

## УСТОЙЧИВОСТЬ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ К АНОКСИИ IN VITRO

© Ю. В. Рылова, Л. Б. Буравкова

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

Проведено сравнение эффектов аноксии после культивирования мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) при 20 и 5% O<sub>2</sub>. Показано, что отсутствие кислорода в фазе роста сопровождалось активной пролиферацией клеток, уменьшением их размера и увеличением гомогенности популяции. При этом аноксия уменьшала долю CD54<sup>+</sup>-клеток и не изменяла количество клеток, несущих маркеры CD90 и CD73. Уровень продукции лактата в условиях аноксии был значительно выше у клеток, предварительно культивированных при 20% O<sub>2</sub>. Однако наиболее высоким молярным соотношением продуцируемого лактата и потребляемой глюкозы характеризовались ММСК, предварительно культивированные при 5% O<sub>2</sub>. Снижение этого соотношения наблюдалось в ММСК, помещенных в условия аноксии в состоянии монослоя. При сохранении высокого уровня жизнеспособности после 10-суточной аноксии как в фазе роста, так и в состоянии монослоя в клетках значительно снижался трансмембранный потенциал митохондрий. Содержание активных форм кислорода в ММСК увеличивалось только при действии аноксии в активной фазе роста культур. Полученные данные свидетельствуют о том, что ММСК хорошо переносят длительную аноксию за счет активации гликолиза в фазе роста и снижения его интенсивности в состоянии монослоя, происходящих на фоне угнетения функционального состояния митохондрий.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, гипоксия, аноксия, пролиферация, метаболизм.

**Принятые сокращения:** АФК — активные формы кислорода, ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки.

Результаты исследований последнего десятилетия показали, что кислород является важным компонентом тканевого микроокружения и гомеостаза прогениторных клеток. Особый интерес исследователей к мультипотентным мезенхимным стромальным клеткам (ММСК) взрослого организма и воздействию на них жесткой гипоксии (< 1% O<sub>2</sub>) вызван накоплением данных о свойствах и функциях этих клеток в организме. Известно, что основная тканевая ниша ММСК — костный мозг — характеризуется довольно низким уровнем содержания кислорода, который позволяет поддерживать недифференцированное состояние мезенхимных стromальных клеток, а также стимулирует их пролиферативную активность (Chow et al., 2000; Буравкова и др., 2007; Fehrer et al., 2007; Mohyeldin et al., 2010). По мнению многих исследователей, ММСК выходят из своей ниши и мигрируют в очаг повреждения ткани для осуществления своей трофической и регенеративной функции (Da Silva Meirelles et al., 2006; Caplan, 2008). Локальная жесткая гипоксия в тканях может возникать в результате различных патологических процессов, например при ишемии, воспалении или механических повреждениях тканей. При этом одновременно с гипоксией может происходить истощение питательных веществ, что, безусловно, может снизить эффективность их функционирования и нарушить процесс reparации ткани.

Ранее в наших и в работах других авторов было показано, что гипоксия до 1% O<sub>2</sub> и меньше не оказывает повреждающего воздействия на ММСК из жировой ткани (Stubbs et al., 2012; Рылова и др., 2013). Более того, предкультивирование в условиях гипоксии способствует усилению терапевтического потенциала ММСК (Rosova et al., 2008). Тем не менее некоторые данные указывают на то, что культивирование в условиях гипоксии и отсутствия сыворотки индуцирует апоптоз ММСК (Zhu et al., 2006; Potier et al., 2007).

В настоящее время активно накапливаются данные о влиянии гипоксии на основные морфофункциональные свойства ММСК (Follmar et al., 2006; Grayson et al., 2006; Lavrentieva et al., 2010; Buravkova et al., 2013). Однако работы по оценке влияния полного отсутствия кислорода (аноксии) на свойства ММСК очень мало. В работе Анохиной с соавторами (2009), посвященной влиянию аноксии на ММСК костного мозга крыс, показано, что аноксия не стимулирует клеточную гибель и не приводит к остановке клеточного цикла.

В связи с этим целью нашей работы была оценка иммунофенотипа, жизнеспособности, пролиферативного потенциала и метаболизма глюкозы ММСК жировой ткани человека в условиях аноксии.

## Материал и методика

ММСК выделяли из жировой ткани по описанной методике (Zuk et al., 2002) с модификациями (Буравкова и др., 2009). Ткань измельчали и обрабатывали раствором коллагеназы IA в среде  $\alpha$ -MEM в течение 35 мин при 37 °C. Затем суспензию фильтровали через фильтр с диаметром пор 10 мкм и центрифугировали 2 раза в течение 5 мин при 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в среде  $\alpha$ -MEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, высевали в чашки Петри и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % N<sub>2</sub>, 20 % O<sub>2</sub>, 100%-ная влажность). Смену среды проводили через 72 ч. После образования предмонослоя клетки пассировали и помещали в мультигазовый инкубатор (Sanyo, Япония) в условия гипоксии с содержанием кислорода 5 %. Со 2-го пассажа клетки, культивируемые при содержании O<sub>2</sub> 20 (нормоксия) и 5 %, помещали в условия аноксии, которые создавали используя герметичную камеру (Stemcell Technologies, США), модифицированную датчиками давления, концентрации кислорода и продували газовой смесью (95 % N<sub>2</sub> и 5 % CO<sub>2</sub>) до установления концентрации кислорода ~ 0 %. Часть клеток помещали в условия аноксии на 10 сут без смены среды сразу после пассирования, другую часть — на 5 сут без смены среды после достижения 80 % конфлюэнтности. Условия аноксии сопровождались естественным снижением питательных компонентов в среде, так как во время аноксии замену культуральной среды не проводили. Контрольные культуры ММСК оставались в условиях с содержанием O<sub>2</sub> 20 и 5 %, замену среды также не проводили.

Морфологические характеристики ММСК оценивали по микрофотографиям случайно выбранных полей зрения с использованием светового фазово-контрастного микроскопа Leica DM IL (Германия) и цветной видеокамеры DC500 (Leica, Германия).

Пролиферативную активность ММСК оценивали, анализируя не менее 5 полей в каждом флааконе. С помощью программы Sigma ScanPro 5.0 Image Analysis Software (SPSS Inc., США) подсчитывали число клеток и рассчитывали число удвоений популяций (PD) по формуле PD = log<sub>2</sub>N/No, где No и N — начальное и конечное количество клеток соответственно (Wolffrom et al., 1994).

