

## РЕАКЦИЯ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ И ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

© А. Н. Шатрова,<sup>1</sup> О. Г. Люблинская, А. В. Бородкина, Е. Б. Бурова

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;*

<sup>1</sup>электронный адрес: *Shatrova@mail.ru*

Мезенхимные стволовые клетки человека в последнее время все шире применяются в качестве источника для регенерации поврежденных органов. При трансплантации они зачастую подвергаются окислительному стрессу со стороны клеток окружающих тканей. Ранее в экспериментах с клеточными культурами мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека (СКЭ) мы показали, что характер ответа СКЭ на окислительный стресс определяется силой окислительного воздействия, которая зависит от концентрации окислителя. Помимо концентрации  $H_2O_2$  сила окислительного воздействия может быть связана также с длительностью действия окислителя. В настоящей работе сравнивали реакцию СКЭ и эмбриональных фибробластов легкого человека (ЭФЧ) на действие  $H_2O_2$  в высоких дозах при длительности окислительного стресса 60 и 10 мин. Обработка как СКЭ, так и фибробластов  $H_2O_2$  в течение 60 мин приводила к остановке пролиферации и дозозависимой гибели клеток во всех фазах клеточного цикла в равной степени. При этом наблюдали существенные различия характера и динамики клеточной гибели. Совершенно иначе реагировали клетки обоих типов при сокращении времени окислительного воздействия до 10 мин. Рост клеток замедлялся, они постепенно накапливались в фазе  $G_1$  клеточного цикла и увеличивались в размере. Совокупность этих фактов позволяет предположить индукцию преждевременного старения. Таким образом, сокращение продолжительности окислительного стресса при действии  $H_2O_2$  в высоких дозах дает возможность модулировать ответ клеток от гибели до индукции старения.

**Ключевые слова:** стволовые клетки эндометрия, фибробласты, окислительный стресс, клеточная гибель, преждевременное старение.

**Принятые сокращения:** АФК — активные формы кислорода, СКЭ — стволовые клетки эндометрия человека, ЭФЧ — эмбриональные фибробласты легкого человека, PI — иодистый пропидий, AnV — аннексин V.

Перекись водорода ( $H_2O_2$ ) является естественным метаболитом клетки, который постоянно генерируется как в качестве побочного продукта клеточного дыхания, так и в ответ на различные стимулы, включая цитокины и ростовые факторы.  $H_2O_2$  вовлечена в регуляцию разнообразных биологических процессов, таких как пролиферация, дифференцировка, миграция клеток и экспрессия генов (Gamaley, Klyubin, 1999; Droge, 2002; Munoz et al., 2002; Veal et al., 2007; Liochev, 2013). Концентрация  $H_2O_2$  в нормальных клетках колеблется в пределах 1—700 нМ и в целом контролируется различными энзиматическими и неэнзиматическими антиоксидантными системами (Hayes, McLellan, 1999; Trachootham et al., 2008; Sarsour et al., 2009; Gulden et al., 2010; Veal, Day, 2011). Повышение внутриклеточной концентрации  $H_2O_2$  (выше 1 мкМ) вызывает в клетках окислительный стресс, приводящий в конечном итоге к развитию различного вида патологий (Dröge, 2002; Klein, Ackerman, 2003; Naderi et al., 2006; Stone, Yang, 2006; Gu et al., 2009). Обработка культивируемых клеток с помощью  $H_2O_2$  обычно используется в качестве модели для исследования физиологической функции  $H_2O_2$ , оценки чувствительности клеток к действию  $H_2O_2$  и эффективности работы антиоксидантных систем

(Trachootham et al., 2008; Sarsour et al., 2009; Gulden et al., 2010; Kaczara et al., 2010). Ответ клеток на окислительный стресс в экспериментальных системах зависит от многих факторов: типа клеточных моделей, которые различаются как по базальному уровню активных форм кислорода (АФК), так и по уровню экспрессии основных участников антиоксидантной защиты, плотности посева клеток, пролиферативного статуса клеток, времени экспозиции и, наконец, концентрации  $H_2O_2$  (Garg, Chang, 2003; Naderi et al., 2003; Garg, Chang, 2004; Domazet-Damjanov et al., 2009; Benhusein et al., 2010; Brenner et al., 2010; Gulden et al., 2010; Wang et al., 2010; Alarif, 2011). При исследовании чувствительности клеток к токсическому действию  $H_2O_2$  в разных работах можно встретить существенно отличающиеся друг от друга пороговые цитотоксические значения концентрации  $H_2O_2$ , находящиеся в диапазоне от 10 до 1000 мкМ (Davies, 1999; Gulden et al., 2010). Такой разброс объясняется не только разной чувствительностью исследуемых клеточных культур к действию  $H_2O_2$ , но и использованием разных экспериментальных условий. В настоящее время для оценки чувствительности клеток считается корректным использовать не номинальную концентрацию  $H_2O_2$ , а количество  $H_2O_2$  в

расчете на 1 клетку (в единицах пМ/кл.) или на единицу общего белка в клетке (Spitz et al., 1987; Wiese et al., 1995; Gulden et al., 2010). В этом случае цитотоксический эффект  $H_2O_2$  не зависит от плотности посева клеток (Gulden et al., 2010).

Описано множество разнообразных ответов клеток на действие  $H_2O_2$  — от стимуляции пролиферации и временной адаптации до индукции старения, апоптоза и некроза (Bladier et al., 1997; Davies, 1999; Teramoto et al., 1999; Chen et al., 2000; Hunt et al., 2010). При исследовании чувствительности клеток к окислительному стрессу основной характеристикой является жизнеспособность клеток, которую оценивают либо при помощи МТТ-теста, либо путем подсчета клеток, окрашенных трипановым синим или иодистым пропидием. Для детекции гибели и стрессиндуцированного старения клеток широко используется метод проточной цитофлуориметрии (Lescœur et al., 2001; Long et al., 2004; Duan et al., 2005; Noppe et al., 2009; Park, 2013).

Результаты многочисленных исследований, в которых оценивали влияние окислительного стресса на клетки, сложно сравнивать ввиду различных экспериментальных условий, и в первую очередь это касается концентраций  $H_2O_2$ . На асинхронных фибробластах линии IMR-90 показано, что при низких дозах  $H_2O_2$  наиболее чувствительными к действию окислителя являются клетки, находящиеся в фазе S клеточного цикла. Такие клетки погибают путем апоптоза, а в клетках, остановленных в фазах  $G_1$  и  $G_2/M$ , развиваются черты старения в течение 1 нед. Более высокие дозы  $H_2O_2$ , по мнению авторов, вызывают некротическую гибель клеток (Chen et al., 2000). У других авторов те же синхронизированные клетки IMR-90 тоже обладали наибольшей чувствительностью к действию  $H_2O_2$  в фазе S. Именно в этих клетках окислительный стресс индуцирует устойчивые повреждения ДНК, постоянный блок клеточного цикла и в конечном итоге преждевременное старение (Chen et al., 2005).

Целью настоящей работы является изучение ответа СКЭ и ЭФЧ (пролиферативный статус, выживаемость) на действие высоких доз  $H_2O_2$  при модуляции времени воздействия. Одновременный анализ выживаемости и пролиферативного статуса позволил оценить характер изменений клеточных ответов на окислительный стресс. Полученные результаты показывают, что сокращение времени инкубации клеток с  $H_2O_2$  с 60 до 10 мин изменяет ответ как СКЭ, так и ЭФЧ: при длительных воздействиях клетки погибают, а при коротких стресс индуцирует их старение при отсутствии гибели.

