

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА К ЦИТОТОКСИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ ДОКСОРУБИЦИНА

**© И. В. Кожухарова,¹ Т. М. Гринчук, Н. А. Пуговкина, З. В. Ковалева,
Л. П. Алексеенко, Н. Н. Никольский**

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
¹ электронный адрес: kojuxarova@mail.ru*

В работе изучали цитотоксическое действие противоопухолевого препарата доксорубицина (ДР) на эмбриональные стволовые клетки человека (чЭСК) линии С910. Для сравнения использовали культуру фибробластов, полученную путем спонтанной дифференцировки той же линии чЭСК. Для культуры фибробластов подтверждено сохранение нормального диплоидного кариотипа. Установлено, что чЭСК имеют более высокую чувствительность к действию ДР по сравнению с фибробластами: концентрация ДР, вызывающая гибель 20 % клеток, составляла 0.01 и 0.1 мкг/мл соответственно. ДР индуцировал апоптотическую гибель чЭСК и снижение пролиферативной активности как чЭСК, так и фибробластов. Однако в культуре чЭСК блокирование пролиферации было обратимо в отличие от фибробластов. Таким образом, продемонстрированы различия как в чувствительности, так и в характере ответа на генотоксический фактор чЭСК и их дифференцированных производных.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, доксорубицин, цитотоксичность.

Результаты исследований по изучению чувствительности эмбриональных стволовых клеток человека (чЭСК) к генотоксическим стрессам крайне противоречивы. С одной стороны, существуют данные о высокой эффективности многих защитных механизмов в чЭСК, таких как теломеразная активность, экспрессия антиоксидантных генов и генов репарации ДНК, и показано, что дифференцировка чЭСК сопряжена с даун-регуляцией этих процессов (Maynard et al., 2008; Saretzki et al., 2008). С другой стороны, отмечена более высокая чувствительность чЭСК к повреждающему действию ионизирующей радиации, УФ-облучению и химическому агенту этопозиду по сравнению с дифференцированными клетками (Grandela et al., 2007; Filion et al., 2009).

В настоящей работе изучали цитотоксическое действие противоопухолевого препарата доксорубицина (ДР) на плорипотентные чЭСК и полученные из них путем спонтанной дифференцировки фибробlastы. ДР относится к группе антрациклиновых антибиотиков и применяется для лечения метастазирующих форм опухолей различной этиологии. Известно, что ДР обладает высокой анти-митотической активностью и подавляет синтез ДНК, почти не влияя на синтез белков в клетке. Основной мишенью ДР в клетке является ДНК-топоизомераза II, которой отводится существенная роль в репликации, рекомбинации ДНК и подготовке клеток к митозу (Wang et al., 1996). ДР интеркалирует в ДНК, стабилизирует этот комплекс, что приводит к образованию двухцепочечных разрывов ДНК (Burden, Osheoff, 1998). Нерепарированные повреждения ДНК вызывают остановку пролиферации клеток в точке контроля фазы G₂ клеточного цикла (Kim

et al., 2009) или апоптоз по p53-зависимому типу (Wang et al., 2004; Kikuchi et al., 2010). Кроме того, цитотоксичность ДР может быть связана с генерацией активных форм кислорода и запуском апоптоза по митохондриальному пути (Tsang et al., 2003). Ранее цитотоксическое действие ДР изучали на многочисленных линиях опухолевых клеток и на нескольких нормальных клеточных линиях. Были найдены существенные различия в ответе на обработку ДР между опухолевыми и нормальными клетками (Wang et al., 2004).

В настоящей работе изучали цитотоксическое действие ДР на плорипотентные чЭСК, которые являются нормальными диплоидными, но иммортальными клетками. Мы показали, что плорипотентные чЭСК имеют более высокую чувствительность к действию ДР по сравнению с изогенными фибробластами. Обработка чЭСК сублетальными дозами ДР приводит к быстрому запуску апоптоза и гибели большей части популяции, но оставшиеся живые клетки сохраняют способность к возобновлению пролиферации. В культуре дифференцированных фибробластов сублетальные дозы ДР вызывают длительный блок пролиферации и постепенную гибель, видимо, по типу старения клеток.

