

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

АЛЕКСЕЕНКО

Лариса Леонидовна

**РЕАКЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
НА ТЕПЛОВОЙ СТРЕСС**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель

д.б.н., академик Н.Н.Никольский

Санкт-Петербург

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность исследования	6
Цель и задачи исследования	7
Основные положения, выносимые на защиту	7
Научная новизна работы	8
Теоретическое и практическое значение работы	8
Апробация работы	9
Список работ, опубликованных по теме диссертации	9
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Эмбриональные стволовые клетки	11
1.1.1. Получение ЭСК	11
1.1.2. Поддержание чЭСК	12
1.1.3. Дифференцировка ЭСК	13
1.1.4. Поверхностные антигены плюрипотентных клеток	14
1.1.5. Генетический контроль плюрипотентности	15
1.1.6. Эпигенетическая регуляция плюрипотентности	16
1.1.7. МикроРНК и плюрипотентность	17
1.1.8. Сигнальные пути, регулирующие плюрипотентность	18
1.1.9. Проблемы при культивировании ЭСК <i>in vitro</i>	19
1.1.10. Индукция плюрипотентности	20
1.2. Стволовые клетки (СК) взрослого организма	22
1.2.1. Маркеры стволовых клеток взрослого организма	23
1.2.2. СК костного мозга	25
1.2.3. Альтернативные источники МСК	26
1.2.4. МСК эндометрия	26
1.2.5. Сигнальные пути, регулирующие пролиферацию и дифференцировку СК взрослого организма	31
1.2.6. Перспективы использования МСК	32
1.3. Молекулярные и клеточные механизмы ответа на гипертермию	33
1.3.1. Стресс	33
1.3.2. Клеточный стресс	34

1.3.3. Семейство белков теплового шока (HSP).....	35
1.3.3.1. Малые белки теплового шока.....	37
1.3.3.2. Белки семейства Hsp60.....	39
1.3.3.3. Белки семейства Hsp70.....	39
1.3.3.4. Белки семейства Hsp90.....	44
1.3.4. Транскрипционная регуляция экспрессии HSP.....	44
1.3.5. Активация сигнальных каскадов при температурном воздействии.....	46
1.3.6. Изменения клеточных структур после воздействия гипертермии.....	46
1.3.6.1. Воздействие гипертермии на клеточную мембрану.....	47
1.3.6.2. Воздействие гипертермии на цитоскелет.....	48
1.3.6.3. Воздействие гипертермии на цитоплазму и клеточные органоиды.....	49
1.3.7. Влияние гипертермии на клеточный цикл.....	49
1.3.8. Влияние гипертермии на репарацию ДНК.....	51
1.3.9. Гипертермия вызывает клеточную гибель.....	51
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	53
2.1. Клеточные культуры, использованные в работе.....	53
2.2. Получение чЭСК.....	53
2.3. Культивирование чЭСК C910.....	54
2.4. Криоконсервация и размораживание чЭСК.....	54
2.5. Получение и культивирование чЭСК–ДИФ.....	54
2.6. Получение и культивирование эМСК.....	55
2.7. Криоконсервация и размораживание эМСК.....	56
2.8. Построение кривых клеточного роста.....	56
2.9. Температурная обработка клеток.....	56
2.10. Проточная цитофотометрия.....	56
2.10.1. Иммунофенотипический анализ.....	56
2.10.2. Анализ клеточного цикла.....	57
2.11. Анализ апоптоза.....	57
2.12. Кариотипирование.....	57
2.13. Иммуноцитохимия.....	58
2.14. Определение активности щелочной фосфатазы.....	59
2.15. Направленная адипогенная, остеогенная и нейральная дифференцировка.....	59
2.15.1. Адипогенная дифференцировка.....	59
2.15.2. Остеогенная дифференцировка.....	60
2.15.3. Нейральная дифференцировка.....	60

2.16. Анализ экспрессии белков методом иммуноблоттинга.....	60
2.16.1. Приготовление проб для электрофоретического разделения белков.....	60
2.16.2. Электрофорез и иммуноблоттинг.....	61
2.17. Анализ генной экспрессии с помощью ОТ-ПЦР.....	62
2.18. Статистическая обработка результатов.....	64
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	65
3.1. Клеточные линии, использованные в работе.....	65
3.1.1. Характеристика клеточной линии чЭСК С910.....	65
3.1.2. Характеристика фибробластоподобных клеток (чЭСК-ДИФ).....	67
3.1.3. Характеристика МСК человека, полученных из десквамированного эндометрия менструальной крови (эМСК).....	67
3.2. Влияние ТШ на чЭСК и их дифференцированные производные чЭСК-ДИФ.....	71
3.2.1. Экспрессия белков теплового шока в чЭСК С910 и чЭСК-ДИФ.....	71
3.2.2. Тепловой шок индуцирует апоптоз в чЭСК, но не в их дифференцированных производных.....	73
3.2.3. Сублетальный ТШ (45 °С, 30 мин) вызывает стресс-индуцированное преждевременное старение (SIPS) в чЭСК-ДИФ.....	74
3.3. Свойства плюрипотентных чЭСК и их дифференцированных производных, переживших сублетальный ТШ.....	77
3.3.1. Свойства чЭСК С910, переживших сублетальный ТШ.....	77
3.3.2. Дифференцированные производные чЭСК, пережившие сублетальный ТШ, сохраняют свойства исходных клеток.....	77
3.4. Влияние ТШ на СК взрослого организма (эМСК).....	79
3.4.1. Тепловой шок не индуцирует апоптоз в эМСК.....	79
3.4.2. ТШ индуцирует SIPS в эМСК.....	81
3.4.3. Экспрессия белков теплового шока в эМСК.....	81
3.4.4. Свойства эМСК, переживших сублетальное воздействие температуры.....	84
4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	87
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
6. ВЫВОДЫ.....	102
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДНК (DNA) – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная ДНК

МСК – мезенхимные (стромальные) стволовые клетки

эМСК – мезенхимные стволовые клетки эндометрия

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

РНК – рибонуклеиновая кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

BSA – бычий сывороточный альбумин

bFGF – основной фактор роста фибробластов

CD – кластер дифференцировки

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид

DMEM – питательная среда Игла в модификации Дюльбекко

DMSO – диметилсульфоксид

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

EGTA – этиленгликоль бис (бета-аминоэтил эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты

FBS – бычья эмбриональная сыворотка

FITC – флюоресцеин изотиоцианат

HLA – (human leucocyte antigen) - главный комплекс гистосовместимости

PBS – фосфатно-солевой буфер

PI – йодистый пропиций

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

SDS – додецилсульфат натрия

TTBS – фосфатно-солевой буфер с твином 20

ТАЕ – трис-ацетатный буфер с этилендиаминтетрауксусной кислотой

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Эмбриональные стволовые клетки и стволовые клетки взрослого организма являются хорошей экспериментальной моделью для фундаментальных исследований в области клеточной биологии, фармакологии и регенерационной медицины.

Эмбриональные стволовые клетки являются плюрипотентными и обеспечивают развитие всего организма. Взрослые стволовые клетки несут ответственность за развитие новых тканей, восстановление и регенерацию поврежденных тканей и органов. Оба типа клеток самообновляются *in vitro* и могут размножаться в культуре в течение длительного времени. И эмбриональные, и взрослые стволовые клетки должны иметь механизмы, обеспечивающие их генетическую стабильность. Стволовые клетки человека более эффективно репарируют одно и двунитевые разрывы ДНК при воздействии H_2O_2 , УФ- и γ -излучения (Chen et al., 2006; Maynard et al., 2008) и более устойчивы, чем дифференцированные клетки, к индукции хромосомных aberrаций при действии митомицина C (Vinoth et al., 2008). Экспрессия генов, ответственных за стрессоустойчивость, снижается при дифференцировке (Saretzki et al., 2008; Armstrong et al., 2010). Высказывается предположение, что стволовые клетки более устойчивы к стрессу, чем дифференцированные (Prinsloo et al., 2009), однако существует и противоположное мнение. Так, эмбриональные стволовые клетки крайне чувствительны к генотоксическим агентам: этопозиду, ингибитору топоизомеразы II (Grandela et al., 2008; Velichko et al., 2011), воздействию УФ-лучей (Luo, 2012), γ -радиации (Filion et al., 2009) и быстро запускают апоптотическую программу, не восстанавливая повреждения (Stambrook et al., 2010).

Реакция культивируемых стволовых клеток человека на стресс активно изучается (Goligorsky, 2009; Tower, 2012), в том числе исследователями, занимающимися проблемами клеточной трансплантации. За последние несколько лет опубликовано много работ, в которых показано, что предварительная обработка трансплантируемых стволовых клеток сублетальными дозами различных стрессорных факторов увеличивает их толерантность и регенеративные свойства (Yu et al., 2013).

Стволовые клетки могут по-разному реагировать на стрессовые воздействия. Мягкий стресс может стимулировать дифференцировку стволовых клеток (Stolberg and McCloskey, 2009; Hronik-Turaj et al., 2011). Результатом жесткого стресса является некроз (Dolan et al., 2012). Сублетальные дозы различных стрессорных факторов приводят к апоптозу или старению (SIPS) (Cmielova et al., 2012). Выбор зависит от типа клеток и силы стресса.

Важную роль в реализации этих программ играют шапероны, принимающие участие в репарации протео-токсических повреждений и поддержании жизнеспособности клеток (Söti et al., 2003). Многие шапероны принадлежат семейству белков теплового шока (HSP). Индукция и накопление HSP происходит при воздействии различных повреждающих агентов, наиболее изученным из них является тепловой стресс. Температура является важным фактором, который регулирует различные клеточные процессы (Richter et al., 2010). Резкие изменения температуры окружающей среды – частые события. Хотя реакция клеток на тепловой шок является одной из наиболее изученных, ответ стволовых клеток на повышение температуры, а также судьба клеток, переживших тепловой стресс, мало исследованы.

Таким образом, изучение реакции культивируемых стволовых клеток человека на тепловой стресс является перспективным направлением современной клеточной биологии и вносит вклад в понимание процессов, происходящих при восстановлении поврежденных тканей и органов, необходимое для применения этих клеток в трансплантационной медицине.

Цель и задачи исследования

Цель работы состояла в исследовании механизмов ответа эмбриональных и взрослых стволовых клеток человека на температурный стресс. В задачи исследования входило:

1. Анализ жизнеспособности и пролиферативной активности недифференцированных эмбриональных стволовых клеток человека (чЭСК), их дифференцированных производных (чЭСК–ДИФ) и эндометриальных мезенхимных стволовых клетках (эмСК) при различной интенсивности прогрева.
2. Оценка распределения интактных и прогретых клеток всех изучаемых линий по фазам клеточного цикла.
3. Исследование экспрессии и локализации основных белков теплового шока в чЭСК, чЭСК–ДИФ и эмСК после мягкого и жесткого теплового воздействия.
4. Оценка генетической стабильности, экспрессии специфических маркеров и дифференцировочного потенциала чЭСК, чЭСК–ДИФ и эмСК, переживших сублетальный тепловой шок.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Сублетальный ТШ вызывает апоптотическую гибель эмбриональных стволовых клеток.

2. Сублетальный ТШ вызывает остановку пролиферации и арест в G0-G1 и G2-M фазах клеточного цикла дифференцированных чЭСК и эндометриальных мезенхимных СК, что приводит к стресс-индуцированному преждевременному старению (SIPS).

3. Потомки клеток всех изученных линий, пережившие сублетальное воздействие температуры, сохраняют свойства родительских клеток.

4. Тепловой шок (ТШ) по-разному влияет на экспрессию индуцибельной изоформы Hsp70 в изученных клетках при мягком и жестком ТШ. Мягкий ТШ индуцирует экспрессию Hsp70 во всех типах клеток; при сублетальном ТШ индукция Hsp70 снижается в чЭСК и продолжает возрастать в дифференцированных производных чЭСК и в эМСК.

5. На поверхности клеточной мембраны чЭСК экспрессируется конститутивная изоформа Hsc70.

Научная новизна работы

Впервые показано, что эмбриональные и взрослые стволовые клетки человека по-разному реагируют на сублетальное тепловое воздействие.

Впервые показано, что ТШ вызывает апоптотическую гибель ЭСК, но не индуцирует апоптоз в их дифференцированных производных и МСК.

Впервые показано, что сублетальный тепловой шок вызывает у дифференцированных производных чЭСК и взрослых стволовых клетках стресс-индуцированное преждевременное старение (SIPS).

Впервые показано, что эмбриональные и взрослые мезенхимные стволовые клетки человека, пережившие сублетальный тепловой шок, сохраняют свойства родительских клеток.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты данной работы могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов ответа стволовых клеток на температурное воздействие. Материалы исследования дают важную информацию для понимания механизмов поддержания геномной стабильности клетками ранних эмбрионов для предотвращения передачи повреждений клеткам потомства. Результаты исследования можно использовать для оптимизации протоколов клеточной терапии. Жизнеспособность трансплантируемых клеток можно повысить с помощью их предварительного прогрева для усиления стрессозащитных механизмов. Полученные нами данные могут быть использованы при чтении лекций по биологии стволовых клеток и регенеративной медицине.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 5 статей и 5 тезисов. Материалы диссертации были представлены на III конференции общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2012), IV Съезде биофизиков России. Симпозиум III «Физика – медицине и экологии» (Нижний Новгород, 2012), на 3-й международной конференции «Stem Cells and Cancer: Proliferation, Differentiation and Apoptosis» (New-Delhi, India, 2012), 38-м конгрессе FEBS (Saint Petersburg, Russia, 2013), Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (Санкт-Петербург, 2013) и на научных семинарах отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта Института цитологии РАН.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Кожухарова ИВ, Фридлянская ИИ, Ковалева ЗВ, Пуговкина НА, **Алексеевко ЛЛ**, Зенин ВВ, Иванцов КМ, Гринчук ТМ, Никольский НН. 2009. Новые линии эмбриональных стволовых клеток человека C612 и C910. Цитология. 51(7):551—557.
2. Кожухарова ИВ, Гринчук ТМ, Пуговкина НА, Ковалева ЗВ, **Алексеевко ЛЛ**, Никольский НН. 2012. Сравнительная оценка чувствительности эмбриональных стволовых клеток человека к цитотоксическому действию доксорубина. Цитология. 54(10):761—766.
3. **Alekseenko LL**, Zemelko VV, Zenin VV, Pugovkina NA, Kozhukharova IV, Kovaleva ZV, Grinchuk, Fridlyanskaya II, Nikolsky NN. 2012. Heat shock induces apoptosis in human embryonic stem cells but a premature senescence phenotype in their differentiated progeny. Cell Cycle. 11(17):3260—3269.
4. Земелько ВИ, Кожухарова ИВ, **Алексеевко ЛЛ**, Домнина АП, Решетникова ГФ, Анисимов СВ, Пузанов МВ, Дмитриева РИ, Гринчук ТМ, Никольский НН. 2013. Сравнительный анализ нейрогенного потенциала мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга, жировой ткани и эндометрия. Цитология. 55(2):101—110.
5. **Alekseenko LL**, Zemelko VI, Domnina AP, Lyublinskaya OG, Zenin VV, Pugovkina NA, Kozhukharova IV, Borodkina AV, Grinchuk TM, Fridlyanskaya II, Nikolsky NN. 2014. Sublethal heat shock induces premature senescence rather than apoptosis in human mesenchymal stem cells. Cell Stress and Chaperones. 19(3):355—366.
6. **Alekseenko LL**, Zemelko VI, Zenin VV, Pugovkina NA, Kozhukharova IV, Kovaleva ZV, Grinchuk TM, Fridlyanskaya II, Nikolsky NN. 2012. Heat shock induces apoptosis in human embryonic stem cells but premature senescence of adult stem cells. New-Delhi, India. Abstracts of 3rd International Conference “Stem Cells and Cancer: Proliferation, Differentiation and Apoptosis”. P.173.

7. **Алексеевко ЛЛ**, Фридлянская ИИ, Зенин ВВ, Земелько ВИ, Гринчук ТМ, Никольский НН. 2012. Тепловой шок вызывает остановку клеточного цикла и индуцирует преждевременное старение мезенхимных стволовых клеток. Санкт-Петербург. Тезисы III конференции общества клеточной биологии. Цитология. 54(9):662.

8. **Алексеевко ЛЛ**, Фридлянская ИИ, Зенин ВВ, Земелько ВИ, Гринчук ТМ, Никольский НН. 2012. Эндометриальные стволовые клетки, выжившие после сублетального теплового шока, сохраняют свойства стволовых клеток. Нижний Новгород. Тезисы IV Съезда биофизиков России. Симпозиум III «Физика – медицине и экологии» С.9.

9. **Alekseenko LL**, Kozhukharova IV, Zemelko VI, Zenin VV, Pugovkina NA, Grinchuk TM, Fridlyanskaya II, Nikolsky N.N. 2013. Premature senescence and apoptosis are different responses of human embryonic stem cells, their differentiated progeny and adult stem cells to sublethal stresses. Saint Petersburg, Russia. Abstracts of the 38th FEBS Congress. FEBS Journal. 280:450

10. **Алексеевко ЛЛ**, Фридлянская ИИ, Зенин ВВ, Жеребцов СВ, Земелько ВИ, Гринчук ТМ, Никольский НН. 2013. Влияние сублетального теплового шока на эмбриональные и мезенхимные стволовые клетки человека. Санкт-Петербург. Тезисы Всероссийского симпозиума “Биология клетки в культуре”. Цитология. 55(9):629.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эмбриональные стволовые клетки

1.1.1. Получение ЭСК

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) были впервые получены в 1980 г. из внутренней клеточной массы (ВКМ) поздней стадии бластоцисты мышей (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). ЭСК были способны неограниченно долго делиться в культуре и дифференцироваться *in vitro* практически во все клеточные типы тканей взрослой мыши.

Первые постоянные линии ЭСК человека (чЭСК) были получены в 1998 г. (Thomson et al., 1998). Это событие открыло путь для использования чЭСК в заместительной терапии и дало мощный стимул исследованиям в области биологии стволовых клеток. На сегодняшний день получены уже несколько сотен линий чЭСК, стали известны молекулярные и генетические аспекты механизма их регуляции, самообновления и плюрипотентности, проведены широкомасштабные работы по оптимизации способов дифференцировки чЭСК в различные типы клеток.

чЭСК получают из ВКМ бластоцист человека, не использованных при экстракорпоральном оплодотворении. Как правило, используются 4- и 5-суточные бластоцисты, хотя описаны попытки доразивания бластоцист и до 9-суточного возраста в целях получения большего количества внутриклеточной массы (Fong et al., 2004). ЭСК могут быть получены из морулы (Strelchenko and Verlinsky, 2006) и из одиночного бластомера (Klimanskaya et al., 2006). Для выделения ВКМ часто используют иммунохирургический метод, позволяющий разделить бластоцисту и клетки трофэктодермы (Solter and Knowles, 1975). Кроме этого с успехом используются и другие техники, включающие механическую изоляцию ВКМ (микрохирургия при помощи лазерного луча или клеточного ножа) и обработку бластоцист проназой (Kim et al., 2005). Возможна также селекция бластоцист, спонтанно «вылупившихся» из блестящей оболочки (*zona pellucida*; также известной как «блестящая зона») (Heins et al., 2004).

Важнейшей особенностью ЭСК является высокий уровень теломеразы, участвующей в восстановлении теломер после каждой репликации ДНК. За счет высокой теломеразной активности, ЭСК не подвергаются репликативному старению и способны к неограниченной пролиферации *in vitro*. Плюрипотентные клетки пролиферируют быстрее, чем большинство соматических клеток (Becker et al., 2006) и имеют более продолжительную S и короткую G1 фазы клеточного цикла (Becker et al., 2006). Характерной особенностью плюрипотентных клеток считается ослабление работы G1/S контрольной точки. Кроме того, для чЭСК характерно симметричное клеточное деление, необходимое для сохранения структурного и

функционально эквивалента дочерних клеток. Все этапы регулирования клеточного цикла чЭСК подробно описаны в обзоре (Abdelalim, 2013).

1.1.2. Поддержание чЭСК

Выделенные из ВКМ клетки обычно культивируются на питающих (фидерных) клетках в присутствии сыворотки и необходимых ростовых факторов. Колонии чЭСК плоские, с достаточно четкими границами между клетками. Плюрипотентные клетки обладают высокой клоногенной способностью.

На первых этапах в качестве фидерного слоя наиболее часто использовали эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ). Однако в дальнейшем было показано, что чЭСК, культивируемые на мышинных питающих клетках, начинают использовать неспецифические для человека химические субстанции, продуцированные фидерными клетками, замещая ими свои собственные (Martin et al., 2005). Использование мышинового фидера и бычьей сыворотки приводило к появлению в мембранных везикулах чЭСК чужеродных белков, которые могут вызвать сильный иммунный ответ при использовании этих клеток *in vivo* (Kubikova et al., 2009). Естественно, были предприняты попытки перевода клеток человека с мышинового фидера на фидерные клетки человека. Оказалось, что возможно получение новых линий и культивирование чЭСК, применяя в качестве фидерного слоя клетки человека: эмбриональные фибробласты, фибробласты крайней плоти, эндометрия, паренхимы молочной железы, эпителия фаллопиевых труб и др. (Amit et al., 2003; Richards et al., 2003; Lee et al., 2004; Inzunza et al., 2005; Anisimov et al., 2011). Использование аллогенных фидерных культур не исключает риска контаминации, поэтому преимущество при культивировании линий чЭСК имеют аутогенные фидерные системы, получаемые при дифференцировке чЭСК (Fu et al., 2011; Lee et al., 2012).

Для стандартизации протоколов поддержания чЭСК в последнее время широко применяют безфидерные системы культивирования. Часто в качестве субстрата используют матригель, который представляет собой смесь белков внеклеточного матрикса (ВКМ), к которым относятся ламинин, коллаген IV, гепаран сульфат протеогликанов, эктактин, нидоген 1. К белкам ВКМ добавляют ростовые факторы и кондиционированную среду от фидерных клеток (Xu et al., 2001, 2005; Rosler et al., 2004; Choo et al., 2008; Montes et al., 2009; Tsai et al., 2010; Higuchi et al., 2011; Sanchez et al., 2012). Матригель получают из мышинной саркомы. Однако использование такой системы несет риск ксеногенной контаминации чЭСК. В связи с этим в настоящее время широко используются субстраты, состоящие из отдельных природных или рекомбинантных белков ВКМ человеческого

происхождения. Недавно была выделена смесь белков ВКМ из плаценты и плазмы человека. На этом субстрате чЭСК могут экспонироваться в течение длительного времени без потери характерных для них свойств (Wang et al., 2012). В современных исследованиях используют дополнительные компоненты среды в виде малых молекул или низкомолекулярных лигандов, ингибирующих клеточные сигнальные пути, ответственные за дифференцировку и клеточную гибель, и способствующих активной пролиферации чЭСК (Burton et al., 2010; Tsutsui et al., 2011; Valamehr et al., 2011).

