

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 576.54

Чувствительность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток к короткому гипоксическому стрессу *in vitro* зависит от эффективности гомотипической коммуникации через щелевые контакты

М.И. Ездакова , Д.К. Матвеева , И.В. Андрианова , Е.Р. Андреева*

Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем,
Российская академия наук, Москва, Россия

*e-mail: andreeva1564@gmail.com

Щелевые контакты (ЩК) обеспечивают метаболическую кооперацию между клетками за счет непосредственного обмена цитоплазматическими компонентами. Проведен анализ влияния короткого гипоксического стресса на эффективность коммуникации через ЩК в культивируемых митотически неактивных мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках (МСК) и охарактеризована зависимость чувствительности МСК к короткому гипоксическому стрессу от работы ЩК. МСК постоянно культивировали при 20% O₂. ЩК блокировали с помощью специфического ингибитора – карбеноксолона. Затем МСК с работающими или заблокированными ЩК подвергали гипоксическому стрессу (менее 0,1% O₂, 24 ч). В условиях гипоксического стресса обнаружено снижение эффективности коммуникации через ЩК. Сочетанное действие ингибитора ЩК и гипоксического стресса сопровождалось увеличением уровня активных форм кислорода по сравнению с МСК при гипоксическом стрессе. МСК с заблокированными ЩК были менее чувствительны к короткому гипоксическому стрессу, чем МСК, интегрированные в общую сеть через работающие ЩК. Это проявилось в ослаблении гипоксия-индуцированной ангиогенной активности МСК. Ангиогенные эффекты кондиционированной среды от МСК с заблокированными ЩК после гипоксического стресса были почти в два раза меньше по сравнению с МСК при гипоксическом стрессе, что связано, по-видимому, с отличиями в профиле ангиогенных медиаторов: содержание фактора роста сосудистого эндотелия уменьшилось, а фактора роста фибробластов – увеличилось при неизменном уровне моноцитарного хемоаттрактантного белка 3. Таким образом, снижение эффективности прямой коммуникации МСК–МСК оказало негативное влияние на способность индуцировать ангиогенез. Сделано заключение, что блокирование коммуникации через ЩК является негативным механизмом, нарушающим координацию ответа МСК на действие факторов микроокружения – в частности гипоксический стресс – и снижающим их функциональную пластичность.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, гомотипические щелевые контакты, ингибитор, короткий гипоксический стресс, внутриклеточные компартменты, миграция, растворимые медиаторы, ангиогенез *in ovo*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-7

Введение

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются не только структурным, но и важнейшим регуляторным компонентом различных тканевых ниш [1–4]. Показано, что функциональное состояние МСК изменяется в зависимости от факторов их микроокружения, среди которых важнейшим является концентрация O₂ [5–6]. Когда концентрация O₂ в тканях снижается до уровня менее 5%, клетки вынужде-

ны адаптировать свой метаболизм и функции к таким гипоксическим условиям [7]. Острый гипоксический стресс, возникающий в участках повреждения тканей наряду с депривацией нутриентов и увеличением концентрации провоспалительных медиаторов, создает то специфическое микроокружение, в котором происходят взаимодействие клеток и реализация их функциональной активности. Известно, что гипоксический стресс (*in vitro* 0,1–5% O₂), значительно изменяет функ-

циональную активность МСК за счет активации HIF-зависимых сигнальных путей, регулирующих такие важные функции МСК, как миграция, пролиферация, метаболическая активность, продукция цитокинов, в том числе ангиогенных [8–10].

Ранее мы показали, что ингибирование работы щелевых контактов (ЩК) *in vitro* приводит к изменению функциональной активности МСК, в частности, снижению способности их секретома стимулировать рост сосудов *in ovo* и миграцию эндотелиальных клеток *in vitro* [11]. Было сделано предположение, что снижение эффективности прямой межклеточной коммуникации МСК–МСК *in vivo* может негативно отразиться на их функционировании. Эффективность работы ЩК зависит от факторов микроокружения и может значительно меняться при повреждении тканей. Так, в присутствии провоспалительных медиаторов, таких как IL-1 β или TNF- α , обнаружено снижение эффективности переноса специфического красителя через ЩК [12, 13]. Короткий гипоксический стресс в культивируемых кардиомиоцитах вызывал перераспределение коннексин-43 (Cx43) из области контактов между клетками на неконтактирующие участки мембраны и снижение проводимости ЩК [14]. Гипоксия-индуцированное снижение экспрессии Cx43 опосредовалось сигнальными каскадами MAPK (mitogen-activated protein kinase) и NF- κ B (nuclear factor kappa B) в кардиомиоцитах [15]. Данных относительно влияния коротких гипоксических экспозиций на ЩК клеток стромального дифферона (МСК, периваскулярные клетки, гладкомышечные клетки, фибробласты) немного. Показано увеличение экс-

прессии гена *GJA1* (белок Cx43) в фибробластах легких после 24-часовой гипоксии (5% O₂). Аналогичный эффект описан для фибробластов ЗТЗ [17]. Таким образом, в зависимости от типа клеток и уровня гипоксического стресса, ответ ЩК на гипоксический стресс может различаться, что указывает на необходимость более детального исследования этого вопроса в отношении МСК в 0,1% O₂, как в данной работе.

В настоящей работе мы определили, как эффективность гомотипической коммуникации через ЩК влияет на устойчивость/чувствительность МСК к короткому гипоксическому стрессу (0,1% O₂, 24 ч).

Материалы и методы

В работе использовали иммортализованные МСК (AsC52telo) и эндотелиальные клетки (ЭК) EA.hy926 (ATCC, США). Клетки культивировали в среде α -MEM (Gibco, США; для МСК) и DMEM/F12 (Gibco, США; для ЭК) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 1% раствора пенициллина/стрептомицина (конечная концентрация в среде составила 100 ед./мл и 100 мг/мл) (ПанЭко, Россия), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия) при 20% O₂ (общепринятые стандартные условия культивирования (95% воздуха (20% O₂) + 5% CO₂)) в CO₂-инкубаторе MCO-17AI (Sanyo, Япония). Схема эксперимента представлена на рис. 1. МСК рассеивали с плотностью 2500 кл./см² и культивировали согласно стандартному протоколу до достижения 80–90% монослоя (рис. 1А). Затем среду заменяли на свежую, содержащую 1,5 мкг/мл митомицина С (Sigma-

