



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.4.002>
УДК 602.9:612.262



Величко А.В.^{1,2}✉, Музыченко Б.А.¹, Яковлева М.А.¹, Нижегородова Д.Б.^{1,2},
Зафранская М.М.^{1,2}

¹ Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

² Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения
Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

Антиокислительный и регенеративный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях гипоксии

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Величко А.В. – проведение иммунологических исследований и статистическая обработка данных, написание исходного варианта текста; Музыченко Б.А. – проведение иммунологических исследований; Яковлева М.А. – проведение иммунологических исследований; Нижегородова Д.Б. – концепция и дизайн исследования, проведение иммунологических исследований и статистическая обработка данных, окончательное редактирование текста рукописи; Зафранская М.М. – концепция и дизайн исследования, окончательное редактирование текста рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке отдельного гранта Министерства образования Республики Беларусь, № госрегистрации 20220591.

Подана: 31.03.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: alesjswirskay@mail.ru

Резюме

Введение. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) представляют собой основу развития перспективной стратегии регенеративной медицины, используемой для терапии широкого спектра заболеваний. В настоящее время особое внимание уделяется исследованию секрета ММСК, посредством которого клетки участвуют в репарации и восстановлении поврежденных тканей, а также обеспечивают антиоксидантную защиту организма при патологических состояниях, сопровождающихся гипоксией.

Цель. Оценить регенеративный и антиокислительный потенциал ММСК костного мозга и жировой ткани человека в условиях экспериментального моделирования гипоксии.

Материалы и методы. Материалом исследования явились 20 культур ММСК доноров, которые предоставили информированное согласие. Мононуклеары периферической крови, нейтрофилы и макрофаги получали от 10 здоровых доноров. Условия гипоксии создавали с помощью микробиологического набора Anaerocult A® mini. Для оценки поверхностного фенотипа и внутриклеточных молекул ММСК использовали метод проточной цитометрии, для внеклеточной продукции ростовых факторов и цитокинов – метод иммуноферментного анализа. Оксидантную активность клеточных культур и кокультур оценивали методом хемилюминесценции. Обработку данных проводили в программе Statistica 8.0.

Результаты. В условиях гипоксии изменялись морфология и фенотип ММСК посредством снижения экспрессии маркеров CD105 и CD90, что может влиять на клеточную

адгезию и межклеточную кооперацию. В то же время гипоксия стимулировала продукцию репаративных факторов (рецептор 2-го типа фактора роста эндотелия сосудов, матриксная металлопротеиназа 3, фактор роста тромбоцитов D), что усиливало репаративные и ангиогенные свойства ММСК, а также увеличивала синтез антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы 3, каталазы, глутатиона, NO-синтазы), предотвращающих избыточное образование активных форм кислорода. В условиях дефицита кислорода ММСК проявляли иммуномодулирующий эффект в отношении нейтрофилов и макрофагов, что проявлялось увеличением интенсивности хемилюминесценции.

Заключение. Для оптимизированной пробоподготовки биомедицинских клеточных продуктов на основе ММСК необходимо учитывать, что гипоксия влияет на морфологию, изменяет фенотип и стимулирует секретом клеток, а также проявляет иммуномодулирующий эффект в отношении клеток врожденного иммунитета.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, оксидативный стресс, гипоксия, иммуномодуляция, фенотип

Alesia V. Vialichka^{1,2}✉, Bogdan A. Muzychenko¹, Maria A. Yakauleva¹, Darya B. Nizheharodava^{1,2}, Marina M. Zafranskaya^{1,2}

¹ International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University, Minsk, Belarus

² Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Antioxidant and Regenerative Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells under Hypoxia Condition

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Alesia V. Vialichka – conducting immunological studies and statistical data processing, writing the original version of the text; Bogdan A. Muzychenko – conducting immunological studies; Maria A. Yakauleva – conducting immunological studies; Darya B. Nizheharodava – concept and study design, conducting immunological studies and statistical data processing, final editing of the manuscript; Marina M. Zafranskaya – concept and study design, final editing of the manuscript.

Funding. The work was carried out with the financial support of a personal grant from the Ministry of Education of the Republic of Belarus, registration number 20220591.

Submitted: 31.03.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: alesjswirskay@mail.ru

Abstract

Introduction. Multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) represent a promising strategy of regenerative medicine used for the treatment of a wide range of diseases. Currently, particular attention is paid to the study of MMSCs secretome, through which cells participate in the repair and regeneration of damaged tissues, and also provide antioxidant protection of the body in pathological conditions accompanied by hypoxia.

Purpose. To evaluate the regenerative and antioxidant potential of human bone marrow and adipose tissue derived MMSCs under experimental hypoxia.



Materials and methods. The material was 20 MMSCs cultures from donors who provided informed consent. Peripheral blood mononuclear cells, neutrophils and macrophages were obtained from 10 healthy donors. Hypoxia condition was created using the Anaerocult A® mini microbiological kit. The flow cytometry method was used for the assessment of the surface phenotype and intracellular molecules of MMSCs while extracellular growth factors and cytokines were estimated by enzyme immunoassay. The oxidant activity of cell cultures and co-cultures was evaluated by chemiluminescence. Data processing was carried out with Statistica 8.0 program.

Results. MMSCs morphology and phenotype were changed via decreased CD105 and CD90 expression under hypoxia conditions, what may affect cell adhesion and intercellular cooperation. Hypoxia stimulated the production of reparative factors (vascular endothelial growth factor type 2 receptor, matrix metalloproteinase 3, platelet-derived growth factor D), what enhanced the reparative and angiogenic properties of MMSCs as well as increase the synthesis of antioxidant enzymes (superoxide dismutase 3, catalase, glutathione, NO-synthase) preventing the excessive formation of reactive oxygen species. In conditions of oxygen deficiency MMSCs showed an immunomodulatory effect on neutrophils and macrophages, what was proved by an increase in the intensity of chemiluminescence.

