

ПОСТОЯННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ПОНИЖЕННОМ СОДЕРЖАНИИ КИСЛОРОДА

© Ю. В. Рылова, Л. Б. Буравкова

*Институт медико-биологических проблем РАН, Москва;
электронный адрес: yuliaril@mail.ru*

Показано, что снижение концентрации кислорода в среде культивирования мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) вызывало кратковременное уменьшение доли CD73⁺-клеток в популяции, не влияя на количество клеток, несущих на поверхности другие конститутивные маркеры (CD90 и CD105). При этом гетерогенность клеточной популяции снижалась: исчезали крупные распластанные клетки. Пролиферативная активность ММСК значительно возрастала и стабильно сохранялась в условиях, при которых содержание кислорода (5 % O₂) близко к тканевому уровню. При более низком содержании кислорода она постепенно снижалась начиная с 3—4-го пассажа. Возрастание пролиферативной активности не сопровождалось увеличением экспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы, что свидетельствовало об отсутствии онкогенной трансформации клеток. Полногеномный анализ уровня экспрессии генов ММСК выявил достоверное изменение экспрессии генов циклинов (CCND2 и PCNA), регуляторной субъединицы циклин-зависимых киназ (CKS2) и ингибитора циклин-зависимой киназы 4 и 6 (CDKN2C), активирующих клеточный цикл при снижении концентрации кислорода.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, иммунофенотип, морфология, пролиферация.

Принятые сокращения: ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки.

Изучение физиологической ниши мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) показало, что их компартмент в постнатальном периоде распространяется на весь организм в результате его периваскулярной локализации (Da Silva Meirelles et al., 2006). Наиболее важным физическим фактором микроокружения в этих тканевых нишах является парциальное давление кислорода. Очевидно, что пространственное расположение мезенхимных клеток-предшественников относительно тока крови, снабжающего их кислородом, существенно для их функций.

Прямые измерения концентрации кислорода в различных органах показали, что в костном мозге имеет место гипоксия и что в некоторых областях содержание кислорода может быть довольно низким (~4—1 %) (Chow et al., 2000; Иванов, 2012). В других органах и тканях содержание кислорода значительно варьирует: в паренхиме легких и в кровотоке, а также в паренхимных органах, таких как печень, почки и сердце, она составляет от 4 до 14 % (Jungermann, Kietzmann, 1997; Mik et al., 2004; Wild et al., 2005). В других тканях содержание кислорода еще ниже. Так, в головном мозге оно колеблется от 0.5 до 7 % (Hemphill et al., 2005), в сетчатке глаза и стекловидном теле — от 1 до 5 % (Yu, Cringle, 2005). Показано, что в жировой ткани мыши, несмотря на высокую степень васкуляризации, содержание кислорода составляет около 3 % (Matsumoto et al., 2005). Следовательно, ММСК в

связи с их периваскулярной локализацией в тканевых депо и участием в репаративных процессах могут оказываться в условиях с различным парциальным давлением кислорода. Поэтому, будучи вовлеченными в различные физиологические и патофизиологические процессы в организме, они должны обладать механизмами для обеспечения пластичности при изменении содержания кислорода в микроокружении.

Особый интерес к ММСК как наиболее перспективному клеточному элементу для тканевой инженерии и восстановительной медицины диктует необходимость проведения исследований, посвященных оценке функционального состояния ММСК в процессе их экспансии *ex vivo*, а также оптимизации процесса культивирования с целью приближения к условиям физиологического микроокружения этих клеток.

Целью данной работы является оценка влияния различного содержания кислорода *in vitro* на морфофункциональное состояние ММСК клеток жировой ткани.

Материал и методика

Выделение ММСК проводили из жировой ткани, используя описанную методику (Zuk et al., 2001) с модификациями (Буравкова и др., 2009). Ткань обрабатывали 0.075%-ным раствором коллагеназы IA в среде α-MEM в

течение 35 мин при 37 °C, затем супензию центрифугировали 2 раза в течение 5 мин при 1000 об/мин, осадок ресуспендировали в среде α-МЕМ, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, высевали в чашки Петри и помещали в CO₂-инкубатор (5 % CO₂, 95 % воздуха). Смену среды проводили через каждые 72 ч. После достижения предмонослоя клетки пассировали и помещали в условия пониженного содержания кислорода, которые создавали используя мультигазовый инкубатор (Sanyo, Япония) или герметичную камеру (Stemcell Technologies, США), модифицированную датчиками давления и концентрации кислорода, и продували газовой смесью (95 % N₂, 5 % CO₂) до установления концентраций кислорода 5, 3 и 1 %.

Для анализа наличия поверхностных маркеров супензию клеток переносили в пробирки (не менее 100 тыс. клеток на пробу), добавляли FITC- или PE-конъюгированные антитела в разведении согласно инструкции фирмы-производителя (Immunotec, Франция). Инкубировали 20 мин при 4 °C и анализировали по стандартной методике на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США).

Оценку морфологических характеристик ММСК производили при анализе микрофотографий случайно выбранных полей зрения, полученных с использованием светового фазово-контрастного микроскопа Leica DM IL (Leica, Германия) и сопряженной с ним цветной видеокамерой (Leica DC500).

Пролиферативную активность ММСК оценивали, анализируя не менее 5 полей в каждом флаконе каждые 24 ч после пассирования. С помощью программы Sigma ScanPro 5.0 Image Analysis Software (SPSS Inc., США) считали число клеток и рассчитывали число удвоений популяций (PD) по формуле PD = log₂N/No, где N₀ и N — соответственно начальное и конечное число клеток. Время удвоения популяции (TD) определяли по формуле TD = (log₂2) · t/[log₂(N/N₀)], где t — время прироста популяции, N — число клеток через время t, N₀ — исходное число клеток.