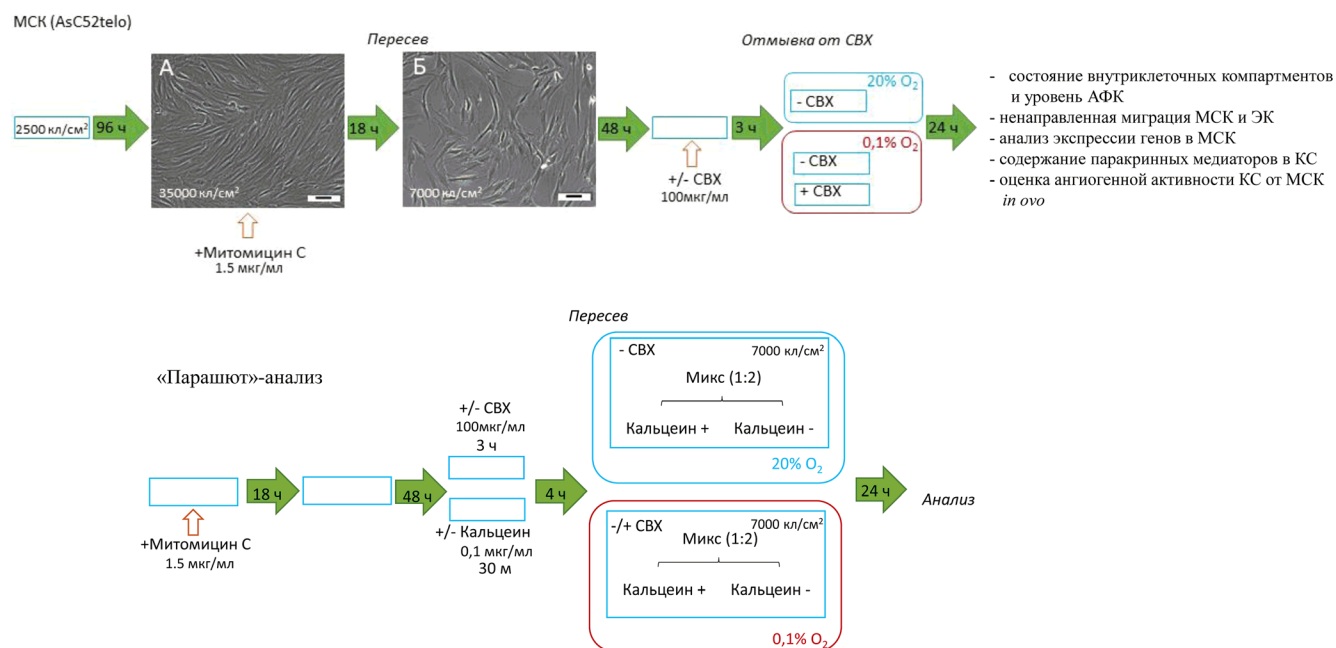


Рис. 1. Схема эксперимента. А – монослой МСК перед добавлением митомицина С. Б – предмонослой МСК, обработанных митомицином С. Репрезентативные изображения: фазовый контраст, масштабный отрезок – 50 мкм. Микс – смешанная культура кальцеин-содержащих и неокрашенных клеток.

Aldrich, США). Через 18 ч клетки промывали, открепляли от подложки и рассеивали в чашки Петри диаметром 35 мм в полной ростовой среде из расчета 7000 кл./см², что позволило получить предмонослой (рис. 1Б). Ранее мы показали, что при такой плотности посева клетки в образовавшемся предмонослое образуют ЩК, о чем свидетельствовала экспрессия белка ЩК Сх43 [18]. Через 48 ч к части МСК для блокирования ЩК добавляли специфический ингибитор — карбенексолол (CBX, carbenoxolone) (Sigma-Aldrich, США) — в концентрации 100 мкг/мл на 3 ч. Затем МСК с заблокированными или работающими ЩК подвергали короткому гипоксическому воздействию — 0,1% O₂, 24 ч в гипоксической камере (кат. №: 27310) (Stem Cell Technologies, Канада), оснащенной кислородным датчиком ПКГ-4 (Эксис, Россия). Гипоксическая газовая смесь (95% N₂ + 5% CO₂) была приобретена в фирме «ООО ГазЗачас» (Россия). В качестве группы сравнения использовали МСК, постоянно культивируемые при 20% O₂. Перед началом экспериментов с гипоксическим стрессом во всех группах МСК меняли среду на свежую. После окончания эксперимента собирали кондиционированную среду (КС).

Эффективность работы ЩК, состояние клеточных органелл, уровень активных форм кислорода (АФК), жизнеспособность оценивали методом проточной цитофлуориметрии (Cytotflex S, Beckman Coulter, США) с использованием соответствующих флуоресцентных проб. Коммуникацию через ЩК определяли с помощью «парашют»-анализа (parashute assay) (рис. 1) [19]. Для этого использовали кальцеин-АМ. Этот vitalный 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 ЩК. Часть МСК, перед сокультивированием окрашивали кальцеином-АМ (0,1 мкг/мл, Invitrogen, США), затем рассаживали вместе с неокрашенной популяцией клеток, часть которых обрабатывали/не обрабатывали СВХ, с плотностью 7000 кл./см². Далее МСК, содержащие кальцеин, и неокрашенные МСК (1:2) совместно культивировали в течение 24 ч. Клетки открепляли Аккутазой (Sigma, США). Увеличение количества окрашенных МСК свидетельствовало о переносе кальцеина через ЩК. Для оценки жизнеспособности клеток использовали тест «анексин V — йодид пропидия» (ANNEXIN V-FITC Kit, Beckman Coulter, США). Массу митохондрий оценивали при помощи потенциал-независимого митохондриального зонда MitoTracker Green (15 нг/мл, Invitrogen, США). Трансмембранный потенциал митохондрий определяли с помощью зонда JC-1 (1,5 нг/мл, Invitrogen, США). АФК в клетках выявляли, используя зонд CM-H2DCFDA (1 мкл/мл, Invitrogen, США). Состояние лизосомального

компартамента оценивали при помощи зонда LysoTracker Green DND26 (0,5 мкл/мл, Invitrogen, США). Окрашивание МСК флуоресцентными зондами проводили согласно протоколам производителя (Invitrogen, США). В качестве параметра для оценки данных проточной цитофлуориметрии использовали среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) на клетку.

Влияние КС от МСК на ненаправленную миграцию МСК и ЭК оценивали в модели экспериментальной «раны» монослоя по средней площади миграции в течение 6 ч после нанесения раны [11]. МСК анализировали на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti-U (Nikon, Япония), с использованием программы NIS-elements AR 3.21 (Nikon, Япония).

Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени с помощью соответствующих праймеров (Qiagen, США) на приборе MX300P (Stratagen, США). Клетки с чашки 35 мм, с плотностью 7000 кл./см², 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 полимеразной цепной реакции в присутствии SYBR Green 1 (Евроген, Россия). Ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (*HPRT*) был использован в качестве референсного. Транскрипция *HPRT* осталась постоянной при гипоксическом стрессе, а также воздействию СВХ и митомицина, что позволяет использовать его для определения относительного изменения уровня экспрессии целевых генов. Подготовка проб была одинаковой для всех групп, в том числе в анализ было взято одинаковое количество кДНК. Специфичность проводимой реакции определяли с помощью анализа кривой плавления продуктов амплификации в диапазоне от 55°C до 95°C с шагом в 1 градус.

Содержание паракринных медиаторов в образцах КС определяли с помощью мультиплексного анализа (Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel — Premixed 41 Plex — Immunology Multiplex Assay; Merck, Germany). Условия посадки и культивирования клеток были одинаковыми во всех группах: плотность 7000 кл./см², чашки диаметром 35 мм, объем среды 2 мл.

Оценку ангиогенной активности проводили с использованием модели *in ovo* (формирование сосудистой сети в хориоаллантоисной оболочке (ХАО) эмбриона японского перепела *Coturnix coturnix japonica*) [20].

В качестве характеристики полученных выборок использовали среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 7.0, используя непараметрический критерий Манна-Уитни (для малых и средних выборок, $n \leq 30$) при выбранном уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

К настоящему времени уже опубликованы результаты несколько исследований, демонстрирующих зависимость функциональной активности клеток от их плотности в культуре [19, 21–22].

Основной проблемой, с которой сталкиваются исследователи в таких экспериментах, является исходно разное функциональное состояние клеток в зависимости от фазы клеточного роста. Для того чтобы преодолеть это затруднение, мы разработали протокол с использованием антибиотика митомицина С, который обладает цитостатическим действием, образуя поперечные сшивки между нитями ДНК.

Среди МСК, культивируемых при 20% O_2 , а также после гипоксического стресса наблюдался низкий уровень клеточной гибели. По данным проточной цитометрии, при 20% O_2 процент живых клеток составил $95,9 \pm 0,7$. МСК после гипоксического стресса и блокирования ЩК сохраняли высокий уровень жизнеспособности – $94,2 \pm 0,3\%$ и $96,2 \pm 0,8\%$ соответственно. Таким образом, МСК достаточно устойчивы к гипоксическому стрессу. Это позволяет предполагать, что в организме при ишемических повреждениях эти клетки могут выжить и участвовать в ремоделировании ткани после ишемической катастрофы.

Эффект депривации O_2 оценивали по изменению нескольких гипоксия-зависимых параметров. По сравнению с МСК при 20% O_2 , в МСК в обеих «гипоксических» группах (0,1% O_2 – СВХ и 0,1% O_2 + СВХ) была достоверно повышена транскрипция переносчика глюкозы *GLUT1* (таблица), что может указывать на увеличение гликолитической составляющей в метаболизме АТФ. Увеличение уровня фактора роста сосудистого эндотелия

(VEGF, vascular endothelial growth factor) является одним из наиболее заметных проявлений ответа клетки на гипоксический стресс [23]. Значимое увеличение содержания VEGF в кондиционированной среде от МСК в обеих группах является дополнительным подтверждением эффекта гипоксического стресса (таблица).

Эффективность коммуникации МСК через ЩК анализировали с помощью «парашют»-анализа с использованием проточной цитофлуориметрии (рис. 2). Для этого неокрашенные МСК (70% популяции) и МСК, содержащие кальцеин (30% популяции), объединяли и совместно культивировали в соответствии с дизайном эксперимента. Гистограммы распределения неокрашенных и окрашенных кальцеином МСК представлены на рис. 2А и 2Б соответственно. Для полуколичественной оценки уровня кальцеина в МСК использовали показатель СИФ на клетку. После взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК при 20% O_2 в течение 24 ч сформировалась популяция, в которой все клетки содержали кальцеин (рис. 2В). Распределение клеток по интенсивности флуоресценции было близким к нормальному. Значения СИФ были ниже, чем в исходных окрашенных клетках, но существенно выше, чем в неокрашенных МСК, что свидетельствовало о перетекании кальцеина через ЩК из окрашенных клеток в неокрашенные.

После культивирования МСК при 0,1% O_2 в течение 24 ч выявлено подавление эффективности переноса красителя через ЩК (рис. 2Г). В отличие от МСК при 20% O_2 , часть окрашенных МСК сохранила исходную СИФ (правый пик на гистограмме). Левый пик представлен исходно неокрашенными МСК, в которые перетек кальцеин, СИФ в этих клетках была существенно ниже.

Гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в популяции после взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК с заблокированными ЩК были представлены кривыми с двумя пиками (рис. 2Д). Часть окрашенных МСК, составлявшая примерно треть популяции, имела исходно высокий уровень флуоресценции, соответствующий значениям

Таблица

Влияние короткого гипоксического стресса и блокирования щелевых контактов на транскрипционную активность МСК и продукцию VEGF

Праймеры/факторы роста	-CBX 20% O_2	-CBX 0,1% O_2	+CBX 0,1% O_2
<i>GLUT1</i>	$6,7 \pm 0,2$	$12,2 \pm 0,9^*$	$14,9 \pm 0,9^*$
<i>GJA1</i>	$1,8 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,1^*$
<i>TUBB</i>	$139,7 \pm 11,2$	$85,1 \pm 12,3^*$	$72,1 \pm 3,7^*$
<i>RHOA</i>	$130,1 \pm 21,3$	$89,1 \pm 16,1^*$	$125,7 \pm 11,3$
<i>ROCK1</i>	$2,9 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,9^*$	$2,4 \pm 0,9$
VEGF, пкг/мл	$200,4 \pm 16,0$	$352,2 \pm 38,1^*$	$276,3 \pm 41,0^*$

Примечания: данные экспрессии генов нормализованы на значения экспрессии гена домашнего хозяйства *HPRT1* и представлены как $M \pm SD$. * – значимое отличие от значения эксперимента «-CBX 20% O_2 », $p < 0,05$

окрашенных клеток до начала эксперимента (рис. 2Б). Другие две трети популяции были окрашены гораздо слабее. Это позволяет утверждать, что ЩК были заблокированы.

По сравнению с МСК при 20% O_2 в МСК с заблокированными ЩК после гипоксического стресса была существенно ниже транскрипция гена *GJA1*, кодирующего Сх43 — представитель семейства белков ЩК (рис. 2Д), что может быть причиной описанного выше ухудшения коммуникации через ЩК.

