

РАЗЛИЧНЫЕ ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

© А. В. Бородкина,¹ А. Н. Шатрова, Н. А. Пуговкина, В. И. Земелько, Н. Н. Никольский, Е. Б. Бурова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: springwater@mail.ru

Известно, что окислительный стресс может вызывать в клетках различных типов как апоптоз, так и преждевременное старение (stress-induced premature senescence, SIPS). Согласно результатам исследований последних лет, стволовые клетки человека обладают высокой устойчивостью к окислительному стрессу, однако данные разных авторов часто противоречивы. В настоящей работе изучали реакции стволовых клеток различного происхождения на стресс, индуцированный действием перекиси водорода (H_2O_2). В качестве объекта исследования использовали эмбриональные (ЭСК) и взрослые, выделенные из эндометрия (СКЭ), стволовые клетки человека. Жизнеспособность клеток в условиях окислительного стресса оценивали методом МТТ. Обнаружено, что СКЭ наиболее устойчивы к токсическому действию H_2O_2 : значения концентраций H_2O_2 , при которых через 24 ч выживало 50 % клеток (LD_{50}), находились в диапазонах 300—350, 370—400 и 600—700 мкМ для ЭСК, фибробластов и СКЭ соответственно. Впервые продемонстрировано, что в ответ на действие H_2O_2 в популяции СКЭ аналогично фибробластам со временем развивается индуцированное преждевременное старение, которое характеризуется существенным усилением экспрессии ингибитора циклинзависимых киназ $p21^{Waf1/Cip1}$, необратимым блоком клеточного цикла и подавлением пролиферации, гипертрофией клеток и появлением ассоциированной со старением β -галактозидазной активности. Сублетальная концентрация H_2O_2 (200 мкМ) индуцировала в СКЭ только SIPS, тогда как более высокие концентрации H_2O_2 запускали в небольшой части клеточной популяции также апоптоз. Напротив, ЭСК человека при действии H_2O_2 в широком диапазоне тестированных концентраций (от 50 до 500 мкМ) быстро подвергались апоптозу, который был единственной сильно выраженной реакцией этих клеток на окислительное повреждение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что стволовые клетки человека различной природы в условиях окислительного стресса используют разные защитные механизмы: ЭСК быстро и эффективно элиминируют поврежденные клетки путем апоптоза, тогда как СКЭ подвергаются преждевременному старению.

Ключевые слова: стволовые клетки, окислительный стресс, преждевременное старение, апоптоз.

Принятые сокращения: н. п. — нуклеотидные пары, СКЭ — стволовые клетки эндометрия, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки, SIPS (stress-induced premature senescence) — преждевременное старение, вызванное стрессом.

В последнее десятилетие интенсивно исследуются реакции стволовых клеток человека, как эмбриональных, так и тканеспецифичных мезенхимной природы, на различные стрессовые воздействия, включая УФ- и γ -излучение, тепловой шок и окислительный стресс, с целью разработки стратегии успешного использования этих клеток в регенеративной медицине (Otto, Wright, 2011). При этом все большее предпочтение отдается тканеспецифичным стволовым клеткам, обеспечивающим возможность трансплантации аутологичных клеток, что позволяет решить ряд этических проблем, возникающих при применении эмбриональных стволовых клеток. Специфические ответы этих клеток на окислительный стресс могут играть критическую роль в регуляции тканевого гомеостаза, а также в регенерации органов после окислительного повреждения. В настоящее время в литературе существу-

ет преобладающая точка зрения о том, что стволовые клетки, в общем, более устойчивы к окислительному стрессу, чем дифференцированные клетки (Chen et al., 2006; George et al., 2009; Guo et al., 2010; Valle-Prieto, Conget, 2010; Brandl et al., 2011). Было показано, что эмбриональные стволовые клетки человека (ЭСК) обладают повышенной устойчивостью к действию перекиси водорода (H_2O_2) по сравнению с их дифференцированными потомками (George et al., 2009). Существуют противоположные данные относительно чувствительности к H_2O_2 мезенхимных стволовых клеток, являющихся типом взрослых стволовых клеток. Так, в мезенхимных стволовых клетках, полученных из костного мозга, разные группы авторов наблюдали различную чувствительность к H_2O_2 , которая различалась приблизительно в 15 раз (Chen et al., 2006; Valle-Prieto, Conget, 2010). Тем не менее в

обоих случаях эти клетки рассматривались как устойчивые к стрессу. С другой стороны, сообщалось, что мезенхимные стволовые клетки из кожи и пуповинной крови человека отличаются пониженной устойчивостью к окислительному стрессу (Ko et al., 2012). Восприимчивость к окислительному стрессу мезенхимных стволовых клеток человека, полученных из десквамированного эндометрия менструальной крови (СКЭ), пока остается неизвестной.

В многочисленных работах было показано, что пролиферирующие клетки в условиях субцитотоксического стресса могут входить в состояние преждевременного старения после повреждения ДНК (УФ- и γ -излучение) (Medrano et al., 1995; Toussaint et al., 2000; Oh et al., 2001), окислительного стресса (Chen et al., 1998; Dumont et al., 2000; Toussaint et al., 2000; Duan et al., 2005; Brandl et al., 2011) или после обработки ингибиторами гистон-деацетилазы (Ogryzko et al., 1996; Demidenko et al., 2009). Как и клетки человека разных типов, включая диплоидные фибробласты кожи и легкого, меланоциты, эндотелиальные и эпителиальные клетки, мезенхимные стволовые клетки при субцитотоксическом стрессе *in vitro* тоже могут подвергаться индуцированному преждевременному старению (Wang, Jang, 2009; Brandl et al., 2011; Kim et al., 2011; Smielova et al., 2012; Larsen et al., 2012). Следует также отметить, что мезенхимные стволовые клетки не иммортабельны и подвергаются репликативному старению. При длительном культивировании популяция этих клеток характеризуется укорочением теломер (Banfi et al., 2002), лимитом Хейфлика (Banfi et al., 2002; Stenderup et al., 2003), повышением β -галактозидазной активности (SA- β -Gal) (Stenderup et al., 2003) и прекращением дифференцировки (Digirolamo et al., 1999). Основные признаки репликативного и индуцированного стрессом старения подобны и включают в себя характерные фенотипические изменения клеток (увеличение размеров и уплощение), накопление в популяции SA- β -Gal-позитивных клеток, потерю регенеративного потенциала (Blagosklonny, 2012). Известно, что стволовые клетки способны регенерировать в организме ткани, поврежденные стрессом, тогда как стареющие клетки не могут делиться и поэтому теряют способность регенерировать ткани.

В настоящей статье мы исследовали реакцию на стресс, индуцированный H_2O_2 , взрослых мультипотентных стволовых клеток (СКЭ) и ЭСК человека с целью сравнить устойчивость стволовых клеток разной природы к различным уровням окислительного стресса, а также выявить специфичность их ответов на стресс. Кроме того, мы проверили нашу гипотезу о том, что H_2O_2 в сублетальных дозах может индуцировать в СКЭ преждевременное старение. Поскольку известно, что нормальные диплоидные фибробласты могут подвергаться преждевременному старению в ответ на низкие дозы H_2O_2 (Bladier et al., 1997; Chen et al., 2000; Fripiat et al., 2001), мы выбрали эти клетки для сравнения.

Материал и методика

Клеточные линии и обработка клеток. Использовали следующие линии клеток: СКЭ (линия 2304) (Земелько и др., 2011) и ЭСК (линия С910) (Aleksenko et al., 2012), полученные сотрудниками Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), и эмбриональные фибробла-

сты легкого человека (линия FRL-9505), полученные из ФГБУ НИИ гриппа МЗ и СР РФ. Фибробласты и СКЭ культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1 % гентамицина и 1 % глутамакса (Gibco, США), при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 . ЭСК культивировали в среде mTeSR1 (Stem Cell Techol, США) на чашках Петри с фидерным слоем из СКЭ, обработанных митомицином. Перед экспериментами ЭСК пересеивали на Matrigel matrix (BD Biosciences, США).

