

## ГОМОТИПИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК: РОЛЬ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ

© 2022 г. М. И. Ездакова<sup>1</sup>, Д. К. Матвеева<sup>1</sup>, Е. Р. Андреева<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007 Россия

\*E-mail: andreeva1564@gmail.com

Поступила в редакцию 15.07.2022 г.

После доработки 15.07.2022 г.

Принята к публикации 17.08.2022 г.

Периэндотелиально расположенные мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) рассматриваются как одно из наиболее вероятных депо, из которого МСК могут быть мобилизованы в случае повреждения тканей. В настоящей работе проанализировано, как нарушение прямой межклеточной коммуникации при ингибировании гомотипических щелевых контактов (ЩК) может влиять на свойства МСК, востребованные в процессах заживления и восстановления тканей: состояние внутриклеточных компартментов, паракринную, в частности ангиогенную активность, способность к миграции и фагоцитозу. В культивируемых митотически неактивных МСК коммуникацию через ЩК подавляли с помощью специфического ингибитора карбенексолона. С помощью проточной цитофлуориметрии в МСК с заблокированными ЩК было показано двукратное увеличение массы митохондрий (зонд MitoTracker Green). Трансмембранный потенциал митохондрий (зонд JC-1) и уровень активных форм кислорода (измеренный с помощью зонда CM-H2DCFDA), а также активность лизосомального компартмента (зонд LysoTracker Green) при этом не изменялись. МСК с заблокированными ЩК менее активно мигрировали в модели раны. Способность к фагоцитозу частиц латекса была снижена. В кондиционированной среде (КС) от МСК с заблокированными ЩК по данным мультиплексного анализа уровень плеiotропных цитокинов IL-6, IL-8, MCP-3 был значимо ниже. Эта КС не стимулировала ненаправленную миграцию эндотелиальных клеток и рост основных сосудов в хориоаллантоисной оболочке эмбриона перепела. Сделано предположение, что снижение эффективности прямой межклеточной коммуникации МСК–МСК *in vivo* может негативно отразиться как на функционировании стромальных предшественников в местах их расположения, так и на возможности их мобилизации из тканевых депо.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, гомотипические щелевые контакты, ингибитор, внутриклеточные компартменты, фагоцитоз, миграция, растворимые медиаторы, ангиогенез *in ovo*

DOI: 10.31857/S0041377122060037

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) вызывают значительный интерес в связи с их фундаментальной ролью в обеспечении физиологии и регенерации тканей, которая делает их важным структурным и регуляторным компонентом различных тканевых ниш (Буравкова и др., 2012; Андреева, Буравкова, 2013; Murphy et al., 2013; Murgau, Réault, 2015; Caplan, 2017; Tan et al., 2020). Многие аспекты их вовлечения в поддержание гомеостаза и ремоделирование тканей остаются неисследованными, что связано с недостаточностью знаний о

функционировании МСК в локальных тканевых депо, а также о модуляции их функциональной активности при действии соответствующих стимулов. Хорошо известно, что, по крайней мере, часть МСК *in vivo* располагается переваскулярно, где они формируют сеть контактирующих между собой клеток (Andreeva et al., 1998). В этой сети гомотипические контакты между МСК осуществляются с участием высокоспециализированных соединений — щелевых контактов (ЩК) (Orekhov et al., 2016).

ЩК играют существенную роль в регулировании тканевого гомеостаза. Через ЩК цитозоли соседних клеток связаны напрямую, что обеспечивает перемещение вторичных мессенджеров, аминокислот, ионов кальция, глюкозы и ее метаболитов, микроРНК, малых интерферирующих РНК (siRNA) и др. непосредственно из клетки в клетку, минуя внекле-

**Принятые сокращения:** АФК — активные формы кислорода; МСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени; ХАО — хориоаллантоисная оболочка; ЩК — щелевые контакты; ЭК — эндотелиальные клетки; СВХ — карбенексолона (carbenoxolone).

точное пространство (Harris et al., 2007; Brink et al., 2012; Gresco et al., 2013). Это позволяет клеткам взаимодействовать, формируя клеточные системы с высокой степенью функциональной интеграции. Наличие интегрированной через ЦК сети обеспечивает, по-видимому, поддержание “покоящегося” (steady-state) фенотипа МСК в периваскулярных депо. Мы предположили, что снижение эффективности коммуникации через ЦК может привести к изменению функциональной активности МСК – фенотипической поляризации.

В настоящей работе мы определили, как степень гомотипической коммуникации через ЦК влияет на свойства МСК, востребованные с точки зрения реализации их регенеративного потенциала. Для этого оценивали влияние подавления коммуникации через ЦК на состояние внутриклеточных компарментов МСК, а также их паракринную, в частности ангиогенную активность, способность к миграции и фагоцитозу.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клетки.** В работе использовали линейные МСК (ASC52telo SCRC-4000™; ATCC, США) и эндотелиальные клетки (ЭК) (EA.hy926 CRL-2922™; ATCC, США) человека, которые культивировали в среде  $\alpha$ -MEM и DMEM/F12 (Gibco, США) соответственно, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия) (далее – среды культивирования). Для остановки клеточных делений МСК предварительно обрабатывали митомизином С (1.5 мкг/мл, 18 ч; Sigma-Aldrich, США). МСК и ЭК постоянно культивировали при стандартных лабораторных условиях в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония).

**Дизайн эксперимента.** Эксперименты проводили следующим образом: после обработки митомизином МСК промывали, пассировали и рассеивали в чашки Петри в полной ростовой среде из расчета 7000 кл./см<sup>2</sup>. Через 48 ч к МСК добавляли (или нет) ингибитор ЦК карбенексон (CBX) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 100 мкг/мл на 18 ч.

**Оценка эффективности коммуникации через ЦК.** Использовали следующие методические подходы.

1) Нагрузка флуоресцентным зондом клеток в модели “раны” клеточного монослоя (Zachar et al., 2016). Для этого монослой МСК повреждали с помощью наконечника микропипетки. Затем добавляли краситель 6-карбоксихлорофлуоресцеин (1 мкМ, Sigma-Aldrich, США). Этот краситель не может проходить через клеточные мембраны неповрежденных клеток. При нанесении раны краситель попадает в поврежденные клетки и из них проникает в соседние только через ЦК. Окрашенные карбоксихлорофлуоресцеином МСК фотографировали через 1 и 6 ч после нанесения раны. Появление окрашенных карбоксихлорофлуоресцеином МСК,

связанных с поврежденными клетками, свидетельствовало о наличии работающих ЦК.

2) Парашют-анализ (Parashute assay) (Talbot et al., 2018). Для подтверждения взаимодействия клеток через ЦК использовали цитоплазматический зонд кальцеин-АМ (Invitrogen, США). Этот витальный краситель проникает в клетки и подвергается гидролизу под действием эстераз. Образующийся кальцеин не может выйти из клетки, но способен к перетеканию в соседние клетки через ЦК. Часть МСК окрашивали кальцеином-АМ (0.1 мкг/мл). Далее МСК, содержащие кальцеин, и неокрашенные МСК (1 : 2) сокультивировали в течение 24 ч. Увеличение количества окрашенных МСК свидетельствовало о переносе кальцеина через ЦК. Для блокирования ЦК использовали специфический ингибитор карбенексон (CBX, 100 мкг/мл; Sigma-Aldrich, США) в течение 3 ч.