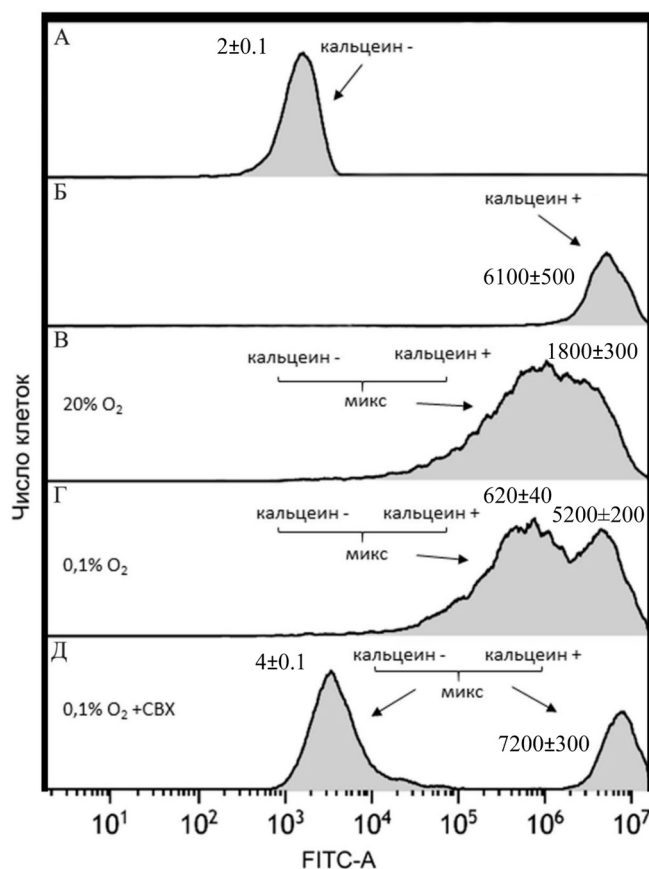


Рис. 2. Оценка эффективности межклеточной коммуникации МСК через щелевые контакты. Репрезентативные гистограммы. «Парашют»-анализ, проточная цитофлуориметрия. А — распределение клеток по интенсивности флуоресценции в суспензии неокрашенных МСК; Б — распределение клеток по интенсивности флуоресценции в суспензии окрашенных кальцеином МСК перед началом совместного культивирования; В — Распределение МСК с различной интенсивностью флуоресценции после 24 ч взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК при 20% O_2 (на рисунке эта смешанная популяция клеток обозначена как «микс»); Г — распределение МСК с различной интенсивностью флуоресценции после 24 ч взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК при 0,1% O_2 (микс). Часть окрашенных МСК сохранила исходную интенсивность флуоресценции (правая часть пика). Левая часть пика представлена исходно неокрашенными МСК, в которые перетек кальцеин; Д — распределение МСК с различной интенсивностью флуоресценции после 24 ч взаимодействия кальцеин-содержащих и неокрашенных МСК при 0,1% O_2 при блокировании ЩК (микс), СВХ — карбенексон. На гистограммах приведены СИФ клеточных популяций (усл. ед. $\times 10^3$)

Известно, что депривация O_2 вызывает стресс митохондрий [24]. Для характеристики митохондриального компартмента полуколичественно определяли интенсивность флуоресценции селективного красителя митохондрий — MitoTracker Green FM (Invitrogen, США). Данный краситель избирательно аккумулируется в матриксе митохондрий, где ковалентно связывается с митохондриальными белками, реагируя со свободными тиоловыми группами остатков цистеина [25–26]. Накопление этого флуоресцентного маркера в матриксе митохондрий прямо пропорционально их массе и не зависит от мембранного потенциала органелл [25], что дает возможность судить об относительном содержании митохондрий в клетке или «массе митохондрий». Кроме того, для оценки трансмембранного потенциала митохондрий использовали катионный карбоцианиновый краситель JC-1, накопление которого потенциал-зависимо. При высоком значении потенциала митохондриальной мембраны краситель образует J-агрегаты, которые имеют красную флуоресценцию ($E_x = 585$ нм, $E_m = 590$ нм). При снижении потенциала (деполяризации) мембраны краситель остается в виде мономера, обладающего зеленой флуоресценцией ($E_x = 514$ нм, $E_m = 529$ нм). Соотношение красной/зеленой флуоресценции JC-1 зависит только от потенциала митохондриальной мембраны, но не от других факторов, таких как размер, форма и плотность митохондрий.

В обеих группах МСК проточная цитофлуориметрия выявила относительное увеличение массы митохондрий (рис. 3А) и содержания внутриклеточных АФК (рис. 3Б). При этом трансмембранный потенциал митохондрий не изменился (рис. 3В). Увеличение СИФ MitoTracker Green FM в МСК может свидетельствовать об увеличении массы (числа) митохондрий, подобный эффект описан ранее [24].

Зависимый от pH зонд LysoTracker Green был использован для оценки функционального состояния лизосом и аутофагосом. Специфическое окрашивание органелл с низким pH позволяет анализировать процессы аутофагии. СИФ МСК с работающими и заблокированными ЩК после гипоксического стресса достоверно не отличались от СИФ в МСК при 20% O_2 (рис. 3Г). Эти результаты можно оценивать как свидетельство устойчивости лизосомального компартмента МСК к острому гипоксическому стрессу вне зависимости от того, работают в них ЩК или нет.

Через 6 ч после повреждения монослоя МСК эффективность закрытия экспериментальной «раны» во всех группах была сходной и составляла 100%, т.е. острый гипоксический стресс (как сам по себе, так и в сочетании с блокированием ЩК) не повлиял на способность МСК к миграции. Анализ активности генов, связанных с миграцией,

выявил значимое снижение уровня транскрипции *TUBB*, кодирующего белок цитоскелета тубулин, а также генов *RHOA* и *ROCK1*, кодирующих молекулы сигнального пути Rho/ROCK, в МСК после гипоксического стресса (таблица). При этом в МСК с заблокированными ЩК активность генов регуляторных молекул *RHOA* и *ROCK1* не отличалась от этого показателя для МСК, постоянно культивируемых при 20% O_2 (таблица). Полученные данные можно интерпретировать следующим образом. Влияние гипоксического стресса на ассоциированные с миграцией структуры определялось только на транскрипционном уровне. Сходные результаты по снижению активности гена-регулятора миграции – *ROCK1* – в МСК после острого гипоксического стресса мы описали ранее [10]. Отмена влияния гипоксического стресса на транскрипцию генов-регуляторов в МСК с заблокированными ЩК дает основания полагать, что уровень межклеточной интеграции через ЩК может быть одним из факторов, определяющих миграционную активность МСК.

