

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ И ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

© Е. Б. Бурова,¹ О. Г. Люблинская, А. Н. Шатрова, А. В. Бородкина, Н. Н. Никольский

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: lenbur87@mail.ru

Исследовали реакцию стволовых клеток эндометрия (СКЭ) человека на окислительный стресс методом проточной цитофлуориметрии. Для сравнения использовали две линии терминально дифференцированных фибробластов человека — легочные эмбриональные и дермальные. Окислительный стресс моделировали действием перекиси водорода (H_2O_2) в широком диапазоне концентраций (50—1500 мкМ) в течение 24 ч. Установлено, что для адекватной оценки действия H_2O_2 на разные линии клеток следует учитывать количество H_2O_2 в пересчете на 1 клетку (пмоль/кл.), но не концентрацию H_2O_2 в ростовой среде. В качестве параметра жизнеспособности была выбрана величина LD_{50} , соответствующая количеству H_2O_2 на клетку, при действии которой через 24 ч выживает 50 % клеток. При такой оценке СКЭ оказались более устойчивыми к действию H_2O_2 по сравнению с легочными эмбриональными фибробластами, но менее устойчивыми (более чувствительными), чем дермальные фибробласты. Таким образом, в зависимости от выбранного объекта сравнения СКЭ можно характеризовать либо как устойчивые (относительно эмбриональных фибробластов), либо как чувствительные к действию H_2O_2 (относительно дермальных фибробластов).

Ключевые слова: стволовые клетки, эндометрий, перекись водорода, фибробласты, окислительный стресс.

Одним из наиболее перспективных направлений современной медицины является лечение многих заболеваний с помощью трансплантации стволовых клеток. Обладая высоким пролиферативным потенциалом, эти клетки способны самообновляться (т. е. реплицироваться в течение длительного времени, сохраняя исходные характеристики), а также дифференцироваться в различные специализированные клетки при определенных условиях. Широкое использование эмбриональных стволовых клеток человека ограничено этическими проблемами, связанными с получением материала для новых линий, вероятностью иммунного отторжения и развития опухолей после трансплантации. Использование тканеспецифичных (региональных) стволовых клеток, локализующихся в ряде органов и тканей взрослого организма и обеспечивающих возможность трансплантации аутологичных клеток, позволяет избежать вышеперечисленных проблем. В настоящее время наиболее распространенными источниками для получения региональных стволовых клеток являются костный мозг (Fridenstein et al., 1968), жировая ткань (Parker, Katz, 2006), пуповинная кровь (Harris et al., 2007), амниотическая жидкость (De Coppi et al., 2007) и ткань эндометрия (Cho et al., 2004; Gargett, 2006).

Стволовые клетки эндометрия (СКЭ) человека, полученные неинвазивным методом из доступного источника — десквамированного (отшелушившегося) эндометрия, содержащегося в менструальной крови, имеют явное преимущество перед другими тканеспецифичными стволовыми клетками. Показано, что СКЭ сохраняют стабильный кариотип при длительном культивировании (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008). Кроме того, они имеют бо-

лее высокую пролиферативную активность по сравнению со стволовыми клетками из пуповинной крови и костного мозга (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008) и могут дифференцироваться в разные тканеспецифичные клетки. Таким образом, доступность материала для получения, мультипотентность, способность к длительному размножению делают СКЭ весьма перспективными для клинического применения.

Известно, что клетки различных типов могут иметь различный уровень устойчивости к окислительному стрессу — одному из самых распространенных типов стресса у живых организмов. Высокий уровень активных форм кислорода (АФК), в том числе перекиси водорода (H_2O_2), обычно вызывает многочисленные окислительные повреждения, которые в конечном итоге через множественные сигнальные каскады приводят к старению, апоптозу и (или) опухолевой трансформации клеток. Напротив, умеренный уровень АФК может прямо или опосредованно модулировать функции многих белков и транскрипционных факторов. При этом АФК как сигнальные молекулы могут регулировать большой пул клеточных процессов (в зависимости от клеточного типа), таких как пролиферация, дифференцировка и онкогенная трансформация.

