
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**АКТИВИРОВАННЫЙ ЭНДОТЕЛИЙ СТИМУЛИРУЕТ АКТИВНОСТЬ
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК
ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И КОРОТКОМ ГИПОКСИЧЕСКОМ
СТРЕССЕ *IN VITRO***

© 2024 г. О. В. Жидкова^{1,*}, Е. Р. Андреева^{1,**}, Л. Б. Буравкова^{1,***}

¹*Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

*E-mail: flain-fish@yandex.ru

**E-mail: andreeva1564@gmail.com

*** E-mail: buravkova@imbp.ru

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

После доработки 12.12.2023 г.

Принята к публикации 13.12.2023 г.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) применяются для дополнительной терапии ишемических и воспалительных заболеваний. При системном введении трансмиграция МСК в ткани-мишени сопровождается взаимодействием с активированными эндотелиальными клетками (ЭК), выстилающими сосуды в участках повреждений. В настоящей работе изучали эффекты активированных ФНО- α эндотелиальных клеток на активность МСК при гипоксии разной степени выраженности. Для этого использовали модель краткосрочного контактного сокультивирования МСК и предварительно активированных ФНО- α эндотелиальных клеток. После взаимодействия с активированными ЭК МСК сохраняли свой стромальный фенотип, потенциал к мультилинейной дифференцировке. В то же время выявлено изменение экспрессии молекул межклеточного взаимодействия, которые участвуют в формировании контактов МСК с другими клетками, матриксом, а также регулируют деградацию внеклеточного матрикса (ВКМ) и клеточную миграцию. Кроме того, кондиционированная среда от активированного эндотелия увеличивала направленную и ненаправленную миграцию МСК. Взаимодействие усиливало паракринный ответ МСК и активированных ЭК за счет увеличения транскрипции и продукции ИЛ-6, ИЛ-8. В совокупности эти данные указывают на то, что краткосрочное взаимодействие с активированными ЭК способствует формированию миграционного фенотипа МСК, а также увеличивает продукцию плейотропных цитокинов и протеаз/ингибиторов протеаз, которые регулируют процессы репарации и ремоделирования ткани. При этом по сравнению с физиологическими для МСК условиями (5% O₂) острый гипоксический стресс (0.1% O₂, 24 ч) ослаблял стимулирующее действие эндотелия на МСК.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, эндотелиальные клетки, гипоксия, провоспалительная активация, сокультивирование

DOI: 10.31857/S0869813924030074, **EDN:** CPQDLR

ВВЕДЕНИЕ

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) представляют собой клетки, основными функциями которых считаются поддержание гомеостаза и репарация тканей как

путем дифференцировки в различные клеточные типы, так и за счет секреции факторов роста и цитокинов. Благодаря иммуноуклончивости для терапевтических целей можно использовать как аутологичные, так и аллогенные клетки [1, 2]. В настоящее время в ряде стран одобрено клиническое применение препаратов на основе МСК для дополнительной терапии различных заболеваний [2–4].

На функционирование МСК существенным образом влияет концентрация O_2 в окружающих тканях. МСК располагаются в тканях периваскулярно, в условиях «физиологической» гипоксии (от 3 до 10% O_2) [5, 6]. Культивирование МСК в условиях, близких к «физиологической» гипоксии, модулирует их важнейшие свойства, что способствует поддержанию их малодифференцированного состояния. *In vitro* продемонстрировано, что при 5% O_2 в популяции МСК выявляется больше клеток, способных давать клоны – колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-ф) при лимитирующей низкой плотности посадки. При стандартной плотности культивирования такие МСК быстрее пролиферируют, менее чувствительны к остео- и адипогенным дифференцировочным стимулам [5, 7].

С другой стороны, значительная депривация O_2 и увеличение содержания провоспалительных медиаторов могут выступать в качестве стимулов для вовлечения МСК в репаративное ремоделирование тканей. Показано, что краткосрочная депривация O_2 (1–72 ч, < 1% O_2) приводит к метаболическим изменениям, таким как усиление гликолиза [5, 8, 9], наблюдается реорганизация цитоскелета, стимуляция миграции [10, 11]. Кроме того, гипоксический стресс повышает секрецию паракринных факторов, которые оказывают трофическое действие на ткань, регулируя активность других клеток [10, 12, 13]. Установлено, что адаптивные изменения функциональных свойств МСК в ответ на гипоксический стресс могут быть обусловлены активацией HIF-1 α -зависимого сигнального пути [8, 14, 15].

Ряд доклинических и клинических исследований продемонстрировал, что применение МСК может улучшать прогноз при различных заболеваниях [16–19]. Показано, что после системной трансфузии МСК частично задерживаются в легких, что ограничивает попадание в другие ткани [20, 21]. Однако терапевтический эффект обусловлен тем, что циркулирующие по кровеносной системе МСК активно мигрируют через эндотелиальную стенку сосуда в поврежденный орган, клетки которого продуцируют медиаторы с хемотактическим действием [20–24]. В связи с этим внутрисосудистое введение МСК часто используется как метод доставки клеток в органы-мишени для терапевтических целей. Воспалительные цитокины (ФНО- α , IFN γ , интерлейкины и др.) не только служат хемоаттрактантами для МСК, но и активируют эпителиальные клетки (ЭК) сосудистой стенки. Активированные ЭК изменяют профиль продуцируемых растворимых медиаторов, а также экспрессируют молекулы адгезии, что необходимо для экстравазации МСК.

Конечные свойства МСК, используемых для терапии, зависят от параметров микроокружения, в которое они попадут. По мере миграции в область повреждения МСК столкнутся с активированными ЭК и гипоксией разной степени выраженности. Известно, что концентрация O_2 в среде влияет на свойства МСК, однако неизвестно, как изменится ответ при взаимодействии с ЭК. Хотя миграция МСК из сосудистого русла в ткань занимает несколько часов [19, 25, 26], даже непродолжительный контакт с эндотелием может повлиять на репаративные свойства стромальных клеток.

Известно, что взаимодействие *in vitro* МСК и ЭК в течение 24–72 ч индуцирует экспрессию генов миогенной дифференцировки и способствует увеличению продукции ИЛ-6 [27–29]. Эти данные указывают на изменения функциональных свойств МСК, важных для участия в репарации ткани.

Цель настоящей работы заключалась в изучении эффектов провоспалительно активированных ЭК на МСК в условиях гипоксии разной степени выраженности.

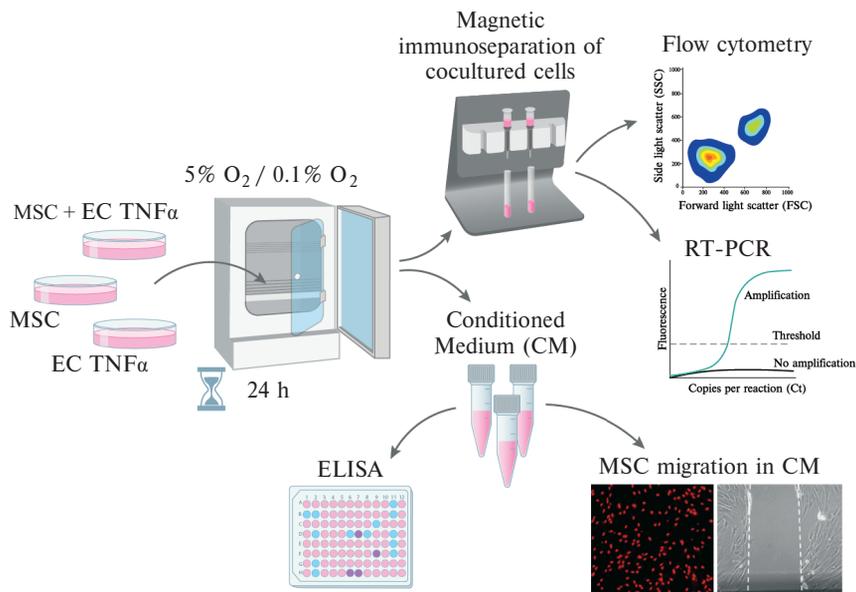


Рис. 1. Схема эксперимента по оценке эффектов взаимодействия мезенхимальных стромальных и эндотелиальных клеток.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение и культивирование МСК

Образцы МСК из жировой ткани человека были получены из коллекции Лаборатории клеточной физиологии Института медико-биологических проблем РАН. Культивирование МСК проводили на чашках Петри, используя полную ростовую среду α -MEM (Gibco, США), с добавлением 10% ФТС (HyClone, США), 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 5% O_2 в CO_2 -инкубаторе (Sanyo, Япония), как описано ранее [30]. В экспериментах использовали клетки 3–6 пассажей.

Культивирование ЭК

ЭК из вены пупочного канатика были предоставлены Банком пуповинной крови Криоцентра (Москва, Россия) в рамках научного соглашения. ЭК культивировали в среде 199 с 2 мМ глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 25 мМ HEPES (Gibco, Life Technologies, США), 50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% ФТС (HyClone, США), 200 мкг/мл фактора роста эндотелиальных клеток (Sigma-Aldrich, США) при 20% O_2 в CO_2 -инкубаторе (Sanyo, Япония). После пассирования клетки культивировали на чашках Петри, покрытых 0.2%-ным раствором желатина в полной ростовой среде 199. В экспериментах использовали ЭК 3–5 пассажей. ЭК активировали с использованием ФНО- α (10 нг/мл) (Abcam, США) в течение 24 ч.

Схема эксперимента

Для оценки эффектов активированных ФНО- α ЭК на МСК при тканевых значениях O_2 использовали модель контактного сокультивирования в соответствии со схемой (рис. 1). ЭК активировали в состоянии предмонослоя, добавляя среду, содержащую 10 нг/мл ФНО- α на 24 ч. Далее клетки отмывали от среды с ФНО- α и добавляли су-

спензию МСК к активированным ЭК в соотношении 1:1. Культуральную среду меняли во всех чашках на свежую (α -МЕМ и 199 в соотношении 1:1) и инкубировали 24 ч. После этого сокультуры и монокультуры клеток трипсинизировали и анализировали экспрессию молекул адгезии методом проточной цитометрии. Клеточные сокультуры разделяли методом иммуносепарации с использованием микрочастиц, несущих CD31 антитела (Miltenyi biotec, США).

Проточная цитометрия

МСК были охарактеризованы по экспрессии минимального набора поверхностных маркеров в соответствии с рекомендациями Международного общества клеточной терапии [31]. Для анализа использовали первичные мышинные моноклональные антитела: CD45, CD73, CD90 и CD105 (IgG1) (Immunotech, Франция). В ЭК оценивали экспрессию ряда эндотелиальных маркеров CD144, CD106, CD62E, CD54 (Immunotech, Франция). В качестве отрицательного контроля (автофлуоресценция) использовали FITC- или PE-конъюгированные изотипические антитела IgG1 мыши (Immunotech, Франция).