Ангиогенные эффекты КС от МСК с работающими/заблокированными ЩК после гипоксического стресса оценивали по влиянию на нена-

правленную миграцию в экспериментальной «ране» в монослое ЭК и в модели формирования сосудистой сети в ХАО эмбриона перепела ($n = 4$) (рис. 4А). Эффективность закрытия раны ЭК была одинаковой при культивировании в КС от МСК всех экспериментальных групп и составила 100% ($n = 4$).

По сравнению с КС от МСК при 20% O_2 , КС от МСК с работающими ЩК после гипоксического стресса вызывала четырехкратное увеличение общего числа сосудов в ХАО, причем этот эффект был достигнут только за счет увеличения числа ветвей (рис. 4Б). Эффект гипоксической стимуляции был снижен в случае использования КС от МСК с заблокированными ЩК. Происходило подавление роста ветвей (рис. 4Б).

После гипоксического стресса в КС от МСК с работающими ЩК выявлено увеличение в 1,75 раза уровня основного медиатора ангиогенеза – VEGF (vascular endothelial growth factor), в случае МСК с заблокированными ЩК – в 1,4 раза (рис. 4В). Уровень другого ангиогенного медиатора – фактора роста фибробластов (FGF-2, fibroblast growth factor 2) – напротив, снижался после депривации O_2 , но значимо

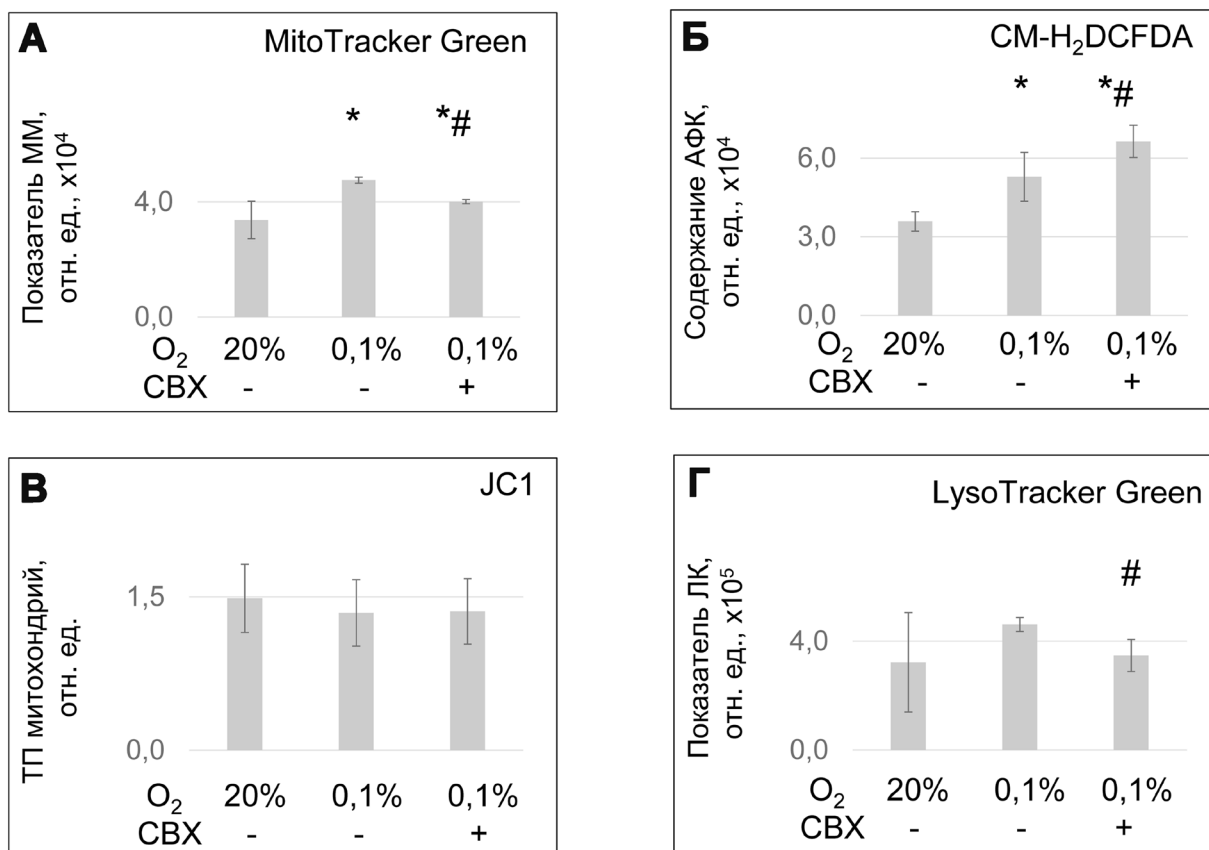


Рис. 3. Влияние короткого гипоксического стресса и блокирования щелевых контактов на состояние внутриклеточных компарментов и уровень АФК в МСК. Данные проточной цитометрии представлены как СИФ: митохондриально-селективных красителей MitoTracker Green (А) и JC-1 (В); АФК-чувствительного зонда CM-H₂DCFDA (Б) и pH-чувствительного лизосомного красителя LysoTracker Green (Г). Среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$), $n = 4$.

* – значимое отличие от показателя при 20% O_2 , $p < 0,05$.

– значимое отличие показателя при «+CBX 0,1% O_2 » от значений при «-CBX 0,1% O_2 », $p < 0,05$.

CBX – карбениксолон

повышался до уровня, характерного для МСК, выращиваемых при 20% O₂, в случае блокирования ЩК (рис. 4Г). В КС от МСК после гипоксической экспозиции независимо от блокирования ЩК значимо снизилось содержание еще одного ангиогенного фактора — моноцитарного хемоаттрактантного белка 3 (MCP-3, monocyte chemoattractant protein 3) (рис. 4Д). Такое изменение секреторного профиля, по-видимому, и определило уменьшение ангиогенной активности КС от МСК с ингибированными ЩК после гипоксического стресса.

ЩК являются одним из самых «высокотехнологичных» видов межклеточной коммуникации, позволяя обмениваться метаболитами и сигнальными молекулами, минуя внеклеточное пространство. Таким образом может осуществ-

ляться модификация активности клеток в пределах популяции [27–28].