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

Жизнеспособность ММСК оценивали по количеству апоптотических и некротических клеток методом проточной цитофлуориметрии с помощью набора ANNEXIN V-FITC—PI (Immunotech, Франция) согласно инструкции фирмы-производителя. Апоптотические клетки определяли за счет высокоаффинного связывания аннексина V, меченного FITC, с фосфолипидом фосфатидилсерином, который в процессе апоптоза перемещается на внешний слой мембранны клетки. Некротические клетки выявляли по связыванию иодида пропидия (PI) с ДНК при повреждении целостности мембран. Клетки, осторожно ресуспендируя, помещали в охлажденный при

4 °C связывающий буфер из расчета не менее 100 тыс. на 100 мкл буфера в каждой пробе и вносили по 5 мкл PI и 1 мкл аннексина V-FITC, инкубировали в течение 15 мин при 4 °C, затем добавляли в каждую пробу 400 мкл связывающего буфера, ресуспендировали и анализировали количество поврежденных клеток на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США).

Концентрацию лактата и глюкозы определяли ферментативным колориметрическим методом согласно инструкции фирмы-производителя специальных реагентов (Biocon, Германия) на спектрофотометре при длине волны 546 нм (оптический путь 1 см, температура 37 °C) (Eppendorf, Германия). Концентрацию (C) лактата (C<sub>La</sub>) и глюкозы (C<sub>Glu</sub>) пересчитывали на количество клеток по формуле C = [ΔMet]/X<sub>v</sub>, где [ΔMet] — величина, на которую изменилась концентрация глюкозы (лактата) в среде за 24 ч, X<sub>v</sub> — среднее количество клеток во флааконе в данный момент времени. Молярное соотношение продуцируемого лактата и потребляемой глюкозы (Y<sub>La/Glu</sub>) рассчитывали как соотношение C<sub>La</sub>/C<sub>Glu</sub>.

Выявление митохондрий в ММСК и определение их трансмембранных потенциала проводили после окончания условий аноксии с помощью флуоресцентного красителя MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes, США). Интенсивность флуоресценции связавшегося красителя прямо пропорциональна величине трансмембранных потенциала митохондрий. MitoTracker вносили в среду культивирования ММСК в конечной концентрации 500 нг/мл и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C и в соответствующей газовой среде.

Выявление активных форм кислорода (АФК) в ММСК проводили после окончания их культивирования в условиях аноксии с помощью ацетилового эфира флуоресцентного красителя 5,6-хлорметил-2,7-дихлородигидрофлуоресцеин-диацетата (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) (Molecular Probes, США). Краситель вносили в среду культивирования ММСК в конечной концентрации 20 мкМ и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C и в соответствующей газовой среде. Интенсивность окрашивания оценивали с помощью проточного цитофлуориметра Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США).

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

Использовали следующие реагенты: среда  $\alpha$ -MEM (MP Biomedicals, США); L-глутамин (ПанЭко, Россия); раствор антибиотиков в 0.85%-ном солевом буфере, содержащем 10 000 ед./мл пенициллина и 10 000 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко или Биолот, Россия); эмбриональная телячья сыворотка (Hyclone, США); 20 мМ фосфатный буфер (Биолот, Россия); раствор трипсина и ЭДТА с концентрациями веществ 0.5 и 0.2 г/л соответственно (Gibco или Sigma, США); 0.075%-ный раствор коллагеназы IA (Sigma, США); моноклональные антитела против антигенов CD31, CD54, CD73, CD90 и CD105, коньюгированные с FITC или PE, и соответствующие изотипические контроли (Immunotec, Франция); набор для определения концентрации лактата и глюкозы (Biocon, Германия); набор ANNEXIN V-FITC—PI (Immunotech, Франция); флуоресцентные красители MitoTracker Red CMXRos и CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Molecular Probes, США).

## Результаты

**Морфология и иммунофенотипическая характеристика ММСК в условиях аноксии.** В популяциях ММСК, культивированных до 2-го пассажа в условиях содержания кислорода 20 % и затем помещенных на 10 сут в условия аноксии в фазе роста, увеличивалась доля клеток веретеновидной формы небольшого размера (100 мкм и менее). Контрольные клетки в условиях 20%-ного содержания  $O_2$  при этом сохраняли свою гетерогенную морфологию с ярко выраженной зернистостью в окколоядерной области (рис. 1, *a*, *в*). Культивирование ММСК при содержании кислорода 5 % в течение 10 сут без смены среды приводило к появлению распластанных клеток (до 200 мкм), тогда как перенос их в фазе роста в условия аноксии способствовал сохранению фибробластоподобной формы и меньшего размера (60—100 мкм), что было характерно для клеток, культивируемых при 5 %  $O_2$  и своевременной смене среды (рис. 1, *д*, *ж*). Влияние аноксии на ММСК в состоянии монослоя после культивирования в среде с содержанием  $O_2$  20 и 5 % не приводило к изменениям морфологии (рис. 1, *б*, *г*, *е*, *з*). Однако в популяции клеток, предварительно культивированных при 5 %  $O_2$ , образовывались участки с более плотным расположением клеток в виде нодул (рис. 1, *е*, *з*).

Аноксия не изменяла существенным образом иммунофенотип клеток. Доля клеток, содержащих характерные для ММСК поверхностные маркеры CD90 и CD73, оставалась на уровне контрольных значений вне зависимости от степени конфлюэнтности культуры. Тем не менее в условиях аноксии в растущих культурах, предварительно культивируемых при 20 и 5 %  $O_2$ , за 10 сут уменьшалась доля клеток, несущих на поверхности молекулу клеточной адгезии ICAM-1 (CD54) по сравнению с контрольными популяциями (табл. 1).

**Жизнеспособность ММСК в условиях аноксии.** После действия аноксии ММСК окрашивали аннексином V-FITC, который специфически связывается с фосфатидилсерином на поверхности клеточной мембранны в процессе гибели клетки путем апоптоза ( $AnnV^+$ -клетки), и PI, который, проникая через поврежденную клеточную мембрану, окрашивает ДНК некротических клеток ( $PI^+$ -клетки). Детектируемое смешанное окрашивание ( $AnnV^+/PI^+$ ) анализируемых клеток свидетельствовало о смене механизма их гибели, который может начинаться апоптозом и завершаться постапоптотическим некрозом, что нередко наблюдается в культурах клеток при достижении ими состояния монослоя.