Для оценки жизнеспособности клеток моно- и сокультуры отделяли с помощью трипсина и окрашивали с использованием набора Annexin V – FITC kit (Beckman Coulter, Франция).

Содержание активных форм кислорода (АФК) в клетках определяли с помощью красителя H_2DCFDA (Sigma, США) (ex/em ~492-495/517-527 нм) в концентрации 10 мкМ. Продукцию оксида азота (OA) определяли после окрашивания клеток 5мкМ раствором DAF-FM Diacetate (Sigma, США) (ex/em ~495/515 нм). Инкубация клеток в среде, содержащей зонд, проводилась 30 мин при 37°C в условиях 5 или 0.1% O_2 . Далее клетки открепляли при помощи трипсина и анализировали на проточном цитофлуориметре Accuri C6 (BD Biosciences, США).

Подсчет КОЕ-ф

Колониеобразующая активность МСК оценивалась после посева клеток в низкой плотности на чашки Петри (100 клеток на чашку) диаметром 35 мм. Чашки инкубировали 14 дней, далее образцы фиксировали и окрашивали в течение 5 мин 0.5%-ным раствором кристалл-виолета в метаноле. Чашки с фиксированными клетками высушивали, затем окрашенные колонии подсчитывали.

Направленная миграция МСК

Для определения скорости направленной миграции МСК использовали модифицированную камеру Бойдена, где в качестве нижней камеры выступает ячейка 24-луночного планшета, а верхней камеры – ячейка-вставка (трансвелл, Corning) с полупроницаемой мембраной. В лунки планшета добавляли кондиционированную среду от ЭК, контролем служила ростовая среда для культивирования эндотелия. 20 тыс. клеток помещали в трансвеллы, далее планшеты инкубировали 24 ч в CO_2 -инкубаторе при 20% O_2 . Прикрепившиеся к мембране МСК фиксировали 4%-ным параформальдегидом и окрашивали 30%-ным раствором йодида пропидия в фосфатном буферном растворе. Трансвелл помещали на предметное стекло, далее фотографировали 5 случайных полей зрения в режиме флуоресцентной микроскопии. На микрофотографиях с помощью программы ImageJ (Wayne Rasband, США) подсчитывали количество ядер, окрашенных йодидом пропидия.

Ненаправленная миграция МСК в модели «рана»

Скорость ненаправленной миграции МСК определяли в модели «рана». МСК выращивали до состояния монослоя, наносили «рану» путем механического повреждения и меняли среду для культивирования на кондиционированную среду от ЭК. Далее

чашки инкубировали 24 ч при 20% O_2 . На дне чашки Петри с МСК обозначали 5 случайных участков для фотографирования «раны». Состояние «раны» фотографировали сразу после нанесения механического повреждения (точка 0 ч) и через 24 ч с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-U. С использованием программы NIS-elements AR версии 3.21 (Nikon, Германия) подсчитывали площадь раны в нулевой точке и через 24 ч, по этим показателям оценивали подвижность МСК.

Определение концентрации цитокинов в среде культивирования

Паракринный ответ МСК и ЭК в монокультурах и после взаимодействия изучали путем анализа уровня цитокинов в кондиционированной среде методом иммуоферментного анализа (ИФА). После 72 ч сокультивирования кондиционированную среду собирали, затем определяли концентрации медиаторов с использованием наборов для ИФА IL-6, IL-8 и набора реагентов BD OptEIA™ (BD, США) в соответствии с инструкцией производителя.

ОТ-ПЦР

Для оценки экспрессии генов *RUNX2*, *SOX9*, *PPAR γ* , *IL6*, *IL8* клеточные культуры трипсинизировали. Сокультуру МСК и ЭК разделяли путем магнитной иммуносепарации. Далее выделяли мРНК с использованием Trizol (Qiagen, США). С использованием Quantitech Reverse Transcription Kit (Qiagen, США) на матрице мРНК синтезировали кДНК. Экспрессию генов производили методом ОТ-ПЦР на амплификаторе Mx3000P (Stratagene, США), используя праймеры к соответствующим генам (Qiagen). Для определения относительного значения изменения уровня экспрессии целевых генов в качестве контрольного гена использовали значения экспрессии гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (*HPRT*), транскрипция которого постоянна в различном уровне O_2 . Кратность изменения экспрессии генов рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (где Ct – номер порогового цикла).

Анализ профиля протеаз/ингибиторов, продуцируемых МСК

Для оценки белкового профиля МСК после сокультивирования с ЭК определяли содержание соответствующих ферментов в лизатах МСК с использованием наборов Human Protease Array/Human Inhibitor Array Kit (R&D Systems, США) в соответствии с инструкцией производителя. Детекцию хемилюминесцентного сигнала проводили на приборе ChemiDoc MP (Biorad, США).

Статистический анализ

Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. В каждой группе сравнения количество образцов $n \geq 3$. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

МСК в условиях депривации O_2

Прежде чем проводить сокультивирование с ЭК, в МСК охарактеризовали жизнеспособность, иммунофенотип и экспрессию генов, кодирующих белки, связанные с дифференцировкой, и продукцию плейотропных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8.

МСК как при 5, так и при 0.1% O_2 соответствовали минимальным критериям Общества по клеточной терапии [31]. Клетки прикреплялись к поверхности культурального пластика, а также характеризовались фибробластоподобной формой (рис. 2а). Кроме

Таблица 1. Экспрессия стромальных маркеров МСК

Антиген	Условия культивирования	
	5% O ₂	0.1% O ₂ , 24 ч
CD90	93.2–98.8 (96.0)	97.3–98.8 (98.1)
CD73	99.0–99.5 (99.3)	99.0–99.9 (99.5)
CD105	97.6–99.3 (98.5)	98.2–99.5 (98.9)
CD45	0.5–1.0 (0.8)	0.7–1.0 (0.9)

Данные представлены как минимальное – максимальное значение и медиана (в скобках), $n \geq 4$.

того, независимо от уровня O₂ МСК экспрессировали стромальные маркеры (CD90, CD73, CD105) и не экспрессировали маркер гемопоэтических клеток (CD45) (табл. 1).

Независимо от содержания O₂ в среде культивирования МСК имели высокую жизнеспособность. При 5% O₂ жизнеспособность клеток составила 95.3–95.7%. Клетки в состоянии раннего апоптоза составили 1.3–2.1%, в состоянии позднего апоптоза – 1.2–1.6% от общего количества МСК в образцах. В условиях гипоксического стресса (0.1% O₂) МСК также демонстрировали высокий уровень жизнеспособности (95.4–96.8%), при этом доля клеток в состоянии раннего и позднего апоптоза составила 1.6–2.2% и 1.2–1.4% соответственно (рис. 2b). После воздействия гипоксического стресса МСК характеризовались в 1.3 раза более высокой продукцией АФК (H₂O₂) по сравнению с клетками, культивируемыми при 5% O₂ (рис. 2c). В условиях гипоксического стресса и при 5% O₂ уровень транскрипции генов-регуляторов дифференцировки *RUNX2*, *SOX9*, *PPAR γ* не отличался (рис. 2d). Оценка паракринной активности не выявила отличий в продукции ИЛ-8, однако продемонстрировала снижение концентрации ИЛ-6 в кондиционированной среде от МСК при действии гипоксического стресса (рис. 2e).

ЭК при активации ФНО- α и депривации O₂

Также мы оценили влияние ФНО- α и депривации O₂ на экспрессию молекул межклеточного взаимодействия, жизнеспособность и продукцию активных форм кислорода в ЭК.

Неактивированные ЭК из пупочной вены демонстрировали эндотелиальный фенотип (рис. 3a). Клетки имели округлую и полигональную форму, формировали группы по 5–10 клеток при низкой плотности, сохраняли исходную жизнеспособность, экспрессировали высокий уровень VE-кадгерина и характеризовались низким уровнем VCAM-1, ICAM-1, E-селектина (рис. 3b; табл. 2).

Активированные ЭК были более вытянутыми (рис. 3a), при этом доля жизнеспособных клеток составила 88.1–95.1% при 5% O₂ и 91.6–93.2% при 0.1% O₂, что было сопоставимо с активированными ЭК при 20% O₂ (90.3–96.1%) (рис. 3b; табл. 2). Активация при различном содержании O₂ вызывала увеличение экспрессии маркера провоспалительной активации ICAM-1 в эндотелиальных клетках. Индукция экспрессии H₂O₂ наблюдалась при действии гипоксического стресса. Сочетанное действие ФНО- α и гипоксического стресса вызывало повышение уровня не только H₂O₂, но и NO (табл. 2).

Взаимодействие МСК и активированных ЭК при депривации O₂ различной степени

После взаимодействия с активированными ЭК при 5 и 0.1% O₂ МСК сохраняли стромальный фенотип: имели высокую экспрессию поверхностных стромальных мар-

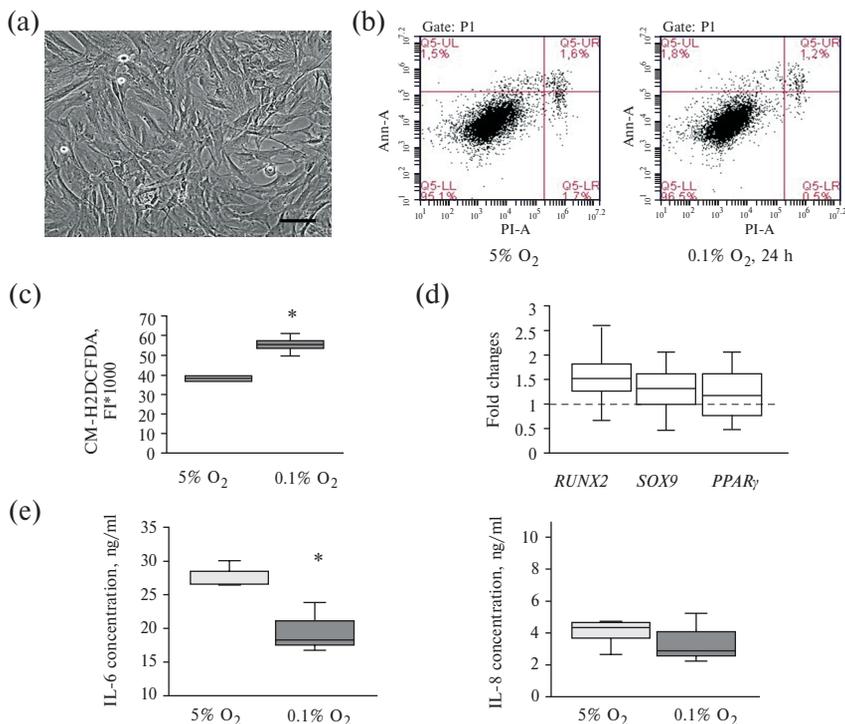


Рис. 2. Характеристика культивируемых МСК при различном содержании O₂. (a) – репрезентативная микрофотография культивируемых МСК при 5% O₂, масштабный отрезок 100 мкм; (b) – характеристика жизнеспособности МСК с применением флуоресцентных красителей аннексин/йодид пропидия (Ann/PI); представлены репрезентативные гистограммы (нижний левый квадрант – популяция живых клеток, верхний левый квадрант – клетки в состоянии раннего апоптоза, правый верхний квадрант – клетки в состоянии позднего апоптоза, нижний правый квадрант – клетки в состоянии некроза); (c) – продукция АДФК; (d) – экспрессия генов-регуляторов дифференцировки в МСК, представлена кратность изменения экспрессии генов по сравнению с монокультурой МСК при 5% O₂; (e) – продукция ИЛ-6, ИЛ-8 в МСК. На графиках представлена медиана, межквартильный разброс, максимальные и минимальные значения, n ≥ 4, * – p < 0.05 по сравнению с монокультурой МСК, культивируемых при 5% O₂.