Недавно мы показали, что ингибирование ЩК вызывает стресс внутриклеточных компартментов и изменение профиля секретируемых медиаторов, ставшее причиной снижения ангиогенной активности КС от таких МСК в модели ангиогенеза *in ovo* [11]. Мы предположили, что снижение эффективности прямой межклеточной коммуникации может рассматриваться как стрессовая ситуация, приводящая к ухудшению интеграционной целостности клеточной системы МСК в локальных тканевых депо и снижению их проангиогенных свойств. В связи с этим нам представлялось актуальным проверить, как факторы микроокружения модулируют активность МСК при разобщении этих прямых межклеточных коммуникаций.

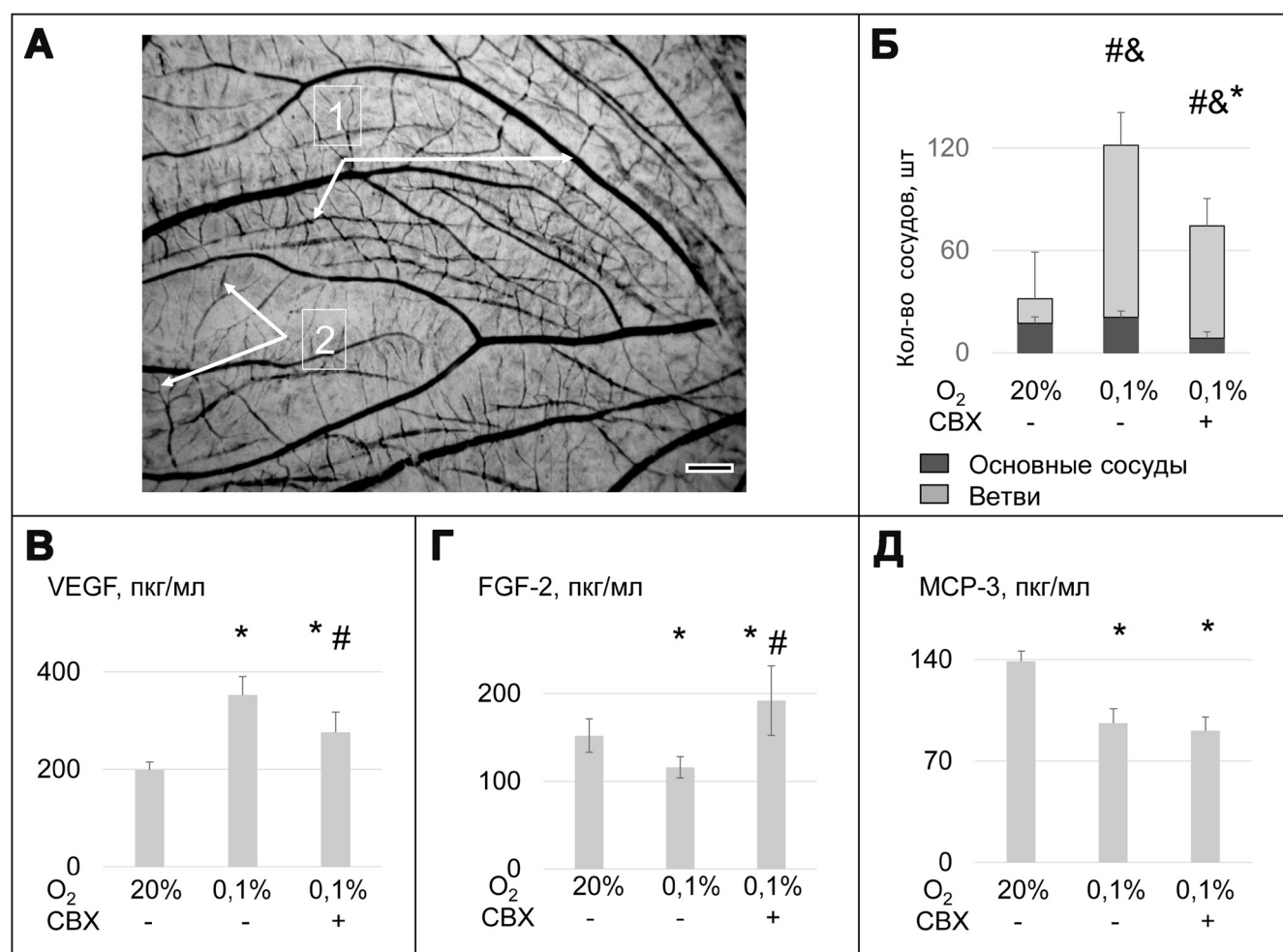


Рис. 4. Влияние короткого гипоксического стресса и блокирования щелевых контактов на ангиогенную активность кондиционированной среды от МСК *in ovo*. А — хориоаллантоисная оболочка (ХАО) эмбриона перепела. Микроскопия в светлом поле. Репрезентативная микрофотография. 1 — основные сосуды; 2 — ветви. Масштабный отрезок — 1 мм. Б — количество сосудов в ХАО. Данные представлены как прирост по сравнению с контролем (полная ростовая среда). CBX — карбенексолон.

— значимое отличие общего количества сосудов от показателя при 20% O₂, $p < 0,05$

& — значимое отличие числа ветвей от показателя при 20% O₂, $p < 0,05$

* — значимое отличие числа ветвей +CBX 0,1% O₂ от показателя при -CBX 0,1% O₂, $p < 0,05$.

В–Д — содержание ангиогенных медиаторов в кондиционированной среде МСК. Данные представлены как $M \pm SD$, $n = 4$. * — $p < 0,05$. CBX — карбенексолон.

* — значимое отличие от показателя при 20% O₂, $p < 0,05$

— значимое отличие показателя при +CBX 0,1% O₂ от показателя при -CBX 0,1% O₂, $p < 0,05$.

Депривация O_2 является обязательным компонентом одного из основных факторов микроокружения в областях повреждения [29]. К настоящему времени уже накоплен значительный массив данных, показывающих, что острый гипоксический стресс может быть индуктором репаративного потенциала МСК, в частности, их «трофической» активности [29–30].

В нашей работе после гипоксического стресса КС от МСК с работающими ЩК значимо стимулировала формирование сети в ХАО. Усиление ангиогенной активности МСК после коротких гипоксических экспозиций является хорошо исследованным феноменом и обуславливается проангиогенным характером профиля растворимых медиаторов [23, 30]. В КС от МСК с работающими ЩК значительно увеличился уровень основного ангиогенного медиатора VEGF, играющего центральную роль в стимуляции пролиферации и миграции ЭК, при этом понизилось содержание FGF-2 и MCP-3, которые стимулируют миграцию МСК. Предположительно с таким изменением профиля хемокинов связан прирост сосудистой сети почти исключительно за счет увеличения числа ветвей [31].

