

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И АНГИОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И КОСТНОГО МОЗГА

© А. Ю. Ефименко,¹ Е. Е. Старостина, К. А. Рубина, Н. И. Калинина, Е. В. Парфенова

*Лаборатория генных и клеточных технологий в медицине
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;*

¹электронный адрес: *efimenkoan@gmail.com*

Прогениторные стромальные клетки, выделенные из жировой ткани (СКЖТ) или костного мозга (СККМ), обладают огромным потенциалом в клеточной терапии заболеваний ишемического генеза. Эти клетки секретируют набор факторов, стимулирующих рост кровеносных сосудов, поэтому на различных моделях ишемии было показано, что системное или внутримышечное введение СКЖТ или СККМ животным вызывает улучшение васкуляризации поврежденных тканей. Однако недостаток кислорода и воспаление в зоне ишемии могут вызывать гибель вводимых клеток и снижать их функциональную активность. Поэтому цель нашей работы заключалась в оценке изменений свойств СКЖТ и СККМ *in vitro* в условиях гипоксии и при добавлении факторов воспаления. Культивируемые СКЖТ и СККМ мышей линии Balb/c подвергали воздействию гипоксии или воспалительных цитокинов. С помощью анализа связывания аннексина V и накопления 7AAD, а также метода TUNEL мы обнаружили, что гипоксия не вызывает гибели клеток, тогда как воздействие воспалительных цитокинов приводит к апоптозу 70 % клеток. При этом воспалительные факторы не вызывали повышения экспрессии генов факторов роста, стимулирующих рост кровеносных сосудов. Напротив, культивирование СКЖТ и СККМ в условиях гипоксии приводило к активации экспрессии генов проангиогенных факторов и подавлению антиангиогенных. При этом активация экспрессии проангиогенных факторов в СКЖТ была более выраженной. На моделях ангиогенеза *in vivo* и *in vitro* мы установили, что инкубация стромальных клеток в условиях гипоксии повышает их способность стимулировать рост кровеносных сосудов.

Ключевые слова: стромальные клетки жировой ткани, стромальные клетки костного мозга, ангиогенез, гипоксия, воспалительные цитокины.

Принятые сокращения: ПЦР — полимеразная цепная реакция, СКЖТ — стромальные клетки жировой ткани, СККМ — стромальные клетки костного мозга, ЭБС — эмбриональная бычья сыворотка, 7AAD — 7-аминоактиномицин D, bFGF — основной фактор роста фибробластов, ENDS — эндостатин; HGF — фактор роста гепатоцитов, HIF — активируемый гипоксией фактор, IL — интерлейкин, MCP-1 — хематоксический фактор моноцитов, MMP — металлопротеиназа, PAI-1 — ингибитор активатора плазминогена, PDGFB — высвобождаемый тромбоцитами ростовой фактор бета, PIGF — плацентарный ростовой фактор, SDF-1 — фактор, выделяемый стромальными клетками, TBS — тромбоспондин, uPA — урокиназа, uPAR — урокиназный рецептор, VEGF — фактор роста эндотелия сосудов; TGFβ — трансформирующий ростовой фактор-β, TNFα — фактор некроза опухолей альфа.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки были впервые описаны Фриденштейном (Friedenstein et al., 1976), который установил, что костный мозг наряду с гемопоэтическими стволовыми клетками также содержит прогениторные клетки, способные давать начало клеткам соединительной ткани: адипоцитам, хондроцитам, остецитам и фибробластам. Позже клетки со сходным фенотипом и экспрессией поверхностных антигенов были обнаружены в строме жировой ткани (Gronthos et al., 2001; Lee et al., 2004; Тракуев и др., 2006; Gimble et al., 2007; Peroni et al., 2008). Прогениторные клетки жировой ткани также оказались способны к дифференцировке в адипоциты, хондробласты, остеобласты, миообласты, клетки глии и эндотелиальные клетки (Zuk et al., 2002;

Planat-Benard et al., 2004; Gimble et al., 2007; Schäffler, Buchler, 2007).

Благодаря своей способности продуцировать цитокины и факторы роста, стимулирующие регенерацию тканей, стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) и стромальные клетки костного мозга (СККМ) являются перспективным материалом для клеточной терапии (Парфенова и др., 2006). Так, локальное и системное введение стромальных клеток способствует увеличению количества сосудов в тканях с нарушенным кровоснабжением, приводит к улучшению кровотока в этих тканях и уменьшению или исчезновению симптомов ишемии, как было показано на различных моделях у экспериментальных животных (Miranville et al., 2004; Planat-Benard et al.,

2004; Парфенова и др., 2006; Moon et al., 2006; Nakagami et al., 2006). Было установлено, что этот эффект от введения СККМ и СКЖТ может быть обусловлен секрецией фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста гепатоцитов (HGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) этими клетками. Продуцируемые факторы стимулируют деление эндотелиальных клеток, их миграцию в область введения стромальных прогениторных клеток и встраивание в формирующиеся сосуды, а также способствуют мобилизации из костного мозга эндотелиальных предшественников, участвующих в образовании новых сосудов (Kinnaird et al., 2004; Rehman et al., 2004; Трактуев и др., 2006; Moon et al., 2006; Peroni et al., 2008). Однако недостаток кислорода и воздействие воспалительных факторов в зоне ишемии могут вызывать гибель вводимых клеток и подавлять их функциональную активность. Поэтому реакция СККМ и СКЖТ на такие воздействия будет во многом определять их терапевтическую эффективность.

Цель нашей работы заключалась в оценке жизнеспособности СКЖТ и СККМ, а также продукции ангиогенных факторов этими клетками под воздействием гипоксии и провоспалительных цитокинов. В результате был выявлен тип клеток, наиболее эффективный для индукции роста кровеносных сосудов в ишемизированных тканях.

Материал и методика

Исследование проводили на мышах линий Balb/c (самцы, возраст 8—10 нед), предоставленных биоклиникой ФГУ РКНПК Росмедтехнологий.

Реактивы коллагеназа I типа (Worthington Biochemical, США); диспаза (Sigma, Германия); bFGF и TNF α (R&D Systems, США); Inhibitor proteinase cocktail (Sigma, Германия); антитела крысы против HIF-1 alpha мыши (Abcam, США); Annexin V-PE и 7-AAD (BD Biosciences, США); набор TUNEL (Trevigen, 4827-30-K, США); наборы RNeasy Mini Kit и RNase Free DNase Set (Qiagen, Германия); набор Fermentas Reverse Transcription Reagents (Fermentas, США); SYBR Green PCR Master Mix и праймеры (Синтол, РФ); Growth factors reduced Matrigel (BD Biosciences, США); 40%-ный формалин (Sigma, Германия); антитела крысы против CXCR4 и CD31 антигенов мыши и соответствующие изотипические антитела (BD Pharmingen, США); антитела кролика против NG2 антигена мыши (Chemicon, США); вторичные антитела осы, конъюгированные с различными флуорохромами Alexa (Molecular Probes, США).

Клетки выделяли из костного мозга и жировой ткани мышей. Клетки выращивали в CO $_2$ -инкубаторе (5 % CO $_2$, 95 % воздуха) при 37 °C на среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM, GIBCO BRL), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС, HyClone), 100 Ед/мл пенициллина и 10 мкг/мл стрептомицина (GIBCO BRL).

Выделение СКЖТ из жировой ткани мышей. Стромальные клетки выделяли из подкожного жира мышей согласно описанной методике (Zuk et al., 2002). Выделенные клетки высаживали на чашки Петри (Coring) с плотностью $3.5 \cdot 10^3$ кл./см 2 . На следующий день среду культивирования заменяли на свежую. Смену среды проводили каждые 2—3 сут; при достижении монослоя клетки рассаживали в соотношении 1 : 2 с использо-

ванием 0.25%-ного раствора трипсина с ЭДТА. Для экспериментов использовали клетки 2-го пассажа, достигшие 70—80 % плотности монослоя.

