

## Влияние культивирования мезенхимных стволовых клеток с эритропоэтином на их морфофункциональные свойства

А.П. Лыков<sup>1,2</sup>, М. Хевор<sup>3</sup>, М.А. Суровцева<sup>1,2</sup>, Н.А. Бондаренко<sup>1,2</sup>, И.И. Ким<sup>1,2</sup>,  
О.В. Повещенко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ клинической и экспериментальной лимфологии –  
филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН  
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

<sup>2</sup> НМИЦ имени академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России  
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

<sup>3</sup> Институт медицины и психологии им. В. Зельмана Новосибирского государственного университета  
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1

### Резюме

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) рассматриваются как перспективный инструмент для лечения воспалительно-дегенеративных заболеваний, но их эффективность связана с выживаемостью клеток в неблагоприятном микроокружении. Эритропоэтин проявляет антиапоптотический эффект для негемопоэтических клеток организма человека и животных. Целью исследования стала оценка морфофункциональных свойств МСК, культивированных с эритропоэтином. **Материал и методы.** МСК получены из аспирата костного мозга больных хронической сердечной недостаточностью. Первичную культуру МСК-ЭПО получали культивированием МСК 4-го пассажа в течение 7–8 дней с эритропоэтином в дозе 33 МЕ/мл. Исследовали фенотип МСК, их дифференцировку в адипогенном и остеогенном направлении, пролиферацию, миграцию и продукцию клетками оксида азота. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что культивирование МСК с эритропоэтином способствует увеличению экспрессии основных поверхностных молекул, характеризующих принадлежность клеток к истинным МСК, большей выраженности дифференцировки МСК в адипоциты и остеобласты, изменению уровня экспрессии молекул адгезии, снижению выраженности апоптоза, усилению миграции клеток при индукции окислительного стресса и гипергликемии. **Заключение.** Культивирование МСК с эритропоэтином способствует увеличению устойчивости клеток к неблагоприятным факторам микроокружения.

**Ключевые слова:** мезенхимные стволовые клетки костного мозга, эритропоэтин, пролиферация, колониеобразование, миграция, молекулы адгезии, клеточный цикл, апоптоз/некроз, оксид азота.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Лыков А.П., e-mail: aplykov2@mail.ru

**Для цитирования:** Лыков А.П., Хевор М., Суровцева М.А., Бондаренко Н.А., Ким И.И., Повещенко О.В. Влияние культивирования мезенхимных стволовых клеток с эритропоэтином на их морфофункциональные свойства. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 53–61. doi: 10.18699/SSMJ20210507

## Effect of mesenchymal stem cells cultivation with erythropoietin on their morphofunctional properties

A.P. Lykov<sup>1,2</sup>, M. Khevor<sup>3</sup>, M.A. Surovtseva<sup>1,2</sup>, N.A. Bondarenko<sup>1,2</sup>, I.I. Kim<sup>1,2</sup>,  
O.V. Poveshchenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology –  
Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS  
630060, Novosibirsk, Timakov str., 2

<sup>2</sup> Meshalkin National Medical Research Center of Minzdrav of Russia  
630055, Novosibirsk, Reshkunovskaya str., 15

<sup>3</sup> V. Zelman Institute of Medicine and Psychology of Novosibirsk State University  
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 1

## Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are considered as a promising tool for the treatment of inflammatory and degenerative diseases, but their effectiveness is associated with the survival of cells in an unfavorable microenvironment. Erythropoietin exhibits an anti-apoptotic effect for non-hematopoietic cells of the human and animal body. The aim of the study was to evaluate the morphofunctional properties of MSCs cultured with erythropoietin. **Material and methods.** MSCs were obtained from bone marrow aspirate of patients with chronic heart failure. The primary culture of MSCs-EPO was obtained by growth MSCs of the 4th passage for 7-8 days with erythropoietin at a dose of 33 IU/mL. The phenotype, differentiation in the adipogenic and osteogenic directions, proliferation, migration, and production of nitric oxide of MSCs were studied. **Results and discussion.** The study revealed that the cultivation of MSCs with erythropoietin contributes to an increase in the expression of the main surface molecules that characterize the cells belonging to true MSCs, possess to differentiated of MSCs into adipocytes and osteoblasts, a change in the expression levels of adhesion molecules, a decrease in the level of apoptosis, increased cell migration during the induction of oxidative stress and hyperglycemia. **Conclusion.** Cultivation of MSCs with erythropoietin increases the resistance of cells to adverse microenvironment factors.

**Key words:** bone marrow mesenchymal stem cells, erythropoietin, proliferation, colony formation, migration, adhesion molecules, cell cycle, apoptosis/necrosis, nitric oxide.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Lykov A.P., e-mail: aplykov2@mail.ru

**Citation:** Lykov A.P., Khevor M., Surovtseva M.A., Bondarenko N.A., Kim I.I., Poveshchenko O.V. Effect of mesenchymal stem cells cultivation with erythropoietin on their morphofunctional properties. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2021; 41 (5): 53–61. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210507

## Введение

Мезенхимные стволовые клетки (МСК), производные мезодермы, представляют собой популяцию клеток человека и животных, вовлеченных в формирование каркаса паренхиматозных органов, и относятся к стволовым в силу способности к самообновлению, дифференцировке в различные типы клеток соединительной ткани [1]. Способность МСК стимулировать процессы репарации и регенерации поврежденных органов и тканей при воспалительно-дегенеративных процессах в организме человека и животных делает их привлекательными для использования в качестве альтернативного инструмента при лечении различных патологических процессов воспалительно-дегенеративного генеза [2]. Однако при старении и хронических заболеваниях человека и животных уменьшается пул стволовых клеток, они теряют свои функциональные свойства, такие как пролиферация, миграция и продукция биоактивных соединений, что может привести к значительному снижению регенеративного потенциала клеток [3]. Эритропоэтин (ЭПО) помимо активации эритропоэза способен оказывать антиапоптотическое действие на другие клетки организма человека и животных [4]. Требуется разработка методов повышения устойчивости МСК к неблагоприятным факторам микроокружения в патологическом очаге с использованием биологически активных молекул, в том числе с использованием ЭПО.