**Объем митохондриального компартмента и трансмембранный потенциал митохондрий.** Объем оценивали при помощи независимого от трансмембранного потенциала митохондриального зонда MitoTracker Green (15 нг/мл; Invitrogen, США); трансмембранный потенциал митохондрий определяли с помощью зонда JC-1 (1.5 нг/мл; Invitrogen, США). Длина волны возбуждения и испускания для обоих зондов составляла соответственно 581 и 644 нм.

**Состояние лизосомального компартмента и уровень АФК.** Лизосомальный компартмент оценивали при помощи рН-чувствительного флуоресцентного зонда LysoTracker Green DND26 (0.5 мкл/мл; Invitrogen, США) (при длине волны возбуждения и испускания соответственно 504 и 511 нм). Активные формы кислорода (АФК) в клетках выявляли, используя зонд CM-H2DCFDA (1 мкг/мл, Invitrogen, США) (длина волны возбуждения и испускания соответственно 492–495 и 517–527 нм).

Для всех флуоресцентных зондов, использованных в работе, указаны конечные концентрации в среде с клетками.

**Фагоцитарная активность МСК.** Оценивали способность клеток поглощать флуоресцентные частицы латекса FluoSpheres Yellow-green диаметром 0.5 мкм (Molecular Probes, США). Частицы добавляли к среде культивирования в концентрации 1 млн частиц/мл. Непосредственно перед добавлением к клеткам суспензию частиц латекса обрабатывали в течение 15 мин в ультразвуковой ванне (Сапфир, Россия) для получения гомогенной суспензии, состоящей из отдельных частиц без агрегатов. МСК (7000 кл./см<sup>2</sup>) инкубировали с частицами в течение 3 ч, после чего клетки тщательно промывали фосфатным буфером для удаления частиц с поверхности. Эффективность отмывки клеток от латексных частиц контролировали с помощью фазово-контрастного микроскопа (Leica DMIL, Германия). После промывки клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 20 мин, после чего тщательно промывали фосфатным буфером и заключали в мон-

тирующую среду Fluoroshield с DAPI (Invitrogene, США). Для характеристики фагоцитарной активности вычисляли фагоцитарный индекс – долю МСК, фагоцитировавших латексные частицы. Подсчет производили с помощью флуоресцентного инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-U (Япония). В каждом эксперименте анализировали 200 клеток в трех технических повторах.

**Иммуноцитохимия.** Для выявления на МСК основного белка ЩК коннексина 43 (Cx43) использовали непрямо́е иммунофлуоресцентное мечение. Клетки фиксировали в 4%-ном параформальдегиде и окрашивали первичными мышиными моноклональными антителами к Cx43 (Abcam, Великобритания) и затем вторичными антителами козы против иммуноглобулинов мыши, мечеными AlexaFluor 488 (Имтек, Россия). После окрашивания покровные стекла с МСК монтировали на предметное стекло при помощи среды для заключения препаратов с добавлением красителя DAPI (Fluoroshield с DAPI; Sigma-Aldrich, США).

МСК анализировали на флуоресцентном инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti-U, лазерном сканирующем микроскопе Zeiss LSM 900, (Zeiss, Германия) и проточном цитофлуориметре Cytoflex S (BeckmanCoulter, США), оснащенном лазерами с длиной волны 488 и 640 нм.

Ненаправленную (в отсутствие хемоаттрактантного стимула) миграцию в монослойных культурах МСК и ЭК (после добавления кондиционированной среды (КС) от МСК) оценивали *in vitro* через 6 ч после нанесения экспериментальной раны по уменьшению площади, свободной от клеток. Площадь закрытия ( $\text{мм}^2$ ) представляла собой разность между начальным (сразу после нанесения повреждения) и конечным размером раны. Измерение площадей проводили с использованием программного обеспечения NIS-elements AR версии 3.21 (Nikon, Япония).

**Оценка транскрипционной активности генов.** Использовали полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ). МСК лизировали с помощью реагента QIAzol (Qiagen, США). Концентрацию и чистоту полученной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США) по уровню поглощения при длине волн 260/280 нм. Далее на матрице РНК синтезировали кДНК с использованием Quantitech Reverse Transcription Kit (Qiagen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для определения уровня экспрессии генов использовали набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green 1. Для определения относительного изменения уровня экспрессии целевых генов в качестве гена домашнего хозяйства использовали ген гипоксантин фосфорибозилтрансферазы (*HPRT1*). Специфичность проводимой реакции определялась с помощью анализа кривой плавления продуктов амплификации в диапазоне от 55 до 95°C с шагом в 1 градус. Методом ПЦР-РВ

определяли транскрипционную активность генов *GJA1*, *GLUT1*, *TUBB*, *RhoA*, *RocK1*, *IL-6*, *IL-8*, *MCP-1* и *VEGF* с помощью соответствующих праймеров (Qiagen, США), на приборе MX300P (Stratagen, США).

**Содержание паракринных медиаторов.** Медиаторы в образцах КС определяли с помощью MILLIPLEX MAP (HumanCytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel-Premixed 41 Plex-Immunology Multiplex Assay) (Merck, Германия).

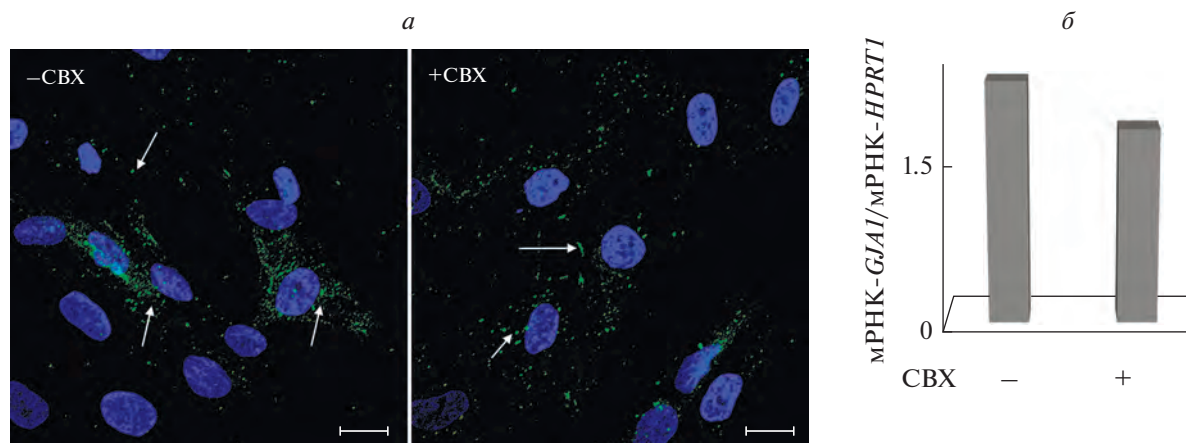
**Оценку ангиогенной активности** проводили с использованием *in ovo* модели (формирование сосудистой сети в хориоаллантаоисной оболочке (ХАО) эмбриона японского перепела *Coturnix coturnix japonica*). КС от МСК наносили на хориоаллантаоисную оболочку на 24 ч, контролем служила полная ростовая среда. Объем вводимого образца составлял 0,025  $\text{см}^3$  на 1 г веса эмбриона вместе с зародышевыми оболочками. Затем образцы фиксировали и фотографировали на стереомикроскопе ZeissStemi 2000-C (Zeiss, Германия) с камерой для захвата изображения Canon G9 (Canon, Япония). На изображениях определяли число ветвей и число основных сосудов, с использованием программного обеспечения AngioQuant ([www.cs.tut.fi](http://www.cs.tut.fi)) (Udartseva et al., 2019). Яйца японского перепела предоставлены виварием ИМБП РАН (Москва).