Выделение СККМ из костного мозга мышей. Выделение клеток проводили согласно протоколу (Sun et al., 2003), с некоторыми модификациями. Костный мозг вымывали из бедренных и большеберцовых костей, осаждали и ресуспендировали в лизирующем буфере для эритроцитов. Далее полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновые мембраны (BD Falcon Cell Strainer) с размером пор 40 мкм, осаждали и ресуспендировали в среде роста (DMEM, содержащей 10 % ЭБС). Клетки высаживали на пластик в плотности $1 \cdot 10^6$ кл./см 2 , добавляли часть очищенных костных фрагментов и культивировали в той же среде. Оставшиеся костные фрагменты культивировали в среде DMEM, содержащей 20 % ЭБС, в течение 3 сут, после чего кондиционированную среду собирали, центрифугировали при 300 g в течение 5 мин и использовали для дальнейшего культивирования СККМ. Через 4 сут после высаживания среду культивирования во флаконах с СККМ и костными фрагментами заменяли на среду DMEM, содержащую 10 % ЭБС и 10 % кондиционированной среды. Смену среды проводили каждые 2—3 сут; при достижении монослоя клетки рассаживали в соотношении 1 : 2 с использованием 0.25%-ного раствора трипсина с ЭДТА. Начиная с 4-го пассажа клетки культивировали в присутствии bFGF (10 нг/мл). При таком способе культивирования через 7—8 пассажей получается популяция клеток, обогащенная стромальными клетками-предшественниками костного мозга (СККМ). Для экспериментов использовали клетки 7—8-го пассажей, достигшие 70—80 % плотности монослоя.

Моделирование гипоксии. За 1 сут до индукции гипоксии клеткам меняли среду культивирования на бессывороточную. Затем в течение 48 ч клетки обоих типов культивировали в условиях гипоксии (1 % кислорода) или нормоксии (20 % кислорода). Все изменения в клетках анализировали немедленно после изъятия клеток из гипоксического инкубатора.

Моделирование воспаления. За 1 сут до начала эксперимента клеткам заменяли среду культивирования на бессывороточную. Затем часть клеток в течение 24 ч культивировали в присутствии 50 нг/мл фактора некроза опухолей альфа (TNF α) или при замещении половины среды культивирования кондиционированной средой от активированных с помощью TNF α клеток линии THP-1. В качестве контроля использовали клетки, культивированные в стандартных условиях.

Электрофорез белков и иммуноблоттинг. Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия по методу Лэммли (Laemmli, Nature, 1971). Образцы клеток, лизированных в буфере, содержащем 1 % Тритона X-100, разделяли в 10%-ном ПААГ толщиной 1 мм (30 мкг белка на дорожку) при 120 В до выхода лидирующего красителя из геля. Для определения молекулярных масс белков использовали смесь окрашенных белков (BioRad). Перенос белков из геля на PVDF-мембрану (Millipore) осуществляли методом полусухого электроблоттинга (Peferoen, 1988) при 25 В в течение 45 мин в буфере для переноса белков.

После переноса мембрану в течение 60 мин инкубировали в буфере, содержащем 5 % обезжиренного молока и 0.01 % Tween-20, приготовленном на фосфатном буфере (PBS). Далее мембрану инкубировали при 4 °C в тече-

ние ночи с первичными моноклональными антителами мыши против HIF-1 α . Затем мембрану 3 раза по 20 мин промывали PBS, содержащим 0.01 % Tween-20, и в течение 60 мин инкубировали в растворе конъюгированных с пероксидазой хрена вторичных антител, распознающих антитела мыши. После этого мембрану 3 раза по 10 мин промывали PBS, содержащим 0.01 % Tween-20. Для визуализации полос белка использовали метод детекции хемилюминесценции при помощи рентгеновской пленки Bio Max (Kodak). Люминесценцию инициировали реакцией люминола с перекисью водорода (ECL, Amersham), катализируемой пероксидазой хрена, конъюгированной со вторичными антителами. Данные для каждого образца нормировали по содержанию в них белка GAPDH.

Оценка жизнеспособности клеток. Количество нежизнеспособных клеток оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии по связыванию аннексина V, конъюгированного с фикоэритрином (Annexin V-PE), и накоплению красителя 7-AAD. Для этого клетки открепляли от поверхности культурального пластика с помощью раствора ЭДТА, приготовленного на PBS (2 mM, 5 мин, 37 °C). Затем 100 мкл клеток в PBS ($1 \cdot 10^5$ — $10 \cdot 10^5$ кл./мл) инкубировали с Annexin V-PE 20 мин, отмывали буфером, прилагаемым к красителю, и добавляли 7-AAD на 5 мин. Окрашенные клетки анализировали с помощью проточного сортировщика MoFlo (Dako Cytomation). Определяли долю клеток на ранних стадиях апоптоза (Annexin V⁺ 7-AAD⁻), а также содержание живых (Annexin V⁻ 7-AAD⁻) и мертвых (Annexin V⁺ 7-AAD⁺) клеток. Гибель клеток путем апоптоза оценивали с помощью количественного метода TUNEL согласно руководству, приложенному к набору реактивов. Для этого часть клеток перед началом эксперимента высаживали на покровные стекла.

Выделение РНК из клеток проводили с использованием Qiagen RNeasy Mini Kit согласно методике, приложенной к набору. Для удаления геномной ДНК из образцов использовали ДНКазу, не содержащую РНКазы. Концентрацию РНК определяли по поглощению раствора РНК при длине волны 260 нм, а также по сравнению с образцами РНК известной концентрации.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени. Синтез кДНК проводили с использованием набора Fermentas Reverse Transcription Reagents согласно руководству пользователя, приложенному к набору. Количественную ПЦР в реальном времени проводили на аппарате Rotor-Gene R6-3000 (Corbett Research) с использованием SYBR Green PCR Master Mix (10 мкл), 1 мкл кДНК, синтезированной на 50 нг общей РНК, и 1 мкл смеси праймеров в концентрации 1—5 мкМ. Условия для ПЦР: 95 °C в течение 10 мин, затем 40 циклов 95 °C — 15 с, t °C — 20 с (где t — температура, эмпирически подобранная для каждой пары праймеров), 72 °C — 20 с. Были подобраны следующие пары праймеров: *vegf* (прямой 5'-AGAGCAGAAGTCCC-ATGAAGTGA-3' и обратный 5'-TCAATCGGACGGCAG-TAGCT-3'), *plgf* (прямой 5'-CCAAGGGGAAGAGGAA-GAGGAGTA-3' и обратный 5'-GCAGGGACGAGTCGGC-TAATAA-3'), *hgf* (прямой 5'-TCATTGGTAAAGGAGG-CAGCTATA-3' и обратный 5'-CTGGCATTTGATGCCAC-TCTTA-3'), *c-met* (прямой 5'-CAACGAGAGCTGTACCT-TGACCTTA-3' и обратный 5'-GCGGGACCAACTGTG-CAT-3'), *pdgfb* (прямой 5'-TCTCTGCTGCTACCTGCGT-CTGG-3' и обратный 5'-GTGTGCTCGGGTCATGTTCA-AGTC-3'), *tgfb* (прямой 5'-TGCCCCTATATTTGGAGCC-

TGGAC-3' и обратный 5'-GCCCCGGGTTGTGTTGGT-TGTAGAG-3'), *fgf2* (прямой 5'-GCGCCGCCTTCCC AC-CAG-3' и обратный 5'-AGCCAGCAGCCGTCATCTT-CCTT-3'), *ura* (прямой 5'-GAATGCG CCTGCTGTCC-3' и обратный 5'-AGGGTCGCTTCTGGTTGTC-3'), *upar* (прямой 5'-CGTTACC TCGAGTGTGCGTCCCTG-3' и обратный 5'-AGCCTCGGGTGTAGTCCATCCT-3'), *mmp2* (прямой 5'-AGTTCCTCCGTTCCGCTTCC-3' и обратный 5'-AGC-CTCGGGTGTAGTCCATCCT-3'), *mmp9* (прямой 5'-GCGGTGTGGGGCGAGGTG-3' и обратный 5'-CCAGG-GGGAAAGGCGT GTGC-3'), *pai-1* (прямой 5'-GCTTCAT-GCCCCACTTCTTCAA-3' и обратный 5'-ACCAGGCGTG-TCAGCTCGTCTAC-3'), *ends* (прямой 5'-AGTTTGGTCT-TGCTGCTGGT-3' и обратный 5'-AAGTCCCGGAAGA-AGAGTTTTG-3'), *tbs1* (прямой 5'-GCGCGGAGCTGGAT-GTA-3' и обратный 5'-AATGTCTTCTGGGGTGGTTC-3'), *sdf-1* (прямой 5'-CTCCAAACTGTGCCCTTCC-3' и обратный 5'-GGGTCAATGCACACTTGT-3'), *cxcr4* (прямой 5'-GTAACCACCACGGCTGTA-3' и обратный 5'-ACGCT-GCTGTAGAGGTTG-3'), *L7* (прямой 5'-CTCCGTCTGCG-GCAGATC-3' и обратный 5'-CAGCATGTTAATTGAAG-CCTTGTT-3'), *gapdh* (прямой 5'-GACCCCTTCATT GAC-CTCAACTAC-3' и обратный 5'-TGGTGGTGCAGGA-TGCTTGCTGA-3').