### Материал и методика

Клеточные культуры и обработка  $H_2O_2$ . Использовали стволовые клетки эндометрия (СКЭ) человека линии 2304, полученные в Отделе внутриклеточной сигнализации и транспорта (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) из десквамированного эндометрия (Земелько и др., 2011), и эмбриональные фибробласты легкого человека (ЭФЧ) линии FRL-9505. СКЭ использовали на 6—10-м пассажах. ЭФЧ получены из НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ. Клетки использовали на 15—28-м пассажах. Клетки обеих линий культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1 % гентамицина и 1 % глутамакса, в атмосфере 5 %  $CO_2$  при 37 °C во

флаконах 25 или 75 см<sup>2</sup>. Для экспериментов клетки рассевали на чашки диаметром 35 мм. Посевная плотность составляла 12 и 20—30 тыс./см<sup>2</sup> для СКЭ и ЭФЧ соответственно. Для индукции окислительного стресса 30%-ную  $H_2O_2$  (Sigma) разбавляли до нужной концентрации непосредственно перед использованием. Продолжительную обработку (24 ч) проводили путем добавления раствора окислителя непосредственно в ростовую среду. Пульс обработки (60, 30 и 10 мин) клеток проводили в среде без сыворотки после их предварительной однократной промывки той же средой. По окончании инкубации с  $H_2O_2$  клетки промывали дважды средой без сыворотки или PBS и далее инкубировали в свежей ростовой среде при 37 °C в атмосфере  $CO_2$ . Клетки, всплывшие и дезагрегированные с помощью 0.05%-ного раствора трипсина с ЭДТА (Gibco, Великобритания), объединяли, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в растворе PBS. Далее часть клеток использовали для оценки выживаемости, остальные — для оценки пролиферативного статуса клеток в условиях окислительного стресса.

Оценка выживаемости клеток. К суспензии необработанных и обработанных  $H_2O_2$  клеток добавляли 50 мкг/мл иодистого пропидия (PI, Sigma), перемешивали в течение 30 с и анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Анализ проводили на цитометре Coulter EPICS XL (Becton Coulter, США) при максимальной скорости подачи образца (1 мкл/с) в течение 100 с. Сбор данных осуществляли на основе оптических характеристик — флуоресценция PI против прямого светорассеяния в логарифмической шкале (FSLOG/FL4LOG). Выживаемость клеток оценивали как отношение числа живых клеток после  $H_2O_2$ -обработки к числу живых клеток в контроле. Для обработки данных использовали программу WinMDI (версия 2.8).

Детекцию апоптоза с помощью аннексина V осуществляли согласно стандартному протоколу фирмы-производителя (BD Pharmingen, США). Необработанные и обработанные  $H_2O_2$  клетки дважды промывали охлажденным раствором PBS и осаждали центрифугированием. Далее клетки ресуспендировали в 1-кратном связывающем буфере (0.1 M HEPES/NaOH, pH 7.4, 1.4 M NaCl и 25 mM CaCl<sub>2</sub>), так чтобы концентрация клеток составляла  $1 \cdot 10^6$ /мл; 100 мкл полученной суспензии клеток переносили в пробирку для анализа. Затем к клеткам добавляли 5 мкл раствора аннексина V-FITC (AnV/FITC), 10 мкл PI (конечная концентрация 5 мкг/мл) и инкубировали в течение 15 мин в темноте. Затем к клеткам добавляли 400 мкл 1-кратного связывающего буфера, осторожно перемешивали и анализировали на проточном цитометре по крайней мере в течение 1 ч.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла. К контрольным и обработанным с помощью  $H_2O_2$  клеткам добавляли 0.25 мг/мл РНКазы, 50 мкг/мл PI и 0.2 мг/мл сапонина (все от Sigma). Окрашивание ДНК проводили в течение 30—60 мин. Для каждого образца анализировали не менее 10 000 событий. Данные собирали в List Mode-файлы и анализировали с помощью программ ModFit LT для Win 32 (Verity Software House, Topsham, ME) и WinMDI (версия 2.8). Для построения гистограмм использовали Microsoft Office Excel 2003.

Анализ содержания АФК в клетках. Клетки окрашивали  $H_2DCFDA$  (Molecular Probes) в концентрации 10 мкМ в среде, не содержащей сыворотки, в течение 20 мин при 37 °C в темноте. По окончании инкубации

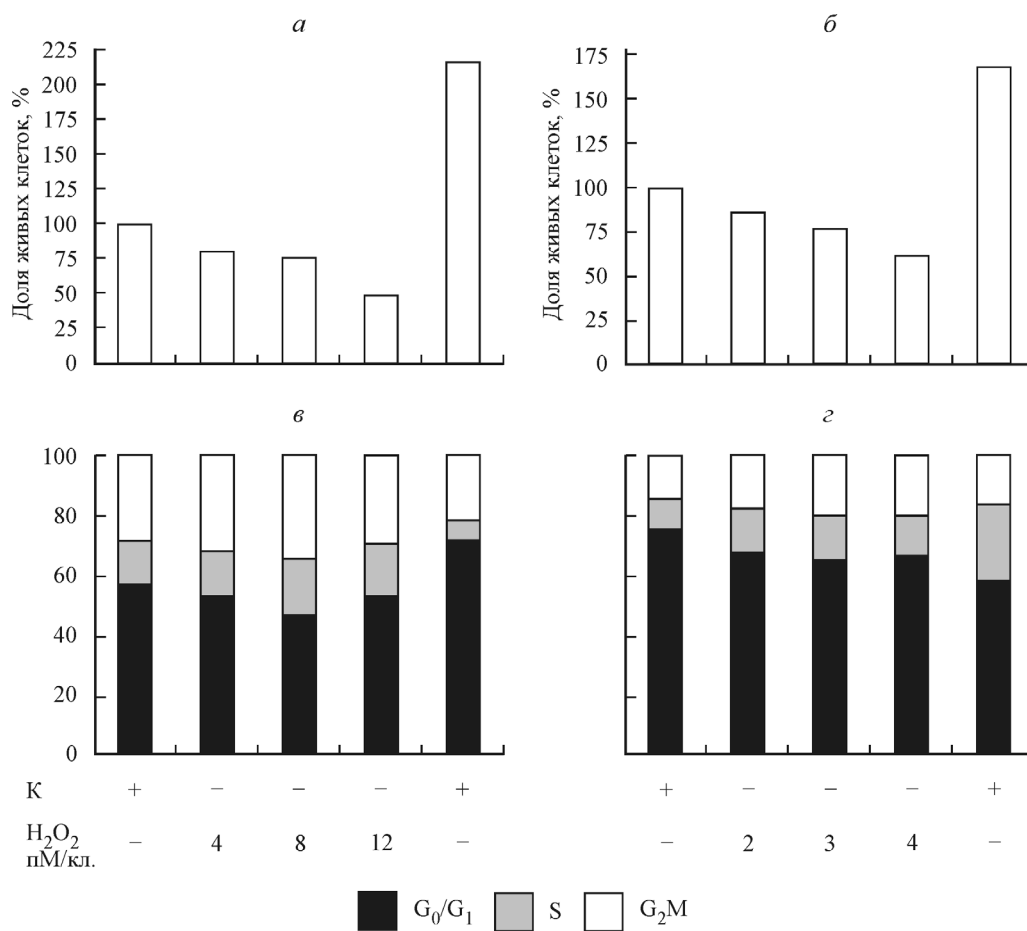


Рис. 1. Выживаемость и пролиферативный статус стволовых клеток эндометрия (СКЭ) и эмбриональных фибробластов легкого человека (ЭФЧ) после продолжительного воздействия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в зависимости от дозы окислителя.

Анализ проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием PI, выживаемость клеток (а, б) оценивали через 24 ч после индукции окислительного стресса как отношение числа живых клеток после инкубации с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> к числу живых клеток в контроле в момент добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, %; в, г — анализ распределения СКЭ и ЭФЧ по фазам клеточного цикла через 24 ч после индукции стресса. По вертикали — доля клеток, %.

