

DOI: 10.1134/S0041377118120040

ВЛИЯНИЕ ПРЕДСЕРДНОГО НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА НА МИГРАЦИЮ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕРИРЕНАЛЬНОГО ЖИРА КРЫСЫ

© *А. В. Ревитцер*^{1, *} *Ю. А. Негуляев*^{1, 2}

¹*Кафедра медицинской физики С.-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251, и*

²*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;*

** электронный адрес: eetytnet@gmail.com*

Усиление миграционного потенциала мезенхимных стволовых клеток (МСК) — один из способов увеличения эффективности терапии с их помощью в регенеративной медицине. Предсердный натрийуретический пептид (ПНП) может оказывать влияние на клеточную подвижность, механические свойства и миграцию МСК. В настоящей работе мультипотентный статус МСК, выделенных из периренального жира крысы, подтверждали их способностью дифференцироваться в адипогенном и остеогенном направлениях. Миграцию МСК исследовали по методу «заращения раны» с использованием прижизненной микроскопии. Показано, что добавление 10 нМ ПНП в питательную среду ускоряло заращение раны: через 15 ч после нанесения раны ее площадь уменьшалась до $5.2 \pm 2.5\%$ (против $25.4 \pm 11.8\%$ в контроле без добавления ПНП). Полученные данные позволяют предположить, что ПНП повышает подвижность МСК и, таким образом, может усиливать их миграционный потенциал.

Ключевые слова: стволовые клетки, миграция, предсердный натрийуретический пептид, метод «заращения раны»

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стволовые клетки, НП — натрийуретический пептид, ПНП — предсердный НП.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) активно используются в регенеративной медицине для лечения различных заболеваний, таких как переломы, инфаркт миокарда и диабет. МСК могут присутствовать в любой ткани или органе, однако чаще всего стволовые клетки получают из костного мозга и жировой ткани, в том числе и жировой ткани, расположенной вокруг органов, например периренального (околопочечного) жира (Hoogduijn et al., 2007).

Для регенеративной медицины важно, что МСК легко выделяются, обладают низкой иммуногенностью, относительно просто культивируются и способны мигрировать в пораженные ткани. Существенное ограничение терапии состоит в том, что только небольшое количество МСК достигает поврежденных тканей и остается в них; вскоре после трансплантации многие клетки обнаруживаются в малых кровеносных сосудах легких и других органов и гибнут там (Song, Li, 2011). Один из способов преодоления этой проблемы — усиление миграционного потенциала МСК, что может позволить клеткам эффективнее достигать пораженных тканей.

Существуют различные биологически активные вещества, оказывающие влияние на миграционный потенциал МСК, и одной из таких молекул является оксид азо-

та (Fuseler, Valarmathi, 2016). Авторы показали, что присутствие оксида азота подавляет миграционную способность МСК через изменения актинового цитоскелета. Известно, что оксид азота имеет общий сигнальный путь с рецепторами системы натрийуретических пептидов (НП). Оксид азота, так же как и рецепторы НП (типов А и В), способен активировать протеинкиназу G (Burley et al., 2007), и, вероятно, рецепторы системы НП могут быть вовлечены в регуляцию клеточной миграции.

Рецепторы семейства НП экспрессируются в клетках многих тканей организма, в том числе и в МСК (Revittser et al., 2014). В настоящее время влияние предсердного НП (ПНП) на миграцию МСК в процессе заращения ран изучено недостаточно. Однако было обнаружено (Mallela et al., 2013), что эффективность миграции МСК к месту раковой опухоли существенно снижается в организме мышей, нокаутных по рецептору НП типа А, по сравнению со здоровыми особями.

Целью нашей работы было выяснить, способен ли ПНП влиять на миграцию МСК в экспериментах по методу «заращения раны». Источником стволовых клеток служил периренальный жир крысы (Hoogduijn et al., 2007).