1.1.3. Дифференцировка ЭСК

Одним из наиболее важных свойств плюрипотентных клеток является их способность дифференцироваться практически в любые типы соматических клеток (Odorico et al., 2001; Schuldiner and Benvenisty, 2003). Дифференцировочный потенциал *in vivo* проверяется путем введения иммунодефицитным бестимусным мышам суспензии ЭСК, в результате чего образуются тератомы, содержащие производные всех трех первичных зародышевых листков. В тератомах, образованных чЭСК, наблюдали образование эпителия желудочно-кишечного тракта (энтодерма), кости, хряща, гладкой и поперечнополосатой мускулатуры (мезодерма), нейрального эпителия, эмбриональных ганглиев и эпителиальных клеток (эктодерма) (Thomson et al., 1998). *In vitro* дифференцировочный потенциал может быть проверен при переводе ЭСК в неоптимальные условия культивирования (культуральные чашки с неадгезивной поверхностью, отсутствие фидера и факторов роста). Это приводит к образованию округлых дифференцированных агрегатов - эмбриональных телец (ЭТ), которые растут в суспензии (Martin, 1981). чЭСК могут быть дифференцированы во все типы клеток. После коммитирования клеток зародышевых слоев, при использовании специальных протоколов дифференцировки, можно наблюдать образование определенных типов клеток. Например, энтодермальные производные могут быть дополнительно индуцированы в гепатоциты, инсулин-продуцирующие β -клетки и эпителий легких. Мезодермальные производные могут быть использованы для индукции хондроцитов, остеоцитов, скелетных миобластов, кроветворных клеток, эндотелиальных клеток и кардиомиоцитов, а эктодермальные предшественники могут быть индуцированы в кератиноциты, клетки пигментного эпителия сетчатки, олигодендроциты, астроциты и зрелые нейроны (Vazin and Freed, 2010). Статус дифференцировки клеток можно контролировать путем анализа специфических маркеров, которые указывают на потерю плюрипотентности и начало дифференцировки. Наиболее часто используют следующие маркеры: для трофэктодермы (ЭСК мыши): GATA3, GATA2, CDX2, hCG α , hCG β , PL-1, GCM1, CD9 и HLA-G; для

энтодермы: AFP, GATA4, Gata6, ламинин B1, альбумин, PDX1, FOXA2 и Sox17; для мезодермы: Brachyury, RUNX1, VEGFR2, α МНС и MSX1; для эктодермы: NF-200, NF68, NCAM, FGF5, PAX6, NEUROD1, MAP2 (Hay et al., 2004; Matin et al., 2004; Hyslop et al., 2005; Takahashi et al., 2007; Cameron et al., 2008; Fong et al., 2008; Melchior et al., 2008).

1.1.4. Поверхностные антигены плюрипотентных клеток

Для чЭСК характерна экспрессия специфичных поверхностных маркеров: гликолипидов SSEA-3, SSEA-4 и кератин-сульфатов TRA-1-60, TRA-1-81 (Thomson et al., 1998). чЭСК характеризуются высоким уровнем экспрессии CD90 (известного также как Thy-1-антиген), CD117 (известного как c-kit), , CD29 (β 1 integrin), CD59 (Protectin) и др. (подробно см. обзор Zhao et al., 2012). Экспрессия SSEA-3 начинает уменьшаться на ранних стадиях дифференцировки чЭСК, тогда как экспрессия SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-54 и CD90 уменьшается на более поздних этапах. Недавно был обнаружен новый поверхностный маркер плюрипотентных клеток SSEA-5, который исчезает в процессе дифференцировки быстрее, чем SSEA-3 (Tang et al., 2011). В настоящее время специфичные поверхностные маркеры плюрипотентности широко используются для идентификации и изоляции ЭСК при помощи методов проточной цитометрии и магнитного сортирования клеток. Для идентификации плюрипотентных клеток наряду с другими маркерами предлагают использовать CD30 (рецептор фактора некроза опухоли суперсемейства TNFRSF8) (Abujarour et al., 2013).

1.1.5. Генетический контроль плюрипотентности

Ключевыми регуляторами плюрипотентности, по мнению многих исследователей, считаются Oct4, Nanog и Sox2. Белок Oct4 относится к V классу POU (PIT, OCT, UNC), семейства транскрипционных факторов. POU-домен состоит из двух структурно независимых субдоменов: POU- специфического (N- концевой, состоящий из 75 а.о.) и POU-гомеодомена (C-концевой, 60 а.о.). Оба субдомена соединены между собой вариабельным по длине подвижным линкером (Okamoto et al., 1990). Экспрессия белка Oct4 характерна для ранних стадий эмбриогенеза человека, мыши и других млекопитающих (Palmieri et al., 1994; Nichols et al., 1998; Hansis et al., 2000). Ген *Oct4* человека локализован в пределах главного комплекса гистосовместимости, и имеет три альтернативных варианта сплайсинга: *Oct4A*, *Oct4B* и *Oct4B1*, которые кодируют четыре изоформы белка - Oct4A, Oct4B-190, Oct4B-265 и Oct4B-164 (Takeda et al., 1992; Atlasi et al., 2008; Wang et al., 2010). Белок, кодируемый изоформой *Oct4A*, локализуется в ядре клетки и принимает участие в регуляции

транскрипции генов, в то же время белок Oct4B локализуется в цитоплазме клеток и не способен поддерживать плюрипотентность (Lee et al., 2006). Интересно, что белок Oct4B-190, кодируемый *Oct4B*, локализуется диффузно в ядре и цитоплазме и его уровень существенно повышается в ЭСК человека в ответ на стрессовые условия, что может оказывать репрессирующее действие на процесс апоптоза (Wang et al., 2009). Подавление экспрессии Oct4 приводит к ранней дифференцировке ВКМ бластоцисты *in vivo* и ЭСК *in vitro* в трофэктодерму. Гиперэкспрессия этого фактора выражается в дифференцировке ЭСК в примитивные энтодерму и мезодерму. Таким образом, для поддержания плюрипотентности экспрессия Oct4 в клетках должна строго контролироваться и поддерживаться на определенном уровне (Nichols et al., 1998; Rodriguez et al 2007). Oct4 регулирует экспрессию тканеспецифических генов, взаимодействуя с другими факторами, а именно - с FGF-4 (fibroblast growth factor-4), специфичным для ЭСК (Avery et al., 2006), Sox2 (high mobility group box protein Sox2) (Boiani and Scholer, 2005). Недавно было показано, что Oct4 не только поддерживает плюрипотентность чЭСК, но и играет ключевую роль в регуляции клеточного цикла. Oct4 является негативным регулятором p21, ингибитора циклин-зависимых киназ, и снижение экспрессии Oct4 ингибирует пролиферацию чЭСК, блокируя прохождение клеточного цикла в фазе G0/G1 (Lee et al., 2010).

Белок Nanog относится к транскрипционным факторам, содержащим гомеодомен, и наиболее близок по аминокислотной последовательности и структуре к белкам семейства NK2 (Wang et al., 2003). Экспрессия гена *Nanog* характерна для плюрипотентных клеток предимплантационных эмбрионов (ВКМ и эпибласта) и ЭСК мыши и человека (Chambers et al., 2003; Hyslop et al., 2005). Подавление экспрессии *Nanog* в ЭСК человека вызывает дифференцировку, сопровождающуюся повышением экспрессии маркеров энтодермы (*GATA4*, *GATA6*, *LMANIN B1*, *AFP*) и трофэктодермы (*CDX2*, *GATA2*, *hCG -α* и *hCG -β*).

Транскрипционный фактор Sox2 (SRY-related HMG box) содержит ДНК-связывающий HMG (high mobility group)-домен. Экспрессия SOX2, как и Oct4, характерна для клеток ВКМ, эпибласта и герминальных клеток эмбриона. Кроме того, нормальная экспрессия гена *Sox2* необходима для поддержания самообновления ЭСК мыши и человека. Подавление и сверхэкспрессия SOX2 вызывают трофэктодермальную дифференцировку ЭСК человека (Adachi et al., 2010).

В ЭСК человека транскрипционные факторы Oct4, Nanog и Sox2 совместно регулируют 353 гена, при этом они могут выступать и как активаторы, и как репрессоры транскрипции (Boyer, 2005). Было показано, что сайты посадки транскрипционных факторов Oct4, Nanog и Sox2 ассоциированы с генами, кодирующими микроРНК. В ЭСК человека сайты связывания транскрипционных факторов Oct4, Nanog и Sox2 обнаружены в

промоторах 14 генов микроРНК, причем в промоторах двух генов *mir-137* и *mir-301* они присутствуют совместно (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006).

1.1.6. Эпигенетическая регуляция плюрипотентности

ЭСК обладают практически неограниченным потенциалом к самообновлению и дифференцировке в широкий спектр клеточных типов. При дифференцировке клеток происходит глобальное изменение морфологии, физиологии, скорости деления клеток и других параметров. В настоящий момент известно, что экспрессия генов жестко регулируется на эпигенетическом уровне. Эпигенетическая регуляция включает в себя ковалентные модификации гистонов (белков, образующих нуклеосомы) и метилирование ДНК промоторных областей генов. Модификации гистонов меняют физические свойства нуклеосом, делая хроматин больше или меньше доступным для факторов, обеспечивающих транскрипцию генов. Выделяют модификации, ассоциированные с активным хроматином и активно транскрибирующимися генами, и модификации, ассоциированные с неактивным хроматином и чаще всего связанные с подавлением транскрипции. Реорганизация хроматина является неотъемлемой частью активации генетических программ, реализация которых определяет направление дифференцировки стволовых клеток как *in vivo*, так и *in vitro* (Humphrey et al., 2004; Niwa et al., 2007). Например, хроматин в ЭСК представлен в основном транскрипционно активным эухроматином, что подтверждается наличием большого количества ацетилированных гистонов и повышенной чувствительностью хроматина к нуклеазам. В то же время, коммитирование клеток сопровождается понижением степени ацетилирования гистонов и сопутствующим увеличением неактивного гетерохроматина. Анализ изменений организации хроматина в ЭСК демонстрирует высокую степень динамической ассоциации структурных протеинов (основных и вариабельных гистонов, линкерного гистона H1, гистона H3, а также белка, ассоциированного с гетерохроматином - HP1a) с хроматином плюрипотентных ЭСК в отличие от хроматина дифференцированных клеток. Замена гистона H1 его модификацией, имеющей более высокое сродство к ДНК, приводит к ингибированию дифференцировки ЭСК; в то время как замена гистона H3 его модификацией H3.3, являющейся маркером активной транскрипции, ускоряет дифференцировку ЭСК (Meshorer et al., 2006). Из этого можно сделать вывод, что структурные белки хроматина в ЭСК слабо связаны с ДНК, что обеспечивает быструю реорганизацию хроматина в процессе дифференцировки. С этим согласуется тот факт, что тканеспецифичные гены в геноме ЭСК находятся в неактивном состоянии. Их активация при коммитировании ЭСК происходит очень быстро, так как в ЭСК постоянно присутствуют активные эпигенетические регуляторы (Szutorisz et al., 2005). Участки ДНК в ядрах ЭСК,

содержащие многие тканеспецифичные гены, образуют комплексы, с так называемыми, бивалентными структурными протеинами, состоящими из супрессорного гистона H3K27me3 и активирующего гистона H3K4me3. Это приводит к быстрому переключению транскрипционных каскадов в процессе эмбрионального развития. Основными компонентами системы эпигенетической регуляции ЭСК являются белки группы Polycomb (PcG) (Ringrose and Paro, 2004). PcG образуют два независимых комплекса: PRC1 (Polycomb repressive complex) и PRC2. Мишенями для PRC являются множество генов, участвующих в дифференцировке и эмбриональном развитии.

1.1.7. МикроРНК и плюрипотентность

Многочисленные исследования показывают, что микроРНК играют важную роль в регуляции экспрессии генов во время эмбрионального развития организмов. В ЭСК человека обнаружена микроРНК, *mir-145*, активация которой вызывает дифференцировку. В недифференцированных ЭСК человека транскрипция *mir-145* репрессируется транскрипционным фактором Oct4 (Xu et al., 2009). Локализация транскрипционных факторов в геномах ЭСК человека и мыши показала, что гены, кодирующие микроРНК, выявляются среди мишеней Oct4, Sox2 и Nanog (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006). Среди микроРНК в ЭСК есть как активно транскрибирующиеся, так и молчащие. Следовательно, транскрипционные факторы плюрипотентности могут выступать как активаторы, так и репрессоры транскрипции микроРНК в ЭСК. В промоторных областях генов микроРНК, репрессируемых Oct4, Sox2, Nanog и TCF3, кроме того, обнаружены белки группы Polycomb, производящие ди- и триметилирование гистона H3 в положении K27 (метка неактивного хроматина). При дифференцировке клеток происходит перестройка транскрипции, в результате которой в каждом из типов дифференцированных клеток формируется специфический паттерн экспрессии микроРНК (Marson et al., 2009). По всей видимости, микроРНК могут играть роль и при репрограммировании клеток. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека были получены с использованием эктопической экспрессии генов Oct4, Sox2, *KLF4* и *LIN28*. Белковый продукт гена *LIN28* является ингибитором продукции микроРНК семейства let-7, которые участвуют в дифференцировке клеток.

1.1.8. Сигнальные пути, регулирующие плюрипотентность

Поддержание плюрипотентного статуса клеток предимплантационных эмбрионов и ЭСК обеспечивается сложной системой поверхностных белков, их молекулярных

сигнальных путей и транскрипционных факторов, инициирующих или модулирующих транскрипцию генов-мишеней.

В поддержании плюрипотентности ЭСК принимают участие несколько сигнальных путей. Исследования, проведенные на ЭСК мыши, Нива с коллегами (Niwa et al., 2009) показывают, что молекулярные каскады, запускаемые LIF, интегрированы в подсистему внутренних регуляторов плюрипотентности, в которую входят гены *Oct4*, *Sox2* и *Nanog*. Эта интеграция происходит благодаря двум параллельным путям: JAK-STAT3 и сигнальному пути, опосредованному фосфатидилинозитол-3-ОН-киназой (PI(3)K). Оказалось, что транскрипционный фактор STAT3 активирует экспрессию фактора KLF4, который, в свою очередь, позитивно регулирует ген *Sox2*. В то же время сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-ОН-киназы активирует ген, кодирующий другой транскрипционный фактор – TBX3. Данный фактор, в свою очередь, активирует ген *Nanog*. Кроме того, LIF может активировать транспорт TBX3 за счет действия через киназу MAPK. Исследования убедительно показывают важную роль LIF-STAT3-сигнального пути в поддержании самообновления ЭСК мыши (Matsuda et al., 1999). Однако многочисленные факты говорят о том, что поддержание плюрипотентности ЭСК человека и других приматов происходит по LIF-STAT3-независимому механизму (Humphrey et al., 2004; Sumi et al., 2004).

В суперсемейство TGF β (transforming growth factor- β) входит большое число сигнальных молекул (в геноме человека обнаружено около 40 потенциальных белково-лигандов TGF β). Это суперсемейство можно разделить на две большие группы активаторов. TGF β /Activin/Nodal, активирующие транскрипцию генов транскрипционных факторов SMAD2/3 (similar to mothers against decapentaplegic homologue) посредством рецепторов ALK4, ALK5 и ALK7 и BMP (bone morphogenic protein)/GDF (growth differentiation factor) посредством рецепторов ALK1, ALK2, ALK3 и ALK6 активирующие факторы SMAD1/5. Показано, что сигнальный путь TGF β /Activin/Nodal играет существенную роль в поддержании плюрипотентности ЭСК человека. В культурах ЭСК человека Nodal или Activin могут действовать совместно с другими белковыми факторами, например, bFGF (FGF2) или WNT при поддержании самообновления ЭСК человека (James et al., 2005; Vallier et al., 2005; Xiao et al., 2006; Greber et al., 2007). Белок Activin может активировать выработку bFGF, необходимого для поддержания самообновления ЭСК человека при культивировании клеток в отсутствие сыворотки (Xiao et al., 2006). Оба белка, Activin и Nodal, могут быть заменены TGF β при культивировании ЭСК человека. В недифференцированных ЭСК человека наблюдается высокая активность TGF β /Activin/Nodal пути, направленная на активацию транскрипционных факторов SMAD2 и/или SMAD3. Транскрипционные факторы SMAD2 и SMAD3 участвуют в активации транскрипции гена *Nanog*. Подавление

фосфорилирования SMAD2 и SMAD3 с помощью специфических ингибиторов вызывает уменьшение уровня экспрессии генов *Oct4* и *Nanog* (James et al., 2005). Во время дифференцировки уровень активности SMAD2 и SMAD3 падает, при этом возрастает уровень SMAD1/5/8, которые активирует BMP. Белки SMAD1/5/8 подавляют транскрипцию гена *Nanog*. Кроме того, действие SMAD2 и SMAD3, а также сигнальный путь, запускаемый FGF2 (bFGF), подавляет экспрессию BMP4, препятствуя спонтанной дифференцировке ЭСК человека (Greber et al., 2007). ЭСК человека экспрессируют bFGF и его рецептор (Dvorak et al., 2005). Действует bFGF через тирозинкиназные рецепторы (ERK1 и ERK2), ингибирование данного сигнального пути вызывает дифференцировку ЭСК человека. Однако полностью механизм действия bFGF на ЭСК человека пока не расшифрован.

Сигнальный путь, в котором ключевым участником является Wnt, может участвовать в краткосрочном поддержании плюрипотентного состояния ЭСК мыши и человека (Aubert et al., 2002). Ингибирование гликогенсинтазкиназы-3, которое вызывает активацию сигнального пути Wnt, приводит к накоплению в ядрах клеток β -катенина и активации ряда генов-мишеней, при этом в клетках поддерживается экспрессия специфичных для плюрипотентных клеток генов транскрипционных факторов *Oct4*, *Rex1* и *Nanog* даже в отсутствие фактора LIF (Sato et al., 2003). Однако позже было показано, что для стабильного поддержания самообновления ЭСК человека необходимо присутствие таких факторов, как TGF β и bFGF, а действие Wnt сводится к усилению пролиферации (Dravid et al., 2005; Lu et al., 2006).

1.1.9. Проблемы при культивировании ЭСК *in vitro*

Длительное культивирование чЭСК *in vitro* может приводить к различным эпигенетическим и генетическим нарушениям. Для чЭСК возможно появление хромосомных аномалий при культивировании. К настоящему времени хромосомные изменения, в том числе трисомия, при длительном культивировании чЭСК описаны многими авторами. Наиболее часто встречается трисомия по хромосомам 12 и 17 (Maitra et al., 2005; Mitalipova et al., 2005; Taapken et al., 2011), хромосоме 20 (Rosler et al., 2004), хромосоме 13 (Caisander et al., 2005) и хромосоме 16 (Suemori et al., 2006). Помимо грубых нарушений, таких, как тетраплоидизация и трисомия, с помощью современных методов удалось показать нарушения также и на уровне небольших участков ДНК. Так, Лаурент с соавт. (Laurent et al., 2011) исследовали изменение копийности различных генов в чЭСК в процессе культивирования. Оказалось, что для чЭСК характерны дубликации участков хромосом 12, 17 и 20. Наибольшее число повторяющихся изменений при адаптации чЭСК к условиям культивирования выявлены в хромосомах 12, 17 и в меньшей степени в X хромосоме (Baker

et al., 2007). Один из описанных механизмов хромосомных аномалий чЭСК – нарушение числа центросом, вызывающее анеуплоидию (Holubcova et al., 2011). Интересное объяснение нестабильности кариотипа было предложено в работе Мантел с соавт. (Mantel et al., 2007). Они показали, что при делении дифференцированной клетки необходимо прохождение точки контроля сборки веретена деления. Если число хромосом диплоидное, деление продолжается, а если возникла анеуплоидия – клетка элиминируется апоптозом. По мнению авторов плюрипотентные клетки проходят контрольную точку и независимо от результата продолжают деление. Необходимо подчеркнуть, что некоторые исследователи, напротив, отмечали стабильность кариотипа ЭСК в течение длительного культивирования (Richards et al., 2002; Rosler et al., 2004; Martins-Taylor and Xu, 2012).

Выявленные генетические изменения в линиях чЭСК встречаются, как правило, на поздних пассажах, поэтому некоторые авторы считают, что на ранних пассажах эти клетки пригодны для терапевтического применения, но подчеркивают необходимость их постоянного мониторинга (Ware et al., 2006; Nospikel, 2013).

1.1.10. Индукция плюрипотентности

В настоящее время активно ведутся исследования в области получения плюрипотентных соматических клеток животных и человека. Описаны два принципиально разных пути получения подобных клеток. Это терапевтическое клонирование, которое заключается в пересадке ядра соматических клеток в безъядерные ооциты (somatic cell nuclear transfer, SCNT) (Byrne et al., 2007) и репрограммирование с получением индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (induced pluripotent stem cells, iPS cells), сходных с ЭСК (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). В этих работах индукцию плюрипотентности проводили, используя разные типы клеток: фибробласты взрослого человека, веретеновидные синовиоциты, фетальные и неонатальные фибробласты (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). В качестве индукторов репрограммирования были предложены 4 транскрипционных фактора: Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4. Селекцию культур iPS клеток проводили на основании морфологического соответствия ЭСК человека (компактность колоний, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, четкая визуализация ядер). Иммунофенотип полученных клеток соответствовал фенотипу ЭСК человека - экспрессия SSEA-3, SSEA-4, Tга-1-60 и Tга-1-81. Методом RT-PCR в iPS клетках показан характерный для ЭСК высокий уровень экспрессии эндогенных Oct4 и Nanog. Высокая экспрессия других генов-маркеров ЭСК человека, REX1, FGF4, ESG1, DPPA2, DPPA4, hTERT, также указывал на соответствие полученных культур клеткам ЭСК. Также было показано деметилирование цитозин-гуанин нуклеотидных последовательностей

промоторных областей генов *Nanog* и *Oct4*, что подтверждало их высокую функциональную активность. В контроле (исходные культуры фибробластов) данные области были метилированы. Для подтверждения плюрипотентного статуса iPS клеток, проводили подкожную трансплантацию iPS клеток иммунодефицитным животным. В местах инъекции развивались тератомы, состоящие из комплекса тканей, морфологически сходных с производными всех трех зародышевых листков. В настоящее время описаны альтернативные комбинации транскрипционных факторов, улучшающие эффективность получения iPS клеток, разнообразные способы их доставки (вирусный, плазмидный, транспозонный, белковый) и различные исходные клеточные типы (Maherali and Hochedlinger, 2008; Ellis et al., 2009). Так, для индукции iPS из клеток дермального гребня волосяного фолликула использовали только один транскрипционный фактор, а именно Oct4 (Tsai et al., 2011). Недавно было показано, что iPS клетки легко генерируются из стрессоустойчивых клеток, обладающих способностью к мультилинейной дифференцировке (Multilineage-differentiating stress enduring, Muse) (Wakao et al., 2013).

Терапевтический потенциал iPS был продемонстрирован в лечении некоторых заболеваний, в том числе серповидно-клеточной анемии и болезни Паркинсона (Hanna et al., 2007; Wernig et al., 2009). Одним из основных приложений iPS клеток является терапия инфаркта миокарда (Carpenter et al., 2012). Однако, обнадеживающие результаты, которые были достигнуты на экспериментальных моделях, были омрачены образованием тератом после iPS трансплантации. Онкогенные риски, с которыми столкнулись исследователи при работе с iPS, оказались главным препятствием для применения этих клеток, в трансплантационной медицине. Считают, что плюрипотентные СК, которые остались недифференцированными, являются главной причиной образования опухолей после трансплантации. Недавно удалось найти небольшие молекулы (цитотоксические селективные ингибиторы плюрипотентных стволовых клеток человека), которые предотвращают образование тератомы у мышей после трансплантации им плюрипотентных стволовых клеток человека. Самое мощное из этих соединений — PluriSIn #1, вызывало ингибирование стеароил-КоА десатуразы (ключевого фермента в биосинтезе олеиновой кислоты), что в конечном итоге приводило к апоптозу плюрипотентных стволовых клеток. С помощью этой молекулы удастся выборочно удалить из культуры недифференцированные клетки (Ben-David et al., 2013; Lou et al., 2013). Эффективной стратегией избирательного устранения плюрипотентных клеток, которые способны дать начало тератоме, является ингибирование характерных для этих клеток антиапоптотических факторов, таких как сурвивин или Bcl10. Обработкой малыми молекулами, которые могут ингибировать антиапоптотические факторы, можно добиться селективного удаления подобных клеток,

вызвав их апоптоз. В частности, одной обработки смешанной популяции химическими ингибиторами сурвивина (например, кверцетином или YM155) было достаточно, чтобы вызвать избирательную гибель недифференцированных клеток. Этого, по мнению авторов исследования, достаточно, чтобы предотвратить образование тератомы после трансплантации клеток, полученных из iPS (Lee et al., 2013).