Содержание исследуемых мРНК нормировали по уровню сигнала, получаемого для кДНК *L7* и *gapdh* (гены домашнего хозяйства). Все эксперименты были дублированы для каждого образца клеток.

Формирование капиллярноподобных структур эндотелиальными клетками. Влияние кондиционированной среды СКЖТ и СККМ на рост кровеносных сосудов *in vitro* оценивали на модели образования капиллярноподобных структур. Для этого кондиционированную среду, полученную при культивировании СКЖТ и СККМ в различных условиях, концентрировали в 40 раз с использованием концентраторов с мол. массой 10 кДа (Centricon, Millipore). Затем эндотелиальные клетки вены пуповины человека (HUVES) 2—4-го пассажей высаживали на 48-луночный планшет, покрытый Матригелем, обедненным ростовыми факторами, в количестве $2 \cdot 10^4$ клеток на 1 лунку. При этом в среду роста HUVES добавляли концентрированную кондиционированную среду в соотношении 1 : 40. Каждый образец кондиционированной среды использовали не менее чем в двух лунках. В качестве отрицательного контроля использовали среду роста HUVES, не содержащую сыворотки, в качестве положительного контроля — среду роста HUVES, содержащую 20 % ЭБС. Планшет помещали в CO₂-инкубатор при 37 °C на 24 ч, после чего анализировали образование капиллярноподобных структур с помощью светового микроскопа (Leica, Германия). Суммарную длину трубчатых структур в 5 случайно выбранных полях зрения в каждой лунке подсчитывали на полученных изображениях (об. 10 \times) с помощью программы MetaMorph 5.0 (Universal Imaging).

Ангиогенез в подкожном имплантате Матригеля. Влияние СКЖТ на рост кровеносных сосудов *in vivo* оценивали на модели ангиогенеза в подкожном имплантате Матригеля. Для этого $7 \cdot 10^5$ СКЖТ 2-го пассажа, культивированных в стандартных условиях или в условиях гипоксии, вводили подкожно сингенным мышам линии Balb/c ($n = 8$) в виде суспензии в Матригеле, обедненном факторами роста. Введение осуществляли под наркозом (2.5%-ный раствор авертина интраперитонеально). Для инъекции 400 мкл холодного (4 °C) Мат-

ригеля смешивали со 100 мкл суспензии клеток в среде роста. В качестве отрицательного контроля вводили смесь Матригеля и 100 мкл среды без клеток, в качестве положительного контроля — Матригель с добавлением 50 нг/мл bFGF в присутствии гепарина. Инъекции проводили инсулиновым шприцем с иглой толщиной 23 G таким образом, чтобы Матригель успевал полимеризоваться под кожей и образовывал желеобразный имплантат неправильной формы.

Через 10 сут после подкожного введения суспензии клеток в Матригеле мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации, полностью изымали имплантаты и взвешивали их. Далее имплантаты Матригеля замораживали в жидком азоте в среде для заморозки тканей Tissue-Tek для последующего приготовления срезов и иммунофлуоресцентного окрашивания.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Оценку плотности кровеносных сосудов на срезах Матригеля, а также экспрессии CXCR4 культивируемыми клетками проводили с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания (Rubina et al., 2007). Кровеносные сосуды выявляли с помощью моноклональных антител крысы против маркерного антигена эндотелия сосудов мышцы (CD31) и вторичных антител ослы против крысы, конъюгированных с флуорохромом Alexa488. Для выявления зрелых сосудов часть срезов одновременно инкубировали с антителами кролика против маркера перicyтов NG2 мышцы и антителами ослы против кролика, конъюгированными с флуорохромом Alexa595. Ядра клеток докрашивали DAPI. В качестве отрицательного контроля срезы инкубировали с неспецифическими изотипическими иммуноглобулинами крысы и кролика. Полученные препараты анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа ZeissAxiovert 200M. Документирование изображений проводили с помощью цифровой видеокамеры AxioCam HRC и обработки в программе Axiovision (Zeiss, Германия). Размер сосудов и их плотность оценивали с помощью программного обеспечения MetaMorph 5.0 (Universal Imaging) и ClickCounter, как описано ранее (Rubina et al., 2007). Подсчет сосудов проводили в 5 полях зрения на срезе (по 12 срезов на каждый имплантат) при 20-кратном увеличении, отдельно выделяя капилляры (CD31-положительные образования без просвета или длиной менее 20 мкм), сосуды среднего диаметра (CD31-положительные образования диаметром или длиной 20—50 мкм) и

крупные сосуды (диаметром более 50 мкм). Полученное число сосудов в поле зрения нормировали на единицу площади среза.

Экспрессию CXCR4 на поверхности культивируемых СКЖТ и СККМ анализировали с помощью моноклональных антител крысы против CXCR4 мыши и вторичных антител ослы против крысы, конъюгированных с флуорохромом Alexa595. В качестве отрицательного контроля использовали изотипические иммуноглобулины крысы. Ядра клеток докрашивали DAPI. Полученные препараты анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа ZeissAxiovert 200M. Документирование изображений производили с помощью цифровой видеокамеры AxioCam (Zeiss, Германия) и обработки в программе Axiovision. Долю CXCR4-положительных клеток оценивали в 5 полях зрения при использовании об. 40×.

Анализ экспрессии CXCR4 с помощью проточной цитометрии. Экспрессию CXCR4 также оценивали с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки открепляли от поверхности культурального пластика раствором ЭДТА, приготовленным на PBS (2 mM, 5 мин, 37 °C). Затем 100 мкл клеток ($1 \cdot 10^5$ — $10 \cdot 10^5$ кл./мл) в PBS, содержащем 10 % сыворотки ослы, инкубировали с моноклональными антителами крысы против CXCR4 мыши, после отмывки инкубировали с вторичными антителами ослы против крысы, конъюгированными с флуорохромом Alexa488. В качестве отрицательного контроля использовали изотипические крысинные антитела. Окрашенные клетки анализировали на проточном сортировщике MoFlo (Dako Cytomation).

Статистический анализ. Статистический анализ данных проводили с использованием программы SigmaStat 9.0. Данные представлены в виде: средние величины \pm стандартная ошибка среднего. Для сравнения групп использовали *U*-критерий Манна—Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $P < 0.05$.

Результаты

Воспалительные цитокины подавляют жизнеспособность стромальных клеток. Для того чтобы выяснить, как воспалительные цитокины могут влиять на жизнеспособность СКЖТ и СККМ и способность этих клеток продуцировать факторы, стимули-

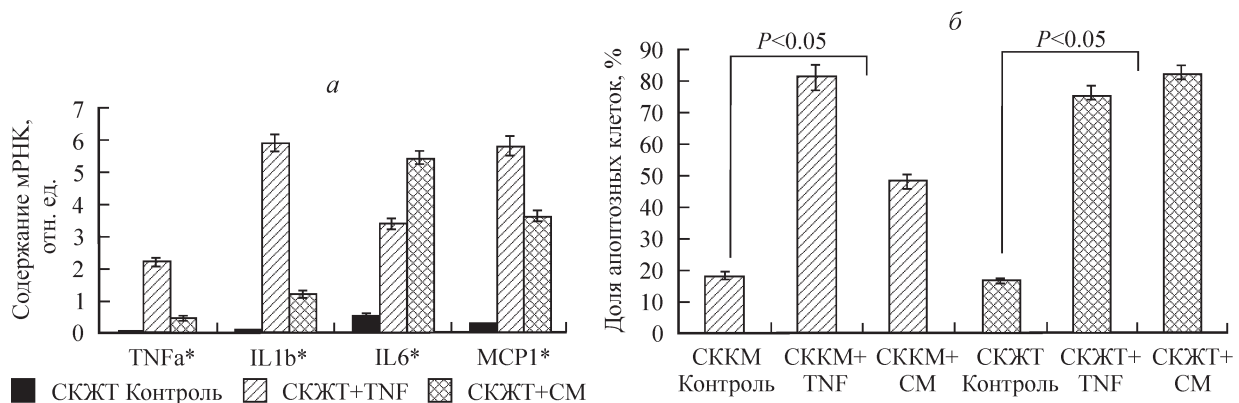


Рис. 1. Жизнеспособность стромальных клеток в присутствии воспалительных цитокинов.

a — содержание мРНК TNF α , IL1, IL6 и MCP1 в СКЖТ и СККМ в присутствии воспалительных цитокинов (по данным ПЦР в реальном времени), * $P < 0.05$; *б* — доля апоптотических клеток в СКЖТ и СККМ в присутствии воспалительных цитокинов (по данным метода TUNEL). CM — кондиционированная среда от активированных с помощью TNF α клеток линии THP-1.