Мы обнаружили, что сам по себе гипоксический стресс может ухудшать работу ЩК, что проявилось в снижении эффективности переноса ЩК-специфического красителя. Тем не менее, сохраняющаяся связь через ЩК, по-видимому, обеспечивала достаточный уровень интеграции, что позволило МСК сохранить свою функциональную активность при ответе на гипоксический стресс.

МСК с заблокированными ЩК оказались менее чувствительными к короткому гипоксическому стрессу, чем МСК, интегрированные в общую сеть. Нарушение щелевых контактов нивелировало позитивный эффект повышения ангиогенного потенциала в МСК после депривации O_2 . Ослабление ангиогенных свойств МСК с заблокированными ЩК подтвердилось меньшим изменением в митохондриальном и лизосомальном компартментах в ответ на гипоксический стресс. Ангиогенные эффекты КС от МСК с заблокированными

ЩК при гипоксии были почти в два раза слабее, чем эффекты КС от МСК, культивируемых при нормоксии, что связано, по-видимому, с различиями в профиле ангиогенных медиаторов: содержание VEGF уменьшилось, а FGF-2 — увеличилось при неизменном уровне MCP-3. Ранее после ингибирования ЩК в стромальных клетках эндометрия было показано снижение продукции VEGF [32]. Известно, что один из механизмов ангиостимулирующего действия VEGF связан с разрушением ЩК между эндотелиальными клетками. Соответственно, уменьшение содержания этого фактора роста может подавлять ангиогенез [33].

В заключение необходимо отметить, что степень функциональной гомотипической интеграции в тканевых депо может играть важную роль в реализации функций МСК как в физиологическом ремоделировании, так и при повреждении тканей. Работающие ЩК увеличивают эффективность клеточной сети, когда клетки реагируют как своего рода синцитий. Это наблюдается в таких высокоинтегрированных системах, как поперечнополосатые скелетные мышцы и миокард. Можно предположить, что сходные ЩК-опосредованные механизмы обеспечивают функционирование сети МСК в локальных тканевых депо. Известно, что такие негативные факторы микроокружения, как гипергликемия [34], повышенный уровень воспалительных медиаторов [12–13, 35] и, как мы показали, короткий гипоксический стресс подавляют коммуникацию через ЩК. Можно полагать, что блокирование коммуникации через ЩК является негативным фактором, нарушающим координацию ответа МСК на действие факторов микроокружения — в частности, гипоксический стресс — и снижающим их функциональную пластичность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00075). Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных, а также с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Паракринная активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и ее особенности в условиях гипоксии. *Физиол. чел.* 2013;39(3):104–113.
2. Murray I.R., Péault B. Q&A: mesenchymal stem cells—where do they come from and is it important? *BMC Biol.* 2015;13:99.
3. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl. Med.* 2017;6(6):1445–1451.
4. Tan L., Liu X., Dou H., Hou Y. Characteristics and regulation of mesenchymal stem cell plasticity

by the microenvironment—specific factors involved in the regulation of MSC plasticity. *Genes Dis.* 2020;9(2):296–309.

5. Буравкова Л.Б., Андреева Е.Р., Григорьев А.И. Роль кислорода как физиологического фактора в проявлении функциональных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека. *Физиол. чел.* 2012;38(4):121–130.
6. Buravkova L.B., Andreeva E.R., Gogvadze V., Zhivotovsky B. Mesenchymal stem cells and hypoxia: where are we? *Mitochondrion.* 2014;19(Part A):105–112.

