

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Свирская А.В., Нижегородова Д.Б.

Международный государственный экологический институт
им. А.Д. Сахарова БГУ

Актуальность. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) активно используются для терапии различных заболеваний, патогенез которых может сопровождаться универсальным патологическим процессом – гипоксией. Экспериментальные модели культивирования ММСК в условиях дефицита кислорода демонстрируют изменения как фенотипа, так и функциональных свойств клеток, однако результаты данных исследований до сих пор остаются противоречивыми.

Цель – оценить фенотип мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и жировой ткани человека в условиях гипоксии.

Методы исследования. ММСК человека получали из аспирата костного мозга (n=6) и подкожной жировой ткани (n=7) доноров (в возрасте от 20 до 58 лет), соответственно, путем центрифугирования на градиенте плотности (Carl Roth, Германия) или ферментативной обработкой коллагеназы IV типа (Sigma, Германия). ММСК культивировали в среде DMEM-LG с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% L-глутамина, 1% антибиотика-антимикотика (Gibco, Германия) в течение 72 часов в условиях газовой гипоксии (1-2% O₂) с использованием набора Anaerocult A® mini (Millipore, Германия) при 37°C или в условиях нормоксии в CO₂-инкубаторе. Для оценки иммунофенотипа ММСК использовали панель моноклональных антител CD90-FITC, CD44-FITC, CD105-PE и CD45-PE-Cy7 (Beckman Coulter, США). Результаты регистрировали на 5000 клеток на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы STATISTICA 8.0.

Результаты и их обсуждение. Согласно Международному сообществу по клеточной терапии фенотип ММСК определяется как CD44+CD105+CD90+CD45-CD34-, где экспрессия положительных маркеров должна составлять не менее 95%, а отрицательных – не более 2,5%. Установлено, что в условиях гипоксии статистически значимо снижалась экспрессия CD105 (эндоглина, входящего в рецепторный комплекс трансформирующего фактора роста β и играющего ключевую роль в ангиогенезе) на ММСК костного мозга и CD90 (адгезивная молекула, участвующая во взаимодействиях между клетками, а также клетками и внеклеточным матриксом) на ММСК жировой ткани на фоне отсутствия изменений в экспрессии CD44 (интегральный клеточный гликопротеин, играющий важную роль в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции) по сравнению с аналогичными показателями ММСК,

культивируемых в условиях нормоксии (таблица). При этом экспрессия CD105 на гипоксических ММСК костного мозга прямо пропорционально коррелировала с концентрацией супероксиддисмутазы-3 ($R=0,97$; $p=0,01$) и рецептора фактора роста эндотелия сосудов ($R=0,98$; $p=0,002$) и обратно пропорционально с тромбоцитарным фактором роста ($R=-0,98$; $p=0,01$). Уровень экспрессии негативных маркеров CD45 (гематопозитический маркер, регулятор роста и дифференцировки клеток) и CD34 (молекула клеточной адгезии) на ММСК варьировал от 0,00 до 1,00 % и не зависел от условий культивирования клеточных культур.

Таблица – Экспрессия (%) фенотипических маркеров ММСК костного мозга и жировой ткани в условиях гипоксии и нормоксии

Фенотипический маркер	Условия культивирования	ММСК костного мозга	ММСК жировой ткани
CD105, %	<i>Гипоксия</i>	46,53 * (6,58÷86,48)	98,41 (97,04÷99,58)
	<i>Нормоксия</i>	84,94 (84,04÷85,84)	99,03 (96,96÷99,52)
CD90, %	<i>Гипоксия</i>	94,63 (89,92÷99,34)	46,33 * (40,66÷94,86)
	<i>Нормоксия</i>	96,18 (92,85÷99,51)	99,08 (98,93÷99,26)
CD44, %	<i>Гипоксия</i>	96,09 (93,72÷98,46)	98,27 (97,20÷98,88)
	<i>Нормоксия</i>	96,99 (96,21÷97,77)	96,71 (95,90÷99,10)

Выводы. Гипоксия способствует снижению экспрессии маркеров CD105 и CD90 на ММСК костного мозга и жировой ткани, соответственно, и влияет как на антиоксидантные свойства клеточных культур, так и синтез факторов роста, участвующих в процессе ангиогенеза, что необходимо учитывать при моделировании иммунопатологических процессов, связанных с окислительным стрессом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Antebi, B. Short-term physiological hypoxia potentiates the therapeutic function of mesenchymal stem cells / B. Antebi, L.A. Rodriguez, et al. // Stem Cell Research & Therapy. – 2018. – Vol. 9 (265). – P. 2-15.
2. Pezzi, A. Effects of hypoxia in long- term in vitro expansion of human bone marrow derived mesenchymal stem cells / A. Pezzi, B. Amarin, et al. // Journal of Cellular Biochemistry. – 2017. – Vol. 37. – P. 1-24.