Большинство исследований по действию окислительного стресса было выполнено на первичных культурах клеток различной природы или постоянных линиях клеток. Как показывает анализ литературы, для оценки жизнеспособности как нормальных (Long et al., 2004; Wang et al., 2010), так и опухолевых (Mao et al., 2006; Alarifi, 2011) клеток в условиях окислительного стресса в пер-

вую очередь необходимо определить порог чувствительности клеток, величина которого значительно варьирует для клеток разного типа. Так, например, дермальные фибробласты, как правило, позиционируются как устойчивые клетки к действию H_2O_2 (Brenneisen et al., 1999; Chevance et al., 2003). Кроме того, терминально дифференцированные фибробласты различной природы часто используют в качестве стандартного объекта сравнения при исследовании реакции как эмбриональных, так и тканеспецифичных стволовых клеток на окислительный стресс.

Проблема устойчивости к окислительному стрессу стволовых клеток разного происхождения обсуждалась в ряде работ (Chen et al., 2006; George et al., 2009; Orciani et al., 2010; Valle-Prieto, Conget, 2010). Показано, что в сравнении с клетками конечной дифференцировки тканеспецифичные стволовые клетки человека являются более устойчивыми к этому типу стресса. Однако следует отметить противоречивость литературных данных о характере ответа стволовых клеток разного происхождения на стресс. При изучении СКЭ внимание исследователей ранее было привлечено в основном к роли антиоксидантной системы в регуляции эндометриальной функции этих клеток при изменении внутриклеточного уровня АФК, в частности H_2O_2 (Sugino, 2007). До настоящего времени не проводилось исследований реакций СКЭ на действие H_2O_2 , так же как и их устойчивости к H_2O_2 , в сравнении с дифференцированными клетками. В конечном счете перспективы терапевтического использования культур СКЭ во многом зависят от того, насколько они окажутся устойчивыми к стрессовым воздействиям различного рода, в том числе к действию окислителей, от их способности сохранять нормальный кариотип, пролиферативную активность и мультипотентность под действием стрессовых факторов.

Цель настоящей работы — провести сравнительный анализ устойчивости СКЭ и терминально дифференцированных фибробластов к окислительному стрессу, вызванному действием H_2O_2 в широком диапазоне концентраций.

Материал и методика

Культивирование клеток. Использовали стволовые клетки эндометрия (СКЭ) человека линий 1410, 2206 и 2304, полученные в нашей лаборатории (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) из десквамированного эндометрия от разных доноров (Земелько и др., 2011). Эмбриональные фибробласты легкого человека (линия FRL-9505) получены из ФГБУ НИИ гриппа МЗ и СР РФ; фибробласты кожи получены в отделе клеточных культур Института цитологии РАН способом миграции из фрагментов кожи века. Фрагменты кожи были получены от разных доноров 50-летнего возраста в результате косметологической операции. Эмбриональные фибробласты и СКЭ культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), дермальные фибробласты — в среде α -MEM (ПанЭко, Россия); обе среды содержали 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1 % гентамицина и 1 % глутамакса. Культивирование клеток проводили в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °C во флаконах 25 или 75 см². Для экспериментов клетки рассевали на чашки диаметром 35 мм. Посевную плотность фибробластов варьировали от 10 до 50 тыс. кл./см², а СКЭ — от 5 до 15 тыс. кл./см². Использовали эмбриональные фибробласты 14—22-го пассажей,

фибробласты кожи 6—12-го пассажей, а также СКЭ 6—12-го пассажей.

Жизнеспособность клеток оценивали по количеству клеток, выживших через 24 ч действия H_2O_2 , по отношению к исходному их количеству. Оценку проводили в тесте «живые/мертвые клетки» методом проточной цитометрии с использованием иодида пропидия (PI), окрашивающего ДНК погибших клеток и не проникающего в живые клетки. Результаты измерений выборочно сопоставляли с результатами подсчета клеток в камере Горяева при окраске трипановым синим.