Материал и методика

Культивирование и дифференцировка. Использовали культуру чЭСК линии С910, полученную в Институте цитологии РАН (Кожухарова и др., 2009). чЭСК культивировали в среде mTeSR (StemCellTechnolo-

гу, Канада) при 37 °C, 6 % CO₂ и 85 % влажности. В качестве фидера использовали культуру клеток эндометрия человека (Земелько и др., 2011), обработанную митомицином С (Sigma, США) в концентрации 10 мкг/мл. Пересев проводили механически через 6—7 сут. Дифференцировку чЭСК индуцировали получением эмбриоидных тел с помощью пересева агрегатов клеток на низкоадгезивные культуральные чашки (Nunc, Дания). Агрегаты клеток культивировали в течение 4 сут в среде KoSR (Knockout DMEM, 20 % serum replacement, Gibco, США) с добавлением 1 мМ глутамина, 100 мМ несущественных аминокислот, 1%-ного раствора пенициллина и стрептомицина (все растворы Gibco, США). Затем их переносили на адгезивные чашки в среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone, США) и культивировали до образования монослоиной культуры. Монослоиные культуры пересевали с использованием 0.05%-ного раствора трипсина (Gibco, США). В течение 7 пассажей популяция становилась однородной и дифференцированные клетки приобретали фибробластоподобную морфологию. Для постановки цитотоксических тестов клетки выращивали без фидера на пластике, обработанном Матригелем (BD Bioscience, США).

Иммуноцитохимия. Культуру чЭСК и дифференцированных клеток выращивали в стандартных условиях на покровных стеклах. Затем клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида (15 мин) при комнатной температуре, пермеабилизовывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 (15 мин). Блокирование неспецифического связывания антител проводили в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) в течение 30 мин при комнатной температуре. В работе использовали специфические мышьиные моноклональные антитела против антигенов человека OCT3/4 (SantaCruz Biotechnology, США) в разведении 1 : 100, SSEA-4 (Chemicon, США) в разведении 1 : 50 и виментина (Chemicon, США) в разведении 1 : 50. В качестве вторых антител применяли козы антимышьиные антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluro 488 (Invitrogen, США) в разведении 1 : 800. Отмытку клеток производили в растворе PBS, содержащем 0.05 % Tween 20. Ядра клеток подкрашивали DAPI (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл. Покровные стекла с клетками заключали в глицериновый буфер, содержащий 1 % пропилгалата. Полученные препараты анализировали с помощью конфокального лазерного люминесцентного микроскопа Leica TCS CL (Германия) при увеличении 63×. Активность щелочной фосфатазы определяли с помощью набора реагентов Sigma Diagnostics Alkaline Phosphatase (AP) leucocytę согласно стандартному протоколу фирмы-производителя (Sigma, США).

Определение цитотоксичности. Суспензию клеток чЭСК или дифференцированных клеток высевали в 24-луночные панели, предварительно обработанные Матригелем. Клетки культивировали до получения субмонослоя (2—3 сут). Затем подсчитывали начальное количество клеток в лунке и обрабатывали их ДР в концентрации от 0.01 до 2 мкг/мл. Через 24 ч подсчитывали количество живых и мертвых клеток в каждом варианте опыта. Для этого клетки дезагрегировали с помощью 0.05%-ного раствора трипсина и окрашивали 0.4%-ным раствором трипанового синего (Gibco, США). В каждом варианте подсчет проводили в 3 лунках и определяли среднее значение и его стандартное отклонение. Жизнеспособность клеток в опыте определяли как процентную

долю живых клеток по отношению к начальному количеству живых клеток. Индекс цитотоксичности ДР определяли как минимальную концентрацию, вызывающую гибель 20, 50 и 90 % клеток, и обозначали ИЦ20, ИЦ50 и ИЦ90 соответственно.

