкубаторе. В экспериментах использовали ЖТ-ММСК от 2–6 пассажа. Для адипогенной дифференцировки ЖТ-ММСК инкубировали в посадочной среде с добавлением 10⁻⁷М дексаметазона и 0,5 мМ изобутилметилксантина. Для остеогенной дифференцировки КМ-ММСК инкубировали с добавлением к посадочной среде 10⁻⁹М дексаметазона, 10 мМ β -глицерофосфата и 50 мкг/мл аскорбат-2-фосфатазы. Клетки культивировали 14 дней, замену среды осуществляли каждые 3–4 дня. Морфологическую картину КМ-ММСК оценивали под инвертированным микроскопом Olympus (Япония). Фенотип ЖТ-ММСК исследовали на проточном цитометре FACSCantoII (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител меченых FITC и PE к CD3, CD14, CD16, CD14, CD20, HLA-DR, (Сорбент, Россия), а также к CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 (Becton Dickinson, США). Спонтанную и индуцированную (30% кондиционной среды от клеток эндотелиальной линии человека EA.Hy926) пролиферацию ЖТ-ММСК исследовали по изменению клеточного импеданса на аппарате Real-Time Cell Analyzer single-plate Instrument xCELLigence System (Roche Applied Science, Германия) в режиме реального времени и выражали в клеточном индексе (КИ): $КИ = (R_n - R_b)/t$, где R_b – это исходное значение импеданса в лунке, содержащей только ростовую для клеток среду, а R_n – это значение импеданса в лунке в любое время (t), содержащей помимо ростовой среды и тестируемые клетки. Миграцию ЖТ-ММСК исследовали на аппарате Cell-IQ в режиме реального времени (CM

Technologies, Финляндия). Для этого ЖТ-ММСК вносили в 96 луночные плоскодонные планшеты на 24 часа в культуральной среде для адгезии к пластику. Через 24 часа в центре лунки наносили кончиком наконечника на 200 мкл рану, слущенные клетки удалялись двукратным промыванием лунки забуференным физиологическим раствором, вносилась культуральная среда с минимальным содержанием сыворотки (1%). В опыте вносили КС от клеток EA.Hy926 (30 или 50%), рекормон – рекомбинантный человеческий эритропоэтин (30 Ед./мл; Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) и VEGF – ростовой фактор эндотелия сосудов (10 нг/мл; BioVision, США). Планшет помещали в аппарат Cell-IQ, в котором подается газовая смесь (95% кислорода и 5% CO₂), задавали условия съемки параметров в лунке (количество полей просмотра – 16, интервал между съемками – 15 минут), в результате чего аппарат в автоматическом режиме производил сканирование выбранных областей лунки и сохранял результаты в виде изображений. Оценка результатов исследований производилась с использованием пакета программ Cell-IQ analyzer. Для получения КС от клеток EA.Hy926, любезно предоставленных Dr. C.J. Edgel (Университет Каролины, США), клетки инкубировали в питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10% FCS (HyClone, США), 160 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Хабаровск), 2 ммоль L-глутамина (ICN, США) и НАГ, добавку к среде, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ICN, США). Через 72 часа надосадочная жидкость снималась, разливалась по аликвотам и хранилась при –70°C до момента использования в работе. Уровни TNF- α , IL-10, IL-18, IL-8, EPO, G-CSF, VEGF определяли с использованием коммерческого набора производства «Вектор-БЕСТ» (г. Новосибирск). Уровень продукции стойких метаболитов оксида азота (NO) в кондиционных средах EA.Hy926 исследовали с использованием реактива Грейсса. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Lq) и верхним (Hq) квартилями; достоверность различий рассчитывалась по U-критерию Манна-Уитни и принималась при значениях $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

На ранних сроках культивирования ядросодержащие клетки из стромально-васкулярной фракции жировой ткани доноров были гетерогенными, а к 14 дню становились гомогенными, приобретали веретенообразную форму, характерную для клеток мезенхимальной принадлежности (рис. 1, а, б), обладали способностью к формированию колониеобразующих единиц, а также к цитодифференцировке в адипогенном (рис. 1, в) и остеогенном (рис. 1, г) направлении. Иммунофенотипический анализ ЖТ-ММСК выявил, что использованные в экспериментальном исследовании ММСК доноров были позитивны по экспрессии типичных для ММСК маркеров – CD73 (98,0; 97,0–99,0), CD90 (95,5; 89,0–99,0)