Суммарную популяцию открепившихся (плавающих) и прикрепленных клеток, снятых с чашек, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в PBS. Для окрашивания PI непосредственно перед анализом к суспензии клеток добавляли 50 мкг/мл PI и осторожно перемешивали. Оценку жизнеспособности клеток проводили на цитометре Coulter EPICS XL Flow Cytometer (Becton Coulter). Оценку количества погибших и живых клеток в образцах проводили по гистограмме (флуоресценция PI против прямого светорассеяния в логарифмической шкале), выделяя соответствующие окна. Анализ проводили при постоянной скорости подачи образца.

Окислительный стресс вызывали добавлением в ростовую среду H_2O_2 в растворе PBS на 24 ч. Конечную концентрацию H_2O_2 варьировали в диапазоне от 50 до 1500 мкМ. Обработку клеток проводили при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 .

В работе использовали неорганические соли производства фирмы «Вектон» (Санкт-Петербург); перекись водорода, DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид) и прочие реактивы были от Sigma (США).

Результаты и обсуждение

Окислительный стресс вызывали действием на клетки H_2O_2 в широком диапазоне конечных концентраций (50—1000 мкМ) в течение 24 ч. Влияние окислительного стресса на жизнеспособность клеток оценивали путем цитофотометрического измерения доли клеток, выживших через 24 ч действия H_2O_2 , по отношению к их исходному количеству. В качестве параметра жизнеспособности была выбрана величина LD_{50} , которая обычно трактуется как концентрация H_2O_2 в ростовой среде, при действии которой через 24 ч выживает 50 % клеток.

Исследовали жизнеспособность СКЭ в зависимости от концентрации H_2O_2 в среде для клеточных культур разной плотности. Как видно на рис. 1, а, выживаемость клеточной популяции зависит как от концентрации H_2O_2 , так и от плотности клеток. Ранее эта особенность цитотоксического действия H_2O_2 подробно обсуждалась в работах, посвященных влиянию окислительного стресса на фибробласты разного происхождения (Spitz et al., 1987; Chen et al., 2000a, 2000b). Авторами было установлено, что на жизнеспособность клеток влияет не конечная концентрация H_2O_2 в среде, а то количество H_2O_2 , которое приходится на 1 клетку, т. е. удельное количество H_2O_2 , измеряемое в пикомоль на 1 клетку (пмоль/кл.). Удельное количество H_2O_2 вычисляется из простого соотношения: $v = (c \cdot V)/N$, где v — удельное количество H_2O_2 , c — молярная концентрация H_2O_2 , V — объем инкубационной среды, N — число клеток на чашке. Такой подход оказался эффективным для сравнения жизнеспособности клеток разных пассажей вне зависимости от плотности посева.