Для определения выживаемости клеток после обработки сублетальными дозами ДР использовали кривые роста клеток. Клетки выращивали в 24-луночных панелях, по достижении субмонослоя обрабатывали ДР в течение 24 ч в концентрации, при которой гибель клеток составляла 20 %. Среду меняли и ежедневно подсчитывали количество клеток в 3 контрольных и 3 опытных лунках в течение 7—10 сут. Апоптотические ядра выявляли по окраске DAPI и подсчитывали их количество на 100 клеток в каждом варианте опыта.

Преждевременное старение клеток оценивали по окрашиванию на β-галактозидазу с помощью Senescence β-Galactosidase Staining Kit согласно протоколу фирмы-производителя (Cell Signaling, США).

Кариотипирование. Приготовление препаратов метафазных хромосом проводили по обычной схеме. Для накопления клеток в стадии метафазы в клеточную культуру в логарифмической фазе роста добавляли стандартный раствор демиколцина в конечной концентрации 0.01—0.02 мкг на 1 мл среды. Для снятия клеток использовали смесь 0.05% трипсина с ЭДТА, в качестве гипотонического раствора — 0.56 % KCl. Время гипотонической обработки, равно как и время инкубации клеток в присутствии митостатика, подбирали экспериментально. Для дифференциальной окраски хромосом на G-диски красителем Гимза их предварительно обрабатывали 0.25%-ным раствором трипсина. Суспензию фиксированных клеток раскладывали на влажные, охлажденные предметные стекла. Высушивали препараты при комнатной температуре. Анализ метафазных пластинок производили с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия) при увеличениях 16× и 100×. Идентифицировали хромосомы в соответствии со стандартной номенклатурой (Yunis, 1980; Мамаева, 2002). Частоту встречаемости в популяции полипloidных клеток оценивали при визуальном анализе под микроскопом не менее 200 метафазных пластинок.

Результаты

Культивирование чЭСК клеток линии C910 на Матригеле не изменяло экспрессию плюрипотентных маркеров щелочной фосфатазы, SSEA-4, OCT3/4 (рис. 1, а—б). Спонтанная дифференцировка сопровождалась потерей экспрессии плюрипотентных маркеров и появлением мезенхимально-эпителиального маркера виментина (рис. 1, г).

Цитотоксичность ДР. После обработки ДР жизнеспособность клеток, оцененная по окрашиванию трипановым синим, как стволовых, так и дифференцированных зависела от концентрации ДР. Стволовые клетки оказались более чувствительными к цитотоксическому действию ДР — в пределах концентраций от 0.01 до 1 мкг/мл доля живых клеток падала с 80 до 5 %. Концентрация ДР, при которой погибало 50 % клеток (ИЦ50), составляла 0.025 мкг/мл (50 нМ). Дифференцированные клетки были менее чувствительны к ДР — в пределах концентраций от 0.01 до 0.075 мкг/мл ДР не действовал цитотоксически. Дальнейшее увеличение концентрации