Цель работы – сравнительное изучение морфофункциональных свойств МСК, полученных от больных ишемической болезнью сердца и рожавших в отсутствие и в присутствии ЭПО.

## Материал и методы

Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, от всех участников получено информированное согласие. Из аспирата костного мозга больных хронической сердечной недостаточностью на градиенте плотности фикола-верографина получали обогащенную фракцию мононуклеаров костного мозга, клетки вносили в питательной среде DMEM («Биолот», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; Hyclone, США), 2 mM L-глутамин («Биолот») и гентамицин сульфата («Дальхимфарм», Россия) в культуральные матрасы на 2–3 суток. Удаляли неприлипающие к пластику клетки и обновляли питательную среду каждые 3–4 дня до получения монослоя в 80–90 % конfluence. Пересев клеток осуществляли раствором трипсина и ЭДТА (1:1; «Биолот»). В работе использованы клетки 4-го пассажа. Культивирование МСК с эритропоэтином («Рекормон», Швейцария) в дозе 33 МЕ/мл осуществляли в течение 7 дней, далее клетки снимали с пластика и исследовали их морфофункциональные свойства (МСК-ЭПО).

Принадлежность полученных клеток к истинным МСК оценивали по фенотипу, дифферен-

цировке в соединительнотканном направлении. Фенотип МСК определяли на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) с использованием программного обеспечения FACS Diva (BD) по экспрессии на них CD90, CD73 (BD). Для дифференцировки МСК и МСК-ЭПО в остеогенном направлении использовали питательную среду, состоящую из DMEM с 10 % ЭТС, 2 mM L-глутамин, 5 mM HEPES-буфера (Sigma, США), 80 мкг/мл гентамицина сульфата,  $10^{-9}$  М дексаметазона («Эллара», Россия), 10 mM  $\beta$ -глицерофосфата (Merck, США) и 50 мкг/мл аскорбат-2-фосфата (Merck), клетки инкубировали при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> в течение 21 дня в 6-луночных культуральных планшетах (TPP, Швейцария). Каждые 3–4 дня меняли питательную среду. Для дифференцировки МСК и МСК-ЭПО в адипогенном направлении использовали питательную среду, состоящую из DMEM с 10 % ЭТС, 2 mM L-глутамин, 5 mM HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина сульфата,  $10^{-7}$  М дексаметазона и 0,5 mM изобутилметилксантина (Merck), клетки инкубировали при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> в течение 21 дня в 6-луночных планшетах (TPP). Каждые 3–4 дня меняли питательную среду. После окрашивания клеток масляным красным O (Serva, Германия), по Фон Косса (депозиты кальция выявляли с использованием 1%-го раствора азотнокислого серебра и 5%-го раствора тиосульфата натрия; Merck) с последующим окрашиванием фиксатор-красителем Май – Грюнвальда («Абрис»+, Россия) делали фотографии на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Экспрессию поверхностных молекул адгезии на МСК и МСК-ЭПО исследовали с использованием моноклональных антител к CD18 (интегрин бета-2), CD29 (интегрин бета-1), CD44 (интегральный клеточный гликопротеин, рецептор гиалуриновой кислоты), CD49a (интегрин альфа-1), CD54 (межклеточная молекула адгезии-1) и CD146 (молекула адгезии клеток меланомы), а также рецепторов к ЭПО (ЭПОР),  $\beta$ -субъединицы нескольких высокоаффинных цитокиновых рецепторов I CD131 и ко-экспрессию ЭПОР/CD131 на МСК и МСК-ЭПО исследовали с использованием соответствующих моноклональных антител (BD) на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD).

Клеточный цикл МСК и МСК-ЭПО оценивали с использованием пропидиума йодида (20 мкг/мл; BD), при анализе гистограммы распределения клеток выделяли фазы subG<sub>0</sub>G<sub>1</sub> (количество хромосом < 2n), G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> (количество хромосом 2n), G<sub>2</sub>/M (количество хромосом 2n–4n), S (количество хромосом > 4n). Параметры апоптоза и некроза МСК и МСК-ЭПО исследовали с ис-

пользованием аннексина V и пропидиума йодида (Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit, BD, США), выделяя гейт мертвых (некротических) клеток, окрашенных только пропидиума йодидом; раннего апоптоза клеток, окрашенных только аннексином V; апоптотических клеток, окрашенных аннексином V и пропидиума йодидом.