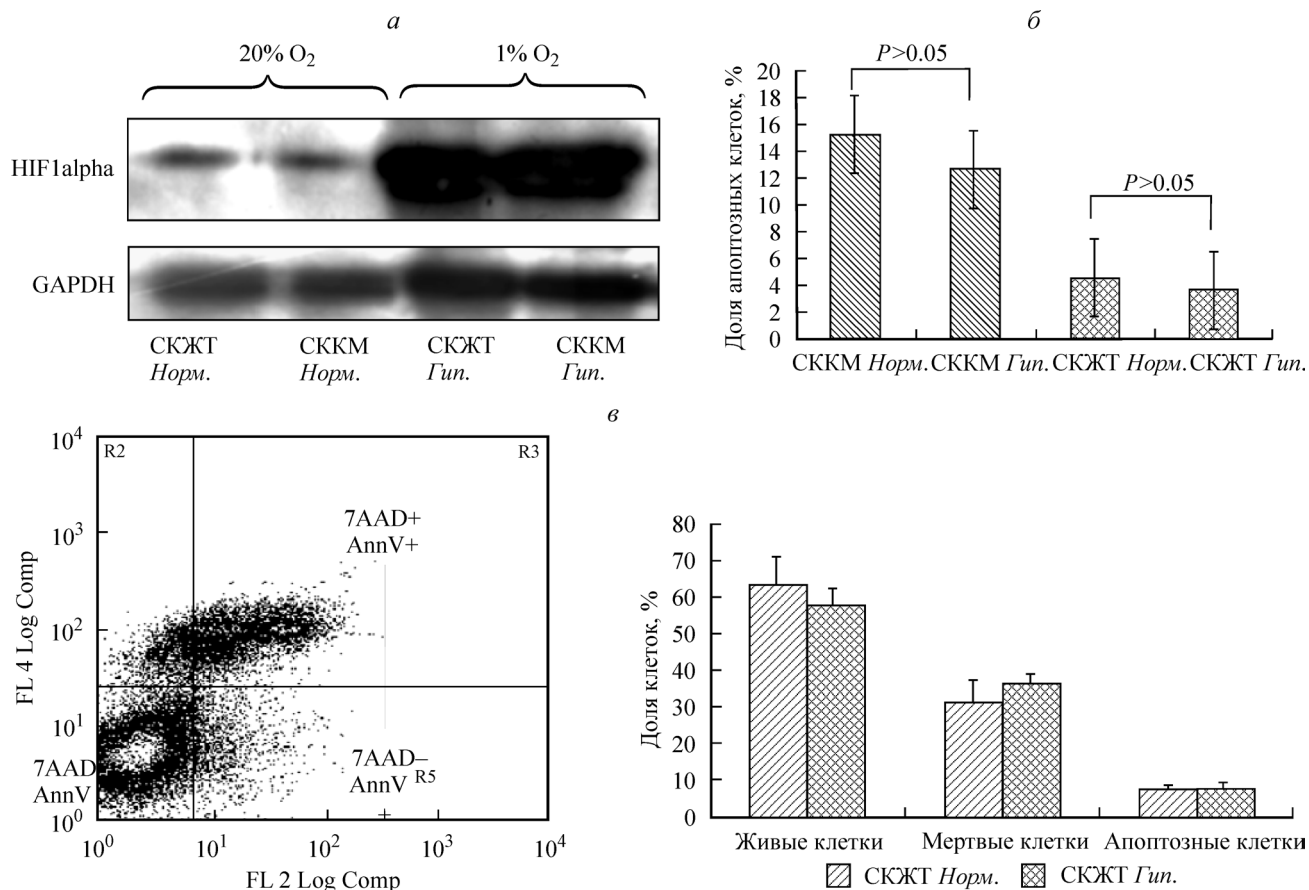


Рис. 2. Жизнеспособность стромальных клеток в условиях гипоксии.

а — содержание HIF-1 α в СКЖТ и СККМ в условиях гипоксии (по данным иммуноблоттинга); *б* — доля апоптотических клеток (по данным TUNEL-анализа) в популяциях СКЖТ и СККМ в условиях гипоксии; *в* — содержание апоптотических (Annexin V⁺ 7-AAD⁻) и мертвых (Annexin V⁺ 7-AAD⁺) клеток в популяциях СКЖТ и СККМ в условиях гипоксии (данные проточной цитофлуориметрии). Норм. и Гип. — соответственно нормоксия и гипоксия.

Влияние гипоксии на экспрессионный профиль СККМ и СКЖТ

Факторы	СККМ	СКЖТ
VEGF	2.25 ± 0.18	3.40 ± 0.60 ^а
PlGF	2.02 ± 0.63	4.83 ± 1.35 ^а
bFGF	1.43 ± 0.11	2.19 ± 0.66 ^а
HGF	1.79 ± 0.14 ^а	3.78 ± 0.74 ^а
c-met	3.08 ± 0.25 ^а	2.54 ± 0.54 ^а
PDGFB	—	3.36 ± 0.81 ^а
TGFb	4.23 ± 0.35 ^а	1.64 ± 0.38 ^б
uPA	0.91 ± 0.07	0.72 ± 0.11
uPAR	1.57 ± 0.13 ^а	2.19 ± 0.21 ^а
MMP2	0.26 ± 0.02 ^а	0.67 ± 0.13 ^а
MMP9	0.54 ± 0.04 ^а	0.55 ± 0.13 ^а
ENDS	0.49 ± 0.04 ^а	0.41 ± 0.11
TBS1	0.76 ± 0.06	0.57 ± 0.09 ^а
PAI-1	0.13 ± 0.01 ^а	0.67 ± 0.13 ^б
SDF-1	0.13 ± 0.02 ^а	0.51 ± 0.09 ^а
CXCR4	1.11 ± 0.06	1.36 ± 1.6

Примечание. Содержание в клетках мРНК генов факторов оценивали методом ПЦР в реальном времени с нормализацией результатов по уровню экспрессии *L7* и *gapdh*. Данные представлены как отношение содержания мРНК фактора в условиях гипоксии к стандартным условиям. ^а $P < 0.05$. ^б $0.05 < P < 0.08$.

рующие рост кровеносных сосудов, мы культивировали клетки в присутствии 50 нг/мл TNF α или кондиционированной среды от активированных с помощью TNF α моноцитов линии THP-1. Это вызывало повышение содержания в СКЖТ и СККМ мРНК провоспалительных цитокинов, включая мРНК TNF α , интерлейкинов 1 β и 6 (IL-1 и IL-6) и белка-хемоаттрактанта моноцитов (MCP-1), что свидетельствует об ответе клеток на добавление провоспалительных факторов (рис. 1, *а*). Однако ни TNF α , ни кондиционированная среда активированных моноцитов не вызвали в СКЖТ и СККМ достоверных изменений экспрессии генов как проангиогенных, так и антиангиогенных факторов роста. Можно отметить, что в ответ на воздействие воспалительных цитокинов наблюдалась тенденция к снижению экспрессии основных проангиогенных факторов в клетках обоих типов (данные не представлены).

Оценивая число клеток, в ядрах которых происходит фрагментация ДНК, методом TUNEL, мы обнаружили, что воздействие воспалительных цитокинов вызывает апоптоз более 70 % клеток (рис. 1, *б*).