1.2. Стволовые клетки (СК) взрослого организма

Очевидным преимуществом СК взрослого организма является генетическая стабильность, отсутствие туморогенности и возможность аутотрансплантации клеточных продуктов, полученных на их основе, что решает иммунологические вопросы, которые сопровождают терапию стволовыми клетками. Взрослые СК являются недифференцированными клетками, способными к самообновлению, но в отличие от ЭСК и iPS, которые являются плюрипотентными и могут дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков, взрослые стволовые клетки либо мультипотентны (дифференцируются в несколько типов клеток) или унипотентны (дифференцируются только в один тип клеток) (Gargett, 2007).

Стволовые клетки взрослого организма можно подразделить на три основные группы: гемопоэтические (ГСК), мультипотентные мезенхимальные (МСК) и тканеспецифичные клетки-предшественники.

Свойства СК взрослого организма регулируются *in vivo* тканеспецифическими нишами. Ниши обеспечивают СК факторами необходимыми для их жизнедеятельности, способствуют взаимному контролю и обмену информацией между клетками, координируют их действия, обеспечивают координацию между различными популяциями клеток, регулируя их ориентацию и местоположение в тканевом компартменте, и, следовательно, регулируют морфогенез и функции тканей (Ema and Suda, 2012). В основе функционирования ниши лежит множество взаимосвязанных механизмов. К ним относятся межклеточные взаимодействия между стволовыми клетками, взаимодействия между стволовыми клетками и соседними дифференцированными клетками, взаимодействия между стволовыми клетками и компонентами внеклеточного матрикса и др. (Brizzi et al., 2012). В последнее время появляются данные о том, что одним из ключевых путей взаимодействия между стволовыми клетками и нишей являются микроРНК (Laine et al., 2012). Передача микроРНК между клетками может осуществляться с помощью экзосом, которые считаются одной из форм межклеточного общения (Lässer, 2013).

1.2.1. Маркеры стволовых клеток взрослого организма

Для идентификации, выделения и очистки клеточной популяции СК используются специфические маркеры. Так, например, для популяций ГСК характерно присутствие на поверхности клетки маркеров CD34, CD133, c-kit (CD117) и отсутствие CD38, гликофорина А, CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD56 и CD66. Некоторые из маркеров (CD133 и c-kit) характерны не только для ГСК и не могут считаться основными при их выделении (Hilbe et al., 2004; Florek et al., 2005).

Вопрос, касающийся выбора специфических поверхностных маркеров для иммунофенотипической характеристики МСК, на сегодняшний день остается открытым. Это связано с тем, что МСК из различных источников могут иметь различный набор поверхностных антигенов. Иммунофенотипическая характеристика МСК варьирует при различных способах их получения и культивирования. Показано, что для МСК человека не характерна экспрессия маркеров CD4, CD11b, CD34, CD43, CD45, CD117, CD31, свойственных ГСК. (Da Silva Meirelles et al., 2006; Kolf et al., 2007). Обычно на негемопозитических прогениторных клетках из костного мозга, обладающих клоногенностью, идентифицируется маркер Stro-1, хотя экспрессия этого маркера может теряться при длительном культивировании (Kolf et al., 2007). Для МСК характерно взаимодействие с антителами к SH-2 – одним из эпитопов рецептора трансформирующего фактора роста **b**, эндоглина (CD105), а также с антителами к SH-3 и SH-4 – различным эпитопам мембранносвязанной экто-5'-нуклеотидазы (CD73) (Kolf et al., 2007). Маркеры CD105 и CD73, CD71, CD90 (Thy-1) и CD13 используются для идентификации МСК в большом количестве работ (Wagner et al., 2005; Da Silva Meirelles et al., 2006; Kolf et al., 2007; Kuroda et al., 2010). Некоторые из поверхностных антигенов разных типов взрослых СК представлены в таблице 1.

Таблица 1. Поверхностные маркеры взрослых стволовых клеток

Маркер	Характеристика
CD1a	Маркер тимоцитов, лимфоцитов, клеток Лангенгарса
CD2	Маркер Т-клеток, натуральных киллеров, тимоцитов
CD4	Маркер тимоцитов и Т-хелперов. Трансмембранный гликопротеин
CD8	Маркер Т-клеток
CD9	Маркер МСК, ассоциированный с ангиогенезом
CD10	Маркер предшественников Т- и В-лимфоцитов
CD11a	Маркер лейкоцитов, принадлежит к молекулам адгезии, представитель семейства интегринов
CD11b	Маркер моноцитов, макрофагов и естественных киллеров
CD13	Маркер макрофагов и моноцитов
CD14	Маркер моноцитов

CD15 (SSEA-4)	Маркер эмбриональных стволовых клеток
CD17	Маркер нейтрофилов, макрофагов, тромбоцитов. Гликофинголипид
CD18	β 2-интегрин участвует в адгезии лейкоцитов
CD21	Рецептор вируса Эпштейн-Барра
CD29	V1-интегрин. Молекула адгезии на мезенхимных и СК печени
CD31	Маркер ангиогенеза, экспрессируется на моноцитах, гранулоцитах, тромбоцитах и эндотелиальных клетках
CD33	Маркер миелоидных клеток
CD34	Маркер гемопоэтических стволовых клеток
CD38	Маркер дифференцирующихся гемопоэтических СК. Трансмембранный гликопротеин
CD41a	Рецептор для фибриногена обнаруженный на МСК и тромбоцитах
CD43	Маркер лейкоцитов, за исключением В-лимфоцитов
CD44	Рецептор гиалуроновой кислот обнаруженный на тканевых стволовых клетках и МСК
CD45	Маркер лейкоцитов, тирозинфосфатаза
CD49	Маркер МСК
CD54	Маркер моноцитов и эндотелия
CD56	Маркер нервных клеток
CD57	Маркер натуральных киллеров
CD59	Белок, ингибирующий комплемент обнаруживается на МСК и стволовых гемопоэтических клетках SP-популяции костного мозга
CD65	Рецептор миелоидных клеток
CD69	Маркер гемопоэтических клеток
CD70	Маркер активированных Т- и В-клеток
CD71	Маркер активированных лейкоцитов
CD73	Экто-5'-нуклеотидаза, вовлечённая в миграцию МСК
CD79	Маркер В-клеток
CD81	Маркер МСК
CD83	Маркер дендритных клеток
CD90 (Thy-1)	Маркер предшественников Т-лимфоцитов и тимоцитов
CD93	Маркер эндотелиальных клеток
CD105	Маркер МСК
CD106	Рецептор VCAM-1 на МСК и эндотелиоцитах
CD111	Маркер нейрональных стволовых клеток и нейроэпителиальных клеток
CD112	Молекула адгезии между эпителиальными и эндотелиальными клетками
CD117 (c-kit)	Маркер гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток
CD133	Маркер гемопоэтических клеток
CD139	Маркер гемопоэтических клеток
CD144	Маркер прогениторов эндотелиальных клеток
CD145	Маркер эндотелиальных и стромальных клеток
CD150	Маркер активированных лимфоцитов
CD166	Молекула клеточной адгезии, маркер МСК
CD175	Маркер стволовых клеток
CD235	Гликофорин А

Nectin-1 (CD111)	Маркер нейтральных СК
Nectin-2 (CD112)	Молекула адгезии между эпителиальными и эндотелиальными клетками
DAF (CD55)	Маркер гемопоэтических клеток
ICAM (CD54)	Маркер моноцитов и эндотелия
L-селектин	Экспрессируется на лейкоцитах и обеспечивает их адгезию к эндотелию в начальной фазе воспаления, а также участвует в хоуминге лимфоцитов
Oct-4	Маркер эмбриональных стволовых клеток
STRO-1	Маркер МСК
Nanog	Маркер эмбриональных стволовых клеток

1.2.2. СК костного мозга

Важнейшим источником соматических стволовых клеток организма является костный мозг. Наиболее значимые классы стволовых клеток костного мозга – гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и мезенхимные стволовые клетки (МСК). ГСК представляет собой самообновляющуюся популяцию стволовых клеток, активно пролиферирующую и способную дифференцировать в различные типы клеток крови. Однако в настоящее время начали появляться сведения о том, что пластичность ГСК может быть значительно выше, чем считалось изначально, и что ГСК могут дифференцировать не только в клетки крови, но и в другие типы клеток, включая гепатоциты, эпителиоциты, кардиомиоциты и клетки скелетных мышц (Stadtfeld and Graf 2005; Tarnowski and Sieron, 2006). В отличие от ГСК, МСК являются немногочисленной популяцией клеток (0.01-0.001%) от общего объема клеток костного мозга. Считается, что основной биологической функцией МСК костного мозга является создание микроокружения для нормального протекания гемопоэза. МСК впервые были описаны в 60-х годах XX века отечественными исследователями (Чертков и Фриденштейн, 1966). Оказалось, что эти клетки способны дифференцироваться не только в многочисленные типы клеток мезенхимного происхождения (клетки костной, хрящевой, мышечной, сухожильной и жировой тканей). Они могут дифференцироваться в глиальные клетки и нейроны (Woodbury et al., 2000), гепатоциты (Sato et al., 2005) и клетки панкреатических островков (Choi et al., 2005). МСК костного мозга обладают высокой миграционной способностью, секретируют большое число биологически активных молекул. Кроме того, МСК способны модулировать параметры иммунитета через индукцию регуляторных Т-лимфоцитов и дендритных клеток (Stagg, 2007; Duffy et al., 2011). Этими свойствами МСК костного мозга и обусловлена возможность их эффективного применения в качестве субстратов как заместительной, так и восстановительной клеточной терапии (Wang et al., 2011; Bernardo et al., 2012) для лечения гематологических, аутоиммунных, сердечнососудистых заболеваний, травм, заболеваний костно-суставной системы.

1.2.3. Альтернативные источники МСК

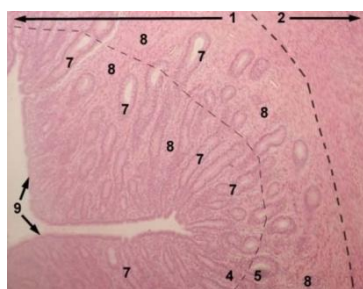
Применение МСК не связано с этическими трудностями, которые возникают при работе с эмбриональными стволовыми клетками. Однако процедура пункции костного мозга может сопровождаться некоторыми осложнениями (например, развитием хронического болевого синдрома, в том числе высокой интенсивности). Поэтому большое значение придается возможности использования МСК из альтернативных костному мозгу источников. Клетки со свойствами МСК были получены из скелетных мышц, хрящей, сухожилий, пульпы зуба, периодонтальной связки, синовиальной мембраны, лёгких и др. (Zuk et al., 2001; De Bari et al., 2001; Salingcariboriboon et al., 2003; Seo et al., 2004). К настоящему времени самыми распространенными источниками для выделения МСК помимо костного мозга являются жировая ткань (Parker and Katz, 2006) и пуповинная кровь (Bieback and Kltiter, 2007). Комплексное изучение свойств соматических стволовых клеток из различных источников позволило заключить, что они, в целом, совпадают со свойствами мезенхимных стволовых клеток костного мозга (в первую очередь по морфологии и профилю экспрессии маркерных антигенов). В результате этих исследований была сформулирована концепция, согласно которой популяции МСК существуют практически во всех органах и тканях (da Silva Meirelles et al., 2006). В течение следующих лет популяции МСК и мультипотентных взрослых клеток-предшественников были обнаружены в стенках крупных кровеносных сосудов, ткани головного мозга, почек, печени, скелетных мышц, поджелудочной железы и селезенки взрослых, тимуса (вилочковой железы) детей и подростков.

1.2.4. МСК эндометрия

В последние годы появилось большое число публикаций о выделении и использовании СК мезенхимной природы из эндометрия (эМСК) (Hida et al., 2008; Patel et al., 2008; Götte, 2011; Земелько и др., 2011). Преимущество МСК, выделенных из эндометрия, заключается в доступности и не инвазивном способе их изоляции.

Эндометрий – это внутренняя слизистая оболочка полости матки. Из клеток этой ткани развиваются некоторые внезародышевые органы, в частности, плацента. В последней фазе менструального цикла женщины эндометрий начинает активно расти, и, если не начинается беременность, часть его клеток отделяется и удаляется из матки с менструальной кровью. Эндометрий (**Рис.1**) состоит из трех слоев: базального, который не отторгается во время менструации; поверхностного, состоящего из компактных эпителиальных клеток, которые выстилают полость матки; промежуточного, спонгиозного слоя. Последние два слоя

составляют функциональный слой, подвергающийся основным циклическим изменениям в течение менструального цикла и отторгающийся в период менструации. Долгое время считалось, что именно базальный слой содержит клетки, пролиферативная активность и пластичность которых определяют возможность циклической регенерации эндометрия в течение всего детородного периода. В процессе ассиметричного деления взрослые СК генерируют более дифференцированные, так называемые коммитированные прогениторные



- 1 - слизистая оболочка (эндометрий)
- 2 - мышечная оболочка (миометрий)
- 4- функциональный слой эндометрия
- 5 - базальный слой эндометрия
- 6 - кровеносные сосуды
- 7 - железы эндометрия (собственной пластинки слизистой оболочки)
- 8 - строма эндометрия (соединительная ткань собственной пластинки слизистой оболочки)
- 9 - эпителий эндометрия

Рис. 1. МАТКА (фаза пролиферации)

«Атлас микрофотографий» (Гунин А.Г. <http://histol.narod.ru/atlas/female-02.htm>)

клетки с относительно высокой пролиферативной активностью. Дальнейшая дифференцировка приводит к образованию терминально дифференцированных железистых эпителиальных клеток эндометрия, стромальных или эндотелиальных клеток (Diaz-Flores et al., 2006).

Предположение о существовании стволовых клеток эндометрия высказывалось уже в середине прошлого века на основе наблюдавшейся регенерации функционального слоя эндометрия после полной абляции эндометрия у приматов и человека (Hartman, 1944; Padykula et al., 1984; Tresserra et al., 1999). Однако собственно популяция эндометриальных СК была впервые изолирована из образцов ткани эндометрия и охарактеризована лишь в 2004 г. (Chan et al., 2004; Cho et al., 2004). Исследователи обнаружили присутствие в ткани эндометрия небольшого количества стромальных клеток, обладающими клоногенными свойствами. Это послужило толчком для более детального изучения прогениторных клеток эндометрия. Описанные клетки по набору экспрессируемых мембранных антигенов CD9 (трансмембранный белок-тетраспанин), CD29 (интегрин $\beta 1$), CD44 (рецептор гиалуронана), CD105 (эндоглин, рецептор трансформирующего фактора роста β), CD90 (мембранный гликопротеин), CD73 (экто-5'-нуклеотидазы) и отсутствия маркеров ГСК CD45, CD34, CD19, были отнесены к клеткам с преобладанием свойств мезенхимальных стволовых клеток (Gargett et al., 2007; Tsuji et al., 2008; Cervello et al., 2011; Schüring et al., 2011).

В 2007—2008 гг. сразу несколько групп исследователей независимо друг от друга выделили и охарактеризовали СК из образцов менструальной крови (Cui et al., 2007; Meng et al., 2007; Toyoda et al., 2007; Dimitrov et al., 2008; Hida et al., 2008; Patel et al., 2008; Мусина и др., 2008). Клетки десквамированного эндометрия широко представлены в менструальной крови (особенно на второй день менструации), и выделение эМСК для последующего использования возможно даже из образцов малого объема. Разные экспериментаторы используют различные методики для выделения и культивирования эМСК *in vitro*, что приводит к выделению линий эМСК, различающихся между собой по свойствам и фенотипу. Нужно отметить, что могут иметься также различия между свойствами популяций эМСК, выделенных из менструальной крови и из образцов ткани эндометрия (Gargett and Masuda, 2010; Allickson and Xiang, 2012). Клеточная фракция, изолированная из менструальной крови, является мультипотентной, обладает клоногенными свойствами. Помимо поверхностных маркеров СК, некоторые линии эМСК экспрессируют маркеры плюрипотентных клеток Oct 3/4, SSEA-4 и Sox2, Nanog, KLF4 и c-kit (CD-117) (Matthai et al., 2006; Cervello et al., 2011; Götte et al., 2011). Кроме того, японские ученые (Kato et al., 2007) выделили небольшую фракцию клеток эндометрия, обладающих характерной особенностью выводить из клеток прижизненный ДНК-связывающий краситель Hoechst 33342 при помощи ABCG2 транспортера G2. Это свойство является уникальной характеристикой, так называемой сторонней популяции (side population – SP) клеток, обладающих свойствами стволовых/прогениторных клеток (Goodell et al., 1996; Challen and Little, 2006). Было показано, что ABCG2⁺-клетки равномерно распределены по базальному и функциональному слоям эндометрия, две трети которого отслаивается во время пролиферативной фазы менструального цикла (Masuda et al., 2010). Наличие ABCG2⁺-клеток в обоих слоях эндометрия позволяет предположить, что не только базальный, но и функциональный слой участвует в регенерации эндометриальной ткани (Cervello et al., 2010, 2011). Многими исследователями отмечена высокая скорость пролиферации стволовых клеток эндометриального происхождения и их способность к длительному культивированию (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008; Gargett et al., 2009).

Одним из наиболее важных свойств эндометриальных стволовых клеток является их высокая пластичность. В определенных условиях эМСК могут дифференцироваться в клетки тканей мезодермального (миоциты, кардиомиоциты, остециты, адипоциты, эндотелиоциты), эктодермального (нейроны) и энтодермального (гепатоциты, клетки поджелудочной железы и дыхательного эпителия) рядов (Meng et al., 2007; Patel et al., 2008). После отработки технологии выделения, размножения и направленной дифференцировки эМСК *in vitro* эти клетки были использованы в трансплантационных экспериментах. В одном из первых

исследований было показано, что трансплантация эМСК, выделенных из ткани эндометрия и менструальной крови человека (интактных и дифференцированных в миогенном направлении) в мышечную ткань мышей с дистрофией Дюшена, приводила к частичной регенерации скелетной мышечной ткани (Cui et al., 2007). В работе Хида с соавторами выделенные из образцов ткани эндометрия и менструальной крови человека эМСК были с высокой эффективностью дифференцированы *in vitro* в предшественники кардиомиоцитов, демонстрирующие характерный комплекс признаков, включая способность к спонтанному сокращению (Hida et al., 2008). Трансплантация эМСК из образцов ткани эндометрия и менструальной крови человека в миокард модельным животным (крысам с моделированным инфарктом миокарда) продемонстрировала высокую эффективность дифференцировки клеток в кардиомиоциты *in vivo* в зоне инфаркта. Для эМСК менструальной крови была показана возможность достичь функционального эффекта (уменьшения зоны фиброза и восстановления систолической функции левого желудочка у модельных животных), что позволило авторам сделать вывод о чрезвычайно высоком потенциале эМСК менструальной крови в качестве субстрата клеточной терапии сердечной патологии (Hida et al., 2008). Высокий ангиогенный потенциал эМСК, соответствующий их биологической роли в циклическом восстановлении чрезвычайно богатой кровеносными сосудами ткани эндометрия (Angle, 2008), послужил обоснованием для трансплантации эМСК менструальной крови мышам, у которых была смоделирована критическая ишемия конечностей (Murphy et al., 2008). эМСК способны оказывать не только трофический эффект, но и выступать в роли антиканцерогенного фактора. Показано, что трансплантированные МСК десквамированного эндометрия замедляют рост глиомы у крыс. При этом наблюдается уменьшение объема опухоли на 46% по сравнению с контролем, что обуславливается снижением плотности сосудистой сети в опухоли. (Han et al., 2009). В 2010 г. были опубликованы результаты исследования, в ходе которого оценивали потенциал эМСК менструальной крови в терапии инсульта. Результаты эксперимента позволили установить, что сокультивирование нейронов с эМСК приводит к снижению числа нейронов, погибших в гипоксических и (или) гипогликемических условиях. При этом в среде были идентифицированы фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и нейротрофин-3 (NT-3). Авторы исследования заключили, что нейропротекторный эффект эМСК менструальной крови обусловлен биосинтезом и секрецией этими клетками проангиогенных и нейротрофических факторов (Borlongan et al., 2010). Чрезвычайный интерес представляет и перспектива использования эМСК менструальной крови в терапии болезни Паркинсона и вторичного паркинсонизма, патогенез которых обусловлен преимущественно потерей одного типа клеток (крупных

дофаминергических нейронов субпопуляции A9) в компактной части черного вещества головного мозга (Анисимов, 2009).

Недавно группой китайских исследователей было продемонстрировано, что эМСК могут быть дифференцированы в функциональные гепатоциты. После трансплантации гепатоцитов, дифференцированных из эМСК, мышам с частичной резекцией печени, у модельных животных в печени были обнаружены клетки, продуцирующие альбумин человека. Трансплантация эМСК человека восстанавливала уровень альбумина и значительно подавляла активность трансаминазы в печени травмированных животных (Mou et al., 2013).

Первым случаем клинического применения эМСК явилась их аллогенная трансплантация четырем больным рассеянным склерозом (Zhong et al., 2009). Это исследование продемонстрировало отсутствие побочных эффектов и безопасность использования данного вида мезенхимальных стволовых клеток. Второй случай применения эМСК был описан при лечении пациента с мышечной дистрофией Дюшенна. эМСК вводились внутримышечно двумя циклами через четыре месяца. После обоих циклов наблюдалось увеличение мышечной массы во всех группах мышц и нормализация уровня дистрофина. Никаких неблагоприятных эффектов в течение трех лет наблюдения за пациентом отмечено не было (Ichim et al., 2010a). Те же авторы описывают успешное применение эМСК при лечении хронической сердечной недостаточности (Ichim et al., 2010b). Перспективным направлением является возможность использования эМСК для коррекции патологии самой эндометриальной ткани (Cervello et al., 2011). Предполагают, что эМСК способны к регенерации эндометриальной ткани и могут быть использованы для лечения синдрома Ашермана, характеризующегося нарушением структуры и функции эндометрия. Хотя в настоящий момент в литературе отсутствуют данные о лечении гинекологических заболеваний стволовыми клетками эндометрия, синдром Ашермана успешно лечили, используя клетки костного мозга. Клетки аутологичного костного мозга больных были отсортированы по экспрессии характерных для эМСК антигенных маркеров CD9, CD90 и CD133 и вводились в полость матки. Неоваскуляризация стенки матки сопровождалась утолщением эндометрия, достаточным для успешной имплантации и вынашивания беременности (Gargett and Healy, 2011; Nagori et al., 2011).