Conclusion. For optimized MMSC-based biomedical cell products preparation it is important to take into account that hypoxia affects MMSCs morphology, changes their phenotype and stimulates cell secretion as well as enhances an immunomodulatory effect of MMSCs on innate immunity cells.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, oxidative stress, hypoxia, immunomodulation, phenotype

■ ВВЕДЕНИЕ

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) – недифференцированные клетки, образующиеся из мезенхимы в ходе эмбриогенеза, которые могут дифференцироваться *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондробласты, а также обладают способностью к самовоспроизведению через асимметричное деление. ММСК обладают иммуномодулирующей, репаративной и антиоксидантной активностью, которая реализуется через способность подавлять пролиферацию лимфоцитов, а также продуцируют широкий спектр биологически активных молекул, которые в совокупности называют секретом ММСК. Секретом ММСК включает компоненты внеклеточного матрикса, белки, участвующие в процессе адгезии, ферменты, а также их активаторы и ингибиторы, факторы роста и связывающие белки, цитокины и хемокины. В совокупности данные факторы поддерживают регенеративные процессы в поврежденных тканях, однако также могут оказывать различное влияние на процессы, которые они регулируют в зависимости от условий микроокружения [7].

В последние годы интерес к потенциалу клинического применения ММСК привел к увеличению числа исследований влияния условий культивирования и экспансии на поведение и функцию клеток, в том числе на содержание кислорода. На сегодняшний день результаты оценки влияния низкого и нормального содержания кислорода на морфологию, фенотип, пролиферативную способность и функциональную

активность ММСК противоречивы и неоднозначны [2, 3, 5]. Доказательства прямой роли окислительного стресса в иммуномодуляции ММСК отсутствуют. В небольшом количестве исследований *in vitro* выявлены механизмы, участвующие в защитных эффектах ММСК, однако при этом не до конца понятно, каким образом ММСК опосредуют их действие *in vivo*. Известно, что по мере культивирования ММСК *ex vivo* окислительный стресс увеличивается, уровень определенных поверхностных антигенов снижается (например, CD13, CD29 и CD44), а способность подавлять пролиферацию Т-клеток уменьшается [5].

Учитывая, что ММСК уже успешно используются для лечения пациентов в клинических испытаниях, крайне важно понимать, как именно ММСК опосредуют свои эффекты при различных воспалительных заболеваниях, связанных с оксидативным стрессом, чтобы гарантировать использование ММСК с оптимальной терапевтической эффективностью и безопасностью [2]. В связи с тем что ММСК, полученные от пациентов, демонстрируют изменение выживаемости, пролиферации и дифференцировки, требуется разработка новой стратегии для улучшения их антиоксидантной, регенеративной и иммуномодулирующей способности. Потенциальным перспективным подходом является обработка культур факторами роста или гипоксическим шоком. Высокие терапевтические эффекты стволовых клеток в гипоксическом состоянии предполагают, что исходной нишей или предпочтительным их микроокружением является низкая концентрация кислорода [4].

Поскольку большинство клинических применений биомедицинского клеточного продукта ММСК зависят от их иммуномодулирующих, репаративных и антиокислительных свойств, весьма важной задачей является выяснение механизмов влияния условий гипоксии на функциональный потенциал ММСК, включая стимуляцию экспансии и увеличение клеточной биомассы *ex vivo*, а также улучшение терапевтической эффективности ММСК [6].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка регенеративного и антиокислительного потенциала ММСК костного мозга и жировой ткани человека в условиях экспериментального моделирования гипоксии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования явились ММСК костного мозга ($n=10$) и жировой ткани ($n=10$), полученные после информированного согласия от доноров; на основе клеток создан криобанк клеточных культур ММСК. Мононуклеары периферической крови (МПК), нейтрофилы и макрофаги получали от 10 здоровых доноров в возрасте от 21 до 31 года.

Культуральный метод

ММСК культивировали в культуральной среде DMEM (Gibco™, United Kingdom) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Бразилия), 1%-ного L-глутамина (Gibco, США), 1%-ной смеси антибиотиков и антимикотика (Gibco, Германия) в течение 24 ч. и 72 ч. в условиях газовой гипоксии (1–2% O₂) с использованием микробиологического набора Anaerocult® A mini (Millipore, Германия) при 37 °C или в условиях нормоксии в CO₂-инкубаторе.



МПК, нейтрофилы и моноциты доноров выделяли из гепаринизированной венозной крови доноров (n=10) на градиенте плотности с $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ (Carl Roth, Германия). Для получения культуры макрофагов проводили культивирование моноцитов в течение 2 ч. в чашках Петри с адгезивным покрытием в культуральной среде DMEM (Gibco™, United Kingdom) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Бразилия), 1%-ного L-глутамина (Gibco, США), 1%-ной смеси антибиотиков и антимикотика (Gibco, Германия).

Метод экспериментального моделирования гипоксии

Условия гипоксии (1–2% O₂) создавали с помощью микробиологического набора Anaerocult A® mini (Millipore, Германия), содержащего гипоксические пакеты с компонентами, которые химически быстро и полностью связывают кислород. Моделирование гипоксии проводили в течение 24 и 72 ч.

Иммуноферментный метод

Концентрации супероксиддисмутазы 3 (SOD3), рецептора 2-го типа фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), фактора роста тромбоцитов D (PDGF-D), матриксной металлопротеиназы (MMP3), фактора роста фибробластов 2 (FGF2), глутатиона, каталазы, фактора некроза опухоли α (TNF- α), интерлейкина 10 (IL-10), интерлейкина 12 (IL-12), интерферона γ (IFN- γ) определяли в супернатантах культур ММСК с использованием наборов, представленных в табл. 1, и рассчитывали концентрацию на 1×10^5 клеток.