Пролиферацию МСК и МСК-ЭПО оценивали по включению клетками 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (MTT; Merck). Для этого МСК или МСК-ЭПО в количестве  $10^4$  на лунку вносили в триплетах в 96-луночный планшет (TPP) в питательной DMEM (25 мкг/мл D-глюкозы) с 10 % ЭТС, 2 mM L-глутамин, 5 mM HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина в присутствии и в отсутствие перекиси водорода (100 мкг; Merck), 64 мкг/л D-глюкозы и ЭПО (33 МЕ/мл) и инкубировали в течение 72 часов при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. За 4 часа до окончания эксперимента планшеты центрифугировали при 1500 оборотов в минуту в течение 5 минут на центрифуге с охлаждением Eppendorf (Германия), надосадочную жидкость удаляли и вносили 100 мкл DMEM без дополнительных ингредиентов, 10 мкл MTT (5 г/л; Sigma, США) и инкубировали в течение 4 часов при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. Далее надосадочную жидкость удаляли, в лунки вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (Merck) с последующей оценкой оптической плотности продукта реакции в лунках на спектрофотометре Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) при длине волны  $\lambda = 492$  нм, результат выражали в условных единицах оптической плотности (ед. оп. плот.).

Трансмембранную миграцию МСК и МСК-ЭПО костного мозга больных хронической сердечной недостаточностью изучали с использованием камер Бойдена (BD Falcon TM, США) с микропорами в мембране 8 мкм. Для этого МСК или МСК-ЭПО в количестве  $10^4$  на лунку вносили в триплетах в камеры Бойдена, которые были вставлены в лунки 24-луночного планшета (TPP), в лунки вносили питательную среду DMEM с 10 % ЭТС, 2 mM L-глутамин, 5 mM HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина в присутствии и в отсутствие перекиси водорода (100 мкг; Merck), 64 мкг/л D-глюкозы и ЭПО (33 МЕ/мл) и инкубировали в течение 24 часов при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. По окончании срока эксперимента камеры Бойдена извлекали из лунок, удаляли жидкость, протирали верхнюю часть мембраны ватными тампонами для удаления клеток, окрашивали фиксатор-красителем Май – Грюнвальда в течение 15 минут, промывали, подсушивали, оценивали количество мигрировавших клеток в направлении градиента ростовых факторов на микроскопе Axio Observer Z1 (Zeiss AG, Германия).

Таблица 1. Фенотип МСК

Table 1. Phenotype of mesenchymal stem cells

Параметр	МСК	МСК-ЭПО
CD73, %	64,07 ± 1,29	91,93 ± 0,58*
CD90, %	90,33 ± 0,47	94,00 ± 1,41*
CD18, %	2,30 ± 0,57	5,83 ± 4,09
CD18/CD54, %	0,33 ± 0,05	1,01 ± 0,16*
CD54, %	19,30 ± 3,23	7,90 ± 0,78*
CD29, %	91,73 ± 0,93	96,20 ± 0,45*
CD44, %	92,53 ± 1,26	92,93 ± 0,4
CD49a, %	13,07 ± 1,24	13,97 ± 0,81
CD146, %	10,13 ± 0,05	10,13 ± 0,05
ЭПОР, %	7,23 ± 1,92	10,37 ± 1,94
CD131, %	3,67 ± 1,91	5,70 ± 2,74
ЭПОР/CD131, %	2,37 ± 0,9	2,77 ± 0,56

**Примечание.** Здесь и далее \* – отличие от величины соответствующего показателя МСК статистически значимо при  $p < 0,05$ .

Для оценки колониеобразующих единиц (КОЕ)  $10^3$  МСК или МСК-ЭПО помещали в культуральный флакон Т75 на 14 суток в питательной среде, состоящей из DMEM с 10 % ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 5 мМ HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина без добавления и с добавлением перекиси водорода (100 мкМ; Merck), 64 мкМ/л D-глюкозы и ЭПО (33 МЕ/мл), инкубировали при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Каждые 3–4 дня меняли питательную среду. На 15-е сутки питательную среду удаляли, клетки промывали и красили 1%-м спиртовым раствором метиленового синего, подсчитывали количество КОЕ, содержащих более 50 клеток, на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1.

Производство МСК или МСК-ЭПО стойких метаболитов оксида азота (нитритов) определяли спектрофотометрически ( $\lambda = 492$  нм) с использованием реактива Грисса в кондиционных средах [5], строили калибровочную кривую с использованием 1 мМ нитрита натрия, выражали в мкмоль/мл.

Нормальность распределения полученных данных оценивали с использованием w-критерия Шапиро – Уилка, в таблицах данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ), статистическую значимость различий между образцами оценивали однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с использованием поправки Бонферрони и принимали при  $p < 0,05$ . Наличие взаимосвязей между явлениями исследовали с использованием коэффициента ранговой корреляции по Спирмену ( $R$ ).