Гипоксия стимулирует экспрессию генов ангиогенных факторов. Для того чтобы оценить влияние гипоксии на жизнеспособность СКЖТ и СККМ, а также способность этих клеток продуцировать факторы, стимулирующие рост кровеносных сосудов, мы культивировали их в условиях 1%-ного содержания O₂ в течение

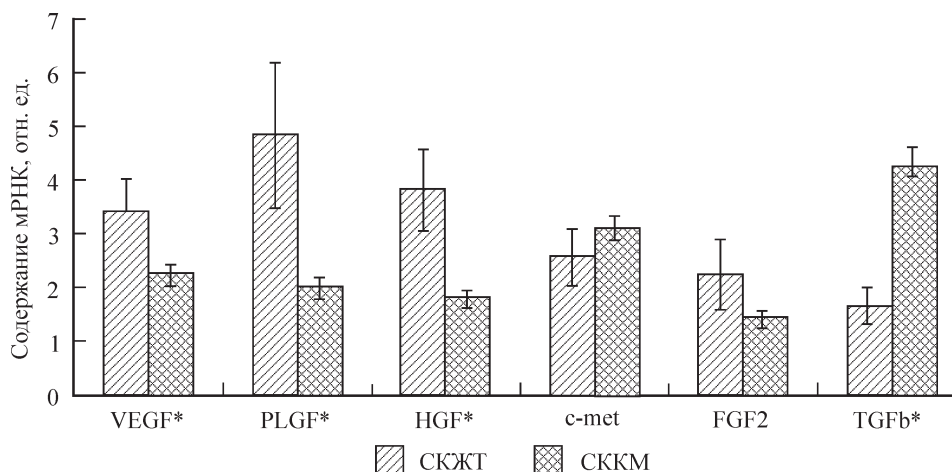


Рис. 3. Экспрессия генов проангиогенных факторов в СКЖТ и в СККМ в условиях гипоксии.

По горизонтали — проангиогенные факторы; по вертикали — отношение содержания мРНК при гипоксии к содержанию мРНК при нормоксии, отн. ед. Гипоксия повышает экспрессию генов проангиогенных факторов в СКЖТ в большей степени, чем в СККМ, * $P < 0.05$.

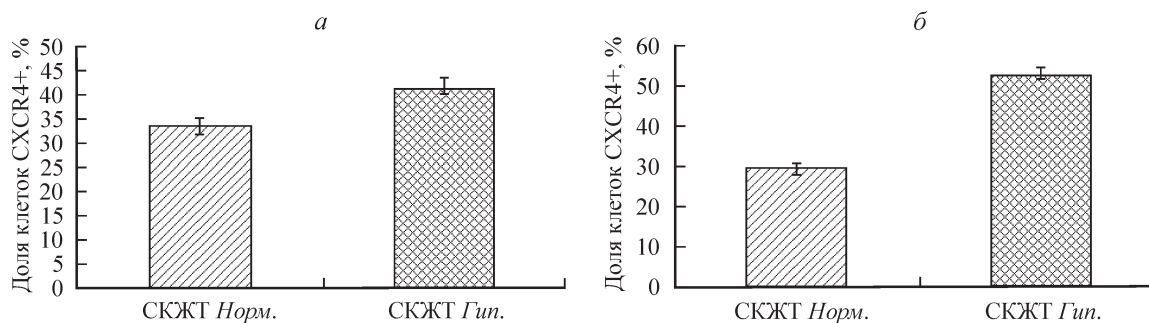


Рис. 4. Экспрессия CXCR4 на поверхности СКЖТ в условиях нормоксии (Норм.) или гипоксии (Гип.).

а — экспрессия клетками CXCR4 (данные проточной цитофлуориметрии); б — содержание CXCR4 в СКЖТ (данные иммунофлуоресцентного окрашивания).

48 ч, поскольку изменения в экспрессии генов в СККМ наиболее выражены при этих параметрах (Ohnishi et al., 2007; Potier et al., 2007). Культивирование СКЖТ и СККМ в условиях гипоксии вызывало повышение содержания белка HIF-1 α в этих клетках (рис. 2, а), что свидетельствует об их адекватном ответе на снижение уровня кислорода. С помощью цитометрического анализа связыва-

ния аннексина V и накопления в клетках 7-AAD, а также с помощью метода TUNEL мы установили, что культивирование стромальных клеток в условиях гипоксии не приводит к снижению их жизнеспособности и к гибели клеток путем апоптоза (рис. 2, б, в).

С помощью ПЦР в реальном времени было обнаружено, что культивирование клеток в условиях гипоксии вы-

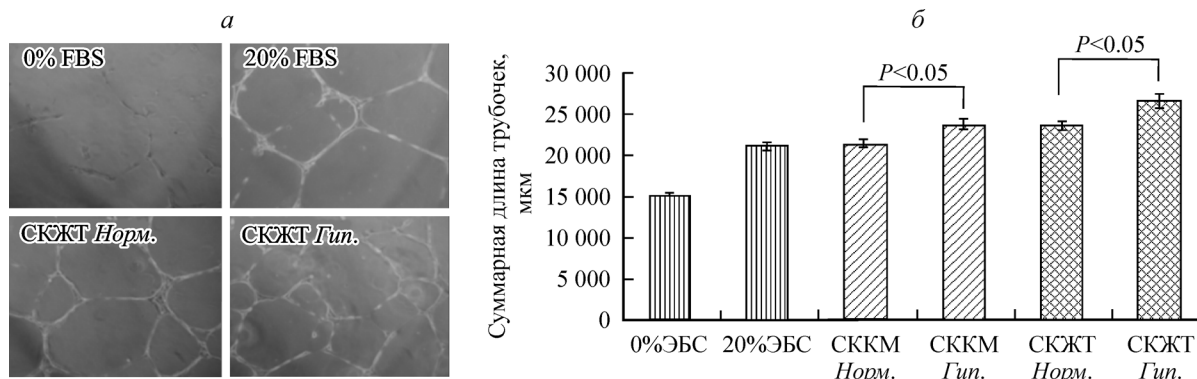


Рис. 5. Формирование капиллярноподобных структур эндотелиальными клетками под действием кондиционированной среды от СКЖТ и СККМ.

а — капиллярноподобные структуры, сформированные эндотелиальными клетками, в контроле (в среде, содержащей 20 % ЭБС) или в присутствии кондиционированной среды от СКЖТ и СККМ в условиях нормоксии (Норм.) или гипоксии (Гип.); б — суммарная длина трубочек, образованных эндотелиальными клетками.