и CD105 (96,0; 94,0–96,0) и негативны в отношении следующих кластеров дифференцировки – CD3, CD14, CD16, CD20, HLA-DR, CD34, CD45. Анализ изменения импеданса ЖТ-ММСК выявил зависимость пролиферации от наличия в питательной среде ростовых факторов, содержащих-

ся в FCS и КС (рис. 2, а). Так, для ЖТ-ММСК показано статистически значимое подавление пролиферативного потенциала при 1% FCS в питательной среде по сравнению с пролиферацией в присутствии 10% FCS ($p < 0,05$) и 30% КС от клеток EA. Hy926 ($p < 0,05$).

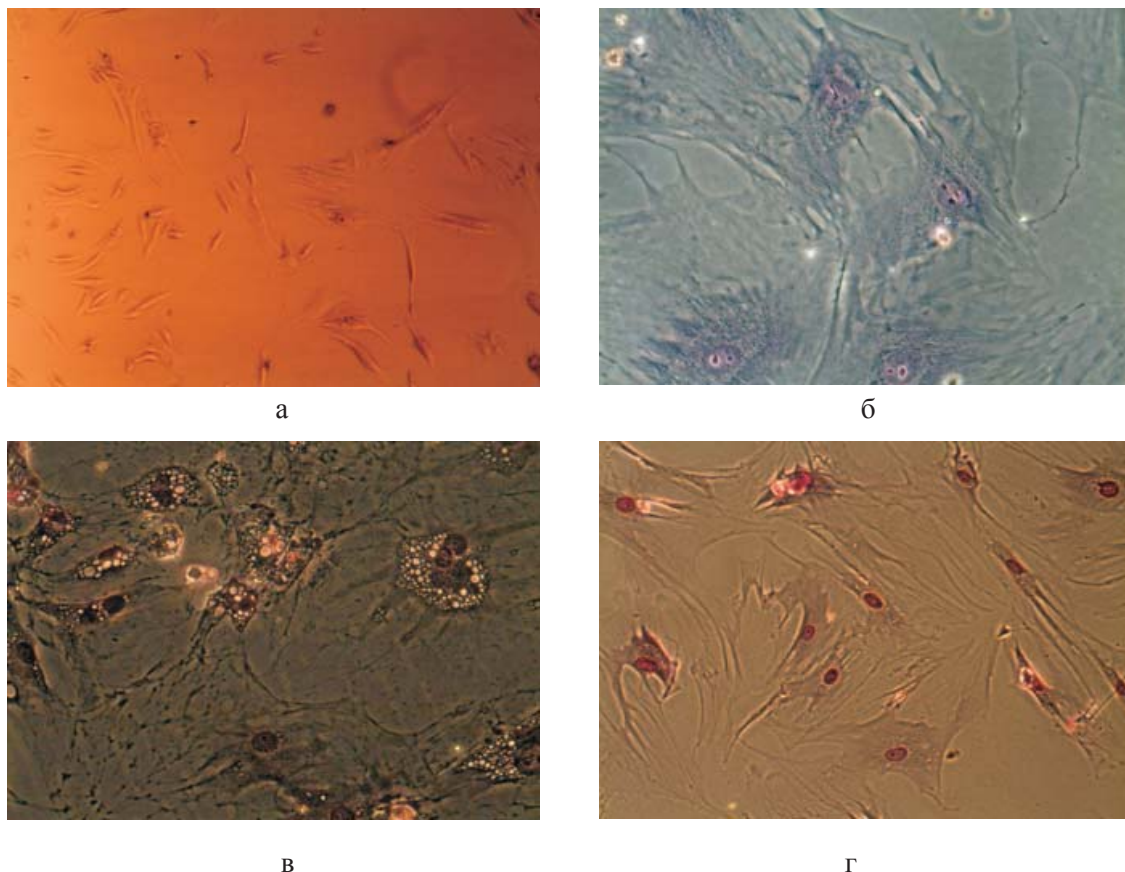
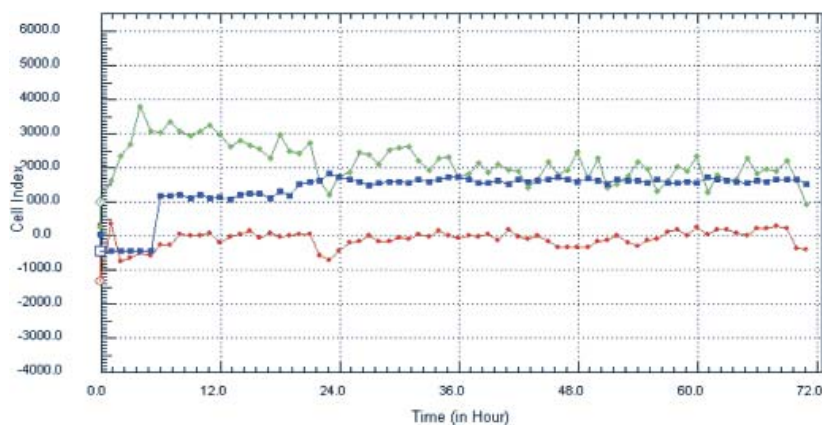