Таблица 1
Используемые наборы для иммуноферментного анализа
Table 1
Used kits for enzyme immunoassay

Фактор	Наименование набора реагентов	Производитель	Каталожный номер
SOD3	Human Superoxide Dismutase 3 ELISA Kit	Elabscience, США	E-EL-H2382
VEGFR2	Human Vascular endothelial growth factor 2 ELISA Kit	Fine Test, Китай	EH0329
PDGF-D	Human Platelet-derived growth factor D человека ELISA Kit	Elabscience, США	E-EL-H2213
MMP3	Human Matrix metalloproteinase-3 человека ELISA Kit	Elabscience, США	E-EL-H1446
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2 ELISA Kit	Cloud-Clone Corporation, США	CEA551Po
Глутатион	GSH ELISA Kit	Cloud-Clone Corporation, США	E-EL-H0026
Каталаза	Catalase ELISA Kit	Cloud-Clone Corporation, США	SEC418Hu
TNF- α	Human Tumor Necrosis Factor Alpha ELISA Kit	Fine Test, Китай	EH0302
IL-10	Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ	БЕКТОР-БЕСТ, Россия	A-9774
IL-12	Human Interleukin 12 ELISA Kit	Bioassay Technology Laboratory, Китай	E3301Hu
IFN- γ	Human IFN- γ ELISA Kit	Elabscience, США	E-EL-H0108

Метод проточной цитометрии

Для оценки фенотипа ММСК использовали панель моноклональных антител CD90-FITC, CD44-FITC, CD105-PE, CD45-PE-Cy7, CD34-PE (Beckman Coulter, США). Результаты регистрировали на 5000 клеток на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Уровень миелопероксидазы и NO-синтазы определяли с помощью моноклональных антител MPO-PE (миелопероксидаза) и eNOS-PE (эндотелиальная синтаза оксида азота) соответственно методом проточной цитометрии (Beckman Coulter, США).

Метод хемилюминесценции

Кокультивирование гипоксических и нормоксических ММСК с нейтрофилами и макрофагами проводили в полной культуральной среде RPMI-1640 (Lonza, Швейцария) в течение 12–18 ч. и 48 ч. соответственно. Для приготовления системы совместного культивирования ММСК помещали в трансвеллу лунки 24-луночных планшетов (Corning, США) в полной среде RPMI-1640 на 24 ч. при 5% CO₂, 37 °C для адгезии клеток. После 24-часовой инкубации, в условиях гипоксии, в лунки с ММСК добавляли свежие нейтрофилы. Планшеты инкубировали при 37 °C в течение 12–18 ч.

Для постановки кокультивирования ММСК в среде RPMI-1640 их помещали в трансвеллу лунки 24-луночных планшетов на 24 ч. при 5% CO₂, 37 °C. После 24-часовой инкубации в условиях гипоксии вносили макрофаги в лунки и клетки культивировали в течение 48 ч. при 5% CO₂, 37 °C.

Оценку люминолзависимой (1 ммоль/л) и форбол-12-миристат-13-ацетат-индуцированной (ФМА-индуцированной) (0,5 мкг/мл) хемилюминесценции нейтрофилов и макрофагов проводили с помощью хемилюминометра Lum-100 (Россия), определяли максимальное значение интенсивности хемилюминесценции ($I_{\max}$).

Статистический метод

Обработку данных и построение графиков проводили в программе Statistica 8.0. Для представления полученных данных использовали показатели медианы, нижнего и верхнего квартилей (25-й÷75-й процентиля). Для сравнения 2 зависимых групп использовали критерий Вилкоксона, для сравнения 2 независимых групп – критерий Манна – Уитни.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фенотипическая характеристика ММСК в условиях гипоксии

Согласно мнению специалистов Международного сообщества по клеточной терапии, фенотип ММСК определяется как CD90⁺CD105⁺CD44⁺CD119⁺CD34⁺CD45⁺CD31⁺, где экспрессия положительных маркеров должна составлять не менее 95%, а отрицательных – не более 2,5%. Для соответствия фенотипа ММСК рекомендовано проводить оценку по двум и более положительным и отрицательным маркерам.

В данном исследовании проведено иммунофенотипирование ММСК костного мозга (рис. 1А–1Е) и жировой ткани (рис. 1Ж–1М) по трем положительным маркерам – CD105, CD190 и CD44, двум отрицательным – CD34 и CD45. Установлено, что в условиях гипоксии статистически значимо снижалась экспрессия CD105 (эндоглина, входящего в рецепторный комплекс TGF-β и играющего ключевую роль в ангиогенезе) на мембране ММСК костного мозга (рис. 1А, 1Г) и CD90 (адгезивная



молекула, участвующая в межклеточном взаимодействии, а также взаимодействии между клетками и внеклеточным матриксом) на ММСК жировой ткани (рис. 13, 1Л) на фоне отсутствия изменений в экспрессии CD44 (интегральный клеточный гликопротеин, играющий важную роль в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции) по сравнению с аналогичными показателями ММСК (рис. 1В, 1И), культивируемых в условиях нормоксии (рис. 1Е, 1М).