Анализ стадии клеточного цикла проводили методом проточной цитофлуориметрии, используя иодид пропидия, связывающийся с ДНК. Супензию клеток переносили в пробирки (не менее 200 тыс. на пробу), центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин, к осадку добавляли 500 мкл 70%-ного этилового спирта и инкубировали 1 ч в темноте при 4 °C. Затем клетки промывали фосфатным буфером, центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин, к осадку добавляли 500 мкл раствора, содержащего 50 мкг/мл иодида пропидия и 20 мкг/мл РНКазы A, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и анализировали. Количество клеток в определенной фазе цикла соответствует содержанию ДНК, определяемому по интенсивности флуоресценции красителя, связанного с ДНК. Содержание ДНК удваивается в фазе G₂/M, что дает пик с большей интенсивностью флуоресценции, чем фазе G₁, тогда как в S-фазе клетки содержат промежуточное количество ДНК (см. раздел «Результаты», рис. 3, а).

Для определения уровня экспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы (*hTERT*) из клеток выделяли РНК с помощью TRIZOL согласно инструкции фирмы-производителя. Реакцию обратной транскрипции и получение кДНК производили с помощью QuantiTect Reverse Transcription Kit согласно инструкции фирмы-производителя (Qiagen, США). Для определения уровня экспрессии генов применяли комплект реагентов для полиг

меральной цепной реакции, в который входят: смесь дезоксирибонуклеотидов, рекомбинантная ДНК-полимераза HotStarTaq, MgCl₂ и кДНК, количество которой для одной реакции составляло 0.5 мкг. Для оценки уровня экспрессии генов использовали пары праймеров, соответствующие четырем формам гена *hTERT*.

Оценку дифференциальной экспрессии генов ММСК, культивируемых при содержании O₂ в среде 20 и 5 %, проводили на 2-м пассаже с помощью набора Human-Ref-8 (Illumina, США). Для выделения РНК использовали стандартный метод с помощью TRIZOL согласно инструкции фирмы-производителя. В полученных образцах клеток определяли содержание РНК с помощью Nanodrop, после чего 200 нг РНК амплифицировали с помощью набора Illumina(r) TotalPrep™ RNA Amplification Kit (Ambion, США). Амплифицированную РНК подвергали гибридизации на микрочипах Human-Ref8 gene expression array (Illumina, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Подсчет и анализ полученных данных производили с помощью программного обеспечения GenomeStudio software (Illumina, США) с использованием статистического модуля для анализа экспрессии генов. Различия считались статистически значимыми при P ≤ 0.05.

Для получения статистически значимых результатов все эксперименты проведены минимум в трех независимых повторах. Для статистической обработки результатов использовали программу «Excel» для WinXP, достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни при выбранном уровне значимости P ≤ 0.05.

В работе использовали следующие реагенты: среду культивирования α-МЕМ (MP Biomedicals, США), L-глутамин, раствор антибиотиков в 0.85%-ном солевом буфере, содержащем 10 000 ед./мл пенициллина и 10 000 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия, или БиоЛот, Россия), эмбриональную телячью сыворотку (Hyclone, США), 20 мМ фосфатный буфер (Биолот, Россия), параформальдегид (Merck, Германия), раствор трипсина и ЭДТА с концентрациями веществ 0.5 и 0.2 г/л соответственно (Gibco, США или Sigma, США), 0.15%-ный раствор коллагеназы типа IA (Sigma, США), моноклональные антитела против антигенов CD31, CD73, CD90 и CD105, конъюгированные с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE), и соответствующие изотипические контроли (Immunotec, Франция).

Результаты

Иммунофенотипический профиль ММСК, культивируемых в условиях различного содержания кислорода. На поверхности исследуемых клеток выявили ряд антигенов, которые регулируют такие процессы, как адгезия, миграция, корецепция и передача сигнала внутрь клетки, и формируют характерный иммунофенотипический профиль резидентных ММСК жировой ткани. Цитофлуориметрическое исследование показало, что данный профиль, используемый в настоящее время для идентификации ММСК (CD73, CD90 и CD105), не изменялся. При этом клетки не несли антигена CD31,нского эндотелиальным клеткам. Культивирование при содержании O₂ 5, 3 или 1 % на 1-м пассаже сопровождалось снижением доли CD73⁺-клеток пропорционально уменьшению концентрации кислорода

Таблица 1

Поверхностные маркеры в ММСК 1—2-го пассажа, культивируемых при различном содержании кислорода

Пассаж	Маркеры	Доля клеток (%), несущих маркеры ММСК, при разном содержании O_2			
		20 %	5 %	3 %	1 %
1	<i>CD73</i>	87.8 ± 6.4	76.9 ± 4.6	69.1 ± 5.8 ^a	53.3 ± 7.6 ^a
	<i>CD90</i>	92.8 ± 4.0	88.4 ± 4.4	73.7 ± 5.4	82.2 ± 4.4
	<i>CD105</i>	89.6 ± 4.1	80.4 ± 12.1	79.4 ± 9.8	87.2 ± 5.5
2	<i>CD73</i>	97.6 ± 1.7	97.4 ± 0.7	97.3 ± 2.4	96.7 ± 1.5
	<i>CD90</i>	97.8 ± 1.5	97.8 ± 0.4	92.3 ± 2.7	95.8 ± 1.2
	<i>CD105</i>	96.6 ± 0.8	94.1 ± 5.0	91.4 ± 6.1	90.3 ± 8.7

^a Достоверное отличие от значений при 20%-ном содержании O_2 , $P \leq 0.05$.

в среде, не вызывая изменения других исследуемых маркеров. Дальнейшее культивирование ММСК в условиях пониженного содержания кислорода в течение трех пассажей не влияло на долю $CD105^+$ - и $CD90^+$ -клеток и приводило к восстановлению количества $CD73^+$ -клеток до исходного уровня (табл. 1).

Влияние различного содержания кислорода на морфологию ММСК. Культивирование в условиях различного содержания кислорода выявило значительные морфологические изменения ММСК. В условиях стандартного содержания кислорода (20 %) отмечали высокую степень гетерогенности популяций ММСК, которая выражалась в присутствии в культуре клеток разных типов, отличающихся по морфологии. Можно было выделить треугольные или звездчатые клетки (40—60 мкм), веретеновидные клетки (60—100 мкм) и очень крупные (до 200 мкм) с большим количеством отростков. Более длительное культивирование (4 пассажа) вызывало постепенное увеличение доли крупных распластанных клеток (200 мкм и более) и сокращение доли клеток классической веретеновидной формы (60—100 мкм) (рис. 1, *a*, *b*).

