

Функциональная активность стромальных клеток-предшественников из жировой ткани и костного мозга в условиях гипоксии *in vitro*

Ефименко Анастасия Юрьевна

аспирантка

*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, факультет
фундаментальной медицины, Москва, Россия*

E-mail: efimenko_an@mail.ru

Во многих органах и тканях взрослого организма, наряду с полностью дифференцированными клетками, существуют разные типы клеток-предшественников, среди которых одними из наиболее перспективных для применения в клеточной терапии считаются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки. Основными источниками их являются жировая ткань и костный мозг [1,2]. В многочисленных работах было показано, что стромальные клетки из жировой ткани (СКЖТ) и из костного мозга (СККМ) обладают способностью стимулировать ангиогенез, в том числе путем секреции множества проангиогенных факторов, причем этот процесс изменяется под воздействием гипоксии [4]. По различным данным, СКЖТ и СККМ имеют довольно схожие профили экспрессии генов и поверхностных маркеров [2], а в работе Nakagami Н. и соавт. [3] приведены данные о сравнимой эффективности этих типов клеток в отношении восстановления кровотока в ишемизированной мышце на модели ишемии задней конечности мыши. Однако остаются неясными конкретные изменения функциональной активности стромальных клеток из разных источников в условиях гипоксии. Поэтому целью нашей работы было оценить влияние гипоксии на свойства СКЖТ и СККМ *in vitro*.

СКЖТ и СККМ были выделены из жировой ткани и трубчатых костей задних конечностей мышей линии C57BL/6 соответственно. Клетки культивировались согласно специфическим методикам [4, 5] до достижения нужного пассажа. После этого в течение 48 часов клетки обоих типов культивировались в условиях 1% (гипоксия) или 20% (нормоксия) содержания кислорода. Все изменения в клетках анализировались немедленно после изъятия клеток из гипоксического инкубатора. Гибель клеток путем апоптоза оценивали с помощью количественного метода TUNEL. Из части клеток выделяли РНК для анализа изменения генной экспрессии методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Уровень секреции клетками проангиогенных факторов оценивали в кондиционированной среде с помощью Western blot и методики образования трубочек на Матригеле эндотелиальными клетками (HUVEC). Для изучения изменения экспрессии на поверхности клеток рецепторов, опосредующих миграцию (CXCR4, рецептор урокиназы), проводили иммуоцитохимическое окрашивание с помощью специфических антител.

Полученные результаты показали, что гипоксия не увеличивала частоту апоптоза как СКЖТ, так и СККМ. Содержание мРНК таких проангиогенных факторов, как фактора роста эндотелия сосудов (VEGF A), фактора роста гепатоцитов (HGF) и его рецептора c-met, основного фактора роста фибробластов (bFGF) повышалось в гипоксических условиях, а экспрессия CD34 снижалась в обоих типах клеток ($p < 0.01$). При этом увеличение экспрессии VEGF и HGF в СКЖТ было более выраженным по сравнению с СККМ (разница в 1.82 раза для VEGF и в 18 раз для HGF). Гипоксия стимулировала секрецию проангиогенных факторов в среду клетками обоих типов, что было показано с помощью определения в среде VEGF методом Western blot и количественной оценки длины трубочек, которые образовывали эндотелиальные клетки на Матригеле в присутствии кондиционированной среды от клеток, культивированных в условиях гипоксии и нормоксии ($p < 0.05$). Наблюдалась тенденция несколько более выраженного индуцированного гипоксией увеличения секреции проангиогенных факторов СКЖТ по сравнению с СККМ, что находилось в корреляции с изменениями на уровне экспрессии генов. Кроме того, в ответ на гипоксию на поверхности СКЖТ на 80% повышалась экспрессия рецептора фактора, полученного из стромальных

клеток (SDF-1), CXCR4 ($p < 0.05$), в то время как на поверхности СККМ экспрессия этого рецептора практически не отличалась в гипоксических и нормоксических условиях.

Таким образом, в гипоксических условиях *in vitro* происходит стимуляция проангиогенных свойств СКЖТ и их потенциальной способности к хоумингу по градиенту SDF-1. При этом выраженность их ответа на гипоксию несколько больше по сравнению с СККМ. Учитывая преимущества СКЖТ в плане доступности, легкости выделения и культивации, этот тип стромальных клеток-предшественников представляется очень перспективным для использования в клеточной терапии заболеваний ишемического генеза.

1. Gronthos, S., et al. (2001) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*; 189(1): p. 54-63.
2. Lee R.H. et al. (2004) Characterization and Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue. *Cell Physiol Biochem*; 14: 311-324.
3. Nakagami H. et al. (2006) Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative therapy. *J Atheroscler Thromb*; 13: 77.
4. Rehman J. et al. (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*; 109(10): 1292-8.
5. Sun S. et al. (2003) Isolation and characterization of bone marrow derived stromal cells from mice. *Stem cells*; 21: 527-535.