Окислительный стресс вызывали добавлением на 1 ч в бессывороточную ростовую среду H_2O_2 , раствор которой готовили из 30%-ной H_2O_2 непосредственно перед использованием. Обработку клеток проводили при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 , после чего клетки дважды промывали бессывороточной средой и далее инкубировали в свежей ростовой среде. Конечную концентрацию H_2O_2 варьировали в диапазоне от 200 до 2000 мкМ.

Жизнеспособность клеток после обработки H_2O_2 оценивали методом МТТ, основанным на ферментативном превращении МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид) в формазан в живых клетках. После удаления культуральной среды к клеткам добавляли раствор МТТ (0.715 мг/мл) в ростовой среде. Через 2 ч раствор заменяли на DMSO для растворения образовавшихся кристаллов формазана и инкубировали клетки в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего измеряли абсорбцию раствора при 570 нм на приборе Fluorofot «Charity».

Распределение клеток по фазам клеточного цикла и изменение их размера оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки снимали с чашек смесью растворов трипсина и Версена (0.05 %), осаждали центрифугированием и промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Одну часть каждого образца использовали для окрашивания йодистым пропидием (PI; 50 мкг/мл) с последующим анализом по протоколу «живые/мертвые клетки», другую часть — для анализа распределения по фазам клеточного цикла. Клетки инкубировали в течение 30 мин в 300 мкл PBS, содержащего 200 мкг/мл сапонина, 250 мкг/мл РНКазы и 50 мкг/мл PI, при комнатной температуре и анализировали на цитометре Coulter EPICS XL Flow Cytometer (Beckman Coulter). Распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали с помощью программы WinMDI, версия 2.8. Изменение размера клеток оценивали с помощью метода прямого светорассеяния на образцах, окрашенных PI, использованных для анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла.

Окрашивание клеток с помощью аннексина V и PI проводили следующим образом. Клетки дважды промывали холодным PBS, ресуспендировали в 1-кратном связывающем буфере, приготовленном из 10-кратного исходного раствора (0.1 М HEPES/NaOH, pH 7.4, 1.4 М NaCl и 25 мМ $CaCl_2$) и инкубировали с 5 мкл аннексина V, меченного ФИТЦ (BD Biosciences, США), и 5 мкл PI при комнатной температуре в темноте. Непосредственно перед анализом добавляли к каждому образцу 400 мкл 1-кратного связывающего буфера. Аннексин V, обладая высоким сродством к остаткам фосфатидилсерина, которые в апоптотических клетках экспонированы на внешнюю сторону мембраны, широко используется как индикатор раннего апоптоза. PI в свою очередь красит только мертвые клетки. Благодаря этим свойствам совместное окрашивание аннексином V и PI

позволяет разделять ранне-, позднеапоптотические и некротические клетки.

Иммуноблоттинг. Клетки дважды промывали холодным PBS и лизировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 10 % глицерина, 1 % Тритона X-100, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ NaF, 0,5 мМ PMSF и коктейль ингибиторов протеаз (1 : 500, Sigma, США), в течение 10 мин на льду. После лизиса клетки соскребали с чашек и центрифугировали в течение 15 мин при 15 000 g. Для определения экспрессии активной каспазы-3 открепившиеся клетки предварительно собирали и лизировали затем вместе с клетками, собранными с чашек. К супернатанту добавляли 1/4 часть буфера для электрофоретических проб (40 мМ Трис, pH 6,8, 10 % SDS, 20 % 2-меркаптоэтанола и 40 % глицерина) и инкубировали в течение 5 мин при 100 °С. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд, используя овальбумин для построения калибровочной кривой. Электрофоретическое разделение белков проводили методом SDS-электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Для визуализации белковых полос использовали Ponceau S (Sigma, США). Для специфического выявления белков использовали моноклональные кроличьи антитела против ингибитора циклинзависимых киназ p21^{Waf1/Cip1}, поликлональные кроличьи антитела против активной каспазы-3 (расщепленной по Asp175) и моноклональные кроличьи антитела против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, clone 14C10). В качестве вторых антител применяли козы антитела, вырабатываемые против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (GAR-HRP). Все антитела были приобретены в фирме Cell Signaling (США). Для детекции пероксидазной активности конъюгатов GAR-HRP использовали реакцию усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham, Швеция). Хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция).

Для анализа уровня экспрессии генов общую РНК экстрагировали с использованием коммерческого набора RNeasy Micro Kit (Qiagen, США), следуя инструкции изготовителя. кДНК получали при отжиге 1 мкг общей РНК с использованием фирменного набора Revert-Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Амплификацию исследуемых генов проводили при помощи Taq-полимеразы (Fermentas, Литва) в амплификаторе Cycler Temp. Стадии ПЦР имели следующие параметры: денатурация при 93 °С в течение 3 мин, 2 мин отжиг праймеров в диапазоне температур от 50 до 70 °С и 1 мин 30 с элонгации при 72 °С. Общее число циклов варьировало от 25 до 27 при сохранении всех параметров, кроме длительности денатурации, которая далее составляла 45 с. После окончания всех циклов пробы инкубировали дополнительно 10 мин при 72 °С.

Для проведения ОТ-ПЦР использовали следующие специфические праймеры: для p21^{Waf1/Cip1}: прямой 5' CCA-CATGGTCTTCCTCTGCTG 3' и обратный 5' GATGTCC-GTCAGAACCCATG 3', температура отжига 55 °С (316 н. п.); для β-актина: прямой 5' GCCGAGCGGGAA-ATCGTGCGT 3' и обратный 5' CGGTGGACGATGGA-GGGGCCG 3', температура отжига 70 °С (507 н. п.). Анализ продуктов ПЦР проводили в горизонтальной уста-

новке для электрофореза, используя для разделения 2%-ный агарозный гель, приготовленный на Трис-ацетатном буфере (pH 7.6) (40 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА и 5.7 % уксусной кислоты), содержащем бромистый этидий в концентрации 0.5 мкг/мл. Для идентификации полученных ПЦР-продуктов использовали маркер молекулярной массы ДНК 100 н.п. (Fermentas, Литва). После электрофореза ДНК в геле визуализировали на трансиллюминаторе при 302 нм.

Активность SA-β-Gal выявляли с использованием фирменного набора «Senescence-galactosidase staining kit» (Cell Signalling Technology, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Клетки на чашках промывали PBS, фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 1-кратным фиксирующим раствором, после чего дважды промывали PBS и окрашивали в β-галактозидазном растворе при 37 °С в течение ночи. Об активности SA-β-Gal судили по появлению синих гранул в цитоплазме клеток.

В работе использовали неорганические соли и перекись водорода производства фирмы Sigma (США).