**Статистическая обработка.** В качестве характеристики полученных выборок использовали среднее значение и стандартное отклонение. Использовали пакет программ MicrosoftExcel 2010 и Statistica 7.0 и непараметрический критерий Манна–Уитни (для малых и средних выборок,  $n \leq 30$ ) при выбранном уровне значимости  $P \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1а представлены результаты иммуноцитохимического выявления основного белка ЩК – Cx43 на поверхности МСК. Как на интактных МСК, так и на МСК с заблокированными с помощью специфического ингибитора карбенексолона (СВХ) ЩК, обнаружено присутствие Cx43 в виде специфических структур – коннексиновых бляшек. Ингибирование работы ЩК не влияло на представленность и расположение коннексиновых бляшек на поверхности МСК и на транскрипционную активность гена *GJA1*, кодирующего Cx43 (рис. 1б).

В монослое МСК связаны друг с другом работающими ЩК, что демонстрируется в экспериментах с нагрузкой ЩК-специфичным красителем б-карбоксифлуоресцеином в модели экспериментальной раны (рис. 2а). Данные флуоресцентной микроскопии подтверждаются с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием парашют-анализа (см. раздел “Материал и методика”). Для этого неокрашенные МСК (70% популяции) (рис. 2б: –СВХ, кривая 1) и МСК, содержащие кальцеин (30% популя-



**Рис. 1.** Экспрессия основного белка щелевых контактов (ЩК) коннексина 43 (Cx43) на МСК и транскрипционная активность соответствующего гена. *a* – Иммуноцитохимическое выявление Cx43 на МСК; репрезентативные микрофотографии, флуоресцентная микроскопия; Cx43 в составе коннексиновых бляшек локализован на поверхности МСК и в местах контактов МСК–МСК (белые стрелки), ядра МСК докрашены DAPI; масштабный отрезок: 20мкм, увел. об.: 20×. *б* – Транскрипционная активность гена *GJA1*, кодирующего Cx43; уровень транскрипции нормализован на значение экспрессии гена домашнего хозяйства *HPRT1*. CBX – карбеноксолон, специфический ингибитор ЩК. Представлены результаты, полученные в интактных МСК (–CBX) и в МСК с заблокированными ЩК (+CBX).

ции) (рис. 2б: +CBX: кривая 2), сокультивировали 3 ч и затем анализировали на проточном цитофлуориметре. Для полуколичественной оценки уровня кальцеина в МСК использовали среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ). В неокрашенных МСК СИФ составила  $(2.0 \pm 0.0) \times 10^3$  отн. ед. СИФ в МСК, содержащих краситель, была равна  $(5400.0 \pm 500.0) \times 10^3$  отн. ед. После взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК можно было видеть, что сформировалась популяция, в которой все клетки содержали кальцеин. Распределение клеток по интенсивности флуоресценции было близким к нормальному (рис. 2б: –CBX, кривая 3), СИФ составила  $(1900.0 \pm 300.0) \times 10^3$  отн. ед. Значения СИФ были ниже, чем в исходных окрашенных клетках, но существенно выше, чем в неокрашенных МСК, что подтвердило перетекание кальцеина через ЩК из окрашенных клеток в неокрашенные.

После блокирования с помощью СВХ функциональная активность ЩК в МСК снижалась существенно. Практически полностью ингибировался перенос карбоксифлуоресцеина в модели раны (рис. 2а: +CBX). Парашют-анализ выявил уменьшение эффективности переноса кальцеина. Гистограмма распределения интенсивности флуоресценции в популяции после взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК с заблокированными ЩК была представлена кривой с двумя пиками (рис. 2б: +CBX, кривая 3). Часть окрашенных МСК, составлявшая примерно треть популяции, имела исходно высокий уровень флуоресценции (СИФ:  $(6070.0 \pm 200.0) \times 10^3$  отн. ед.) (рис. 2б: +CBX, кривая 3, пик справа). Другие две трети популяции были окра-

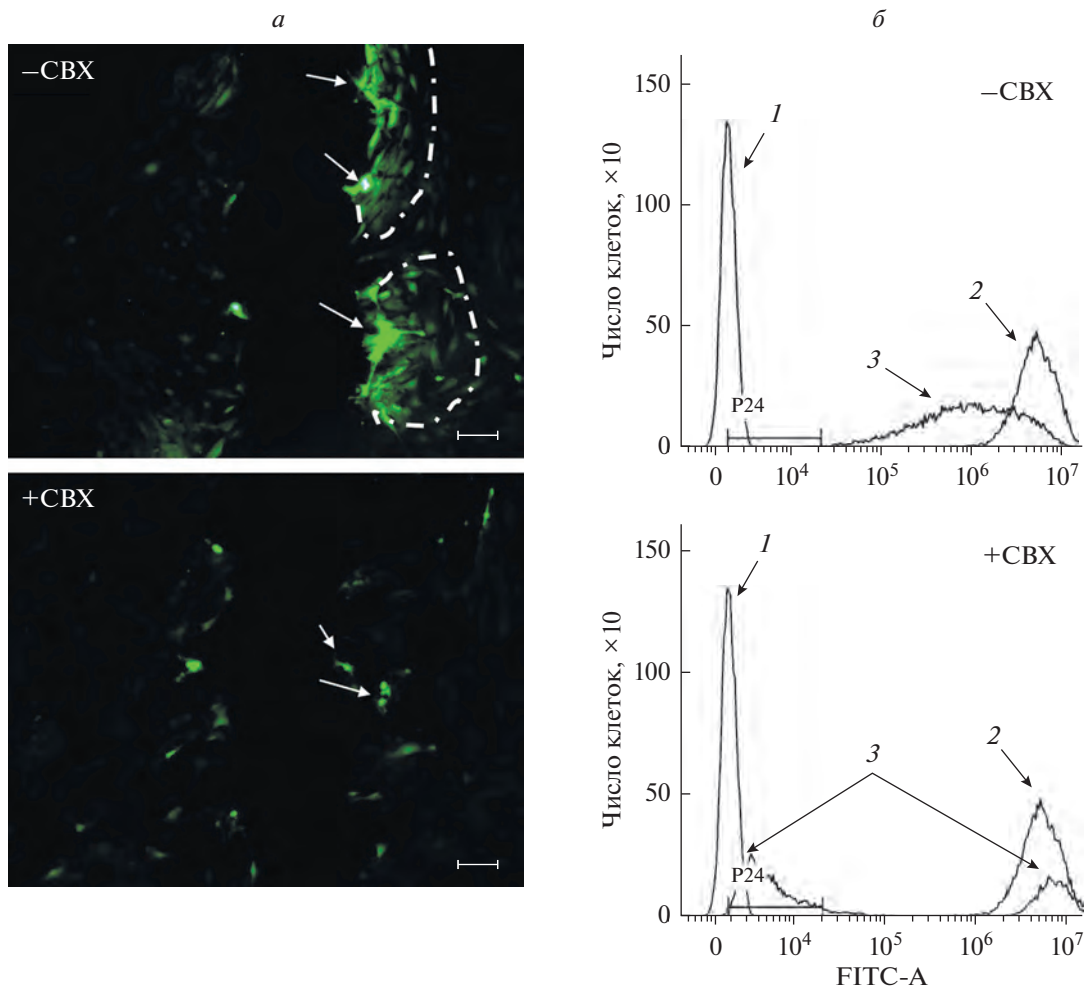
шены гораздо слабее (СИФ:  $(8.0 \pm 0.2) \times 10^3$  отн. ед.) (рис. 2б: +CBX, кривая 3, пик слева).