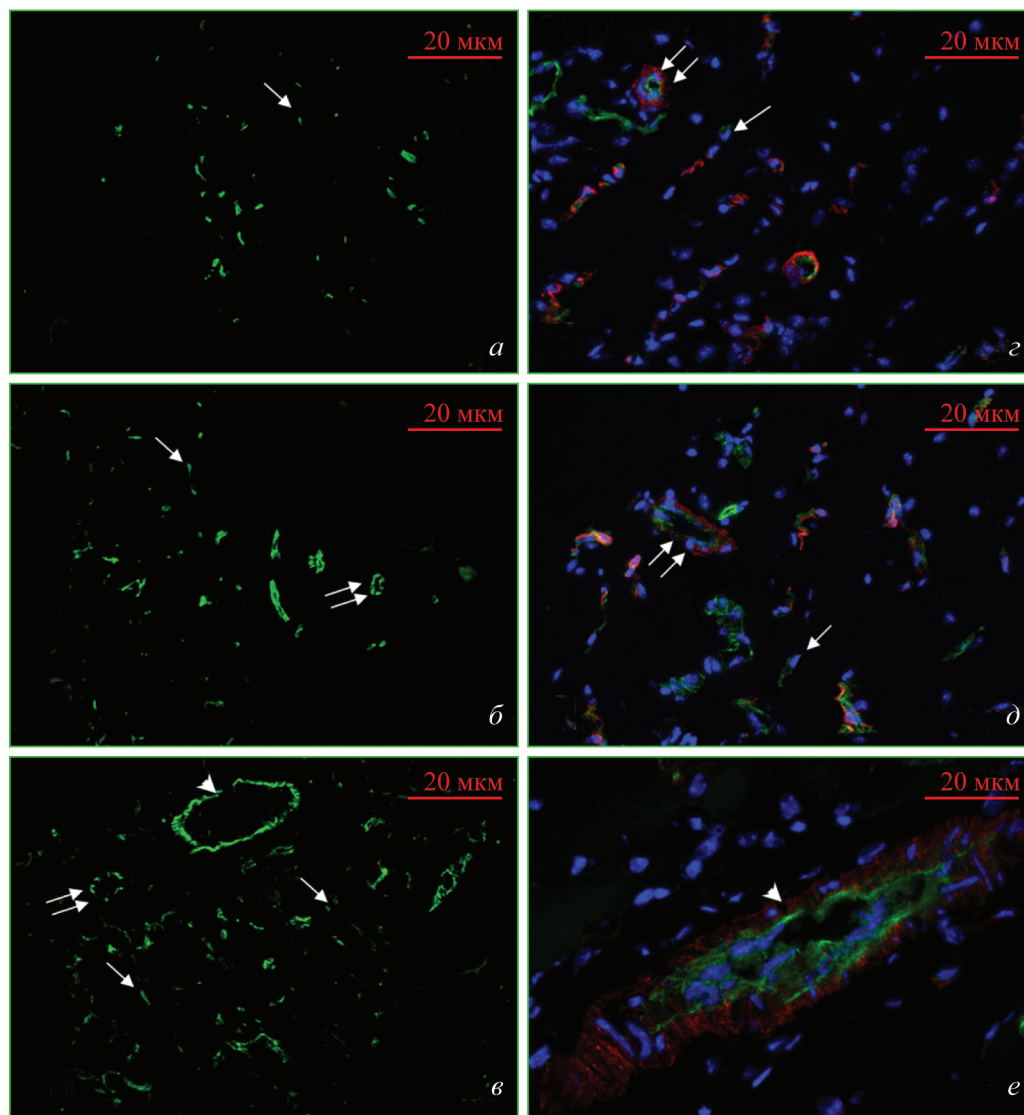


Рис. 6. Васкуляризация имплантатов Матригеля при введении СКЖТ, культивированных в стандартных или гипоксических условиях.

a–в — выявление эндотелия сосудов с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания замороженных срезов Матригеля антителами против CD31 (зеленая флуоресценция); *г–е* — выявление эндотелия и перicyтов с помощью двойного иммунофлуоресцентного окрашивания замороженных срезов Матригеля антителами против CD31 (зеленая флуоресценция) и антигена NG2 (красная флуоресценция). Ядра клеток окрашены DAPI (синяя флуоресценция). *a, г* — Матригель без клеток; *б, д* — Матригель, содержащий СКЖТ, культивированные в стандартных условиях; *в, е* — Матригель, содержащий СКЖТ, культивированные при гипоксии. Капилляры указаны *одинарными стрелками*, сосуды среднего калибра — *двойными стрелками*, крупные сосуды — *головками стрелок*. Об. 20×.

зывает повышение содержания мРНК проангиогенных факторов, включая фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), плацентарный фактор роста (PlGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), высвобождаемый тромбоцитами фактор роста В (PDGF β) и трансформирующий фактор роста β_1 (TGF- β_1) (см. таблицу). При этом стимуляция экспрессии VEGF, PlGF и HGF была более выраженной в СКЖТ, а TGF- β_1 — в СККМ (рис. 3). Кроме того, гипоксия стимулирует экспрессию рецептора HGF с-met и рецептора урoкиназы (uPAR) в клетках обоих типов. При этом культивирование клеток в гипоксических условиях приводило к подавлению экспрессии антиангиогенных факторов, включая ингибитор активатора плазминогена (PAI-1), ангиостатин (ENDS) и тромбоспондин (TSP1), а также вызывало снижение содержания мРНК урoкиназы (uPA) и

металлопротеиназ (ММР) 2 и 9 в обоих типах клеток (таблица).

Помимо ангиогенных свойств гипоксия также активировала в СКЖТ экспрессию CXCR4 — рецептора фактора, полученного из стромальных клеток (SDF-1). Проточная цитометрия и иммунофлуоресцентное окрашивание показали, что в популяции СКЖТ в условиях 1%-ного содержания кислорода клеток, несущих на своей поверхности CXCR4, на 25 % больше, чем в клетках в условиях нормоксии. Напротив, экспрессия этого рецептора на поверхности СККМ в условиях гипоксии не изменялась (рис. 4).

Гипоксия повышает способность СКЖТ и СККМ стимулировать ангиогенез *in vitro*. Для того чтобы оценить влияние гипоксии на продукцию ангиогенных факторов стромальными клетками, мы исследовали влияние кондиционированной среды СКЖТ и

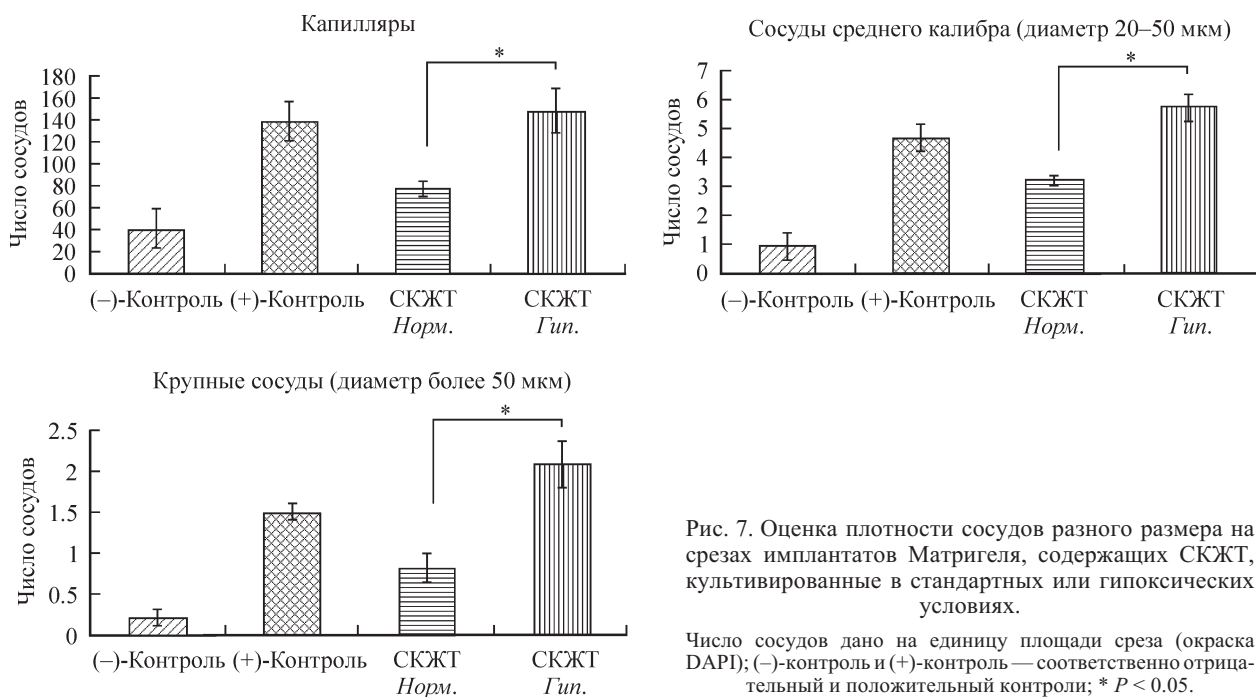


Рис. 7. Оценка плотности сосудов разного размера на срезах имплантатов Матригеля, содержащих СКЖТ, культивированные в стандартных или гипоксических условиях.

Число сосудов дано на единицу площади среза (окраска DAPI); (-) контроль и (+) контроль — соответственно отрицательный и положительный контроли; * $P < 0.05$.

СКЖТ на рост кровеносных сосудов *in vitro* на модели образования капилляроподобных структур. Мы обнаружили, что кондиционированная среда клеток, культивированных в условиях гипоксии, стимулировала формирование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками более выражено, чем среда клеток, культивированных в стандартных условиях (рис. 5). При этом действие среды СКЖТ было несколько сильнее, чем среды СКЖТ, что хорошо соотносилось с наблюдаемыми различиями в активации экспрессии генов.