кероv CD90, CD73, CD105 и не экспрессировали маркер CD45, характерный для гемопоэтических клеток (табл. 3), а также сохраняли исходное число КОЕ-ф (табл. 4).

Морфологический анализ показал, что через 24 ч после добавления МСК к эндотелиальному монослою наблюдалось распределение стромальных клеток между группами (кластерами) ЭК. Характер распределения клеток в сокультурах был схожим при различном уровне O₂ в среде (рис. 4а).

Для оценки влияния ЭК на мультилинейный дифференцировочный потенциал в МСК определяли уровень транскрипции генов-регуляторов хондрогенной (*SOX9*), остеогенной (*RUNX2*) и адипогенной (*PPARγ*) дифференцировок. После сокультивирования с активированными ЭК в МСК снижался уровень мРНК *SOX9* в условиях «физиологической» гипоксии в 2.5 раза, а после гипоксического стресса в 2 раза (рис. 4б, с). Экспрессия *RUNX2*, *PPARγ* существенно не изменялась.

Краткосрочное взаимодействие с активированным эндотелием приводило к значимому увеличению количества МСК, которые экспрессировали интегрин α1, αVβ3, ICAM-1 и снижали количество клеток, экспрессирующих интегрин α4 и N-кадгерин

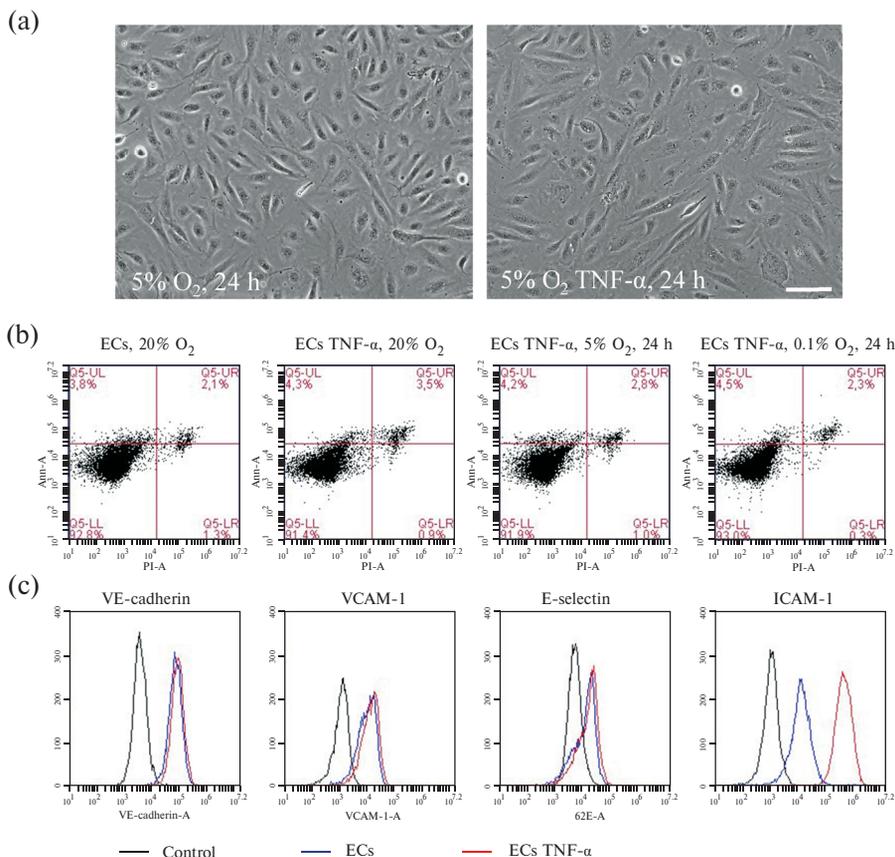


Рис. 3. Влияние активации ФНО-α и депривации O₂ на ЭК при различном уровне O₂. (a) – интактные и ФНО-α активированные ЭК после краткосрочного культивирования при 5% O₂, световая микроскопия, репрезентативные микрофотографии ЭК при 5% O₂, масштабный отрезок 100 мкм; (b) – жизнеспособность ЭК, представлены репрезентативные гистограммы (нижний левый квадрант – популяция живых клеток, верхний левый квадрант – клетки в состоянии раннего апоптоза, правый верхний квадрант – клетки в состоянии позднего апоптоза, нижний правый квадрант – клетки в состоянии некроза); (c) – экспрессия молекул адгезии на ЭК при различном уровне O₂, репрезентативные гистограммы при 5% O₂. ECs – интактные ЭК, ECs TNF-α – активированные ЭК, control – клетки, окрашенные изотипическими IgG1 антителами.

при «физиологической» гипоксии и при гипоксическом стрессе. Также изменялась средняя интенсивность флуоресценции окрашенных антителами интегринов α1, αVβ3, α4, ICAM-1 и N-кадгерина. В условиях гипоксического стресса было отмечено возрастание средней интенсивности флуоресценции интегрин α5 на МСК в моно- и сокультуре по сравнению с культивируемыми клетками при «физиологической» гипоксии (рис. 5). Таким образом, после сокультивирования с ЭК при гипоксии разной степени (5, 0.1% O₂) наблюдалось изменение экспрессии молекул адгезии МСК, участвующих в образовании межклеточных контактов и контактов с компонентами внеклеточного матрикса.

Секреция паракринных факторов МСК и активированных ФНО-α ЭК изменялась при взаимодействии, о чем свидетельствовало увеличение концентрации плеiotропных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 в среде от сокультур. В условиях физиологической гипоксии уровень ИЛ-6 в кондиционированной среде вырос в 3.4 раза, а уровень ИЛ-8 – в 6.5

Таблица 2. Характеристика культивируемых ЭК в условиях депривации O₂ и активации ФНО-α

Единицы измерения	Показатель	Концентрация O ₂				
		20%	20→5%, 24 ч		20→0.1%, 24 ч	
		ЭК	ЭК	ЭК+ФНО	ЭК	ЭК+ФНО
% клеток	An/PI	90.0–94.3 (92.1)	88.6–93.4 (91.0)	85.0–90.0 (87.6)	91.1–95.8 (93.4)	90.0–93.0 (92.3)
ИФ*10 ³	VE-кадгерин	49.7–81.9 (51.7)	27.1–117.3 (55.5)	30.0–117.1 (54.0)	34.2–119.4 (41.2)	29.7–111.3 (49.8)
	VCAM-1	9.3–26.9 (17.3)	11.1–20.1 (15.1)	23.0–34.5 (28.3)	12.0–27.7 (19.8)	18.4–26.7 (18.6)
	ICAM-1	28.0–36.0 (31.7)	28.0–36.0 (31.7)	517.0–699.0 (620.1) *	27.8–28.8 (28.3)	578.8–755.9 (668.3) #
	E-селектин	18.8–25.4 (22.0)	25.5–30.1 (27.3)	30.0–32.3 (31.4)	20.9–23.2 (22.9)	27.3–29.6 (27.8)
АФК, отн. ед.	H ₂ O ₂	1	0.4–1.3 (0.8)	1.6–2.7 (2.2)	1.7–3.0 (2.4)*	5.1–8.7 (6.9) #
	NO	1	0.5–1.1 (0.9)	0.9–1.9 (1.4)	0.9–2.2 (1.7)	2.5–2.6 (2.5) #

ЭК – монокультура интактных ЭК, ЭК ФНО – ФНО-α активированные ЭК. В таблице представлены минимальное, максимальное значение и медиана (в скобках), n ≥ 3. В связи с отличиями в базовых значениях интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных зондом для детекции NO и H₂O₂, в таблице этот показатель представлен в относительных единицах по отношению к флуоресценции ЭК, постоянно культивируемых при 20% O₂. * – p < 0.05 по сравнению с ЭК 5% O₂, # – p < 0.05 по сравнению с ЭК 0.1% O₂. ИФ*10³ – интенсивность флуоресценции на клетку.

Таблица 3. Характеристика иммунофенотипа МСК после взаимодействия с активированными ЭК

Концентрация O ₂	CD90	CD73	CD105	CD44	CD45
5%	92.7–98.0 (95.4)	97.9–99.1 (98.5)	97.4–99.2 (98.3)	97.0–100.0 (99.9)	0.9–1.1 (1.0)
0.1%	93.2–98.0 (95.6)	96.0–99.0 (96.1)	98.3–99.2 (98.8)	99.0–100.0 (99.9)	0.2–1.5 (1.0)

Указана доля положительно окрашенных клеток. Данные представлены как минимальное – максимальное значение и медиана (в скобках), n ≥ 4.

Таблица 4. Колониеобразующая способность МСК после взаимодействия с активированными ЭК

Параметр	МСК 5% O ₂	МСК+ЭК ФНО 5% O ₂	МСК 0.1% O ₂	МСК+ЭК ФНО 0.1% O ₂
КОЕ-ф	190–250 (205)	180–280 (200)	100–250 (170)	150–280 (215)

Указано количество колоний, образованных КОЕ-ф/1000 МСК. Данные представлены как минимальное – максимальное значение и медиана (в скобках), n ≥ 3. МСК – монокультура МСК, МСК+ЭК ФНО – МСК после 24 ч сокультивирования с активированными ФНО-α ЭК.