После блокирования ЩК в МСК через 96 ч увеличилась (по сравнению с интактными МСК) в 2 раза масса митохондрий (объем митохондриального компартмента), выявленная с помощью красителя MitoTracker Green (рис. 3а). Трансмембранный потенциал митохондрий (определенный с помощью зонда JC-1) (рис. 3б) и содержание внутриклеточных АФК в МСК не зависели от эффективности работы ЩК (рис. 3в), но ингибирование ЩК привело к увеличению транскрипции переносчика глюкозы *GLUT1* (рис. 3г). Блокирование ЩК не повлияло на активность лизосомального компартмента, выявляемого с помощью зонда LysoTracker Green (рис. 3д).

Таким образом, ингибирование коммуникации через ЩК привело к изменению состояния внутриклеточных компартментов, что отразилось на функциональной активности МСК.

В случае МСК с ингибированными ЩК площадь открытой раны через 6 ч после нанесения была больше, чем в МСК с работающими ЩК ( $P < 0.05$ ) (рис. 4а, б), что свидетельствовало о снижении скорости миграции МСК. При этом не выявлено изменения активности генов, кодирующих белок цитоскелета (*TUBB*) и белки сигнального пути Rho/ROCK (*RhoA*, *Rock1*), контролирующего перестройки цитоскелета (рис. 4в).

Для оценки фагоцитарной активности к МСК добавляли флуоресцентные частицы латекса. Способность к захвату частиц латекса после ингибирования контактов снижалась практически в два раза: доля фагоцитирующих МСК составила 35% в контроле и 18% в МСК с ингибированными контактами (рис. 4г).



**Рис. 2.** Функционально-активные ЩК в МСК. *а* – Флуоресцентный ЩК-специфичный карбоксифлуоресцеин, введенный в МСК при повреждении монослоя, распространяется через работающие ЩК; белыми стрелками отмечены поврежденные МСК, ярко окрашенные карбоксифлуоресцеином; прерывистая линия показывает область клеток, в которые краситель проник через ЩК; флуоресцентная микроскопия, репрезентативные микрофотографии: масштабный отрезок: 50 мкм; увел. об.: 10×. *б* – Функционально-активные ЩК в МСК, проточная цитофлуориметрия, парашют-анализ, репрезентативные гистограммы распределения МСК неокрашенных (1), окрашенных кальцеином-АМ (2) и смешанная популяция 1 и 2 (3). Кальцеин перетек из окрашенных МСК в неокрашенные через работающие ЩК. СВХ – карбенексолон, специфический ингибитор ЩК; –СВХ – интактные МСК; +СВХ – МСК с заблокированными ЩК.

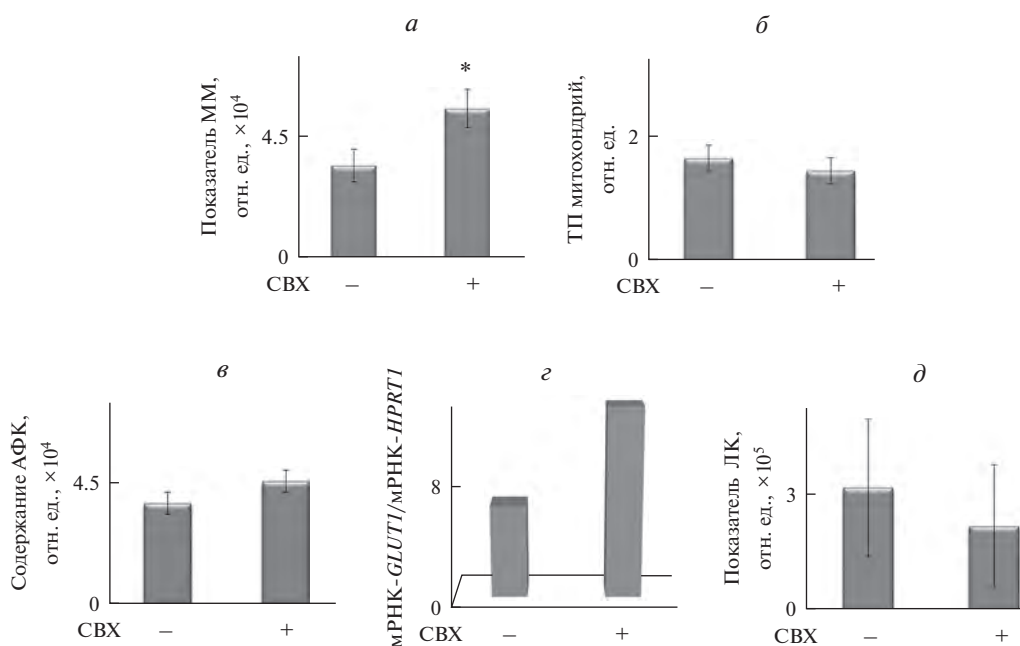
Ангиогенные эффекты КС от МСК с работающими и заблокированными ЩК оценивали по влиянию на ненаправленную миграцию в экспериментальной ране в монокультурах ЭК (рис. 5а, б) и в модели формирования сосудистой сети в ХАО эмбриона перепела (рис. 5в–д).

Эффективность закрытия раны ЭК была одинаковой при культивировании в КС от МСК с работающими или заблокированными ЩК (рис. 5б).

Через 24 ч после добавления среды культивирования (контроль) или КС от интактных МСК в сосудистой сети ХАО стало больше как основных сосудов, так и ветвей. Эффект при добавлении КС был более выраженным. Превышение над значениями в контроле составило 20% ( $P = 0.0476$  и  $P = 0.0286$  для основных сосудов и ветвей соответственно) (рис. 5г, д).

При использовании КС от МСК с ингибированными ЩК не выявлено прироста основных сосудов в ХАО ( $P = 0.699$ ) (рис. 5г), тогда как прирост ветвей был таким же, как при действии КС от интактных МСК (20%,  $P = 0.0222$ ).

Транскрипционная активность генов МСК, кодирующих плейотропные ангиогенные цитокины IL-6, IL-8 и MCP-1, а также основной ангиогенный медиатор – фактор роста сосудистого эндотелия VEGF, не изменялась в МСК с заблокированными ЩК (рис. 5е). При этом содержание ангиогенных медиаторов IL-6, IL-8, GRO, MCP-3 в КС от МСК понижалось, что могло быть причиной выявленных эффектов (рис. 5е). Снижение уровня VEGF носило характер тенденции, но было отмечено увеличение уровня другого медиатора – фактора роста фиброб-



**Рис. 3.** Влияние блокирования щелевых контактов с помощью ингибитора карбенексолона (CBX) на состояние внутриклеточных компартментов МСК: массы митохондрий (ММ, *а*), трансмембранного потенциала (ТП) митохондрий (*б*), содержания АФК (*в*), уровня транскрипции гена переносчика глюкозы *GLUT1* (*г*; данные нормализованы на значение экспрессии гена домашнего хозяйства *HPRT1*) и лизосомального компартмента (ЛК, *д*). По вертикали – средняя интенсивность флуоресценции митохондриально-селективного красителя MitoTracker Green (*а*) или JC-1 (*б*), АФК-чувствительного зонда CM-H2DCFDA (*в*) и pH-чувствительного лизосомного красителя LysoTracker Green (*д*). Представлены средние значения и стандартные отклонения,  $n = 4$ . Результаты получены в интактных МСК (–CBX) и в МСК с заблокированными ЩК (+CBX).