Таблица 2. Клеточный цикл, апоптоз и некроз МСК

Table 2. Cell cycle, apoptosis and necrosis of the mesenchymal stem cells

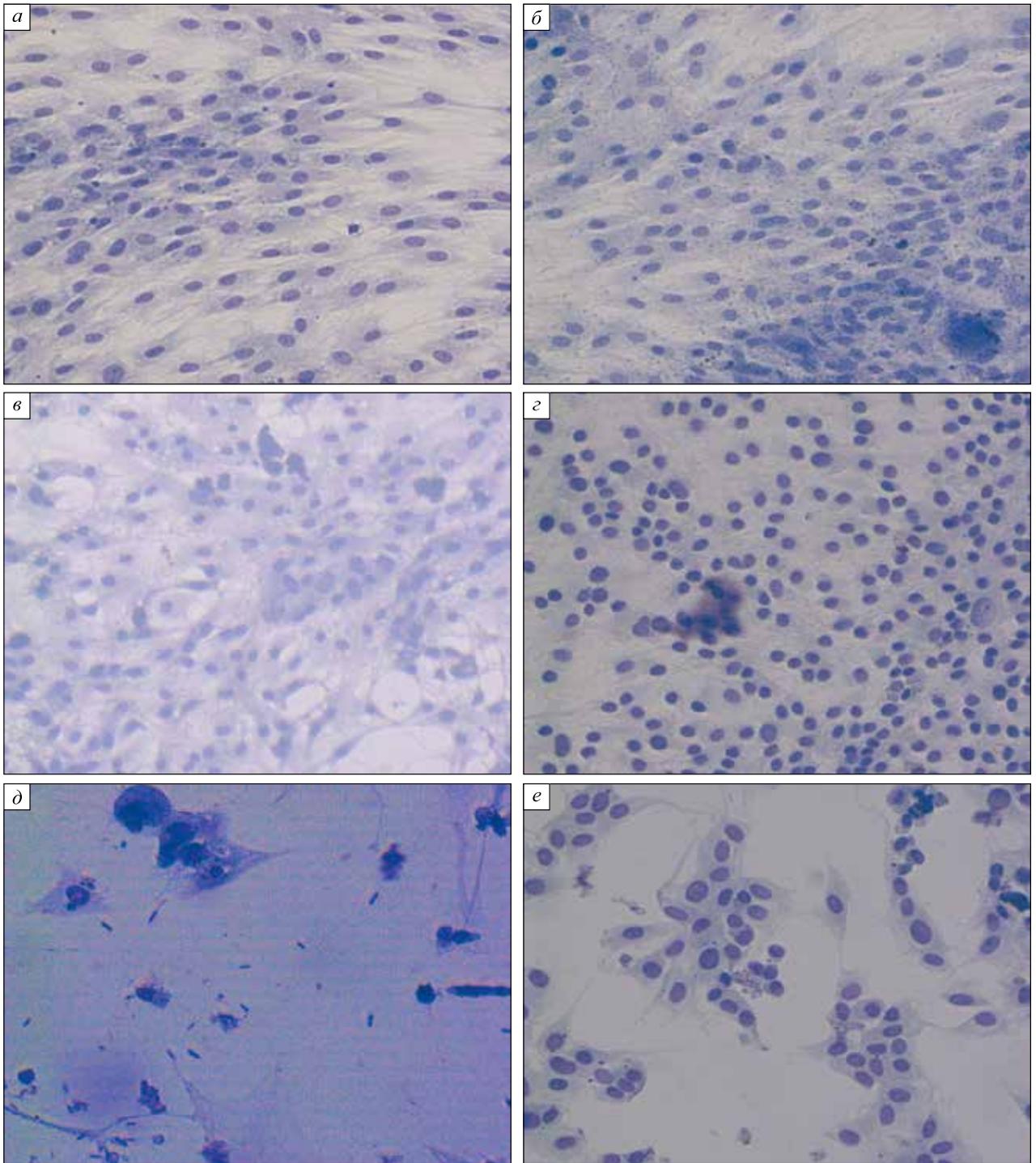
Параметр	МСК	МСК-ЭПО
subG <sub>0</sub> G <sub>1</sub> , %	2,02 ± 0,18	2,03 ± 0,78
G <sub>0</sub> G <sub>1</sub> , %	76,20 ± 7,22	80,03 ± 9,89
S, %	9,37 ± 3,34	10,00 ± 0,82
G <sub>2</sub> /M, %	15,67 ± 4,19	5,00 ± 0,49
Ранний апоптоз, %	6,67 ± 3,86	6,03 ± 3,7
Апоптоз, %	11,70 ± 1,75	6,57 ± 2,36*
Некроз, %	8,90 ± 3,97	5,00 ± 0,49

## Результаты

Выделенные из костного мозга больных МСК относятся к истинным МСК, так как экспрессируют CD73, CD90 и дифференцируются в адипогенном и остеогенном направлении. Культивирование МСК 4-го пассажа в течение 7–8 дней с ЭПО значимо увеличивало экспрессию CD73, CD90 на их мембране (табл. 1), способствовало большей дифференцировке клеток в адипоциты и остеобласты (рис. 1), увеличивало представленность на мембране клеток молекул адгезии (CD18/CD54, CD29), но снижало экспрессию CD54 по сравнению с МСК (см. табл. 1). Отмечена тенденция к увеличению экспрессии на МСК-ЭПО рецепторов к ЭПО и CD131 ( $p > 0,05$ ). Также установлено, что культивирование МСК с ЭПО значимо снижает количество клеток в апоптозе, несколько увеличивает пул клеток в фазе покоя и синтеза клеточного цикла (G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>, S), уменьшает пул клеток в фазе митоза клеточного цикла (G<sub>2</sub>/M) и долю некротических клеток ( $p > 0,05$ ) (табл. 2).