Материал и методика

Получение МСК крысы из периренального жира. Использовали крысу-самца породы Wistar 8-месячного возраста. После цервикального умерщвления из животного иссекали периренальный жир, который помещали в фосфатный буферный раствор на 1—2 мин, затем его переносили в культуральную чашку и измельчали скальпелем, после чего материал обрабатывали (37 °С, 90 мин) с помощью свежеприготовленного профильтрованного 0.02%-ного раствора коллагеназы II типа (Worthington, США) в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей смесь пенициллина (50 Ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (Биолот, Россия). Далее все содержимое чашки Петри центрифугировали (400 g, 5 мин, 4 °С) и удаляли супернатант. К клеточному осадку добавляли питательную среду α -MEM (Биолот, Россия), содержащую 20 % сыворотки плодов коровы (HyClone, США), 2 мМ L-глутамин, смесь пенициллина (50 Ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (Биолот, Россия), интенсивно ресуспендировали и переносили содержимое пробирки в чашку Петри. Селекцию МСК проводили с помощью адгезии к пластику. Через 1 сут полученную культуру отмывали питательной средой, далее клетки культивировали со сменой среды каждые 2—3 сут. В дальнейших экспериментах использовали клетки 4-го пассажа.

Эффективность клонирования клеток оценивали в условиях редкого пассажа (3—4 кл./см² в чашке Петри). Через 7 сут клетки окрашивали смесью Романовско-го—Гимзы и считали количество колоний, в которых было не менее 50 клеток. Эффективность клонирования определяли отношением числа выросших колоний к числу посеянных клеток в %, эксперимент выполняли трижды (n = 3).

Для направленной адипогенной дифференцировки использовали индукторы из описанного протокола (Zebisch et al., 2012). Клетки высевали в чашку Петри при плотности 10⁴ на 1 см² в среду α -MEM (Биолот, Россия), содержащую 20 % сыворотки плодов коровы (HyClone, США), 2 мМ L-глутамин, смесь пенициллина (50 Ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (Биолот,

Россия). Смену среды проводили 1 раз в 2—3 сут. Когда клетки достигали субконфлюэнтности, их переводили на среду, содержащую 0.5 мМ изобутилметилксантина, 0.5 мкМ дексаметазона и 2 мкМ розиглитазона (все от Sigma, США). В среде этого состава клетки культивировали 4 сут. Через 4—8 сут использовали среду, содержащую 1 мкг/мл инсулина (Sigma, США), а через 8—12 сут — среду без индукторов. Для выявления жировых включений клетки промывали в PBS, фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре и окрашивали красным масляным (Oil Red O, Sigma, США) в течение 15 мин, затем промывали дистиллированной водой.

Для направленной остеогенной дифференцировки использовали набор с коммерческой дифференцировочной средой MesenCult Osteogenic Stimulatory Kit (STEMCELL Technologies Inc., США) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Индукция остеогенной дифференцировки длилась 28 сут. Для выявления солей кальция, откладывающихся при успешной остеогенной дифференцировке, клетки промывали PBS, фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 30 мин при комнатной температуре и окрашивали ализариновым красным (AlizarinRed, Sigma, США), затем промывали дистиллированной водой и PBS.

Оценка миграции МСК по методу «заразтания раны». Полученные МСК высевали в культуральный планшет при плотности 10⁴ на 1 см² в питательную среду следующего состава: α -MEM (Биолот, Россия), 20 % сыворотки плодов коровы (HyClone, США), 2 мМ L-глутамин, смесь пенициллина (50 Ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (Биолот, Россия). После достижения конfluence питательную среду заменяли на свежую, при этом в экспериментальный планшет в отличие от контрольного к среде добавляли 10 нМ ПНП (Atrial Natriuretic Peptide (Rat), Tocris, США). Через 1 сут на клеточный монослой всех образцов наносили рану (шириной приблизительно 300—350 мкм) с помощью стерильного наконечника (200 мкл) и промывали клетки PBS. Затем к клеткам добавляли питательную среду. С помощью микроскопа Axio Observer Z1 (Zeiss, Германия), оборудованного устройством для поддержания