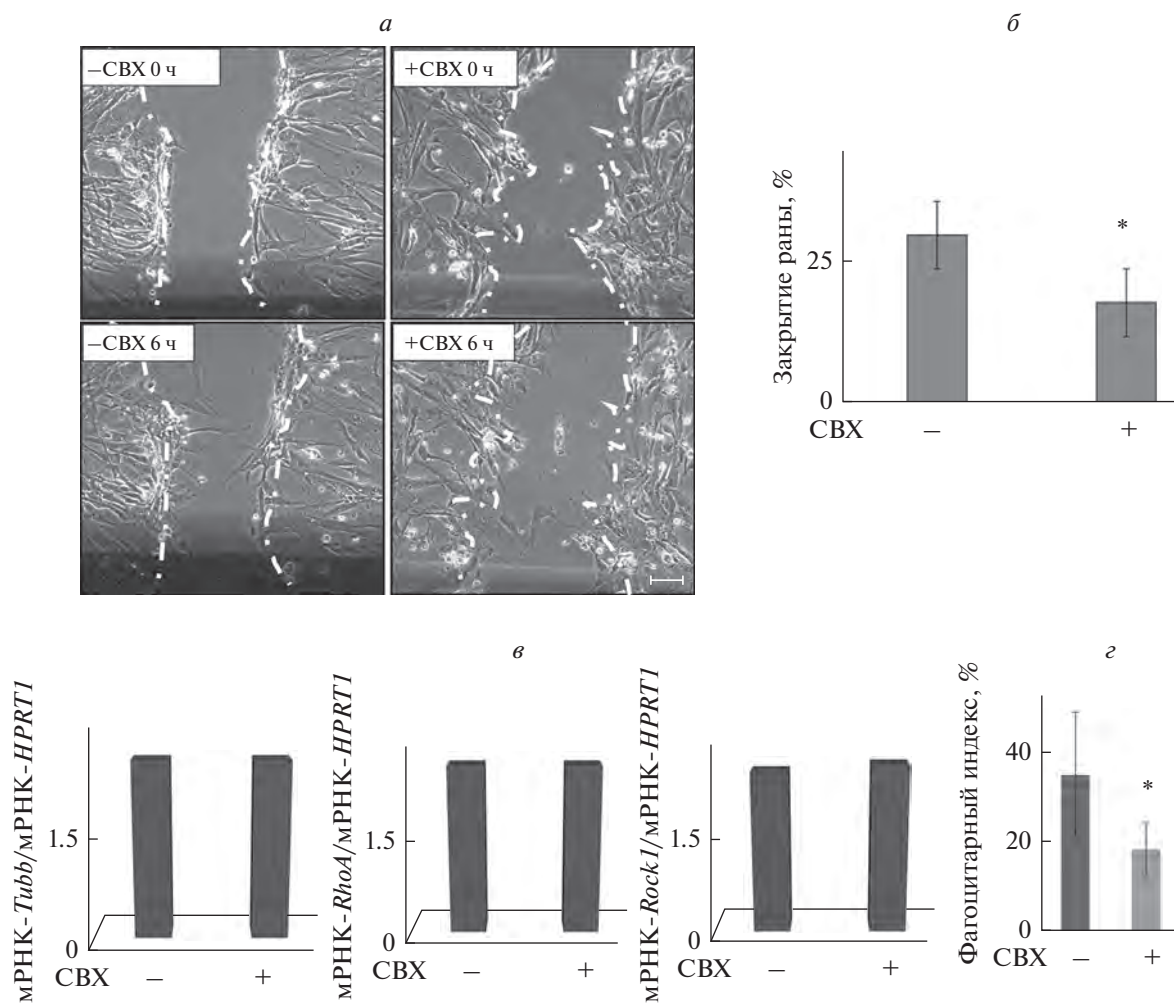
ластов (FGF-2). Такое изменение секреторного профиля, по-видимому, и определило уменьшение ангиогенной активности КС от МСК с ингибированными ЩК.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, МСК образуют различные типы соединений, таких как адгезионные и щелевые контакты, туннельные микротрубочки (Vatra et al., 2012; Plotnikov et al., 2015; Успенская и др., 2021). Мы сосредоточили внимание на ЩК, т.к. именно этот способ коммуникации позволяет клеткам обмениваться метаболитами и сигнальными молекулами, минуя внеклеточное пространство, и таким образом может осуществляться модификация активности клеток в пределах популяции. Ранее мы показали, что физическое уменьшение степени гомотипических контактов МСК приводит к поляризации их фенотипа (Ездакова и др., 2020). МСК при низкой плотности и, соответственно, малом количестве физических контактов, имели более высокие уровни трансмембранного потенциала митохондрий и эндогенных АФК, менее закисленный лизосомальный компартмент, а также продуцировали существенно больше растворимых медиаторов, обладающих иммунорегуляторной и ангиогенной активностью. Возник вопрос, как снижение функциональной коммуника-

ции через высокоспециализированные структуры, такие как ЩК, при сохранении уровня физических контактов повлияет на фенотипическую поляризацию МСК?

После ингибирования ЩК в МСК нами выявлено увеличение объема митохондриального компартмента, при этом не изменялись трансмембранный потенциал митохондрий и уровень внутриклеточных АФК. Изменение массы митохондрий рассматривается как индикатор происходящих внутри клетки изменений. С одной стороны, увеличение массы митохондрий может быть свидетельством преобладания анаболических процессов над катаболическими, что сопровождается усилением биогенеза митохондрий (Lamb et al., 2015). С другой стороны, есть данные, позволяющие интерпретировать увеличение массы митохондрий как защитный ответ клеток на имевший место стресс, в частности повреждение митохондрий. Так, показано увеличение этого показателя после действия ионизирующего излучения (Limoli et al., 2003), пероксида водорода (Lee et al., 2005), антибиотиков (Manchini et al., 2005), цитостатиков (Cupler et al., 1995) и статинов (Lee et al., 2000). Логично предположить, что в наших экспериментах снижение эффективности прямых межклеточных коммуникаций оказалось стрессом для МСК. Усиление биогенеза митохондрий в этом случае можно интерпретировать как адаптивную реакцию. Еще