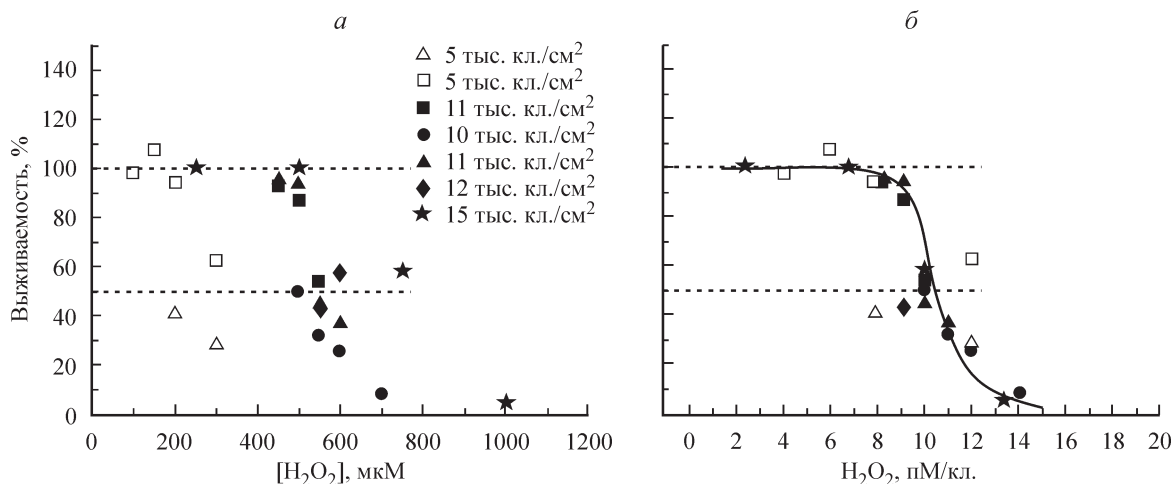


Рис. 1. Выживаемость стволовых клеток эндометрия человека (СКЭ) при 24-часовом окислительном стрессе в зависимости от концентрации H₂O₂ в ростовой среде (а) и от удельного количества H₂O₂ (б).

Клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии (см. раздел «Материал и методика»). Использовали СКЭ линии 2304, пассажи с 6-го по 12-й; плотность клеток при посеве показана на рисунке.

Очевидно, эта закономерность справедлива при продолжительных инкубациях в случае полной утилизации экзогенной H₂O₂ антиоксидантной системой клеток.

Расчет количества H₂O₂ на клетку в наших экспериментах показал, что при одних и тех же концентрациях удельное количество H₂O₂ было разным, что объясняет наблюдаемые различия в выживаемости клеток, показанные на рис. 1, а. Разброс точек на этом рисунке не позволял построить кривую зависимости изменения выживаемости СКЭ от концентрации H₂O₂. После пересчета конечной концентрации H₂O₂ в среде по вышеприведенной формуле удельного количества H₂O₂ представили результаты экспериментов, показанных на рис. 1, а, как зависимость выживаемости клеток от удельного количества H₂O₂ (рис. 1, б). В этом случае почти все экспериментальные точки легли на одну кривую, которая носит выраженный пороговый характер. На основании многочисленных экспериментов можно утверждать, что вид этой кривой не зависит от пассажа и плотности клеток. С учетом этого факта при оценке устойчивости клеток к окислительному стрессу в дальнейшем мы будем рассматривать LD₅₀ как величину, соответствующую удельному количеству H₂O₂, при действии которой через 24 ч выживает 50 % клеток. Анализ жизнеспособности трех разных линий СКЭ, полученных от разных доноров, позволил определить LD₅₀ как 10 ± 1 пмоль/кл. (550—600 мкМ), а порого-

вое количество H₂O₂, приводящее к цитотоксическому эффекту, как 8 ± 1 пмоль/кл. (450—500 мкМ).

При увеличении концентрации H₂O₂, превышающей цитотоксический порог, наблюдали дозозависимую гибель клеток в культуре. На рис. 2 приведены фазово-контрастные изображения контрольных клеток и после действия H₂O₂ в концентрации 600 мкМ в течение 3 и 24 ч. Через 3 ч после добавления H₂O₂ уже отчетливо видна популяция поврежденных клеток, которые не открепляются от поверхности (рис. 2, б). Через 24 ч площадь, занятая такими клетками, значительно увеличивалась (рис. 2, в). Интересно отметить, что поврежденные клетки оставались прикрепленными в течение нескольких последующих суток. При увеличении концентрации H₂O₂ до 1 мМ увеличивался также и размер площади, занятой поврежденными клетками (данные не показаны). Ядра популяции мертвых клеток окрашивались DAPI, в то время как живые клетки с интактной мембраной оставались неокрашенными. Фрагментацию ядер погибших клеток не наблюдали, что позволяет предполагать неапоптотический путь гибели клеток. Однако для окончательного вывода о механизме H₂O₂-индуцированной гибели СКЭ необходимы дополнительные исследования возможности активации каспаз и мечение клеток при помощи аннексина.