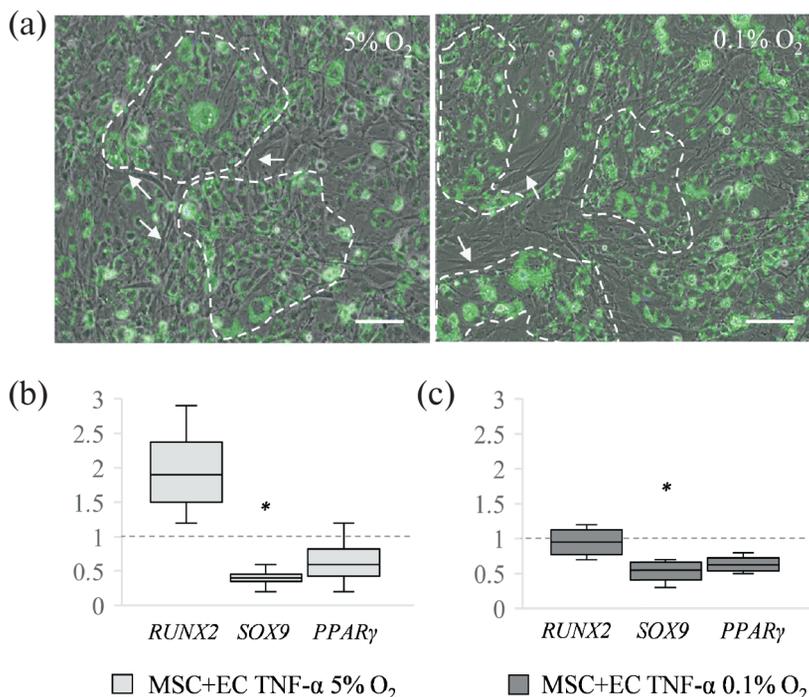


Рис. 4. Морфология и транскрипционный профиль МСК после взаимодействия с ЭК активированными ФНО- α . (a) – вид сокультуры через 24 ч при 5 и 0.1% O₂. Представлены репрезентативные изображения, полученные путем совмещения микрофотографий, сделанных в режиме фазового контраста и флуоресценции, эндотелиальные клетки окрашены флуоресцентным красителем PKH27. Масштабный отрезок равен 100 мкм. Стрелками указаны МСК; (b), (c) – экспрессия дифференцировочных генов МСК после взаимодействия с ЭК, активированными при пониженном содержании O₂. На графиках показана кратность изменения экспрессии генов в МСК после сокультивирования по сравнению с монокультурой МСК (пунктирная линия) в тех же условиях. Данные представлены как медиана, межквартильный разброс, максимальные и минимальные значения, $n \geq 3$. * – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК, культивируемых при 5% O₂. MSC+EC TNF- α – МСК после 24 ч сокультивирования с активированными ФНО- α ЭК.

раз по сравнению со средой от монокультуры МСК. После действия краткосрочного гипоксического стресса продукция ИЛ-6 и ИЛ-8 в сокультуре увеличилась в 3.9 и в 8.7 раз соответственно по сравнению с монокультурой МСК (рис. 6a, b). Анализ экспрессии генов цитокинов в МСК и ЭК показал, что сокультивирование индуцировало возрастание уровня мРНК *IL6*, *IL8* в МСК и в активированных ЭК. Наблюдаемое возрастание экспрессии *IL8* в клетках после сокультивирования было более выраженным при действии гипоксического стресса (0.1% O₂, 24 ч). В этих же условиях возрастание экспрессии *IL6* в обоих типах клеток было менее выраженным (рис. 6c, d). Таким образом, сокультивирование индуцировало как транскрипцию генов *IL6* и *IL8*, так и продукцию этих цитокинов. Однако после гипоксического стресса в МСК и ЭК индукция транскрипции *IL8* усиливалась, а индукция *IL6* была не такой выраженной как при 5% O₂.

МСК способны мигрировать в ткани благодаря способности отвечать на хемотактические стимулы, продуцируемые находящимися там клетками. Для оценки влияния активированных ЭК на подвижность МСК мы проанализировали эффективность ненаправленной (в модели рана) и направленной (в системе трансвелл) миграции клеток в кондиционированной среде. При различном содержании кислорода

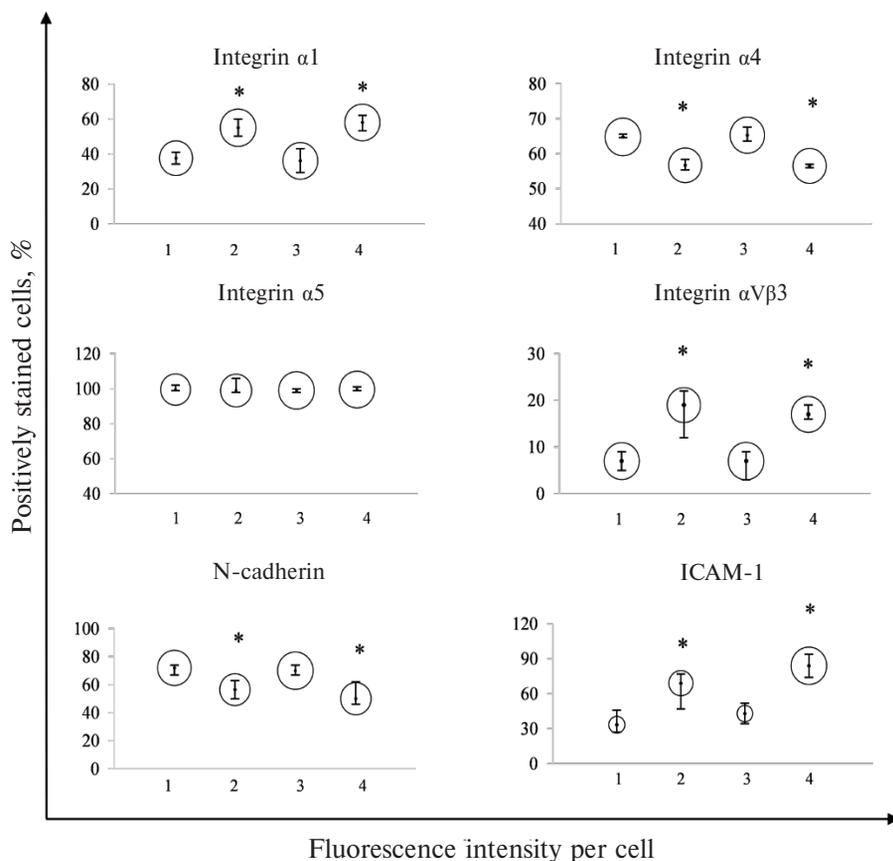


Рис. 5. Экспрессия молекул межклеточного взаимодействия МСК после сокультивирования с ФНО- α активированными ЭК. На графиках представлена доля положительно окрашенных МСК до и после взаимодействия с активированными ЭК (медиана, минимальное и максимальное значение). На этих же графиках размер пузырьков соответствует значению медианы интенсивности флуоресценции окрашенных клеток, $n \geq 3$. * – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК в тех же условиях культивирования. 1 – МСК 5% O_2 , 2 – МСК после сокультивирования с ЭК 5% O_2 , 3 – МСК 0.1% O_2 , 4 – МСК после сокультивирования с ЭК 0.1% O_2 .

(5 и 0.1% O_2) среда, полученная от активированных ЭК, по сравнению с обычной средой культивирования увеличивала процент закрытия площади экспериментальной «раны» (рис. 7а, б). Кроме того, количество клеток, мигрировавших через трансвелл в кондиционированной среде, в 2.5–3 раза превышало количество МСК, которые мигрировали в ростовой среде (рис. 7с, d). Таким образом, кондиционированная среда, полученная после культивирования активированных ЭК при гипоксии разной степени выраженности, увеличивала скорость направленной и ненаправленной миграции МСК.

МСК могут участвовать в ремоделировании внеклеточного матрикса за счет продукции различных протеаз/ингибиторов протеаз. В условиях повреждения и провоспалительного микроокружения это свойство необходимо для вовлечения клеток в процессы репарации ткани [32–35]. Были определены концентрации 32 протеаз, таких как металлоэндопептидазы, протеиназы ADAMTS, катепсины, калликреиновые протеазы, металлопротеазы и урокиназы (рис. 8, табл. 5). Также были проанализированы уровни 32 белков, обладающих регуляторным действием в отношении протеаз: цистати-

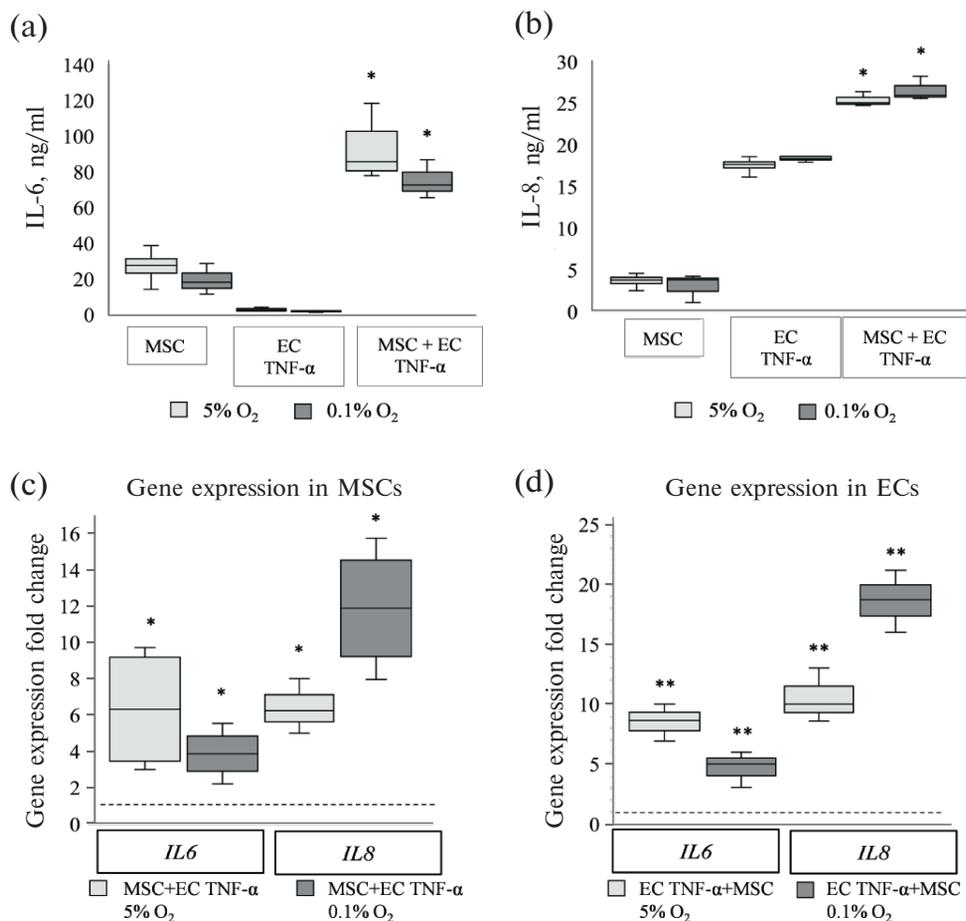


Рис. 6. Изменение паракринной активности ЭК и МСК после взаимодействия при пониженном содержании O₂. (a) – концентрация ИЛ-6 в среде от моно- и сокультур МСК и активированных ЭК; (b) – концентрация ИЛ-8 в среде от моно- и сокультур МСК и активированных ЭК; (c) – изменение экспрессии генов *IL6* и *IL8* в МСК; (d) – изменение экспрессии генов *IL6* и *IL8* в ЭК. На графиках представлена кратность отличий экспрессии генов интереса в МСК (c) и ЭК (d) после взаимодействия по сравнению с монокультурой клеток (пунктирная линия) в тех же условиях культивирования. Данные представлены как медиана, межквартильный разброс, максимальные и минимальные значения, $n = 3$, * – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК в тех же условиях культивирования. ** – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой ЭК в тех же условиях культивирования. MSC+EC TNF- α – МСК после взаимодействия с активированными ЭК. EC TNF- α +MSC – активированные ЭК после взаимодействия с МСК.