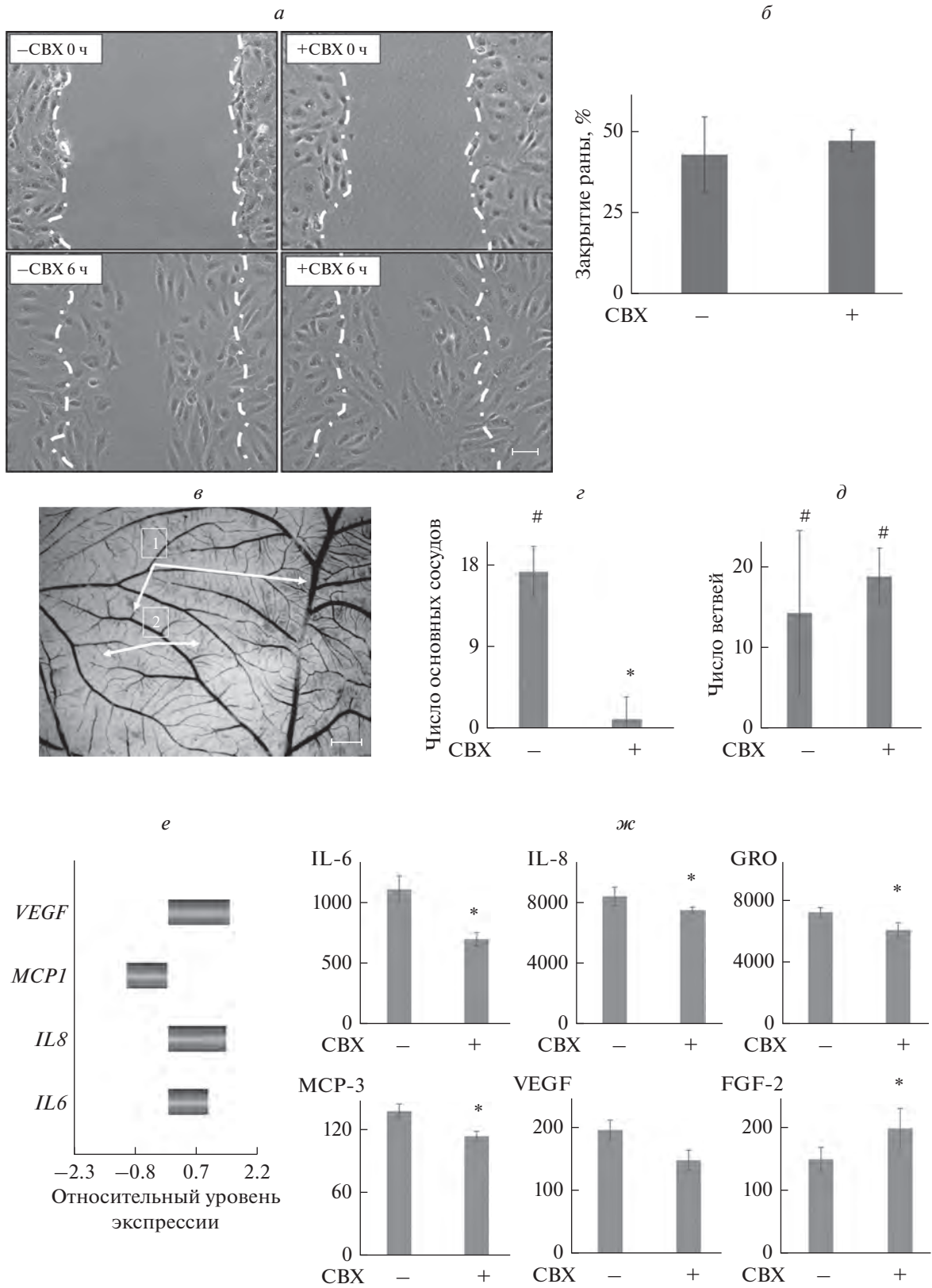


**Рис. 4.** Влияние блокирования ЩК с помощью ингибитора карбенексолона (CBX) на функциональную активность МСК. *а* – Ненаправленная миграция МСК в модели раны монослоя; фазово-контрастная микроскопия, репрезентативные микрофотографии; прерывистая линия показывает границы раны (поврежденного монослоя) в точке “0”; масштабный отрезок: 50 мкм, увел. об.: 10×. *б* – Эффективность закрытия раны; представлены средние значения и стандартные отклонения,  $n = 4$ , (\*) – различия достоверны при  $P < 0.05$ . *в* – Транскрипционная активность генов, кодирующих тубулин (*TUBB*) и белки-регуляторы миграции (*RhoA*, *Rock1*), данные нормализованы на значение экспрессии гена домашнего хозяйства *HPRT1*,  $n = 3$ . *г* – Фагоцитарный индекс, показаны средние значения и стандартные отклонения для доли МСК, захвативших частицы латекса,  $n = 4$ , (\*) – различия достоверны при  $P < 0.05$ . Результаты получены в интактных МСК (–CBX) и в МСК с заблокированными ЩК (+CBX).

одним проявлением ответа на стресс на уровне клеточного метаболизма можно считать повышение транскрипции переносчика глюкозы, что может указывать на увеличение гликолитической составляющей в метаболизме АТФ.

Блокирование ЩК привело к изменению функциональной активности МСК. Выявленное замедление ненаправленной миграции МСК после ингибирования ЩК оказалось неожиданным. Ранее было показано, что снижение коммуникации через ЩК за счет подавления транскрипции *Sx43* приводит к стимуляции миграции. При этом было выявлено увеличение транскрипции генов, кодирующих белки, ассоциированные с репарацией тканей: нескольких матриксных металлопротеиназ, факторов

TGF- $\beta$ 1 и проангиогенного VEGF-A, тогда как гены, молекулы которых ассоциированы с фиброзом (про-коллаген I типа, сократительные белки), были ингибированы. В эти изменения вовлечены сигнальные пути ERK1/2, GSK3 $\alpha/\beta$ , TGF- $\beta$  и транскрипционные факторы AP1, SP1 (Tarzeman et al., 2015). В нашей работе ингибирование работы ЩК не сопровождалось снижением транскрипции белка *Sx43* и уменьшением количества коннексиновых бляшек на поверхности МСК, с чем, по-видимому, и было связано отсутствие стимуляции миграции МСК с заблокированными ЩК. Это наблюдение может представлять интерес с точки зрения возможности направленного воздействия на функционирование ЩК-интегрированных клеточных систем.





← **Рис. 5.** Ангиогенные эффекты кондиционированной среды от МСК с работающими и заблокированными ЩК в моделях *in vitro* и *in ovo*. *a* – Ненаправленная миграция эндотелиальных клеток (ЭК) в модели раны монослоя; фазово-контрастная микроскопия, репрезентативные микрофотографии; прерывистой линией показаны границы поврежденного монослоя в точке “0”; масштабный отрезок: 50 мкм, об.: 10×. *b* – Эффективность закрытия раны ЭК; представлены средние значения и стандартные отклонения,  $n = 4$ ; отличие от значений в контроле (среда культивирования,\*) и от значений для интактных МСК (–СВХ, #) достоверно при  $P < 0.05$ . *в* – Сосудистая сеть в хориоаллантоисной оболочке (ХАО) эмбриона перепела, стрелками указаны основные сосуды (1) и ветви (2); микроскопия в светлом поле, репрезентативная микрофотография; масштабный отрезок: 1мм, об.: 6×. *г*, *д* – Число основных сосудов и ветвей соответственно: показан прирост по сравнению с контролем (средой культивирования); отличие от значений в контроле (\*) и от значений для интактных МСК (–СВХ, #) достоверно при  $P < 0.05$ . *e* – дифференциальная экспрессия генов, кодирующих ангиогенные медиаторы; показана кратность отличий в МСК с заблокированными ЩК по сравнению с интактными МСК,  $n = 3$ . *ж* – Содержание ангиогенных медиаторов (IL-6, IL-8, GRO, MCP-3, VEGF, FGF-2) в кондиционированной среде МСК. Представлены средние значения и стандартные отклонения,  $n = 4$ ; отличия между МСК с заблокированными контактами (+СВХ) и интактными МСК (–СВХ) достоверны при  $P < 0.05$  (\*).

Помимо снижения миграции мы обнаружили уменьшение фагоцитарного индекса после ингибирования ЩК в МСК. Подобный эффект был ранее описан в результате нокдауна *Sx43* и последующего подавления работы ЩК в клетках внутриглазной трабекулярной сети (Li et al., 2020). Кроме того, ингибирование *Sx43* с помощью малых интерферирующих мНРК вызывало снижение фагоцитоза в макрофагах. Этот эффект авторы объяснили тем, что *Sx43* связан с цитоскелетными белками и необходим для реорганизации F-актинового цитоскелета и RhoA-зависимого захвата фагоцитируемых частиц (Anand et al., 2008).