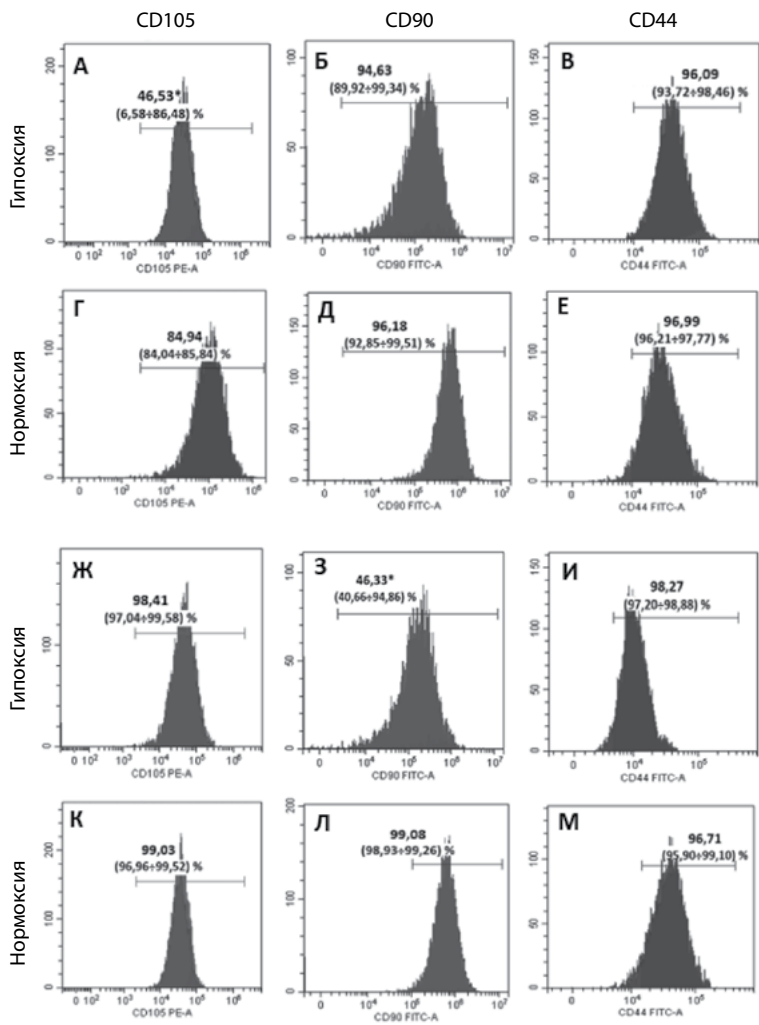


Рис. 1. Уровень экспрессии маркеров ММСК костного мозга и жировой ткани в условиях гипоксии и нормоксии

Примечание: * $p < 0,05$, статистически значимые различия указаны по сравнению с нормоксией.

Fig. 1. The level of expression of MMSCs markers of bone marrow and adipose tissue under conditions of hypoxia and normoxia

Уровень экспрессии негативных маркеров CD45 (гематопэтический маркер, регулятор роста и дифференцировки клеток) и CD34 (молекула клеточной адгезии) на ММСК варьировал от 0,00 до 1,00% и не зависел от условий культивирования клеточных культур.

Согласно данным литературы, экспрессия эндоглина на ММСК опосредует передачу сигналов от TGF- β в контроле хондрогенной дифференцировки ММСК, а также взаимодействие между ММСК и кроветворными клетками в микроокружении костного мозга, в связи с чем его снижение может влиять на пролиферацию и дифференцировку клеток, развитие кровеносных сосудов [8].

CD90 играет роль в адгезии клеточного матрикса и межклеточной адгезии между медиаторами воспаления, иммунного ответа, обеспечивает адгезию лейкоцитов и моноцитов к эндотелиоцитам и фибробластам, опосредует регенерацию нервов, рост дендритов и аксонов нервов, восстановление тканей в результате воспаления.

CD44 функционирует как рецептор для гиалуроновой кислоты и многих других компонентов внеклеточного матрикса, а также кофактор для факторов роста и цитокинов, в связи с чем CD44 является платформой, которая интегрирует сигналы клеточной микросреды, факторов роста и цитокинов, передает их мембраносвязанным белкам цитоскелета или ядру для регулирования различных уровней экспрессии генов, связанных с адгезией клеточного матрикса, миграцией клеток, пролиферацией, дифференцировкой и выживанием [5].

В работе Andreeva и соавт. установлено, что пониженное содержание кислорода (5% по сравнению с окружающим – 20%) в культуральной среде не оказывало никакого влияния на иммунофенотип стромальных клеток [20]. Kwon и соавт. выявили пониженную экспрессию положительных маркеров CD44, CD73, CD90 и CD105 на ММСК при гипоксическом состоянии и пониженную экспрессию отрицательных маркеров CD31, CD34, CD45, что согласуется с полученными данными [7].

Изменение экспрессии маркеров CD105 и CD90 может являться возможной причиной угнетения ангиогенеза и репаративных свойств ММСК. В связи с этим определение уровня экспрессии поверхностных маркеров ММСК способствует установлению функциональных свойств ММСК и может определять выбор области применения в клеточной терапии.

Влияние гипоксии на ростовые факторы ММСК

Принимая во внимание выявленные изменения в фенотипе ММСК в условиях гипоксии, для определения функционального состояния клеточных культур проведена оценка синтеза ангиогенного фактора (VEGFR2) и факторов репарации (PDGF-D, MMP3, FGF2) в супернатантах культур ММСК костного мозга и жировой ткани.

Установлено увеличение синтеза VEGFR2 в культуре ММСК костного мозга и жировой ткани в условиях дефицита O₂ при культивировании на протяжении 72 ч. относительно аналогичных культур ММСК в условиях нормального уровня кислорода ($p < 0,05$) (рис. 2А, 2Б). Интенсивность стимуляции VEGFR2 была более выраженной в культурах ММСК, полученных из жировой ткани ($SI=15,5$), по сравнению с ММСК из костного мозга.

Выявлено повышение продукции PDGF-D в культуре ММСК костного мозга в условиях отсутствия кислорода при культивировании в течение 48 ч. относительно ММСК, культивируемых при нормальном уровне O₂ ($p < 0,05$). Аналогично



при культивировании ММСК костного мозга и жировой ткани в условиях гипоксии в течение 72 ч. концентрация PDGF-D увеличивалась в 3 и 1,5 раза соответственно, по сравнению с ММСК, находящимися в условиях нормоксии ($p<0,05$) (рис. 2В, 2Г).

В гипоксических условиях культивирования ММСК жировой ткани в течение 72 ч. установлено увеличение концентрации MMP3 относительно ММСК, культивируемых в условиях нормального уровня кислорода ($p<0,05$) (рис. 2Е). Аналогично в культуре ММСК костного мозга в условиях дефицита кислорода наблюдалась тенденция к повышению синтеза MMP3 по сравнению с ММСК, культивируемыми при нормоксии (рис. 2Д).