Сравнительный анализ соотношения поврежденных и живых клеток в популяции показал, что ММСК, предварительно культивированные при 20 %  $O_2$ , за 10 сут в фазе роста в условиях аноксии содержали в 3 раза больше  $AnnV^+$ -клеток и в 1.5 раза больше  $PI^+$ -клеток по сравнению с контролем. В клетках, предварительно культивированных при 5 %  $O_2$  и затем помещенных в условия аноксии, практически в 2 раза возросло число  $AnnV^+/PI^+$ -клеток. Тем не менее все популяции ММСК при длительной экспозиции в условиях аноксии без смены питательной среды сохранили высокий уровень жизнеспособности, доля живых клеток составляла не менее 88 % популяции.

Воздействие аноксии в течение 5 сут на ММСК в состоянии монослоя оказалось еще менее выраженный повреждающий эффект, доля живых клеток в популяции составляла не менее 90 %. При этом в контрольных культу-

рах ММСК без смены питательной среды в состоянии монослоя количество апоптотических и некротических клеток было минимальным (табл. 2).

**Пролиферативная активность ММСК в условиях аноксии.** Перенос культивированных при 20 %  $O_2$  клеток в условия аноксии способствовал увеличению пролиферативной активности. Популяция ММСК в фазе роста, подвергаемая аноксии в течение 10 сут, совершила в среднем 1.8 удвоения, что в 1.4 раза превысило количество удвоений популяции контрольных клеток при 20 %  $O_2$ . Аноксия после предварительного культивирования при 5 %  $O_2$  не оказала влияния на пролиферацию клеток, сохранив в среднем 2.4 удвоения в сутки (рис. 2).

**Метabolизм глюкозы клетками в условиях аноксии.** Анализ результатов не выявил изменения потребления глюкозы ММСК при аноксии по сравнению с контрольными клетками. При пересчете количества потребленной глюкозы на клетку оказалось, что ММСК, культивируемые при 20 %  $O_2$ , потребляли в среднем  $63 \pm 9.1$  пмоль на 1 клетку. Условия аноксии вызывали незначительное увеличение этого параметра до  $80 \pm 4.4$  пмоль на 1 клетку (рис. 3, *а*). Культивирование при 5 %  $O_2$  сопровождалось снижением потребления глюкозы до  $43 \pm 6.1$  пмоль на 1 клетку. Аноксия в течение 10 сут не вызывала дополнительного снижения этого показателя. Аноксия в течение 5 сут для клеток в состоянии монослоя сопровождалась полным потреблением глюкозы из среды культивирования. При этом все популяции клеток потребляли одинаковое количество глюкозы (от  $30 \pm 2.8$  до  $35 \pm 4.0$  пмоль на 1 клетку) (рис. 3, *б*).

Пересчет концентрации продуцируемого во время фазы роста при аноксии лактата на 1 клетку показал более выраженную продукцию лактата (в 1.6 раза) по сравнению с ММСК, культивированными при 20 % ( $262 \pm 9.1$  пмоль на 1 клетку). Для клеток, предварительно культивированных при 5 %  $O_2$ , в условиях аноксии такого увеличения не было, продукция лактата оставалась на уровне  $139 \pm 3.7$  пмоль на 1 клетку (рис. 3, *а*). В ММСК, помещенных в условия аноксии в состоянии монослоя, уровень этого метаболита варьировал от  $73 \pm 1.1$  до  $94 \pm 10.7$  пмоль на 1 клетку (рис. 3, *б*).

Однако для того чтобы оценить, испытывают ли клетки недостаток кислорода, недостаточно определять только содержание лактата в среде культивирования. Для оценки эффективности катаболизма глюкозы в процессе гликолиза и окислительного фосфорилирования мы использовали молярное соотношение продуцируемого лактата и потребляемой глюкозы ( $Y_{La/Glu}$ ). Анализ показал, что перемещение ММСК в фазе роста, предкультуриванных при 20 %  $O_2$ , в условия аноксии сопровождается значительным увеличением молярного соотношения  $Y_{La/Glu}$ . Некоторое увеличение этого соотношения отмечается и для клеток, предкультуриванных при 5 %  $O_2$ . Увеличение соотношения  $Y_{La/Glu}$  свидетельствует об увеличении вклада анаэробного гликолиза в метаболизм глюкозы. Следует отметить, что в клетках в состоянии монослоя при аноксии, наоборот, этот параметр незначительно снижался по сравнению с контрольными значениями (табл. 3).

**Функциональное состояние митохондрий и содержание АФК в ММСК в условиях аноксии.** Функциональное состояние митохондрий в ММСК оценивали после действия аноксии с помощью потенциал-зависимого красителя MitoTracker Red CMXRos, интенсивность флуоресценции которого зависит от уровня трансмембранных потенциала митохонд-