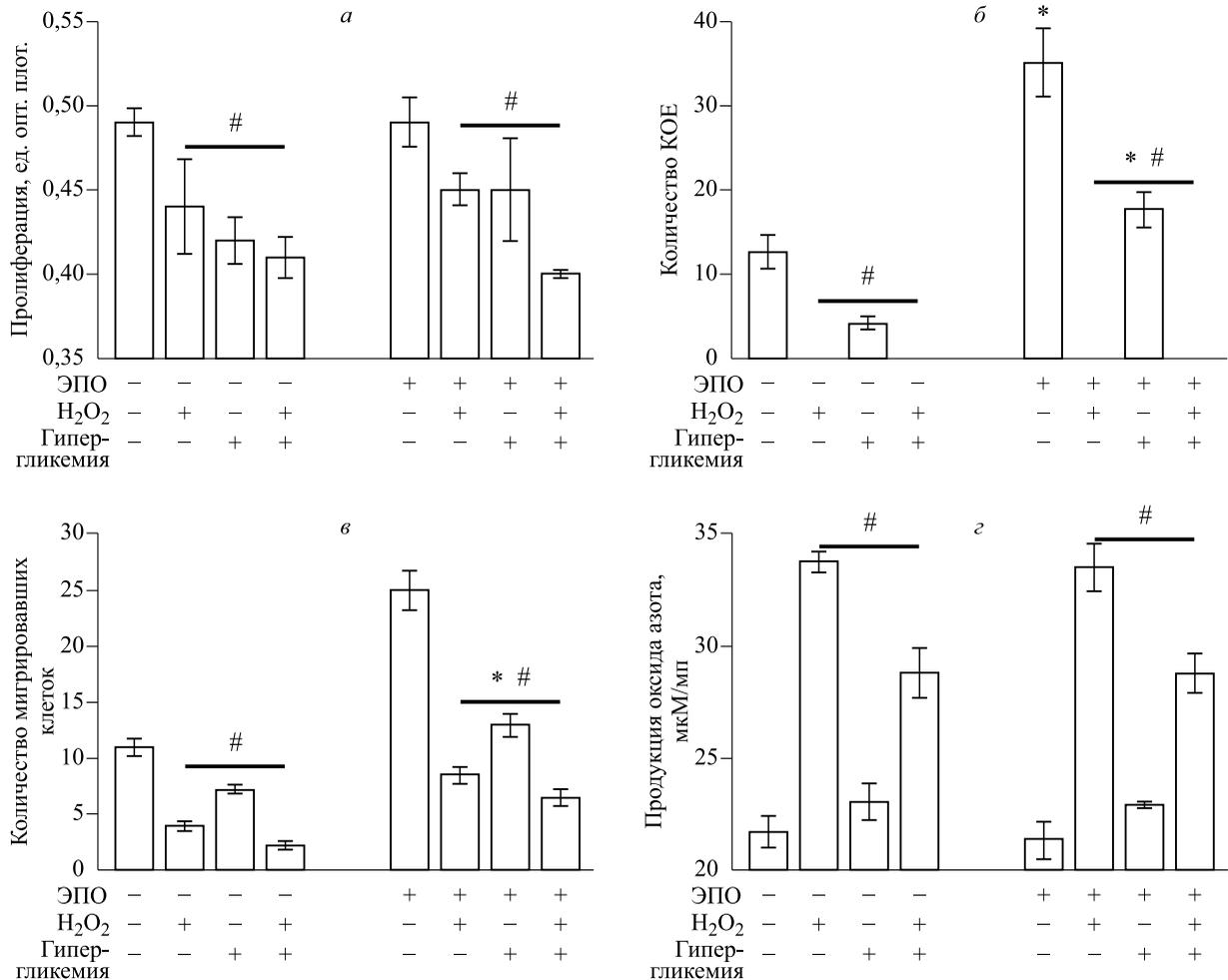
Следующим этапом работы стало сравнительное изучение функционального потенциала МСК и МСК-ЭПО при индукции неблагоприятного микроокружения (окислительного стресса и гипергликемии). Нами не выявлено существенного влияния ЭПО на пролиферативный потенциал МСК как в базальных условиях, так и при индукции окислительного стресса, гипергликемии и их комбинации (рис. 2, а;  $p > 0,05$ ), в то же время пролиферация клеток в обеих группах в неблагоприятном микроокружении значимо уменьшалась по сравнению с базальным уровнем, так же как их колониеобразующий потенциал, при этом МСК-ЭПО по сравнению с МСК формируют больше колоний как в стандартных условиях роста, так и при индукции гипергликемии (рис. 2, б, рис. 3).

Окислительный стресс и гипергликемия снижали миграцию МСК и МСК-ЭПО, но более значимо в группе «МСК» (рис. 2, в). Установлено,



**Рис. 1.** МСК, росшие в стандартных условиях культивирования (а) и при добавлении ЭПО (б) (33 МЕ/мл), окраска по Май – Грюнвальду,  $\times 40$ ; адипогенная дифференцировка МСК, росших в стандартных условиях культивирования (в) и при добавлении ЭПО (г), окраска масляным красным О и по Май – Грюнвальду,  $\times 40$ ; остеогенная дифференцировка клеток, росших в стандартных условиях культивирования (д) и при добавлении ЭПО (е), окраска по Фон Косса и Май – Грюнвальду,  $\times 40$

**Fig. 1.** Mesenchymal stem cells that grew under standard cultivation conditions (a) and in the presence of erythropoietin (б) (33 IU/ml), May – Grunwald stain,  $\times 40$ ; adipogenic differentiation of cells that grew under standard cultivation conditions (в) and in the presence of erythropoietin (г), oil red O and May – Grunwald stain,  $\times 40$ ; osteogenic differentiation of cells that grew under standard cultivation conditions (д) and in the presence of erythropoietin (е), Von Kossa and May – Grunwald stain,  $\times 40$