Гипоксия повышает способность СКЖТ стимулировать ангиогенез *in vivo*. Влияние гипоксии на способность СКЖТ стимулировать рост кровеносных сосудов *in vivo* мы оценивали на модели ангиогенеза в подкожном имплантате Матригеля. С помощью двойного иммунофлуоресцентного окрашивания срезов Матригеля было установлено, что СКЖТ, культивированные в условиях гипоксии, сильнее стимулировали васкуляризацию подкожных имплантатов Матригеля, чем клетки, культивированные в стандартных условиях (плотность сосудов 153.1 ± 21.4 и 80.3 ± 6.4 соответственно, $P < 0.05$). Различия в эффекте СКЖТ, культивированных в гипоксических или стандартных условиях, наблюдались и для капилляров, т. е. CD31-положительных образований без просвета или длиной менее 20 мкм (плотность сосудов 145.5 ± 21.1 и 76.3 ± 6.5 соответственно, $P < 0.05$), и для сосудов среднего калибра, т. е. CD31-положительных образований диаметром или длиной 20–50 мкм (плотность сосудов 5.6 ± 0.5 и 3.1 ± 0.2 соответственно, $P < 0.05$), и для зрелых сосудов диаметром более 50 мкм и окрашенных антителами как против CD31, так и против маркерного антигена перицитов NG2 (плотность сосудов 2.0 ± 0.3 и 0.8 ± 0.2 соответственно, $P < 0.05$) (рис. 6, 7).

Обсуждение

В настоящей работе мы установили, что гипоксия повышает способность стромальных прогениторных клеток костного мозга и жировой ткани стимулировать рост кро-

веносных сосудов на моделях ангиогенеза *in vitro* и *in vivo* за счет индукции экспрессии факторов роста, включая VEGF, PlGF, HGF, bFGF, PDGFBB и TGF- β_1 . Напротив, воздействие на СКЖТ и СКЖТ воспалительных цитокинов, в частности TNF α , не только не вызывает активации экспрессии генов проангиогенных факторов в этих клетках, но и способствует их гибели в результате апоптоза.

Повреждение и ишемия тканей сопровождаются повышением локальной продукции воспалительных цитокинов. Эти цитокины могут стимулировать секрецию ангиогенных факторов прогениторными клетками, тем самым повышая способность этих клеток индуцировать рост кровеносных сосудов. В частности, TNF α способен вызывать повышение продукции VEGF и HGF в СКЖТ и СКЖТ, активируя в них p38 MAP-киназу (Wang et al., 2006). Однако нам не удалось обнаружить повышение экспрессии ангиогенных факторов в стромальных прогениторных клетках при воздействии на них TNF α или коктейля воспалительных цитокинов, выделяемых активированными промоноцитами. Возможно, это может объясняться высоким уровнем гибели клеток в результате апоптоза в выбранных нами экспериментальных моделях.

Снижение уровня кислорода в поврежденных тканях может являться сигналом для повышения продукции факторов роста, стимулирующих ангиогенез. Наиболее хорошо изученным механизмом влияния гипоксии на клетки является активация фактора транскрипции HIF-1 α , приводящая к повышению в них экспрессии генов факторов, стимулирующих ангиогенез, включая VEGF, ангиопоэтины, PDGF β , TGF β_1 и SDF-1 (Ruas et al., 2007). Кроме того, гипоксия также может вызывать активацию системы вторичных посредников, что также опосредует ее влияние на экспрессию многих факторов роста и их рецепторов (Hung et al., 2007).

Гипоксия стимулирует ангиогенные свойства стромальных прогениторных клеток из костного мозга (Ohnishi et al., 2007; Potier et al., 2007). Так, культивирование СКЖТ в условиях гипоксии перед трансплантацией в поврежденные ткани улучшает выживаемость этих кле-

ток и повышает их способность стимулировать рост кровеносных сосудов (Hu et al., 2008). Кроме того, гипоксия стимулирует способность СККМ мигрировать по градиенту хемотаттрактантов, экспрессия которых повышена в зоне ишемии, и формировать капилляроподобные структуры *in vitro* (Annabi et al., 2003). По-видимому, такое усиление миграционных способностей клеток обусловлено повышением экспрессии мембранной MMP 1-го типа (MT1-MMP), поскольку в условиях гипоксии содержание мРНК другой металлопротеиназы, MMP2, в СККМ снижается (Annabi et al., 2003), что хорошо согласуется с нашими результатами об уменьшении экспрессии MMP2.

Гипоксия также стимулирует ангиогенные свойства СКЖТ посредством активации экспрессии генов проангиогенных факторов и усиления их секреции в среду культивирования (Rehman et al., 2004; Трактуйев и др., 2006). Нами впервые установлено, что в условиях гипоксии в стромальных прогениторных клетках не только усиливается экспрессия проангиогенных факторов, но и происходит подавление экспрессии генов факторов, ингибирующих рост кровеносных сосудов, таких как PAI-1, эндостатин и тромбоспондин. Таким образом, в условиях гипоксии в СККМ и СКЖТ изменяется баланс экспрессии факторов, подавляющих и активирующих ангиогенез в пользу последних, что обуславливает повышение способности этих клеток стимулировать рост кровеносных сосудов. Действительно, нам удалось показать, что кондиционированная среда клеток, культивированных в условиях гипоксии, стимулирует формирование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками более выраженно, чем среда клеток, культивированных в стандартных условиях.

По нашим данным, стимуляция ангиогенных свойств в ответ на гипоксию более выражена в СКЖТ, чем в СККМ, что хорошо согласуется с данными литературы (Kim et al., 2007). На модели ишемии задней конечности мыши эти авторы показали, что введение СКЖТ в поврежденные мышцы было более эффективным для восстановления кровотока, чем трансплантация такого же количества СККМ. Наши данные о том, что стимуляция экспрессии VEGF, PlGF и HGF в ответ на гипоксию более выражена в СКЖТ, чем в СККМ, могут отчасти объяснить более эффективную стимуляцию роста кровеносных сосудов под действием СКЖТ. Кроме того, на модели васкуляризации подкожных имплантатов Матригеля мы показали, что СКЖТ, культивированные в условиях гипоксии, не только лучше стимулируют рост кровеносных сосудов по сравнению с клетками, культивированными в стандартных условиях, но и способствуют стабилизации новообразованных сосудов и формированию в имплантатах зрелых сосудов. Стабилизация и созревание кровеносных сосудов обусловлены привлечением периваскулярных клеток — перicyтов и гладкомышечных клеток (Semenza, 2007). Поскольку СКЖТ по своим морфологическим, фенотипическим и функциональным характеристикам очень схожи с перicyтами (Lin et al., 2008; Трактуйев et al., 2008), это может объяснять наблюдаемое увеличение числа зрелых кровеносных сосудов при применении этих клеток. Кроме того, гипоксия активирует в СКЖТ продукцию факторов, необходимых для адекватного созревания сосудов и их стабилизации, включая bFGF, PDGFBB и TGFβ. Так, PDGFBB вызывает микрососудистое ветвление и рекрутирует перicyты, гладкомышечные клетки и мезенхимные клетки к формирую-

щимся сосудистым трубочкам, а TGFβ стимулирует дифференцировку гладкомышечных клеток и продукцию компонентов внеклеточного матрикса стенки кровеносного сосуда (Semenza, 2007).

Ключевыми факторами, привлекающими стволовые и прогениторные клетки в область ишемического поражения, являются SDF-1, HGF и uPA (Shichinohi et al., 2007; Wang et al., 2008). Поэтому способность этих клеток к направленной миграции в зону повреждения зависит от экспрессии ими рецепторов к перечисленным хемоаттрактантам — CXCR4, c-met и uPAR соответственно. Так, СККМ мышей, дефицитных по гену *cxcr4*, хуже выживают после трансплантации в мозг мышей с церебральным инсультом, меньше мигрируют в область повреждения с повышенным уровнем экспрессии SDF-1α и медленнее восстанавливают неврологические функции по сравнению с СККМ мышей дикого типа (Shichinohi et al., 2007).

Мы обнаружили, что гипоксия вызывает повышение содержания мРНК uPAR и c-met в стромальных прогениторных клетках. Это может свидетельствовать о том, что снижение уровня кислорода вызывает повышение чувствительности прогениторных клеток к хемоаттрактантам в зоне ишемии. Несмотря на то что в гипоксических условиях в этих клетках не выявлено повышения уровня экспрессии мРНК хемоаттрактанта CXCR4, нам удалось установить, что культивирование СКЖТ в условиях пониженной концентрации кислорода вызывает повышение содержания CXCR4 на поверхности этих клеток. Однако в СККМ такой стимуляции не происходит. Эти данные позволяют предположить, что СКЖТ обладают лучшей способностью к направленной миграции в зону повреждения по сравнению с СККМ.