клетки суспендировали в растворе трипсина с ЭДТА, переносили в пробирку с ростовой средой и оценивали изменение флуоресценции DCF (отн. ед.), используя проточный цитофлуориметр.

### Результаты

В настоящей работе на первом ее этапе оценивали ответ СКЭ и ЭФЧ на действие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в диапазоне доз, близких LD50, равных LD50 и превышающих LD50, при пролонгированном действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (24 ч). На рис. 1 представлены сравнительные данные о выживаемости СКЭ и ЭФЧ (а, б) и их распределении по фазам клеточного цикла (в, г) в зависимости от использованных доз H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Значения LD50 совпадают с полученными ранее (Бурова и др., 2012) и составляют 12 и 4 пМ/кл. для СКЭ и ЭФЧ соответственно. Через 24 ч после действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> независимо от использованных доз окислителя клетки обеих линий отвечают остановкой пролиферации. Интересно отметить, что распределение обработанных H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> клеток по фазам цикла не изменяется по сравнению с распределением в контрольных образцах в момент добавления окислителя. При этом распределение по фазам цикла пролиферирующих клеток в контрольных образцах существенно

различается (рис. 1, в, г). Наблюдаемые одновременно остановка пролиферации, дозозависимая гибель клеток и неизменное распределение их по фазам цикла позволяют предполагать гибель обработанных клеток из всех фаз клеточного цикла в равной степени.

В следующей серии экспериментов мы исследовали ответы клеток обеих линий при сокращении времени инкубации с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до 60 мин. На основании цитометрического анализа с использованием PI определены значения LD50, которые составили 10—11 пМ/кл. для СКЭ и 4 пМ/кл. для ЭФЧ (рис. 2, а, б), что совпадает со значениями LD50 при продолжительном воздействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 1, а, б). На двухмерных цитограммах (рис. 2, в, г) в координатах прямое светорассеивание (FS) против флуоресценции иодистого пропидия (PI) показано дозозависимое перераспределение клеток через 24 ч после действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Заметны постепенное сокращение популяции «живых» PI<sup>-</sup>-клеток, увеличение популяции PI<sup>+</sup>- или «мертвых» клеток и появление популяции клеток (отмечено стрелкой), которая характеризуется постепенным уменьшением величины FS (коррелирующей с размером клеток) и увеличением проницаемости к PI. Следует отметить, что динамика появления этих клеток в пределах исследуемых линий различается. Полученные данные позволяют предположить, что описанная популяция

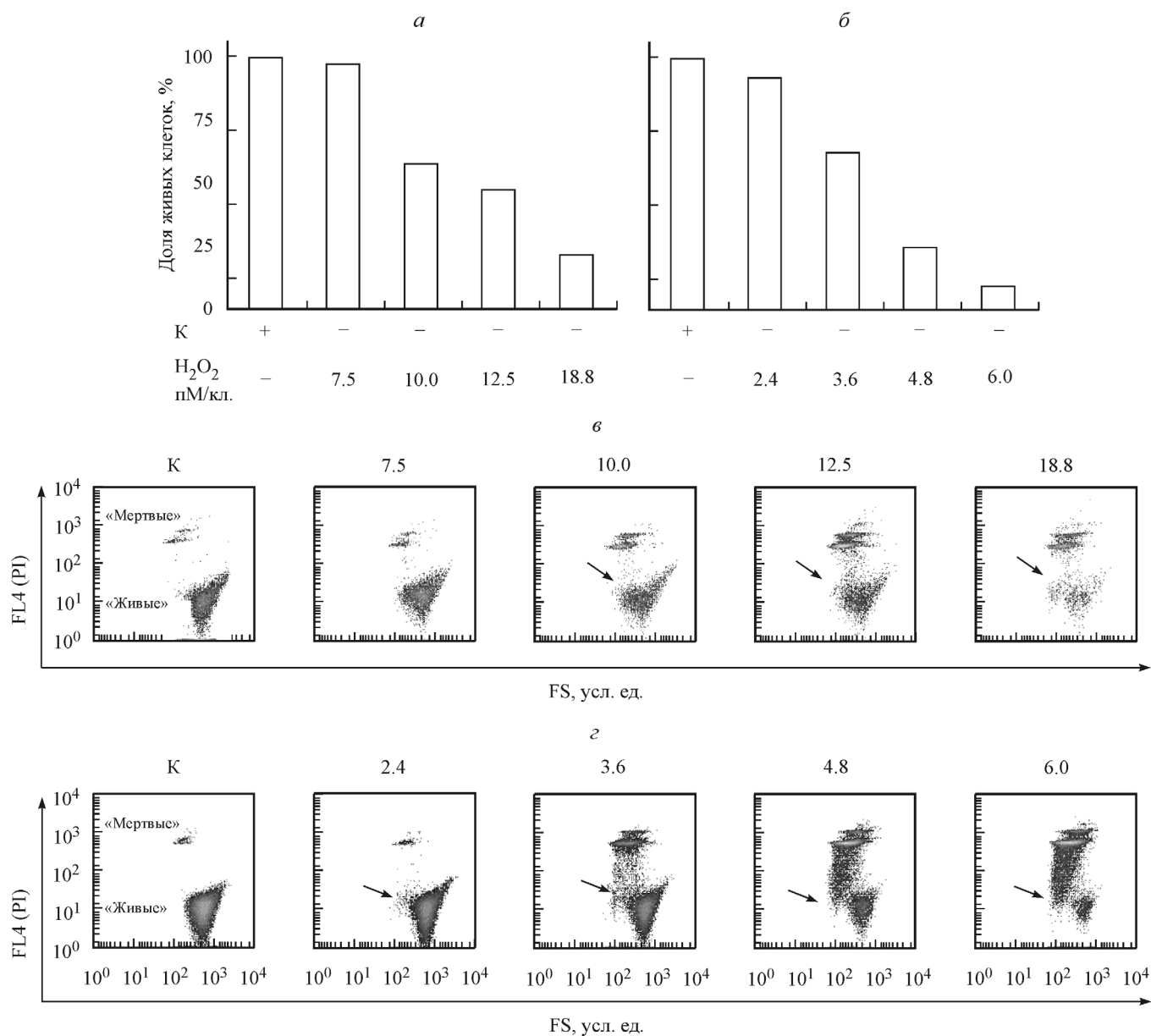


Рис. 2. Сравнительная оценка чувствительности СКЭ (а, б) и ЭФЧ (б, з) к 60-минутному действию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в зависимости от дозы окислителя.

а, б — выживаемость клеток через 24 ч после индукции стресса (проточная цитофлуориметрия, как и на рис. 1); в, з — те же данные представлены в виде двухмерных цитогрэм в координатах: прямое светорассеяние (FS) против флуоресценции иодистого пропидия (PI); стрелками показана популяция погибающих PI-клеток. К — контроль.

«гибнущих» клеток относится к ранним апоптотическим AnV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>-клеткам. В связи с этим был проведен тест с использованием AnV-FITC/PI, традиционно применяемый для детекции апоптоза. Двухмерные цитогрэм (рис. 3, I, II, а) в координатах FS/PI демонстрируют положение выделенных в отдельное «окно» погибающих клеток в координатах AnV/PI. Искомые клетки занимают правый нижний квадрат и являются AnV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> (рис. 3, I, II, б).