На следующем этапе исследований интересно было сравнить устойчивость СКЭ и фибробластов человека

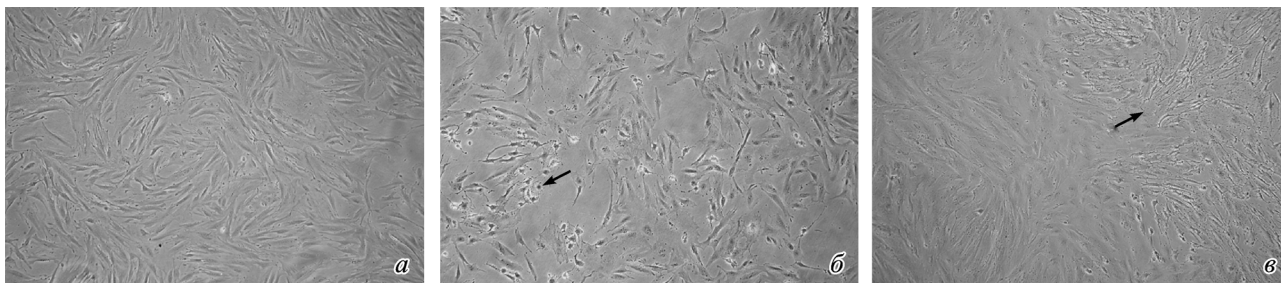


Рис. 2. Прижизненные фотографии СКЭ человека.

а — контрольные клетки до инкубации с H₂O₂; б, в — соответственно через 3 и 24 ч после добавления H₂O₂ в конечной концентрации 600 мкМ. Стрелки указывают на поврежденные клетки (б, в). Через 24 ч большая часть клеток повреждена действием H₂O₂ (в). СКЭ линии 2304, пассаж 7, плотность 12 тыс. кл./см². Об. 40×.

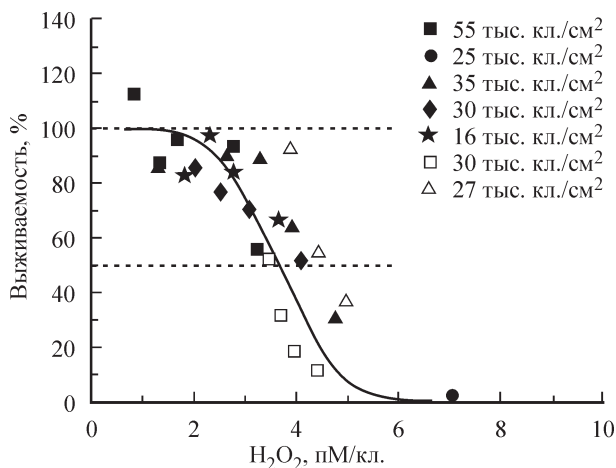


Рис. 3. Выживаемость эмбриональных фибробластов человека в зависимости от удельного количества H_2O_2 .

Необработанные (контрольные) и обработанные H_2O_2 в течение 24 ч клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Использовали эмбриональные фибробласты линии FRL-9505, пассажи 14–22; плотность клеток при посеве в разных опытах показана на рисунке.

разного происхождения к действию H_2O_2 . Для изучения жизнеспособности эмбриональных фибробластов легкого использовали широкий диапазон концентраций H_2O_2 , начиная с субцитотоксических концентраций (100 мкМ), действие которых ранее было проверено на подобных клетках (Chen et al., 1998, 2000a; Zdanov et al., 2006). В предварительных экспериментах показали корреляцию выживаемости и плотности клеточных культур при одинаковой концентрации H_2O_2 в инкубационной среде. При этом доля клеток, выживших после действия окислителя, увеличивалась по мере роста плотности клеток (данные не показаны). На рис. 3 представлены результаты изучения выживаемости в условиях окислительного стресса, полученные на эмбриональных фибробластах разных пассажей и при разной плотности посева. Как и в случае СКЭ, кривая зависимости выживаемости клеток от удельного количества H_2O_2 почти не зависит от пассажа и плотности клеточной культуры; величина LD_{50} определяется в диапазоне от 3.4 до 4.4 пмоль/кл. Таким образом, по сравнению с СКЭ эмбриональные фибробласты легкого более чувствительны к действию H_2O_2 .