Стволовые клетки эндометриального происхождения имеют большой потенциал для изучения свойств стволовых клеток и поиска новых факторов, определяющих дифференцировку прогениторных клеток. Перспективно также их использование в клинической практике для терапии различных заболеваний, возможно, неизлечимых прежде.

1.2.5. Сигнальные пути, регулирующие пролиферацию и дифференцировку СК взрослого организма

Пролиферация и специфическая дифференцировка СК происходит за счет взаимодействия нескольких сигнальных путей. Основными сигнальными путями в различных нишах СК являются Notch, Wnt, TGF β и Sonic hedgehog (Shh) (Lowry and Richter, 2006; Michel et al., 2012; Roozen et al., 2012).

Белки Wnt сигнального каскада участвуют в регуляции дифференцировки МСК в остеогенном и адипогенном направлении (Tang and Lane, 2012). В каноническом сигнальном пути ключевым участником передачи сигналов Wnt является β -катенин (Verheyen and Gottardi, 2010). Сигнальный путь Wnt/ β -катенин поддерживает активность СК многих тканей, а повышение его экспрессии способствует образованию карциномы в различных органах (Clevers and Nusse, 2012).

Сигнальный путь Notch вовлечен в развитие многих тканей взрослого организма. Так, например, активация Notch сигнального пути приводит к увеличению числа клеток предшественников в кишечных криптах и к снижению терминальной дифференцировки клеток кишечника. Notch сигналинг препятствует преждевременной дифференцировке нейтральных клеток. Усиление функции участников Notch сигнального пути в стволовых клетках нервного гребня способствует глиальной дифференцировке (Lowry and Richter, 2006). Интересно, что Notch и Wnt сигнальные пути участвуют в преждевременном старении стволовых клеток (Scaffidi and Mistel, 2008).

В процессе развития организма белки суперсемейства TGF β регулируют пролиферацию, дифференцировку, продукцию внеклеточного матрикса и клеточную гибель. В зрелом организме белки TGF β вовлечены в репарацию тканей и иммунную реакцию. Белки семейства TGF β являются транскрипционными факторами. В их состав входят белки собственно семейства TGF β , Bmp (семейство костно-морфогенетических белков) и активины. Белки семейства TGF β , с одной стороны, ингибируют деление эпителиальных клеток и функционирование иммунной и кроветворной системы, с другой стороны, активируют рост соединительной ткани. Активины играют важную роль в пролиферации клеток эндокринной системы. Белки BMP участвуют в процессе репарации костной и других тканей взрослого организма. Все члены суперсемейства семейства TGF β используют одни и те же рецепторы (рецепторные серин/треониновые трансмембранные киназы) и систему белков (Smad) для передачи сигнала в ядро (Rahimi and Leof., 2007).

Shh может регулировать самоподдержание стволовых клеток через свою мишень – ген BMI1, обнаруженный при изучении гранулярных нейтральных клеток-предшественников

мозжечка (CGNP). Развитие мозжечка регулируется Shh, который продуцируется клетками Пуркинье. Сигнальный путь Shh регулирует аккумуляцию клеток в фазе G2/M клеточного цикла. Ptc (patched), один из участников Shh сигналинга, взаимодействует с циклином B1 и поддерживает цитоплазматическую локализацию фосфорилированного циклина B1, ингибируя клеточную пролиферацию. Перераспределение циклина B1 и замедление перехода G2/M могут быть отменены с помощью лиганда Ptc-Shh, который активирует транслокацию циклина B1 в ядро и последующую прогрессию клеточного цикла. Таким образом, сигнальный путь Shh регулирует самоподдержание стволовых клеток в фазе G1, что опосредовано белком BMI1, и в фазе G2/M путем подавления активности белка Ptc (Valk-Lingbeek et al., 2004). Мишенью действия Shh также являются гены WNT, N-MYC и циклинов D, активность которых связана с регуляцией клеточного цикла. Влияние Shh и других сигнальных путей на самоподдержание стволовых клеток показано на **Рис. 2**.

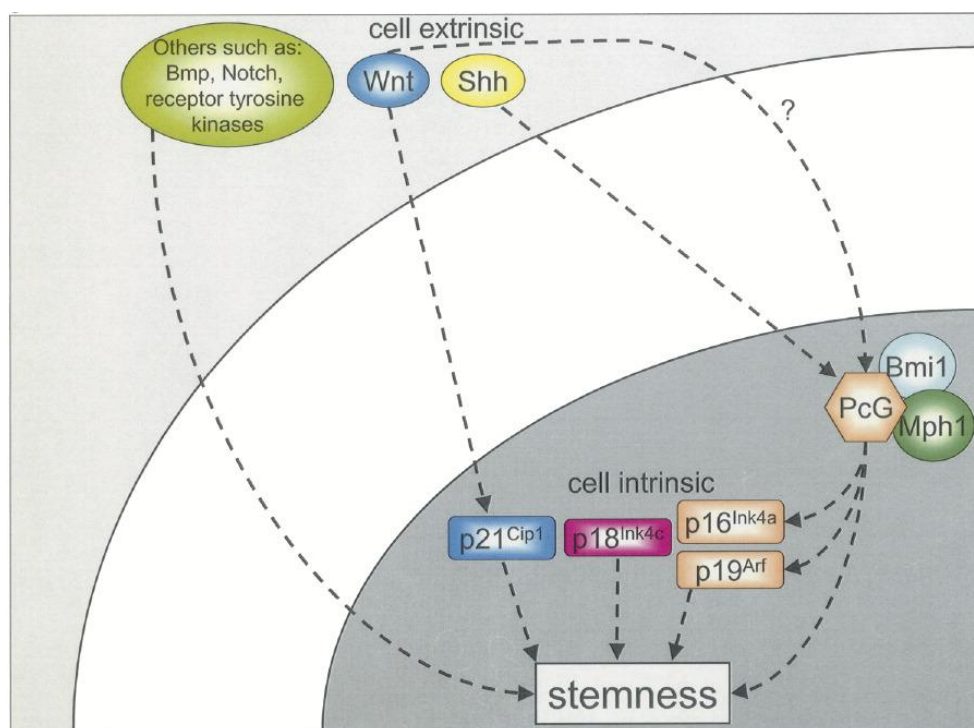


Рис.2. Сигнальные пути, регулирующие самоподдержание стволовых клеток
(Valk-Lingbeek et al., 2004).

1.2.6. Перспективы использования МСК

В настоящее время МСК являются наиболее перспективными клетками для клинического применения. К концу 2013 года база данных по клиническому применению МСК описывает более 600 клинических испытаний МСК на модельных животных для лечения широкого спектра заболеваний (<http://www.clinicaltrials.gov>). Терапевтическая

эффективность трансплантированных МСК изначально была связана с хоумингом, приживлением в поврежденных тканях и последующей дифференцировкой для восстановления и замещения поврежденных тканей. На сегодняшний день все больше исследователей склоняются к мысли о том, что наиболее существенным в процессе восстановления тканей является секреторная функция МСК (Kupcova Skalnikova, 2013). Внеклеточные везикулы, секретируемые из МСК, обладают уникальными свойствами. Они защищают клетки в поврежденных тканях от апоптоза, стимулируют деление выживших клеток. Это происходит за счет того, что мембраны этих везикул обогащены биологически активными липидами, такими, как близкий родственник церамидов сфингозин-1-фосфат. На поверхности этих везикул выявляются антиапоптозные и стимулирующие ростовые факторы. При помощи везикул в поврежденные ткани доставляются мРНК, регуляторные микроРНК и ферменты, что способствует клеточной регенерации. Например, мезенхимальные стволовые клетки посылают с помощью экзосом в поврежденные клетки канальцев почек матричную РНК рецептора инсулиноподобного ростового фактора-1. В клетках начинается синтез этого рецептора и регенерация идет активнее. Аналогичным образом, транспортировка экзосомами мРНК TGF- β 1 при повреждении, активирует процессы регенерации и восстановление тканей (Borges et al., 2013). Подобные механизмы перепрограммирования поврежденных клеток стволовыми могут быть задействованы и при инфаркте миокарда. В экспериментах на животных даже однократное введение экзосом мезенхимальных стволовых клеток уменьшает размер инфаркта и улучшает состояние подопытных. Очевидно, экзосомы восполняют дефицит ферментов, важных для снабжения клетки энергией, а значит, и для скорейшей реабилитации сердечной мышцы (Arslan et al., 2013; Lai et al., 2013).

1.3. Молекулярные и клеточные механизмы ответа на гипертермию

1.3.1. Стресс

Впервые физиологический стресс был описан канадским физиологом Гансом Селье как общий адаптационный синдром (Selye, 1936). В 1950 году, в своей работе, посвященной стрессу, он написал: *"Все, что вызывает стресс, угрожает жизни, если он не встречает адекватных адаптивных реакций; наоборот, все, что ставит под угрозу жизнь, вызывает стресс и адаптивные реакции. Адаптивность и устойчивость к стрессам являются необходимыми условиями существования, и каждый жизненно важный орган участвует в этих процессах"* (Selye, 1950). В настоящее время понятие стресс является объединяющей концепцией для понимания взаимодействия органической жизни с окружающей средой.

Мягкий стресс предоставляет возможность организму справиться с последующим, более сильным стрессом. Эта явление получило название стрессоустойчивости или гормезиса. Однако, если повреждения подавляют адаптационные ответы, происходит функциональный упадок, так называемый дистресс. Адаптационный ответ организма опосредуется вегетативной нервной системой и эндокринной системой (гипоталамус, гипофиз, надпочечники) (Šoti and Csermely, 2007).

1.3.2. Клеточный стресс

Острый и хронический стресс могут неблагоприятно влиять на клеточные инфраструктуры и нарушать клеточный гомеостаз. Большинство стрессов окружающей среды, такие как осмотический, температурный, оксидативный, воздействие тяжелых металлов, ионизирующая радиация и др., изменяют конформацию белков, нарушают структуру ДНК и липидов (Kempner, 1993; Rydberg, 2001; Hochachka and Somero, 2002; Catalá, 2010). Воздействие стресса на эукариотические клетки может ингибировать инициацию трансляции и приводить к образованию цитоплазматических РНК-белковых комплексов – стрессовых гранул (Buchan and Parker, 2009). Вследствие этого в организмах выработалась способность инициировать адаптивные пути клеточного ответа для сохранения или восстановления клеточного гомеостаза (Gupta et al., 2010). На клеточном уровне выделяют несколько главных этапов ответа на стресс: изменение флюидности и мембранного потенциала клеточной мембраны; активация специфических протеинкиназ, которые в свою очередь активируют факторы транскрипции; транслокация транскрипционных факторов в ядро, индукция или репрессия определенных генов; экспрессия специфических мРНК; синтез стресс-индуцибельных белков.

Гипертермия – один из наиболее изученных экзогенных стрессорных факторов. Хотя диапазон оптимальной температуры отличается у разных организмов, защитный механизм, названный “ответом на тепловой шок”, весьма консервативен. Первые сведения об обратимых изменениях в белковой системе живых клеток под действием высоких температур (до 45 °C) появились в 60-х годах XX ст. Итальянский исследователь Ф. Ритоза обнаружил, что под влиянием температуры 37 °C образуются гигантские пuffs хромосом дрозофилы (Ritossa, 1962). Было установлено, что это явление связано с синтезом *de novo* специфической группы белков, которые получили название “белки теплового шока” (БТШ, Hsp — Heat shock protein) (Ashburner and Bonner, 1979). Синтез Hsp индуцируется не только при повышении температуры, но и при многих других неблагоприятных воздействиях, таких как добавление к клеткам органических растворителей, тяжелых металлов, сильных оксидантов, а также под влиянием некоторых гормонов и ростовых факторов. В связи с этим

некоторые авторы называют белки теплового шока белками стресса. Действительно, при воздействии неблагоприятных факторов индукция Hsp усиливается в несколько раз. В нормальных условиях члены семейства HSP конститутивно синтезируются в клетках и играют важную роль в процессах сворачивания полипептидной цепи вновь синтезированных белков, в процессах репарации или элиминации неправильно свернутых и денатурированных белков. Вероятно, именно поэтому Hsp обнаружены во всех организмах от бактерий до человека и относятся к группе наиболее консервативных белков.

1.3.3. Семейство белков теплового шока (HSP)

В семействе HSP можно выделить два основных класса в соответствии с их молекулярной массой. К первому классу относятся небольшие HSP с молекулярной массой не более 40 кДа (Hsp40, известен также как кошаперон Hsp70 или Hdj1, HSP32, HSP27, HSP20 и др.) (Kregel, 2002). Второй класс включает HSP с высокой молекулярной массой 60-100 кДа (HSP60, HSP70, HSP90 и HSP110) (Hildebrandt et al., 2002). В настоящее время во избежание путаницы в описании конститутивно экспрессирующихся и индуцибельных белков, отнесенных к одному семейству, предложена другая номенклатура (Kampinga et al., 2009). Так, например, в соответствии с данной номенклатурой HSPA1A и HSPA1B являются аналогами двух изоформ стресс-индуцированного белка Hsp70, а конститутивная форма (Hsc70) обозначается HSPA8, малые белки ТШ (sHsps) – HSPB и т.д. Номенклатура некоторых представителей белков семейства HSP человека с альтернативными названиями приведена в **Таблице 2** (Kampinga et al., 2009).

Таблица 2. Номенклатура некоторых представителей белков семейства HSP человека с альтернативными названиями
Семейство HSPA/HSP70

	Ген	Белок	Старое название	№ в Ген банке (ID)
1	HSPA1A	HSPA1A	HSP70-1; HSP72; HSPA1	3303
2	HSPA1B	HSPA1B	HSP70-2	3304
3	HSPA1L	HSPA1L	hum70t; hum70t; Hsp-hom	3305
4	HSPA2	HSPA2	Heat-shock 70kD protein-2	3306
5	HSPA5	HSPA5	BIP; GRP78; MIF2	3309
6	HSPA6	HSPA6	Heat shock 70kD protein 6 (HSP70B')	3310

7	HSPA7	HSPA7	Heat shock 70kD protein 7	3311
8	HSPA8	HSPA8	HSC70; HSC71; HSP71; HSP73	3312
9	HSPA9	HSPA9	GRP75; HSPA9B; MOT; MOT2; PBP74; mot-2	3313
10	HSPA12 A	HSPA12A	FLJ13874; KIAA0417	259217
11	HSPA12B	HSPA12B	RP23-32L15.1; 2700081N06Rik	116835
12	HSPA13	HSPA13	Stch	6782
13	HSPA14	HSPA14	HSP70-4; HSP70L1; MGC131990	51182

Семейство HSPB/sHSP (малые белки теплового шока - small heat shock proteins)

1	HSPB1	HSPB1	CMT2F; HMN2B; HSP27; HSP28; HSP25; HS.76067; DKFZp586P1322	3315
2	HSPB2	HSPB2	MKBP; HSP27; Hs.78846; L0H11CR1K; MGC133245	3316
3	HSPB3	HSPB3	HSPL27	8988
4	HSPB4	HSPB4	crystallin alpha A; CRYAA, CRYA1	1409
5	HSPB5	HSPB5	crystallin alpha B, CRYAB; CRYA2	1410
6	HSPB6	HSPB6	HSP20; FLJ32389	126393
7	HSPB7	HSPB7	cvHSP; FLJ32733; DKFZp779D0968	27129
8	HSPB8	HSPB8	H11; HMN2; CMT2L; DHMN2; E2IG1; HMN2A; HSP22	26353
9	HSPB9	HSPB9	FLJ27437	94086
10	HSPB10	HSPB10	0DF1; 0DF; RT7; 0DF2; 0DFP; S0DF; 0DF27; 0DFPG; 0DFPGA; 0DFPGB; MGC129928; MGC129929	4956
11	HSPB11	HSPB11	HSP16.2; C1orf41; PP25	51668

Семейство HSP90/HSPC

1	HSPC1	HSPC1	HSP90AA1; HSPN; LAP2; HSP86; HSPC1; HSPCA; HSP89; HSP90; HSP90A; HSP90N; HSPCAL1; HSPCAL4; FLJ31884	3320
2	HSPC2	HSPC2	HSP90AA2; HSPCA; HSPCAL3; HSP90ALPHA;	3324

3	HSPC3	HSPC3	HSP90AB1; HSPC2; HSPCB; D6S182; HSP90B; FLJ26984; HSP90-BETA	3326
4	HSPC4	HSPC4	HSP90B1;ECGP; GP96; TRA1; GRP94; endoplasmin	7184
5	HSPC5	HSPC5	TRAP1; HSP75; HSP90L	10131

Некоторые из представителей семейства DNAJ (HSP40)

1	DNAJA1	DNAJA1	DJ-2; DjA1; HDJ2; HSDJ; HSJ2; HSPF4; hDJ-2	3301
2	DNAJA2	DNAJA2	DNJ3; mDj3; Dnaj3; HIRIP4	10294
3	DNAJA3	DNAJ A3	Tid-1; Tid1l	9093
4	DNAJA4	DNAJA4	Dj4; Hsj4	55466
5	DNAJB1	DNAJB 1	HSPF1; HSP40	3337
6	DNAJB2	DNAJB2	HSJ1; HSPF3; Dnajb10; MDJ8	3300
7	DNAJB4	DNAJB4	Hsc40	11080

Семейство HSPH (HSP110)

1	HSPH1	HSPH1	HSP105	10808
2	HSPH2	HSPH2	HSPA4; APG-2; HSP110	3308
3	HSPH3	HSPH3	HSPA4L; APG-1	22824
4	HSPH4	HSPH4	HY0U1/Grp170; ORP150; HSP12A	10525

1.3.3.1. Малые белки теплового шока

Малые белки теплового шока Small Hsps (sHsps или HSPB) представляют собой группу АТР независимых белков, участвующих в предотвращении агрегации белков и защищающих клетку от накопления частично денатурированных белков. sHsp имеют консервативный домен α -кристаллина, окруженный вариабельными N и C- концами, которые участвуют в связывании субстрата (Vos et al., 2008). sHsp, как правило, являются сложно построенными олигомерами (Benesch et al., 2008), которые связывают частично денатурированные белки и передают их АТР-зависимым шаперонам, которые обеспечивают полную ренатурацию белков (Nakamoto and Vigh, 2007). Увеличение экспрессии Hsp27 наблюдалось при дифференцировке культуры клеток эмбриональной карциномы, индуцированной ретиноевой кислотой (Stahl et al., 1992), и культуры промиелоцитов,

индуцированной форболовыми эфирами (Spector et al., 1993). Эти данные свидетельствуют о возможном участии sHsp в регуляции клеточной дифференциации. **Рис.3** показывает, что sHsp принимают активное участие в процессе апоптоза. При внутреннем пути активации апоптоза HspB1 препятствует выходу цитохрома C из митохондрий, активирует PI3-K phosphoinositide 3-kinase, которая активирует Akt (protein kinase B). Akt, в свою очередь, фосфорилирует BAX и препятствует образованию поры в мембране митохондрий, ингибирует Ask (Apoptosis signal-regulating kinase) и JNK (c-jun N-terminal kinase, phosphoinositide 3-kinase), предотвращая выход цитохрома C, блокирует образование апоптосом и ингибирует активность некоторых каспаз. При внешнем пути HspB1 препятствует перемещению Bid (BH3 interacting-domain death agonist) к мембране митохондрий и выходу цитохрома C, препятствует выходу Daxx (Death-associated protein 6) из ядра и активации Ask, способствует убиквитинилированию I κ B α (ингибитор NF- κ B) и тем самым способствует активации транскрипционного фактора NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Mymrikov et al., 2011).

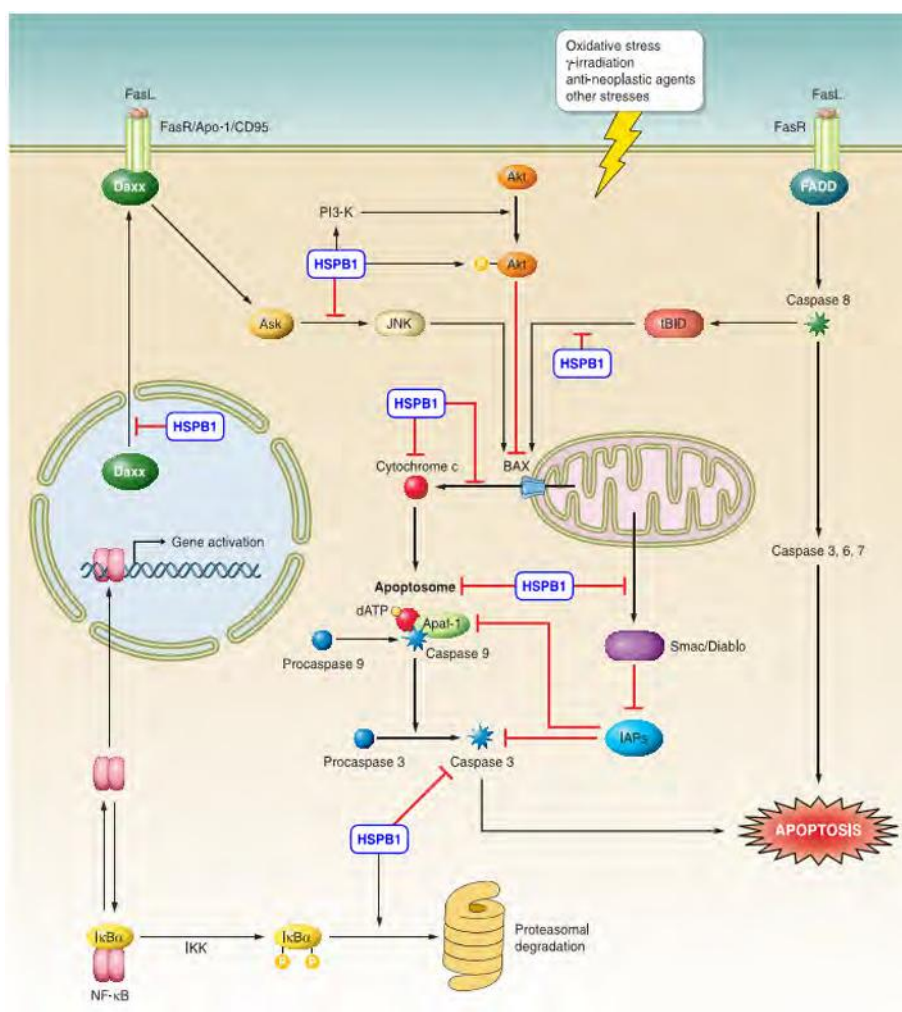


Рис. 3. Участие Hsp27 в процессах апоптоза (Mymrikov et al., 2011).

1.3.3.2. Белки семейства HSP60

Белки семейства Hsp60 (HSPD) (бактериальный гомолог GroE) часто называют молекулярными шаперонами. Общим структурным свойством шаперонинов является то, что их четвертичная структура образована двумя взаимодействующими друг с другом «кольцами», состоящими из 7–8 субъединиц. Внутренняя полость шаперонинов «втягивает» в себя гидрофобные аминокислоты еще не полностью свернувшихся белков, заставляя их изменить конфигурацию (Motojima et al., 2004). Белки семейства HSP60 могут участвовать в фолдинге сложно устроенных многодоменных белков, а также в АТФ-зависимой коррекции ошибок частично денатурированных белков (Netzer et al., 1998). Hsp60 локализуется преимущественно в митохондриях. Кроме этого этот белок обнаружен в цитозоле и во внеклеточном пространстве (Gupta et al., 2002). Существует мнение, что Hsp60 функционирует как сигнал опасности – информирует иммунную систему о наличии и локализации стрессовой ситуации и способствует активации как естественного, так и адаптивного иммунного ответа организма (Gupta and Knowlton, 2007). После выхода из экзосом, Hsp60 может вызывать апоптоз миоцитов сердца посредством активации Toll-подобных рецепторов 4 (Malik et al., 2013). Выход Hsp60 во внеклеточное пространство наблюдался при лечении болезни Паркинсона, смоделированной у взрослых крыс. По мнению авторов, этот процесс сопровождался активацией клеток микроглии (Feng et al., 2013). Кроме того доказано, что Hsp60 может экспрессироваться на клеточной поверхности кардиомиоцитов. Такая экспрессия Hsp60 происходит лишь под воздействием стрессовых факторов и коррелирует с повышением уровня апоптоза (Gupta et al., 2005; Pfister et al., 2005).

