

ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭРИТРОПОЭТИНА

Бондаренко Н.А.¹, Лыков А.П.¹, Казаков О.В.¹, Кабаков А.В.¹, Повещенко О.В.¹,
Суrowцева М.А.¹, Ким И.И.¹, Повещенко А.Ф.¹

¹Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии - филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, e-mail: bond802888@yandex.ru

Изучено влияние эритропоэтина на функциональные свойства мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга крыс. Установлено, что эритропоэтин в трех дозах 34, 68, 100 МЕ/мл оказывает стимулирующее действие на пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крысы. В отношении миграционной активности клеток стимулирующее действие эритропоэтина менее выражено, миграция увеличивается, но не статистически значимо. Кроме того, установлено, что эритропоэтин в большей степени стимулирует пролиферацию и миграцию мезенхимальных стволовых клеток, чем ангиогенный фактор VEGF. Показано, что в присутствии эритропоэтина в дозе 34 МЕ/мл мезенхимальные стволовые клетки образуют тубулоподобные структуры, по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования эритропоэтина как фактора, повышающего функциональную активность мезенхимальных стволовых клеток.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, эритропоэтин, пролиферация, миграция.

CHANGES IN FUNCTIONAL PROPERTIES OF MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER THE INFLUENCE OF ERYTHROPOIETIN

Bondarenko N.A.¹, Lykov A.P.¹, Kazakov O.V.¹, Kabakov A.V.¹, Poveschenko O.V.¹,
Surovtseva M.A.¹, Kim I.I.¹, Poveschenko A.F.¹

¹Scientific Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology - branch of the Institute of Ecology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, e-mail: bond802888@yandex.ru

The effect of erythropoietin on the functional properties of mesenchymal stem cells of the bone marrow was studied. It was established that erythropoietin in three doses of 34, 68, 100 IU/ml exerts a stimulating effect on the proliferative activity of mesenchymal stem cells of rat bone marrow. With regard to migration, the stimulating effect of erythropoietin is less pronounced, migration is increasing, but not statistically significant. In addition, it has been established that erythropoietin stimulates the proliferation and migration of mesenchymal stem cells more than the angiogenic factor VEGF. It was shown that in the presence of erythropoietin at a dose of 34 ME/ml mesenchymal stem cells form tubulo-like structures, in comparison with the control. The obtained result testify to the possibility of using erythropoietin as a factor that increases the functional activity of mesenchymal stem cells.

Keywords: mesenchymal stem cells, erythropoietin, proliferation, migration.

На сегодняшний день прогноз для пациентов с тяжелым заболеванием периферических артерий остается неутешительным, поскольку современные хирургические, медикаментозные методы лечения не спасают от ампутаций пациентов с критической ишемией нижних конечностей [1]. Таким образом, в последнее время активно развивается новое направление - клеточная терапия, направленная на стимуляцию реваскуляризации ишемических тканей. Клинические исследования показали, что аутологичные стволовые клетки костного мозга способны улучшать кровоснабжение у пациентов с критической ишемией нижних конечностей [2; 3]. Для стимуляции ангиогенеза при ишемии нижних конечностей используются разные типы клеток, в том числе активно применяют мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) костного мозга [4]. Несмотря

на имеющиеся предварительные положительные результаты экспериментальных и клинических исследований эффективности клеточной терапии стволовыми/прогениторными клетками ишемии нижних конечностей, исследователи продолжают поиск новых методов стимуляции ангиогенеза [5; 6].

Оказалось, что эритропоэтин способен не только стимулировать эритропоэз, но и обладает цитопротективным действием как *in vivo*, так и *in vitro* [7], способствует эндотелиальной дифференцировке и повышает экспрессию факторов дифференцировки стволовых клеток, увеличивает секрецию ими проангиогенных цитокинов [8; 9], подавляет апоптоз стволовых/прогениторных клеток и повышает их выживаемость [10]. Также кратковременное культивирование стволовых/прогениторных клеток с эритропоэтином значительно стимулирует их пролиферацию, миграцию и образование первичной тубулярной сосудистой сети, приводит к увеличению плотности капилляров при экспериментальной ишемии нижних конечностей [11]. Кроме того, имеются лишь немногочисленные работы исследователей, посвященные изучению влияния эритропоэтина на активность стволовых/прогениторных клеток [12-14]. В связи с этим необходимо изучение эффекта эритропоэтина на функциональный резерв стволовых/прогениторных клеток с целью дальнейшего применения в качестве клеточной терапии при ишемии. Таким образом, целью исследования стало изучение влияния эритропоэтина на пролиферативную и миграционную активность ММСК костного мозга крысы.