**Рис. 2.** Влияние окислительного стресса и гипергликемии на пролиферацию (а), колониобразование (б), миграционный потенциал (в) и продукцию МСК оксида азота (г); # – отличие от величины соответствующего базального уровня статистически значимо при  $p < 0,05$

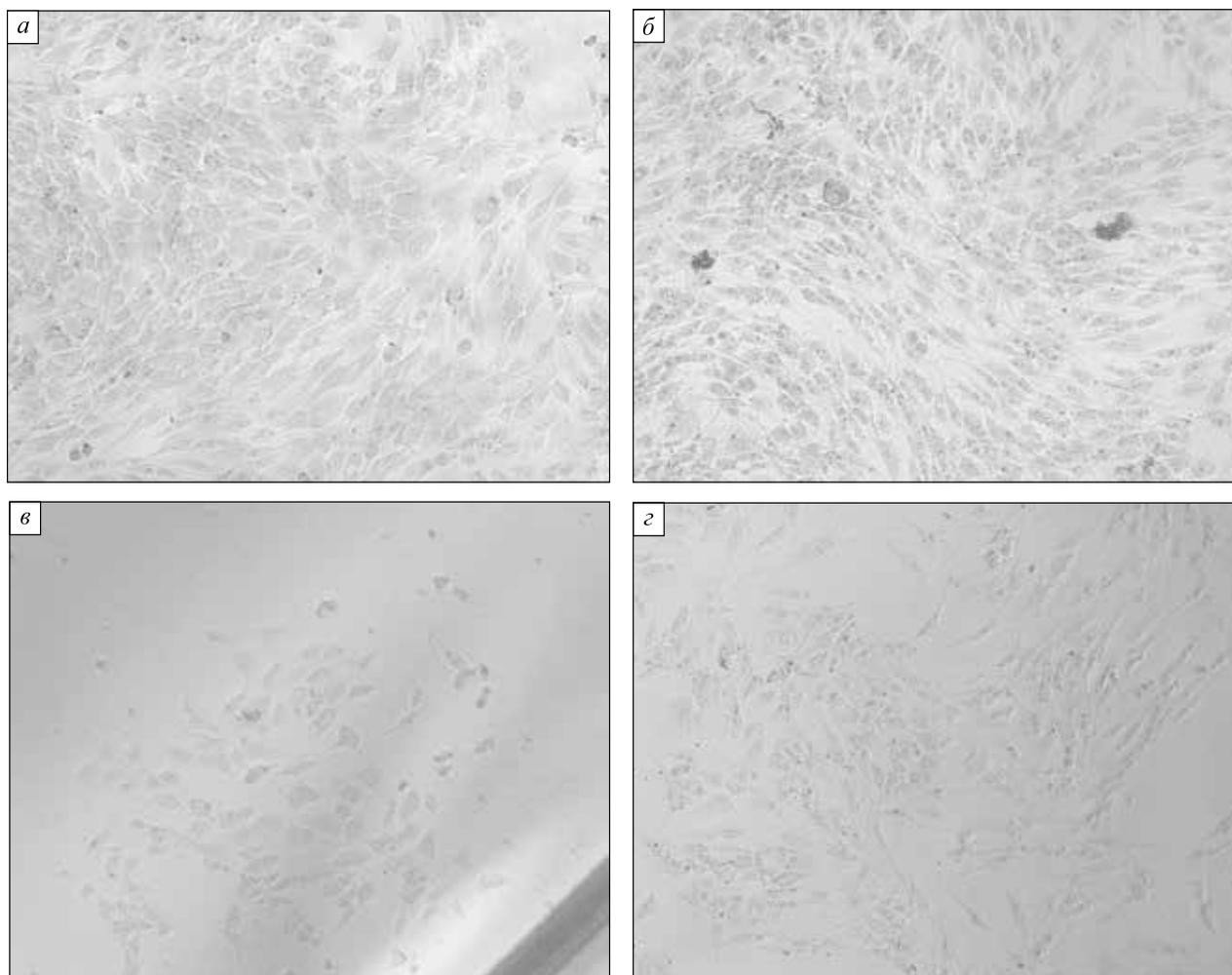
**Fig. 2.** The effect of oxidative stress and hyperglycemia on proliferation (a), colony formation (б), migration potential (в) and nitric oxide production by mesenchymal stem cells; \* –  $p < 0.05$  compared to mesenchymal stem cells without erythropoietin, # –  $p < 0.05$  compared to basal level

что культивирование МСК с ЭПО способствует большей сохранности миграции клеток при индукции неблагоприятного микроокружения. По уровню базальной продукции оксида азота МСК и МСК-ЭПО значимо не различались (рис. 2, г;  $p > 0,05$ ), но для обеих групп характерен прирост уровня оксида азота в кондиционной среде в условиях окислительного стресса, гипергликемии и их комбинации относительно базального уровня.

Корреляционный анализ полученных данных в группе «МСК» выявил наличие сопряженности базального пролиферативного потенциала клеток с экспрессией CD90, CD18, CD54 ( $R = 0,97$ ;  $p = 0,005$ ), количеством ЭПОР и ранним апоптозом ( $R = 0,89$ ;  $p = 0,04$ ), экспрессией CD131 и долей клеток в фазе синтеза ( $R = -0,89$ ;  $p = 0,04$ ), что может указывать на важность данных маркеров в процессе деления клеток. Кроме этого коло-

ниеобразующая способность МСК в стандартных условиях роста взаимосвязана с выраженностью экспрессии CD54, CD29, CD44, CD49a, CD131, ЭПОР/CD131, долей некротических клеток и долей клеток в фазе синтеза ( $R = 0,97$ ;  $p = 0,028$ ). С другой стороны, колониобразование МСК находится в обратной связи с экспрессией ЭПОР, долей клеток в раннем апоптозе и в фазе покоя клеточного цикла ( $R = -0,91$ ;  $p = 0,028$ ), свидетельствуя о вовлеченности вышеперечисленных факторов в процесс жизнедеятельности клеток.