1.3.3.3. Белки семейства HSP70

В одной клетке высших организмов может одновременно присутствовать несколько представителей семейства HSP70. Индуцибельный Hsp70 и конститутивно синтезирующийся Hsc70, функционирующие в цитоплазме, митохондриальный Mtp70 и представитель эндоплазматического ретикулума Grp78 (Маргулис и Гужова, 2000). Hsp70 состоит из двух доменов: АТФ- и пептид-связывающего, занимающих соответственно N- и C-концевые фрагменты белковой молекулы. АТФ-связывающий домен является консервативным в эволюционном отношении, а структура пептидсвязывающего домена достаточно вариabельна. Пептидсвязывающий домен обеспечивает узнавание гидрофобных участков, выходящих на поверхность молекулы белка-субстрата. Одной из наиболее значимых функций HSP70, как и представителей других семейств HSP, является их шаперонная

активность. Шаперонная функция Hsp70 основана на его способности взаимодействовать с гидрофобными участками белков-мишеней. Гидрофобные участки могут быть экспонированы на молекулах вновь синтезированных пептидов или белков, утративших вследствие стресса свою нативную конформацию. Шаперон может восстанавливать исходную укладку полипептидной цепи благодаря циклическим актам ассоциации-диссоциации с молекулами-мишенями. Кроме представителей Hsp70, в шаперонную систему входят Hdj1/Hsp40, Hdj2 (белки, содержащие J-домен), нуклеотид-обменщики Bag-1 и Hip (Hsc-interacting protein), фактор связывания шаперонов Hsp70 и Hsp90 Hop (Hsp-organizing protein). Процесс захвата субстрата контролируется белками, содержащими J-домен, которые, связываясь с АТФазным доменом и С-концевой последовательностью аминокислот EEVD, изменяют конформацию Hsp70. После инициации АТФазы шаперона и гидролиза АТФ, комплекс субстрата с Hsp70 становится устойчивым. Для высвобождения полипептида нужен нуклеотид-обменщик Bag-1, который заменяет АДФ на АТФ, субстратный полипептид освобождается, а Hsp70 переходит в промежуточное состояние (Zeiner et al., 1997). Если правильная, активная структура белка не может быть восстановлена шаперонами, включается механизм протеолитической деградации белка, в котором Hsp70 также играет важную роль. Таким образом проявляется двойственная функция Hsp70 по отношению к белковым молекулам: восстановление нативной конформации белка или удаление неисправленного полипептида из клетки с помощью протеасом (Маргулис и др. 2009). Функционирование Hsp70 в эукариотической клетке представлена на **Рис. 4**. В последнее время появилось большое количество данных, подтверждающих возможность выхода белка Hsp70 на поверхность и (или) во внеклеточное пространство и кровоток. Появление Hsp70 на клеточной поверхности раковых клеток может активировать цитотоксическую активность естественных киллеров (NK). Комплекс шаперона с клеточной мембраной вызывает огромный интерес исследователей потому, что на его основе могут создаваться противоопухолевые вакцины. Эндогенный Hsp70 защищает раковые клетки различного происхождения от цитотоксических факторов, использующихся в терапии раковых клеток. Однако Hsp70, секретируемый раковыми клетками, подвергшихся стрессу, может служить сигналом опасности. Он может также рекрутировать клетки, ответственные за генерацию врожденного и адаптивного иммунного ответа против опухолевых клеток (Guzhova et al., 2013).

Помимо шаперонной, Hsp70 выполняет также антиапоптотическую функцию, участвуя в регуляции процесса апоптоза на всех его этапах (Calderwood et al., 2006). Мишени Hsp70 могут находиться как выше, так и ниже митохондрий. Ключевым моментом для Hsp70 является участие в апоптотической программе на уровне Araf-1 (Apoptotic protease activating

factor 1). Hsp70 способен связывать CARD (caspase recruitment domain) Apaf-1, предотвращая его олигомеризацию и активацию каспазы 9 (Saleh et al., 2000). Сверхэкспрессия Hsp70 негативно регулирует олигомеризацию и транслокацию Bax в митохондриях (Stankiewicz et al., 2005). Повышение экспрессии Hsp70 защищает клетки от TNF (Tumor necrosis factors) - индуцируемой смерти. Это происходит за счет ингибирования активации фосфолипазы A2 (Jaattella et al., 1992, Jaattella et al., 1993).

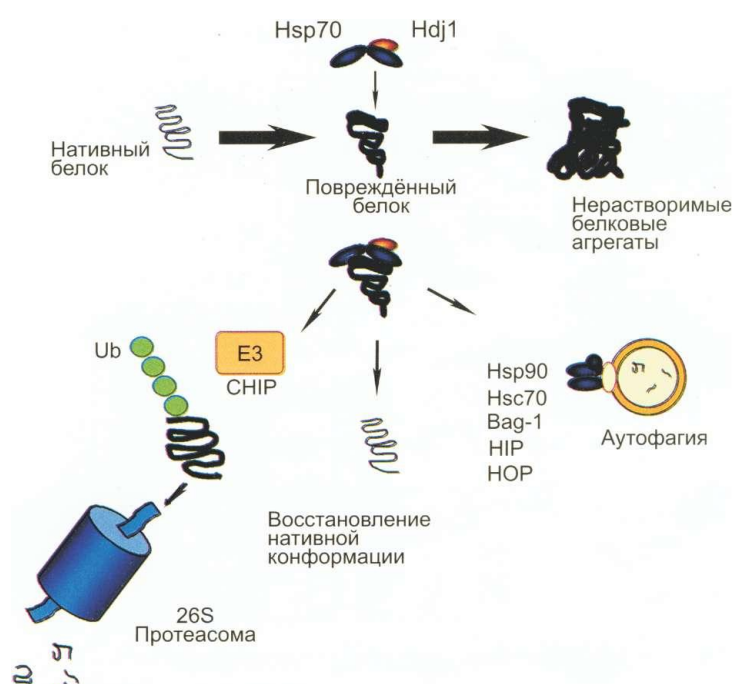


Рис. 4. Схемы работы Hsp70 в эукариотической клетке по восстановлению активной структуры поврежденных и вновь синтезированных полипептидов или удалению белков, не подлежащих восстановлению (Маргулис и др. 2009).

Hsp70 с помощью белка-кошаперона Hdj1 связывает субстратный полипептид и поддерживает его, до тех пор, пока тот перестанет быть «узнаваем» шапероном; затем в процессе, контролируемом другим кошапероном Bag-1, происходит высвобождение субстратной белковой молекулы в активной конформации. Если белок-мишень восстановлению не подлежит, то белок CHIP совместно с ферментом E3-лигазой контролирует его убиквитинилирование и помогает Hsp70 представить субстрат протеасомам. Помимо протеасом шаперон Hsp70 вместе с другими белками (Hsp90, Bag-1, H1P и HOP) принимает участие в направленном протеолизе субстратов в лизосомах (аутофагия). В этом заключается двойственная функция Hsp70 в клетке: исправление субстратных белков или их удаление.

Функционирование Hsp70 на различных этапах апоптотического каскада представлено на **Рис. 5.**

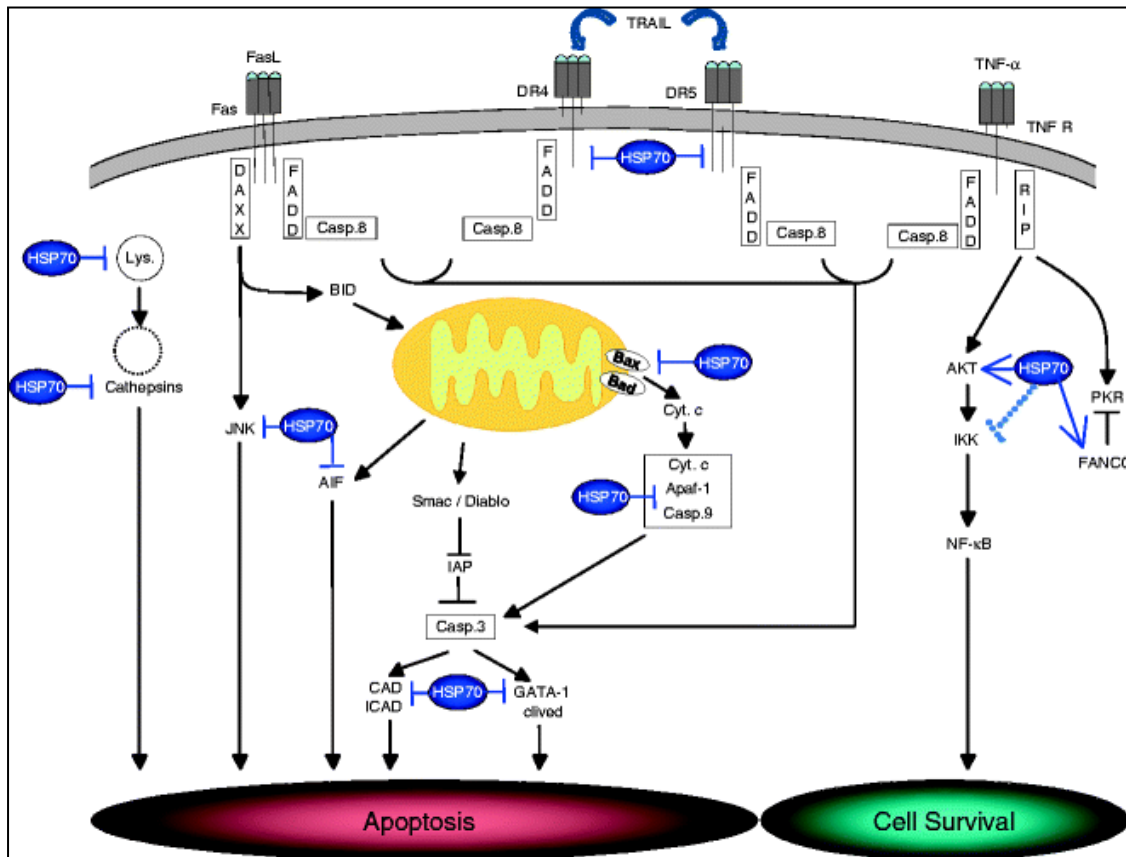


Рис. 5. Участие Hsp70 в апоптозе (Rérole et al., 2011).

Спорные моменты показаны пунктирной линией. Подробное описание см. обзор (Rérole et al., 2011).

Имеются данные свидетельствующие о том, что Hsp70 может также оказывать защитную функцию путем ингибирования лизосомальных сигнальных путей (Nylandsted et al., 2004). Hsp70 ингибирует выход катепсинов из лизосом, предотвращая каспаз-зависимым и каспаз-независимым путь гибели клеток (Kroemer and Jäätelä., 2005).

Многочисленные исследования описывают роль белков семейства HSP70 в аутофагии, катаболическом процессе, ведущего к деградации цитозольных компонентов в лизосомах. Существует три основных формы аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперонопосредованная аутофагия (chaperone-mediated autophagy – CMA). Участие HSPA8 было впервые описано для селективного аутофагического пути CMA (**Рис. 6**). Этот механизм основан на связывании цитозольных белков, содержащих определенный KFERQ мотив, с Lamp2a (мембранный белок 2A, ассоциированный с лизосомами) и перемещение «помеченных» белков через мембраны лизосом для их дальнейшей деградации. После связывания субстрата требуется сборка мономерной формы Lamp2a в мультимерный

комплекс, который быстро распадается после транслокации (Kaushik and Cuervo, 2012). На цитозольной стороне лизосом HSPA8, в ассоциации с кошаперонами HSP90, BAG1, Hsp40, ST13 и STIP1/HOP, связывает определенный KFERQ мотив на субстратах СМА (Agarraberes and Dice, 2001). Вариант HSPA8, находящийся в полости лизосомы (lys-HSPA8)

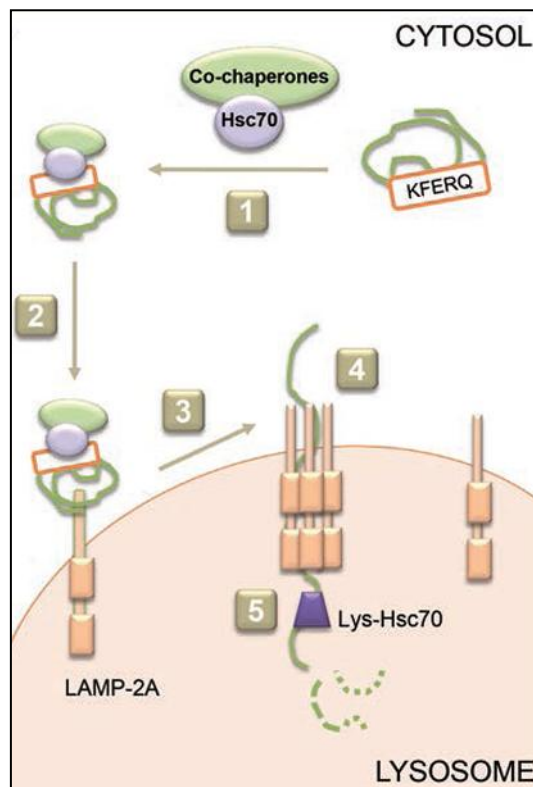


Рис. 6. Участие шаперонов в аутофагии (Cuervo and Wong, 2014).

необходим для полной транслокации субстратов СМА в матрикс лизосом, где они деградируют. Подробнее см. обзор (Stricher et al., 2013).

Классическим индуктором клеточной аутофагии является голодание, т.е. отсутствие питательных веществ в культуральной среде. Если в среде увеличивается количество белков семейства HSP70, то аутофагия замедляется (Dokladny et al., 2013). Тот же коллектив авторов показал, что подавление экспрессии HSF1 при помощи микроРНК, приводит к быстрой аутофагии, сопровождающейся увеличением количества модифицированного белка LC3. Повышение экспрессии HSP70 в таких условиях предотвращало развитие аутофагии. На основании этих данных, авторы предположили, что именно HSP70 является промежуточным звеном между HSF1 и предотвращением развития аутофагии. При этом важна именно каталитическая активность HSP70. Мутация в той его части, которая ответственна за проявление активности, приводит к развитию аутофагии в стрессовых условиях. В недавней работе японских ученых также было получено важное подтверждение участия HSP70 и HSF1 в развитии аутофагии. При изучении эффектов выключения одного из

белков-компонентов ядерной поры белка Trp, происходила активация аутофагии. Исследователи установили, что этот белок контролирует транспорт мРНК Hsp70 и HSF1 из ядра в цитоплазму. Нарушение регуляции транспорта мРНК Hsp70 из ядра в цитоплазму приводит к развитию аутофагии (Funasaka et al., 2012).

1.3.3.4. Белки семейства Hsp90

Белок теплового шока Hsp90 (HSPC) относится к классу внутриклеточных белков-шаперонов и обеспечивает фолдинг вновь синтезированных белков, сборку мультимолекулярных комплексов, участвует в транспорте белков и пептидов между клеточными органеллами, деградации белков, предотвращает агрегацию и денатурацию белков при различных видах стресса (Csermely et al., 1998; Taipale et al., 2010). Hsp90 выполняет не только внутриклеточные функции. Этот шаперон обнаружен во внеклеточном пространстве и на клеточной мембране (Schmitt et al., 2007), где участвует в формировании врожденного и приобретенного иммунитета, в том числе противоопухолевого иммунитета, способен выступать в качестве «сигнала опасности» в организме (Csermely et al., 1998). Показано, что экстраклеточный Hsp90 участвует в процессе миграции нормальных и опухолевых клеток, а также в инвазии опухолевых клеток (Sidera and Patsavoudi 2009; Li et al., 2012; McCready et al., 2010). Ингибирование внутриклеточного и экстраклеточного Hsp90 считается перспективным направлением для разработки противоопухолевых препаратов, предотвращающих метастазирование опухолей (Sidera et al., 2009; He et al., 2013; Franke et al., 2013).

1.3.4. Транскрипционная регуляция экспрессии HSP

Вызванное гипертермией усиление транскрипции, связано с транскрипционными факторами ТШ (HSF), которые конститутивно экспрессируются у высших эукариот и активизируются в условиях ТШ (Sarge et al., 1993; Anckar and Sistonen, 2011). Семейства HSF включает четыре фактора, HSF1-4 (Akerfelt et al., 2010). Наиболее изученным фактором среди них является фактор транскрипции HSF1. Он содержит ДНК-связывающий, олигомеризационный домен, способствующий тримеризации, и два активационных домена (Anckar and Sistonen, 2011). HSFs, связывающиеся с элементами теплового шока (HSE), находящимися в промоторах многих генов, обеспечивают регулирования экспрессии HSPs. У высших эукариот в стрессовых условиях активация HSF1 происходит посредством его тримеризации. В нормальных условиях большинство HSFs находятся в неактивном мономерном состоянии в комплексах с Hsp70 и Hsp90, которые взаимодействуют с активационным доменом HSF1 (**Рис. 7**). При воздействии стресса Hsp70 и Hsp90

взаимодействуют с денатурированными белками, отделяются от HSF1 и тем самым стимулируют свою собственную экспрессию. Увеличение экспрессии Hsp продолжается до того момента, когда количества молекулярных шаперонов вновь становится достаточно для блокирования активационного домена HSF1 (Morimoto et al., 1998; Richter et al., 2010).

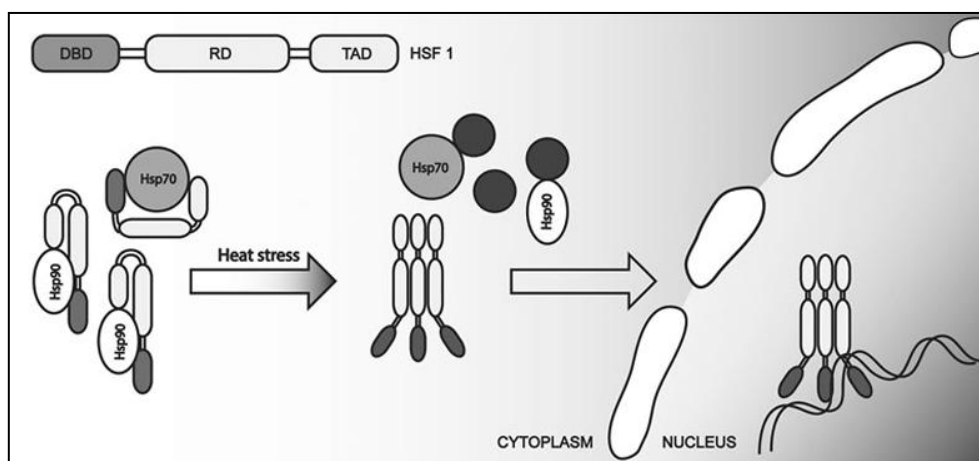


Рис. 7. Тепловой шок индуцирует активацию HSF1 (Velichko et al., 2013).

DBD - N-терминальный ДНК-связывающий домен, TAD - транс-активационный домен, RD - регуляторный домен

Посттрансляционные модификации HSFs, такие как фосфорилирование, ацетилирование и сумоилирование (Sumoylation-small ubiquitin-like modification), также регулируют их связывания с HSE. Например, HSF1 содержит не менее 12 остатков серина, которые подвергаются фосфорилированию. Сериновые остатки в положениях 230 и 326 фосфорилируются в стрессовых условиях, что способствует активированию HSF1 (Akerfelt et al., 2010). Сумоилирование вызывает противоположный эффект. Оно ослабляет функцию трансаактивации HSF1. Фосфорилирование и сумоилирование происходят сразу после HS, в то время как ацетилирование HSF1 является отсроченным процессом. Стресс-индуцированное ацетилирование регулируется балансом между p300-CBP ацетилтрансферазой и SIRT1 (НАД⁺-зависимой Sirtuin) деацетилазой. Увеличение экспрессии SIRT1 способствует связыванию HSF1 с промотором гена HSP70, в то время как снижение экспрессии SIRT1 приводит к ацетилированию HSF1 и ослаблению ДНК-связывающей активности без прямого влияния на структуры HSF1 гомотримера (Westerheide et al., 2009).

Индукция HSF1 при различных стрессовых воздействиях и широкое разнообразие посттрансляционных модификаций предполагает, что HSF1 может быть точкой конвергенции для нескольких сигнальных путей. Действительно, стресс-активируемые пути

передачи сигналов затрагивают HSF1. При температурном воздействии активируются протеинкиназы, которые могут модулировать ответ на ТШ (Calderwood et al., 2010).

1.3.5. Активация сигнальных каскадов при температурном воздействии

ТШ включают три митоген-активированные протеинкиназы MAPK сигнального пути. Это N-концевые киназы c-Jun (JNK), митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK) p38 и киназы, регулируемые внеклеточными сигналами ERK (extracellular signal-regulated kinase). Эти киназы далее фосфорилируют свои субстраты – транскрипционные факторы, другие протеинкиназы, фосфорилазы и белки, ассоциированные с цитоскелетом. При ТШ ERK активируется через автофосфорилирование рецептора эпидермального фактора роста (EGF), не зависимо от связывания самого EGF (Nadeau and Landry, 2007). Активация ERK1 подавляет транскрипционную активность HSF1 или активирует PCK (protein kinase C), которая также может ингибировать HSF1. Активация p38 киназы индуцирует нижележащую MK2 киназу (MAPK-activated protein kinase 2), которая фосфорилирует Hsp27, что приводит к усилению функций этого молекулярного шаперона. p38 фосфорилирует HSF1 по серину 121. Сигнальный путь кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII) принимает участие в положительном регулировании HSF1-опосредованной трансаактивации (Holmberg et al., 2001). Протеинкиназа A (PKA) участвует в фосфорилировании HSF1 по Ser320 при ядерной локализации транскрипционного фактора ТШ (Murshid et al., 2010). Таким образом, некоторые киназы активируются в ответ на ТШ и участвуют в регулировании транскрипционной активности HSF1.

1.3.6. Изменения клеточных структур после воздействия гипертермии

В зависимости от силы воздействия и типа клеток, клетка может или полностью восстановить исходные функции или погибнуть. Повышение температуры индуцирует денатурацию белковых структур и их агрегацию, что может привести к различным клеточным дефектам: изменению цитоскелета (Toivola et al., 2010), фрагментации эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, уменьшению количества митохондрий и лизосом (Welch and Suhan, 1985) и нарушению сплайсинга РНК (Vogel et al., 1995; Boulon et al., 2010). Изменения клеточных структур при гипертермии показано на **Рис.8.**

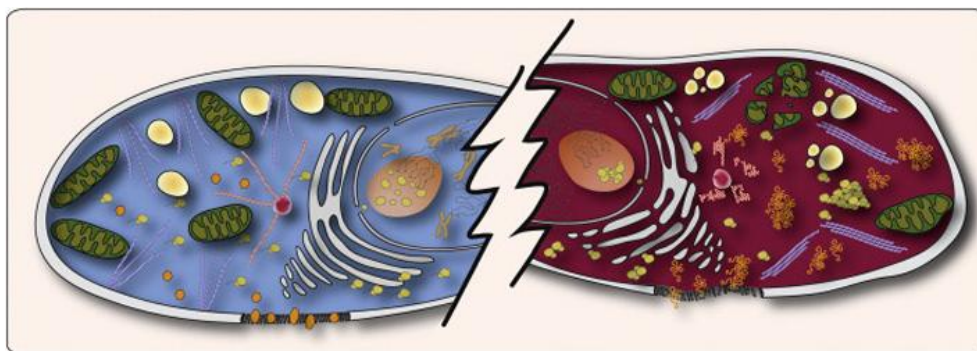


Рис. 8. Влияние ТШ на структуру эукариотической клетки (Richter et al., 2010).