Результаты

Ранее нами было показано, что при длительном воздействии H₂O₂ (в течение 24 ч) СКЭ обладали более высокой устойчивостью по сравнению с диплоидными фибробластами человека (Бурова и др., 2012). В настоящей работе окислительный стресс вызывали кратковременным (в течение 1 ч) действием на клетки H₂O₂ в концентрации от 200 мкМ до 2 мМ. Диапазоны значений LD₅₀, отражающие концентрацию H₂O₂ в ростовой среде, при которой через 24 ч выживает 50 % клеток, соответствовали 600—700, 370—400 и 300—350 мкМ H₂O₂ для СКЭ, фибробластов и ЭСК соответственно (рис. 1). Однако эти результаты не согласовывались с визуальными наблюдениями: в культурах ЭСК и фибробластов число клеток, открепившихся и плавающих в ростовой среде после стресса, существенно различалось. Поэтому для тестирования цитотоксического эффекта H₂O₂ мы применили подход, описанный ранее в ряде работ (Spitz et al., 1987; Wiese et al., 1995; Chen et al., 2000), и оценивали не молярную концентрацию, а удельное количество H₂O₂, т. е. количество H₂O₂ на 1 клетку (пмоль/кл.). Тогда значения LD₅₀ составили 15.0—17.5, 3.5—4.0 и 1.8—2.1 пмоль/кл. для СКЭ, фибробластов и ЭСК соответственно. На основании полученных результатов можно заключить, что СКЭ являются самыми устойчивыми, тогда как ЭСК — наиболее чувствительными к окислительному стрессу.

Для проверки возможности индукции преждевременного старения в наших экспериментальных условиях нормальные диплоидные фибробласты обрабатывали H₂O₂ в сублетальной концентрации (200 мкМ) в течение 1 ч и затем анализировали основные показатели, характерные для индуцированного стрессом преждевременного старения. Необходимо отметить, что мы использовали фибробласты только на ранних пассажах, чтобы избежать нежелательного репликативного старения клеток, поскольку основные черты индуцированного стрессом и репликативного старения совпадают (Toussaint et al., 2000; Frippi et al., 2001). Наблюдения за H₂O₂-обработанными клетками выявили типичную для стареющих клеток морфологию: клетки становились более плоскими и укрупнялись

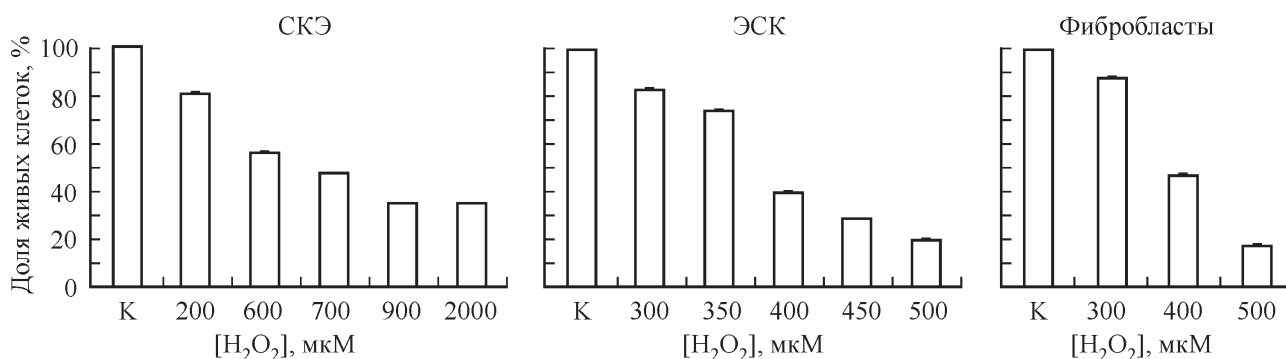


Рис. 1. Жизнеспособность клеток различных типов в зависимости от концентрации H_2O_2 .
Долю живых клеток после обработки H_2O_2 в течение 1 ч оценивали через 24 ч методом МТТ.

(через 5 сут размер клеток увеличивался почти в 2 раза; рис. 2, б), а также увеличивалось число SA- β -Gal-позитивных клеток (рис. 2, а). Характер распределения по фазам клеточного цикла позволяет предположить необратимый арест обработанных клеток во всех фазах цикла по крайней мере в течение 5 сут после действия H_2O_2 (рис. 2, в). Совокупность полученных результатов подтверждает, что сублетальные дозы H_2O_2 действительно инициируют в фибробластах состояние преждевременного старения.

Феномен индуцированного стрессом преждевременного старения в СКЭ до настоящего времени не был исследован. В связи с этим было интересно выяснить, могут ли СКЭ подобно фибробластам подвергаться преждевременному старению в ответ на H_2O_2 в сублетальной концентрации (200 мкМ). Обработка H_2O_2 в течение 1 ч уже через 2 сут приводила к развитию специфичной для старения морфологии — размер клеток увеличивался, клетки становились плоскими и зернистыми. Как показано

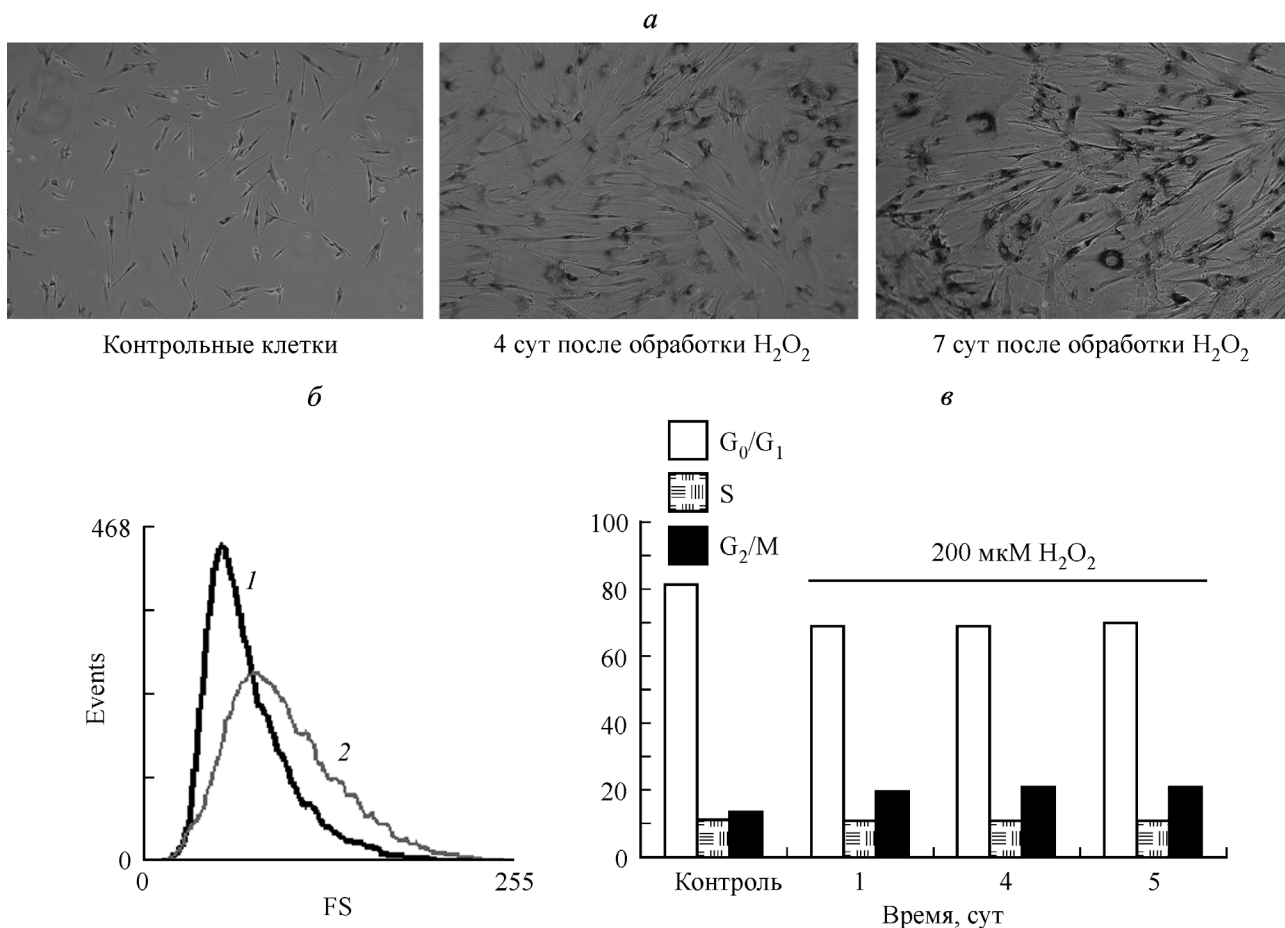


Рис. 2. Оценка основных характеристик преждевременного старения фибробластов после обработки H_2O_2 в сублетальной концентрации (200 мкМ) в течение 1 ч.