Уменьшение концентрации кислорода в среде ко 2-му пассажу сокращало популяцию крупных клеток и способствовало преобладанию фибробластоподобных клеток (рис. 1, *в*, *г*, *ж*). В условиях 1%-ного содержания O_2 появлялись небольшие клетки размером 40—60 мкм. Дальнейшее культивирование ММСК (3—4-й пассаж) в условиях пониженного содержания кислорода способствовало поддержанию морфологической гомогенности клеточной популяции. При условиях, наиболее приближенных к тканевому уровню кислорода (3—5 %), сохранилась однородность клеток в культуре, тогда как при крайне низком содержании кислорода на 4-м пассаже появлялись распластанные клетки с большим количеством отростков, характерные для культур ММСК при стандартном содержании кислорода.

Влияние различного содержания кислорода на пролиферативную активность ММСК. Культивирование в условиях пониженного содержания кислорода в течение 6 сут (1-й пассаж) не приводило к изменению пролиферативной активности ММСК жировой ткани. Число удвоений клеточной популяции не менялось и соответствовало контрольным зна-

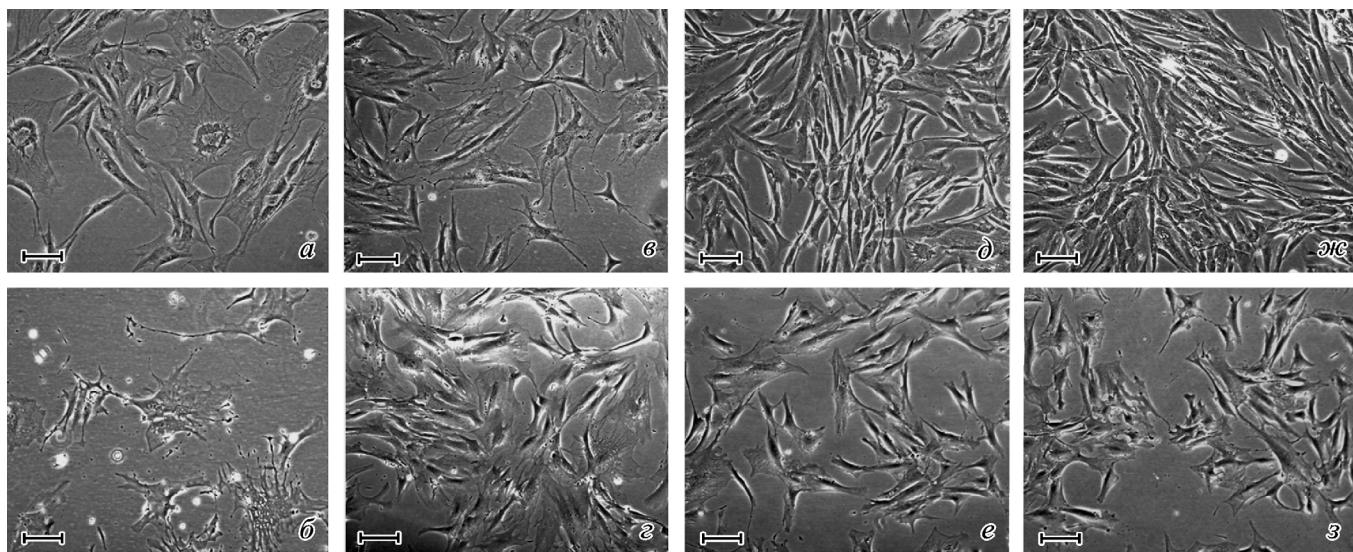


Рис. 1. Морфология ММСК при культивировании в условиях содержания кислорода 20 (*а*, *б*), 5 (*в*, *г*), 3 (*д*, *е*) и 1 (*ж*, *з*) %.

Представлены клетки 2-го (*а*, *в*, *д*, *ж*) и 4-го (*б*, *г*, *е*, *з*) пассажа; фазовый контраст; масштабные отрезки — 100 мкм.

чениям в условиях стандартного культивирования (20 % O₂) (рис. 2, а). При этом время удвоения популяции также варьировало в незначительных пределах от 73—79 ч при 20 и 5 % O₂ до 64—67 ч при 3 и 1 % O₂ (табл. 2).

Дальнейшее культивирование ММСК в условиях пониженного содержания кислорода в течение 2-го пассажа оказывало равнозначное стимулирующее клеточную пролиферацию действие независимо от степени уменьшения концентрации кислорода и способствовало сокращению времени удвоения популяции до 56—54 ч. Число удвоения популяции в условиях пониженного содержания кислорода возрастало в 1.3 раза по сравнению со значениями на 1-м пассаже. Тогда как в стандартных условиях культивирования пролиферативная активность уменьшалась, о чем свидетельствовали 1.5-кратное снижение числа удвоения и значительное увеличение времени удвоения популяции.

Кривые пролиферации ММСК на 2-м пассаже при 1—5 % O₂ значительно отличались от кривой пролиферации клеток в контроле. Время лаг-фазы, в течение которой не происходило удвоения клеток, сократилось до нескольких часов, после чего начиналась фаза активной пролиферации. При стандартном культивировании лаг-фаза длилась не менее 2 сут и сменялась фазой медленного роста культуры (рис. 2, б). В результате число ММСК в культурах, экспонированных при пониженном содержании кислорода, более чем в 3 раза превышало число клеток в контроле.

Несмотря на выраженное увеличение пролиферативной активности и сокращение лаг-фазы в условиях пониженного содержания кислорода, не выявлено значительных изменений соотношения клеток, находящихся в той или иной фазе клеточного цикла (рис. 3, б). Количество клеток в S-фазе увеличивалось с 3 до 5—6 %, а в G₂/M-фазах — с 17 до 19 %.