Сравнение интактной клетки (слева) с клеткой после ТШ (справа). Внутриклеточные компартменты имеют различную цветовую окраску: синий – нити актина, красный – микротрубочки, белый – эндоплазматическая сеть, зеленый – митохондрии, желто-белый градиент – лизосомы, желтый – стресс гранулы, оранжевый – белковые агрегаты.

1.3.6.1. Воздействие гипертермии на клеточную мембрану

Воздействие гипертермии на клеточную мембрану проявляется в увеличении мембранной текучести, сопровождаемой формированием неполярных шестиугольных структур в билипидном слое (Kruuv et al., 1983; Vigh et al., 2007, Balogh et al., 2013). Флюидизация приводит к нарушению межклеточных контактов, изменению мембранного потенциала и ионного гомеостаза (Nishida et al., 1997; Park et al., 2005). Изменение текучести мембран при воздействии гипертермии может быть использовано для терапии канцерогенеза совместно с радио- и химиотерапией (Csoboz et al., 2013). Роль температурных датчиков в клетках млекопитающих выполняют TRP - термочувствительные каналы с транзитным рецепторным потенциалом (temperature-sensitive transient receptor potential channels) (Huang et al., 2006). TRP – это ионные каналы, работа которых регулируется потенциалом напряжения. Ваниллоиды, агонисты этих каналов, вызывая депорязлизацию мембраны, открывают TRP для прохождения ионов Ca^{2+} и Na^{+} . Чувствительность теплового рецептора зависит от притока ионов кальция, а чувствительность холодových рецепторов зависит от притока ионов натрия (Patapoutian et al., 2003). Приток Ca^{2+} регулирует активацию кальмодулин-связывающей киназы (СВК), ведущей к фосфорилированию и активации HSFs, которые, в свою очередь, запускают синтез HSP. ТШ также индуцирует аккумуляцию фосфатидилинозитол- бифосфата (PIP2) после активации фосфатидилинозитол монофосфат киназы (PIPK), которая может регулироваться G-белком, связанным с сигналингом или непосредственной активацией ионных каналов. PIP2 также может быть гидролизован с помощью фосфолипазы C (PLC), генерирующей инозитол трифосфата (IP3), который может быть фосфорилирован, чтобы генерировать инозитол гетерофосфат. Последний может

выступать в качестве мессенджера и модулировать увеличение цитозольного Ca^{2+} . ТШ также вызывает активацию фосфолипазы D (PLD), индуцирующую синтез фосфатидной кислоты (PA). PLA и PA могут быть связаны с повышением уровня H_2O_2 и NO, а также с перестройкой цитоскелета (Horváth et al., 2012) (Рис. 9).

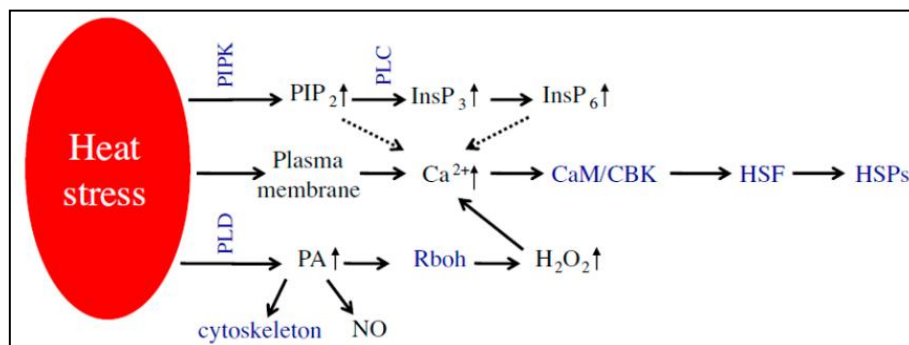


Рис. 9. Воздействие гипертермии на клеточную мембрану (Horváth et al., 2012).

Объяснения в тексте.

1.3.6.2. Воздействие гипертермии на цитоскелет

Повышение температуры оказывает воздействие на цитоскелет – динамическую структуру, в функции которой входит поддержание формы клетки, экзо и эндоцитоз, обеспечение движения клетки, активный внутриклеточный транспорт и клеточное деление. Характерной реакцией клетки на ТШ является изменение формы клетки, вызванное модификациями цитоскелета (Luchetti et al., 2004), включая реорганизацию микрофиламентов. ТШ может привести к коллапсу актиновых фибрилл и накоплению F-актина в центральных клеточных компартаментах (Pawlik et al., 2012). Тубулин, который является структурной единицей микротрубочек, также реагирует на тепловой стресс. Было продемонстрировано, что при ТШ в клеточной линии H1299, микротрубочки отодвигаются от периферии клетки, их сеть дезорганизуется, и тубулин накапливается в перинуклеарном пространстве (Pawlik et al., 2012). ТШ может привести к многополюсному митозу и последующему формированию гигантских многоядерных клеток, одному из признаков митотической катастрофы (Gupta et al., 2008). В нормальных интерфазных фибробластах ТШ уже через 2–4 минуты вызывает одновременную перестройку всех филаментов. При гипертермии актиновые филаменты разбираются, изменяется морфология микротрубочек, промежуточные филаменты коллапсируют вокруг ядра. Возвращенные в нормальные условия, клетки способны восстановить актиновый цитоскелет (Гаврилова и др. 2012).

1.3.6.3. Воздействие гипертермии на цитоплазму и клеточные органоиды

Температурный стресс вызывает ряд морфологических изменений в клетке. ТШ приводит к набуханию и увеличению размера митохондрий (Welch et al., 1985; Rivera et al., 2003), фрагментированию эндоплазматической сети и аппарата Гольджи (Welch et al., 1985). Структура ядра также меняется. Ядрышко подвергается дезинтеграции (Iliakis and Pantelias, 1989). Это связано с тем, что при ТШ из ядрышка высвобождается множество белков. Так, например, нуклеолин связывает белок RPA (Replication protein A) и ингибирует синтез ДНК (Wang et al., 2001). Другой ядрышковый белок, нуклеофозмин (B23), при воздействии гипертермии также транслоцируется в ядро (Vanderwaal et al., 2009). При ТШ в ядре и цитоплазме формируются стрессовые гранулы (СГ) (Jolly et al., 2002). В формировании ядерных СГ участвуют HSF1 и HSF2 (Sandqvist et al., 2009). Роль ядерных СГ до конца не понятна, но, вероятно, они участвуют в регуляции сплайсинга во время стресса. Формирование цитоплазматических СГ связано с изменением работы трансляционного аппарата клетки (Kedersha and Anderson 2009). В условиях стресса большое число мРНК генов «домашнего хозяйства» отделяются от полисом и накапливаются в СГ, где они находятся в транскрипционно неактивном состоянии. Кроме мРНК в состав СГ входят большое количество РНК-связывающих белков, факторы инициации трансляции и малая рибосомная субъединица. Предполагается, что образование СГ является следствием ингибирования трансляции на стадии инициации, в частности за счет фосфорилирования факторов инициации трансляции (Kedersha et al., 2013).

1.3.7. Влияние гипертермии на клеточный цикл

Чувствительность клеток к гипертермии зависит от стадии клеточного цикла. Результаты различных исследований показывают, что клетки в S фазе и митозе более чувствительны к высоким температурам, чем в G1 или G2 фазах (Dewey and Westra, 1971; Palzer and Heidelberger, 1973; Bhuyan et al., 1977). ТШ, также как и ионизирующее облучение, вызывает арест в G2/М. Однако при гипертермии, арест в G2/М фазе происходит раньше и сохраняется в течение меньшего времени, чем радиационный блок (Valenzuela et al., 1997). Исследования, проведенные на клетках Jurkat и HeLa, показали, что G2/М арест в условиях ТШ контролируется ATR/Chk1 сигнальным каскадом и является необходимым условием для предотвращения каспаза-3-зависимого апоптоза (Furusawa et al., 2012). В некоторых клеточных линиях умеренный тепловой стресс индуцирует арест клеточного цикла в фазе G1, который, по-видимому, вызван протеолитической деградацией Cdc25A фосфатазы (Madlener et al., 2009). Протеолиз Cdc25A начинается с активации p38MAPK и Chk2 киназ, которые фосфорилируют Cdc25A. Такое фосфорилирование диссоциирует Cdc25A из

комплекса с Hsp90 и транслоцирует его из ядра в цитоплазму. В цитоплазме, фосфорилированные формы Cdc25A образуют комплекс с убиквитинлигазой SCF β -TrCP и белком 14-3-3, что приводит к деградации Cdc25A (Madlener et al., 2009). Исследования, проведённые на нормальных фибробластах кожи, продемонстрировали, что ТШ вызывает G1/S p53-опосредованный арест. В условиях гипертермии p53 транслоцируется в ядро клетки, где он активирует экспрессию p21^{WAF1}. p21 ингибирует циклин-CDK протеинкиназный комплекс (Nitta et al., 1997). Аналогичные результаты были получены в клетках глиомы A172 и в лейкозных клетках U937 (Fuse et al., 1996), но не в клетках HeLa с дефектом гена p53 (Nitta et al., 1997). Тем не менее, тепло-индуцированная сверхэкспрессия p21^{WAF1} не всегда зависит от p53. Так, например, гипертермия индуцирует p21^{WAF1}-опосредованный G1 арест в p53-дефицитных клетках T98G и MDAH041 (Fuse et al., 1996). Некоторые авторы сообщают, что ТШ приводит к G1 аресту в клетках дрожжей путем ингибирования транскрипции элементов из STAT системы, включая циклины CLN1 и CLN2 (Nunes and Siede, 1996; Rowley et al., 1993). Таким образом, можно заключить, что ТШ может блокировать прогрессию клеточного цикла практически в любой фазе. Влияние гипертермии на клеточный цикл показано на **Рис. 10**.

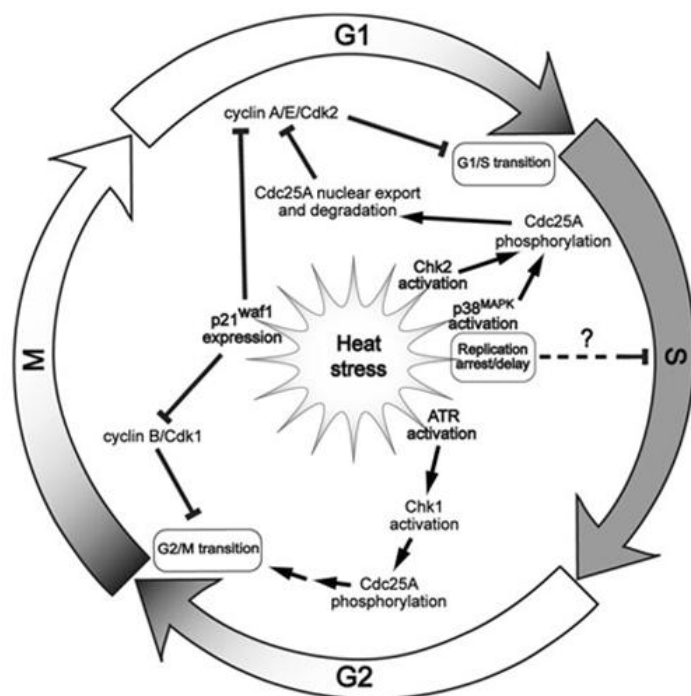


Рис.10. Упрощенная модель ТШ индуцированного торможения прогрессии клеточного цикла (Velichko et al., 2013).

(↑ активирующий или положительный эффект; ⊥ ингибирующий или отрицательный эффект).

1.3.8. Влияние гипертермии на репарацию ДНК

Гипертермия оказывает значительное влияние на систему репарации ДНК после повреждений. Так, например, экспрессия одного из центральных участников нуклеотидной эксцизионной репарации ДНК (Nucleotide excision repair – NER), белка ХРА (mutant xeroderma pigmentosum group) супрессированна при ТШ (Muenyi et al., 2011). Влияние ТШ на систему репарации ДНК лежит в основе феномена, названного тепловой радиочувствительностью и применяется для лечения рака (Kampinga et al., 2004). Точный механизм радиосенсибилизации все еще обсуждается. Одна из гипотез предполагает, что тепловая радиосенсибилизация является результатом торможения репарации ДНК, вызванной ионизирующей радиацией (IR) (Kampinga et al., 2004; Batuello et al., 2009; Dynlacht et al., 2011). Кроме торможения систем репарации, ТШ сам является фактором, повреждающим ДНК. Причем ТШ может вызывать формирование как одонитевых (SSBs) (Corry et al., 1977; Jorritsma and Konings 1984; Wartens et al., 1985), так и двунитевых разрывов ДНК (DSBs) (Velichko et al., 2012).

1.3.9. Гипертермия вызывает клеточную гибель

Не удивительно, что реорганизация клеточных компонентов в результате ТШ приводит к общему снижению жизнеспособности и гибели клеток. Индукция гибели клеток зависит от силы и продолжительности ТШ (Takahashi et al., 2004; Pawlik et al., 2012). В условиях жесткой гипертермии (выше 45,5 ° C) клетки умирают в основном путем некроза (Harmon et al., 1990; VanderWaal et al., 1997). В популяциях клеток, подвергнутых ТШ ниже этой температуры, наблюдалась быстрая и медленная гибель клеток (Vidair and Dewey, 1988). Последняя является результатом отсроченных последствий ТШ (Nakahata et al., 2002; Pawlik et al., 2012). Быстрая гибель клеток происходит либо в момент ТШ или в течение нескольких часов после ТШ, и обусловлена разрушением клеток и ингибированием синтеза макромолекул, как описано выше (Vidair and Dewey, 1988; Hildebrandt et al., 2002). Индукция апоптоза при гипертермии также вносит свой вклад в режим "быстрой" клеточной смерти (O'Neill et al., 1998; Hildebrandt et al., 2002). Вероятность индукции апоптоза зависит не только от интенсивности ТШ, но и от типа клеток (Falcieri et al., 2000). Гипертермия включает программу апоптоза в HL60 и U937 клеточных линий, но не в K562 (Falcieri et al., 2000). Это может зависеть от различий в уровнях экспрессии антиапоптотических членов белков семейства Bcl-2 (Amarante-Mendes et al 1998). Апоптоз, индуцированный ТШ, не всегда является классическим. При гипертермии каспаза-3 может активироваться некоторыми неопределенными каспаза-подобными протеазами, тогда как классические инициаторные каспазы (например, каспазы-2, -8 или -9) и их комплексы не участвуют в этом

процессе (Milleron and Bratton 2006). Недавно было показано, что использование гипертермии при лечении рака ободочной кишки усиливает апоптотический эффект (Song et al., 2012). Апоптоз, индуцированный температурой, интенсивно изучается, однако молекулярный механизм этого процесса все еще является дискуссионным (Milleron and Bratton 2007).

Гипертермия индуцирует еще один тип клеточной гибели – аутофагию. Мощное действие гипертермии в качестве индуктора макроаутофагии было продемонстрировано на нескольких опухолевых клеточных линиях человека и мыши (HeLa, HEK293T, MCF7, N2a, B16, A549 и SH-SY5Y) (Zhao et al., 2009). HSF1 играл негативную роль в этом процессе. Использование гипертермии как индуктора аутофагии предлагают в качестве защитного механизма при нейродегенеративных процессах мозга (Liu et al., 2010). Интересное исследование провели Oberley и сотр., которые изучали изменения гепатоцитов у молодых и старых крыс при двукратном гипертермическом воздействии. Оказалось, что и у молодых и у старых животных гипертермия индуцировала аутофагию, но митохондрии были сильнее повреждены у старых крыс (Oberley et al., 2008). Недавно было показано, что при воздействии высокой температуры (43 °C в течение 2 часов) на кардиомиоциты крысы линии H9c2, развивалась сильная аутофагия (увеличение экспрессии одного из маркеров аутофагии лизосомного белка LC3-II – light chain 3 of microtubule-associated protein 2 и усиление лизосомальной активности), в результате чего клетки погибали. Однако предварительный мягкий прогрев, усиливающий экспрессию HSP, снижал интенсивность аутофагии и увеличивал выживаемость клеток. Судя по всему, в определенных условиях HSP могут смягчать проявления аутофагии. В этой работе, как и в некоторых других, в качестве индуктора аутофагии выступала гипертермия (Hsu et al., 2013).

Температура является важным физиологическим фактором, и клетки часто подвергаются воздействию повышенной температуры, тем не менее, ответ СК человека на тепловое воздействие изучен недостаточно хорошо. Кроме этого до сих пор остаётся открытым вопрос о судьбе стволовых клеток, переживших сублетальное тепловое воздействие.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Клеточные культуры, использованные в работе

В работе были использованы: 1) культура эмбриональных стволовых клеток человека (чЭСК) линии C910, полученная в Институте цитологии РАН (Кожухарова и др., 2009), 2) культура мезенхимных стволовых клеток эндометрия (эМСК) линия 2304, так же полученная в Институте цитологии РАН (Земелько и др., 2011), 3) фибробластоподобные клетки, полученные в результате спонтанной дифференцировки чЭСК (линия C910) через эмбрионидные тельца (ч ЭСК-ДИФ).

2.2. Получение чЭСК

Источником клеток для получения линий ЭСК послужили избыточные бластоцисты, которые не могли быть использованы в процессе экстракорпорального оплодотворения. Бластоцисту 5—6-суточного развития, самостоятельно освободившуюся от белковой оболочки (пеллюиды) помещали на подготовленный фидерный слой в лунку 4-луночной панели. Клетки культивировали на среде mTeSR при следующих условиях: 37 °C, 85% влажности и 6 % CO₂. Среду меняли ежедневно в течение 9—11 сут. В качестве фидерной культуры использовали мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФ), полученные в результате эксплантации 14-суточных эмбрионов самок линии CBA, скрещенных с самцами линии C57Bl/6. Клетки МЭФ растили на среде DMEM/F12 с добавлением 2 mM L-глутамина, смеси пенициллина и стрептомицина, 10 % эмбриональной бычьей сыворотки; пересевали в соотношении 1 : 2 с использованием раствора 0.25 %-ного трипсина и ЭДТА (Invitrogen, США) в течение 5 пассажей. Для приготовления фидерного слоя культуральную посуду обрабатывали 0.1 %-ным раствором желатина, поверх которого высевали клетки МЭФ 3—4-го пассажей, предварительно обработанные митомицином C (Sigma, США) в концентрации 10 мкг/мл в течение 2.5 ч. Плотность фидерной культуры составляла 25×10^3 кл/см². Бластоцисты, помещенные на фидерный слой, начинали увеличиваться в размере через 3 сут, и через 9—11 сут из них появлялись колонии растущих клеток. Выросшие колонии клеток разделяли на 2—4 части с помощью пластикового наконечника для пипетки под микроскопом с использованием фазового контраста. Агрегаты клеток переносили на свежий слой МЭФ в лунки 4-луночной панели. В дальнейшем для культивирования использовали культуральные чашки 35 и 60 мм и среду mTeSR (StemCellTechnology, Канада) или среду следующего состава: knockout DMEM (Gibco, США) с добавлением 20 % knockout serum replacement (заменителя сыворотки) (Gibco, США), 2 mM L-глутамина, 1 % заменимых аминокислот, 0.1 mM β-меркаптоэтанол (Sigma, США), 25 мкг/мл пенициллина и

стрептомицина и 6 нг/мл ростового фактора bFGF (Chemicon, США). Через каждые 5—6 суток колонии недифференцированных стволовых клеток разделяли на 6—10 частей механически с помощью пластикового наконечника и переносили на свежий фидер в соотношении 1: 2; среду полностью меняли ежедневно.

2.3. Культивирование чЭСК C910

Для поддержания и культивирования чЭСК C910 в качестве фидера использовали обработанные митомицином эМСК. Условия культивирования были такие же, как и при использовании в качестве фидерного слоя МЭФ. Для всех экспериментальных исследований клетки выращивали без фидера на 35 мм культуральных чашках или покровных стёклах, обработанных матригелем (BD Bioscience).

2.4. Криоконсервация и размораживание чЭСК

Колонии недифференцированных стволовых клеток механически разделяли на агрегаты размером в 2—4 раза больше, чем для посева. Суспензию собирали в коническую пробирку, в которой они оседали в течение 10 мин, затем верхний слой среды сливали, а к суспензии по каплям добавляли равный объем 20%-ного раствора DMSO (Sigma, США) в эмбриональной сыворотке. Криовials с клетками замораживали со скоростью 1 °C/мин и хранили в жидком азоте. Размораживание клеток проводили, быстро нагревая ампулу в водяной бане при 37 °C, содержимое переносили в коническую пробирку, затем по каплям добавляли 10 мл теплой ростовой среды. Пробирку центрифугировали со скоростью 800 об/мин в течение 3 мин при комнатной температуре. Осадок ресуспензировали 1—2 раза в 2 мл ростовой среды и распределяли по лункам 4-луночной панели, содержащим приготовленный накануне фидерный слой МЭФ или эМСК предварительно обработанные митомицином С в концентрации 10 мкг/мл в течение 2.5 ч. Среду меняли ежедневно, и через 10—12 сут в лунках вырастали 1—2 колонии недифференцированных стволовых клеток.

2.5. Получение и культивирование чЭСК–ДИФ

Дифференцировку чЭСК индуцировали получением эмбрионидных телец с помощью посева агрегатов клеток на низкоадгезивные культуральные чашки (Nunc, США). Агрегаты клеток культивировали в течение 4 сут в среде KoSR (Knockout DMEM, 20 % serum replacement (Invitrogen, США) с добавлением 1 mM глутамина, 100 mM заменимых аминокислот, 1 %-ного раствора пенициллина и стрептомицина. Затем их переносили на адгезивные чашки в среде DMEM/F12 (Invitrogen, США) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone, США) и культивировали до образования монослойной культуры.

Монослойные культуры пересевали с использованием 0.05 %-ного раствора трипсина. В течение 7 пассажей популяция становилась однородной, и дифференцированные клетки приобретали фибробластоподобную морфологию. Для подтверждения статуса плюрипотентности, эмбрионидные тельца высевали на покровные стёкла, покрытые желатином, и культивировали в среде DMEM/F12 с 10 % эмбриональной сывороткой в течение 2-х недель. Для выявления дифференцированных клеток – производных трёх зародышевых листков, проводили иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркерных белков. Выросшие колонии были окрашены антителами против маркеров дифференцировки в энтодерму (α -фетопротейн), мезодерму (мышечная изоформа α -актина) и эктодерму (виментин, нестин).