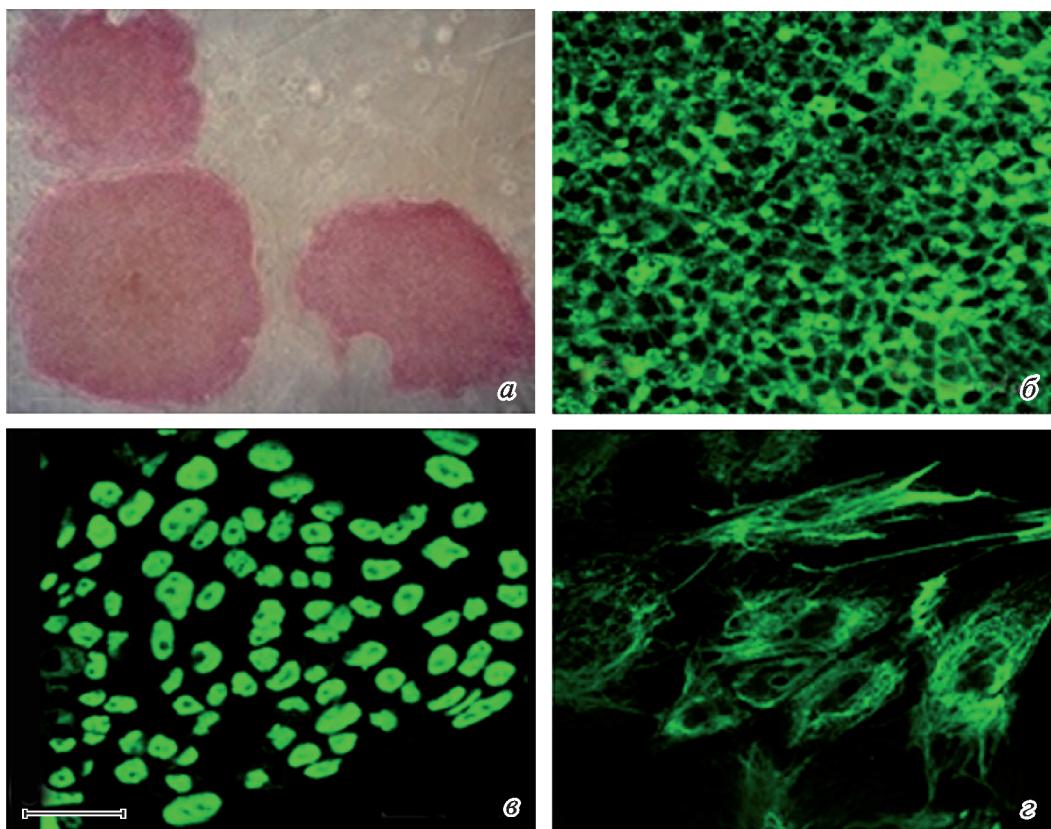


Рис. 1. Экспрессия плюрипотентных маркеров в эмбриональных стволовых клетках человека линии С910, культивируемых на Матригеле: щелочной фосфатазы (а), SSEA-4 (б) и OCT 3/4 (с). Спонтанная дифференцировка С910 вызывает экспрессию маркера фибробластов виментина (д).

ДР приводило к снижению доли живых клеток до 60 % при концентрации 0.1 мкг/мл и до 40 % — при концентрации 2 мкг/мл. ИЦ50 для дифференцированных клеток составил 1.0 мкг/мл (2.5 мкМ) (рис. 2).

Окрашивание ДНК-тропным красителем DAPI клеток С910 через 24 ч после обработки ДР в концентрации, вызывающей гибель 50 % клеток, выявило 22 % апоптотических ядер в популяции плюрипотентных клеток и отсутствие их в популяции дифференцированных клеток.

Выживаемость и сохранение способности недифференцированных и дифференцированных клеток к пролиферации после воздействия минимально эффективными концентрациями ДР (0.01 и 0.1 мкг/мл) была разной. Данные рис. 3 демонстрируют различия в ответе на воздействие ДР между дифференцированными и недифференцированными клетками. В популяции плюрипотентных клеток через 24 ч погибло 20 % клеток, на 3-и сут оставшиеся клетки возобновляли пролиферацию, и на 5-е сут популяция по отношению к первоначальному уровню удваивалась (рис. 3, а). Популяция дифференцированных клеток, обработанная ДР в минимально эффективной дозе (0.1 мкг/мл), прекращала пролиферировать, и этот цитостатический эффект сохранялся в течение всего времени наблюдения (9 сут). Цитостатическое действие ДР на фибробlastы сопровождалось признаками преждевременного старения клеток, что было показано с помощью окрашивания на β -галактозидазу. Число окрашенных клеток после обработки ДР через 2 сут составляло 80—100 % (рис. 4, б), в то время как в контроле окраска наблюдалась только в единичных клетках (рис. 4, а).

Сравнительный цитогенетический анализ клеток исходной линии С910 и изогенных фибробластов показал, что последние имеют диплоидный набор хромосом и стандартную структуру (рис. 5). Полиплоидных клеток в популяции дифференцированных клеток обнаружено не было. Анализ чЭСК на 3-м пассаже после обработки ДР в минимально эффективной концентрации (0.01 мкг/мл) не выявил количественных изменений в числе хромосом, связанных с анеуполиплоидизацией.