В группе «МСК-ЭПО» базальная пролиферация взаимосвязана с выраженностью экспрессии CD73, CD29, CD44, CD49a ( $R = 0,89$ ;  $p = 0,04$ ), CD146 ( $R = 0,97$ ;  $p = 0,005$ ), долей клеток в апоптозе и митозе ( $R = 0,89$ ;  $p = 0,04$ ), что также может быть следствием вовлеченности данных мембранных молекул в реализацию пролифера-



**Рис. 3.** Колонии МСК, росших в стандартных условиях культивирования (а), при добавлении ЭПО (б), при индукции гипергликемии (в), при добавлении ЭПО и индукции гипергликемии (г). Окраска по Май – Грюнвальду,  $\times 20$

**Fig. 3.** Colonies of mesenchymal stem cells that grew under standard cultivation conditions (a), with the addition of erythropoietin (б), with hyperglycemia induction (в), with the addition of erythropoietin and hyperglycemia induction (г). May – Grunwald stain,  $\times 20$

тивного потенциала клеток. Колониеобразующий потенциал МСК-ЭПО сопряжен с экспрессией CD73, CD54, CD29, CD44, CD49a, CD131, долей некротических клеток ( $R = -0,91$ ;  $p = 0,028$ ) и количеством ЭПОР ( $R = -0,91$ ;  $p = 0,028$ ), указывая на существенный вклад молекул адгезии и рецепторов к ЭПО в реализацию формирования очагов роста и в пролиферативную активность клеток. Продукция оксида азота МСК-ЭПО находилась в сопряженности с долей апоптотических/некротических клеток ( $subG_0G_1$ ) и клеток в фазе покоя ( $G_0G_1$ ) клеточного цикла ( $R = 0,89$ ;  $p = 0,04$  и  $R = -0,89$ ;  $p = 0,04$  соответственно), долей клеток в раннем апоптозе ( $R = -0,89$ ;  $p = 0,04$ ) и долей некротических клеток ( $R = 0,91$ ;  $p = 0,028$ ), что может быть следствием диффузии во внешнюю среду содержимого цитоплазмы, в том числе мо-

лекул оксида азота, при нарушении целостности мембраны клеток.

### Обсуждение

МСК рассматриваются как альтернативный инструмент при лечении многих воспалительно-дегенеративных процессов [6, 7]. Функциональный потенциал МСК зависит от источника выделения клеток: так, тип жировой ткани влияет на жизнеспособность и цитодифференцировку выделенных из нее МСК [8].

Нами выделены МСК из костного мозга больных хронической сердечной недостаточностью, по фенотипу и потенциалу дифференцировки в клетки соединительной ткани – это истинные МСК. При культивировании МСК с ЭПО выявлено изменение экспрессии основных марке-

ров принадлежности клеток к истинным МСК и молекул адгезии, обеспечивающих интеграцию клеток, усиление выраженности их дифференцировки в адипоциты и остеобласты, повышение устойчивости к неблагоприятным факторам микроокружения. Показано, что на мембране МСК костного мозга крыс имеются CD44, CD54 [9]. Интенсивность пролиферации МСК зависит от уровня глюкозы: при концентрации глюкозы от 5,5 до 25 мМ она усиливается, при содержании более 40 мМ – снижается [10]. Культивирование МСК с ЭПО в дозе 500 МЕ/мл значимо увеличивало интенсивность пролиферации и миграции клеток [11].

Таким образом, культивирование МСК с ЭПО наделяет клетки повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам микроокружения, на уровне тенденции увеличивает экспрессию ЭПОР и ко-экспрессию ЭПОР с CD131, способствует более выраженной дифференцировке МСК в соединительнотканном направлении, что можно рассматривать как факт приобретения клетками новых морфофункциональных свойств, способствующих повышению их выживаемости и способности к регенерации. Необходимы доклинические испытания МСК-ЭПО с целью подтверждения терапевтического потенциала клеток.

## Выводы

1. Культивирование МСК с ЭПО увеличивает экспрессию на них маркеров принадлежности к истинным МСК, интенсивность дифференцировки клеток в адипоциты и остеоциты.

2. Культивирование МСК с ЭПО увеличивает экспрессию на них молекул адгезии CD18/CD54 и CD29, снижает долю апоптотических клеток.

3. Культивирование МСК с ЭПО увеличивает количество колониеобразующих клеток и способствует большей сохранности миграционного потенциала клеток при неблагоприятном микроокружении.

## Список литературы / References

1. Паюшина О.В. Локализация и функции мезенхимных стромальных клеток *in vivo*. *Журн. общей биологии*. 2015; 76 (2): 161–172.

Payushina O.V. Localization and functions of mesenchymal stromal cells *in vivo*. *Zhurnal obshchey biologii = J. General Biol.* 2015; 76 (2): 161–172. [In Russian].