2.6. Получение и культивирование ЭМСК

Менструальную кровь, содержащую фрагменты эндометрия, получали от женщин, проходивших подготовку к ЭКО в Международном центре репродуктивной медицины (г. Санкт-Петербург). Забор менструальной крови проводили на 2-й день менструального цикла. Кровь собирали аспиратором Iras MVA plus с насадкой диаметром 4 мм, введенным в цервикальный канал до внутреннего зева. Полученный образец переносили в фосфатно-солевой буфер (PBS; Sigma, США) с добавлением цитрата натрия и 10 % смеси антибиотика и антимикотика (смесь пенициллина, стрептомицина и амфотерицина) (Sigma, США) и центрифугировали при 1750 об/мин в течение 7 мин. Осадок, содержащий фрагменты эндометрия, ресуспензировали в PBS с добавлением 10 % смеси антибиотика и антимикотика и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. Затем эндометриально-менструальные клетки осаждали центрифугированием и переносили в 6-сантиметровые чашки Петри (Corning, США). Для получения адгезивной клеточной популяции клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % бычьей эмбриональной сыворотки (FBS; HyClone, США), 1% смеси антибиотика и антимикотика и 1 % глутамакса. Клетки культивировали в течение 3—7 сут. За это время среду меняли несколько раз. Полученную адгезивную популяцию клеток (4—9 млн) пересевали 2 раза в нед с помощью 0.05 %-ного раствора трипсина и EDTA (Invitrogen, США) в соотношении 1 : 4 до 5-го пассажа, далее в соотношении 1 : 3 и замораживали. Для культивирования использовали флаконы T25 и T75 (Fisher Scientific, США). Плотность при пересеве составляла 14—15 тыс. клеток/см².

Для определения эффективности клонирования клетки сеяли в плотности 5 и 10 клеток/см² в 60 мм чашки Петри и через 14—20 дней подсчитывали количество выросших клонов. Для визуализации клонов использовали краситель Гимза (BDH, Англия).

Эффективность клонирования определяли по отношению числа клонов к числу посеянных клеток и умножали на 100.

2.7. Криоконсервация и размораживание эМСК

эМСК, открепленные с помощью 0.05 %-ного раствора трипсина и EDTA, помещали в пробирку с культуральной средой и центрифугировали со скоростью 1750 об/мин в течение 5 мин. Клетки, ресуспензированные в растворе 90 %-ной бычьей эмбриональной сыворотки, содержащей 10 % DMSO (Sigma, США), переносили в криовials (Nunc, США) и замораживали со скоростью 1 °C/мин с последующим хранением в жидком азоте. При размораживании ампулу с клетками быстро нагревали в водяной бане при 37 °C, по каплям добавляли теплую ростовую среду, переносили в пробирку и центрифугировали при 1750 об/мин в течение 5 мин. Отмытые от DMSO клетки сеяли во флаконы.

2.8. Построение кривых клеточного роста

Пролиферативную активность клеток оценивали как функцию их количества от времени. 100 x 10³ клеток культивировали на чашках Петри d = 35 мм и проводили подсчет в камере Горяева через каждые 24 часа в течение 5 суток. Измерения проводили в трехкратной повторности. Среднее время удвоения популяции Td считали по формуле $Td = \frac{t \ln 2}{\ln \frac{N_t}{N_0}}$, где t – время прироста популяции, N_t – количество клеток через время t, N₀ – исходное количество клеток.

2.9. Температурная обработка клеток

Клетки прогревали в водной бане в 3-х см чашках, с добавлением 1.8 мл среды при 45 °C в течение 10 и 30 мин.

2.10. Проточная цитофотометрия

2.10.1. Иммунофенотипический анализ

Клеточная суспензия эМСК была получена при помощи 0.05 %-ного трипсина и EDTA. Клетки (1млн/мл) ресуспензировали в растворе PBS, содержащем 5 % FBS. В отдельные пробирки отбирали 30 мкл суспензии, добавляли к каждой из них по 3 мкл антител и инкубировали при +4 °C в течение 30 мин. Далее пробы доводили до оптимального для анализа объема 1—0.4 мл FACS буфером (PBS с 1 % BSA и 0.05 % азида натрия). Для анализа использовали антитела к CD9, CD11a, CD13, CD34, CD44, CD45, CD105, CD117,

CD146, (Beckman Coulter, США), CD90, HLA-2 (Chemicon, США), CD73, CD29 (BD BioSciences, США), конъюгированные с фикоэритрином (PE) или флуоресцеина изотиоцианатом (FITC). Иммунофенотипический анализ ЭМСК на поверхностные CD-маркеры проводили с использованием проточного цитофотометра Epics XL (Beckman Coulter, США).

2.10.2. Анализ клеточного цикла

Клеточный монослой дезинтегрировали раствором 0.05 % трипсина и EDTA, клетки ресуспендировали в растворе PBS, пермеабелизовали раствором сапонина (Fluka) 250 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре, затем добавляли РНКазу А (250 мкг/мл), йодид пропидия (50 мкг/мл) и инкубировали ещё 30 мин при комнатной температуре. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили, используя цитофотометр Epics XL (Beckman Coulter, США). Доля клеток, находящихся в разных фазах цикла, определялась при помощи программного обеспечения WinList и ModFit LT.

2.11. Анализ апоптоза

Для выявления фракции апоптотических клеток использовали комбинированную окраску йодистым пропидием (PI) и аннексином V (AnV), конъюгированным с FITC (BD Pharmingen). Единичная клеточная суспензия была получена при помощи 0.05 % трипсина и EDTA. Клетки (1млн/мл) ресуспендировали в аннексин-связывающем буфере (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂). Окрашивание осуществлялось согласно инструкции производителя: к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 5 мкл AnV–FITC и PI (10 мкг/мл), суспензию тщательно перемешивали и инкубировали 15 минут при комнатной температуре в темноте, затем добавляли 400 мкл аннексин-связывающего буфера. Клетки анализировали при помощи проточного цитофотометра Epics XL (Beckman Coulter, США). Количество апоптотических клеток определяли как долю клеток, окрашенных аннексином V, но не окрашенных йодистым пропидием (фракция AnV⁺/PI⁻), выраженную в % от общего количества анализируемых клеток. Детекцию клеток с конденсированными или фрагментированными ядрами, окрашенными DAPI, осуществляли при помощи конфокального микроскопа в трех независимых экспериментах. Анализировали не менее 500 клеток в разных полях зрения.

2.12. Кариотипирование

Приготовление препаратов метафазных хромосом проводили по обычной схеме. Для накопления клеток в стадии метафазы в клеточную культуру в логарифмической фазе роста добавляли стандартный р-р демиколцина (Sigma, США) в конечной концентрации 0.01–0.02 мкг/мл среды. Для снятия клеток использовали смесь 0.05 % трипсина с EDTA, в качестве гипотонического р-ра – 0.56 % KCl. Время гипотонической обработки и время инкубации клеток в присутствии митостатика подбирали экспериментально. Клетки фиксировали стандартным способом в трех сменах свежеприготовленной смеси метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1). Для дифференциальной окраски хромосом на G-диски красителем Гимза их предварительно обрабатывали 0.25 %-ным р-ром трипсина. Суспензию фиксированных клеток раскапывали на влажные, охлажденные предметные стекла. Высушивали препараты при комнатной температуре. Анализ метафазных пластинок производили с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия) при увеличениях 16х и 100х. Идентифицировали хромосомы в соответствии со стандартной номенклатурой (Yunis, 1980; Мамаева, 2002). Частоту встречаемости в популяции полиплоидных клеток оценивали при визуальном анализе под микроскопом не менее 200 метафазных пластинок.

2.13. Иммуноцитохимия

Культуру чЭСК, эМСК и чЭСК-ДИФ выращивали в стандартных условиях на покровных стеклах. Клетки фиксировали 4 % раствором параформальдегида (15 мин), отмывали раствором PBS (4х4 мин.), затем пермеабелизовали 0.1 % раствором Тритона X-100 (15 мин). Блокирование неспецифического связывания антител проводили в 1 %-ном растворе BSA (Sigma) 30 мин. Обрабатывали первичными антителами в 1 %-ном растворе BSA 45 мин, производили отмывку клеток в растворе PBS, содержащем 0.05 % Tween 20 (4х4 мин). После этого клетки обрабатывали вторичными антителами и помещали в защищенное от света место (45 мин.). Ядра клеток подкрашивали DAPI. Все процедуры проводили при комнатной температуре. Локализацию поверхностных антигенов проводили на живых клетках. Для этого клетки обрабатывали первичными антителами в течение 60 мин при температуре 4° С и после этого фиксировали 4 %-ным раствором параформальдегида. Все последующие процедуры проводились так же, как и с другими антителами. Покровные стекла заключали в глицериновый буфер с 1 % пропилгалата. Полученные препараты анализировали с помощью конфокальных лазерных люминесцентных микроскопов Leica TCS CL (Германия) (объективы 63х, 40х и 10х) и Leica TCS SP5 (Германия) (объективы 60х/1,32 и 40х/1,0). В работе использовались лазеры с длиной волны 405, 488 и 543 нм. В работе использовали специфические мышинные моноклональные антитела против Hsp70*, Ki-

67 (Abcam), Oct4 (Santa Cruz), SSEA-4 (Chemicon), ABCG2 (Abcam), muscle α -actinin (Sigma), vimentin (Chemicon), α -fetoprotein (Sigma), кроличьи моноклональные антитела против Hsc70 (Abcam), против NF-H (Abcam, США), Neun (Millipore, США) в соотношении 1:100, β -III-тубулина в разведении 1 : 1000 (Chemicon, США) и кроличьи поликлональные антитела против β -III-tubulin (Sigma). В качестве вторых антител применяли козы антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с Dylight 488 (Jackson ImmunoResearch), овечьи антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с Cy3 (Sigma), и козы антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с Cy2 (Jackson ImmunoResearch).

* Антитела любезно предоставлены Б.А. Маргулисом (Lasunskaja et al., 2010).

2.14. Определение активности щелочной фосфатазы

Активность щелочной фосфатазы в недифференцированных стволовых клетках определяли с использованием набора реагентов «Sigma Diagnostics Alkaline Phosphatase (AP) leukocyte» согласно протоколу фирм-производителей.

2.15. Направленная адипогенная, остеогенная и нейральная дифференцировка

2.15.1. Адипогенная дифференцировка

Клетки ЭМСК (2×10^4 кл/см²) высевали в чашки Петри, покрытые 0.1 %-ным желатином, в среде DMEM/F12, содержащей 10 % FBS, 1 % глутамакса, 1 % смеси пенициллина и стрептомицина. После образования субмонослоя (90 % конфлюентности) в ростовую среду добавляли следующие факторы: 1 мкМ дексаметазона (Sigma, США), 250 мкМ изобутилметилксантина (IBMX; Sigma, США), 10 мкг/мл рекомбинантного инсулина человека (Sigma, США) и 200 мкМ индометацина (MP Biomedicals). Клетки культивировали в данной среде в течение 5 недель. Дифференцировочную среду меняли через 2–3 дня. Для выявления клеток, содержащих жировые капли, использовали окрашивание красителем красным масляным (Oil Red Sigma, США). С этой целью чашки с клетками ополаскивали PBS, фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 1 часа при комнатной температуре и окрашивали в течение 15 минут при комнатной температуре в растворе Oil Red на изопропанол, разведённом дистиллированной водой в соотношении 3:2. Окрашенные клетки обильно промывали дистиллированной водой в течение 2 минут, ядра подкрашивали гематоксилином (Sigma, США) и снова проводили несколько отмывок водой. Клетки анализировали при 200-кратном увеличении в фазовом контрасте при помощи микроскопа Nikon и фотографировали, используя цифровую камеру Sony. Контрольные

клетки культивировали в той же ростовой среде, но без добавления дифференцирующих факторов.

2.15.2. Остеогенная дифференцировка

Клетки эМСК (2×10^4 кл/см²) высевали в чашки Петри, покрытые 0.1%-ным желатином. После образования монослоя (100 % конфлюентности) в ростовую среду добавляли следующие дифференцировочные факторы: 100 нМ дексаметазона, 10 мМ бета-глицерофосфата (Sigma, США), 100мкг/мл аскорбиновая кислота-2- фосфата (Sigma, США),. Клетки дифференцировали 4 недели со сменой среды каждые 2–3сут. Клетки, содержащие кальциевые преципитаты, отмывали PBS, фиксировали 70 %-ным ледяным этанолом 30 мин при комнатной температуре с последующей 30 минутной окраской ализариновым красным (Sigma, США), pH которого доводили до 4.1-4,2 с помощью 1 % гидроксида аммония. Визуализацию клеток проводили при 200-кратном увеличении с помощью микроскопа Nikon и фотографировали, используя цифровую камеру Sony. Контрольные клетки культивировали одновременно с направленно-дифференцированными в той же ростовой среде, но без добавления стимулирующих факторов.

2.15.3. Нейральная дифференцировка

эМСК в количестве 100 тыс. клеток высевали в 35 мм чашки Петри с покровными стеклами, покрытые матригелем (BD Bioscience, США). На следующий день ростовую среду в чашках меняли на нейральную бессывороточную среду (Neurobasal, Gibco, США) с добавлением 2%-ного реагента B27(B27 supplement; Gibco, США), 1%-ного реагента N2(N2 supplement; Gibco, США), 25нг/мл рекомбинантного основного фактора роста фибробластов человека (bFGF; BD Bioscience, США) и 25 нг/мл рекомбинантного эпидермального фактора роста человека (Sigma). Через 2 дня без смены среды в нее добавляли 1мкМ ретиноевой кислоты (RA; Sigma, США) и 0.25мМ изобутил-метилксантина (IBMX; Sigma, США) и 1 мМ дибутирил-цАМФ (dbc AMP, Sigma, США). После 7 дней нейральной дифференцировки, клетки были проанализированы методом иммуноцитохимии.

2.16. Анализ экспрессии белков методом иммуноблоттинга

2.16.1. Приготовление проб для электрофоретического разделения белков

Для выделения белковых лизатов контрольные и обработанные клетки помещали на лед, и все дальнейшие процедуры проводили при +4 °С. Клетки промывали три раза холодным PBS. Тотальный лизат получали добавлением в чашки 0.1 мл лизирующего буфера, содержащего 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA,

10%-ный глицерин, 1%-ный тритон X-100, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ NaF, 0.5 мМ PMSF, коктейль протеазных ингибиторов (Sigma, P8340, в разведении 1:500). Клетки инкубировали в течение 10 мин при +4 °С, затем соскребали с чашек и центрифугировали в течение 15 мин при 15000g. 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 Бредфорда (Bradford, 1976), используя овальбумин для построения калибровочной кривой.

2.16.2. Электрофорез и иммуноблоттинг

Электрофоретическое разделение белков проводили методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле в модификации Лэммли (Laemmli, 1970). Концентрирующий гель (pH 6.8) содержал 4 % полиакриламида, разделяющий (pH 8.8) – 12 %. Разделение белков проводили в блоках геля 90x60x1 мм при силе тока 30 мА на пластину в течение 2 ч. Разделенные в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Электроперенос проводили при силе тока 35 мА в течение 6 ч в буфере для мокрого переноса (48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 0,037 %-ный SDS, 20 %-ный метанол). Для визуализации белковых полос использовали Ponceau S (Sigma, США). Иммуноблоттинг проводили в соответствии с методикой ECL Western Blotting protocols (Amersham). Мембрану промывали TTBS (20 мМ Трис-HCl (pH 7.6), 150 мМ NaCl, 0.1 %-ный Tween -20), после чего инкубировали в 5 %-ном растворе сухого обезжиренного молока в TTBS в течение часа при комнатной температуре, затем в растворе первичных антител в 5% BSA в TTBS в течение ночи при +4 °С. Все последующие процедуры осуществляли при комнатной температуре. По окончании инкубации с первичными антителами мембрану промывали TTBS (3 раза по 5 мин), затем помещали на 1 час в раствор вторичных антител в 5 %-ном растворе молока в TTBS, после чего промывали мембрану, как описано выше. Для детекции пероксидазной активности конъюгатов GAR-HRP использовали реакцию усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham). Нитроцеллюлозную мембрану промывали водой и инкубировали в темноте 1 мин в свежеприготовленном растворе ECL. Хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция). Для специфического выявления белков использовали моноклональные кроличьи антитела против p21^{Waf1/Cip1} (12D1, #2947) (Cell Signaling, США), против глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH, clone 14C10, #2118) (Cell Signaling, США), мышинные моноклональные против hsp70 (Lasunskaja et al., 1997), кроличьи моноклональные к hsc70 (Abcam). В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против

иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (GAR-HRP) (Cell Signaling, США) и козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (GAM-HRP) (Sigma, США). Денситометрию проводили с помощью программы Scion Image, версия 4.0.3.2.

2.17. Анализ генной экспрессии с помощью ОТ-ПЦР

Тотальную РНК выделяли из клеток с помощью системы RNAeasy Micro Kit или RNAeasy Mini Kit (QIAGEN, США) согласно протоколу производителя. Для оценки качества тотальной РНК проводили электрофорез образцов в 2 %-ном агарозном геле с добавлением 0.5 мкг/мл бромистого этидия (Sigma, США). Визуализацию 28S и 18S субъединиц проводили в ультрафиолетовом свете (302 нм) при помощи прибора Transilluminator. Количественное определение концентрации РНК проводилось спектрометром автоматически путем умножения значения поглощения света при 260 нм на коэффициент 40.

Синтез кДНК проводили с использованием 1— 0.5 мкг тотальной РНК при помощи системы RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) в соответствии с рекомендациями производителя. Все манипуляции с РНК проводили на льду. В реакции использовались восемнадцатимерные или гексомерные случайные олигонуклеотидные праймеры. При использовании восемнадцатимерных олигонуклеотидных праймеров перед добавлением обратной транскриптазы, пробы тщательно перемешивали и переносили на 15 мин в 37 °С термостат, а в случае использования гексомерных олигонуклеотидных праймеров, оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Обратную транскрипцию проводили в водной бане при 42 °С в течение 60 мин. Реакцию останавливали 10 мин нагреванием образцов при 70 °С. Десятая часть кДНК каждой линии была амплифицирована при помощи 0.5 единиц ДНК полимеразы (Fermentas, Литва), с использованием специфичных олигонуклеотидных праймеров (**Таблица 3**), на амплификаторе Cyclo Temp (СТМ, Россия) по следующей программе: горячий старт – денатурация, 93 °С в течение 3 мин, отжиг праймеров, 55—70 °С в течение 2 мин, удлинение цепи, 72 °С в течение 1 мин 30 с; затем 26—40 циклов: денатурация, 93 °С в течение 45 с; отжиг праймеров, 55—70 °С в течение 1 мин; удлинение цепи, 72 °С в течение 1 мин 30 с; завершающее удлинение цепи – 72 °С в течение 10 мин.). В качестве количественного и качественного контроля кДНК использовали олигонуклеотидные праймеры актина. Электрофорез амплифицированного продукта проводили в 2%-ном агарозном геле, содержащем буфер ТАЕ с бромистым этидием. В качестве маркера молекулярной массы использовали 1000 или 100 Kb DNA ladder (Gibco, США). Визуализацию проводили в ультрафиолетовом свете (302 нм) при помощи

прибора Transilluminator, регистрируя изображения цифровой фотокамерой Canon. Денситометрию проводили с помощью программы Scion Image версия, 4.0.3.2.

Таблица 3. Последовательности специфических праймеров и условия проведения ОТ-ПЦР

Ген	Последовательность праймеров	Темп. отжига (°C)	Размер PCR продукта (п.н.)	№ в Ген банке
hsp 27	s 5' cgcgctcagccggcaactcag 3' as 5' aggggtgggcatccgggctaagg 3'	64	419	NM_001540.3
hsp70	s 5' atcggccaagaaccaggtg 3' as 5' gcgctgcgagtcgtgaagt 3'	61	307	NM_005345.5
hsc 70	s 5' atccccaagattcagaagct 3' as 5' ttgatgaggacagtcata 3'	63	218	NM_153201.1
hsp90	s 5' aatcggaagaagctttcaga 3' as 5' gtgcttgtagacaatacagca 3'	55	446	NM_005348.3
oct4	s 5'cgaccatctgccgctttgag 3' as 5'ccccctgtccccattccta 3'	60	577	NM_001173531.1
rex 1	s 5'gcgtagcacaataaagtcaga3' as 5'cagcatcctaaacagctcgcagaat 3'	56	306	NM_174900.3
nanog	s 5' caaaggcaaacaccact 3' as 5'ctggatgttctgggtctggt 3'	60	427	NM_024865.2
abcg-2	s 5'agttccatggcactggccata 3' as 5'tcaggtaggcaattgtgaagg 3'	62	379	NM_001257386.1
p21	s 5'ccacatggtcttctctgctg 3' as 5' gatgtccgtcagaaccatg 3'	55	316	NM_001220778.1
gapdh	s 5'gctcagacacatggggaaggt 3' as 5'gtggtgcaggaggcattgctga 3'	67	474	NM_002046.4
actin	s 5' gccgagcgggaaatcgtgcgt 3' as 5' cgggtggacgatggaggggccg 3'	70	506	NM_001101.3

Actin – Homo sapiens actin, beta (ACTB), mRNA; p21 – Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A); Hsp 27 – Homo sapiens heat shock 27kDa protein 1 (HSPB1); Hsp70 – Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A); Hsc 70 – Homo sapiens heat shock 70kDa protein 8 (HSPA8); Hsp90 – Homo sapiens heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 (HSP90AA1). oct4 – Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1); rex 1 – Homo sapiens ZFP42 zinc finger protein (ZFP42); nanog – Homo sapiens Nanog homeobox (NANOG); gapdh – Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); abcg-2 – Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (ABCG2).

2.18. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента, приняв доверительную вероятность p равной 0,95. Различия считали достоверными при t экспериментальном большем, чем стандартное значение t-критерия Стьюдента. Вычисления производили по формуле: $t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$, где M_1 и M_2 – средние арифметические, m_1 и m_2 – квадратичные ошибки среднего арифметического. Квадратичную ошибку среднего арифметического (m) вычисляли по формуле: $m = \pm \frac{\delta}{\sqrt{n}}$, где δ – среднеквадратичное отклонение ($\delta = \sqrt{\frac{\sum(x - M)^2}{n - 1}}$), где n – число наблюдений, $(x - M)^2$ – возведённая в квадрат разница между каждым наблюдаемым вариантом и средней арифметической. При расчетах использовали Автоматический расчет t-критерия Стьюдента (<http://www.psychol-ok.ru/statistics/student/>) и программу Excel (Microsoft office).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Клеточные линии, использованные в работе

3.1.1. Характеристика клеточной линии чЭСК С910.

Линия чЭСК С910 получена из бластоцисты человека с развитой внутренней клеточной массой (Кожухарова и др., 2009). Клетки обладают типичной для ЭСК морфологией и способны размножаться в культуре в течение длительного времени. Для поддержания полученной линии в качестве фидера изначально использовались обработанные митомицином С клетки мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ).