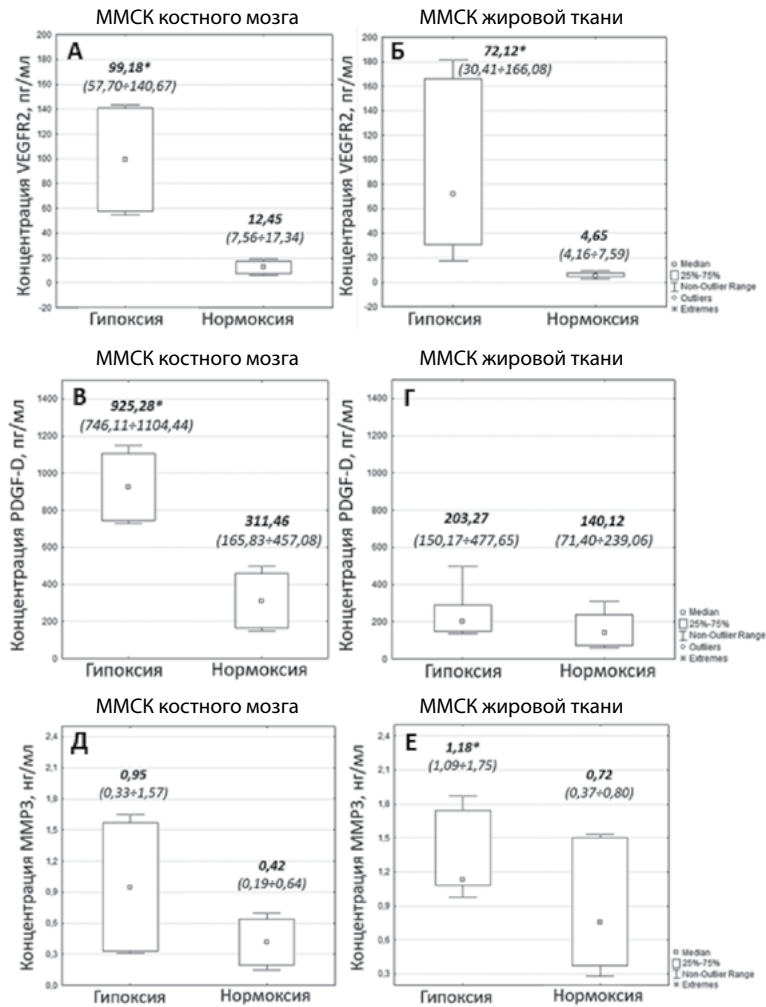


Рис. 2. Продукция ростовых факторов ММСК в условиях гипоксии и нормоксии

Примечание: * $p<0,05$, статистически значимые различия указаны по сравнению с нормоксией.

Fig. 2. Production of MMSCs growth factors in hypoxia and normoxia

Проведена оценка концентрации FGF2 в культуре ММСК, культивируемых в условиях гипоксии и нормоксии, и установлено, что различная концентрация кислорода не оказывала влияния на синтез FGF2.

Таким образом, изменение фенотипа ММСК отражает функциональные особенности культур в условиях гипоксии, а именно снижение экспрессии маркера CD90 ММСК жировой ткани сопровождается угнетением репаративных свойств за счет потери межклеточных контактов, а снижение экспрессии маркера CD105 ММСК костного мозга приводит к нарушению ангиогенеза вследствие изменения передачи сигналов от TGF-β.

Влияние гипоксии на продукцию цитокинов ММСК

Цитокины принимают участие в регуляции пролиферативных процессов, процессов дифференцировки, роста, деятельности клеток. Количественное содержание цитокинов и их соотношение отражают динамику патологического процесса, коррелируют с активностью заболевания, что позволяет судить об эффективности проводимой терапии [9]. В данном исследовании проведена оценка продукции провоспалительного IL-12 в культурах ММСК костного мозга и жировой ткани в условиях гипоксии и нормоксии при культивировании в течение 72 ч. Установлено значительное снижение концентрации IL-12 в культуре ММСК костного мозга в условиях гипоксии относительно ММСК, культивируемых в условиях нормоксии (p<0,05). Выявлено увеличение концентрации IL-12 в культуре ММСК жировой ткани, культивируемых при отсутствии кислорода, относительно культур, культивируемых при нормальном уровне O₂ (p<0,05) (табл. 2).

Концентрация TNF-α в культуре ММСК костного мозга при 1–2%-ном содержании кислорода имела тенденцию к повышению относительно ММСК, культивируемых при условиях нормоксии. Синтез противовоспалительного цитокина IL-10 в культуре ММСК жировой ткани при дефиците O₂ снижался относительно ММСК, культивируемых при нормальном уровне кислорода (p<0,05). Уровень γIFN в исследуемых группах не определялся.

Таблица 2
Продукция цитокинов ММСК в условиях гипоксии и нормоксии
Table 2
Production of MMSCs cytokines under conditions of hypoxia and normoxia

Фактор	Источник ММСК	Гипоксия	Нормоксия	p
IL-10, нг/л	Костный мозг	–	–	–
	Жировая ткань	10,14 (9,86÷10,41)	13,08 (10,82÷15,34)	0,01
IL-12, мкг/л	Костный мозг	1,66 (0,86÷2,46)	7,35 (5,10÷9,60)	0,01
	Жировая ткань	1,52 (1,17÷2,04)	0,93 (0,35÷1,41)	0,04
TNF-α, нг/л	Костный мозг	19,97 (0,00÷39,94)	1,27 (0,00÷2,53)	0,43
	Жировая ткань	–	–	–

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с нормоксией.