3-й и 4-й пассажи характеризовались постепенным снижением пролиферативной активности ММСК независимо от содержания O₂ в среде (рис. 2, а). Однако к 4-му пассажу культивирования наибольшее число удвоения и, следовательно, наименьшее время удвоения было у клеток, экспонированных в условиях, приближенных к физиологическим, при которых уровень содержания кислорода составляет 5 %. А в культурах, экспонированных при более низком содержании кислорода в среде культивирования (1 и 3 %), увеличивалось время удвоения и снижалось число удвоения популяции до 1.6—1.8. Тем не менее эти значения за 6 сут культивирования в течение

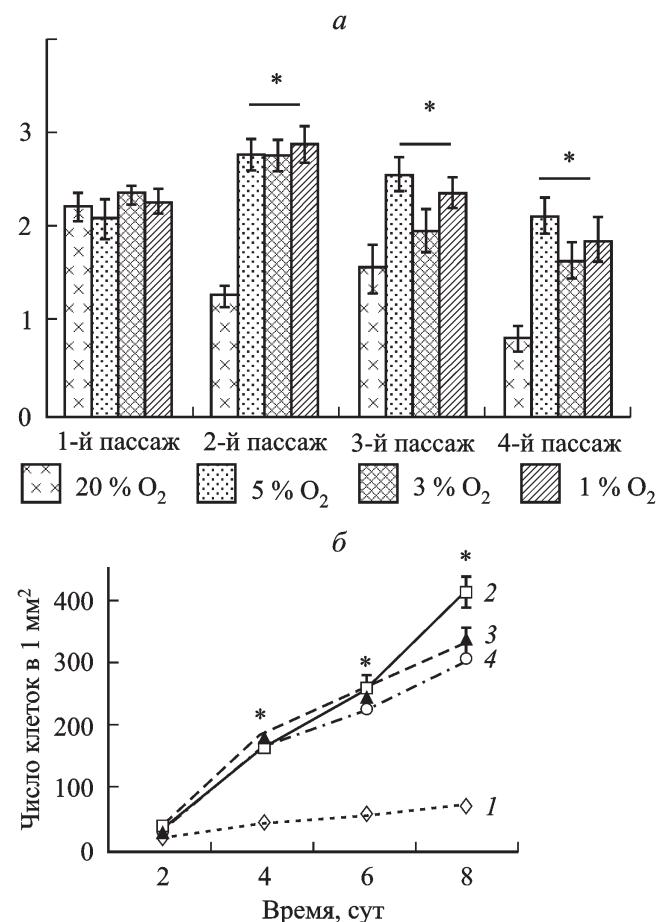


Рис. 2. Пролиферация ММСК, культивируемых при различном содержании кислорода.

a — средние значения числа удвоения популяций ММСК, культивируемых при 20, 5, 3 и 1 % O₂ в течение 1—4-го пассажей; *б* — кривые пролиферации клеток в течение 2-го пассажа при содержании O₂ (%): 20 (кривая 1), 5 (кривая 2), 3 (кривая 3) и 1 (кривая 4). Звездочкой показаны достоверные отличия от значений для стандартного содержания O₂ (20 %), $P \leq 0.05$, $n = 3$.

4-го пассажа более чем в 2 раза превышали число удвоений в случае 20%-ного содержания кислорода в среде.

Экспрессия гена теломеразы в условиях различного содержания кислорода. Ни в одном из исследуемых образцов ММСК не обнаружили выраженной экспрессии гена *hTERT*, кодирующего катали-

Таблица 2

Время удвоения (ч) популяции ММСК, культивируемых при разном содержании кислорода, в течение 1—4-го пассажей

Пассаж	Содержание кислорода, %			
	20	5	3	1
1-й	73 ± 6	79 ± 9	64 ± 3	67 ± 4
2-й	129 ± 15	56 ± 4 ^a	55 ± 4 ^a	54 ± 3 ^a
3-й	116 ± 21	63 ± 7 ^a	88 ± 9 ^a	67 ± 5 ^a
4-й	209 ± 28	75 ± 8 ^a	104 ± 15 ^a	90 ± 12 ^a

^a Достоверное отличие от значений при 20%-ном содержании O₂ на соответствующем пассаже, $P \leq 0.05$ ($n = 3$).

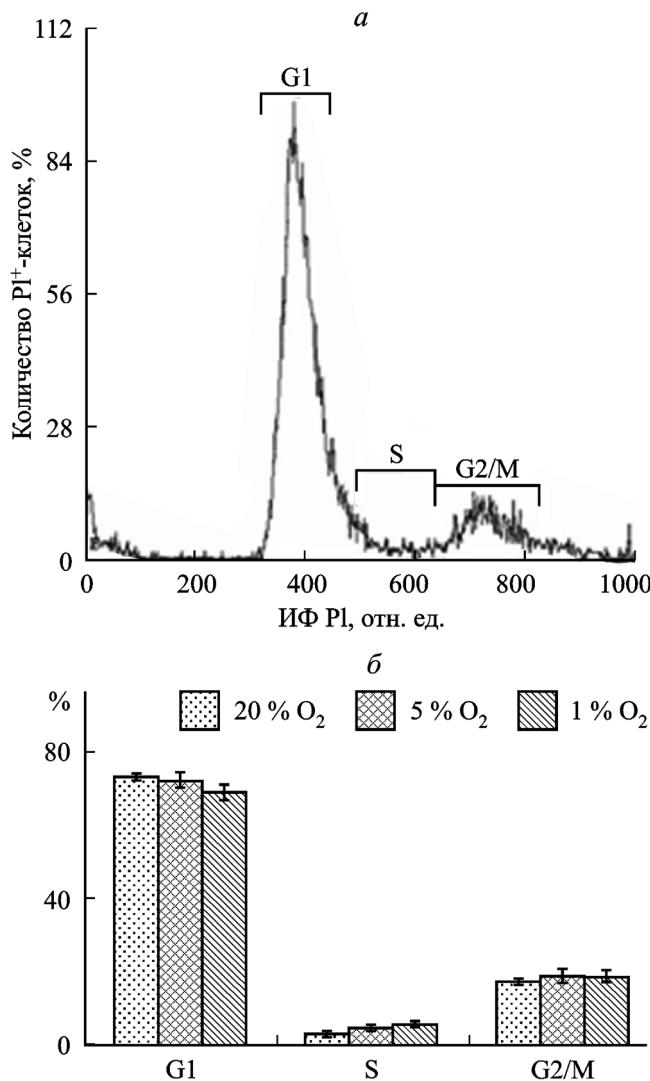


Рис. 3. Характеристика распределения ММСК по фазам клеточного цикла при различном содержании кислорода.