Материал и методы исследования

ММСК получали из клеток костного мозга бедренных костей у крыс. Клетки культивировали в питательной среде DMEM с 10%-ным содержанием эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия), 160 мкг/мл гентамицина сульфата («Дальхимфарм», Россия), 2 ммоль L-глутамин (ICN, США) при 37 °C во влажной атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂. В работе использовали клетки 3-5 пассажей.

Фенотип ММСК определяли на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (BD, США) с использованием моноклональных антител к CD90, CD105, CD73, CD34 и CD45, меченых FITC и PE (BD, США). По изменению клеточного импеданса на аппарате xCELLigence (Roche Applies Science, Германия) в одно- или двухуровневых камерах оценивали пролиферацию и миграцию ММСК. Влияние эритропоэтина на пролиферацию и миграцию ММСК оценивали в дозах 34, 68, 100 МЕ/мл («Рекормон», Германия), а также VEGF (10 нг/мл, BioVision, США) в среде с 1% FCS. В условиях исследования задавалось общее время сканирования и интервал сканирования, далее все измерения проводились в автоматическом режиме. Изменение импеданса на микроэлектродах, обусловленного прикреплением и распластыванием клеток, выражали как клеточный индекс (КИ), который автоматически

вычисляется программой: $KI=(Rn-Rb)/t$, где Rb – исходное значение импеданса в лунке, содержащей только ростовую среду для клеток, Rn – значение импеданса в любое время t в лунке, содержащей, помимо ростовой среды, тестируемые клетки. КИ, таким образом, отражает изменения количества клеток, качества прикрепления клеток и морфологию клеток в лунке, которые могут меняться во времени. Образование тубулоподобных структур проводили следующим образом. Дно 24-луночного планшета покрывали раствором Матригеля и инкубировали 20 минут при 37 °С до полимеризации. Далее клетки вносили в лунки, покрытые Матригелем, и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 4–5 часов. В качестве положительного контроля использовали эндотелиальные клетки линии EaHy.926. ММСК наносили на матригель с добавлением эритропоэтина в дозе 34 МЕ/мл. Оценивали степень сформированности сети. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Statistica 10,0. Данные представлены в виде среднего значения (M) и ошибки среднего (m). Достоверность различий оценивали по критериям Манна-Уитни в независимых группах. Различия считались достоверными при $p<0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Методом проточной цитометрии была установлена фенотипическая характеристика ММСК, выделенных из костного мозга крысы. Получено, что ММСК на своей поверхности экспрессируют такие маркеры, как CD90 $97,4\pm0,25\%$, CD29 $99,4\pm0,13\%$ и CD73 $17,1\pm0,1\%$, при этом практически не экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток CD34 $0,1\pm0,01\%$, CD45 $0,2\pm0,03\%$. Также мы подтвердили способность ММСК костного мозга крысы дифференцироваться в адипогенном и остеогенном направлениях (рис. 1). Таким образом, нами была подтверждена фенотипическая принадлежность клеток, полученных из костного мозга крыс, к мезенхимальным стволовым клеткам.