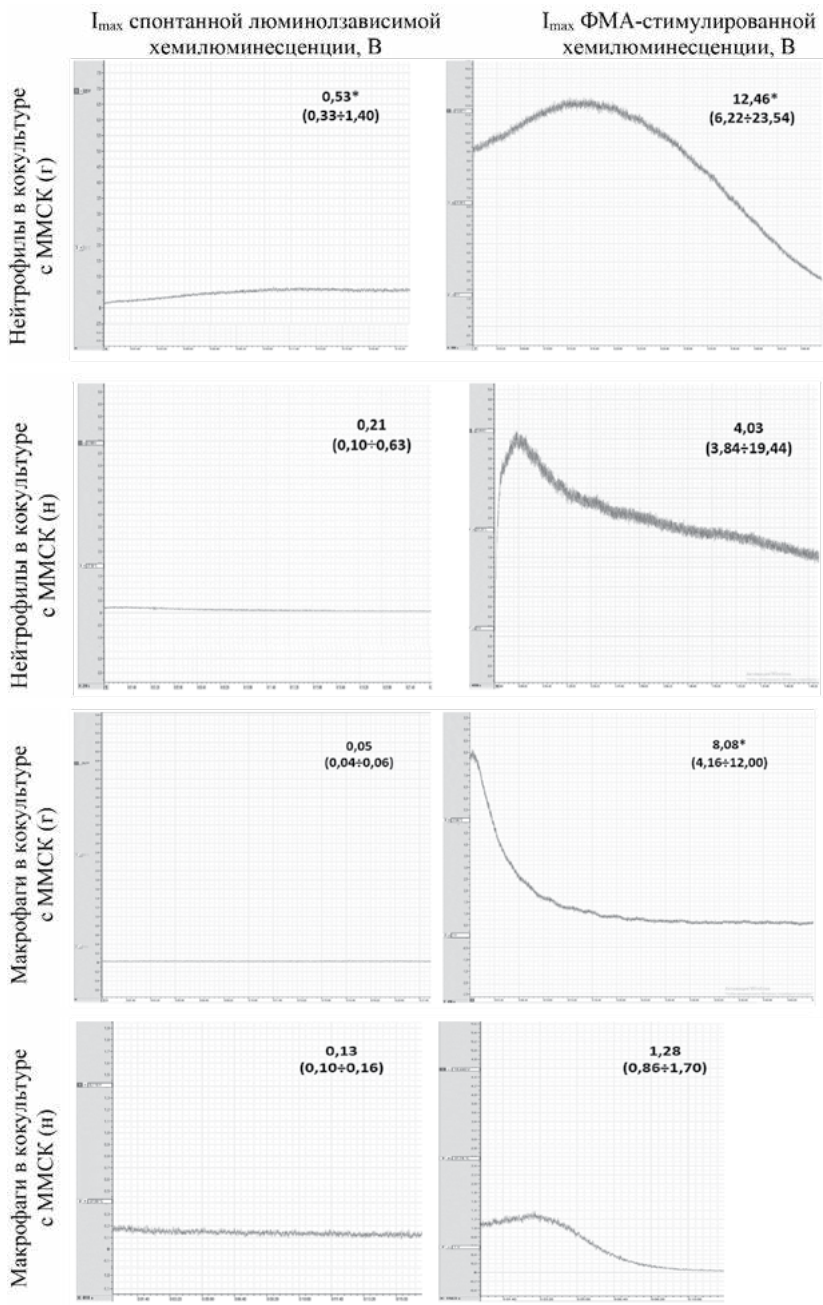


Рис. 3. Хемилюминесцентная активность нейтрофилов и макрофагов в кокультуре с ММСК

Примечания: * $p < 0,05$, статистически значимые различия указаны по сравнению с нормоксией; ММСК (n) – нормоксические ММСК; ММСК (r) – гипоксические ММСК.

Fig. 3. Chemiluminescent activity of neutrophils and macrophages in co-culture with MMSCs

Согласно Kotas и соавт., синтез TNF- α ММСК в условиях гипоксии приводит к выработке значительного количества белка, индуцируемого геном 6 фактора некроза опухоли (TSG-6). Во всех моделях TSG-6 ингибировал раннюю воспалительную реакцию, и в частности инфильтрацию нейтрофилов и провоспалительные цитокины.

Исследование уровня образования активных форм кислорода и антиоксидантной системы

В кокультуре с гипоксическими ММСК установлено увеличение $I_{\max}$ как спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов, так и ФМА-стимулированной относительно кокультур с ММСК, культивируемыми в условиях нормоксии ($p < 0,05$). В то же время в кокультурах с макрофагами отмечалось повышение ФМА-стимулированной люминолзависимой хемилюминесценции в присутствии гипоксических ММСК относительно ММСК, культивируемых в условиях нормоксии ($p < 0,05$), при отсутствии статистически значимых изменений в спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции макрофагальных фагоцитов (рис. 3).

Таким образом, пробоподготовка ММСК в условиях гипоксии способствует усилению стимулированной хемилюминесцентной активности нейтрофилов и макрофагов. Результаты исследования согласуются с данными Cassatella и соавт., которые показали, что ММСК могут поддерживать и сохранять жизнеспособность и функции фагоцитов за счет согласованного действия эндогенно продуцируемых IL-6 и β IFN, определяющих большинство иммуномодулирующих эффектов.

Влияние гипоксии на антиокислительные факторы ММСК

Проведена оценка уровня антиокислительных ферментов MPO, eNOS, SOD3, каталазы и глутатиона в культуре ММСК в условиях гипоксии и нормоксии. Выявлено, что в условиях гипоксии и нормоксии содержание MPO не изменялось и составило 10,43% (рис. 4А, 4В). MPO является основным элементом нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs) и необходима для их образования, способствует активации протеаз и их высвобождению в ядрах, что приводит к деградации гистонов и деконденсации хроматина. ММСК могут непосредственно ослаблять кислородный взрыв нейтрофилов. Часть антиоксидантного ответа стволовых клеток может зависеть от контакта с клеткой, но паракринная активность, по-видимому, играет фундаментальную роль [10].

Установлено снижение уровня eNOS в культуре ММСК в условиях гипоксии по сравнению с контрольной группой (рис. 4Б, 4Г). eNOS, производная оксида азота (NO), регулирует многие важные функции, включая сосудистый тонус и региональный кровоток, пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, взаимодействие лейкоцитов и эндотелия и тромбоз. eNOS отвечает за выработку NO, который важен для поддержания целостности сосудов и может усиливать васкулогенез посредством передачи сигналов фактора роста фибробластов. VEGFR2 также индуцируется путем синтеза NO, способствуя ангиогенезу [11].

Проведена оценка продукции SOD3 в культурах ММСК костного мозга и жировой ткани в условиях гипоксии и нормоксии при культивировании в течение 72 ч. Установлено значительное увеличение концентрации SOD3 в культуре ММСК костного мозга (рис. 5А) и жировой ткани (рис. 5Б) при условиях гипоксии относительно ММСК, культивируемых в условиях нормоксии ($p < 0,05$). В то же время в условиях