а — гистограмма распределения клеток по интенсивности флуоресценции (ИФ) иодида пропидия (PI), соответствующей содержанию ДНК; б — количественное соотношение PI⁺-клеток в популяциях 3-го пассажа в разных фазах клеточного цикла при содержании O₂ 20, 5 и 1 % (n = 3).

тическую субъединицу фермента теломеразы, в условиях как стандартного (20 % O₂), так и пониженного (5 % O₂) уровня (близкого к физиологическому) содержания кислорода. Тем не менее небольшое количество продукта детектировали в одном из образцов клеток, культивируемых при содержании кислорода 20 % (рис. 4, а, дорожка 3), и в двух образцах клеток, культивируемых при содержании кислорода 5 % (рис. 4, б, дорожки 1 и 3), что свидетельствует о незначительном уровне активности этого фермента в ММСК на данном этапе культивирования.

Уровень экспрессии генов, опосредующих пролиферацию. Сравнительный анализ результатов, полученных при полногеномном исследовании экспрессии генов ММСК жировой ткани, показал, что в условиях пониженного до 5 % содержания кислорода происходило увеличение уровня экспрессии генов, отвечающих за вступление клеток в клеточный цикл и позитивно регулирующих их пролиферацию (табл. 3). Среди

них гены семейства Fos (*FOSB* и *FOSL1*), кодирующие белки, которые, димеризуясь с белками семейства Jun, участвуют в формировании белка-активатора 1 (AP1); гены *PCNA* и *CCND2*, продукты которых представляют собой циклины, необходимые для перехода клеток из фазы G₁ в S-фазу синтеза ДНК, а также ген *CKS2*, кодирующий регуляторную субъединицу циклинзависимой киназы. Кроме того, в ответ на пониженное содержание кислорода уменьшалась экспрессия *CDKN2C* — гена-ингибитора циклинзависимой киназы.

Обсуждение

Внедрение клеточных технологий, основанных на использовании уникальных свойств ММСК, в клиническую практику является актуальной задачей современной медицины и требует совершенствования методов подготовки клеточных препаратов. В настоящее время хорошо известны многие морфофункциональные особенности ММСК *in vitro* (Caplan, 1991; Gimble et al., 2007). Однако существует недостаточно экспериментальных данных относительно влияния естественного микроокружения, которое существенно отличается от условий, создаваемых *in vitro*. Одним из наиболее важных факторов является газовый состав среды, параметры которой традиционно остаются наиболее консервативным при культивировании клеток. При этом уровень CO₂ приближается к тканевому (5 %), тогда как содержание кислорода в обычных CO₂-инкубаторах соответствует его содержанию в воздухе (около 20 %), что превышает его уровень в тканевом микроокружении и может стать причиной возможных изменений свойств ММСК. В связи с этим высказываются предположения о том, что физиологическое содержание кислорода (3—7 %) является оптимальным для культивирования прогениторных клеток (Fehrer et al., 2007; Буравкова и др., 2009), а более низкий уровень может оказать гипоксический эффект. Следует отметить также, что ММСК в связи с выполнением регенеративных функций нередко оказываются в условиях крайне низкого содер-

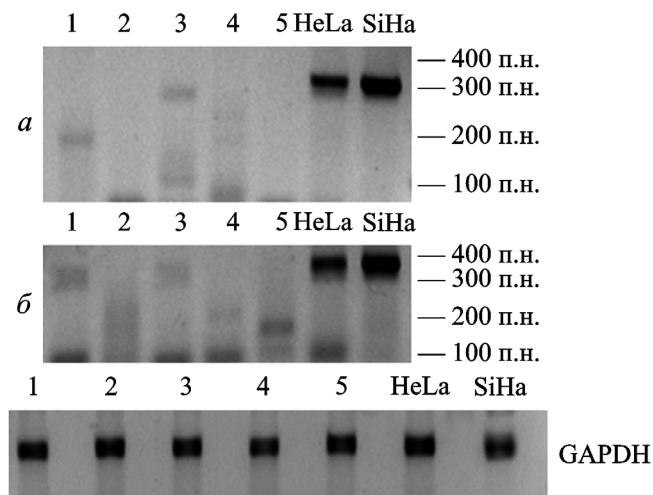


Рис. 4. Анализ экспрессии гена, кодирующего несплайсированную изоформу каталитической субъединицы теломеразы (hTERT) в течение 50 циклов ПЦР.

Продукт амплификации (~300 п. н.) виден в контрольных образцах линий опухолевых клеток HeLa, SiHa в образцах ММСК 40-го пассажа, культивируемых при содержании кислорода 20 (а) и 5 (б) %.

Таблица 3

Изменение уровня экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией ММСК, при уменьшении содержания кислорода от 20 до 5 %

Ссылка на последовательность в базах данных (RefSeq)	Символ гена	Название продукта	Интенсивность сигнала на микрочипе, отн. ед.		Соотношение сигналов
			20 % O ₂	5 % O ₂	
NM_006732.1	<i>FOSB</i>	Белки семейства fos, участвуют в формировании транскрипционного фактора AP-1	356.8	84.2	4.2 ^a
NM_005438.2	<i>FOSL1</i>		301.3	93.3	3.2 ^a
NM_182649.1	<i>PCNA</i>	Ядерный антиген пролиферирующих клеток	182.6	85.2	2.1 ^a
NM_001759.2	<i>CCND2</i>	G ₁ /S-специфичный циклин D2	315.3	156.1	2.0 ^a
NM_001827.1	<i>CKS2</i>	Регуляторная субъединица циклинзависимой киназы	287.6	143.2	2.0 ^a
NM_078626.2	<i>CDKN2C</i>	Ингибитор циклинзависимой киназы	50.6	136.2	0.4 ^a

^a Достоверное отличие от значений при 20%-ном содержании O₂, P ≤ 0.05.

жания кислорода, которое имеет место при патологических процессах или повреждении тканей. В связи с этим предпринимаются попытки изучения состояния культивируемых клеток при различном содержании кислорода (Буравкова, Анохина, 2007; Fehrer et al., 2007; Буравкова и др., 2009; Dos Santos et al., 2010; Lavrentieva et al., 2010; Basciano et al., 2011).