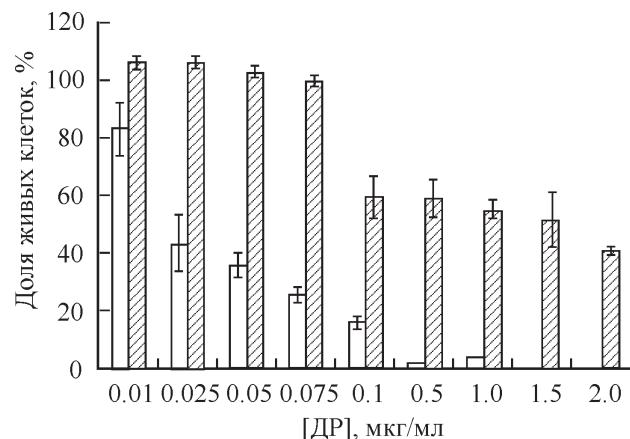


Рис. 2. Жизнеспособность стволовых (белые столбцы) и дифференцированных (заштрихованные столбцы) клеток линии С910 через 24 ч после обработки доксорубицином (ДР) в разной концентрации.

Представлены данные 3 независимых экспериментов.

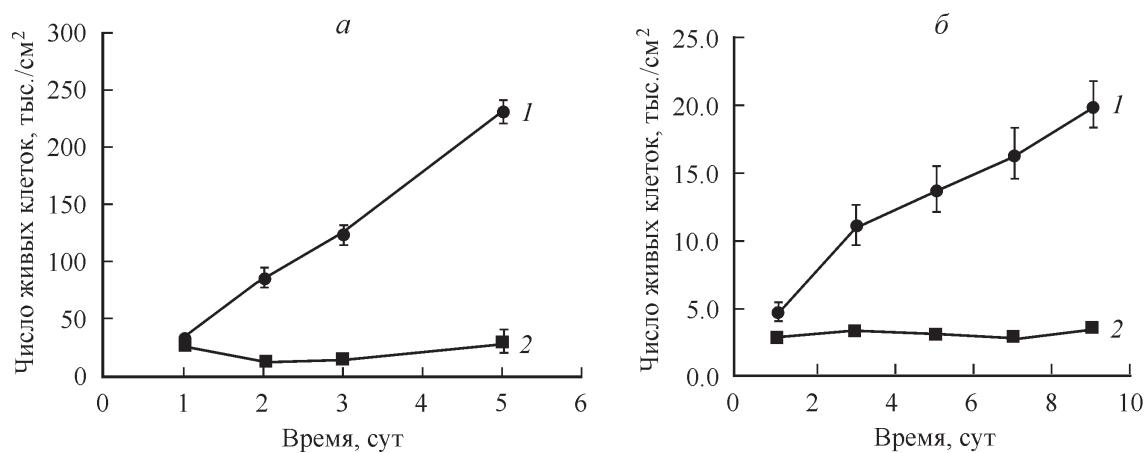


Рис. 3. Влияние предобработки ДР в концентрации, вызывающей гибель 20 % клеток через 24 ч, на размножение стволовых клеток линии С910 (а) и изогенных фибробластов (б).

Кривая 1 — контроль, 2 — ДР в концентрации 0.01 (а) или 0.1 (б) мкг/мл. Представлены данные 2 экспериментов.