Для сравнительной оценки устойчивости к окислительному стрессу СКЭ в качестве модели были использованы также фибробласты кожи человека. Ввиду сопоставимого размера СКЭ и дермальных фибробластов эти клетки рассевали с одинаковой плотностью для достижения субконфлюента. Для определения ответа дермальных фибробластов на H_2O_2 мы применили аналогичный подход, описанный выше для СКЭ и эмбриональных фибробластов. Анализ жизнеспособности дермальных фибробластов разных пассажей и при различной плотности посева показал, что величина LD_{50} определяется в диапазоне от 10 до 15 пмоль/кл., что соответствует концентрации H_2O_2 700–800 мкМ (рис. 4).

По сравнению с СКЭ и эмбриональными фибробластами дермальные фибробласты оказались самыми устойчивыми к действию H_2O_2 . Возможной причиной такой устойчивости, по мнению одних авторов, может быть корреляция степени окислительного повреждения ДНК дермальных фибробластов с количеством глутатионпероксидазы, которое возрастает вдвое при старении клеток

(Caldini et al., 1998). Имеющиеся в нашем распоряжении дермальные фибробласты были достаточно «взрослыми» клетками (от 50-летнего донора). Напротив, другие авторы утверждают, что дермальные фибробласты при старении утрачивают способность противостоять окислительному стрессу (Gurjala et al., 2005). Для выяснения истинной причины более высокой устойчивости дермальных фибробластов в наших опытах необходимы дополнительные исследования процесса их старения в условиях окислительного стресса. При сравнении реакции на окислительный стресс мезенхимных стволовых клеток другого происхождения (из костного мозга) и дермальных фибробластов было показано, что последние в 2.5 раза более чувствительны к воздействию окислителя (Valle-Prieto, Conget, 2010). Значения LD_{50} для дермальных фибробластов у этих авторов и у нас оказались одного порядка. В действительности сопоставление этих значений LD_{50} затруднено, так как в упомянутой работе (Valle-Prieto, Conget, 2010) авторы не учитывали в расчетах удельное количество H_2O_2 и не описывали детально экспериментальные условия (объем инкубационной среды и плотность посева клеток) для возможной экстраполяции результатов.

Суммируя полученные результаты, мы заключаем, что в зависимости от объекта сравнения СКЭ можно характеризовать как устойчивые (относительно эмбриональных фибробластов легкого) или как чувствительные к действию H_2O_2 (относительно дермальных фибробластов).

Данные, полученные на трех линиях различных по природе клеток, позволяют сделать важный вывод о том, что для адекватной оценки эффекта H_2O_2 на разные линии клеток следует учитывать количество H_2O_2 в расчете на 1 клетку, но не концентрацию H_2O_2 в ростовой среде. Прямое сопоставление устойчивости СКЭ к окислительному воздействию в наших экспериментах с другими тканеспецифичными стволовыми клетками в свете вышесказанного представляет определенную проблему, поскольку во всех известных нам аналогичных работах для оценки повреждающего действия традиционно учитывалась концентрация H_2O_2 в ростовой среде, а не удельное количество H_2O_2 .