2. Лыков А.П., Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., Миллер Т.В., Повещенко А.Ф., Суровцева М.А., Бгатова Н.П., Коненков В.И. Перспективность использования клеточного продукта для терапии кожных дефектов при сахарном диабете. *Клеточ. технол. в биол. и мед.* 2017; 3: 175–177.

Lykov A.P., Bondarenko N.A., Poveshchenko O.V., Miller T.V., Poveshchneko A.F., Surovtseva M.A., Bgatova N.P., Konenkov V.I. Prospect of using cell product for the therapy of skin defects in diabetes mellitus. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017; 164: 266–268.

3. Taguchi T., Borjesson D.L., Osmond C., Grifon D.J. Influence of donor's age on immunomodulatory properties of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2019; 28 (23): 1562–1571. doi: 10.1089/scd.2019.0118

4. Hu R., Cheng Y., Jing H., Wu H. Erythropoietin promotes the protective properties of transplanted endothelial progenitor cells against acute lung injury via PI3K/Akt pathway. *Shock.* 2014; 42 (4): 327–336. doi: 10.1097/SHK.0000000000000216

5. Korolenko T.A., Goncharova N.V., Karmatskikh O.L., Johnston T.P., Machova E., Nescakova Z., Bgatova N.P., Lykov A.P., Shintyapina A.B., Maiborodin I.V. Hypolipidemic effect of mannans from *C. albicans* serotype A and B in acute hyperlipidemia in mice. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018; 107: 2385–2394. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.111

6. Красина М.Е., Кошелева Н.В., Липина Т.В., Карганов М.Ю., Медведева М.А., Лебедева В.А., Зурина И.М., Сабурин И.Н. Восстановительный потенциал суспензии и сфероидов мультипотентных мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека на модели инфаркта миокарда крыс. *Клеточ. технол. в биол. и мед.* 2020; 2: 89–97.

Krasina M.E., Kosheleva N.V., Lipina T.V., Karganov M.Yu., Medvedeva M.A., Lebedeva V.A., Zurina I.M., Saburina I.N. Regenerative potential of a suspension and spheroids of multipotent mesenchymal stromal cells from the human umbilical cord on myocardial infarction model in rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2020; 169: 549–557.

7. Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., Лыков А.П., Бондаренко Н.А., Дружинина Ю.В., Коненков В.И. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки для терапии дисфункции лимбального эпителия. *Бюл. СО РАМН*. 2014; 34 (3): 48–55.

Poveshchenko O.V., Poveshchenko A.F., Lykov A.P., Bondarenko N.A., Druzhinina Yu.V., Konenkov V.I. Multipotent mesenchymal stromal cells for therapy of the limbal epithelium dysfunction. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences.* 2014; 34 (3): 48–55. [In Russian].

8. Jurgens W.J., Oedayrajsingh-Varma M.L., Helper M.N., Zandiehoulabi B., Schouten T.E., Kuik D.J., Ritt M.J., van Milligen F.J. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* 2008; 332 (3): 415–426. doi: 10.1007/s00441-007-0555-7

9. Zhang B., Wang F., Deng L., Dun A., Dong L., Li J., Yang H. [Isolating and culturing rat marrow mesenchymal stem cells and studying their phenotypical

and functional properties]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2003; 34 (4): 738–741. [In Chinese].

10. Chen Y., Hu Y., Yang L., Zhou J., Tang Y.Y., Zheng L.L. Effects of different concentrations of glucose on the osteogenic differentiation of orofacial bone mesenchymal stem cells. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2016; 47 (5): 679–684. [In Chinese].

11. Zhou S., Liu Y.G., Zhang Y., Hu J.M., Liu D., Chen H., Li M., Guo Y., Fan L.P., Li L.Y., Zhao M. Bone mesenchymal stem cells pretreated with erythropoietin enhance the effect to ameliorate cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. *J. Cell Biochem*. 2018; 119 (10): 8220–8232. doi: 10.1002/jcb.26833

**Сведения об авторах:**

**Александр Петрович Лыков**, к.м.н., ORCID: 0000-0003-4897-8676, e-mail: aplykov2@mail.ru

**Майкл Хевор**, e-mail: m.khevor@g.nsu.ru

**Мария Александровна Суровцева**, к.м.н., ORCID: 0000-0002-4752-988X, e-mail: mfelde@ngs.ru

**Наталья Анатольевна Бондаренко**, к.б.н., ORCID: 0000-0002-8443-656X, e-mail: bond80288@yandex.ru

**Ирина Иннокентьевна Ким**, к.м.н., ORCID: 0000-0002-7380-2763, e-mail: kii5@yandex.ru

**Ольга Владимировна Повешенко**, д.м.н., ORCID: 0000-0001-9956-0056, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru

**Information about the authors:**

**Alexander P. Lykov**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-4897-8676, e-mail: aplykov2@mail.ru

**Michael Khevor**, e-mail: m.khevor@g.nsu.ru

**Maria A. Surovtseva**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-4752-988X, e-mail: mfelde@ngs.ru

**Nataliya A. Bondarenko**, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-8443-656X,  
e-mail: bond80288@yandex.ru

**Irina I. Kim**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-7380-2763, e-mail: kii5@yandex.ru

**Olga V. Poveshchenko**, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-9956-0056, e-mail: poveshchenkoov@yandex.ru

*Поступила в редакцию 08.07.2021*

*После доработки 10.07.2021*

*Принята к публикации 24.08.2021*

*Received 08.07.2021*

*Revision received 10.07.2021*

*Accepted 24.08.2021*