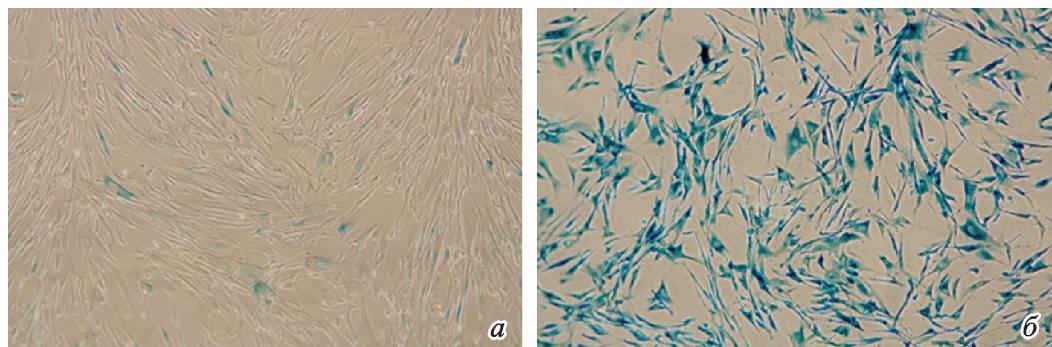


Рис. 4. Экспрессия маркера преждевременного старения β -галактозидазы (синий цвет) в дифференцированных клетках С910 в контроле (а) и через 48 ч после обработки ДР в концентрации 1 мкг/мл (б).

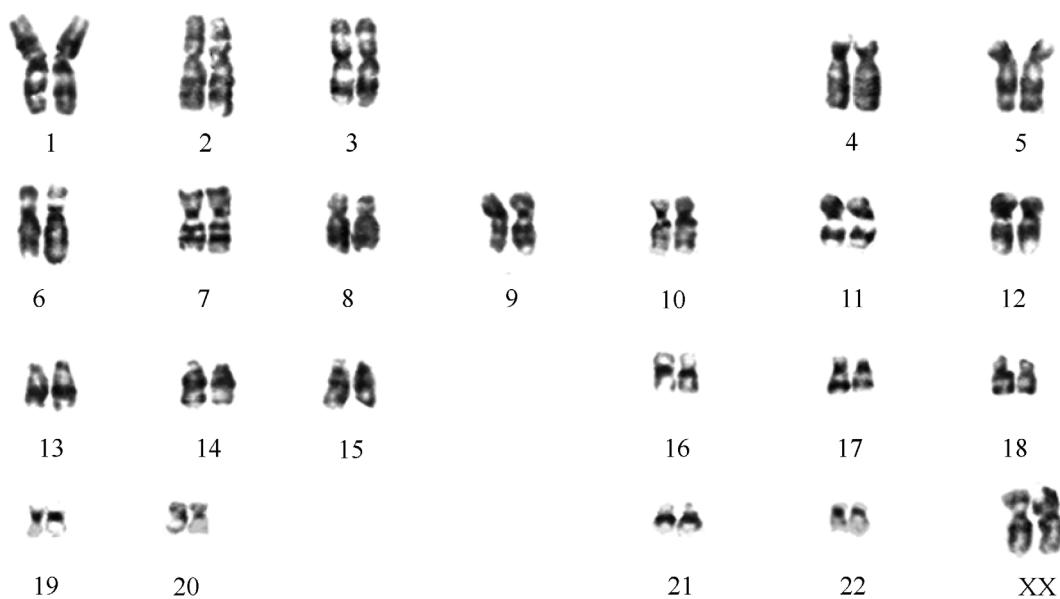


Рис. 5. Кариотип клеток С910 после спонтанной дифференцировки. Пассаж 7.

цией клеток. Ни двойных хроматидных разрывов, ни морфологических маркеров амплификации генов типа ДМ или ДМХ не выявлялось. Кариотипирование дифференцированных чЭСК данной линии после обработки ДР в минимально эффективной концентрации (0.1 мкг/мл) было невозможно в связи с остановкой пролиферации клеток.

Обсуждение

Принято считать, что чЭСК при культивировании в стандартных условиях в течение длительного времени могут сохранять генетическую стабильность, которая поддерживается, с одной стороны, эффективной репарацией ДНК, с другой — апоптотической гибелью клеток с нерепарированными повреждениями ДНК.