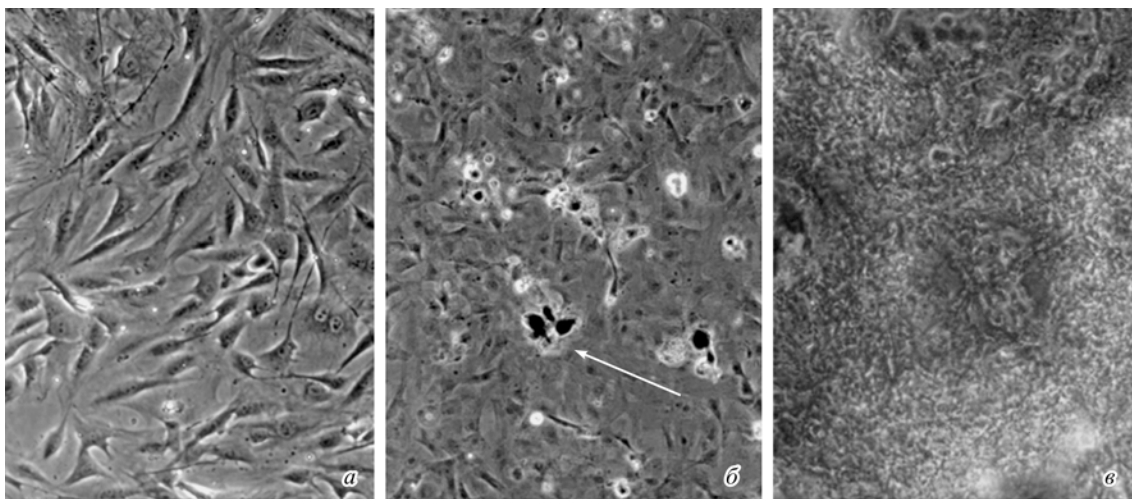


Рис. 1. МСК, выделенные из периренального жира крысы. Прижизненная микроскопия.

а — культура МСК, прижизненная микроскопия; б, в — соответственно адипоцитарная (окрашено масляным красным) и остеогенная (окрашено ализариновым красным) дифференцировка. Стрелка (б) указывает на жировые капли. Увел.: об. 20× (а) и 10× (б, в).

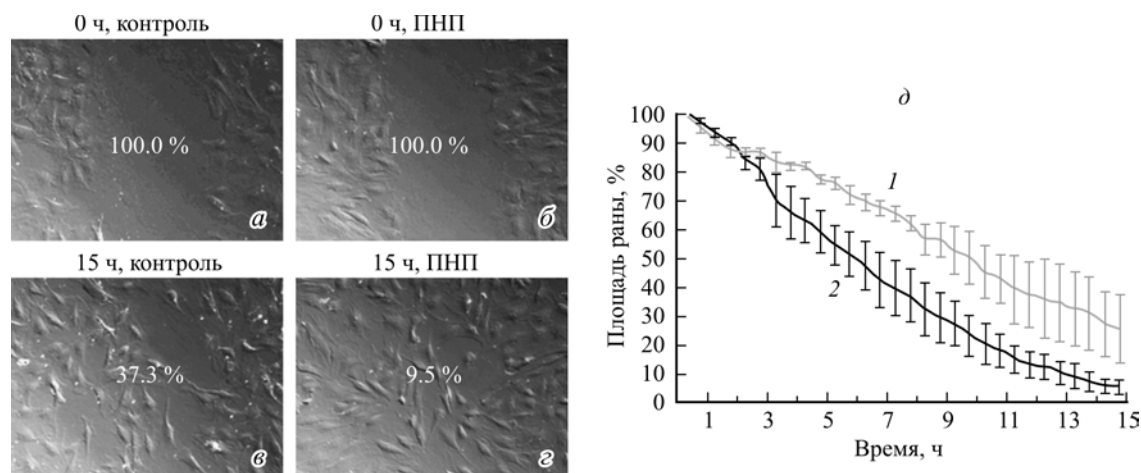


Рис. 2. Зарастание раны через 15 ч после ее нанесения на слой МСК в контроле (а, в) и после действия 10 нМ ПНП (б, г), а также ее динамика в контроле (д, кривая 1) и после действия ПНП (д, кривая 2).