Рис. 1. Морфология ЖТ-ММСК:

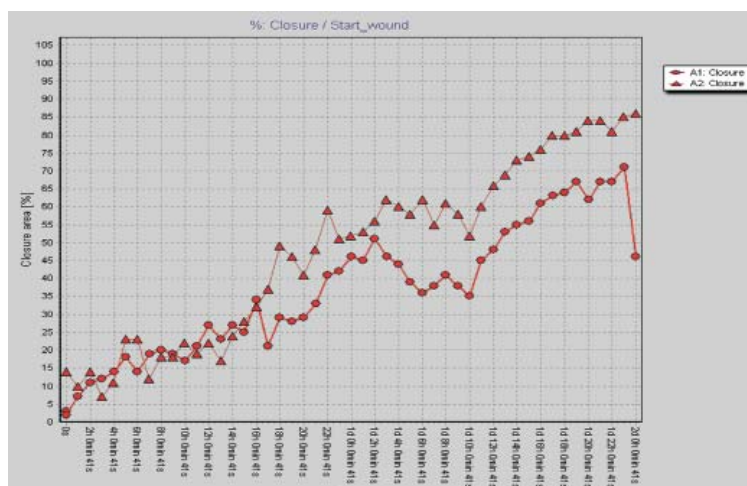
а – веретенообразная морфология ЖТ-ММСК (x40; нативный препарат); б – ЖТ-ММСК окраска по Романовскому-Гимзе (x400); в – адипогенная дифференцировка ЖТ-ММСК окраска Oil Red-O и докрасивание по Романовскому-Гимзе (x400); г – остеогенная дифференцировка ЖТ-ММСК окраска AgNO₃ и докрасивание по Романовскому-Гимзе (x400).



а



б



в



г

Рис. 2. Показатели изменения клеточного импеданса ЖТ-ММСК в режиме реального времени на аппарате xCELLigence System (а) и миграционная активность ЖТ-ММСК в режиме реального времени по данным аппарата Cell-IQ (б-г):

а – красная линия – 1% FCS, зеленая линия – 10% FCS, синяя линия – 30% KC;
 б – круг – 1% FCS, треугольник – 30% KC, ромб – 50% KC; в – круг – 1% FCS,
 треугольник – рекормона (30 ЕД/мл); г – круг – 1% FCS, треугольник – VEGF (10 нг/мл)