В настоящей работе в качестве химического агента, вызывающего генотоксический стресс чЭСК, использовали противоопухолевый препарат ДР. Повреждающее действие ДР основано на его способности ингибиривать топоизомеразу II, что приводит к образованию двойных разрывов ДНК. Клетки способны распознавать возникшие повреждения, либо элиминируя их путем апоптоза или некроза, либо индуцируя преждевременное старение клеток (Rebbaa et al., 2003). Цитотоксический эффект ДР различен в зависимости от типа клеток, концентрации ДР и условий культивирования. Мы сравнивали чувствительность недифференцированных и дифференцированных чЭСК и показали значительно более высокую чувствительность чЭСК к цитотоксическому действию ДР по сравнению с изогеннымными фибробластами.

По некоторым данным, особенность клеточного ответа чЭСК на генотоксический стресс состоит в том, что они в отличие от других соматических клеток не имеют точки ареста в фазе G₁ клеточного цикла, но могут останавливаться на границе фаз G₂/M (Filion et al., 2009). Дифференцировка чЭСК вызывает появление точки ареста в фазе G₁ (Neganova et al., 2011). В наших экспериментах обработка дифференцированных клеток сублетальными дозами ДР также вызывала их остановку в фазе G₁ или G₂ клеточного цикла. Активность β-галактозидазы означает, что в этих клетках происходит процесс преждевременного старения. Обработка чЭСК ДР в концентрации в 10 раз меньшей, чем используемая для фибробластов, вызывала гибель 50 % клеток в течение 48 ч. Окрашивание ДНК-тропным красителем выявило возрастающее количество апоптотических ядер в популяции чЭСК и их отсутствие в изогенных фибробlastах после обработки ДР, что может свидетельствовать о гибели чЭСК путем апоптоза. Наши данные согласуются с данными о повреждающем действии другого противоопухолевого препарата — ингибитора топоизомеразы II этопозида (Grandella et al., 2007; Velichko et al., 2011). Этопозид вызывал гибель 50 % клеток чЭСК в дозе 100 нМ (Grandella et al., 2007), а ДР, по нашим данным, — в концентрации 20 нМ. Дифференцировка чЭСК сопровождалась снижением чувствительности к этопозиду аналогично ДР.

Установлено, что культивирование в присутствии ДР может приводить к дестабилизации клеточного генома, возникновение которой связывают с нарушением механизма клеточного деления под влиянием цитостатика. Показано, что сублетальные концентрации ДР могут вызывать стимуляцию полипloidизации культуры опухолевых и нормальных клеток (Меликсетян и др., 1999; Eom

et al., 2005; Kikuchi et al., 2010). Данные, полученные нами, указывают на то, что в культуре чЭСК после кратковременного их культивирования в присутствии ДР в концентрации 0.01 мкг/мл частота встречаемости полиплоидных клеток не возрастает.

Таким образом, данные настоящей работы подтверждают, что чЭСК и их дифференцированные производные имеют не только разные уровни чувствительности к противоопухолевому цитостатику ДР, но и различные реакции на генотоксический стресс.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-12077 офи-м) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домниня А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Кирсанов А. А., Бичевая Н. К., Корсак В. С., Никольский Н. Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. 53 (12) : 919—929.
- Кожухарова И. В., Фридлянская И. И., Ковалева З. В., Пуговкина Н. А., Алексеенко Л. Л., Зенин В. В., Иванцов К. М., Леонтьева О. К., Гринчук Т. М., Никольский Н. Н. 2009. Новые линии эмбриональных стволовых клеток человека C612 и C910. Цитология. 51 (7) : 551—558.
- Мамаева С. Е. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Наука. 231 с.
- Меликсетян М. Б., Березкина Е. В., Пащенко М. А., Гринчук Т. М. 1999. Исследование механизмов лекарственной устойчивости двух клеточных линий хронического промиелойкоза человека линии K562, резистентных к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II адриамицину и этопозиду. Цитология. 41 (7) : 615—621.
- Burden D. A., Osheoff N. 1998. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. Biochim. Biophys. acta. 1400 : 139—154.
- Eom Y. W., Kim M. A., Park S. S., Goom J., Sohn S., Kim W. H., Yoon G., Choi K. S. 2005. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. Oncogene. 24 : 4765—4777.
- Filion T. M., Qiao M., Ghule P. N., Mandeville M., Wijnen A. J., Stein J. L., Lian J. B., Altieri D. C., Stein G. S. 2009. Survival responses of human embryonic stem cells to DNA damage. J. Cell. Physiol. 220 : 586—592.
- Grandela C., Pera M. F., Wolvetang E. J. 2007. p-53 is required for etoposide-induced apoptosis of human embryonic stem cells. Stem Cell Res. 1: 116—128.
- Kikuchi I., Nakayama Y., Morinaga T., Fukumoto Y., Yamaguchi N. 2010. A decrease in cyclin B1 levels leads to polyploidization in DNA damage-induced senescence. Cell Biol. Int. 34 : 645—653.
- Kim H.-S., Lee Y.-S., Kim D.-K. 2009. Doxorubicin exerts cytotoxic effects through cell cycle arrest and Fas-mediated cell death. Pharmacology. 84 : 300—309.
- Maynard A., Swistowska A. M., Lee J. W., Liu Y., Liu S., Bettencourt Da Cruz A., eRao M., Souza-Pinto N., Zeng X., Bohr V. 2008. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. Stem Cells. 26 : 2266—2274.
- Neganova I., Vilella F., Atkinson S. P., Lloret M., Passos J. F., Zglinicki T., O'Connor J.-E., Burks D., Jones R., Armstrong L., Lako M. 2011. An important role for CDK2 in G1 to S checkpoint activation and DNA damage response in human embryonic stem cells. Stem Cells. 29 : 651—659.