а—г: прижизненная микроскопия, дифференциальный интерференционный контраст, цифры показывают площадь раны относительно первоначальной. Об.: 20×.

условий культивирования (37 °С, 5 % CO₂ и необходимая влажность), мы проводили съемку нативного препарата МСК с нанесенной раной с частотой 1 кадр в 30 мин в течение 15 ч. Далее оценивали изменение площади раны относительно начальной точки в процентах, измерения площади раны проводили в программе ImageJ (NIH, США), а полученные числовые значения обрабатывали в Excel (Microsoft, США).

Результаты и обсуждение

МСК, полученные из периренального жира крысы, обладают схожей морфологией, имеют вытянутую фибробластоподобную форму (рис. 1, а).

Эффективность клонирования МСК составила 51 ± 9 % (n = 3). Исходя из этих данных было принято решение для дальнейших экспериментов сеять клетки с плотностью 10⁴ на 1 см².

Мультипотентный статус МСК. Для подтверждения статуса МСК индуцировали адипогенную и остеогенную дифференцировку клеток *in vitro*. При индукции адипогенной дифференцировки клетки формировали жировые капли, которые выявляли с помощью окраски препарата масляным красным (рис. 1, б, стрелка). При индукции остеогенной дифференцировки клетки формировали минеральные отложения внеклеточного матрикса, которые выявлены нами с помощью окраски ализариновым красным (рис. 1, в). Полученные результаты согласуются с данными из литературы по дифференцировочному потенциалу МСК, выделенных из периренального жира (Hoogduijn et al., 2007; Sensebe et al., 2010).

Миграция МСК. Мы выяснили, что нанесенные экспериментальные раны имеют площадь (2.15—2.25) · 10⁻¹ мм² и ширину в пределах 300—350 мкм. На рис. 2, а—г показаны результаты типичного эксперимента: спустя 15 ч экспериментальная рана у контрольных МСК уменьшилась и составила 37.3 % по отношению к контролю (рис. 2, в), в то время как рана у МСК в присутствии 10 нМ ПНП уменьшилась до 9.5 % (рис. 2, г), т. е. в присутствии ПНП рана зарастает гораздо быстрее.

На рис. 2, д приведены усредненные данные, отображающие уменьшение относительной площади раны во время эксперимента. При действии 10 нМ ПНП через 15 ч культивирования рана, нанесенная на монослой, закрылась практически полностью, оставшаяся площадь раны составляла всего 5.2 ± 2.5 % (n = 3) от первоначальной площади, в то время как значение относительной площади раны контрольных МСК составляло 25.4 ± ± 11.8 % (n = 4) от первоначальной площади. Таким образом, можно сделать вывод о том, что добавление 10 нМ ПНП в питательную среду положительно влияет на динамику зарастания экспериментальной раны, нанесенной на монослой МСК.

Сходные результаты были получены для эндотелиальных клеток сосудов (аорты и поллой вены) человека (Kook et al., 2003). Авторы показали, что низкие концентрации ПНП (10 нМ) ускоряют заживление раны, нанесенной на монослой эндотелиальных клеток различного происхождения. Механизм пока остается не вполне ясным, но предполагается, что увеличение внутриклеточного цГМФ, связанное с активацией гуанилатциклазного рецептора натрийуретических пептидов типов А и В, способствует реорганизации актинового цитоскелета через активацию киназы Akt, как это показано для миграции раковых клеток (Schwappacher et al., 2013).