а — появление ассоциированной со старением β -галактозидазной активности (темное мечение); б — изменение прямого светорассеяния (FS) PI-окрашенных клеток в зависимости от размера у контрольных клеток (кривая 1) и через 5 сут после обработки H_2O_2 (кривая 2), по вертикали — число событий, усл. ед.; в — распределение по фазам клеточного цикла.

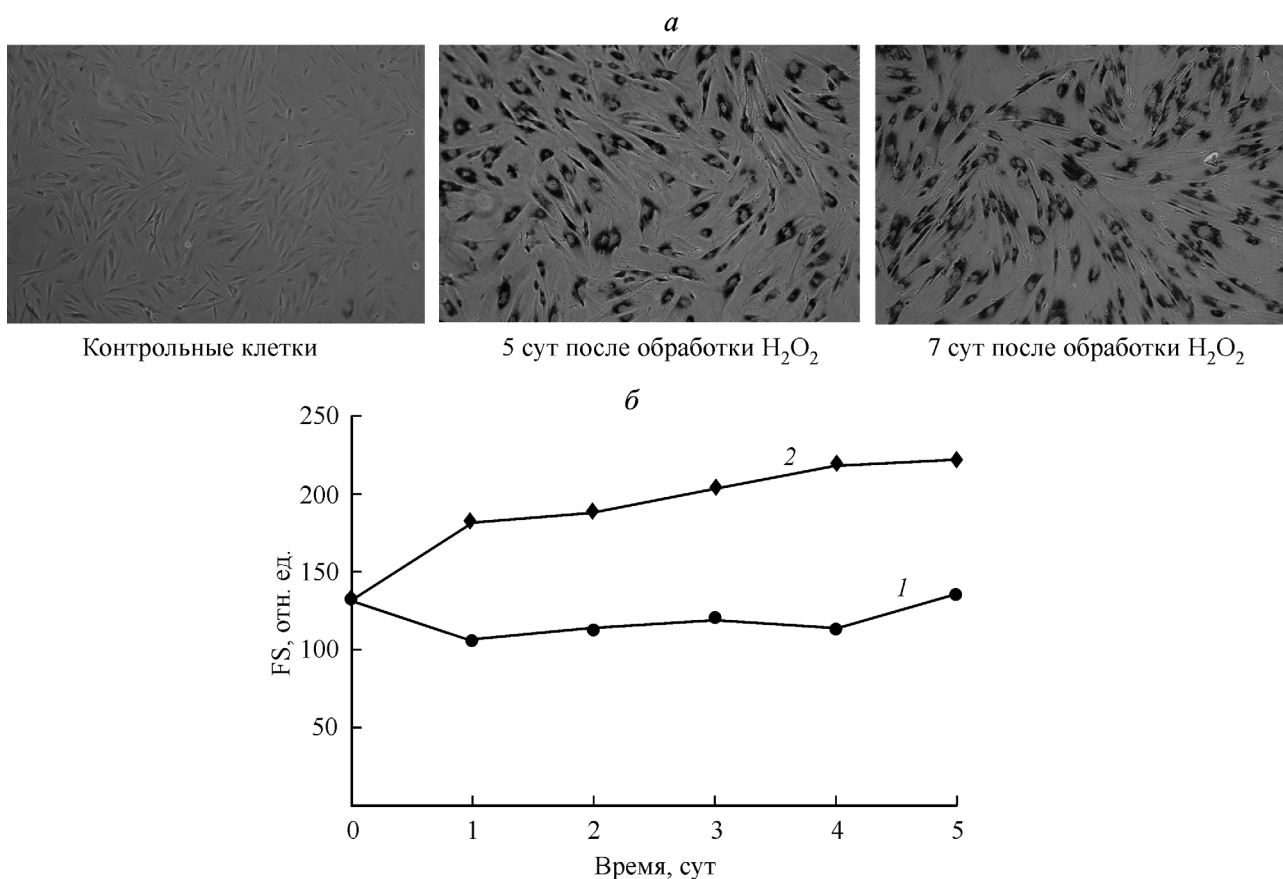


Рис. 3. Изменение морфологии СКЭ при воздействии H₂O₂ в сублетальной концентрации (200 мкМ) в течение 1 ч. *а* — развитие окраски SA-β-Gal после обработки СКЭ; *б* — динамика изменения прямого светорассеяния (FS) от размера PI-окрашенных клеток в контроле (кривая 1) и после обработки H₂O₂ (кривая 2).

методом прямого светорассеяния клеток, окрашенных PI, через 5 сут H₂O₂ индуцировала приблизительно 2-кратное увеличение размера СКЭ, как и в фибробластах (рис. 3, б), что сопровождалось накоплением количества общего белка, определяемого в лизатах клеток методом Бредфорд. Кроме того, в обработанных клетках постепенно увеличивалась окраска на SA-β-Gal, которая через 7 сут становилась максимальной (рис. 3, а), тогда как экспоненциально растущие контрольные клетки проявляли едва заметное увеличение окрашивания на SA-β-Gal.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что морфологические изменения фибробластов и СКЭ сходны при индукции клеточного старения.

Далее мы проанализировали пролиферативный потенциал и распределение по фазам клеточного цикла СКЭ после индукции окислительного стресса. Характер кривой роста свидетельствует об отсутствии увеличения числа клеток, обработанных H₂O₂, по сравнению с контрольными пролиферирующими клетками (рис. 4, а), что может быть связано либо с гибелью обработанных кле-

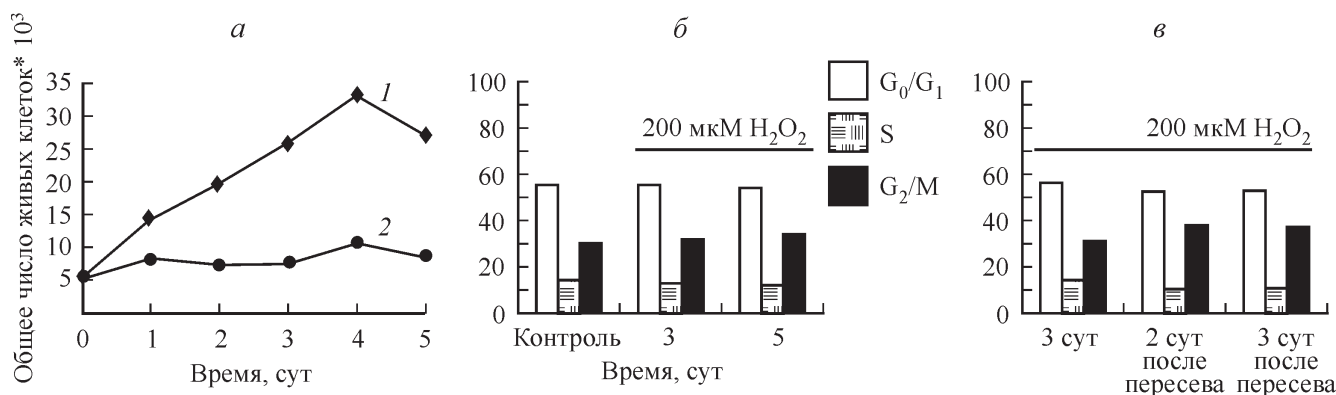


Рис. 4. Кривые роста контрольных (1) и обработанных H₂O₂ в концентрации 200 мкМ (2) СКЭ (а) и распределение этих клеток по фазам клеточного цикла (б, в).