- Rebbaa A., Zheng X., Chou P. M., Mirkin B. L. 2003. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. Oncogene. 22 : 2805—2811.*
- Saretzki G., Walter T., Atkinson S., Passos J. F., Breth B., Keith W. N., Stewart R., Hoare S., Stojkovic M., Armstrong L., Zglinicki T., Lako M. 2008. Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. Stem Cells. 26 : 455—464.*
- Tsang W. P., Chau S. P., Kong S. K., Fung K. P., Kwok T. T. 2003. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. Life Sci. 73 : 2047—2058.*
- Velichko A. K., Lagarkova M. A., Philonenko E. S., Kiselev S. L., Katidze O. L., Rasin S. V. 2011. Sensitivity of human embryonic and induced pluripotent stem cells to a topoisomerase II poison etoposide. Cell Cycle. 10 : 2035—2037.*
- Wang S., Konorev E. A., Kotamraju S., Joseph J., Kolivendi S., Kalyanaraman B. 2004. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms, intermediacy of H(2)O(2)- and p-53-dependent pathways. J. Biol. Chem. 279 : 25 536—25 543.*
- Wang X., Watt P., Louis R. H., Hickson I. D. 1996. Part I: a topoisomerase II-associated protein required for faithful chromosome transmission in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucl. Acids Res. 24 : 4791—4797.*
- Yunis J. J. 1980. Nomenclature for high resolution human chromosomes. Cancer Genet. Cytogenet. 2 : 221—229.*

Поступила 30 IV 2012

EXAMINATION OF CYTOTOXIC EFFECT OF ANTI-CANCER DRUG DOXORUBICIN ON HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS

I. V. Kozhukharova,¹ T. M. Grinchuk, N. A. Pugovkina, Z. V. Kovaleva, L. L. Alekseenko, N. N. Nikolsky

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: kojuxarova@mail.ru.

Cytotoxic effect of anti-cancer drug, doxorubicin (DR), has been examined on human embryonic stem cells (ESC) C910 and fibroblasts spontaneously differentiated from these cells. The fibroblasts retained diploid karyotype. It was found that ESC are more sensitive to DR than fibroblasts: DR dose killing 20 % cells was 0.01 and 0.1 µg/ml, respectively. DR induced ESC apoptotic death and reduced both ESC and fibroblast proliferation. Unlike fibroblasts DR reversibly inhibited ESC proliferation. Thus, we have demonstrated that ESC and their differentiated derivates differ their sensitivity and response to the genotoxic agent.

Key words: human embryonic stem cells, doxorubicin, cytotoxicity.