Фенотипическая поляризация МСК при снижении коммуникации через ЩК, помимо замедления миграции и подавления фагоцитоза, сопровождалась снижением продукции паракринных медиаторов, что привело к ослаблению ангиогенных эффектов КС от МСК. Ранее после ингибирования ЩК в культивируемых стромальных клетках эндометрия человека было показано снижение продукции VEGF-A, что рассматривалось как одна из причин снижения ангиогенеза в эндометрии (Yu et al., 2011). В нашей работе при анализе паракринного профиля КС выявлена тенденция к снижению уровня основного ангиогенного медиатора VEGF, играющего центральную роль в стимуляции пролиферации и миграции ЭК, а также наблюдалось снижение содержания нескольких хемокинов: IL-8, IL-6, GRO, MCP-3.

Хемокины играют важную роль в регуляции процессов ангиогенеза. IL-8 – первый из хемокинов, для которых показана прямая проангиогенная активность за счет стимуляции миграции ЭК, а также опосредованная – путем усиления продукции VEGF и фактора роста фибробластов FGF-2 (Li et al., 2003). Похожими эффектами обладает и плеотропный IL-6: за счет стимулирования синтеза и секреции VEGF он активирует процессы миграции и пролиферации ЭК, что обеспечивает формирование сосудистой сети (Papetti, Herman, 2002; Wei et al., 2003). Кроме того, IL-6 повышает экспрессию Ang-2. Этот медиатор

вызывает антиангиогенные эффекты, способствует гибели клеток эндотелия и регрессии сосудов. Но действуя синергично с VEGF, он содействует образованию новых кровеносных сосудов, опосредуя взаимодействия между эндотелиальными и периваскулярными клетками, усиливая эффект проангиогенных белков (Wei et al., 2003; Kayakabe et al., 2012).

Кроме того, еще ряд факторов роста и цитокинов, таких как GRO- $\alpha$ , вызывают опосредованные проангиогенные эффекты через усиление продукции основных регуляторов сосудобразования (Caunt et al., 2006). Семейство моноцитарных хемотактических протеинов также вовлечено в регуляцию роста сосудов. В частности, продемонстрировано, что MCP-3 стимулирует миграцию МСК, тем самым индуцируя ангиогенез (Voussiquenaud et al., 2012). Поскольку в наших экспериментах содержание перечисленных выше медиаторов значительно снижалось, это может объяснять отсутствие действия на продукцию VEGF, стимуляцию миграции ЭК в модели раны, а также снижение эффективности формирования сосудистой сети *in ovo* при использовании КС от МСК с заблокированными ЩК.

Таким образом, снижение эффективности прямой межклеточной коммуникации МСК–МСК может рассматриваться как стрессовая ситуация, приводящая к ухудшению интеграционной целостности клеточной системы МСК в локальных тканевых депо и поляризации фенотипа МСК. В связи с этим представляется актуальным анализ того, как факторы микроокружения МСК могут повлиять на эффективность коммуникации. В частности, есть данные о подавлении ЩК при гипергликемии (Muto et al., 2014) и повышенном уровне воспалительных медиаторов (Dorshkind et al., 1993; Duffy et al., 2000; Chanson et al., 2005). Возможно, что подобные эффекты могут вызваться также острым гипоксическим стрессом или депривацией факторов роста, возникающими при повреждении тканей. Подобного рода нарушения могут негативно отразиться как на функционировании МСК в местах их расположения, так и на возможности их мобилизации из тканевых депо.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00075).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящей работе не проводили какие-либо исследования с использованием животных или людей в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.* 2013. Паракринная активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и ее особенности в условиях гипоксии. Физиол. человека. Т. 39. № 3. С. 104. (*Andreeva E.R., Buravkova L.B.* 2013. Paracrine activity of multipotent mesenchymal stromal cells and its modulation in hypoxia. Human Physiol. 2013. V. 39. № 3. P. 315. <https://doi.org/https://doi.org/10.7868/S0131164613030041>)
- Буравкова Л.Б., Андреева Е.Р., Григорьев А.И.* 2012. Роль кислорода как физиологического фактора в проявлении функциональных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека. Физиол. человека. Т. 38. № 4. С. 1. (*Buravkova L.B., Andreeva E.R., Grigoriev A.I.* 2012. The impact of oxygen in physiological regulation of human multipotent mesenchymal cell functions. Hum. Physiol. V. 38. № 4. P. 444.)
- Ездакова М.И., Зорникова К.В., Буравков С.В., Андреева Е.Р.* 2020. Функциональная активность непродлиферирующих мезенхимных стромальных клеток, культивируемых в различной плотности. Клет. тех. биол. мед. № 4. С. 247. (*Ezdakova M.I., Zornikova K.V., Buravkov S.V., Andreeva E.R.* 2021. Functional activity of non-proliferating mesenchymal stromal cells cultured at different densities. Bull. Exper. Biol. Med. V. 170. P. 537. <https://doi.org/10.47056/1814-3490-2020-4-247-254>)
- Успенская Ю.А., Малиновская Н.А., Салмина А.Б.* 2021. Межклеточный транспорт митохондрий: молекулярные механизмы и роль в поддержании энергетического гомеостаза в тканях. Цитология. Т. 63. № 6. С. 513. (*Uspenskaya Yu.A., Malinovskaya N.A., Salmina A.B.* 2021. Intercellular mitochondrial transfer: molecular mechanisms and role in maintaining the energy homeostasis in tissues. Tsitologiya. V. 63. № 6. P. 513. <https://doi.org/10.31857/S0041377121060110>)
- Anand R.J., Dai S., Gribar S.C., Richardson W., Kohler J.W., Hoffman R.A., Branca M.F., Li J., Shi X.H., Sodhi C.P., Hackam D.J.* 2008. A role for connexin43 in macrophage phagocytosis and host survival after bacterial peritoneal infection. J. Immunol. V. 181. P. 8534. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8534>
- Andreeva E.R., Pugach I.M., Gordon D., Orekhov A.N.* 1998. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. Tiss. Cell. V. 30. P. 127. [https://doi.org/10.1016/s0040-8166\(98\)80014-1](https://doi.org/10.1016/s0040-8166(98)80014-1)
- Batra N., Kar R., Jiang J.X.* 2012. Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone. Biochim. Biophys. Acta. V. 1818. P. 1909. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.09.018>
- Bousquenaud M., Schwartz C., Léonard F., Rolland-Turner M., Wagner D., Devaux Y.* 2012. Monocyte chemotactic protein 3 is a homing factor for circulating angiogenic cells. Cardiovasc. Res. V. 94. P. 519. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs140>
- Brink P.R., Valiunas V., Gordon C., Rosen M.R., Cohen I.S.* 2012. Can gap junctions deliver? Biochim. Biophys. Acta. V. 1818 P. 2076. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.09.025>
- Caplan A.I.* 2017. Mesenchymal stem cells: time to change the name! Stem Cells Transl. Med. V. 6. P. 1445. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Castellano P., Eugenin E.A.* 2014. Regulation of gap junction channels by infectious agents and inflammation in the CNS. Front. Cell Neurosci. V. 8. P. 122. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00122>
- Caunt M., Hu L., Tang T., Brooks P.C., Ibrahim S., Karpatkin S.* 2006. Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. Cancer Res. V. 66. P. 4125. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2570>
- Chanson M., Derouette J.P., Roth I., Foglia B., Scerri I., Dudez T., Kwak B.R.* 2005. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. Biochim. Biophys. Acta. V. 1711. P. 197. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.10.005>
- Cupler E.J., Danon M.J., Jay C., Hench K., Rapka M., Dalakas M.C.* 1995. Early features of zidovudine-associated myopathy: histopathological findings and clinical correlations. Acta Neuropathol. V. 90. P. 1. <https://doi.org/10.1007/BF00294452>
- Dorshkind K., Green L., Godwin A., Fletcher W.H.* 1993. Connexin-43-type gap junctions mediate communication between bone marrow stromal cells. Blood. V. 82. P. 38.
- Duffy H.S., John G.R., Lee S.C., Brosnan C.F., Spray D.C.* 2000. Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes. J. Neurosci. V. 20. P. RC114. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-j0004.2000>
- Greco S.J., Rameshwar P.* 2013. Analysis of the transfer of circulating microRNA between cells mediated by gap junction. Methods Mol. Biol. V. 1024. P. 87. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-453-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-453-1_7)
- Harris A.L.* 2007. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. Prog. Biophys. Mol. Biol. V. 94. P. 120. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.011>
- Kayakabe K., Kuroiwa T., Sakurai N., Ikeuchi H., Kadiombo A.T., Sakairi T., Nojima Y.* 2012. Interleukin-6 promotes destabilized angiogenesis by modulating angiotensin expression in rheumatoid arthritis. Rheumatol. V. 51. P. 1571. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes093>
- Lamb R., Bonuccelli G., Ozsvári B., Peiris-Pagès M., Fiorillo M., Smith D.L., Bevilacqua G., Mazzanti C.M., McDonnell L.A., Naccarato A.G., Chiu M., Wynne L., Martinez-Outschoorn U.E., Sotgia F., Lisanti M.P.* 2015. Mitochondrial mass, a new metabolic biomarker for stem-like cancer cells: understanding WNT/FGF-driven anabolic signaling. Oncotarget. V. 6. P. 30453. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5852>
- Lee C.F., Liu C.Y., Hsieh R.H., Wei Y.H.* 2005. Oxidative stress-induced depolymerization of microtubules and alteration of mitochondrial mass in human cells. Ann. NY Acad. Sci. V. 1042. P. 246. <https://doi.org/10.1196/annals.1338.027>