б, в: по вертикали — доля клеток (%) в разных фазах клеточного цикла.

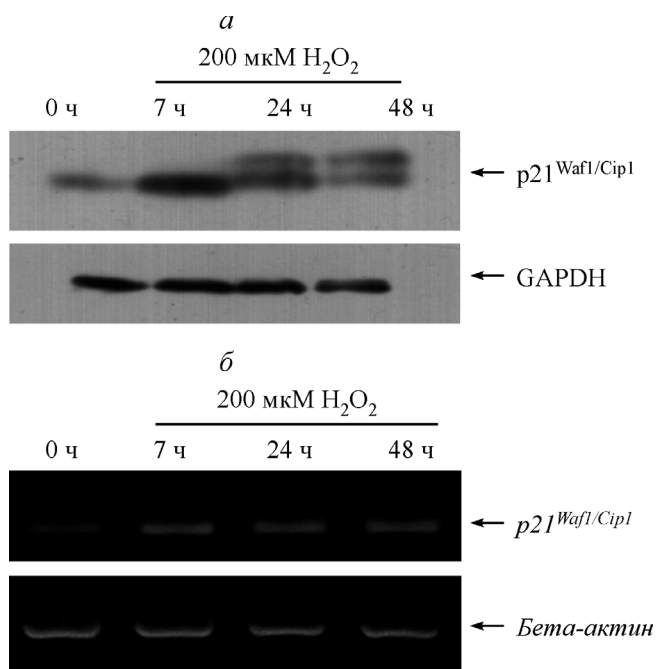


Рис. 5. Динамика изменения содержания белка (а) и мРНК (б) гена $p21^{Waf1/Cip1}$ в контрольных и H_2O_2 -обработанных СКЭ. В качестве контроля равномерности нанесения использовали GAPDH и бета-актин.

ток, либо с блоком клеточного цикла. Поскольку мы наблюдали лишь незначительную гибель при обработке клеток H_2O_2 в концентрации 200 мкМ (рис. 1), далее проанализировали распределение по фазам клеточного цикла. Как видно на рис. 4, б, действие H_2O_2 вызывает длительную остановку клеточного цикла во всех фазах СКЭ в отличие от контрольных клеток. Для подтверждения необратимости потери пролиферативного потенциала остановленные клетки пересеивали и дополнительно культивировали в течение 3 сут. Как показано на рис. 4, в, пересеиваемые клетки по-прежнему находятся в состоянии ареста и имеют такое же распределение по фазам клеточного цикла, как и до посева. Таким образом, H_2O_2 -индуцированное старение СКЭ, как и фибробластов, развивается

вследствие необратимой остановки пролиферации клеток.

Преждевременное старение, вызванное H_2O_2 , в мезенхимных стволовых клетках костного мозга человека сопровождается усилением синтеза белка $p21^{Waf1/Cip1}$ (Brandl et al., 2011; Kim et al., 2011). Повышенный уровень этого белка может опосредовать блок клеточного цикла в результате подавления активности циклинзависимых киназ, способствующих прохождению клеток по фазам цикла (Chen et al., 1998; Toussaint et al., 2000). Для выяснения возможного участия $p21^{Waf1/Cip1}$ в регуляции преждевременного старения СКЭ мы определили количество этого белка и уровень экспрессии его гена. H_2O_2 в концентрации 200 мкМ уже через 7 ч после обработки вызывает значительное увеличение уровней мРНК и белка $p21^{Waf1/Cip1}$ (рис. 5, б и а). Максимальное накопление белка $p21^{Waf1/Cip1}$ наблюдали через 7 ч, уровень которого через 2 сут значительно снижался, но не до контрольного значения. Несмотря на снижение уровня белка $p21^{Waf1/Cip1}$, остановленные клетки не могли возобновить пролиферацию (рис. 4, а) и имели морфологию, характерную для старых клеток (рис. 3, а). Эти данные демонстрируют, что повышение уровня экспрессии $p21^{Waf1/Cip1}$ необходимо для запуска преждевременного старения в СКЭ в ответ на окислительный стресс.

В наших предварительных экспериментах было показано, что H_2O_2 в сублетальных концентрациях, в том числе 200 мкМ, индуцировала апоптоз в ЭСК. Учитывая зависимость жизнеспособности этих клеток от дозы H_2O_2 (рис. 1), логично было предположить, что и при более высоких концентрациях ЭСК будут погибать путем апоптоза. Для проверки этого предположения мы оценили цитотоксическое влияние H_2O_2 в концентрации 500 мкМ на характер гибели ЭСК. Для детекции апоптоза использовали двойное окрашивание клеток с помощью аннексина V и PI. Оказалось, что в популяции ЭСК, обработанных 500 мкМ H_2O_2 , происходят быстрое (через 5 ч) увеличение до 40 % числа раннеапоптотических клеток (AnV⁺) и одновременное снижение доли живых клеток до 47.2 %. При этом в контроле сохранялось 84.7 % живых клеток (рис. 6). Следует отметить, что в контрольных ЭСК наблюдали относительно высокий уровень спонтанного апоптоза (5.6 % AnV⁺-клеток), что характерно для ЭСК (Qin et al., 2007).

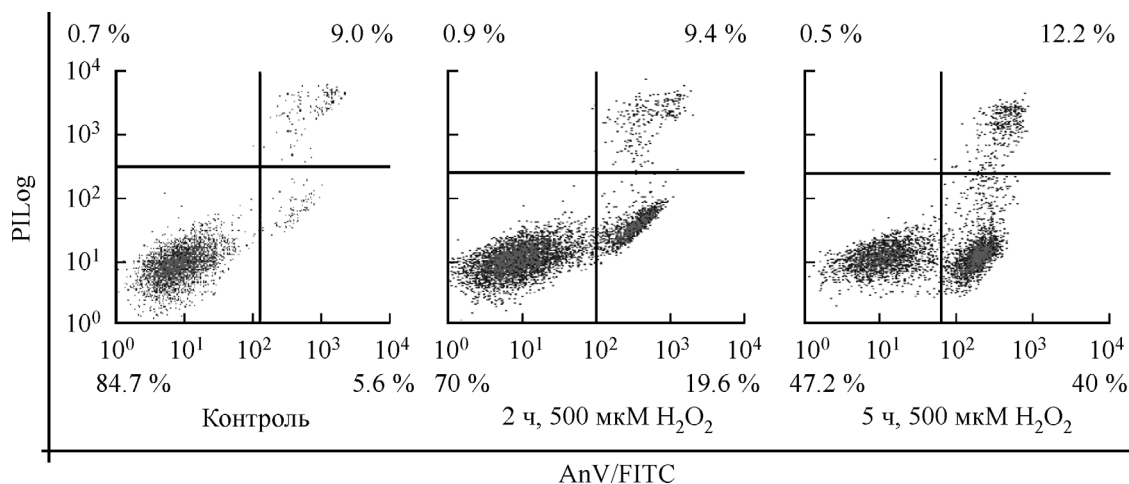


Рис. 6. Распределение ЭСК, меченных AnV/FITC и PI, после действия H_2O_2 в концентрации 500 мкМ. Видно, что при действии H_2O_2 увеличивается доля раннеапоптотических (AnV⁺) клеток (правый нижний квадрант).