Характер и динамика гибели СКЭ и ЭФЧ после 60-минутного воздействия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> представлены на рис. 4, I, II. Видно (рис. 4, II, б), что через 24 ч после воздействия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на ЭФЧ появляются раннеапоптотические (AnV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>, 11.9 %) и позднеапоптотические (AnV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>, 25.5 %) клетки. При этом индукция апоптоза увеличива-

ется через 48 ч, о чем свидетельствует увеличение почти в 2 раза фракций AnV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> и AnV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>. При дозе, превышающей LD50 в 2.5 раза, наблюдается массовая гибель ЭФЧ (рис. 4, II, в) уже через 24 ч; при этом доля погибающих клеток составляет почти 80, а раннеапоптотических — 5 %. Динамика и характер гибели СКЭ заметно отличались от ЭФЧ. При дозе, вызывающей гибель LD50 (рис. 4, I, б), основную популяцию погибших клеток представляют позднеапоптотические клетки (AnV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>, 41.9 % через 24 ч), а доля раннеапоптотических AnV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>-клеток составляла 6.6 %. Такое соотношение сохранялось последующие 24 ч. При дозе, превышающей LD50 почти в 3 раза (рис. 4, I, в), почти все клетки погибли (доля живых клеток составляла 9.4 и 5 % через 24 и 48 ч соответственно). Интересным наблюдением является

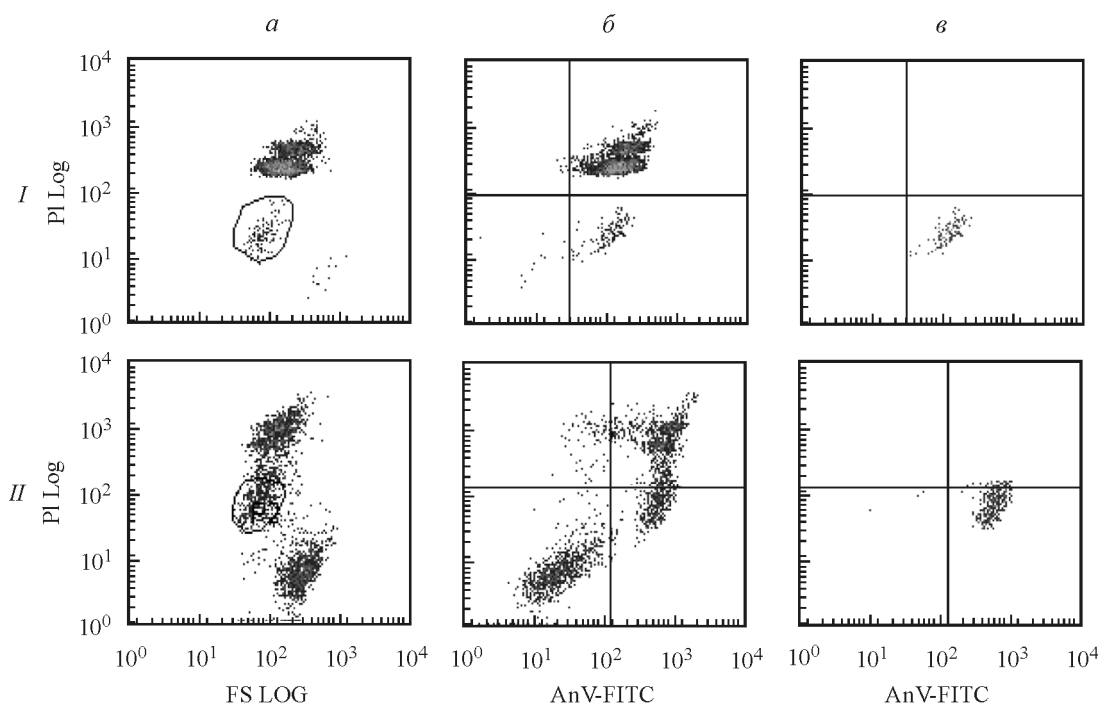


Рис. 3. Выделение фракции раннеапоптотических СКЭ (I) и ЭФЧ (II).

Тест с использованием аннексина V, меченного флуоресцеином, и PI (AnV-FITC/PI). В координатах FS/PI (I, II, a) для каждой линии «гибнущие» клетки, негативные по PI и меньше по размеру (FS), были выделены в отдельные «окна». Далее находили положение выделенных клеток в координатах AnV-FITC/PI. Видно, что искомые клетки расположены в зоне раннеапоптотических An<sup>+</sup>PI-клеток (I, II, в).

выявление отчетливой фракции AnV<sup>+</sup>/PI-клеток (до 11.8 % через 48 ч) при этой дозе.

Следующим этапом работы был анализ ответа клеток на действие высоких доз H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 30 мин. Использовали эмбриональные фибробласты ЭФЧ. Действие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в дозах от 4 до 6 пМ/кл. не вызывало гибели клеток через 24 ч после воздействия. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла не выявил различий по сравнению с таковым после пролонгированного и 60-минутного воздействия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (данные не показаны). Однако анализ клеточного цикла (SS/PI) показал существенное перераспределение клеток, находящихся в S-фазе, по сравнению с клетками в контроле (рис. 5, a, б). Действие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> приводило к истощению популяции клеток в ранней S-фазе, что указывает на торможение перехода из G<sub>1</sub>-фазы в S-фазу. Дальнейшие эксперименты показали, что остановка пролиферации клеток, обработанных H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, сохраняется в течение 3 сут (рис. 6, a). При этом величина FS, коррелирующая с размером клеток, возрастает в 1.5 раза (рис. 6, б) по сравнению с контролем. Таким образом, наблюдаемые эффекты (остановка пролиферации, значительное увеличение FS и торможение перехода G<sub>1</sub> → S) могут свидетельствовать о вовлечении клеток, обработанных H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 30 мин, в процесс индуцированного старения.

На последнем этапе работы были проанализированы реакции СКЭ и ЭФЧ на кратковременное действие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (в течение 10 мин). Как показано на рис. 7, a, б, обработанные H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ЭФЧ замедляют пролиферацию как минимум на 3 сут при отсутствии гибели. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла выявил изменение соотношения обработанных клеток в разных фазах цикла по сравнению с контрольными. Так, отношение G<sub>1</sub>/S по числу клеток увеличилось в 2.5 раза через 3 сут после

действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 пМ/кл.), что свидетельствует о накоплении клеток в G<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла. Аналогичные данные, свидетельствующие о торможении пролиферации и появлении G<sub>1</sub>-блока клеточного цикла, были получены через 6 сут после действия 10 пМ/кл. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на СКЭ (рис. 8, I, в). В результате такой обработки величина FS клеток обеих линий увеличилась (рис. 8, I, II, д, е). Совокупность полученных данных позволяет предположить индукцию преждевременного старения как ЭФЧ, так и СКЭ при краткосрочном действии высоких доз H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Дополнительным подтверждением индукции преждевременного старения клеток СКЭ является поддержание высокого уровня АФК, который к 6-м сут увеличивается в 4 раза (рис. 8, I, ж).

Таким образом, несмотря на более высокую устойчивость СКЭ к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> по сравнению с ЭФЧ, характер ответа клеток и его временная зависимость каждой линии были одинаковы.

## Обсуждение

Окислительный стресс вызывает широкий спектр ответов клеток млекопитающих от стимуляции пролиферации, временного торможения роста, адаптации к стрессу до необратимого торможения роста, апоптотической или некротической гибели (Davies, 1999). Одним из основных факторов, определяющих характер ответа, является концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В настоящее время считается корректным учитывать количество H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (дозу), отнесенное к числу клеток или к количеству общего белка в клетке (Spitz et al., 1987; Wiese et al., 1995; Chen et al., 2000; Gulden et al., 2010). Однако не все авторы используют этот подход, что весьма затрудняет адекватную сравнительную