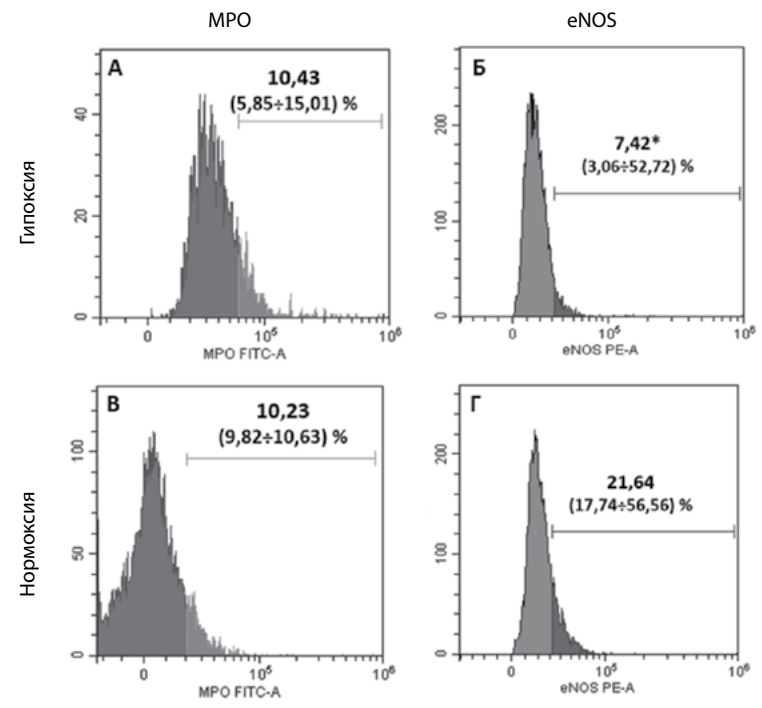


Рис. 4. Уровень синтеза MPO и eNOS MMCK в условиях гипоксии и нормоксии

Примечание: * $p < 0,05$, статистически значимые различия указаны по сравнению с нормоксией.

Fig. 4. The level of synthesis of MPO and eNOS MMSC in hypoxia and normoxia

гипоксии показатели стимуляции SOD3 (SI) по отношению к нормоксии были одинаковыми как в культурах MMCK костного мозга (SI=2,0), так и в культурах MMCK, полученных из жировой ткани (SI=2,3).

SOD3 является одним из антиоксидантных ферментов, который обладает иммуномодулирующими, антиангиогенными, антихемотаксическими и противовоспалительными свойствами. Синтезируя перекись водорода, SOD3 может стимулировать образование фактора роста эндотелия сосудов, который стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток, регулирует развитие и формирование кровеносных сосудов, а также увеличивает проницаемость сосудов и хемотаксис эндотелиальных клеток [12].

Установлен уровень каталазы в культуре MMCK, культивируемых в условиях гипоксии и нормоксии (рис. 5B). Каталаза является одним из важнейших антиоксидантных ферментов, который в значительной степени смягчает окислительный стресс, разрушая клеточную перекись водорода с образованием воды и кислорода. MMCK ослабляют окислительный стресс, вызванный активными формами кислорода, и это антиоксидантное действие обусловлено присутствием каталазы в экзосомах. Каталаза

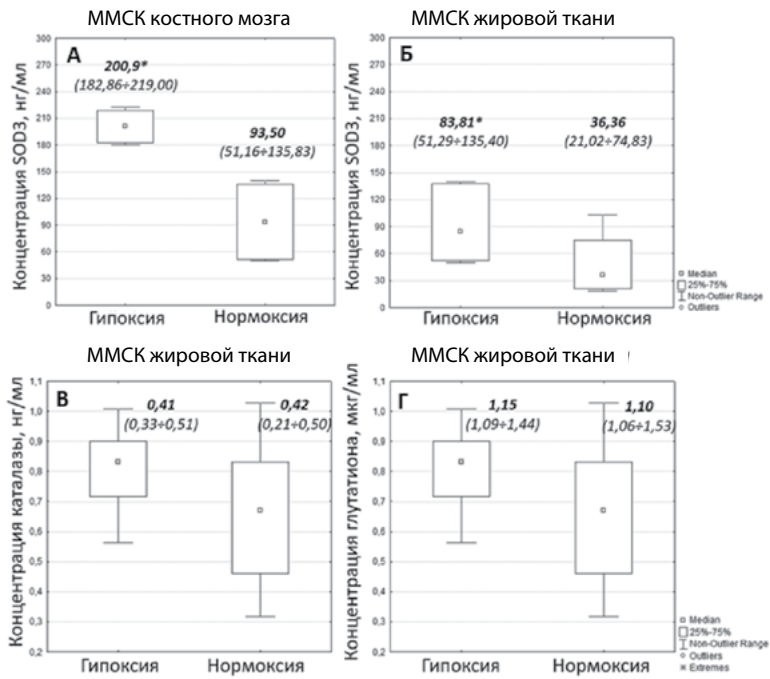


Рис. 5. Уровень синтеза SOD3, каталазы и глутатиона MMCK в условиях гипоксии и нормоксии

Примечание: * $p < 0,05$, статистически значимые различия указаны по сравнению с нормоксией.

Fig. 5. The level of synthesis of SOD3, catalase and glutathione MMSC in hypoxia and normoxia

может присутствовать в растворимой форме в секрете MMCK или адсорбироваться на внешней поверхности экзосом [13].

Определено содержание глутатиона в супернатантах культур MMCK, культивируемых в условиях гипоксии и нормоксии, статистически значимых различий не установлено (рис. 5Г).

Восстановленный глутатион представляет собой низкомолекулярный тиол, осуществляющий разрушение свободных радикалов. Глутатион в восстановленной форме может функционировать как антиоксидант многими способами: химически взаимодействовать с синглетным кислородом, супероксидом и радикалами гидроксила или напрямую разрушать свободные радикалы; стабилизировать мембранную структуру перемещением ацилпероксидов, образующихся путем перекисного окисления липидов. Глутатион является коферментом ряда ферментов, активность которых основана на изменении редокс-потенциала глутатиона [21].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К условиям дефицита кислорода (1–2%) более чувствительны MMCK костного мозга, чем MMCK жировой ткани, что проявлялось изменением морфологии клеток



к 3-м суткам культивирования. Гипоксия способствует снижению экспрессии маркеров CD105 и CD90 на ММСК костного мозга и жировой ткани, соответственно, влияет как на антиоксидантные свойства клеточных культур, так и на синтез факторов роста, участвующих в процессе ангиогенеза, что необходимо учитывать при моделировании иммунопатологических процессов, связанных с окислительным стрессом.