Необходимым параметром в идентификации выделенных и культивируемых клеток является определение и подтверждение статуса мезенхимных стромальных клеток. К сожалению, в настоящее время не представляется возможным выделение одного или нескольких определенных поверхностных маркеров, которые позволили бы идентифицировать ММСК. Различные литературные источники свидетельствуют о достаточно большом количестве антигенов, которые могут быть в разной степени экспрессированы на поверхности ММСК различного происхождения, в том числе и жировой ткани (Gronthos et al., 2001; Gimble et al., 2007; Самойлович и др., 2013). В нашем исследовании в условиях стандартного содержания кислорода ММСК стабильно экспрессировали такие поверхностные маркеры, как CD105 (эндолгин), CD90 (рецепторная тирозинкиназа-1) и CD73 (5'-нуклеотидаза), формируя тем самым характерный иммунофенотипический профиль.

Снижение доли CD73⁺-клеток при уменьшении концентрации кислорода было транзиторным, и в дальнейшем количество этих клеток восстанавливалось до контрольного уровня. Известно, что CD73 представляет собой мембранный фермент, который принимает активное участие в катаболизме пуринов и пиримидинов, катализирует превращение АМФ до аденоцина и зависит от уровня содержания кислорода (Ledoux et al., 2003). При исследовании работы этого фермента в условиях пониженного содержания кислорода было показано, что изменение его уровня на поверхности в условиях гипоксии может быть опосредовано активацией различных транскрипционных факторов, в том числе HIF-1 (Synnestvedt et al., 2002).

Наблюдаемое в нашей работе изменение морфологии клеток в условиях гипоксии было отмечено и в отношении ММСК костного мозга человека: 48-часовое культивирование клеток в условиях 1%-ного содержания кислорода приводило к уменьшению их размеров, кроме того, клетки приобретали более вытянутую форму (Raheja et al., 2011). Накопление в культурах ММСК в процессе

культивирования сильно распластанных непролиферирующих клеток большого размера исследователи связывают со старением популяции, о чем свидетельствует активная экспрессия β-галактозидазы в этих клетках (Safwani et al., 2012).

Снижение доли крупных распластанных клеток в условиях пониженного содержания кислорода позволяет предположить, что относительная гипероксия может являться фактором, провоцирующим появление таких клеток в культурах ММСК. Допуская, что это свидетельствует об их повреждении в процессе культивирования, можно предположить, что приближение концентрации кислорода в среде культивирования к тканевому уровню обеспечивает снижение степени окислительного стресса и гетерогенности культур ММСК. Однако культивирование при содержании кислорода 1 %, вероятно оказывая повреждающее воздействие, вновь приводит к увеличению гетерогенности культуры, что проявляется в появлении сильно распластанных клеток к 4-му пассажу.

Представленные данные о влиянии пониженного содержания кислорода на пролиферативную активность ММСК жировой ткани согласуются с рядом исследований, демонстрирующих возможность стимуляции пролиферации недифференцированных клеток из различных источников при снижении концентрацией кислорода. Так, показано, что 12-суточное культивирование ММСК костного мозга человека на ранних пассажах при содержании кислорода 2 % сопровождалось большим приростом клеточной популяции, при этом также отмечали сокращение лаг-фазы по сравнению с таковой при содержании кислорода 20 % (Dos Santos et al., 2010). Подобные изменения наблюдали и при длительном культивировании в условиях 3%-ного содержания кислорода (Fehrer et al., 2007). Возрастающий пролиферативный потенциал отмечен для ММСК пуповины в условиях различного содержания кислорода. Уже через 72 ч в условиях 5 и 2.5 % O₂ пролиферация увеличивалась, однако при 1.5%-ном содержании O₂, наоборот, несколько снижалась (Lavrentieva et al., 2010). Сравнительный анализ пролиферативной активности ММСК, выделенных из пульпы зуба, при различном содержании кислорода (1, 3, 10 и 20 %) показал, что на начальных этапах культивирования (4 сут) наибольшей скоростью пролиферации обладали клетки в условиях 3%-ного содержания O₂, тогда как в других случаях скорость пролиферации была соизмеримой. Более длительное культивирование приводило к выравниванию

этого показателя при всех исследуемых концентрациях кислорода (Iida et al., 2010).

Известно, что в контроле за пролиферацией клетки важную роль играет теломераза — фермент, достраивающий теломерные повторы ДНК. В клетках различных типов количество теломераз строго регулируется. Ряд исследований показал, что активация теломераз связана с трансформацией клеток, приобретающих потенциал к неограниченному делению. Однако наличие активной теломеразы показано и в стволовых клетках организма (Зверева и др., 2010).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что мезенхимные клетки стромы взрослого организма обладают незначительным уровнем активности этого фермента, которая не возрастает при культивировании в условиях пониженного содержания кислорода, несмотря на значительное возрастание пролиферативной активности. Снижение концентрации кислорода в среде культивирования до 5 % не приводит к увеличению активности теломеразы, и это позволяет предположить, что большая по сравнению со стандартными условиями (20 % O₂) пролиферативная активность ММСК не является результатом их трансформации. Данное наблюдение согласуется с результатами другой группы исследователей, показавших, что в условиях пониженного содержания кислорода ММСК костного мозга, совершая большее количество удвоений, имеют меньшую длину теломер, чем в условиях стандартного культивирования (Dos Santos et al., 2010).