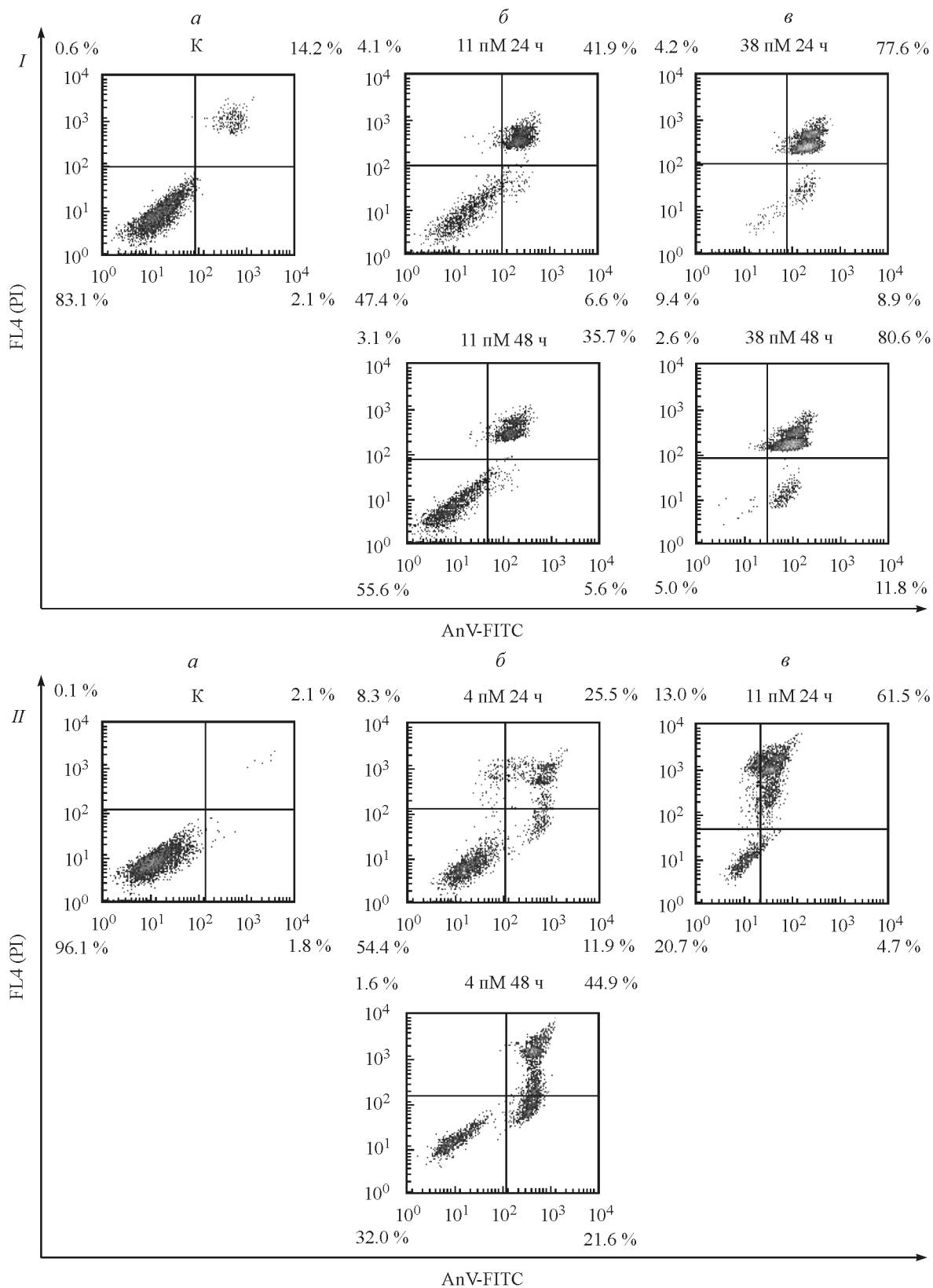


Рис. 4. Сравнительный анализ динамики и характера гибели СКЭ (I) и ЭФЧ (II) через 24 и 48 ч после индукции окислительного стресса, вызванного 60-минутным действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. AnV-FITC/PI-тест.

Для каждой линии использовали дозу H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, соответствующую LD50 (I, II, б) и превышающую LD50 (I, II, в); К (I, II, а) — контроль.

оценку полученных данных. Кроме того, чувствительность клеток к окислительному стрессу может зависеть от числа пассажей, возраста доноров клеток и уровня активности ферментов антиоксидантной защиты (Allen et al., 1999). Так, было показано, что мезенхимные стволовые клетки, выделенные из кожи человека (sMSC), и кератиноциты линии HaCaT обладают разной чувствительностью к окислительному стрессу, вызванному H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Авторы полагают, что клетки sMSC более склонны к апоптозу, так как обладают слабой антиоксидантной защитой (Orciani et al., 2010). Другими авторами показано, что мезенхимные стволовые клетки человека проявляют устойчивость к окислительному стрессу, так как способны эффективно регулировать его (Valle-Prieto, Conget, 2010). Ранее мы показали, что СКЭ более устойчивы к окислительному стрессу, чем ЭФЧ (Бурова и др., 2012). В настоящей работе мы подтвердили полученные ранее результаты и продемонстрировали, что пролонгированное (1-суточное) действие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в высоких дозах вызывает блок пролиферации и гибель СКЭ и ЭФЧ во всех фазах в равной степени. Следует отметить, что аналогичное блокирование клеточного цикла уже наблюдали при воздей-

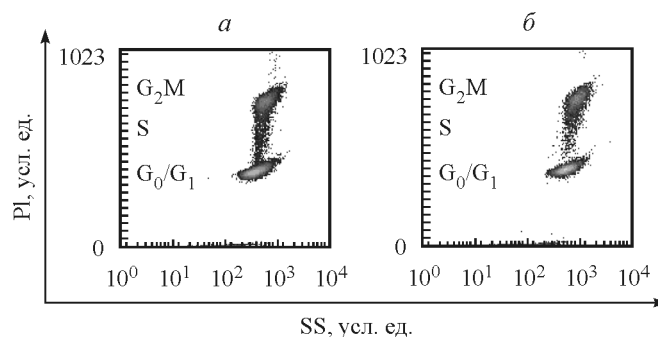


Рис. 5. Характер распределения ЭФЧ по фазам клеточного цикла в контроле (а) и через 24 ч после 30-минутного действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 пМ/кл.) (б).

По горизонтали — боковое светорассеяние (SS, отн. ед.); по вертикали — флуоресценция PI, отн. ед.

ствии сублетальных доз H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на мышинные эмбриональные фибробласты (Varnouin et al., 2002). Кроме того, было показано, что мышинные эмбриональные стволовые клетки линии СЗН10Т1/2, находящиеся в разных фазах

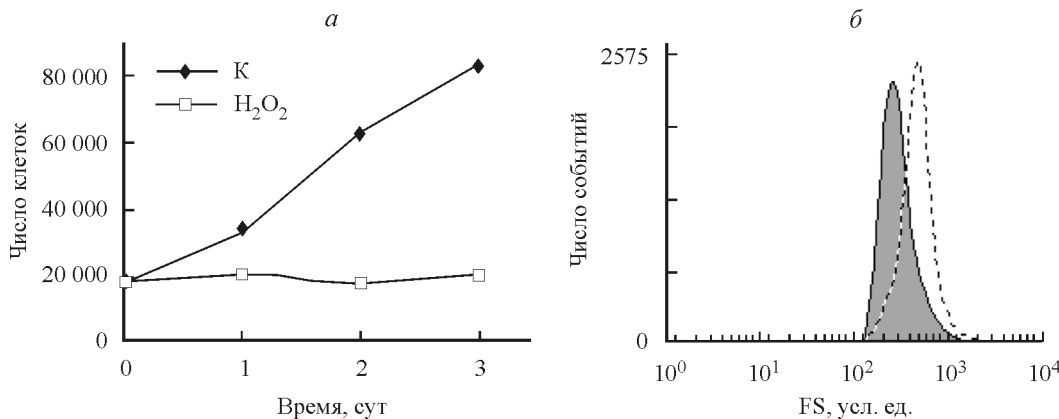


Рис. 6. Ответ ЭФЧ на кратковременный окислительный стресс (30 мин).

а — кривые роста в контроле (К) и после действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4.5 пМ/кл.); по вертикали — число проанализированных клеток за 100 с. б — гистограмма распределения клеток в контроле (сплошная линия) и через 3 сут после действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> по параметру прямого светорассеяния (FS).