нов, ингибиторов сериновых протеаз (HAI), индуктора матричных металлопротеаз (EMMPRIN), серпинов, белков семейства Testican, Latexin, ингибиторов тканевого фактора, тканевых ингибиторов металлопротеаз (табл. 6).

Наши данные показали, что сокультивирование с активированными ЭК вызывало увеличение продукции протеаз, которые участвуют в деградации ВКМ и миграции клеток (ADAM8, Cathepsin B, Cathepsin V, MMP-2, ADAM9, ADAMTS1, Cathepsin A, Cathepsin C, Cathepsin D, Cathepsin X/Z/P, MMP-1, MMP-3, MMP-10, Urokinase), в 1.5 и более раз (табл. 5). В пользу потенциального увеличения протеолитической активности МСК также свидетельствует снижение уровня ингибитора матричных металло-

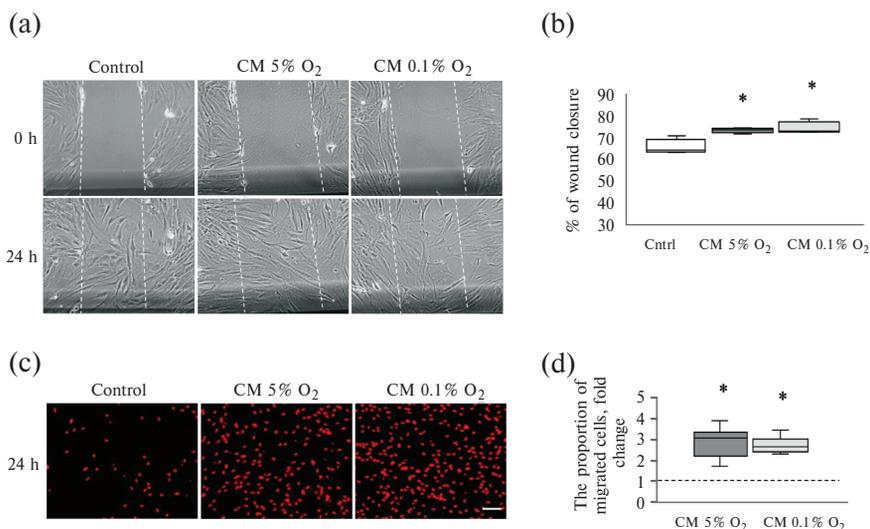


Рис. 7. Паракринное влияние ЭК на подвижность МСК. (а) – ненаправленная миграция МСК в модели «рана» в кондиционированной среде от активированных ЭК. Репрезентативные микрофотографии сразу после нанесения «раны» (0 ч) и через сутки (24 ч); (б) – площадь закрытия раны. На графике площадь закрытия представлена в % относительно изначальной площади раны; (с) – направленная миграция МСК через мембрану трансвелл в кондиционированной среде от активированных ЭК. Репрезентативные микрофотографии, сделанные через 24 ч инкубации клеток в лунках планшетов; (д) – на графике представлена доля клеток, мигрировавших за 24 ч (соотношение клеток, мигрировавших в кондиционированной среде от ЭК, по сравнению с количеством клеток, мигрировавших в ростовой среде). Данные представлены как медиана, межквартильный разброс, максимальные и минимальные значения, $n = 3$. * – $p < 0.05$ по сравнению с количеством клеток, мигрировавших в ростовой среде (Cntrl). CM 5% O₂ – кондиционированная среда от активированных ЭК, культивируемых при 5% O₂. CM 0.1% O₂ – кондиционированная среда от активированных ЭК, культивируемых при 0.1% O₂.

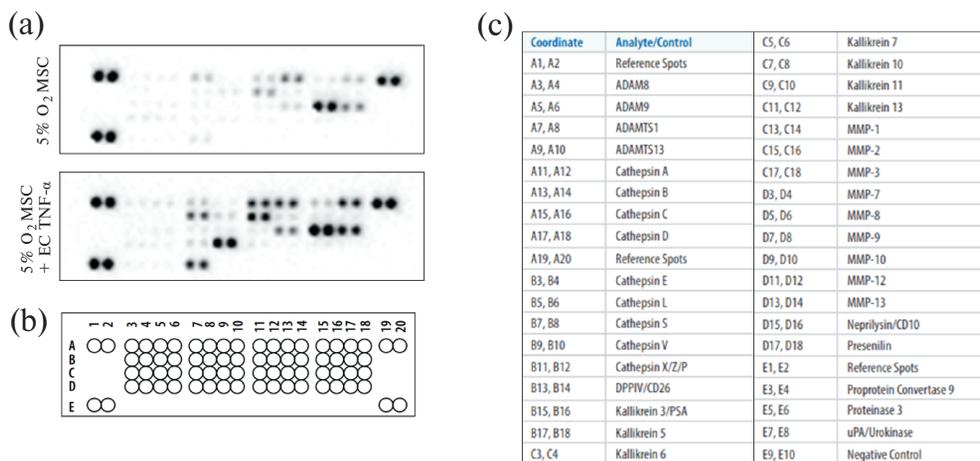


Рис. 8. Определение уровня протеаз в лизатах МСК до и после 24 ч сокультивирования с ЭК активированными ФНО- α . (а) – репрезентативные фотографии мембран; (б), (с) – схема расположения и названия детектирующих антител к различным протеазам.

Таблица 5. Влияние ФНО- α активированных ЭК на продукцию протеаз в МСК

Название протеазы	5% O ₂ МСК	5% O ₂ МСК + ЭК	0.1% O ₂ МСК	0.1% O ₂ МСК + ЭК
ADAMTS1	22.4–28.2 (25.3)	58.7–69.1 (63.9)*	27.4–27.6 (27.5)	75.2–78.6 (76.9)**
Cathepsin A	30.1–35.5 (32.8)	70–129.8 (99.9)*	40.0–48.0 (44.0)	93.4–162.6 (128.0)**
Cathepsin B	59.1–65.3 (62.2)	102.0–103.0 (102.5)*	75.8–76.8 (76.3)	77.6–78.0 (77.8)
Cathepsin C	7.8–9.2 (8.5)	24.7–25.9 (25.2)*	7.6–8.8 (8.2)	11.5–14.7 (13.1)
Cathepsin D	23.9–32.1 (28.0)	100.0–103.4 (101.7)*	36.3–37.5 (36.9)	97.7–117.3 (107.7)**
Cathepsin X/Z/P	35.6–45.6 (40.6)	89.8–136.4 (113.1)*	41.4–49.6 (45.5)	45.6–82.2 (64.0)**
MMP-1	14.3–15.5 (14.9)	52.9–54.7 (53.8)*	11.8–13.8 (12.8)	42.1–43.1 (42.6)**
MMP-2	138.1–173.3 (155.7)	233.6–242.2 (237.9)*	268.0–291.0 (279.5)	231.4–249.8 (240.6)**
MMP-3	61.2–78.4 (69.8)	132.6–153.8 (143.2)*	54.6–80.2 (67.4)	69.3–93.7 (81.5)
MMP-10	4.1–7.1 (5.6)	145.9–175.3 (160.6)*	3.6–5.6 (4.6)	154.6–176.6 (165.6)**
Urokinase	12.4–14.2 (13.3)	78.4–92.6 (85.5)*	8.5–9.5 (9.0)	61.5–76.5 (69.0)**

Данные представлены как минимальное – максимальное значение и медиана (в скобках), $n = 3$. * – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК 5% O₂; ** – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК 0.1% O₂, 24 ч.

протеаз широкого спектра действия TIMP-1 в 1.9 раза и возрастание уровня индуктора активности различных металлопротеаз EMMPRIN/CD147. Наблюдалось повышение продукции и других белков с регуляторной активностью в отношении протеаз APP/Protease Nexin II, Latexin, Serpin E1/PAI-1, Testican 1/SPOCK1, Cystatin B, Serpin B6, TFPI, TFPI-2 (табл. 6). В условиях гипоксического стресса профиль продуцируемых протеаз и ингибиторов в МСК после сокультивирования с ФНО-активированными ЭК отличался от такового при «физиологической» гипоксии. Наблюдалась отмена увеличения продукции некоторых протеаз (ADAM8, Cathepsin B, Cathepsin X/Z/P, MMP-3) (табл. 5) и антипротеаз (Serpin E1/PAI-1, Serpin F1/PEDF) (табл. 6). При этом продукция Serpin B8 возрастала, а TIMP-2 снижалась в МСК. Таким образом, взаимодействие с эндотелиальными клетками стимулировало секрецию протеаз МСК, однако в условиях значительной кислородной депривации (0.1% O₂) наблюдалось ослабление этого эффекта.

Таблица 6. Влияние сокультивирования с ФНО- α активированными ЭК на продукцию белков-регуляторов протеаз в МСК

Название белка-регулятора	5% O ₂ МСК	5% O ₂ МСК + ЭК	0.1% O ₂ МСК	0.1% O ₂ МСК + ЭК
APP/Protease Nexin II	97.4–101.0 (99.2)	131.3–251.4 (191.3)*	93.8–101.8 (97.8)	174.4–185.7 (180.1)**
Cystatin B	40.4–55.8 (48.0)	144.4–150.9 (147.6)*	41.8–46.5 (44.1)	157.5–179.3 (168.0)**
EMMPRIN/ CD147	47.7–67.9 (57.8)	121.5–132.3 (126.9)*	45.1–46.7 (45.9)	137.6–174.4 (156.1)**
Serpin B6	59.3–65.1 (62.2)	114.9–143.7 (129.3)*	34.7–42.1 (38.4)	112.1–129.5 (120.8)**
Serpin B8	90.9–102.1 (96.5)	92.6–103.2 (98.0)	43.2–58.4 (50.8)	186.8–202.2 (194.5)**
Serpin E1/PAI-1	104.1–108.5 (106.3)	158.7–179.3 (169.0)*	125.9–183.5 (154.8)	114.8–138.2 (126.5)
Testican 1/ SPOCK1	130.9–136.9 (133.9)	254.1–256.1 (255.1)*	138.2–144.6 (141.4)	244.8–245.8 (245.3)**
TFPI	31.3–31.7 (31.5)	107.1–110.7 (108.9)*	26.6–31.2 (28.9)	114.3–115.1 (114.8)**
TFPI-2	54.5–62.1 (58.3)	282.2–356.2 (319.2)*	40.6–40.8 (40.7)	352.2–366.4 (359.3)**
TIMP-1	194.3–226.7 (210.5)	94.5–122.5 (108.1)*	134.6–143.8 (139.2)	117.5–121.1 (119.3)
TIMP-2	193.5–211.9 (202.7)	205.8–214.2 (210.0)	259.0–272.6 (265.8)	134.9–149.1 (142.1)**

Данные представлены как минимальное – максимальное значение и медиана (в скобках), $n = 3$. * – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК 5% O₂; ** – $p < 0.05$ по сравнению с монокультурой МСК 0.1% O₂, 24 ч.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе проведена оценка функциональных свойств МСК после краткосрочного сокультивирования с активированными ЭК при физиологической гипоксии (5%) и гипоксическом стрессе O₂ (0.1%).