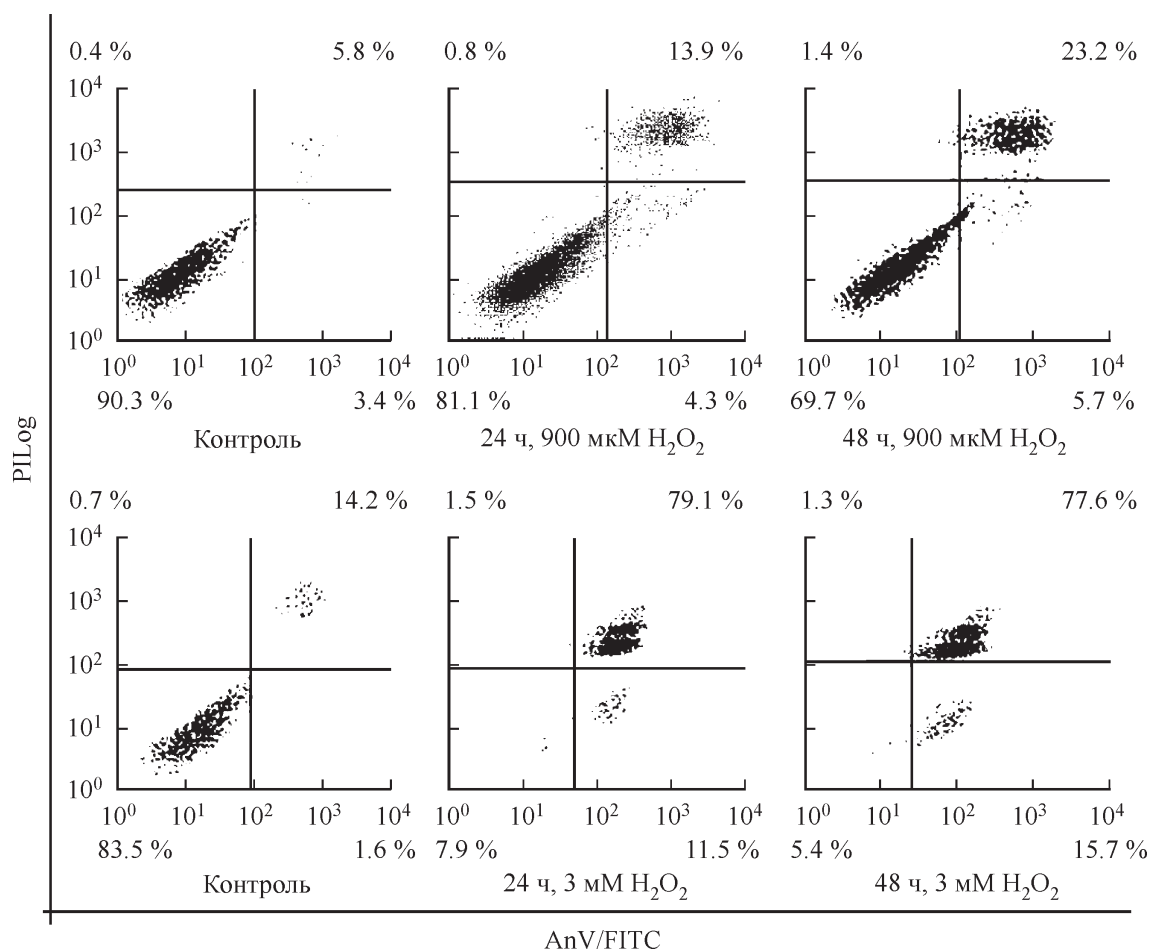


Рис. 7. Распределение ЭСК, меченных AnV/FITC и PI, после действия H₂O₂ в концентрации 900 мкМ или 3 мМ.

На следующем этапе исследований мы проверили, могут ли высокие концентрации H₂O₂ вызывать апоптоз в СКЭ в наших экспериментальных условиях. Как видно на рис. 7 (верхняя панель), после обработки клеток 900 мкМ H₂O₂ через 24 ч наблюдается лишь небольшое увеличение (до 4.3 %) числа AnV⁺-клеток, которое почти не изменяется через 48 ч, тогда как доля AnV⁺/PI⁺-клеток заметно возрастает (23.2 % против 5.8 % в контроле). Эти данные позволяют говорить о наличии медленно развивающегося апоптоза в СКЭ. Как мы и ожидали, H₂O₂ в более высокой концентрации (3 мМ) также вызвала апоптоз СКЭ, но значительно более сильный и быстрый: уже через 24 ч

доля AnV⁺-клеток увеличилась до 11.5 %, тогда как доля AnV⁺/PI⁺-клеток — до 79.1 % (рис. 7). Для выяснения механизма H₂O₂-индуцированной гибели СКЭ и ЭСК определяли активность каспазы-3 методом Вестерн-блоттинга. В H₂O₂-обработанных ЭСК через 4 ч детектировали максимальный уровень активной (расщепленной) каспазы-3, который уменьшался до контрольного значения через 24 ч (рис. 8). В свою очередь, в СКЭ лишь через 24 ч наблюдали экспрессию активной каспазы-3 на заметном, но значительно более низком, чем в ЭСК, уровне. Таким образом, для обеих линий клеток активация каспазы-3 совпадает по времени с появлением AnV⁺-клеток. Получен-

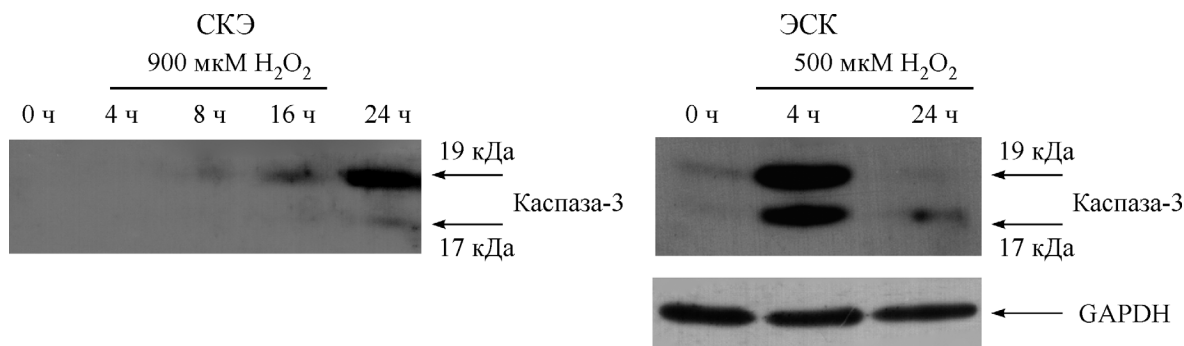


Рис. 8. Выявление каспазы-3 в лизатах СКЭ и ЭСК после действия H₂O₂.

Имуноблоттинг проводили с использованием антител против активной (расщепленной по аспарагину 175) каспазы-3. В качестве контроля равномерности нанесения белка использовали GAPDH.

ные результаты позволяют предполагать вовлечение каспазы-3 в H_2O_2 -индуцированный апоптоз как в ЭСК, так и в СКЭ.

Обсуждение

В настоящей работе мы провели сравнительный анализ специфических ответов на окислительный стресс ЭСК и СКЭ. Принимая во внимание противоречивость литературных данных о характере ответа стволовых клеток разного происхождения на стресс, а также отсутствие сведений о характере поведения СКЭ в условиях окислительного стресса, такое исследование представлялось весьма актуальным.