Комплексное изучение профиля экспрессии генов в ММСК, культивируемых при 20 и 5 % O₂, выявило значительные изменения уровня экспрессии отдельных генов, принимающих участие в самых различных внутриклеточных процессах, в том числе и генов, продукты которых принимают активное участие в регуляции прохождения клетками клеточного цикла. Так, экспрессия *FOSB*, *FOSL1* и *CCND2* может косвенно свидетельствовать об участии AP-1 в активации пролиферации ММСК в условиях пониженного содержания кислорода. Транскрипционный фактор AP-1 регулирует экспрессию ряда генов в ответ на различные стимулы, включая цитокины, факторы роста и стресс (Puntschart et al., 1998). Кроме того, активация экспрессии гена циклина D (*CCND2*) ассоциирована с переходом клеток из фазы G₁ в фазу S цикла и могла происходить под воздействием транскрипционного фактора AP-1 (Brooks et al., 1996). Увеличение экспрессии гена другого циклина (*PCNA*), известного как ядерный антиген пролиферирующих клеток, тоже могла приводить к детектируемой нами активации пролиферации клеток, так как, являясь кофактором ДНК-полимеразы δ, он участвует в репликации ДНК. Известно, что наиболее выраженная экспрессия этого белка начинается на границе фаз G₁/S и заканчивается в конце S-фазы клеточного цикла (Matsumoto et al., 1987). Транскрипция гена каталитической субъединицы циклинзависимой киназы (*CKS2*) коррелирует с выполнением ею функций в определенную фазу клеточного цикла. Известно, что «молчание» этого гена в фибробластах приводит к остановке клеточного цикла в фазе G₂ (Martinsson-Ahlzen et al., 2008). Снижение уровня экспрессии гена ингибитора циклинзависимой киназы (*CDKN2C*) в свою очередь может сопровождаться активацией циклинзависимых киназ 4-го и 6-го типов, снимая ограничение клеточного цикла в фазе G₁ (Jeffrey et al., 2000).

Подобные изменения экспрессии генов показаны исследователями другой группы, подтвердившими, что ак-

тивная пролиферация ММСК в условиях 1%-ной гипоксии сопровождалась увеличением экспрессии такого маркера клеточной пролиферации, как ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA). При этом экспрессия циклина D увеличивалась во времени, а экспрессия ингибитора циклинзависимой киназы p27 снижалась (Hung et al., 2012).

Наблюдаемое изменение уровня экспрессии генов вызвано активацией определенных сигнальных путей, опосредующих экспрессию транскрипционных факторов и активацию механизмов, контролирующих клеточный цикл. В ряде исследований подтверждено, что активация сигнальных путей, опосредуемых митогенактивируемыми протеинкиназами (ERK, JNK и p38), в условиях гипоксии сопровождается стимуляцией клеточной пролиферации (Laderoute, Webster, 1997; Scott et al., 1998; Kunz, Ibrahim, 2003). Так, механизм активации пролиферации фибробластов и гладкомышечных клеток в ответ на низкий уровень кислорода в среде (1 %, 30 ч) предположительно осуществлялся посредством стрессактивируемых киназ JNK и p38 и ассоциировался с переходом клеток из фазы клеточного цикла G₁ в фазу S (Scott et al., 1998). С другой стороны, стимуляция пролиферации остеобластов при умеренно низком содержании кислорода (5 %) в отличие от других исследований оказалась сопряжена с увеличением активности классического MAP-киназного каскада через киназы ERK1/2 при постоянном уровне активности киназы p38 (Matsuda et al., 1998). Следовательно, в механизме усиления клеточного деления, по-видимому, могут быть вовлечены как ERK-киназы, так и JNK и p38. При этом существует предположение о том, что механизмы активации этих киназ при снижении концентрации кислорода отличаются от механизмов, действующих в случае активации пролиферации ростовыми факторами сыворотки (Das et al., 2001). В некоторых исследованиях высказывается предположение о том, что пролиферативная активность ММСК жировой ткани тоже может быть связана с активацией этих сигнальных каскадов (Lee et al., 2011; Zonca et al., 2012).

Таким образом, ММСК жировой ткани человека в условиях пониженного содержания кислорода изменяют свои моррофункциональные свойства, что проявляется в уменьшении размеров и изменении формы клеток, активации пролиферации, которая, по всей видимости, не является результатом трансформации клеток, приводящей к неограниченному росту культуры, однако сопровождается изменением экспрессии генов, кодирующих регуляторы клеточного цикла.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы ОФФМ РАН.

Список литературы

Буравкова Л. Б., Анохина Е. Б. 2007. Влияние гипоксии на стromальные клетки-предшественники из костного мозга крыс на ранних этапах культивирования. Бюл. эксперим. биол. мед. 4 : 386—389.

Буравкова Л. Б., Гринаковская О. С., Андреева Е. Р., Жамбалова А. П., Козионова М. П. 2009. Характеристика мезенхимных стромальных клеток из липоаспирата человека, культивируемых при пониженном содержании кислорода. Цитология. 51(1) : 5—11.

Зверева М. Э., Щербакова Д. М., Донцова О. А. 2010. Теломераза: структура, функции и пути регуляции активности. Успехи биол. хим. 50 : 155—202.