Одним из параметров, характеризующих функциональную активность ЖТ-ММСК, является способность к миграции в направлении градиента концентрации хемотаксических веществ, в том числе и ростовых факторов [9]. Как видно из рис. 2, б, ЖТ-ММСК статистически значимо быстрее мигрируют в область «раневой поверхности» в присутствии 30% КС от клеток EA.Hy926 ($p < 0,05$). В то же время наличие 50% КС в питательной среде в меньшей степени активировало миграцию ЖТ-ММСК в область «раневой поверхности» по сравнению с контролем (рис. 2, б). Также показано статистически значимое увеличение пролиферативной и миграционной способности ЖТ-ММСК под влиянием рекормона (рис. 2, в) и VEGF (рис. 2, г). Известно, что функциональная активность ММСК зависит от цитокинов и ростовых факторов [4–5, 7]. Поэтому нами были оценены уровни продукции биологически активных веществ клетками EA.Hy926. Показано, что клетки EA.Hy926 продуцируют IL-8 (1870,75; 1405,0–3253,25 пг/мл), IL-10 (169,0; 80,0–244,0 пг/мл), IL-18 (223,0; 161,25–473,5 пг/мл), TNF- α (11,25; 10,0–13,75 пг/мл), G-CSF (31,0; 14,75–67,25 пг/мл), VEGF (75,0; 25,0–197,5 пг/мл), EPO (300,0; 245,0–547,5 мМЕ/мл) и NO (3,55; 2,9–4,15 μ M/мл), способные стимулировать процессы пролиферации и миграции в микроокружение. Полученные данные о морфофункциональных свойствах ЖТ-ММСК не противоречат имеющимся в литературе данным, в которых также указывается возможность получать ММСК из жировой ткани, напоминающих фибробласты, обладающие способностью к образованию колоний и дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлении, а фенотипически такие клетки несли маркеры, характерные для ММСК [3]. Результаты анализа пролиферативной активности ЖТ-ММСК в присутствии КС, полученной от клеток человеческой эндотелиальной гибридомы EA.Hy926, морфологически имеющей черты эндотелиоцитов для средних и крупных сосудов, указывают на активацию пролиферативного потенциала по сравнению с таковым параметром для клеток, росших в обедненной сывороткой питательной среде. Также в присутствии КС от клеток EA.Hy926 нами отмечено увеличение миграционного потенциала ЖТ-ММСК в тесте «раневой поверхности». Активация пролиферации и миграции КС от клеток EA.Hy926 может быть обусловлена тем фактом, что многие клетки организма способны к продукции биологически ак-

тивных веществ, в том числе и стволовые/прогениторные клетки. В подтверждение данной гипотезы нами был исследован спектр продукции биологически активных веществ клетками EA.Hy926. Нами показана продукция широкого спектра цитокинов и ростовых факторов EA.Hy926. Известно, что КС от ММСК подавляет процессы апоптоза печеночной ткани при ее повреждении CCl₄ [8]. С учетом того факта, что в КС от клеток EA.Hy926 содержатся биологически активные вещества, то не исключено, что именно за счет их наличия (эритропоэтин, TNF- α , IL-8, G-CSF) и выявляется стимулирующее влияние на функциональную активность ЖТ-ММСК. Известно, что эритропоэтин оказывает протективный эффект и на клетки негемопоэтического ряда, обусловленный стимуляцией через экспрессируемые на поверхности клеток рецепторов к нему или же через активацию в них генов эритропоэтина и синтезом эритропоэтина в клетках, тем самым оказывая ауто- и паракринный характер регуляции функциональной активности этих тканей [1]. Под действием TNF- α активируется продукция IL-8 ММСК и дифференцировка их в направлении эпителиоцитов легких [7].

Заключение

Таким образом, при сокультивировании ЖТ-ММСК с кондиционной средой от клеток человеческой эндотелиальной гибридомы EA.Hy926 отмечается активация процессов пролиферации и миграции ЖТ-ММСК, что может быть использовано для предобработки ММСК с последующим их введением в организм пациента с целью улучшения приживления ММСК и проявления ими более выраженного позитивного терапевтического эффекта.