Мы обнаружили, что сами по себе МСК и ЭК демонстрируют устойчивость к действию краткосрочной депривации O₂. При контактном взаимодействии активированные ЭК не влияли на стромальный фенотип и мультилинейный дифференцировочный потенциал МСК, при этом происходило изменение экспрессии молекул межклеточной адгезии, продукции растворимых медиаторов и протеаз в МСК. Модулирующее действие краткосрочного гипоксического стресса выражалось преимущественно в изменении экспрессии генов *IL6*, *IL8* по сравнению с условиями физиологической гипоксии (5% O₂).

Предварительный этап включал оценку возможных неблагоприятных эффектов гипоксического стресса (0.1% O₂, 24 ч) на МСК и ЭК, а также провоспалительной активации ФНО- α на ЭК. МСК демонстрировали высокую устойчивость к депривации O₂. Предполагается, что изменения, которые помогают клеткам адаптироваться к гипоксическому стрессу, вызваны работой антиоксидантных систем, возрастанием активности транскрипционного фактора NIF и транзиторным увеличением экспрессии *HIF1A*, *HIF3A* [8, 14, 15, 36–38].

Анализ эффектов ФНО- α и кислородной депривации разной степени выраженности на ЭК показал, что краткосрочное воздействие физиологической гипоксии (5% O₂) и активация ФНО- α в этих условиях существенно не влияли на исследуемые параметры ЭК по сравнению с культивированием клеток при стандартных условиях (20% O₂). ЭК демонстрировали морфологические и иммунофенотипические признаки активации при действии ФНО- α , что сопоставимо с полученными ранее экспериментальными данными [39, 40]. На фоне краткосрочной кислородной депривации (0.1% O₂, 24 ч) наблюдались признаки окислительного стресса (\uparrow H₂O₂), а совместно с действием ФНО- α выраженность этих признаков усиливалась (\uparrow H₂O₂ \uparrow NO). Увеличение продукции эндогенных АФК может быть связано с ингибирующим действием NO на фермент каталазу, функция которого заключается в деактивации H₂O₂ [41, 42]. Возможно, устойчивость ЭК к действию краткосрочного гипоксического стресса и ФНО- α обусловлена активацией сигнального пути NF κ B и возрастанием активности NIF, что помогает клеткам адаптироваться к стрессовым факторам среды [43].

Анализ эффектов межклеточного взаимодействия при пониженном содержании O₂ показал, что после краткосрочного контакта с активированными ЭК МСК не отличались от монокультуры клеток по клоногенной активности, экспрессии стромальных маркеров, также отсутствовали признаки коммитирования, судя по экспрессии генов-регуляторов дифференцировки, что может свидетельствовать в пользу сохранения статуса малокоммитированных предшественников. Ранее было показано, что МСК сохраняют мультилинейный потенциал несмотря на длительное взаимодействие с ЭК [28], что согласуется с нашими данными.

В настоящей работе оценивались эффекты ЭК на экспрессию поверхностных молекул МСК, которые участвуют в регуляции межклеточной адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировке клеток [44, 45]. Взаимодействие вызывало снижение экспрессии белка гомотипических межклеточных контактов (N-кадгерина) и интегрин α 4 в МСК. При этом увеличивалось количество клеток, экспрессирующих молекулы, которые участвуют в миграции и формировании гетероклеточных контактов МСК-ЭК, МСК-иммунные клетки (интегрин α 1 и α V β 3, ICAM-1) [46, 47]. Гипоксический стресс способствовал усилению индукции ICAM-1 в МСК после взаимодействия с активированными ЭК. Как показано для некоторых клеточных линий, в гипоксических условиях (1% O₂, 24 ч) происходит протеасомная деградация белка I κ B, который является цитоплазматическим ингибитором NF κ B. Известно, что активация сигнального пути NF κ B индуцирует экспрессию ICAM-1, что может объяснять наблюдаемые изменения [48].

Терапевтическое применение МСК напрямую связано с их способностью мигрировать в поврежденные органы по градиенту цитокинов с хемотактическим действием [21, 24]. В настоящем исследовании мы оценили изменение потенциала к направленной и ненаправленной миграции МСК в кондиционированной среде от активированных ЭК. Наблюдаемое нами увеличение подвижности МСК в модели направленной и ненаправленной миграции свидетельствует о мобилизации МСК в ответ на факторы, продуцируемые активированными ЭК.

МСК оказывают трофическое действие на ткань за счет продукции различных цитокинов и факторов роста. Опубликованные ранее экспериментальные данные демонстрируют, что при взаимодействии стромальных и эндотелиальных клеток изме-

нялась транскрипция генов некоторых паракринных медиаторов МСК, однако данные о влиянии ЭК на секреторный профиль МСК практически не представлены [49, 50]. В настоящем исследовании представлены новые данные о том, что сокультивирование МСК и активированных ЭК индуцирует не только транскрипцию, но и продукцию цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8. Известно, что VEGF путем связывания с рецептором VEGFR2 усиливает транскрипцию генов *IL6* и *IL8* в ЭК с помощью протеинкиназы D1 [51]. Можно предположить, что VEGF-опосредованные сигнальные пути способствовали усилению экспрессии генов *IL6* и *IL8* в совместно культивируемых МСК и ЭК, поддерживая повышенную продукцию этих интерлейкинов.

Протеазы участвуют во многих физиологических процессах, таких как репарация ткани, ангиогенез, иммунный ответ, свертывание крови [52–54]. Баланс секретируемых протеаз и их ингибиторов непосредственно контролирует высвобождение связанных форм цитокинов и факторов роста, способствует образованию «путей» для миграции клеток, опосредует иммунный ответ, что влияет на заживление ран и формирование новых сосудов (тканевой гомеостаз/репаративные процессы в ткани) [55–57].

Анализ белкового профиля сокультивируемых МСК показал возрастание протеолитической активности МСК за счет продукции белков, которые индуцируют локально опосредованную деградацию компонентов ВКМ и миграцию МСК, таких как матриксные металлопротеазы (ММП-1, -2, -3, -10), катепсины, урокиназа. Формирование миграционного фенотипа МСК связано с работой матриксных металлопротеаз, и ЭК являются индукторами активности этих ферментов [58, 59]. Продемонстрировано, что кондиционированная среда от ЭК повышает уровни ММП-1, ММП-3 и скорость миграции МСК [33]. Также известно, что ММП-2 положительно влияет на трансэндотелиальную миграцию МСК. В то же время уменьшение трансэндотелиальной миграции МСК связано с ингибированием ММП-2 и возрастанием экспрессии TIMP-3 [60]. Ries и соавт. показали, что подавление ММП-2 или TIMP-2 снижает клеточную подвижность, в то время как подавление экспрессии TIMP-1, наоборот, активизирует клеточную подвижность [61]. Катепсины участвуют в неспецифической деградации ВКМ и процессинге цитокинов, хемокинов и клеточных рецепторов. Показано, что катепсины А, В, D стимулируют миграцию различных типов клеток, в том числе МСК [62–65].

Избыточная продукция клетками протеолитических ферментов, которые деградируют ВКМ, может неблагоприятно отражаться на восстановлении поврежденного органа. Однако регуляция процесса деградации ВКМ осуществляется за счет белковых регуляторов, которые ингибируют или стимулируют действие различных протеаз.

Тканевые ингибиторы матриксных металлопротеаз (TIMP) являются регуляторами функциональной активности соответствующих ферментов. В организме TIMPs контролируют ремоделирование матрикса при регенерации различных тканей [59, 66]. Наблюдаемое нами снижение продукции ингибитора металлопротеаз широкого спектра действия TIMP-1 и возрастание продукции Emmpin (индуктор внеклеточной матриксной металлопротеазы), индуцирующего активность металлопротеаз, наряду с возрастанием продукции ММП-1, -2, -3, -10 может свидетельствовать в пользу увеличения протеолитической активности МСК. Вместе с этим наблюдалась индукция экспрессии белков, которые оказывают ингибирующее действие на подвижность МСК, таких как PAI-1, nexin-1, cystatin B, TFPI, после взаимодействия с активированными ЭК [67–69].

В настоящем исследовании мы также проанализировали влияние значительной депривации O_2 , характерной для ишемического повреждения ткани, на взаимодействие ЭК и МСК.

В условиях гипоксического стресса многие эффекты эндотелия на МСК были подобны таковым при «физиологической» гипоксии (рис. 9). Среди отличий можно

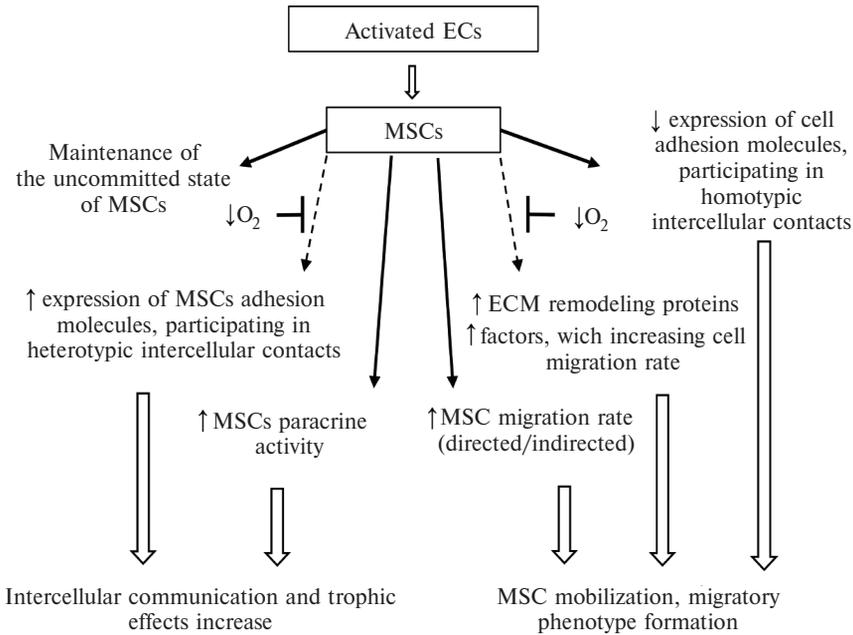


Рис. 9. Эффекты гипоксического стресса на взаимодействие активированных ЭК и МСК.