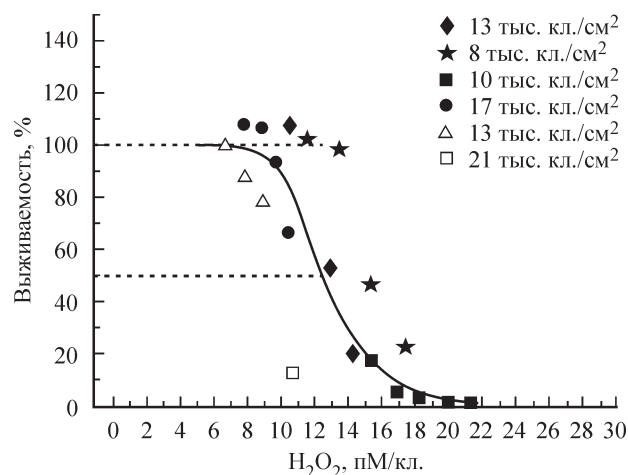


Рис. 4. Устойчивость дермальных фибробластов человека в зависимости от удельного количества H_2O_2 .

Анализ выживаемости обработанных H_2O_2 в течение 24 ч и контрольных клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии. Использовали фибробласты кожи человека на 6–13-м пассажах; плотность клеток при посеве в разных опытах показана на рисунке.

В заключение следует подчеркнуть, что данные о влиянии окислительного стресса на СКЭ являются абсолютно новыми и представляют несомненный интерес с точки зрения как изучения физиологических особенностей этих клеток, так и общего взгляда на устойчивость стволовых клеток к стрессовым воздействиям по сравнению с клетками конечной дифференцировки, в частности фибробластами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01581-а) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнина А. П., Арцибашева И. В., Зенин В. В., Курсанов А. А., Бичева Н. К., Корсаков 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.
- Alarifi S. 2011. Assessment of MCF-7 cells as an *in vitro* model system for evaluation of chemical oxidative stressors. African J. Biotechnol. 10 : 3872—3879.
- Brenneisen P., Wenk J., Wlaschek M., Blanduschun R., Scharfetter-Kochanek K. 1999. A newly adapted pulsed-field gel electrophoresis technique allows to detect distinct types of DNA damage at low frequencies in human dermal fibroblasts upon exposure to non-toxic H₂O₂ concentrations. Free Radic. Res. 31 : 405—418.
- Caldini R., Chevanne M., Mocali A., Tombaccini D., Paoletti F. 1998. Premature induction of aging in sublethally H₂O₂-treated young MRC5 fibroblasts correlates with increased glutathione peroxidase levels and resistance to DNA breakage. Mech. Ageing Develop. 105 : 137—150.
- Chen M. F., Lin C. T., Chen W. C., Yang C. T., Chen C. C., Liao S. K., Liu J. M., Lu C. H., Lee K. D. 2006. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 66 : 244—253.
- Chen Q. M., Bartholomew J. C., Campisi J., Acosta M., Reagan J. D., Ames B. N. 1998. Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. Biochem. J. 332 : 43—50.
- Chen Q. M., Liu J., Merrett J. B. 2000a. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. Biochem. J. 347 : 543—551.
- Chen Q. M., Tu V. C., Catania J., Burton M., Toussaint O., Dilley T. 2000b. Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. J. Cell Sci. 113 : 4087—4097.
- Chevanne M., Caldini R., Tombaccini D., Mocali A., Gori G., Paoletti F. 2003. Comparative levels of DNA breaks and sensitivity to oxidative stress in aged and senescent human fibroblasts: a distinctive pattern for centenarians. Biogerontology. 4 : 97—104.
- Cho N. H., Park Y. K., Kim Y. T., Yang H., Kim S. K. 2004. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. Fertil. Steril. 81 : 403—407.
- De Coppi P., Bartsch G., jr., Siddiqui M. M., Xu T., Santos C. C., Perin L., Mostoslavsky G., Serre A. C., Snyder E. Y., Yoo J. J., Furth M. E., Soker S., Atala A. 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat. Biotechnol. 25 : 100—106.
- Friedenstein A. J., Petrakova K. V., Kurolesova A. I., Frolova G. P. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 6 : 230—247.
- Gargett C. E. 2006. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells. Aust. NZ J. Obstet. Gynaecol. 46 : 250—253.
- George S., Heng B. C., Vinoth K. J., Kishen A., Cao T. 2009. Comparison of the response of human embryonic stem cells and their differentiated progenies to oxidative stress. Photomed. Laser Surg. 27 : 669—674.