Таким образом, мы получили МСК крысы из периренального жира и подтвердили их статус с помощью адипогенной и остеогенной дифференцировки. Также мы продемонстрировали положительное воздействие ПНП, добавляемого в питательную среду (концентрация 10 нМ), на зарастание раны, нанесенной на монослой полученных клеток.

Авторы выражают благодарность Е. А. Морачевской (Институт цитологии РАН) за помощь при подготовке рукописи к печати.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 18-15-00106).

Список литературы

- Burley D., Ferdinandy P., Baxter G. 2007. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br. J. Pharmacol.* 152 : 855—869.
- Fuseler J., Valarmathi M. 2016. Nitric oxide modulates postnatal bone marrow-derived mesenchymal stem cell migration. *Front Cell Develop. Biol.* 4 : 133.
- Hoogduijn J., Crop J., Peeters A., Van Osch G., Balk A., Ijzermans J., Weimar W., Baan C. 2007. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Develop.* 16 : 597—604.
- Kook H., Itoh H., Choi B., Sawada N., Doi K., Hwang T., Kim K., Arai H., Baik Y., Nakao K. 2003. Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration *in vitro*. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284 : H1388—H1397.
- Mallela J., Ravi S., Jean Louis F., Mulaney B., Cheung M., Garapati U., Chinnasamy V., Wang C., Nagaraj S., Mohapatra S., Mohapatra S. 2013. NPR1 signaling regulates stem cell recruitment and angiogenesis: a model to study linkage between inflammation and tumorigenesis. *Stem Cells.* 31 : 1321—1329.
- Revittser A., Pivovarova O., Rudovich N., Pfeiffer A. F. H., Shlyakto E., Dmitrieva R. 2014. PPAR γ and natriuretic peptides (NP) pathway are altered in adipose tissue from heart failure patients/ mesenchymal stromal cells (MMSC) as a tool to study cardiovascular metabolic disorders *in vitro*. *Cardiovasc. Res.* 103 : s105.
- Schwappacher R., Rangaswami H., Su-Yuo J., Hassad A., Spittler R., Casteell D. 2013. cGMP-dependent protein kinase β regulates breast cancer cell migration and invasion via interaction with the actin/myosin-associated protein caldesmon. *J. Cell Sci.* 126 : 1626—1636.
- Sensebe L., Krampfer M., Schrezenmeier H., Bourin P., Giordano R. 2010. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 98 : 93—107.
- Song C., Li G. 2011. CXCR4 and matrix metalloproteinase-2 are involved in mesenchymal stromal cell homing and engraftment to tumors. *Cytotherapy.* 13 : 549—561.
- Zebisch K., Voigt V., Wabitsch M., Brandsch M. 2012. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal. Biochem.* 425 : 88—90.

Поступила 14 VI 2018

INFLUENCE OF ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE ON MIGRATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS, GAINED FROM PERIRENAL RAT FAT

A. V. Revittser,^{1,*} Yu. A. Negulyaev^{1,2}¹ Department of Medical Physics Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, and² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg. 194064;

* e-mail: eetytnet@gmail.com

Enhancing the migration potential of mesenchymal stem cells (MSCs) helps to increase the efficiency of stem cell therapy in regenerative medicine. Atrial natriuretic peptide (ANP) can be a biological active molecule that affects cellular motility, cytoskeleton and migration of MSCs. To study the role ANP in cell migration we isolated MSCs from rat perirenal fat and showed their adipogenic and osteogenic differentiation to confirm multipotent status of cells. Migration of MSC was studied by «wound healing» method using live cell microscopy. We have demonstrated that the addition of 10 nM ANP to the nutrient medium leads to acceleration of experimental wound healing: wound area at ANP treated MSCs was reduced to 5.2 ± 2.5 % relative to the initial values, while for the control cells (no ANP treatment) showed the result as 25.4 ± 11.8 %. The data obtained indicate that ANP increases motility of MSCs and can enhance their migration potential.

Key words: stem cells, migration, atrial natriuretic peptide, live cell microscopy, wound-healing method