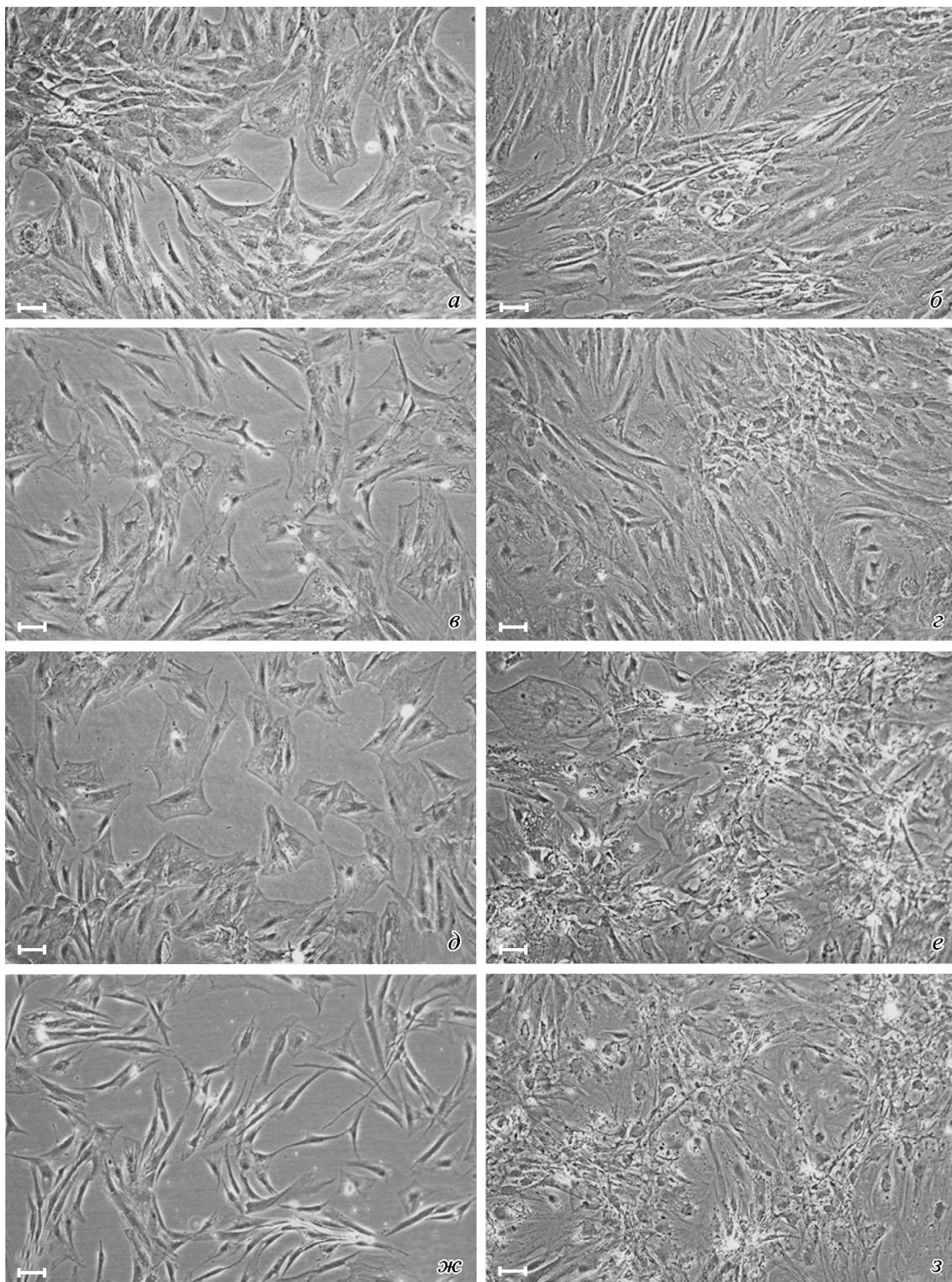


Рис. 1. Морфология ММСК при культивировании в следующих условиях: нормоксия (20 % O<sub>2</sub>, контроль) (а, б); аноксия с предварительным культивированием в условиях нормоксии (в, г); гипоксия (5 % O<sub>2</sub>, контроль) (д, е); аноксия с предварительным культивированием в условиях гипоксии (ж, з).

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

рий. Проточная цитофлуориметрия показала, что концентрация кислорода в среде культивирования не влияет на число окрашенных клеток, которое во всех случаях составляло более 95 %. А средняя интенсивность флуоресценции зонда в ММСК, находящихся как в фазе роста,

так и в состоянии монослоя, после действия аноксии уменьшалась в среднем на 50 % по сравнению с контролем. Клетки, культивируемые при 5 % O<sub>2</sub> тоже имели сниженный трансмембранный потенциал митохондрий (интенсивность флуоресценции красителя на 60 % ниже, чем

Таблица 1

**Количество ММСК, несущих поверхностные маркеры, в зависимости от содержания кислорода в культуральной среде**

Время аноксии и состояние клеток	Маркеры	Доля клеток, %, несущих поверхностные маркеры при содержании O <sub>2</sub>			
		20 %	0 % после перевода из 20 %	5 % (гипоксия)	0 % после перевода из 5 %
10 сут, фаза роста	CD54	62.9 ± 5.7	45.9 ± 7.7 <sup>a</sup>	73.4 ± 0.7	53.2 ± 11.6 <sup>b</sup>
	CD90	93.9 ± 2.8	77.2 ± 16.8	94.0 ± 1.1	97.7 ± 0.3
	CD73	95.7 ± 3.2	98.4 ± 1.4	98.2 ± 1.0	98.4 ± 1.3
	CD31	1.5 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.1
5 сут, монослой	CD54	45.7 ± 12.0	35.4 ± 9.9	71.3 ± 17.0	69.8 ± 5.3
	CD90	78.0 ± 9.4	75.8 ± 4.9	90.1 ± 5.1	90.7 ± 3.7
	CD73	94.1 ± 0.3	89.3 ± 1.3	98.0 ± 1.7	99.0 ± 0.6
	CD31	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.3

<sup>a</sup> Отличия от 20%-ного содержания O<sub>2</sub> достоверны. <sup>b</sup> Отличия от гипоксии достоверны;  $P \leq 0.05, n = 3$ .

Таблица 2

**Количество поврежденных ММСК в зависимости от содержания кислорода в культуральной среде**

Время аноксии и состояние клеток	Маркеры повреждения	Доля поврежденных клеток, %, при содержании O <sub>2</sub>			
		20 %	0 % после перевода из 20 %	5 % (гипоксия)	0 % после перевода из 5 %
10 сут, фаза роста	AnnV <sup>+</sup>	0.66 ± 0.07	1.90 ± 0.61	3.14 ± 1.04	3.62 ± 1.20
	PI <sup>+</sup>	2.14 ± 0.54	3.06 ± 1.60	4.26 ± 1.98	1.97 ± 0.40
	AnnV <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup>	6.79 ± 0.85	6.64 ± 1.36	3.55 ± 0.53	6.68 ± 1.76
	AnnV <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup>	90.40 ± 0.43	88.4 ± 0.37	89.10 ± 3.48	87.80 ± 2.50
5 сут, монослой	AnnV <sup>+</sup>	0.49 ± 0.09	0.95 ± 0.27	0.72 ± 0.16	3.12 ± 1.02
	PI <sup>+</sup>	3.05 ± 1.44	4.27 ± 0.51	2.27 ± 1.72	2.49 ± 1.61
	AnnV <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup>	3.54 ± 0.29	4.46 ± 0.43	1.80 ± 0.82	2.84 ± 0.43
	AnnV <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup>	93.00 ± 1.80	90.30 ± 0.29	95.20 ± 2.70	91.60 ± 0.20

у клеток, культивируемых при 20 % O<sub>2</sub>), но при переносе предварительно культивируемых при 5 % O<sub>2</sub> ММСК в условия аноксии дальнейшего снижения этого потенциала не было (рис. 4, *a, б*).