- Gurjala A. N., Liu W. R., Mogford J. E., Procaccini P. S., Mustoe T. A. 2005. Age-dependent response of primary human dermal fibroblasts to oxidative stress: cell survival, pro-survival kinases, and entrance into cellular senescence. Wound Repair. Regen. 13 : 565—575.
- Harris D. T., Badowski M., Ahmad N., Gaballa M. A. 2007. The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine. Expert. Opin. Biol. Ther. 7 : 1311—1322.
- Long A. C., Colitz C. M., Bomser J. A. 2004. Apoptotic and necrotic mechanisms of stress-induced human lens epithelial cell death. Exp. Biol. Med. 229 : 1072—1080.
- Mao Y., Song G., Cai Q., Liu M., Luo H., Shi M., Ouyang G., Bao S. 2006. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gastric carcinoma MGC 803 cells. Cell Biol. Int. 30 : 332—337.
- Meng X., Ichim T. E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K. W., Thebaud B., Riordan N. H. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. J. Transl. Med. 5 : 57—66.
- Orciani M., Gorbi S., Benedetti M., Di Benedetto G., Mattioli-Belmonte M., Regoli F., Di Primio R. 2010. Oxidative stress defense in human-skin-derived mesenchymal stem cells versus human keratinocytes: different mechanisms of protection and cell selection. Free Radic. Biol. Med. 49 : 830—838.
- Parker A. M., Katz A. J. 2006. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. Expert. Opin. Biol. Ther. 6 : 567—578.
- Patel A. N., Park E., Kuzman M., Benetti F., Silva F. J., Allickson J. G. 2008. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. Cell Transplant. 17 : 303—311.
- Spitz D. R., Dewey W. C., Li G. C. 1987. Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblasts. J. Cell. Physiol. 131 : 364—373.
- Sugino N. 2007. The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. Placenta 28, Supplement A, Trophoblast. Research. 21 : S133—S136.
- Valle-Prieto A., Conget P. A. 2010. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. Stem Cells and Develop. 19 : 1885—1893.
- Wang X. Y., He P. Y., Du J., Zhang J. Z. 2010. Quercetin in combating H₂O₂-induced early cell apoptosis and mitochondrial damage to normal human keratinocytes. Chin Med. J. 123 : 532—536.
- Zdanov S., Remacle J., Toussaint O. 2006. Establishment of H₂O₂-induced premature senescence in human fibroblasts concomitant with increased cellular production of H₂O₂. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1067 : 210—216.

COMPARISON OF HUMAN ENDOMETRIAL STEM CELLS
AND FIBROBLASTS RESISTANCE TO OXIDATIVE STRESS

E. B. Burova,¹ O. G. Lublinskaya, A. N. Shatrova, A. V. Borodkina, N. N. Nikolsky

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: lenbur87@mail.ru

The response of human endometrial stem cells (hESCs) to oxidative stress has been investigated by flow cytometry. Two terminally differentiated cell lines were used for the comparison: human embryonic lung fibroblasts and human dermal fibroblasts. The oxidative stress was designed by hydrogen peroxide (H₂O₂) action in the wide range of concentrations (50—1500 μM) during 24 h. It has been shown that the H₂O₂ amount per one cell (pM/cell), but not H₂O₂ concentration in the growth medium, should be taken into account for the accurate evaluation of H₂O₂ effect on different cell lines. Therefore, in our experiments LD₅₀ reflects the amount of H₂O₂ per cell, at which 50 % cells survived after 24 h. We have demonstrated that hESCs are more resistant to H₂O₂ than embryonic lung fibroblasts, but less resistant than dermal fibroblasts.

Key words: endometrial stem cells, H₂O₂, fibroblasts, LD₅₀, oxidative stress.