Условия дефицита кислорода повышают продукцию рецептора 2-го типа к VEGF, MMP 3-го типа, PDGF-D, что, соответственно, усиливает репаративные и ангиогенные свойства. Наряду с этим, прекондиционирование клеток в условиях гипоксии способствует снижению продукции провоспалительного IL-12, увеличению противовоспалительного IL-10 и не изменяет уровень синтеза TNF- α и IFN- γ в культурах ММСК, что может использоваться для регуляции воспалительной реакции.

Гипоксия стимулирует синтез SOD3, снижает синтез NO-синтазы и увеличивает синтез активных форм кислорода в культуре с гипоксическими ММСК по сравнению с контрольной группой. В кокультуре клеток врожденного иммунитета с гипоксическими ММСК увеличивается максимальное значение интенсивности хемилюминесценции ($I_{\max}$), как спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов, так и ФМА-стимулированной, относительно кокультур с ММСК, культивируемыми в условиях нормоксии. В кокультурах с макрофагами повышается ФМА-стимулированная люминолзависимая хемилюминесценция в присутствии гипоксических ММСК относительно ММСК, культивируемых в условиях нормоксии, при отсутствии статистически значимых изменений в спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции макрофагальных фагоцитов.

ММСК непосредственно влияют на уровень окислительного стресса и тем самым могут уменьшать объем клеточного повреждения, снижать воспаление и модулировать нарушения клеточного метаболизма, что может объяснять их цитопротекторные и противовоспалительные свойства. Среди основных эффектов предполагается прямое удаление свободных радикалов, усиление эндогенной антиоксидантной защиты, иммуномодуляция воспалительной реакции посредством подавления активных форм кислорода, стимуляция клеточного дыхания. Данные антиокислительные эффекты опосредуются не только за счет клеточных контактов, но и при помощи секрета ММСК, включающего ростовые факторы и иммунологические молекулы.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Almeria C., Weiss R., Roy M. Hypoxia Conditioned Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Induce Increased Vascular Tube Formation in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7:1–12. doi: 10.3389/fbioe.2019.00292
2. Bahir B., Choudhery M., Hussain I. Hypoxic Preconditioning as a Strategy to Maintain the Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Regenerative Medicine*. 2022;11:1–15. doi: 10.5772/intechopen.93217
3. Capek J., Rousar T. Detection of Oxidative Stress Induced by Nanomaterials in Cells – The Roles of Reactive Oxygen Species and Glutathione. *Molecules*. 2021;26(4710):1–20. doi: 10.3390/molecules26164710
4. Ferreira J.R., Teixeira G.Q., Santos S.G. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(2837):1–17. doi: 10.3389/fimmu.2018.02837
5. Kosol W., Kumar S., Marrero-Berrios I. Medium conditioned by human mesenchymal stromal cells reverses low serum and hypoxia-induced inhibition of wound closure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;20:1–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.071
6. Kotas M.E., Matthay M.A. Mesenchymal stromal cells and macrophages in sepsis: new insights. *Eur Respir J*. 2018;51:1–4. doi: 10.1183/13993003.00510-2018
7. Kwon S.Y., Chun S.Y., Ha Y.S. Hypoxia Enhances Cell Properties of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Regen Med*. 2017;12(22):1–10. doi: 10.1007/s13770-017-0068-8
8. Mirshafiey A., Asghari B., Ghalamfarsa G. The Significance of Matrix Metalloproteinases in the Immunopathogenesis and Treatment of Multiple Sclerosis. *SQU Medical Journal*. 2014;14(1):13–25. doi: 10.12816/0003332/

9. Murphy M.B., Moncivais K., Caplan A. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine*. 2013;45:1–16. doi: 10.1038/emm.2013.94
10. Najjar M., Krayem M., Merimi M. Insights into inflammatory priming of mesenchymal stromal cells: functional biological impacts. *Inflammation Research*. 2018;14(22):1–11. doi: 10.1007/s00011-018-1131-1
11. Najjar M., Raicevic G., Crompton E. The Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cells: A Story of a Regulatory Network. *J Immunother*. 2016;39(2):45–59. doi: 10.1097/CJI.0000000000000108
12. Neculachi C.A., Burlacu A., Mihai B.P. Inflammation and Hypoxia Negatively Impact the Survival and Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. *Romanian Journal of Cardiology*. 2021;31(3):547–554. doi: 10.47803/rjc.2021.31.3.547
13. Rodriguez-Fuentes D.E., Fernandez-Garza L.E., Samia-Meza J.A. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Archives of Medical Research*. 2021;52:93–101. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.08.006
14. Siegel G., Schafer R., Dazzi F. The Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation*. 2009;87:45–49. doi: 10.1097/TP.0b013e3181a285b0
15. Tao H., Han Z., Han Z.C. Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem Cells International*. 2016;11:1–12. doi: 10.1155/2016/1314709
16. Verges S., Chacaroun S., Godin-Ribuot D. Hypoxic conditioning as a new therapeutic modality. *Frontiers in Pediatrics*. 2015;3:1–14. doi: 10.3389/fped.2015.00058
17. Wang T., Jian Z., Baskys A. MSC-derived exosomes protect against oxidative stress-induced skin injury via adaptive regulation of the NRF2 defense system. *Biomaterials*. 2020;257:1–18. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120264
18. Wang X., Bove A.M., Simone G. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8(59):1–12. doi: 10.3389/fcell.2020.599281
19. Wei F., Li Z., Crawford R. Immunoregulatory role of exosomes derived from differentiating mesenchymal stromal cells on inflammation and osteogenesis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13:1978–1991. doi: 10.1002/term.2947
20. Weiss D.J., English K., Krasnodembskaya A. The Necrobiology of Mesenchymal Stromal Cells Affects Therapeutic Efficacy. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(1228):1–12. doi: 10.3389/fimmu.2019.01228
21. Wu X., Jiang J., Gu Z.X. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(345):1–16. doi: 10.1186/s13287-020-01855-9
22. Xiong Z., Wang Q., Li W. Platelet-Derived Growth Factor-D Activates Complement System to Propagate Macrophage Polarization and Neovascularization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:1–16. doi: 10.3389/fcell.2021.686886