В популяции ММСК в условиях аноксии увеличивается доля клеток, окрашенных флуоресцентным красителем CM-H<sub>2</sub>DCFDA, с помощью которого выявляют АФК. В действительности доля окрашиваемых CM-H<sub>2</sub>DCFDA клеток в этих культурах была невысока и составляла чуть более 4 % (рис. 4, *г*). При этом аноксия не оказывала подобного действия на ММСК в состоянии монослоя, средняя интенсивность флуоресценции клеток соответствовала фоновым значениям (рис. 4, *г*).

### Обсуждение

В настоящее время свойства ММСК взрослого организма достаточно хорошо изучены. Современные исследования посвящены выяснению и изучению механизмов, посредством которых эти клетки осуществляют свои функции для поддержания и восстановления поврежденных тканей (Rodrigues et al., 2010). Особенно важна

информация о влиянии экстремальных факторов на свойства этих клеток. К таким факторам относятся крайне низкий уровень концентрации кислорода или полное его

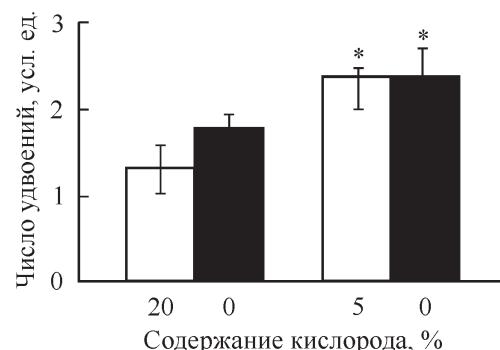


Рис. 2. Число клеточных удвоений популяции ММСК в фазе роста.

Белые столбцы — предкультивирование в присутствии соответственно 20 и 5 % O<sub>2</sub>, черные столбцы — последующий перевод этих же ММСК в условиях аноксии на 10 сут. Звездочкой показана достоверность различия от значения левого столбца ( $P \leq 0.05, n = 3$ ).

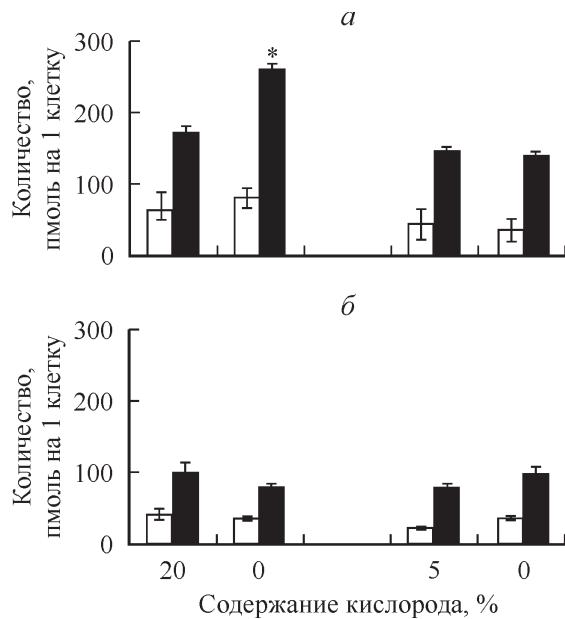


Рис. 3. Количество потребленной глюкозы (белые столбцы) и лактата (черные столбцы), продуцируемого в среду клетками после культивирования в условиях аноксии в фазе роста (а) и в состоянии монослоя (б).

Клетки предварительно культивировали при 20 или 5 % O<sub>2</sub>. Звездочкой показана достоверность отличия от значения при 20%-ном содержании O<sub>2</sub> ( $P \leq 0.05$ ,  $n = 3$ ).

отсутствие и снижение питательных компонентов в микроокружении, которым ММСК могут подвергаться в участках поврежденных тканей.

Необходимым параметром в идентификации культивируемых клеток является подтверждение статуса ММСК. На клетках 2-го пассажа ММСК мы показали стабильную экспрессию характерных для ММСК поверхностных маркеров CD73 и CD90 и отсутствие маркера CD31, свойственного эндотелиальным клеткам. Условия аноксии не изменили процентного соотношения клеток в популяции, несущих эти маркеры. Отмечаемое снижение доли CD54<sup>+</sup>-клеток при перемещении ММСК в условия аноксии в фазе роста может свидетельствовать о снижении взаимодействия клеток друг с другом. Клетки в этих культурах располагались по пластике достаточно равномерно, сохраняя незначительное количество контактов в отличие от контрольных культур, где ММСК плотно прилипают друг к другу по всей длине клетки. В состоянии монослоя количество CD54<sup>+</sup>-клеток не менялось, они не теряли контактов друг с другом, а в популяциях, предкультивированных при 5%-ном содержании O<sub>2</sub>, они образовывали участки с более плотным расположением клеток в виде нодул. Это наблюдение согласуется с исследо-

ваниями, проведенными на эндотелиальных клетках, которые при воздействии аноксии тоже сохраняли неизменный уровень экспрессии CD54 (Jiang et al., 2003).

Наблюдаемые изменения морфологии клеток и уменьшение их размеров при перестановке в условия аноксии в фазе роста происходили за счет появления новых клеток в популяции, а не за счет изменения формы и размера уже присутствующих клеток в культуре, о чем свидетельствует отсутствие выраженных различий в популяциях ММСК, помещенных в аноксию в состоянии монослоя. Если рассматривать крупные клетки в культуре ММСК как стареющие или вставшие на путь дифференцировки, то очевидно, что аноксия снижает гетерогенность пролиферирующей популяции ММСК, не оказывая повреждающего воздействия (Safwani et al., 2012). Об этом также свидетельствует незначительное количество поврежденных клеток в культурах, несмотря на длительность аноксии и постепенное снижение питательных компонентов среды.