Список литературы

1. Захаров М.Ю. Цитопротекторные функции эритропоэтина / М.Ю. Захаров // Клиническая нефрология. – 2009. – № 1. – С. 16–21.
2. Кругляков П.В. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток в кардиомиоцитарном направлении in vitro и in vivo / П.В. Кругляков, И.Б. Соколова, Н.Н. Зинькова // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – № 4. – С. 194–197.
3. Повещенко О.В. Способы выделения и условия культивирования мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека, полученной из различных источников / О.В. Повещенко, А.П. Колесников, И.И. Ким // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – № 5. – С. 90–95.
4. Aguirre A. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis / A. Aguirre, J.A. Planell, E. Engel // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2010. – Vol. 400. – P. 284–291.
5. Hoch A.I. Differentiation-dependent secretion of pro-angiogenic factors by mesenchymal stem cells / A.I. Hoch,

B.Y. Binder, D.C. Genetos // PLoS ONE 2012; 7: e35579. doi: 10.1371/journal.pone.0035579.

6. Ichim T.E. Feasibility of combination allogeneic stem cell therapy for spinal cord injury: a case report / T.E. Ichim, F. Solano, F. Lara // *Int. Arch. Med.* 2010; 3. doi: 10.1186/1755-7682-3-30.

7. Perng D.W. miRNA-146a expression positively regulates tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in mesenchymal stem cells and differentiated lung epithelial-like cells / D.W. Perng, D.M. Yang, Y.H. Hsiao // *Tissue Eng. Part A.* – 2012. – Vol. 18. – P. 2259–67.

8. Xagorari A. Protective effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury / A. Xagorari, E. Siotou, M. Yiangou // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2013. – Vol. 6. – P. 831–840.

9. Yeum C.E. Quantification of MSCs involved in wound healing: use of SIS to transfer MSCs to wound site and quantification of MSCs involved in skin wound healing / C.E. Yeum, E.Y. Park, S-B. Lee // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2013. – Vol. 7. – P. 279–291.

References

1. Zakharov Yu.M. Cytoprotective effects of erythropoietin / Yu.M. Zakharov // *Klinicheskaya nefrologiya.* 2009. no.1. pp. 16–21.

2. Kruglyakov P.V. Differentiation of mesenchymal stromal cells into cardiomyocyte direction in vitro and in vivo / P.V. Kruglyakov, I.B. Sokolova, N.N. Zinkova // *Kletochnyie tehnologii v biologii i meditsine* 2006. no. 4. pp. 194–197.

3. Poveschenko O.V. Methods of isolation and condition cultivation stromal cells of human adipose tissue / O.V. Poveschenko, A.P. Kolesnikov, I.I. Kim // *Byulleten SO RAMN* 2008. no. 5. pp. 90–95.

4. Aguirre A. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis / A. Aguirre, J.A.

Planell, E. Engel // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. Vol. 400. pp. 284–291.

5. Hoch A.I. Differentiation-dependent secretion of pro-angiogenic factors by mesenchymal stem cells / A.I. Hoch, B.Y. Binder, D.C. Genetos // PLoS ONE 2012; 7: e35579. doi: 10.1371/journal.pone.0035579.

6. Ichim T.E. Feasibility of combination allogeneic stem cell therapy for spinal cord injury: a case report / T.E. Ichim, F. Solano, F. Lara // *Int. Arch. Med.* 2010; 3. doi: 10.1186/1755-7682-3-30.

7. Perng D.W. miRNA-146a expression positively regulates tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in mesenchymal stem cells and differentiated lung epithelial-like cells / D.W. Perng, D.M. Yang, Y.H. Hsiao // *Tissue Eng. Part A.* 2012 Vol. 18. pp. 2259–67.

8. Xagorari A. Protective effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury / A. Xagorari, E. Siotou, M. Yiangou // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013. Vol. 6. pp. 831–840.

9. Yeum C.E. Quantification of MSCs involved in wound healing: use of SIS to transfer MSCs to wound site and quantification of MSCs involved in skin wound healing / C.E. Yeum, E.Y. Park, S-B. Lee // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2013. Vol. 7. pp. 279–291.

Рецензенты:

Шурлыгина А.В., д.м.н., профессор лаборатории хронофизиологии, главный научный сотрудник, ФГБУ «НИИФФМ» СО РАМН, г. Новосибирск;

Бгатова Н.П., д.б.н., зав. лабораторией ультраструктурных исследований ФГБУ «НИИКЭЛ» СО РАМН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 14.03.2014.