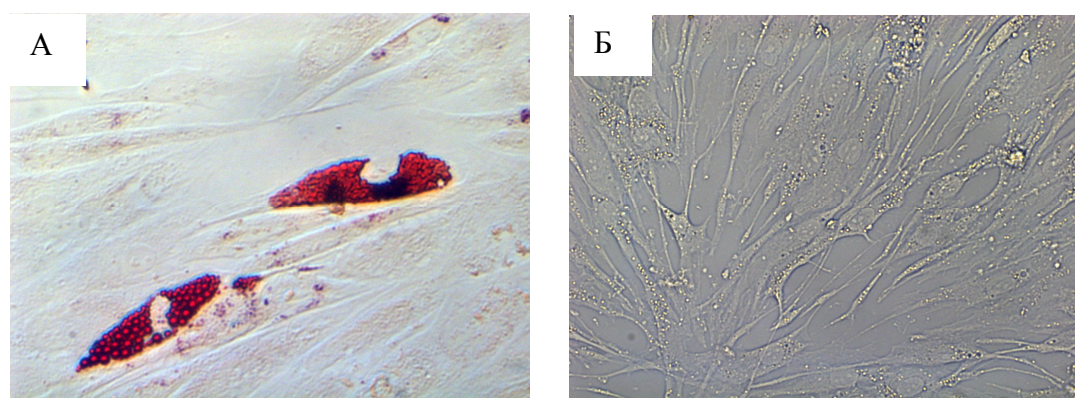


Рис. 1. Дифференцировочный потенциал ММСК костного мозга крыс: А – адипогенная дифференцировка по окраске Oil red (x40); Б – остеогенная дифференцировка (x20)

На рисунке 2 представлена оценка влияния эритропоэтина в трех дозах 34, 68, 100 МЕ/мл на пролиферативную и миграционную активность ММСК костного мозга. Выявлено, что уже в первые часы (1-4 ч.) эксперимента эритропоэтин в дозах 34 и 68 МЕ/мл оказывает стимулирующее действие на пролиферацию ММСК.

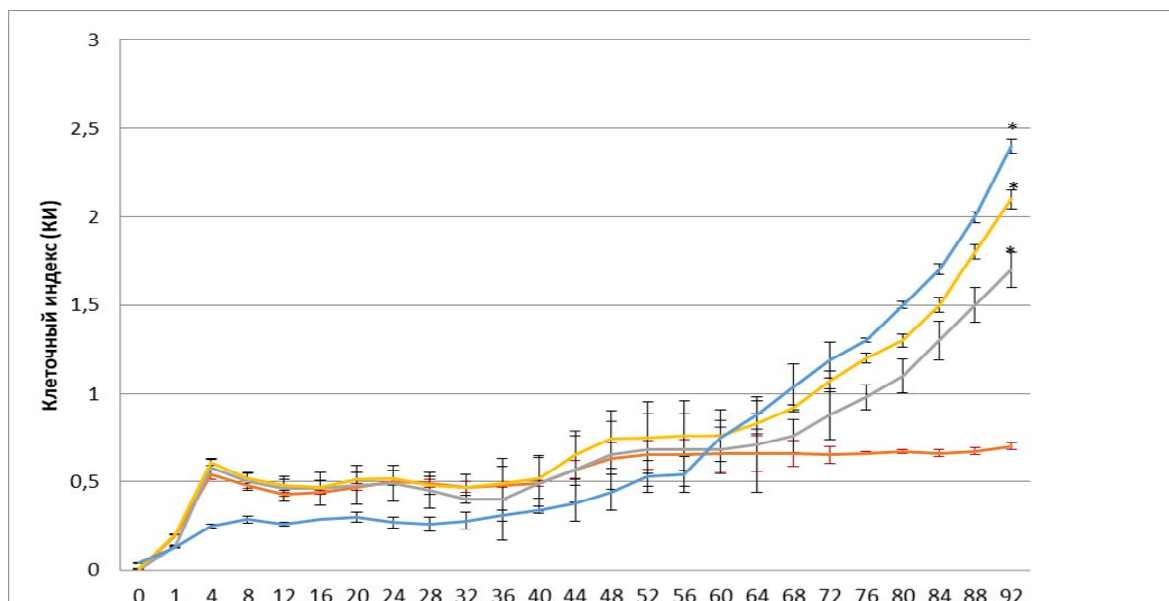


Рис. 2. Динамика изменения значений клеточного индекса ММСК в присутствии различных доз эритропоэтина

Примечание: — спонтанная пролиферация клеток, — пролиферация клеток в присутствии 34 МЕ; — пролиферация клеток в присутствии 68 МЕ, — пролиферация клеток в присутствии 100 МЕ. * - достоверность различия со спонтанной пролиферацией $p < 0,05$.