- Lee C., Yin P.H., Lu C.Y., Chi C.W., Wei Y.H. 2000. Increase of mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem. J.* V. 348. P. 425.
- Li A., Dubey S., Varney M.L., Dave B.J., Singh R.K. 2003. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J. Immunol.* V. 170. P. 3369. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3369>
- Li X., Nagy J.I., Li D., Acott T.S., Kelley M.J. 2020. Gap junction connexin43 is a key element in mediating phagocytosis activity in human trabecular meshwork cells. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* V. 12. P. 25
- Limoli C.L., Giedzinski E., Morgan W.F., Swarts S.G., Jones G.D.D., Hyun W. 2003. Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells. *Cancer Res.* V. 63. P. 3107.
- Mancini M., Anderson B.O., Caldwell E., Sedghinasab M., Paty P.B., Hockenbery D.M. 2005. Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line. *J. Cell Biol.* V. 138. P. 449. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.2.449>
- Murphy M.B., Moncivais K., Caplan A.I. 2013. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exper. Mol. Med.* V. 45. P. 54. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.94>
- Murray I.R., Péault B. 2015. Mesenchymal stem cells – where do they come from and is it important? *BMC Biol.* V. 13. P. 99. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0212-7>
- Orekhov A.N., Andreeva E.R., Bobryshev Y.V. 2016. Cellular mechanisms of human atherosclerosis: role of cell-to-cell communications in subendothelial cell functions. *Tissue Cell.* V. 48. P. 25. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2015.11.002>
- Papetti M., Herman I.M. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* V. 282. P. C947. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00389.2001>
- Plotnikov E.Y., Babenko V.A., Silachev D.N., Zorova L.D., Khryapenkova T.G., Savchenko E.S., Pevzner I.B., Zorov D.B. 2015. Intercellular transfer of mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)*. V. 80. P. 542. <https://doi.org/10.1134/S0006297915050041>
- Talbot J., Brion R., Lamora A., Mullard M., Morice S., Heymann D., Verrecchia F. 2018. Connexin43 intercellular communication drives the early differentiation of human bone marrow stromal cells into osteoblasts. *J. Cell. Physiol.* V. 233. P. 946. <https://doi.org/10.1002/jcp.25938>
- Tan L., Liu X., Dou H., Hou Y. 2020. Characteristics and regulation of mesenchymal stem cell plasticity by the microenvironment-specific factors involved in the regulation of MSC plasticity. *Genes Dis.* V. 9. P. 296. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.10.006>
- Tarzemany R., Jiang G., Larjava H., Häkkinen L. 2015. Expression and function of connexin 43 in human gingival wound healing and fibroblasts. *PLoS One.* V. 10. P. e0115524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115524>
- Udartseva O.O., Zhidkova O.V., Ezdakova M.I., Ogneva I.V., Andreeva E.R., Buravkova L.B., Gollnick S.O. 2019. Low-dose photodynamic therapy promotes angiogenic potential and increases immunogenicity of human mesenchymal stromal cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* V. 199. P. 111596. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111596>
- Wei L.H., Kuo M.L., Chen C.A., Chou C.H., Lai K.B., Lee C.N., Hsieh C.Y. 2003. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene.* V. 22. P. 1517. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206226>
- Yu J., Wu J., Bagchi I.C., Bagchi M.K., Sidell N., Taylor R.N. 2011. Disruption of gap junctions reduces biomarkers of decidualization and angiogenesis and increases inflammatory mediators in human endometrial stromal cell cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* V. 344. P. 25. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.011>
- Zachar L. Bačenkova D., Rosocha J. 2016. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *J. Inflamm. Res.* V. 9. P. 231. <https://doi.org/10.2147/JIR.S121994>

## Homotypic Regulation of Functional Activity of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: The Role of Gap Junctions

M. I. Ezdakova<sup>a</sup>, D. K. Matveeva<sup>a</sup>, and E. R. Andreeva<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123007 Russia*

\**e-mail: andreeva1564@gmail.com*

Perivascular multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are considered as most likely putative depot for MSCs' mobilization in case of tissue damage. Here, we analyzed the involvement of direct homotypic gap junctional intercellular communication (GJIC) in realization of MSC functions requested in tissue healing and repair: the state of intracellular compartments, paracrine, in particular angiogenic activity, the migration and phagocytosis. GJIC in growth arrested MSCs was suppressed with specific inhibitor, carbenoxolone. Using flow cytometry, a two-fold increase in mitochondrial mass (MitoTracker Green) was shown in MSCs with blocked GJ. The transmembrane mitochondrial potential (JC-1) and the ROS levels (CM-H2DCFDA probe), as well as the activity of the lysosomes (LysoTracker Green) did not change. MSCs with blocked GJs migrated less actively in the "scratch wounding" model. The phagocytosis of latex beads was reduced. According to multiplex immunofluorescence assay, the levels of pleiotropic cytokines IL-6, IL-8, and MCP-3 were significantly lower in the conditioned medium from MSCs with blocked GJs. This medium did not stimulate the non-targeted migration of endothelial cells and the growth of the tubule complexes in the chorioallantoic membrane of the quail embryo. It is supposed, that a decrease in the efficacy of direct MSC-MSC intercellular communication *in vivo* may negatively affect stromal cells' functions on site as well as their mobilization from tissue depots.

**Keywords:** multipotent mesenchymal stromal cells, homotypic gap junctions, inhibitor, intracellular compartments, phagocytosis, migration, soluble mediators, angiogenesis *in ovo*