Подобная схема эксперимента, не предусматривающая смены среды, была применена и другими авторами для оценки повреждающего воздействия гипоксии (pO<sub>2</sub> < 1.5 mm Hg). Авторы показали, что начиная с 9-х сут действия гипоксии количество поврежденных клеток резко возрастало, тогда как клетки в условиях 20 % O<sub>2</sub> могли поддерживать высокий уровень жизнеспособности более длительное время (Deschepper et al., 2011). Кроме того, представленные данные хорошо согласуются с ранее проведенными исследованиями, посвященными воздействию аноксии на ММСК костного мозга крыс: аноксия в течение 96 ч не сопровождалась значительной клеточной гибелью, а выраженное повреждение клеток отмечалось лишь после 14-суточного культивирования в этих условиях (Анохина и др., 2009).

Факт высокой жизнеспособности ММСК в условиях жесткой гипоксии подтверждается исследованиями по комбинированному воздействию гипоксии и сывороточного голода. В частности, не было отмечено более быстрой гибели клеток при 0.5—1 % O<sub>2</sub> в присутствии 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в среде. Однако отсутствие ЭТС сопровождалось выраженной гибелью клеток как при 1, так и при 20 % O<sub>2</sub>. Это позволило предположить, что гипоксия не является фактором, лимитирующим жизнеспособность ММСК (Zhu et al., 2006; Potier et al., 2007).

Для большинства клеток глюкоза является наиболее важным питательным компонентом среды культивирования для получения энергии, необходимой для роста и функционирования. Отсутствие смены среды в процессе роста культуры в течение 10 сут в настоящей работе не приводило к снижению числа удвоений ММСК в условиях как 20, так и 5 % O<sub>2</sub>. Количество клеточных удвоений популяции оставалось в пределах ранее показанных нами

Таблица 3

Молярное соотношение продуцируемого лактата и потребляемой глюкозы ( $Y_{La/Glu}$ ) для ММСК, культивируемых при различном содержании кислорода

Время аноксии и состояние клеток	$Y_{La/Glu}$ ( усл. ед.) при содержании O <sub>2</sub>			
	20 %	0 после перевода из 20 %	5 %	0 после перевода из 5 %
10 сут, фаза роста	2.70 ± 0.14	3.30 ± 0.27	3.40 ± 0.21	3.90 ± 0.51
5 сут, монослой	2.70 ± 0.17	2.20 ± 0.31	3.70 ± 0.39	3.00 ± 0.20

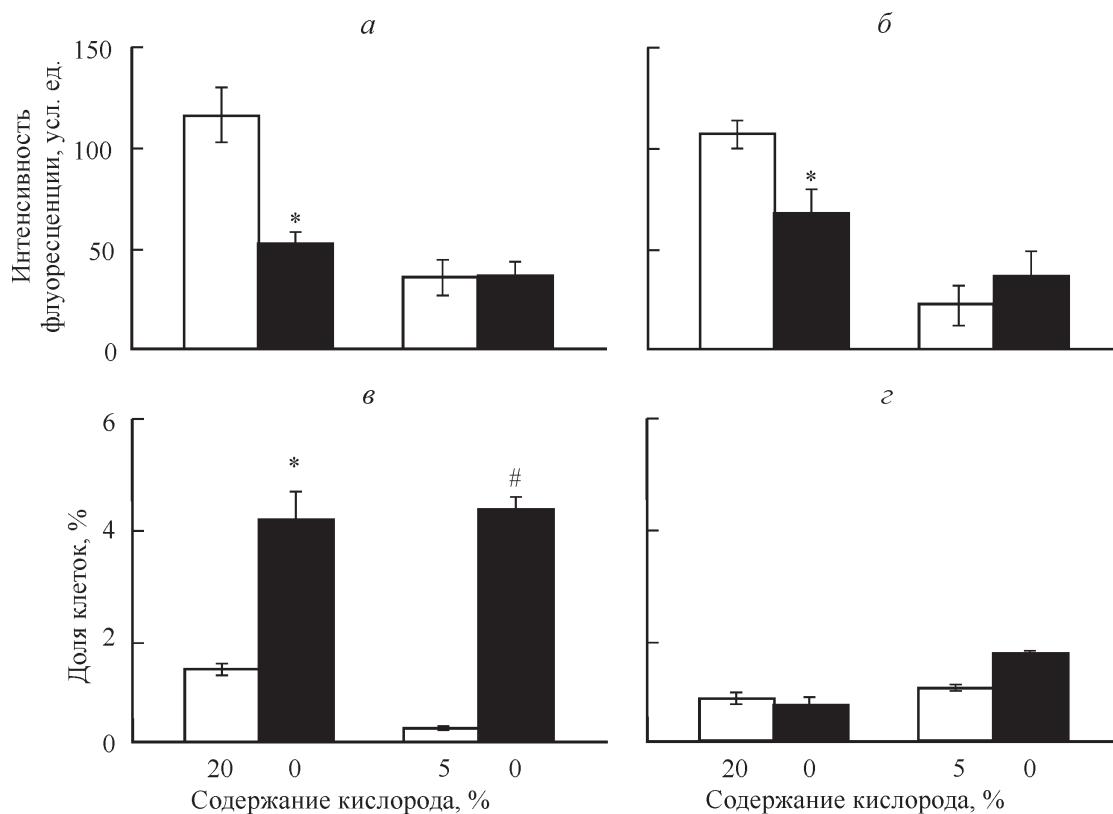


Рис. 4. Средняя интенсивность флуоресценции митохондриального красителя Mito Tracker Red CMXRos в ММСК (*a*, *б*) и доля клеток, содержащих АФК-зависимый краситель CM-H<sub>2</sub>DCFDA (*в*, *г*) после 10-суточной аноксии в фазе роста (*a*, *в*) и в состоянии монослоя (*б*, *г*).

Звездочкой и решеткой показана достоверность отличия от значения в условиях соответственно 20 и 5 % O<sub>2</sub> ( $P \leq 0.05$ ,  $n = 3$ ).

значений (Рылова и др., 2013). Аноксия после культивирования клеток при 20 % O<sub>2</sub> стимулировала их пролиферативную активность, а после предварительного культивирования при 5 % O<sub>2</sub> не увеличивала число удвоений. В условиях еще более низкого уровня кислорода (3 и 1 %) после предварительного культивирования при 5 % O<sub>2</sub> мы тоже не отмечали дополнительного увеличения пролиферативной активности ММСК жировой ткани (Рылова и др., 2013).