Отмечено, что пролиферативный потенциал клеток имел волнообразный характер. Нами не выявлено статистически значимого различия по уровню пролиферации ММСК с 10 по 40 час эксперимента в присутствии эритропоэтина. В этот период происходят колебания значения клеточного индекса, что связано с адгезией и распластыванием клеток в лунках планшета. На более поздних сроках эксперимента к 44-му часу отмечено увеличение пролиферативной активности ММСК в присутствии эритропоэтина в дозе 68 МЕ/мл (КИ=0,65) по сравнению с контролем (КИ=0,57). После 60-го часа эксперимента отмечено увеличение пролиферации ММСК в присутствии эритропоэтина в дозах 34, 68 и 100 МЕ/мл. В последующие часы эксперимента стимулирующее действие эритропоэтина, отражающееся в КИ, составило в дозе 34 МЕ/мл (КИ=0,71; КИ=1,7; $p < 0,05$), в дозе 68 МЕ/мл (КИ=0,83; КИ=2,1; $p < 0,05$), в дозе 100 МЕ/мл (КИ=0,88; КИ=2,4; $p < 0,05$) и усиливалось, что приводило к статистически значимому возрастанию пролиферативной активности ММСК по сравнению с контролем (КИ=0,6; КИ=0,7). Необходимо отметить, что стимулирующее действие эритропоэтина обладает дозозависимым эффектом.

Кроме того, мы провели сравнение действия эритропоэтина в дозе 34 МЕ/мл с влиянием главного фактора ангиогенеза VEGF на ММСК костного мозга крысы (рис. 3).

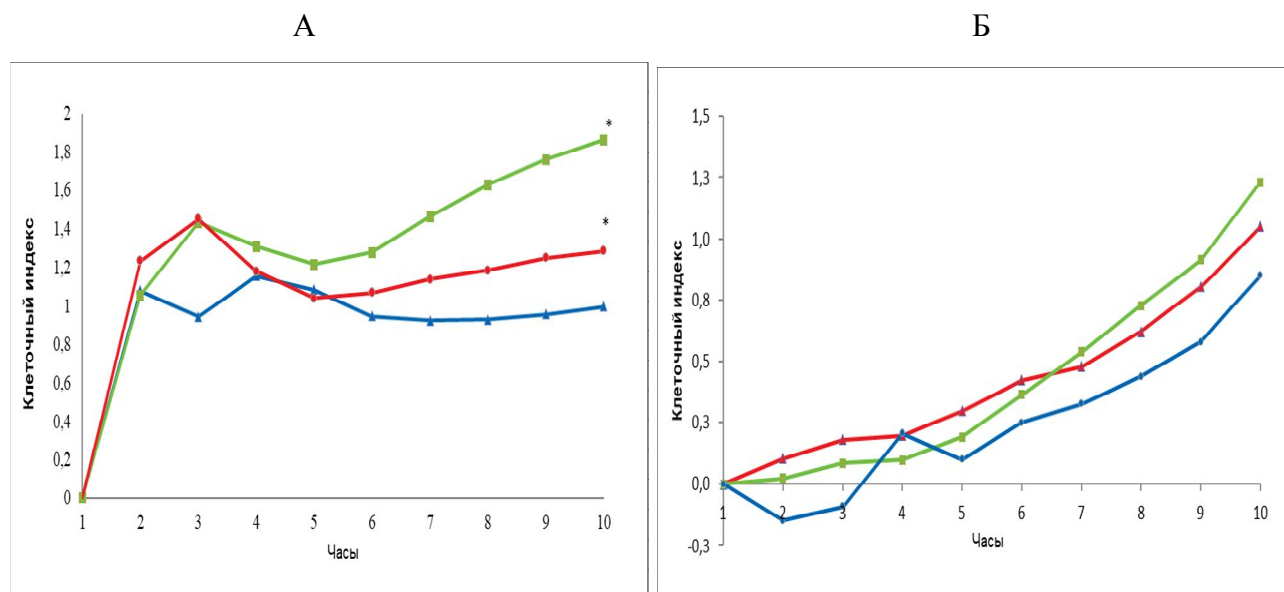


Рис. 3. Динамика изменения пролиферативной (А) и миграционной активности (Б) ММСК костного мозга в присутствии эритропоэтина и VEGF

Примечание: — спонтанная пролиферация клеток, — пролиферация клеток в присутствии VEGF; — пролиферация клеток в присутствии эритропоэтина, * - достоверность различия со спонтанной пролиферацией $p < 0,05$.