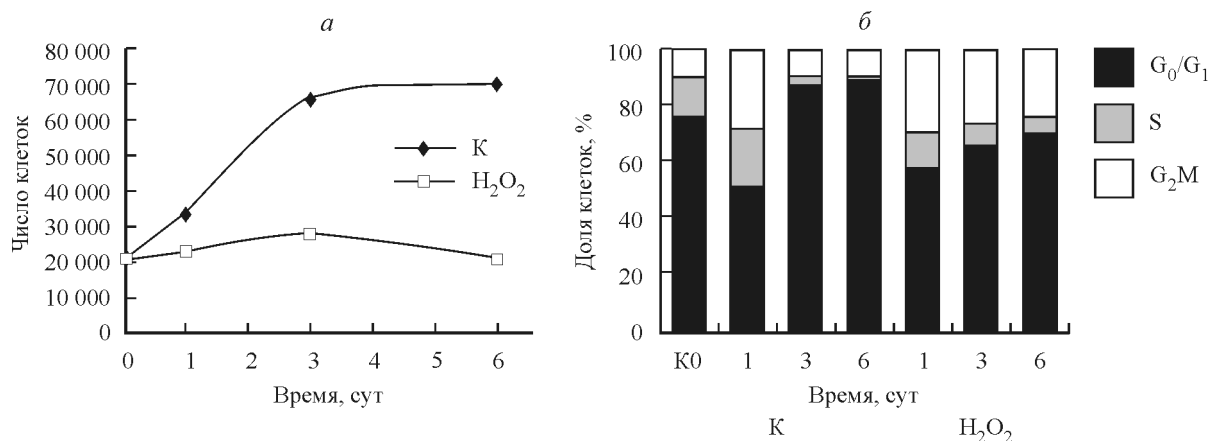


Рис. 7. Ответ ЭФЧ на сокращение времени действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до 10 мин.

а — кривая роста клеток, измерения с использованием PI; клетки инкубировали с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 пМ/кл.), в течение 10 мин, цитометрический анализ пролиферативного статуса ЭФЧ обработанных и необработанных клеток проводили через 1, 3 и 6 сут. б — распределение ЭФЧ по фазам клеточного цикла; отношение G<sub>1</sub>/S увеличилось в 2.5 раза через 3 сут после действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 пМ/кл.), что свидетельствует о накоплении клеток в G<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла.

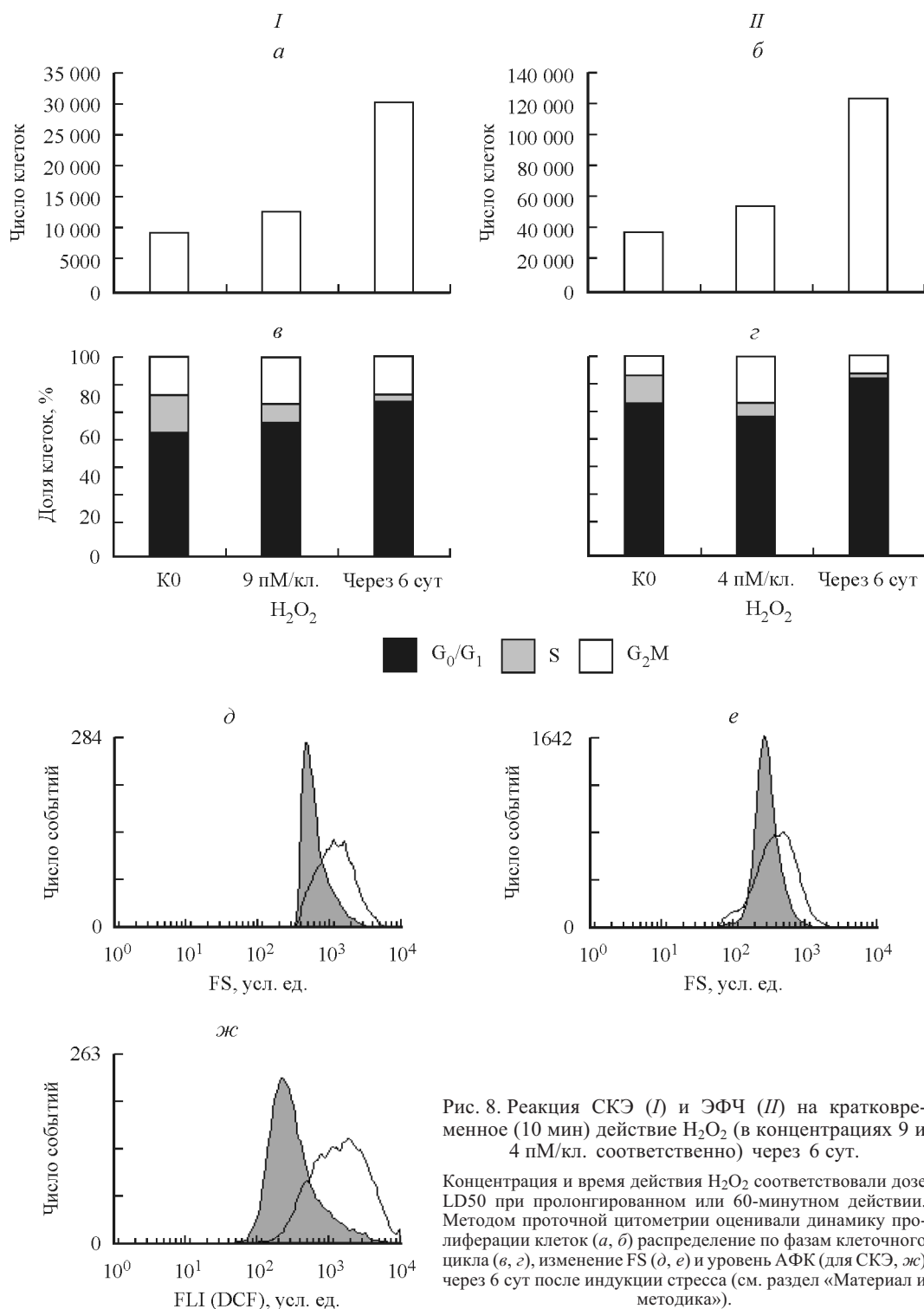


Рис. 8. Реакция СКЭ (I) и ЭФЧ (II) на кратковременное (10 мин) действие  $H_2O_2$  (в концентрациях 9 и 4 пМ/кл. соответственно) через 6 сут.

Концентрация и время действия  $H_2O_2$  соответствовали дозе LD50 при пролонгированном или 60-минутном действии. Методом проточной цитометрии оценивали динамику пролиферации клеток (а, б) распределение по фазам клеточного цикла (в, г), изменение FS (д, е) и уровень АФК (для СКЭ, ж) через 6 сут после индукции стресса (см. раздел «Материал и методика»).

клеточного цикла, одинаково реагируют на действие высоких доз  $H_2O_2$  (Villani et al., 2000).