Несмотря на растущее число работ (Chen et al., 2006; Valle-Prieto, Conget, 2010; Brandl et al., 2011), демонстрирующих высокую устойчивость к окислительному стрессу мезенхимных стволовых клеток человека из разных источников, прямое сравнение результатов, представленных различными авторами, часто затруднено из-за разных экспериментальных условий и подходов. К тому же изучение окислительного стресса по ряду причин оказывается довольно сложным. В том случае, когда окислительный стресс моделируется действием экзогенной H_2O_2 , на устойчивость клеток влияет большое число факторов, которые следует учитывать: концентрация и объем раствора H_2O_2 , длительность обработки, уровень метаболизма H_2O_2 , специфичный для каждого типа клеток. Как показывает анализ литературы, для большинства работ по оценке цитотоксического эффекта H_2O_2 на клетки характерно использование молярной концентрации H_2O_2 . Однако для более корректной и адекватной оценки цитотоксичности было предложено использовать удельное количество H_2O_2 , измеряемое в пикомолях на 1 клетку (пмоль/кл.; Spitz et al., 1987; Wiese et al., 1995; Chen et al., 2000); такой подход мы применили и в нашей работе.

Ранее нами было показано, что при непрерывном действии H_2O_2 в течение 24 ч устойчивость СКЭ была в 3 раза выше, чем у эмбриональных фибробластов человека (Бурова и др., 2012). В рамках настоящего исследования мы сравнили чувствительность трех линий клеток — ЭСК, фибробластов и СКЭ — в условиях обработки H_2O_2 в течение 1 ч. Как и в предыдущей работе, СКЭ оказались гораздо более устойчивыми к действию H_2O_2 по сравнению с фибробластами. Это следует из диапазонов значений LD_{50} , составляющих 1.8—2.1, 3.5—4.0 и 15.0—17.5 пмоль/кл. для ЭСК, фибробластов и СКЭ соответственно. По нашим предварительным данным, в H_2O_2 -обработанных СКЭ повышен уровень ферментов антиоксидантной защиты, таких как супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза, что может быть одной из основных причин толерантности СКЭ к стрессу. Эти наблюдения хорошо согласуются с сообщениями о высокой устойчивости к окислительному стрессу мезенхимных стволовых клеток спинного мозга человека, которая была связана с высоким базальным уровнем антиоксидантной защиты клеток (Valle-Prieto, Conget, 2010; Brandl et al., 2011). В то же время относительно высокая чувствительность к действию H_2O_2 мезенхимных стволовых клеток человека из пуповинной крови коррелировала с низкими уровнями активности ферментов антиоксидантной защиты (Ko et al., 2012).

Мы показали, что ЭСК чрезвычайно чувствительны к действию H_2O_2 , которая индуцировала в клетках настоль-

ко сильный апоптоз, что уже через 4 ч после стресса доля ApV^+ -клеток возрастала почти в 7 раз. Тем не менее после элиминации таким путем поврежденных клеток в популяции ЭСК через 48 ч возобновлялась нормальная пролиферация. Эти наблюдения согласуются с хорошо известными фактами о значительной склонности ЭСК к апоптозу при увеличении температуры (Alekseenko et al., 2012), а также при действии агентов, повреждающих ДНК, таких как ионизирующая радиация (Filion et al., 2009; Luo et al., 2012) или этопозид (Grandela et al., 2007). Предполагают, что в ЭСК для поддержания геномной стабильности должны быть хорошо развиты механизмы, обеспечивающие репарацию ДНК и (или) элиминацию поврежденных клеток из популяции. Как было обнаружено, высокая чувствительность ЭСК к различным стрессовым воздействиям коррелирует с более эффективной работой систем репарации ДНК, чем в соматических клетках (Maynard et al., 2008; Luo et al., 2012). Наши результаты, демонстрирующие быструю и массовую гибель ЭСК в ответ на действие H_2O_2 , свидетельствуют в пользу того, что H_2O_2 -индуцированный апоптоз служит защитным механизмом от стресса, благодаря которому поврежденные клетки эффективно элиминируются из клеточной популяции с целью сохранения геномной стабильности ЭСК (Stambrook, Tichy, 2010).

Совершенно другая ситуация характерна для СКЭ: в соответствии с высокой устойчивостью этих клеток к токсическому действию H_2O_2 апоптоз медленно развивался лишь при действии высоких концентраций H_2O_2 . Так, при действии 900 мкМ H_2O_2 мы детектировали повышенный уровень апоптоза в части популяции клеток только через 1 сут, в то время как большая часть клеток постепенно входила в состояние индуцированного старения. При более высоких концентрациях H_2O_2 (3 мМ) апоптоз становился преимущественным ответом СКЭ на стресс. Зависимость гибели поврежденных при окислительном стрессе клеток (ЭСК и СКЭ) от активности каспазы-3, несмотря на различную динамику активации этой эффекторной каспазы, позволяет предположить, что основные черты апоптоза сходны в обоих типах стволовых клеток, однако для детального выяснения механизма необходимы дальнейшие исследования.

Наиболее интересная находка нашей работы заключается в том, что СКЭ подобно фибробластам могут подвергаться индуцированному преждевременному старению в условиях окислительного стресса. Процесс старения в ответ на действие H_2O_2 в сублетальных дозах развивался в популяции СКЭ постепенно и характеризовался существенным усилением экспрессии гена ингибитора циклинзависимых киназ *p21^{Waf1/Cip1}* и увеличением синтеза его белка, необратимым блоком клеточного цикла и подавлением пролиферации, гипертрофией клеток и появлением ассоциированной со старением β -галактозидазной активности.

Проблема старения мезенхимных стволовых клеток человека вызывает особый интерес исследователей в течение последних нескольких лет. Однако с 2009 г., когда в литературе впервые был описан феномен индуцированного стрессом преждевременного старения мезенхимных стволовых клеток, появилось лишь несколько сообщений о старении в результате окислительного стресса стволовых клеток человека, полученных из костного мозга (Brandl et al., 2011; Kim et al., 2011) и пуповинной крови (Ko et al., 2012). В отличие от упомянутых клеток, инвазивное получение которых связано с определенным рис-

ком для пациента, СКЭ дают уникальную возможность изучения механизма H₂O₂-индуцированного старения в клетках человека, полученных простым неинвазивным методом (Земелько и др., 2011). Отметим, что хотя основные признаки процесса старения в мезенхимных клетках разного происхождения были похожи, динамика аккумуляции p21^{Waf1/Cip1} и уменьшения скорости пролиферации клеток существенным образом различалась в зависимости от клеточного контекста (Brandl et al., 2011; Kim et al., 2011). Результаты нашего исследования в совокупности с известными данными литературы позволяют предположить, что индукция преждевременного старения является общим физиологическим ответом на стресс мезенхимных стволовых клеток любого происхождения. Можно полагать, что взрослые стволовые клетки мезенхимной природы именно таким образом защищают себя от различных повреждающих воздействий, чтобы избежать злокачественной трансформации.

Таким образом, полученные данные доказывают, что принципиально разные ответы СКЭ и ЭСК на окислительный стресс регулируются различными внутриклеточными механизмами: ЭСК после воздействия H₂O₂ быстро элиминируют поврежденные клетки через апоптоз, тогда как СКЭ аналогично фибробластам при сублетальных концентрациях H₂O₂ подвергаются преждевременному старению.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01581-а).