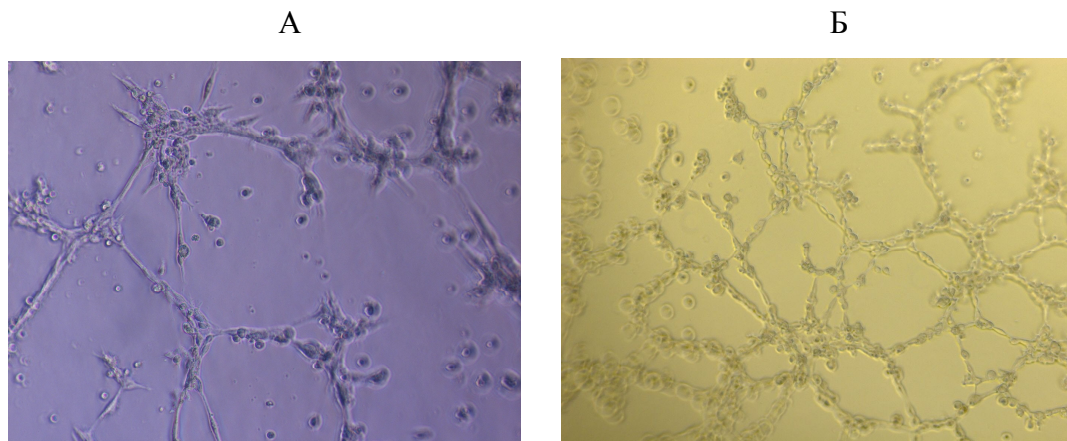
Нами не выявлено статистически значимого различия по уровню пролиферации ММСК к 8 часам эксперимента в присутствии эритропоэтина и VEGF. На более поздних сроках эксперимента к 16 часам отмечено увеличение пролиферации ММСК в присутствии VEGF (КИ=1,5) и эритропоэтина (КИ=1,5) по сравнению с контролем (КИ=1,1). Спустя ещё 8 часов отмечено снижение интенсивности пролиферации ММСК, а к 48 часам эксперимента показано, что эритропоэтин статистически значимо стимулировал пролиферативный потенциал клеток (КИ=1,6) по сравнению с VEGF (КИ= 1,1) и контролем (КИ=1). Стимулирующее влияние эритропоэтина сохранялось до конца эксперимента и достигло величины КИ=1,86. Что касается VEGF, то он оказывал стимулирующее влияние на пролиферацию ММСК (КИ=1,28) по сравнению с контролем (КИ=1,1), хотя и статистически незначимое.

В отношении миграции ММСК под влиянием эритропоэтина и VEGF не выявлено статистически значимых различий по сравнению с контролем. При этом показано, что миграционная активность ММСК в направлении градиента концентрации эритропоэтина увеличивается по сравнению с контролем, но данные не статистически значимы.

Таким образом, нами показано, что эритропоэтин в большей степени стимулирует пролиферативный потенциал ММСК, в меньшей степени стимулируя миграционную

активность клеток. Кроме того, установлено, что эритропоэтин в большей степени стимулирует пролиферацию и миграцию ММСК, чем ангиогенный фактор VEGF.

Для оценки проангиогенных свойств эритропоэтина был проведен тест по образованию первичных тубулоподобных структур на Матригеле *in vitro*. Установлено, что эритропоэтин в дозе 34 МЕ/мл стимулирует ММСК к образованию тубулоподобных структур по сравнению с контролем, где без добавления фактора ММСК не образовывали тубулярные структуры. В качестве положительного контроля использовали клетки эндотелиальной линии Ea.Hy926, которая в полной мере также образовывала тубулярную сеть (рис. 4).



*Рис. 4. Образованные тубулоподобные структуры на Матригеле *in vitro*: А – ММСК в присутствии эритропоэтина; Б – клетки эндотелиальной линии Ea.Hy.926*

Таким образом, в нашем исследовании были выявлены различия в характере и степени изменения функциональных характеристик ММСК под влиянием различных доз эритропоэтина. Ряд исследований посвящен изучению влияния эритропоэтина на пролиферацию, миграцию в модели «раны», фибробластов, мезенхимальных стволовых клеток [13; 15]. В связи с этим полученные данные о стимулирующем эффекте эритропоэтина на функциональную активность ММСК согласуются с предыдущими исследованиями. При этом необходимо отметить, что данные о влиянии эритропоэтина на пролиферацию и миграцию ММСК в режиме реального времени отсутствуют. Поэтому использованный нами метод и полученные результаты дают возможность сравнить динамику пролиферативного и миграционного ответа ММСК под действием эритропоэтина в режиме реального времени. Кроме того, установлено, что эритропоэтин обладает проангиогенными свойствами, влияя на способность ММСК к формированию тубулоподобных структур, и в большей степени стимулирует пролиферацию клеток, чем ангиогенный фактор VEGF. В связи с вышеизложенным полученные данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии эритропоэтина на функциональные свойства ММСК костного мозга крысы в отношении пролиферации и миграции клеток.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о стимулирующем влиянии эритропоэтина на функциональную активность ММСК костного мозга крысы, в частности увеличивается пролиферация, миграция клеток. Данные свойства эритропоэтина можно использовать для увеличения функциональной активности ММСК, что имеет практическое значение при использовании ММСК, предобработанных эритропоэтином, в целях клеточной терапии ишемических заболеваний.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ Номер проекта 16-34-00076.