7. Pulido-Escribano V., Torrecillas-Baena B., Camacho-Cardenosa M., Dorado G., Gálvez-Moreno M.Á., Casado-Díaz A. Role of hypoxia preconditioning in therapeutic potential of mesenchymal stem-cell-derived extracellular vesicles. *World J. Stem Cells*. 2022;14(7):453–472.
8. Antebi B., Rodriguez L.A., Walker K.P., Asher A.M., Kamucheka R.M., Alvarado L., Mohammadipoor A., Cancio L.C. Short-term physiological hypoxia potentiates the therapeutic function of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2018;9(1):265.
9. Ishiuchi N., Nakashima A., Doi S., Yoshida K., Maeda S., Kanai R., Yamada Y., Ike T., Doi T., Kato Y., Masaki T. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):130.
10. Udartseva O.O., Lobanova M.V., Andreeva E.R., Buravkov S.V., Ogneva I.V., Buravkova L.B. Acute hypoxic stress affects migration machinery of tissue O 2-adapted adipose stromal cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7260562.
11. Ездакова М.И., Матвеева Д.К., Андреева Е.Р. Гомотипическая регуляция функциональной активности мультипотентных мезенхимных стромальных клеток: роль щелевых контактов. *Цитология*. 2022;64(6):523–533.
12. Dorshkind K., Green L., Godwin A., Fletcher W.H. Connexin-43-type gap junctions mediate communication between bone marrow stromal cells. *Blood*. 1993;82(1):38–45.
13. Chanson M., Derouette J.P., Roth I., Foglia B., Scerri I., Dudez T., Kwak B.R. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim. Biophys. Acta*. 2005;1711(2):197–207.
14. Danon A., Zeevi-Levin N., Pinkovich D.Y., Michaeli T., Berkovich A., Flugelman M., Eldar Y.C., Rosen M.R., Binah O. Hypoxia causes connexin 43 internalization in neonatal rat ventricular myocytes. *Gen. Physiol. Biophys.* 2010;29(3):222–233.
15. Wu X., Huang W., Luo G., Alain L.A. Hypoxia induces connexin 43 dysregulation by modulating matrix metalloproteinases via MAPK signaling. *Mol. Cell. Biochem.* 2013;384(1–2):155–162.
16. McNair A.J., Wilson K.S., Martin P.E., Welsh D.J., Dempsey Y. Connexin 43 plays a role in proliferation and migration of pulmonary arterial fibroblasts in response to hypoxia. *Pulm. Circ.* 2020;10(3):2045894020937134.
17. Glass B.J., Hu R.G., Phillips A.R., Becker D.L. The action of mimetic peptides on connexins protects fibroblasts from the negative effects of ischemia reperfusion. *Biol. Open*. 2015;4(11):1473–1480.
18. Ездакова М.И., Зорникова К.В., Буравков С.В., Андреева Е.Р. Функциональная активность непродифференцирующихся мезенхимных стромальных клеток, культивируемых в различной плотности. *Клеточные технол. биол. мед.* 2020(4):247–254.
19. Talbot J., Brion R., Lamora A., Mullard M., Morice S., Heymann D., Verrecchia F. Connexin43 intercellular communication drives the early differentiation of human bone marrow stromal cells into osteoblasts. *J. Cell. Physiol.* 2018;233(2):946–957.
20. Udartseva O.O., Zhidkova O.V., Ezdakova M.I., Ogneva I.V., Andreeva E.R., Buravkova L.B., Gollnick S.O. Low-dose photodynamic therapy promotes angiogenic potential and increases immunogenicity of human mesenchymal stromal cells. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2019;199:111596.
21. Andreeva E., Andrianova I., Rylova J., Gornostayeva A., Bobyleva P., Buravkova L. Proinflammatory interleukins' production by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells: the impact of cell culture conditions and cell-to-cell interaction. *Cell Biochem. Funct.* 2015;33(6):386–393.
22. Wiesner M., Berberich O., Hoefner C., Blunk T., Bauer-Kreisel P. Gap junctional intercellular communication in adipose-derived stromal/stem cells is cell density-dependent and positively impacts adipogenic differentiation. *J. Cell. Physiol.* 2018;233(4):3315–3329.
23. Paquet J., Deschepper M., Moya A., Logeart-Avramoglou D., Boisson-Vidal C., Petite H. Oxygen tension regulates human mesenchymal stem cell paracrine functions. *Stem Cells Transl. Med.* 2015;4(7):809–821.
24. Fuhrmann D.C., Brüne B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biol.* 2017;12:208–215.
25. Presley A.D., Fuller K.M., Arriaga E.A. MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003;793(1):141–150.
26. Cottet-Rousselle C., Ronot X., Leverve X., Mayol J.F. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A*. 2011;79(6):405–425.
27. Ездакова М.И., Матвеева Д.К., Буравков С.В., Андреева Е.Р. Роль щелевых контактов во взаимодействии эндотелиальных и стромальных клеток. *Физиол. чел.* 2021;47(3):124–136.
28. Zhu Y. Gap junction-dependent and-independent functions of Connexin43 in biology. *Biology (Basel)*. 2022;11(2):283.
29. Zamorano M., Castillo R.L., Beltran J.F., Herrera L., Farias J.A., Antileo C., Aguilar-Gallardo C., Pessoa A., Calle Y., Farias J.G. Tackling ischemic reperfusion injury with the aid of stem cells and tissue engineering. *Front. Physiol.* 2021;12:705256.
30. Yang Y., Lee E.H., Yang Z. Hypoxia-conditioned mesenchymal stem cells in tissue regeneration application. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2022;28(5):966–977.
31. Blebea J., Vu J.H., Assadnia S., McLaughlin P.J., Atnip R.G., Zagon I.S. Differential effects of vascular growth factors on arterial and venous angiogenesis. *J. Vasc. Surg.* 2002;35(3):532–538.
32. Yu J., Wu J., Bagchi I.C., Bagchi M.K., Sidell N., Taylor R.N. Disruption of gap junctions reduces biomarkers of decidualization and angiogenesis and increases inflammatory mediators in human endometrial stromal cell cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011;344(1–2):25–34.
33. Suarez S., Ballmer-Hofer K. VEGF transiently disrupts gap junctional communication in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 2001;114(Part 6):1229–1235.
34. Muto T., Tien T., Kim D., Sarthy V.P., Roy S. High glucose alters Cx43 expression and gap junction intercellular communication in retinal Müller cells: promotes Müller cell and pericyte apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014;55(7):4327–4337.
35. Duffy H.S., John G.R., Lee S.C., Brosnan C.F., Spray D.C. Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1 β in primary human fetal astrocytes. *J. Neurosci.* 2000;20(23):RC114.

Поступила в редакцию 06.04.2023

После доработки 29.09.2023

Принята в печать 04.10.2023

RESEARCH ARTICLE

The sensitivity of multipotent mesenchymal stromal cells to short-term hypoxic stress *in vitro* depends on the efficiency of homotypic communication through gap junctions

M.I. Ezdakova , D.K. Matveeva , I.V. Andrianova , E.R. Andreeva* 

*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences,
76A Khoroshevskoye shosse, Moscow, 123007, Russia*

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

Gap junctions (GJ) provide metabolic cooperation between cells through the direct exchange of cytoplasmic components. We analyzed the effect of short-term hypoxic stress on the efficiency of communication through the GJs in cultured multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) and characterized the sensitivity of MSCs to short-term hypoxic stress depending on the GJ function. Mitotically inactive MSCs were used in the experiments, in which the GJs were blocked with a specific inhibitor – carbenoxolone. The MSCs were continuously cultured at 20% O₂. Further, MSCs with blocked and working GJs were subjected to hypoxic stress (0.1%, 24 hours). The efficiency of GJ communication was attenuated under hypoxic stress. The combined action of GJ inhibition and hypoxic stress was accompanied by an increase in ROS level as compared to the MSCs after hypoxic stress only. MSCs with blocked GJs were less sensitive to short-term hypoxic stress in comparison with MSCs integrated into the common network through working GJs. It was manifested in attenuation of hypoxia-induced angiogenic activity of MSCs. The angiogenic effects of conditioned medium from the MSCs with blocked GJs were almost twice less, which seems to be related to differences in the angiogenic mediators' profiles: VEGF level decreased and FGF-2 level increased, while the monocyte chemoattractant protein 3 (MCP-3) level was unchanged. Thus, a decrease in the efficiency of direct MSCs-MSCs communication had a negative effect on mostly requested MSCs activity – the ability to induce angiogenesis. We conclude that blocking of GJ communication in MSCs is a negative event that impairs the coordination of MSCs' response to the microenvironmental factors, in particular hypoxic stress, and reduces their functional plasticity.

Keywords: *multipotent mesenchymal stromal cells, homotypic gap junctions, inhibitor, short-term hypoxic stress, intracellular compartments, migration, soluble mediators, angiogenesis in ovo*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 20-015-00075.

Сведения об авторах

Ездакова Мария Игоревна — канд. биол. наук, науч. сотр. ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: ezdakova.mi@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9995-416X>

Матвеева Диана Константиновна — аспирантка, мл. науч. сотр. ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: matveeva.dajana@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1386-2836>

Андрианова Ирина Вячеславовна — канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: irandrianova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4986-0920>

Андреева Елена Ромуальдовна — докт. биол. наук., вед. науч. сотр. ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: andreeva1564@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1000-5804>