отметить увеличение экспрессии интегрин $\alpha 5$ как в моно-, так и в сокультуре, значительное увеличение экспрессии ICAM-1 на МСК после взаимодействия с активированными ЭК, что может указывать на потенцирующее действие кислородной депривации на экспрессию некоторых молекул межклеточного взаимодействия. Ранее показано, что краткосрочная кислородная депривация (1–2% O₂, 24 ч) приводит к возрастанию экспрессии интегрин $\alpha 5$ на поверхности МСК из костного мозга [70, 71], что согласуется с нашими результатами. Увеличение экспрессии ICAM-1 наблюдается при поляризации МСК в провоспалительный фенотип, что связано с активацией TLR4 или действием воспалительных цитокинов (ФНО- α , ИФН γ , ИЛ-1 β) [72]. ЭК могут синтезировать ИЛ-1 α , который обладает ИЛ-1 β -подобным действием (относится к провоспалительным цитокинам), а при гипоксии его секреция увеличивается [73], что может обуславливать потенцирующее влияние гипоксического стресса на экспрессию ICAM-1 в МСК при взаимодействии с ЭК.

При гипоксическом стрессе, как и при «физиологической» гипоксии, концентрации ИЛ-6 и ИЛ-8 в среде после сокультивирования МСК и активированных ЭК значительно возрастали. Кроме того, мы наблюдали, что сокультивирование клеток в условиях гипоксического стресса индуцировало экспрессию гена *IL8* и ослабляло усиление экспрессии *IL6* в МСК и ЭК по сравнению с «физиологической» гипоксией. Также гипоксический стресс отменял увеличение продукции протеаз, стимулирующих клеточную миграцию, таких как катепсины, MMP-3, TIMP-2, что может непосредственно влиять на подвижность МСК.

Таким образом, мы наблюдали изменение экспрессии поверхностных молекул, ответственных за миграцию МСК и образование гомо- и гетероклеточных контактов, а также возрастание скорости миграции МСК, что свидетельствует об увеличении подвижности клеток. Более высокий уровень транскрипции и трансляции провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и активация продукции протеолитических белков может свидетельствовать в пользу усиления межклеточной коммуникации и ремоде-

лирования внеклеточного матрикса. При этом краткосрочная депривация O_2 (0.1% O_2 , 24 ч) частично отменяла индукцию экспрессии *IL6* и некоторых протеаз и ингибиторов протеаз при взаимодействии МСК и ЭК.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (Е. Р. А., О. В. Ж.), проведение экспериментов, сбор и обработка данных (О. В. Ж.), написание и редактирование манускрипта (Е. Р. А., О. В. Ж., Л. Б. Б.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Программы фундаментальных исследований Института медико-биологических проблем РАН (тема 65.3 и FMFR-2024-0032). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты были одобрены Комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН, протокол № 550МСК от 22 июля 2020 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Caplan AI, Correa D* (2011) The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell* 9: 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.06.008>
2. *Squillaro T, Pehuso G, Galderisi U* (2016) Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* 25: 829–848. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>
3. *Galipeau J, Sensébé L* (2018) Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell* 22: 824–833. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.004>
4. *Fernández-Garza LE, Barrera-Barrera SA, Barrera-Saldaña HA* (2023) Mesenchymal Stem Cell Therapies Approved by Regulatory Agencies around the World. *Pharmaceuticals* 16: 1334. <https://doi.org/10.3390/ph16091334>
5. *Buravkova LB, Andreeva ER, Gogvadze V, Zhivotovsky B* (2014) Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? *Mitochondrion* 19: 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.07.005>
6. *Egger D, Lavrentieva A, Kugelmeier P, Kasper C* (2022) Physiologic isolation and expansion of human mesenchymal stem/stromal cells for manufacturing of cell-based therapy products. *Eng Life Sci* 22: 361–372. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100097>
7. *Choi J-W, Shin S, Lee CY, Lee J, Seo H-H, Lim S, Lee S, Kim I-K, Lee H-B, Kim SW, Hwang K-C* (2017) Rapid Induction of Osteogenic Markers in Mesenchymal Stem Cells by Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells. *Cell Physiol Biochem* 44: 53–65. <https://doi.org/10.1159/000484582>
8. *Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R* (2010) Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal CCS* 8: 18. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-18>
9. *Moniz I, Ramalho-Santos J, Branco AF* (2022) Differential Oxygen Exposure Modulates Mesenchymal Stem Cell Metabolism and Proliferation through mTOR Signaling. *Int J Mol Sci* 23: 3749. <https://doi.org/10.3390/ijms23073749>
10. *Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA* (2008) Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 26: 2173–2182. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1104>

11. *Udartseva OO, Lobanova MV, Andreeva ER, Buravkov SV, Ogneva IV, Buravkova LB* (2016) Acute Hypoxic Stress Affects Migration Machinery of Tissue O₂-Adapted Adipose Stromal Cells. *Stem Cells Int* 2016: 1–16.
<https://doi.org/10.1155/2016/7260562>
12. *Busletta C, Novo E, Valfrè Di Bonzo L, Povero D, Paternostro C, Ievolella M, Mareschi K, Ferrero I, Cannito S, Compagnone A, Bandino A, Colombatto S, Fagioli F, Parola M* (2011) Dissection of the Biphasic Nature of Hypoxia-Induced Motogenic Action in Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 29: 952–963.
<https://doi.org/10.1002/stem.642>
13. *Wang Q, Li X, Wang Q, Xie J, Xie C, Fu X* (2019) Heat shock pretreatment improves mesenchymal stem cell viability by heat shock proteins and autophagy to prevent cisplatin-induced granulosa cell apoptosis. *Stem Cell Res Ther* 10: 348.
<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1425-4>
14. *Peterson KM, Aly A, Lerman A, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M* (2011) Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: role of oxidative stress. *Life Sci* 88: 65–73.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.023>
15. *Andreeva ER, Lobanova MV, Udartseva OO, Buravkova LB* (2014) Response of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in Tissue-Related O₂ Microenvironment to Short-Term Hypoxic Stress. *Cells Tissues Organs* 200: 307–315.
<https://doi.org/10.1159/000438921>
16. *Caplan AI* (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213: 341–347.
<https://doi.org/10.1002/jcp.21200>
17. *Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L, Shi Y* (2013) Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin* 34: 747–754.
<https://doi.org/10.1038/aps.2013.50>
18. *Lu L, Xu A, Gao F, Tian C, Wang H, Zhang J, Xie Y, Liu P, Liu S, Yang C, Ye Z, Wu X* (2022) Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a Novel Strategy for the Treatment of Intervertebral Disc Degeneration. *Front Cell Dev Biol* 9: 770510.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.770510>
19. *Sanchez-Diaz M, Quiñones-Vico MI, Sanabria De La Torre R, Montero-Vilchez T, Sierra-Sánchez A, Molina-Leyva A, Arias-Santiago S* (2021) Biodistribution of Mesenchymal Stromal Cells after Administration in Animal Models and Humans: A Systematic Review. *J Clin Med* 10: 2925.
<https://doi.org/10.3390/jcm10132925>
20. *Becker AD, Riet IV* (2016) Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells* 8: 73.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i3.73>
21. *Szydłak R* (2021) Biological, chemical and mechanical factors regulating migration and homing of mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 13: 619–631.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i6.619>
22. *Leibacher J, Dauber K, Ehser S, Brixner V, Kollar K, Vogel A, Spohn G, Schäfer R, Seifried E, Henschler R* (2017) Human mesenchymal stromal cells undergo apoptosis and fragmentation after intravenous application in immune-competent mice. *Cytotherapy* 19: 61–74.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.09.010>
23. *Zachar L, Bačenková D, Rosocha J* (2016) Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *J Inflamm Res* 9: 231–240.
<https://doi.org/10.2147/JIR.S121994>
24. *Nitzsche F, Müller C, Lukomska B, Jolkonen J, Deten A, Boltze J* (2017) Concise Review: MSC Adhesion Cascade—Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem Cells* 35: 1446–1460.
<https://doi.org/10.1002/stem.2614>
25. *Teo GSL, Ankrum JA, Martinelli R, Boetto SE, Simms K, Sciuto TE, Dvorak AM, Karp JM, Carman CV* (2012) Mesenchymal Stem Cells Transmigrate Between and Directly Through Tumor Necrosis Factor- α -Activated Endothelial Cells Via Both Leukocyte-Like and Novel Mechanisms. *Stem Cells* 30: 2472–2486.
<https://doi.org/10.1002/stem.1198>
26. *Guo Y-C, Chiu Y-H, Chen C-P, Wang H-S* (2018) Interleukin-1 β induces CXCR3-mediated chemotaxis to promote umbilical cord mesenchymal stem cell transendothelial migration. *Stem Cell Res Ther* 9: 281.
<https://doi.org/10.1186/s13287-018-1032-9>

27. *Merfeld-Clauss S, Lupov IP, Lu H, Feng D, Compton-Craig P, March KL, Traktuev DO* (2014) Adipose Stromal Cells Differentiate Along a Smooth Muscle Lineage Pathway Upon Endothelial Cell Contact via Induction of Activin A. *Circ Res* 115: 800–809.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304026>
28. *Lin C-H, Lilly B* (2014) Endothelial Cells Direct Mesenchymal Stem Cells Toward a Smooth Muscle Cell Fate. *Stem Cells Dev* 23: 2581–2590.
<https://doi.org/10.1089/scd.2014.0163>
29. *Li C, Wu X, Tong J, Yang X, Zhao J, Zheng Q, Zhao G, Ma Z* (2015) Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther* 6: 55.
<https://doi.org/10.1186/s13287-015-0066-5>
30. *Buravkova LB, Grinakovskaya OS, Andreeva ER, Zhambalova AP, Kozionova MP* (2009) Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under lower oxygen tension. *Cell Tissue Biol* 3: 23–28.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X09010039>
31. *Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM* (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–317.
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
32. *Tondreau T, Meuleman N, Stamatoopoulos B, De Bruyn C, Delforge A, Dejefneffé M, Martiat P, Bron D, Lagneaux L* (2009) In vitro study of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase production by mesenchymal stromal cells in response to inflammatory cytokines: the role of their migration in injured tissues. *Cytotherapy* 11: 559–569.
<https://doi.org/10.1080/14653240903051541>
33. *Lozito TP, Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS* (2014) Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs. *Matrix Biol* 34: 132–143.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.003>
34. *Beloglazova IB, Zubkova ES, Tsokolaeva ZI, Stafeev YuS, Dergilev KV, Ratner EI, Shestakova MV, Sukhareva OYu, Parfenova EV, Menshikov MYu* (2016) Regulatory Effects of Urokinase on Mesenchymal Stromal Cell Migration, Proliferation, and Matrix Metalloproteinase Secretion. *Bull Exp Biol Med* 161: 775–778.
<https://doi.org/10.1007/s10517-016-3507-y>
35. *Wei L, Xu Y, Zhang L, Yang L, Zhao RC, Zhao D* (2023) Mesenchymal Stem Cells Promote Wound Healing and Effects on Expression of Matrix Metalloproteinases-8 and 9 in the Wound Tissue of Diabetic Rats. *Stem Cells Dev* 32: 25–31.
<https://doi.org/10.1089/scd.2021.0218>
36. *Lee JA, Kim BI, Jo CH, Choi CW, Kim E-K, Kim H-S, Yoon K-S, Choi J-H* (2010) Mesenchymal stem-cell transplantation for hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat model. *Pediatr Res* 67: 42–46.
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181bf594b>
37. *Pogodina MV, Buravkova LB* (2014) Expression of hypoxia-associated genes in multipotent mesenchymal stromal cells during long-term cultivation at low oxygen. *Dokl Biol Sci* 458: 310–312.
<https://doi.org/10.1134/S0012496614050056>
38. *Pulido-Escribano V, Torrecillas-Baena B, Camacho-Cardenosa M, Dorado G, Gálvez-Moreno MÁ, Casado-Díaz A* (2022) Role of hypoxia preconditioning in therapeutic potential of mesenchymal stem-cell-derived extracellular vesicles. *World J Stem Cells* 14: 453–472.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v14.i7.453>
39. *Fontani F, Domazetovic V, Marcucci T, Vincenzini MT, Iantomasi T* (2016) Tumor Necrosis Factor-Alpha Up-Regulates ICAM-1 Expression and Release in Intestinal Myofibroblasts by Redox-Dependent and -Independent Mechanisms: ICAM-1 Expression and Release in 18C o Cells. *J Cell Biochem* 117: 370–381.
<https://doi.org/10.1002/jcb.25279>
40. *Li M, Van Esch BCAM, Wagenaar GTM, Garssen J, Folkerts G, Henricks PAJ* (2018) Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 831: 52–59.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.003>
41. *Sigfrid LA, Cunningham JM, Beeharry N, Lortz S, Tiedge M, Lenzen S, Carlsson C, Green IC* (2003) Cytokines and nitric oxide inhibit the enzyme activity of catalase but not its protein or mRNA expression in insulin-producing cells. *J Mol Endocrinol* 31: 509–518.
<https://doi.org/10.1677/jme.0.0310509>