Логично предположить, что *in vitro* биоэнергетика клеток при пониженном и при атмосферном содержании кислорода будет разной. Несмотря на некоторые различия в экспериментальных протоколах, основная часть накопленных данных о метаболизме глюкозы ММСК из различных источников свидетельствует о превалировании гликолитического пути метаболизма глюкозы в условиях гипоксии (Follmar et al., 2006; Dos Santos et al., 2010; Lavrentieva et al., 2010; Deschepper et al., 2011; Buravkova et al., 2013). Так, культивирование ММСК костного мозга в условиях 0.5%-ного содержания кислорода не оказывало повреждающего воздействия и более 95 % клеток сохраняли высокий уровень жизнеспособности. Добавление ингибитора дыхательной цепи 2,4-динитрофенола в условиях 20%-ного содержания кислорода тоже не сопровождалось гибелю клеток и не изменяло трансмембранный потенциала митохондрий (Mylotte et al., 2008). Это позволило предположить, что ММСК используют преимущественно гликолитический путь получения энергии. Депривация глюкозы приводила к резкому уменьшению продукции АТФ до 20 %, которая в дальнейшем уже не менялась, подтверждая, что даже в стандартных усло-

виях культивирования не менее 80 % общего количества АТФ в клетке синтезируется гликолитическим путем (Mylotte et al., 2008; Dos Santos et al., 2009).

Известно, что в процессе гликолиза превращение одной молекулы глюкозы заканчивается образованием двух молекул АТФ и двух молекул пирувата, который в присутствии кислорода поступает в митохондрии для дальнейшего окисления, а в отсутствие кислорода превращается в лактат. Таким образом, если вся глюкоза превращается в лактат, соотношение Y<sub>La/GLu</sub> соответствует значению 2. В настоящей работе молярное соотношение Y<sub>La/GLu</sub> превышает это значение. По всей видимости, при полном истощении глюкозы в культуральной среде клетки метаболизировали другие компоненты питательной среды, например L-глютамин и другие аминокислоты, которые в результате дезаминирования и трансаминирования могут включаться в глюконеогенез. Кроме того, недавние результаты показали, что гипоксическое прекондиционирование при 1 % O<sub>2</sub> способствует активации накопления гликогена для получения АТФ при последующем культивировании в отсутствие сыворотки и глюкозы в среде, позволяя сохранять жизнеспособность ММСК. Посредством PI3K/Akt, HIF-1 и киназы гликогенсинтазы-3β (GSK-3β) в условиях гипоксии активируется экспрессия генов транспортера глюкозы-1 (GLUT-1), гексокиназы (HK), гликогенсинтазы-1 (GS-1) и гликогенфосфорилазы (GP), которые регулируют накопление и распад гликогена в условиях гипоксии (Zhu et al., 2014).

Важно отметить, что плотность посадки клеток в культуре практически не влияет на эффективность реак-

ций анаэробного гликолиза при 20 и 5 % O<sub>2</sub>, что соответствует отсутствию зависимости молярного соотношения Y<sub>La/Glu</sub> и начальной плотности культивирования (Higuera et al., 2009). Эти данные также свидетельствуют об исходном превалировании гликолиза над окислительным фосфорилированием в этих клетках. Однако при помещении монослойных культур в условия аноксии мы детектировали снижение показателя Y<sub>La/Glu</sub>, который, тем не менее, превышал значение 2. Снижение молярного соотношения происходило из-за меньшей продукции лактата при том же потреблении глюкозы.

Представленные нами данные об уменьшении функциональной активности митохондрий в условиях аноксии хорошо коррелируют с результатами, указывающими на равнозначное снижение скорости потребления кислорода и трансмембранных потенциала митохондрий при 1—5 % O<sub>2</sub> (Lavrentieva et al., 2010; Buravkova et al., 2013).

В ряде работ высказывается предположение о том, что переключение метаболизма глюкозы на анаэробный гликолиз осуществляется посредством зависимых от напряжения анионных каналов (VDAC) митохондрий. В условиях гипоксии гексокиназа, первый фермент гликолиза, ингибирует каналы и происходит замедление всего митохондриального метаболизма и содействие гликолизу (Lemasters et al., 2006). Исследователи предполагают, что в эти механизмы могут быть вовлечены такие факторы, как цитокины, NADH, АФК и активные формы азота, фосфорилирование белков. Показано, что закрытие может происходить в результате фосфорилирования протеинкиназой А (РКА), а открытие VDAC2 — при участии GSK-3β (Lemasters et al., 2012). В некоторых случаях VDAC, по-видимому, действует в качестве ингибитора митохондриального метаболизма, что может быть полезно для ограничения энергетически невыгодного гидролиза АТФ во время ишемии или гипоксии.

Таким образом, оказавшись в условиях неблагоприятного воздействия факторов микроокружения (гипоксия, аноксия, снижение питательных компонентов) ММСК могут поддерживать не только высокий уровень жизнеспособности, но и пролиферативный потенциал. Это возможно за счет ранее запасенных в процессе активного гликолиза внутриклеточных метabolитов, что подтверждается завышенным молярным соотношением Y<sub>La/Glu</sub> и ограничением митохондриального метаболизма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00993).

#### Список литературы

Анохина Е. Б., Буракова Л. Б., Гальчук С. В. 2009. Устойчивость мезенхимальных стromальных клеток-предшественников костного мозга крыс к аноксии *in vitro*. Клеточные технологии в биологии и медицине. 3 : 165—168. (Anokhina E. B., Buravkova L. B., Galchuk S. V. 2009. Resistance of rat bone marrow mesenchymal stromal precursor cells to anoxia *in vitro*. Bull. Exp. Biol. Med. 148 : 148—151.)

Буракова Л. Б., Анохина Е. Б. 2007. Влияние гипоксии на стромальные клетки предшественники из костного мозга крыс на ранних этапах культивирования. Бюл. эксперим. биол. мед. 143 (4) : 386—389. (Buravkova L. B., Anokhina E. B. 2007. Effect of hypoxia on stromal precursors from rat bone marrow at the early stage of culturing. Bull. Exp. Biol. Med. 143 (4) : 411—413.)