Ответ на окислительный стресс можно модулировать разными способами: изменением или дозы  $H_2O_2$  на 1 клетку, или объема инкубационной среды, или времени действия окислителя, или плотности посева клеток (Gülden et al., 2010). На фибробластах человека было показано, что при увеличении концентрации  $H_2O_2$  характер ответа клеток изменяется от остановки пролиферации и появления морфологических изменений, характерных для

стареющих клеток, до апоптотической и некротической гибели (Bladier et al., 1997; Davies, 1999; Teramoto et al., 1999; Chen et al., 2000; Guo et al., 2010; Hunt et al., 2010). В зависимости от плотности посева и соответственно различного пролиферативного статуса клеток был получен разный ответ фибробластов на действие  $H_2O_2$  в высокой (500 мкМ) концентрации в течение 1 ч: активно пролиферирующие клетки (в 50%-ном монослое) отвечали индукцией апоптоза, в то время как покоящиеся фибробласты (в 100%-ном монослое) — индукцией преждевременного



старения (Naderi et al., 2003; Domazet-Damjanov et al., 2009). Другими авторами была показана индукция старения после 2-кратного воздействия высокой дозы  $H_2O_2$  (4 пМ/кл. или 600 мкМ) в течение 2 ч (Chen et al., 2004). Упомянутые выше данные сложно сравнивать, так как авторы, использующие одну и ту же высокую концентрацию  $H_2O_2$  на клетках с разной плотностью посева, не учитывали фактора дозы  $H_2O_2$  на клетку. Понятно, что большее число клеток за 60 мин более успешно утилизируют окислитель, тем самым защищая себя от его токсического воздействия. Мы использовали постоянную для каждой линии посевную плотность (субконфлюэнтную), высокие дозы  $H_2O_2$ , а ответ клеток модулировали сокращением продолжительности воздействия до 60, 30 и 10 мин.

При 60-минутной длительности воздействия реакция клеток эндометрия и фибробластов на высокие дозы  $H_2O_2$  была подобна таковой при продолжительном (24 ч) стрессе и различалась только характером гибели клеток: доля раннеапоптотических СКЭ существенно меньше, чем в случае ЭФЧ. Характерную для каждого типа клеток динамику гибели можно объяснить их разной устойчивостью к окислительному стрессу. Возможно, индукция апоптоза СКЭ вызывается при более сильных повреждениях, чем это происходит у ЭФЧ. С другой стороны, постоянное наличие большого числа клеток  $An^+PI^+$  и одновременно малого числа  $An^+P^-$  у СКЭ свидетельствует о том, что СКЭ преимущественно погибают иным способом, который требует дополнительного исследования. Известно, что методом проточной цитометрии с использованием  $AnV-FITC/PI$  сложно отличить ранние апоптотические от первичных некротических клеток, так как те и другие являются  $AnV^+/PI^-$  (Sawai, Domaе, 2011). Вероятно, предложенное авторами использование некростатина-1, ингибитора первичного некроза, позволило бы пролить свет на путь гибели СКЭ.

Ранее нами уже было показано, что в течение 60 мин низкие дозы  $H_2O_2$  (2.5 пМ/кл.) полностью утилизируются СКЭ (Borodkina et al., 2014). При этом мы наблюдали необратимое блокирование пролиферации СКЭ и отсутствие их гибели в течение 5 сут. Всесторонний анализ заблокированных клеток позволял выявить различные маркеры старения (Бородкина и др., 2013; Burova et al., 2013). В настоящей работе нам было интересно изучить характер ответа клеток на сокращение продолжительности окислительного стресса до 30—10 мин и использование высоких доз  $H_2O_2$ . Очевидно, что, сокращая продолжительность воздействия до 30 и 10 мин при неизменной концентрации  $H_2O_2$ , мы тем самым уменьшаем дозу окислителя на клетку. Поэтому понятие «доза» становится чисто условным. Мы обнаружили, что ответ ЭФЧ и СКЭ на краткосрочные воздействия высоких доз  $H_2O_2$  характеризуется остановкой пролиферации, отсутствием гибели и увеличением размера клеток при их продолжительном культивировании, а также увеличением внутриклеточного уровня АФК. Эти данные указывают на то, что ответом на кратковременный стресс для обеих клеточных линий является  $H_2O_2$ -индуцированное преждевременное старение клеток.

Представленные результаты позволяют сделать вывод о подобном ответе СКЭ и ЭФЧ на окислительный стресс в пределах цитотоксических доз, характерных для каждой линии. В настоящее время в литературе появляется все больше данных в пользу выявления у фибробластов человека свойств, характерных для мезенхимных

стволовых клеток: это и супрессия иммунного ответа, и дифференцировочный потенциал, и экспрессия поверхностных антигенов (Haniffa et al., 2009; Chang et al., 2014). Возможно, именно этим обстоятельством объясняется качественное сходство ответа СКЭ и ЭФЧ на действие  $H_2O_2$  в диапазоне доз, соответствующих их чувствительности к окислительному воздействию.

Выводы. Динамика ответа СКЭ и ЭФЧ (имеющих разную чувствительность к  $H_2O_2$ ) на окислительный стресс при использовании высоких доз  $H_2O_2$  одинакова и не зависит от времени действия  $H_2O_2$ . При кратком действии  $H_2O_2$  (60 мин), как и при пролонгированном (24 ч), ответ заключается в остановке пролиферации и дозозависимой гибели во всех фазах. Сокращение экспозиции до 10 мин приводит к замедлению (остановке) пролиферации, остановке в фазе клеточного цикла  $G_1$ , увеличению размеров клеток и поддержанию в них высокого уровня АФК, т. е. к появлению признаков преждевременного старения. Нами показана возможность модуляции ответа клеток от гибели до старения при использовании короткой экспозиции и высоких доз  $H_2O_2$ .

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00718).

#### Список литературы

- Бородкина А. В., Шатрова А. Н., Пуговкина Н. А., Земелько В. И., Никольский Н. Н., Бурова Е. Б. 2013. Различные защитные механизмы эмбриональных и тканеспецифичных стволовых клеток человека в условиях окислительного стресса. Цитология. 55 (8) : 517—526. (Borodkina A. V., Shatrova A. N., Pugovkina N. A., Zemelko V. I., Nikolsky N. N., Burova E. B. 2014. Different protective mechanisms of human embryonic and endometrium-derived mesenchymal stem cells under oxidative stress. Cell Tissue Biol. 8 (1) : 11—21.)
- 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. (Burova E. B., Lyublinskaja O. G., Shatrova A. N., Borodkina A. V., Nikolsky N. N. 2012. Comparison of human endometrial stem cells and fibroblasts resistance to oxidative stress. Tsitologiya. 54 (6) : 478—483.)
- 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.
- Allen R. G., Tresini M., Keogh B. P., Doggett D. L., Cristofalo V. J. 1999. Differences in electron transport potential, antioxidant defenses, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38). J. Cell. Physiol. 180 : 114—122.
- Asensi K. D., Fortunato R. S., dos Santos D. S., Pacheco T. S., de Rezende D. F., Rodrigues D. C., Mesquita F. C., Kasai-Brunswick T. H., de Carvalho A. C., Carvalho D. P., Carvalho A. B., Goldenberg R. C. 2014. Reprogramming to a pluripotent state modifies mesenchymal stem cell resistance to oxidative stress. J. Cell Mol. Med. 18 : 824—831.
- Benhusein G. M., Mutch E., Aburawi S., Williams F. M. 2010. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. Libyan J. Med. 13;5. doi: 10.3402/ljm.v5i0.4637.
- Bladier C., Wolvetang E. J., Hutchinson P., de Haan J. B., Kola I. 1997. Response of a primary human fibroblast cell line to  $H_2O_2$ : senescence-like growth arrest or apoptosis? Cell Growth Differ. 8 : 589—598.
- 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.