42. *Bauer G* (2015) Increasing the endogenous NO level causes catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis signaling specifically in tumor cells. *Redox Biol* 6: 353–371.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.017>
43. *Mussbacher M, Salzmann M, Brostjan C, Hoesel B, Schoergenhofer C, Datler H, Hohensinner P, Basilio J, Petzelbauer P, Assinger A, Schmid JA* (2019) Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis. *Front Immunol* 10: 85.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00085>
44. *Frith JE, Mills RJ, Hudson JE, Cooper-White JJ* (2012) Tailored Integrin–Extracellular Matrix Interactions to Direct Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Stem Cells Dev* 21: 2442–2456.
<https://doi.org/10.1089/scd.2011.0615>
45. *Steward AJ, Kelly DJ* (2015) Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J Anat* 227: 717–731.
<https://doi.org/10.1111/joa.12243>
46. *Huttenlocher A, Horwitz AR* (2011) Integrins in Cell Migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005074–a005074.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005074>
47. *Becerra-Bayona SM, Guiza-Arguello VR, Russell B, Höök M, Hahn MS* (2018) Influence of collagen-based integrin α_1 and α_2 mediated signaling on human mesenchymal stem cell osteogenesis in three dimensional contexts. *J Biomed Mater Res A* 106: 2594–2604.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36451>
48. *Winning S, Spletstoesser F, Fandrey J, Frede S* (2010) Acute Hypoxia Induces HIF-Independent Monocyte Adhesion to Endothelial Cells through Increased Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression: The Role of Hypoxic Inhibition of Prolyl Hydroxylase Activity for the Induction of NF- κ B. *J Immunol* 185: 1786–1793.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903244>
49. *Thin Luu N, Mcgettrick HM, Buckley CD, Newsome PN, Ed Rainger G, Frampton J, Nash GB* (2013) Crosstalk Between Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Cells Leads to Downregulation of Cytokine-Induced Leukocyte Recruitment. *Stem Cells* 31: 2690–2702.
<https://doi.org/10.1002/stem.1511>
50. *Bartaula-Brevik S* (2017) Secretome of Mesenchymal Stem Cells Grown in Hypoxia Accelerates Wound Healing and Vessel Formation In Vitro. *Int J Stem Cell Res Ther* 4.
<https://doi.org/10.23937/2469-570X/1410045>
51. *Hao Q, Wang L, Tang H* (2009) Vascular endothelial growth factor induces protein kinase D-dependent production of proinflammatory cytokines in endothelial cells. *Am J Physiol-Cell Physiol* 296: C821–C827.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00504.2008>
52. *Guillamat-Prats R* (2022) Role of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Coagulation. *Int J Mol Sci* 23: 10393.
<https://doi.org/10.3390/ijms231810393>
53. *Lund LR, Green KA, Stoop AA, Ploug M, Almholt K, Lilla J, Nielsen BS, Christensen IJ, Craik CS, Werb Z, Danø K, Romer J* (2006) Plasminogen activation independent of uPA and tPA maintains wound healing in gene-deficient mice. *EMBO J* 25: 2686–2697.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601173>
54. *Rundhaug JE* (2005) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9: 267–285.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x>
55. *McCarty SM, Percival SL* (2013) Proteases and Delayed Wound Healing. *Adv Wound Care* 2: 438–447.
<https://doi.org/10.1089/wound.2012.0370>
56. *Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S* (2015) Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 22: 526–539.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
57. *Habič A, Novak M, Majc B, Lah Turnšek T, Breznik B* (2021) Proteases Regulate Cancer Stem Cell Properties and Remodel Their Microenvironment. *J Histochem Cytochem* 69: 775–794.
<https://doi.org/10.1369/00221554211035192>
58. *Brauer PR* (2006) MMPs-Role in Cardiovascular Development and Disease. *Front Biosci* 11: 447.
<https://doi.org/10.2741/1810>
59. *Kasper G, Glaeser JD, Geissler S, Ode A, Tuischer J, Matziolis G, Perka C, Duda GN* (2007) Matrix Metalloprotease Activity Is an Essential Link Between Mechanical Stimulus and Mesenchymal Stem Cell Behavior. *Stem Cells* 25: 1985–1994.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0676>

60. *De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever J, De Waele M, Van Riet I* (2007) Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica* 92: 440–449.
<https://doi.org/10.3324/haematol.10475>
61. *Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P* (2007) MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 109: 4055–4063.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-051060>
62. *Tong B, Wan B, Wei Z, Wang T, Zhao P, Dou Y, Lv Z, Xia Y, Dai Y* (2014) Role of cathepsin B in regulating migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes into inflamed tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 177: 586–597.
<https://doi.org/10.1111/cei.12357>
63. *Vangala G, Imhoff FM, Squires CML, Cridge AG, Baird SK* (2019) Mesenchymal stem cell homing towards cancer cells is increased by enzyme activity of cathepsin D. *Exp Cell Res* 383: 111494.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.07.007>
64. *Vidak E, Javoršek U, Vizovišek M, Turk B* (2019) Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment. *Cells* 8: 264.
<https://doi.org/10.3390/cells8030264>
65. *Park S, Huang H, Kwon W, Kim H, Park J, Han JE, Cho G, Han S, Sung Y, Ryoo ZY, Kim MO, Choi S* (2021) Cathepsin A regulates pluripotency, proliferation and differentiation in mouse embryonic stem cells. *Cell Biochem Funct* 39: 67–76.
<https://doi.org/10.1002/cbf.3554>
66. *Mott JD, Werb Z* (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16: 558–564.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.07.010>
67. *Stefansson S, Lawrence DA* (1996) The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin $\alpha\beta 3$ binding to vitronectin. *Nature* 383: 441–443.
<https://doi.org/10.1038/383441a0>
68. *Richard B, Pichon S, Arocas V, Venisse L, Berrou E, Bryckaert M, Jandrot Perrus M, Bouton MC* (2006) The serpin protease nexin-1 regulates vascular smooth muscle cell adhesion, spreading, migration and response to thrombin. *J Thromb Haemost* 4: 322–328.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01710.x>
69. *Provençal M, Michaud M, Beaulieu É, Ratel D, Rivard G-É, Gingras D, Béliveau R* (2008) Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) interferes with endothelial cell migration by inhibition of both the Erk pathway and focal adhesion proteins. *Thromb Haemost* 99: 576–585.
<https://doi.org/10.1160/TH07-10-0623>
70. *Saller MM, Prall WC, Docheva D, Schönitzer V, Popov T, Anz D, Clausen-Schaumann H, Mutschler W, Volkmer E, Schieker M, Polzer H* (2012) Increased stemness and migration of human mesenchymal stem cells in hypoxia is associated with altered integrin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 379–385.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.134>
71. *Choi JH, Lee YB, Jung J, Hwang SG, Oh I-H, Kim GJ* (2016) Hypoxia Inducible Factor-1 α Regulates the Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via Integrin α_4 . *Stem Cells Int* 2016: 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2016/7932185>
72. *Ren G, Roberts AI, Shi Y* (2011) Adhesion molecules: Key players in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Cell Adhes Migr* 5: 20–22.
<https://doi.org/10.4161/cam.5.1.13491>
73. *Mai J, Virtue A, Shen J, Wang H, Yang X-F* (2013) An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells. *J Hematol Oncol* 6: 61.
<https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-61>

Activated Endothelium Changes The Activity Of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells During Physiological Hypoxia Or Short Hypoxic Stress *In Vitro*

O. V. Zhidkova^{a, *}, E. R. Andreeva^{a, **}, and L. B. Buravkova^{a, ***}

^a*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

**e-mail: flain-fish@yandex.ru*

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

*** *e-mail: buravkova@imbp.ru*

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are used for supplemental therapy of ischemic and inflammatory diseases. After systemic administration, transmigration of MSCs to the target tissue is accompanied by interaction with activated endothelial cells (ECs) at the site of injury. In this study, we investigated the influence of TNF- α -activated ECs on the functions of MSCs under different levels of hypoxia. For this purpose, MSCs and TNF- α activated ECs were cocultured in a direct cell-to-cell setting for a short period of time. MSCs retained their stromal phenotype and multilineage differentiation potential after interaction with activated ECs. At the same time, changes in molecules involved in MSC-cell and MSC-extracellular matrix interaction were detected. The paracrine activity of MSCs and activated ECs after interaction was demonstrated by both upregulated transcription and increased levels of pleiotropic IL-6 and IL-8. Proteases/antiproteases profiles were also altered after interaction. These data suggest that short-term interaction of MSCs with activated ECs may play an important role in tissue repair and remodeling processes. In particular, it may promote the migratory phenotype of MSCs. In comparison to physiological hypoxia – 5% O₂, acute hypoxic stress (0.1% O₂, 24 h) attenuated the stimulatory effects of ECs on MSCs.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, endothelial cells, hypoxia, proinflammatory activation, cocultivation