Буракова Л. Б., Гринаковская О. С., Андреева Е. Р., Жамбалова А. П., Козионова М. П. 2009. Характеристика мезенхимальных стромальных клеток из липоаспираата человека, культивируемых при пониженном содержании кислорода. Цитология. 51(1) : 5—11. (Buravkova L. B., Grinakovskaya O. S., Andreeva E. R., Zhambalova A. P., Kozionova M. P. 2009. Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under a lower oxygen tension. Tsitologiya. 51 (1) : 5—11.)

Рылова Ю. В., Буракова Л. Б. 2013. Постоянное культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при пониженном содержании кислорода. Цитология. 55 (12) : 852—860. (Rylova J. V., Buravkova L. B. 2014. Long-term expansion of multipotent mesenchymal stromal cells under reduced oxygen tension. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 8 (2) : 107—114.)

Buravkova L. B., Rylova Y. V., Andreeva E. R., Kulikov A. V., Pogodina M. V., Zhivotovsky B., Gogvadze V. 2013. Low ATP level is sufficient to maintain the uncommitted state of multipotent mesenchymal stem cells. Biochim. biophys. acta. 1830 : 4418—4425.

Caplan A. 2008. All MSCs are pericytes? Cell Stem Cell. 3 : 229—230.

Chow D. C., Wenning L. A., Miller W. M., Papoutsakis E. T. 2000. Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. Biophys. 81 : 685—696.

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.

Deschepper M., Oudina K., David B., Myrtil V., Collet C., Bensidhoum M., Logeart-Avramoglou D., Petite H. 2011. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. J. Cell Mol. Med. 15 : 1505—1514.

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.

Follmar K. E., Decroos F. C., Prichard H. L., Wang H. T., Erdmann D., Olbrich K. C. 2006. Effects of glutamine, glucose, and oxygen concentration on the metabolism and proliferation of rabbit adipose-derived stem cells. Tissue Eng. 12 : 3525—3533.

Grayson W. L., Zhao F., Izadpanah R., Bunnell B., Ma T. 2006. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. J. Cell Physiol. 207 : 331—339.

Higuera G., Schop D., Janssen F. 2009. Quantifying *in vitro* growth and metabolism kinetics of human mesenchymal stem cells using a mathematical model. Tissue Eng. A. 15 : 2653.

Jiang H. M., Li S. F., Li Y. P. 2003. Influence of anoxia/reoxygenation on immunofunction of endothelial cells and effect of intervention with yisheng injection on it. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 23 : 451—454.

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—26.

Lemasters J. J., Holmuhamedov E. 2006. Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor-thinking outside the box. Biochim. biophys. acta. 1762 : 181—190.

Lemasters J. J., Holmuhamedov E. L., Czerny C., Zhong Z., Maldonado E. N. 2012. Regulation of mitochondrial function by voltage dependent anion channels in ethanol metabolism and the Warburg effect. Biochim. biophys. acta. 1818 : 1536—1544.

Mohyeldin A., Garzón-Muñoz T., Quiñones-Hinojosa A. 2010. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. Cell Stem Cell. 7 : 150—61.

Mylotte L. A., Duffy A. M., Murphy M., O'Brien T., Samali A., Barry F., Szegezdi E. 2008. Metabolic flexibility permits mesenc-

- hymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem Cells.* 26 : 1325—1336.
- Potier E., Ferreira E., Meunier A., Sedel L., Logeart-Avramoglou D., Petite H. 2007. Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death. *Tissue Eng.* 13 : 1325—1331.
- Rodrigues M., Griffith L. G., Wells A. 2010. Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem Cell Res. Ther.* 1 : 32—43.
- Rosová I., Dao M., Capoccia B., Link D., Nolta J. A. 2008. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 26 : 2173—2182.
- 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.
- Stubbs S. L., Hsiao S. T., Peshavariya H. M., Lim S. Y., Dusting G. J., Dilley R. J. 2012. Hypoxic preconditioning enhances survival of human adipose-derived stem cells and conditions endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells Develop.* 21 : 1887—1896.
- Wolfson C., Raynaud N., Maigne J., Papathanassiou S., Conti M., Kadhom N., Hecquet B., Levi F., Gautier M., Deschartre J. 1994. Periodic fluctuations in proliferation of SV-40 transformed human skin fibroblast lines with prolonged lifespan. *Cell Biol. Toxicol.* 10 : 247—254.
- Zhu H., Sun A., Zou Y., Ge J. 2014. Inducible metabolic adaptation promotes mesenchymal stem cell therapy for ischemia: a hypoxia-induced and glycogen-based energy prestorage strategy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34 : 870—876.
- Zhu W., Chen J., Cong X., Hu S., Chen X. 2006. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 24 : 416—425.
- 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 : 4279—4295.

Поступила 31 VII 2014

## STEADINESS OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM ADIPOSE TISSUE TO ANOXIA *IN VITRO*

*J. V. Rylova, L. B. Buravkova*

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

We have compared the effects of anoxia on multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) preconditioned at 20 and 5 % O<sub>2</sub>. It has been shown that the lack of oxygen in the growth phase is accompanied by active cell proliferation, the decrease in their size and increasing the homogeneity of the population. At the same time, the anoxia reduced share of CD54-cells and did not change the number of cells expressing CD90 and CD73 surface markers. Preconditioning at 20 % O<sub>2</sub> increased the proliferative potential of cells, which nevertheless remained significantly, lower than that of the cells preconditioned at 5 % O<sub>2</sub>. The level of lactate production was also significantly higher for cells preconditioned at 20 % O<sub>2</sub>. However, the highest molar ration of lactate production and glucose consumption ( $Y_{La/Glu}$ ) was typical for MMSC pre-cultured at 5 % O<sub>2</sub>. At anoxia, monolayer MMSCs conversely showed a decrease in this ratio by comparison with control cells and the cells cultured in growth phase. While maintaining a high level of viability under anoxia in the growth phase and in monolayer, we detected significant decrease in mitochondrial transmembrane potential. At the same time, the level of reactive oxygen species was increased only for MMSCs placed in anoxia in the active growth phase.

**Key words:** multipotent mesenchymal stromal cells, hypoxia, anoxia, proliferation, metabolism.