Список литературы

1. Hirsch A.T. Critical limb ischemia and stem cell research: anchoring hope with informed adverse event reporting // Circulation. – 2006. – Vol. 114. - P. 2581-2583.
2. Burt R.K. Autologous peripheral blood CD133+ cell implantation for limb salvage in patients with critical limb ischemia / R.K. Burt, A. Testori, Y. Oyama et al. // Bone Marrow Transplant. – 2010. – Vol. 45. - P. 111-116.
3. Lawall H. Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy / H. Lawall, P. Bramlage, B.J. Amann // Vasc. Surg. – 2011. – Vol. 53. - P. 445-453.
4. Liew A. Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia / A. Liew, T. O'Brien // Stem Cell Res. Ther. – 2012. – Vol. 3. - P. 28.
5. Lai W.H. Attenuation of hind-limb ischemia in mice with endothelial-like cells derived from different sources of human stem cells / W.H Lai., J.C. Ho, Y.C. Chan et al. // PLoS One - 2013. – Vol. 8 (3). - P. e57876.
6. Повещенко О.В. Эффективность внутримышечного введения стволовых/прогениторных клеток в эксперименте на модели ишемии нижних конечностей / О.В. Повещенко, А.П. Лыков, Н.А. Бондаренко и др. // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2016. - Т. 22. - № 4. - С. 51-54.
7. Kang Y.J. Erythropoietin plus insulin-like growth factor-I protects against neuronal damage in a murine model of human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders / Y.J. Kang, M. Digicaylioglu, R. Russo et al. // Ann. Neurol. – 2010. – Vol. 68. - P. 342-352.
8. Liu N.M. Effect of erythropoietin on mesenchymal stem cell differentiation and secretion in vitro in an acute kidney injury microenvironment / N.M. Liu, J. Tian, W.W. Wang et al. // Genet. Mol. Res. – 2013. – Vol. 12. - P. 6477-6487.

9. Wang P.R. Mouse adult renal progenitor cells in combination with erythropoietin or suramin--a potential new strategy for the treatment of acute kidney injury // *Stem Cell Res. Ther.* – 2013. - Vol. 4. - P. 89.
10. Ercan E. In vitro protection of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by erythropoietin / E. Ercan, A.G. Bagla, A. Aksoy et al. // *Acta Histochem.* - 2014. – Vol. 116. - P. 117-125.
11. Bennis Y. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential / Y. Bennis, G. Sarlon-Bartoli, B. Guillet et al. // *J. Thromb. Haemost.* – 2012. – Vol. 10. - P. 1914-1928.
12. Nair A. The Effect of Erythropoietin on Autologous Stem Cell-Mediated Bone Regeneration / A. Nair, Y.T. Tsai, K. Shah, J. Shen // *Biomaterials.* – 2013. – Vol. 34. - P. 7364-7371.
13. Liu N. Effect and mechanism of erythropoietin on mesenchymal stem cell proliferation in vitro under the acute kidney injury microenvironment / N. Liu, J. Tian, W. Wang et al. // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* – 2011. - Vol. 236. - P. 1093-1099.
14. Lombardero M. Erythropoietin: A Multifunctional Hormone / M. Lombardero, K. Kovacs, B.W. Scheithauer // *Pathobiology.* – 2011. – Vol. 78. - P. 41-53.
15. Емельянова Е.А. Влияние рекомбинантного эритропоэтина на функциональную активность клеток человека в культуре / Е.А. Емельянова, А.В. Косых, Ю.В. Суханов и др. // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* - 2012. - № 2. - С. 83-87.