- Иванов К. П. 2012. Гипоксия мозга и роль активных форм кислорода и недостатка энергии в дегенерации нейронов. Успехи физиол. наук. 1 : 95—110.
- Самойлович М. П., Пиневич А. А., Шашкова О. А., Варташян Н. Л., Киселева Л. Н., Клинович В. Б. 2013. Влияние мезенхимных стromальных клеток на рост В-клеточных линий и синтез ими иммуноглобулинов. Цитология. 55 (1) : 45—51.
- Basciano L., Nemos C., Foliguet B., de Isla N., de Carvalho M., Tran N., Dalloul A. 2011. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol.* 12 : 12.
- Brooks A. R., Shiffman D., Chan C. S., Brooks E. E., Milner P. G. 1996. Functional analysis of the human cyclin D2 and cyclin D3 promoters. *J. Biol. Chem.* 271 : 9090—9099.
- Caplan A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9 : 641—650.
- Chow D. C., Wenning L. A., Miller W. M., Papoutsakis E. T. 2000. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys. J.* 81 : 685—696.
- Das M., Bouchey D. M., Moore M. J., Hopkins D. C., Nemeoff R. A., Stenmark K. R. 2001. Hypoxia-induced proliferative response of vascular adventitial fibroblasts is dependent on G-protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 276 : 1563—1564.
- Da Silva Meirelles L., Chagastelles P. C., Nardi N. B. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 1 : 2204—2213.
- Dos Santos F., Andrade P. Z., Boura J. S., Abecasis M. M., da Silva C. L., Cabral J. M. 2010. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J. Cell. Physiol.* 223 : 27—35.
- Fehrer C., Brunauer R., Laschober G., Unterluggauer H., Reitinger S., Kloss F., Gully C., Gassner R., Lepperdinger G. 2007. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell.* 6 : 745—757.
- 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.
- Hemphill J. C., Smith W. S., Sonne D. C., Morabito D., Manley G. T. 2005. Relationship between brain tissue oxygen tension and CT perfusion: Feasibility and initial results. *Amer. J. Neuroradiol.* 26 : 1095—1100.
- Hung S. P., Ho J. H., Shih Y. R., Lo T., Lee O. K. 2012. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 30 : 260—266.
- Iida K., Takeda-Kawaguchi T., Tezuka Y., Kunisada T., Shiba-T., Tezuka K. 2010. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. *Arch. Oral Biol.* 55 : 648—654.
- Jeffrey P. D., Tong L., Pavletich N. P. 2000. Structural basis of inhibition of CDK—cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes Develop.* 14 : 3115—3125.
- Jungermann K., Kietzmann T. 1997. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int.* 51 : 402—412.
- Kunz M., Ibrahim S. M. 2003. Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Mol. Cancer.* 2 : 23.
- Laderoute K. R., Webster K. A. 1997. Hypoxia/reoxygenation stimulates Jun kinase activity through redox signaling in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 80 : 336—344.
- Lavrentieva A., Majore I., Kasper C., Hass R. 2010. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun. Signal.* 8 : 18—27.
- Ledoux S., Runemberg I., Koumanov K., Michel J. B., Trugnan G., Friedlander G. 2003. Hypoxia enhances Ecto-5'-Nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: role of membrane lipids. *Circ. Res.* 92 : 848—855.
- Lee J., Roh K. B., Kim S. C., Lee J., Park D. 2011. Soy peptide-induced stem cell proliferation: involvement of ERK and TGF-β1. *J. Nutr. Biochem.* 23 : 134—1351.
- Martinsson-Ahlzen H. S., Liberal V., Grunenfelder B., Chaves S. R., Spruck C. H., Reed S. I. 2008. Cyclin-dependent kinase-associated proteins Cks1 and Cks2 are essential during early embryogenesis and for cell cycle progression in somatic cells. *Mol. Cell. Biol.* 28 : 5698—5709.
- Matsuda N., Morita N., Matsuda K., Watanabe M. 1998. Proliferation and differentiation of human osteoblastic cells associated with differential activation of MAP kinases in response to epidermal growth factor, hypoxia, and mechanical stress *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 : 350—354.
- Matsumoto K., Moriuchi T., Koji T., Nakane P. K. 1987. Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *EMBO J.* 6 : 637—642.
- Matsumoto S., Utsumi H., Aravalluvan T., Matsumoto K., Matsumoto A., Devasahayam N., Sowers A. L., Mitchell J. B., Subramanian S., Krishna M. C. 2005. Influence of proton T1 on oxymetry using Overhauser enhanced magnetic resonance imaging. *Magn. Reson. Med.* 54 : 213—217.
- Mik E. G., van Leeuwen T. G., Raat N. J., Ince C. 2004. Quantitative determination of localized tissue oxygen concentration *in vivo* by two-photon excitation phosphorescence lifetime measurements. *J. Appl. Physiol.* 97 : 1962—1969.
- Puntschart A., Wey E., Jostarnadt K., Vogt M., Wittwer M., Widmer H. R., Hoppeler H., Billeter R. 1998. Expression of fos and jun genes in human skeletal muscle after exercise. *Amer. J. Physiol.* 274 : 129—137.
- Raheja L. F., Genetos D. C., Wong A. 2011. Hypoxic regulation of mesenchymal stem cell migration: the role of RhoA and HIF-1α. *Cell Biol. Int.* 35 : 981—989.
- Safwani W. K., Makpol S., Sathapan S., Chua K. H. 2012. The impact of long-term *in vitro* expansion on the senescence-associated markers of human adipose-derived stem cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166 : 2101—2113.
- Scott P. H., Paul A., Belham C. M., Peacock A. J., Wadsworth R. M., Gould G. W., Welsh D., Plevin R. 1998. Hypoxic stimulation of the stress-activated protein kinases in pulmonary artery fibroblasts. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 158 : 958—962.
- Synnestvedt K., Furuta G. T., Comerford K. M., Louis N., Karhausen J., Eltzschig H. K., Hansen K. R., Thompson L. F., Colligan S. P. 2002. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* 110 : 993—1002.
- Wild J. M., Fichele S., Woodhouse N., Paley M. N., Kasuboski L., van Beek E. J. 2005. 3D volumelocalized pO₂ measurement in the human lung with 3He MRI. *Magn. Reson. Med.* 53 : 1055—1064.
- Yu D. Y., Cringle S. J. 2005. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp. Eye Res.* 80 : 745—751.
- Zonca M., Mancheño-Corvo P., DelaRosa O., Mañes S., Büscher D., Lombardo E., Planelles L. 2012. APRIL and BAFF proteins increase proliferation of human adipose-derived stem cells through activation of Erk1/2 MAP kinase. *Tissue Eng. Part A.* 18 : 852—859.
- Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7 : 211—228.

LONG-TERM EXPANSION OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS
UNDER REDUCED OXYGEN TENSION

Yu. V. Rylova, L. B. Buravkova

Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow;
e-mail: yuliaril@mail.ru

We have shown that the decrease in oxygen tension in the culture medium of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) results in a short-term reduction in the proportion of CD73⁺-cells in the population, without effecting the number of cells expressing other constitutive surface markers (CD90 and CD105). In this case, the heterogeneity of the cell population declined: large spread cells disappeared. The proliferative activity of MMSCs significantly increased and remained stable in conditions in which the oxygen content was close to the tissue oxygen levels (5 % O₂). At lower oxygen concentration, proliferative activity of the cells gradually reduced from passages 3—4. The increase in proliferative activity was not accompanied by increased expression of telomerase gene indicating the absence of cell transformation. However, genome-wide analysis of MMSC gene expression level revealed changes in expression of cyclins (CCND2 and PCNA), regulatory subunit cyclin-dependent kinase (CKS2) and an inhibitor of cyclin-dependent kinase (CDKN2C), regulating the cell cycle, which is obviously facilitated the increase in the proliferative capacity of cells at lower oxygen tension.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, immunophenotype, morphology, proliferation.