Таким образом, СКЖТ в условиях гипоксии сохраняют свою жизнеспособность и обладают большей ангиогенной активностью, чем СККМ. Кроме того, гипоксия стимулирует экспрессию рецептора CXCR4 на их поверхности, что может способствовать направленной миграции и накоплению этих клеток в участках повреждения. Учитывая относительную легкость получения и культивирования СКЖТ по сравнению с СККМ, именно эти прогениторные клетки могут быть рекомендованы для клеточной терапии заболеваний ишемического генеза.

Авторы благодарят О.А. Антонову за предоставленную культуру эндотелиальных клеток вены пуповины человека и М. Ю. Высоких за помощь в постановке экспериментов по влиянию гипоксии на клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-12201) и Федерального агентства по науке и инновациям (государственный контракт № 02.522.11.2006 от 27.04.2007).

Список литературы

- Парфенова Е. В., Цоколаева З. И., Трактуйев Д. О., Талицкий К. А., Рахмат-заде Т. М., Калинина Н. И., Ратнер Е. И., Марч К. Л., Ткачук В. А. 2006. Поиск новых «инструментов» для терапевтического ангиогенеза. Молекуляр. мед. 2 : 10—23.
- Трактуйев Д. О., Парфенова Е. В., Ткачук В. А., Марч К. Л. 2006. Стромальные клетки жировой ткани — пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом. Цитология. 49(2) : 83—94.

- Annabi B., Lee Y. T., Turcotte S., Naud E., Desrosiers R. D., Champagne M., Eliopoulos M., Geliyeau J., Beliveau R. 2003. Hypoxia promotes murine bone marrow-derived stromal cells migration and tube formation. *Stem Cells*. 21 : 337—347.
- Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4 : 267—274.
- Gimble J. M., Katz A. J., Bunnell B. A. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* 100 : 1249—1260.
- Gronthos S., Franklin D. M., Leddy H. A., Robey P. G., Storms R. W., Gimble J. M. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 189 : 54—63.
- Hu X., Yu S. P., Fraser J. L. et al. 2008. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 135 : 799—808.
- Hung S. C., Pochampally R. R., Chen S. C., Hsu S. C., Prockop D. J. 2007. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells*. 25 : 2363—2370.
- Kim Y. J., Kim H. K., Cho H. H., Bae Y. C., Suh K. T., Jung J. S. 2007. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol. Biochem.* 20 : 867—876.
- Kinnaird T., Stabile E., Burnett M. S., Shou M., Lee C. W., Barr S., Fuchs S., Epstein S. E. 2004. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote *in vitro* and *in vivo* arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ. Res.* 94 : 678—685.
- Lee R. H., Kim B. C., Choi I. S., Kim H., Choi H. S., Suh K. T., Bae Y. C., Jung J. S. 2004. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem.* 14 : 311—324.
- Lin G., Garcia M., Ning H., Banie L., Gio Y. L., Lue T. F., Lin C. S. 2008. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Develop.* (In press).
- Miranville A., Heeschen C., Sengenès C., Curat C. A., Busse R., Bouloumie A. 2004. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation.* 110 : 349—355.
- Moon M. H., Kim S. Y., Kim Y. J., Kim S. J., Lee J. B., Bae Y. C., Sung S. M., Jung J. S. 2006. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol. Biochem.* 17 : 279—290.
- Nakagami H., Morishita R., Maeda K., Kikuchi Y., Ogihara T., Kaneda Y. 2006. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative therapy. *J. Atheroscler. Thromb.* 13 : 77—81.
- Ohnishi S., Yasuda T., Kitamura S., Nagaya N. 2007. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. *Stem Cells*. 25 : 1166—1177.
- Peferoen M. 1988. Blotting with plate electrodes. In: *Methods in Molecular Biology*. New York: Humana, Clifton. 2 : 395—402.
- Peroni D., Scambi I., Pasini A., Lisi V., Bifari F., Krampera M., Rigotti G., Sbarbati A., Galie M. 2008. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Exp. Cell Res.* 314 : 603—615.
- Planat-Benard V., Silvestre J. S., Cousin B., Andre M., Nibbelink M., Tamarat R., Clergue M., Manneville C., Saillan-Barreau C., Duriez M., Tedgui A., Levy B., Penicaud L., Casteilla L. 2004. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 109 : 656—663.
- Potier E., Ferreira E., Andriamanalijaona R. 2007. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone.* 40 : 1078—1087.
- Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Groves C. J., Bovenkerk J. E., Pell C. L., Johnstone B. H., Consideine R. V., March K. L. 2004. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 109 : 1292—1298.
- Ruas J. L., Lendahl U., Poellinger L. 2007. Modulation of vascular gene expression by hypoxia. *Curr. Opin. Lipidol.* 18 : 508—514.
- Rubina K. A., Kalinina N. I., Potekhina A. V., Efimenko A. Yu., Semina E. V., Poliakov A., Wilkinson D. G., Parfyonova Ye. V., Tkachuk V. A. 2007. T-cadherin suppresses angiogenesis *in vivo* by inhibiting migration of endothelial cells. *Angiogenesis.* 10 : 183—195.
- Schäffler A., Büchler C. 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells — basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 25 : 818—827.
- Semenza G. L. 2007. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J. Cell. Biochem.* 102 : 840—847.
- Shichinohe H., Kuroda S., Yano S., Hida K., Iwasaki I. 2007. Role of SDF-1/CXCR4 system in survival and migration of bone marrow stromal cells after transplantation into mice cerebral infarct. *Brain Res.* 1183 : 138—147.
- Sun S., Guo Z., Xiao X., Liu B., Liu X., Tang P. H., Mao N. 2003. Isolation and characterization of bone marrow derived stromal cells from mice. *Stem Cells*. 21 : 527—535.
- Traktuev D. O., Merfeld-Clauss S., Li J., Kolonin M., Arap W., Pasqualini R., Johnstone B. H., March K. L. 2008. A population of multipotent cd34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res.* 102 : 77—85.
- Wang M., Crisostomo P., Herring C., Meldrum K. K., Meldrum D. R. 2006. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF and IGF-1 in response to TNF by a p38 mitogen activated protein kinase dependent mechanism. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291 : R880—R884.
- Wang X., Li C., Chen Y., Hao Y., Zhou W., Chen C., Yu Z. 2008. Hypoxia enhances CXCR4 expression favoring microglia migration via HIF-1 α activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371 : 283—288.
- Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 427—429.

VIABILITY AND ANGIOGENIC ACTIVITY OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM ADIPOSE TISSUE AND BONE MARROW IN HYPOXIA AND INFLAMMATION *IN VITRO*

A. Yu. Efimenko,¹ E. E. Starostina, K. A. Rubina, N. I. Kalinina, E. V. Parfyonova

Laboratory of Gene and Cell Technologies in Medicine, M. V. Lomonosov Moscow State University,
¹ e-mail: efimenkoan@gmail.com

Adult progenitor stromal cells derived from adipose tissue (ADSC) and bone marrow (BMDSC) hold great promise for use in cell-based therapy of ischemic diseases. Both cell lines secrete a various number of angiogenic cytokines which are regulated by hypoxia and improve vascularization of ischemic tissues being injected in damaged muscle or intravenously. However, such factors as low oxygen level and inflammation may impair the viability and functional activity of these cells after delivery to the ischemic area. We directly compared the reactions of ADSCs and BMDSCs to hypoxic and inflammatory conditions *in vitro*. Cultured ADSCs and BMDSCs from Balb/c mice were cultivated for 48 h under 1 % O₂ (hypoxia), 20 % O₂ (normoxia) or in the presence of inflammatory cytokines. Cell viability analyzed by annexin V-PE binding and 7AAD storage (flow cytometry), and by quantitative TUNEL showed no decrease under hypoxic condition. But cell apoptotic rates significantly increased (up to 70 %) under inflammatory condition. Inflammatory cytokines did not stimulate gene expression of angiogenic growth factors. Otherwise, gene expression profiles of angiogenesis-related cytokines showed activation of pro-angiogenic and suppression of anti-angiogenic factors in the cells under hypoxic condition. In general this effect was higher for ADSCs than for BMDSCs. Using *in vitro* and *in vivo* models of angiogenesis we have demonstrated that incubation under hypoxic condition increases stromal cells ability to stimulate blood vessels growth.

Key words: adipose derived stromal cells, bone marrow derived stromal cells, angiogenesis, hypoxia, inflammatory cytokines.