- Brenner S., Gulden M., Maser E., Seibert H. 2010. Lasting effect of preceding culture conditions on the susceptibility of C6 cells to peroxide-induced oxidative stress. *Toxicol. In Vitro*. 24 : 2090—2096.
- Burova E., Borodkina A., Shatrova A., Nikolsky N. 2013. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2013 : 474931. doi: 10.1155/2013/474931.
- Chang Y., Li H., Guo Z. 2014. Mesenchymal stem cell-like properties in fibroblasts. *Cell Physiol. Biochem*. 34 : 703—714.
- Chen J. H., Ozanne S. E., Hales C. N. 2005. Heterogeneity in premature senescence by oxidative stress correlates with differential DNA damage during the cell cycle. *DNA Repair (Amst.)*. 4 : 1140—1148.
- Chen J. H., Stoerber K., Kingsbury S., Ozanne S. E., Williams G. H., Hales C. N. 2004. Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *J. Biol. Chem*. 279 : 49 439—49 446.
- 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of normal human fibroblasts. *Biochem. J*. 347 : 543—551.
- Davies K. J. 1999. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*. 48 : 41—47.
- Domazet-Damjanov D., Somayajulu-Niu M., Pandey S. 2009. Resistance of quiescent human diploid fibroblasts to high dose of external oxidative stress and induction of senescence. *Open Biol. J*. 2 : 149—160.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*. 82 : 47—95.
- Duan J., Duan J., Zhang Z., Tong T. 2005. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 37 : 1407—1420.
- Gamaley I. A., Klyubin I. V. 1999. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int. Rev. Cytol*. 188 : 203—255.
- Garg T. K., Chang J. Y. 2003. Oxidative stress causes ERK phosphorylation and cell death in cultured retinal pigment epithelium: prevention of cell death by AG126 and 15-deoxy-delta 12, 14-PGJ2. *BMC Ophthalmol*. 3 : 5. doi:10.1186/1471-2415-3-5.
- Garg T. K., Chang J. Y. 2004. 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 prevents reactive oxygen species generation and mitochondrial membrane depolarization induced by oxidative stress. *BMC Pharmacol*. 4 : 6. doi:10.1186/1471-2210-4-6.
- Gu L., Cui T., Fan C., Zhao H., Zhao C., Lu L., Yang H. 2009. Involvement of ERK1/2 signaling pathway in DJ-1-induced neuroprotection against oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 383 : 469—447.
- Gülden M., Jess A., Kammann J., Maser E., Seibert H. 2010. Cytotoxic potency of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic. Biol. Med*. 49 : 1298—1305.
- 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.
- Haines D. D., Juhasz B., Tosaki A. 2013. Management of multicellular senescence and oxidative stress. *J. Cell Mol. Med*. 17 : 936—957.
- Haniffa M. A., Collin M. P., Buckley C. D., Dazzi F. 2009. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 94 : 258—263.
- Hayes J. D., McLellan L. I. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res*. 31 : 273—300.
- Hunt A., Betts D., King A. W., Madan P. 2010. Senescence or apoptosis? The choice bovine fibroblasts make in the presence of increasing concentrations of extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Studies by Undergraduate Researchers at Guelph, [S. l.]*. 3 : 64—68. ISSN 2291—1367.
- Kaczara P., Sarna T., Burke J. M. 2010. Dynamics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability to ARPE-19 cultures in models of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med*. 48 : 1064—1070.
- Kazzaz J. A., Xu J., Palaia T. A., Mantell L., Fein A. M., Horowitz S. 1996. Cellular oxygen toxicity. Oxidant injury without apoptosis. *J. Biol. Chem*. 271 : 15 182—15 186.
- Klein J. A., Ackerman S. L. 2003. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J. Clin. Invest*. 111 : 785—793.
- Lecoeur H., Prévost M. C., Gougeon M. L. 2001. Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay. *Cytometry*. 44 : 65—72.
- Liochev S. I. 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic. Biol. Med*. 60 : 1—4.
- 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. (Maywood)*. 229 : 1072—1080.
- Muñoz C. M., van Meeteren L. A., Post J. A., Verkleij A. J., Verrips C. T., Boonstra J. 2002. Hydrogen peroxide inhibits cell cycle progression by inhibition of the spreading of mitotic CHO cells. *Free Radic. Biol. Med*. 33 : 1061—1072.
- Naderi J., Hung M., Pandey S. 2003. Oxidative stress-induced apoptosis in dividing fibroblasts involves activation of p38 MAP kinase and over-expression of Bax: resistance of quiescent cells to oxidative stress. *Apoptosis*. 8 : 91—100.
- Naderi J., Lopez C., Pandey S. 2006. Chronically increased oxidative stress in fibroblasts from Alzheimer's disease patients causes early senescence and renders resistance to apoptosis by oxidative stress. *Mech. Ageing Develop*. 127 : 25—35.
- Noppe G., Dekker P., de Koning-Treurniet C., Blom J., van Heemst D., Dirks R. W., Tanke H. J., Westendorp R. G., Maier A. B. 2009. Rapid flow cytometric method for measuring senescence associated beta-galactosidase activity in human fibroblasts. *Cytometry A*. 75 : 910—916.
- 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.
- Park W. H. 2013. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibits the growth of human pulmonary fibroblast cells by inducing cell death, GSH depletion and G<sub>1</sub> phase arrest. *Mol. Med. Rep*. 7 : 1235—1240.
- Sarsour E. H., Kumar M. G., Chaudhuri L., Kalen A. L., Goswami P. C. 2009. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid. Redox Signal*. 11 : 2985—3011.
- Sawai H., Domae N. 2011. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 411 : 569—573.
- 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.
- Stone J. R., Yang S. 2006. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid. Redox Signal*. 8 : 243—270.
- Teramoto S., Tomita T., Matsui H., Ohga E., Matsuse T., Ouchi Y. 1999. Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione. *Jpn. J. Pharmacol*. 79 : 33—40.
- Trachootham D., Lu W., Ogasawara M. A., Nilsa R. D., Huang P. 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal*. 10 : 1343—1374.
- Valle-Prieto A. L., Conget P. A. 2010. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Develop*. 19 : 1885—1893.
- Veal E., Day A. 2011. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxid. Redox Signal*. 15 : 147—151.
- Veal E. A., Day A. M., Morgan B. A. 2007. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell*. 26 : 1—14.
- Villani P., Altavista P. L., Castaldi L., Leter G., Cordelli E. 2000. Analysis of DNA oxidative damage related to cell proliferation. *Mutat. Res*. 464 : 229—237.

Wang X. Y., He P. Y., Du J., Zhang J. Z. 2010. Quercetin in combating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced early cell apoptosis and mitochondrial damage to normal human keratinocytes. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 123 : 532—536.

Wharton W. 1995. Cell cycle constraints on peroxide- and radiation-induced inhibitory checkpoints. *Cancer Res.* 55 : 5069—5074.

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 3 VII 2015

#### OXIDATIVE STRESS-PROMOTED RESPONSES IN HUMAN ENDOMETRIAL STEM CELLS AND LUNG EMBRYONIC FIBROBLASTS

A. N. Shatrova,<sup>1</sup> O. G. Lyublinskaya, A. V. Borodkina, E. B. Burova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

<sup>1</sup> e-mail: Shatrova@mail.ru

Human mesenchymal stem cells are an attractive cell source for tissue engineering. During transplantation they may be subjected to oxidative stress due to unfavorable cellular microenvironment, which is characterized by increased levels of reactive oxygen species. Recently, we have demonstrated that oxidative stress responses of human mesenchymal stem cells derived from endometrium (hMESC) depend upon the oxidizer concentration. Besides, the duration of the cell treatment with oxidizer may play an important role. In this study, we investigate dependence of the cell response character on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treatment duration. The effects of the high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doses on hMESC and human lung embryonic fibroblasts were compared. In both cell types, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treatment for 60 min was shown to promote the multiphase cell cycle arrest, as well as to the dose-dependent cell death that occurred equally from all phases of cell cycle. However, the cell death dynamics in hMESC and fibroblasts were different. Interestingly, in both cell types, shortening of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treatment duration from 60 to 10 min induced growth retardation, G<sub>1</sub>-phase accumulation and the cell size increase. Together, these findings allow us to suggest an induction of the premature senescence as a result of the short cell exposure to the high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doses. Thus, regarding both human endometrial stem cells and human embryonic fibroblasts, shortening of oxidative stress duration induced by high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doses enables to avoid the cell death and to produce the features of the premature senescence.

Key words: endometrial stem cells, fibroblasts, oxidative stress, cell death, premature senescence.