Список литературы

- Бурова Е. Б., Люблинская О. Г., Шатрова А. Н., Бородкина А. В., Никольский Н. Н. 2012. Сравнительный анализ устойчивости к окислительному стрессу стволовых клеток эндометрия и фибробластов человека. *Цитология*. 54 (6) : 478—483.
- Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнина А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Кирсанов 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.
- Alekseenko L. L., Zemelko V. I., Zenin V. V., Pugovkina N. A., Kozhukharova I. V., Kovaleva Z. V., Grinchuk T. M., Fridlyanskaya I. I., Nikolsky N. N. 2012. Heat shock induces apoptosis in human embryonic stem cells but a premature senescence phenotype in their differentiated progeny. *Cell Cycle*. 11 : 3260—3269.
- Banfi A., Bianchi G., Notaro R., Luzzatto L., Cancedda R., Quarto R. 2002. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*. 8 : 901—910.
- Bladier C., Wolvetang E. J., Hutchinson P., de Haan J. B., Kola I. 1997. Response of a primary human fibroblast cell line to H₂O₂: senescence-like growth arrest or apoptosis? *Cell Growth Differ*. 8 : 589—598.
- Blagosklonny M. V. 2012. Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging (Albany NY)*. 4 : 159—165.
- Brandl A., Hartmann A., Bechmann V., Graf B., Nerlich M., Angele P. 2011. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J. Orthop. Res*. 29 : 1114—1120.
- Brandl A., Meyer M., Bechmann V., Nerlich M., Angele P. 2011. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res*. 317 : 1541—1547.
- 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 (Pt 1) : 43—50.
- Chen Q. M., Liu J., Merrett J. B. 2000. 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.
- Cmielova J., Havellek R., Soukup T., Jiroutová A., Visek B., Suchánek J., Vavrova J., Mokry J., Muthna D., Bruckova L., Filip S., English D., Rezacova M. 2012. Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. *Int. J. Radiat. Biol.* 88 : 393—404.
- Demidenko Z. N., Zubova S. G., Bukreeva E. I., Pospelov V. A., Pospelova T. V., Blagosklonny M. V. 2009. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle*. 8 : 1888—1895.
- Digirolamo C. M., Stokes D., Colter D., Phinney D. G., Class R., Prockop D. J. 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br. J. Haematol.* 107 : 275—281.
- Duan J., Zhang Z., Tong T. 2005. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 : 1407—1420.
- Dumont P., Burton M., Chen Q. M., Gonos E. S., Fripiat C., Mazarati J. B., Eliaers F., Remacle J., Toussaint O. 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Rad. Biol. Med.* 28 : 361—373.
- Filion T. M., Qiao M., Ghule P. N., Mandeville M., van 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.
- Fripiat C., Chen Q. M., Zdanov S., Magalhaes J. P., Remacle J., Toussaint O. 2001. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276 : 2531—2537.
- 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.
- Grandela C., Pera M. F., Grimmond S. M., Kolle G., Wolvetang E. J. 2007. p53 is required for etoposide-induced apoptosis of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 1 : 116—128.
- Guo Y.-L., Chakraborty S., Rajan S. S., Wang R., Huang F. 2010. Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence, and self-renewal. *Stem Cells Develop.* 19 : 1321—1331.
- Kim J. S., Kim E. J., Kim H. J., Yang J. Y., Hwang G. S., Kim C. W. 2011. Proteomic and metabolomic analysis of H₂O₂-induced premature senescent human mesenchymal stem cells. *Exp. Gerontol.* 46 : 500—510.
- Ko E., Lee K. Y., Hwang D. S. 2012. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells undergo cellular senescence in response to oxidative stress. *Stem Cells Develop.* 21 : 1877—1886.
- Larsen S. A., Kassem M., Rattan S. I. 2012. Glucose metabolite glyoxal induces senescence in telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Chem. Cent. J.* 6:18.
- Luo L. Z., Gopalakrishna-Pillai S., Nay S. L., Park S. W., Bates S. E., Zeng X., Iverson L. E., O'Connor T. R. 2012. DNA repair in human pluripotent stem cells is distinct from that in non-pluripotent human cells. *PLoS ONE*. 7 : e30541.
- Majumdar M. K., Thiede M. A., Mosca J. D., Moorman M., Gerson S. L. 1998. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 176 : 57—66.

- Maynard S., Swistowska A. M., Lee J. W., Liu Y., Liu S. T., Da Cruz A. B., Rao M., de Souza-Pinto N. C., Zeng X., Bohr V. A. 2008. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells*. 26 : 2266—2274.
- Medrano E. E., Im S., Yang F., Abdel-Malek Z. A. 1995. Ultraviolet B light induces G₁ arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21^{Waf-1/SDI-1/Cip-1} protein. *Cancer Res.* 55 : 4047—4052.
- Ogryzko V. V., Hirai T. H., Russanova V. R., Barbie D. A., Howard B. H. 1996. Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol. Cell. Biol.* 16 : 5210—5218.
- Oh C. W., Bump E. A., Kim J. S., Janigro D., Mayberg M. R. 2001. Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 156 : 232—240.
- Otto W. R., Wright N. A. 2011. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogen Tiss. Repair*. 4 : 20.
- Qin H., Yu T., Qing T., Liu Y., Zhao Y., Cai J., Li J., Song Z., Qu X., Zhou P., Wu J., Ding M., Deng H. 2007. Regulation of apoptosis and differentiation by p53 in human embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 282 : 5842—5852.
- 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.
- Stambrook P. J., Tichy E. D. 2010. Preservation of genomic integrity in mouse embryonic stem cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 695 : 59—75.
- Stein G. H., Drullinger L. F., Soulard A., Dulić V. 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 2109—2117.
- Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 33 : 919—926.
- Toma C., Pittenger M. F., Cahill K. S., Byrne B. J., Kessler P. D. 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 105 : 93—98.
- Toussaint O., Medrano E. E., von Zglinicki T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontol.* 35 : 927—945.
- Valle-Prieto A., Conget P. A. 2010. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Develop.* 19 : 1885—1893.
- Wang D., Jang D. J. 2009. Protein kinase CK2 regulates cytoskeletal reorganization during ionizing radiation-induced senescence of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 69 : 8200—8207.
- Wiese A. G., Pacifici R. E., Davies K. J. 1995. Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 318 : 231—240.

Поступила 18 IV 2013

DIFFERENCES IN DEFENSE MECHANISMS AGAINST OXIDATIVE STRESS
IN BOTH HUMAN EMBRYONIC AND ENDOMETRIUM-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

A. V. Borodkina,¹ A. N. Shatrova, N. A. Pugovkina, V. I. Zemelko,
N. N. Nikolsky, E. B. Burova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: springwater@mail.ru

Oxidative stress has been shown to induce either apoptosis or stress-induced premature senescence (SIPS) in different cell types. At present, it is generally accepted that stem cells have high resistance to oxidative stress; however data reported by various authors are controversial. In this study, we investigated stress responses of human embryonic stem cells (hESC) and human mesenchymal stem cells (hMESC) derived from desquamated endometrium to hydrogen peroxide (H₂O₂). Cell viability was evaluated by MTT assay. LD₅₀ were determined as 300—350, 350—400 and 600—700 μM for hESC, human embryonic fibroblasts and hMESC, respectively. Thus, among the cell lines studied, hMESC demonstrated the most resistance to increased H₂O₂ concentration. We have found for the first time that sub-lethal doses of H₂O₂ induce premature senescence phenotype in hMESC, like in HEF, which is characterized by increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{Waf1/Cip1}, an irreversible cell cycle arrest, the permanent loss of proliferative potential, cell hypertrophy and SA-β-Gal staining. While a sub-lethal H₂O₂ dose (200 μM) promoted in hMESC only SIPS, the higher H₂O₂ doses induced also apoptosis in the part of the cell population. On the contrary, in hESC, H₂O₂ regardless of the doses tested (from 50 to 500 μM) triggered apoptosis, that was the only pronounced response of these cells to oxidative damage. The data obtained demonstrate that stem cells of various origins under oxidative stress utilize the different defense mechanisms: hESC rapidly eliminate damaged cells through apoptosis, whereas hMESC may enter SIPS.

Key words: stem cells, oxidative stress, premature senescence, apoptosis.