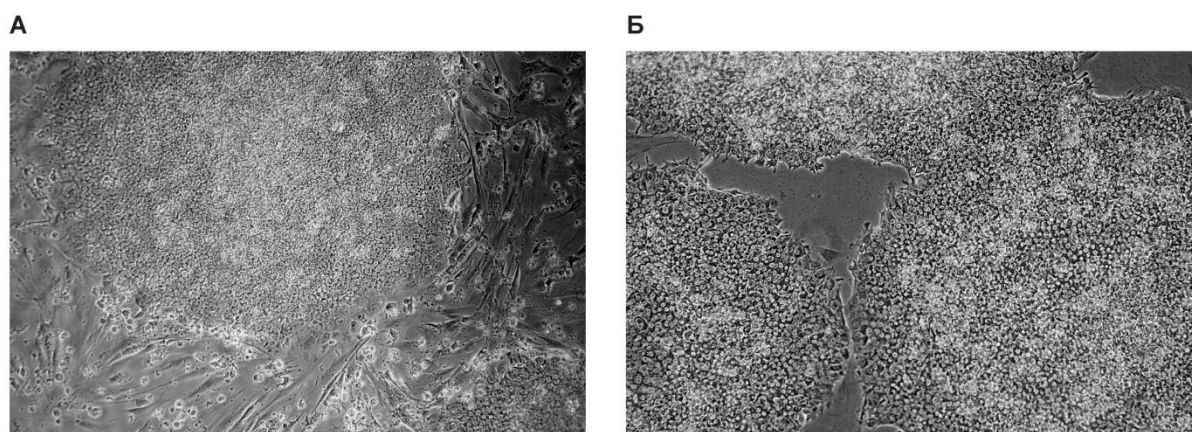


Рис.11. Морфология чЭСК С910

(А) чЭСК С910 на фидерном слое (эМСК человека, инактивированные митомицином С).
(Б) чЭСК С910 на матригеле. Об. 10х.

В дальнейшем для экспансии линии в качестве фидерного слоя использовались инактивированные эндометриальные МСК человека (**Рис. 11А**). Для проведения всех экспериментов были использованы чЭСК С910 на 12—24 пассажах, выращенные на матригеле (**Рис. 11Б**). Клетки чЭСК С910 обладают типичной для ЭСК морфологией (**Рис. 11**), формируют колонии и способны размножаться в культуре в течение длительного времени. Время удвоения популяции составляет 28 часов. Анализ линии чЭСК 910 методами иммуноцитохимии, ОТ-ПЦР и цитохимии выявил экспрессию маркеров плюрипотентности Oct-4, Nanog, SSEA-4, Rex1 (**Рис. 12А, В**), характерных для ЭСК человека, а также высокую активность щелочной фосфатазы (**Рис. 12Б**), которая позволяет оценить не только плюрипотентность растущих колоний, но и гетерогенность всей популяции.

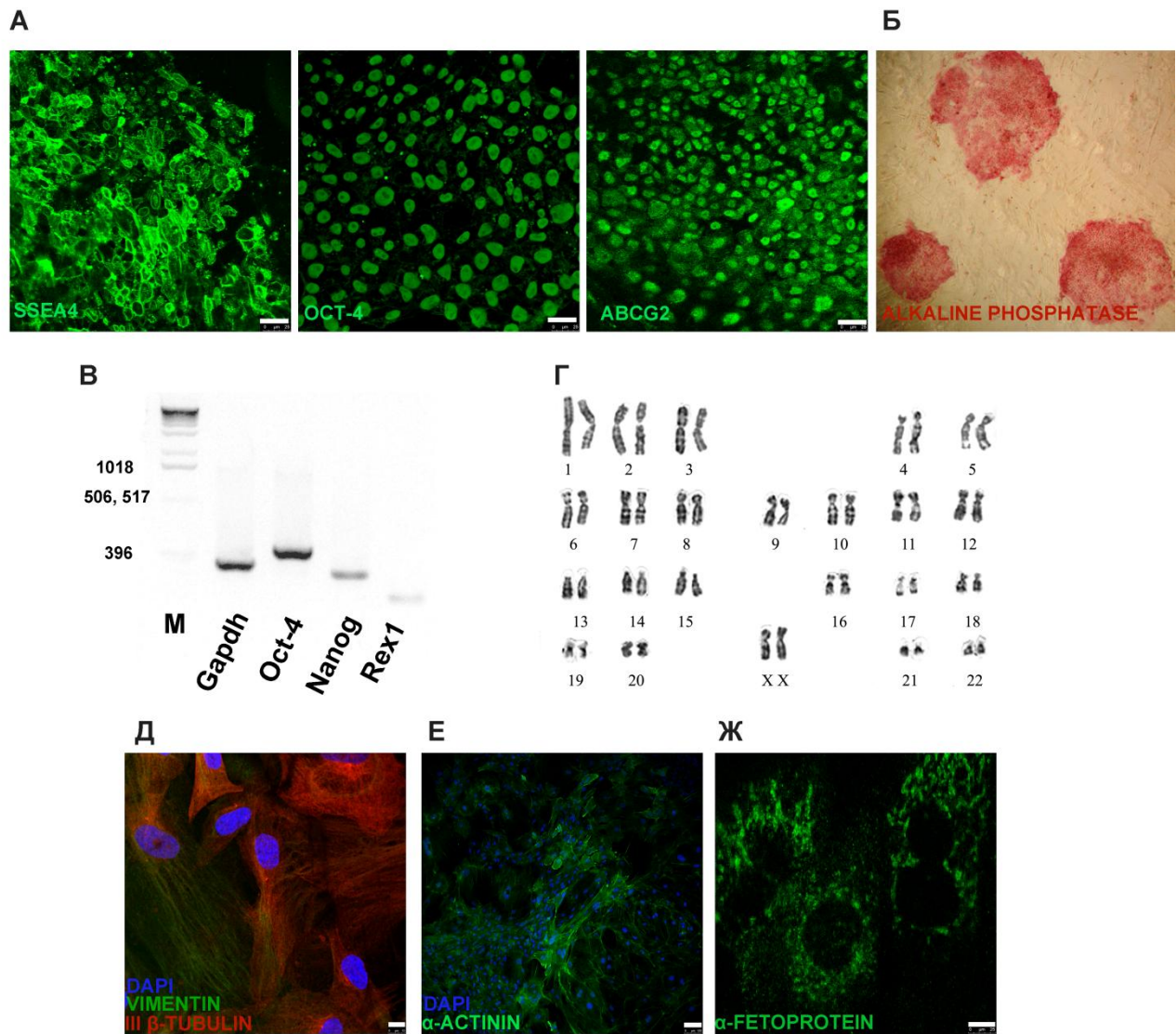


Рис. 12. Клеточная линия чЭСК С910 обладает всеми типичными признаками плюрипотентности

(А) Иммуноцитохимический анализ маркеров плюрипотентности линии ч ЭСК С910. Масштабная линейка 25 мкм. (Б) Окраска на щелочную фосфатазу (alkaline phosphatase). Об. 10х. (В) ОТ-ПЦР анализ показал наличие маркеров плюрипотентности (oct-4, nanog, SSEA-4, Rex1) в чЭСК С910. (Г) Кариотип клеток линии чЭСК С910 ($2n = 46 XX$). Об. 40х. (Д, Е, Ж) Дифференцировка чЭСК С910 в производные трёх зародышевых листков: эктодерму (III β -тубулин), мезодерму (виментин и мышечный α -актинин) и энтодерму (α -фетопротеин). Масштабная линейка: Д-10 мкм, Е-100 мкм, Ж-25 мкм. М-маркер молекулярного веса. 1018, 506,517, 396 — количество пар оснований

Показано, что чЭСК могут спонтанно дифференцироваться в клетки трёх зародышевых листков – эктодерму, мезодерму и энтодерму, и направленно дифференцироваться в дофаминовые нейроны (Кожухарова и др. 2009). Таким образом, линии чЭСК C910 присущи все типичные свойства ЭСК: самообновление, экспрессия маркеров плюрипотентности, диплоидный кариотип (**Рис. 12Г**) и способность дифференцироваться в производные трёх зародышевых листков (**Рис. 12Д, Е, Ж**).

3.1.2. Характеристика фибробластоподобных клеток (чЭСК-ДИФ)

Дифференцировку чЭСК индуцировали получением эмбриоидных тел, как описано ранее (Кожухарова и др., 2010). Дифференцированные производные чЭСК имели диплоидное число хромосом (**Рис. 13А**) и ограниченное время жизни в культуре. Они могли нормально размножаться *in vitro* на протяжении 20—23 пассажей (30—35 удвоений популяции), после чего переставали делиться и погибали. На ранних пассажах клеточная культура активно пролиферировала (**Рис. 13Б**), но постепенно деление замедлялось, и клетки подвергались репликативному старению. Этот процесс сопровождался необратимой остановкой клеточного цикла, изменением клеточной морфологии (преобладание уплощенных клеток увеличенного размера) и усилением активности β -галактозидазы, связанной со старением (SA- β -Gal) (**Рис. 13В, Г**).

3.1.3. Характеристика МСК человека, полученных из десквамированного эндометрия менструальной крови (эМСК)

Линии эМСК получены в институте Цитологии РАН и подробно описаны в работе Земелько и др. (Земелько и др., 2011). Полученные линии были представлены адгезивными, однородными, морфологически сходными с фибробластами клетками (**Рис. 14, А**). Они характеризуются высоким уровнем пролиферации (время удвоения составляет 26—27 ч) (**Рис. 14Б**) и высокой эффективностью клонирования (более 60 %). В процессе культивирования *in vitro* клетки проходят более 45 удвоений популяции, не подвергаются трансформации и сохраняют диплоидный кариотип (Домнина и др., 2013). Для фенотипирования эМСК в качестве позитивных маркеров МСК были выбраны следующие поверхностные антигены: молекулы адгезии – тетраспан CD9, миелоидный маркер – аминопептидаза CD13, поздний маркер активации Т-клеток – β 1-интегрин CD29, фагоцитарный гликопротеин Pgp-1 CD44, экто-5'-нуклеотидаза CD73, маркер экстрацеллюлярного матрикса Thy1 мембранный гликопротеин CD90, и рецептор трансформирующего фактора роста β CD105 (эндоглин). В качестве негативных были

выбраны маркеры гемопоэтических клеток: поверхностный антиген миелоидных клеток и естественных киллеров α M-интегрин CD11b, антиген В-лимфоцитов CD19, маркер

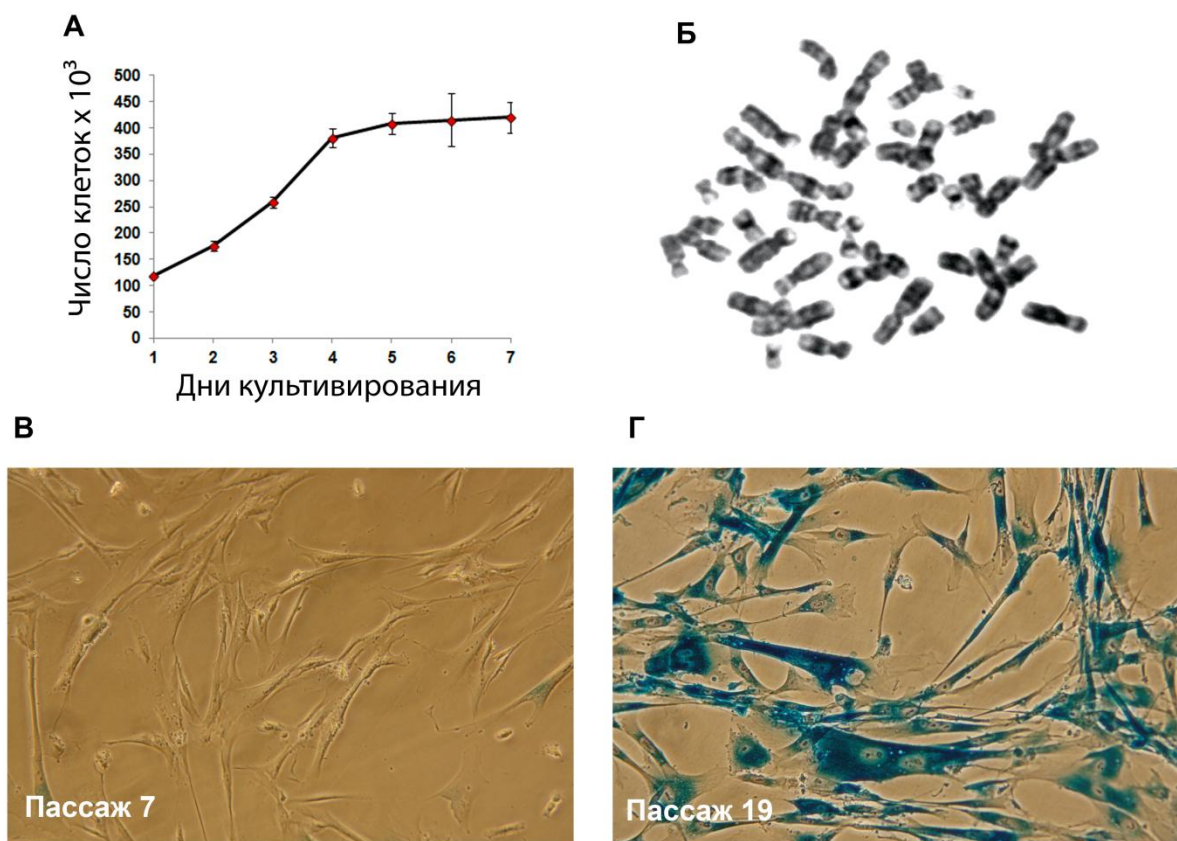


Рис. 13. Кривая клеточного роста и динамика старения чЭСК-ДИФ

(А) Кривая клеточного роста чЭСК-ДИФ. Количество клеток подсчитывалась в трёх независимых экспериментах. (Б) Дифференциальная окраска метафазных хромосом на G-диски ($2n = 46 XX$). (В, Г) Экспрессия β -галактозидазы, ассоциированной со старением, на разных пассажах культивирования чЭСК-ДИФ. Об. 20х.

ранних кроветворных предшественников CD34, общий лейкоцитарный антиген CD45, поверхностный маркер гемопоэтических предшественников костного мозга CD117 и антигены главного комплекса гистосовместимости HLA-DR (класса II). эМСК характеризуются позитивной экспрессией поверхностных маркеров CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 и CD105, а так же отсутствием экспрессии маркеров CD19, CD34, CD45, CD117, и HLA-DR (класса II), что подтверждает их мезенхимное, а не гемопоэтическое происхождение (**Рис. 14В**). Необходимо отметить, что отсутствие экспрессии HLA-DR и

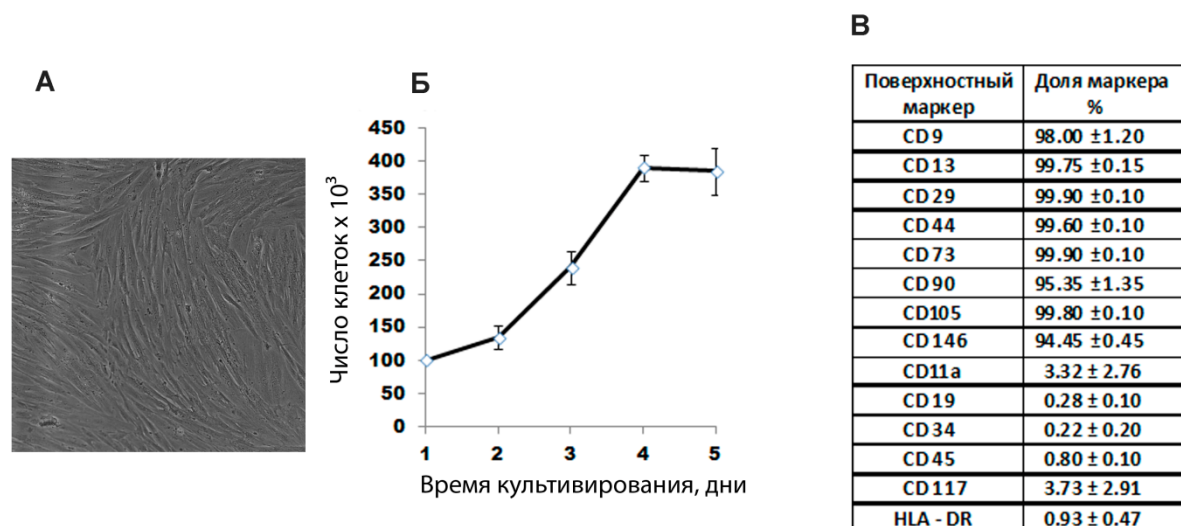


Рис. 14. Характеристика клеток линии эМСК 2304

(А) Рост клеток в культуре. Об. 10х. (Б) Кривая клеточного роста. Количество клеток подсчитывалась в трёх независимых экспериментах с двукратными повторами. (В) Подтверждение мезенхимного происхождения эМСК при помощи поверхностных маркеров. Анализ проводился при помощи проточной цитометрии в трёх независимых экспериментах.

иммуносупрессорные свойства эМСК делают их пригодными для аллогенной трансплантации без риска отторжения тканей. эМСК являются мультипотентными и могут направленно дифференцироваться в другие типы клеток мезодермы – остеобласты и адипоциты, а также обладают способностью к транс-дифференцировке в нейроноподобные клетки (производные эктодермы). Существует мнение, что дифференцировочная пластичность МСК ослабевает в процессе пассирования. Мы показали, что эМСК сохраняют свою дифференцировочную активность, по крайней мере, до 10 пассажа (**Рис. 15**). Способность к остеогенной дифференцировке была детектирована как на ранних этапах дифференцировки по усилению активности щелочной фосфатазы, так и на более поздних – по окрашиванию минерализованных компонентов матрикса красителем Alizarin Red (**Рис. 15, А**). Адипогенный дифференцировочный потенциал оценивали по появлению в культуре клеток с липидными каплями, которые выявляли с помощью красителя Oil Red (**Рис. 15, Б**).

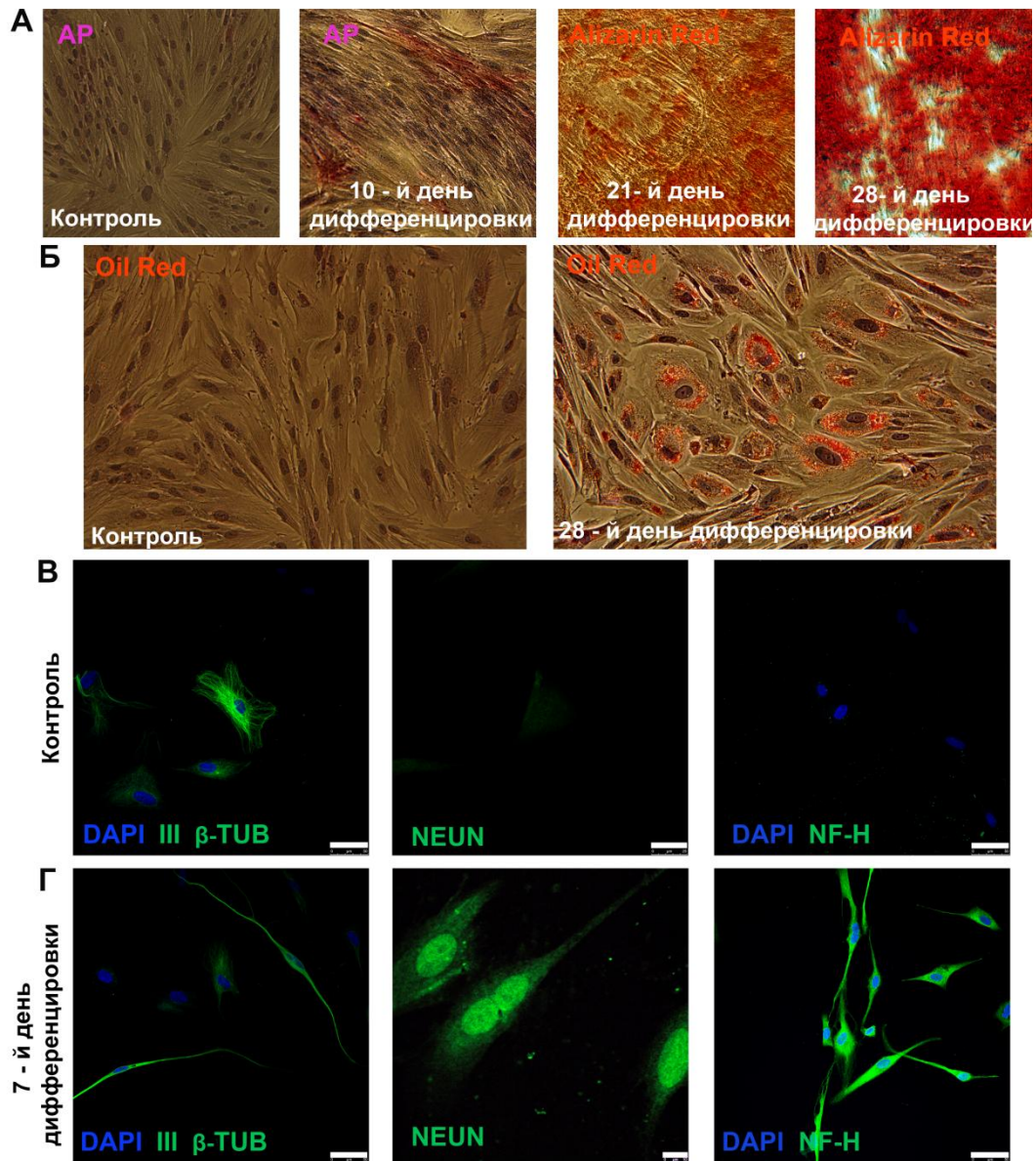


Рис. 15. Дифференцировочная пластичность эМСК

(А) Остеогенная дифференцировка эМСК. AP – щелочная фосфатаза (ранний маркер остеобластов). Alizarin Red окрашивает минеральные компоненты матрикса остеобластов. Ядра подкрашены гематоксилином. Об. 20х. (Б) Адипогенная дифференцировка эМСК. Окраска жировых включений красителем Oil Red. Ядра подкрашены гематоксилином. Об. 20х. (В) эМСК без индукторов дифференцировки. (Г) Нейральная дифференцировка эМСК. Масштабная линейка при окраске антителами против III β -TUB и NF-H 50 мкм, NEUN (В) 25 мкм, NEUN (Г) 10 мкм.

Способность к направленной нейральной дифференцировке оценивали по изменению клеточной морфологии и способности экспрессировать нейрональные маркеры (**Рис. 15, Г**). Контрольные клетки культивировали одновременно с направленно дифференцированными в аналогичной ростовой среде, но без добавления стимулирующих факторов (**Рис. 15, В**). Все перечисленные выше свойства позволяют говорить о сходстве эМСК с МСК костного мозга (Allickson and Xiang, 2012), которые являются наиболее изученными СК взрослого организма. Преимущества МСК, выделенных из менструальной крови заключаются в их доступности и неинвазивном способе изоляции.

3.2. Влияние ТШ на чЭСК и их дифференцированные производные чЭСК-ДИФ

Существует мнение, что ЭСК более устойчивы к действию повреждающих агентов, и экспрессия генов, ответственных за стрессоустойчивость снижается во время дифференцировки. В связи с этим, на начальном этапе нашего исследования мы решили изучить ответную реакцию чЭСК и их дифференцированных производных на тепловой стресс.

3.2.1. Экспрессия белков теплового шока в чЭСК C910 и чЭСК-ДИФ

Было выбрано два режима термического воздействия: 45 °C, 10 мин и 45 °C, 30 мин. В этих условиях были исследованы экспрессия и локализация белков теплового шока (Hsp) в чЭСК и их дифференцированных аналогах. На данном этапе исследования наше внимание было сфокусировано на изучении конститутивной (Hsc70) и индуцибельной (Hsp70) изоформ Hsp, принадлежащих к семейству HSP70, одному из основных семейств белков ТШ. Методами иммуноблоттинга и ОТ-ПЦР было обнаружено, что ТШ незначительно увеличивал экспрессию Hsc70 в обоих типах клеток (**Рис. 16, А**). ТШ резко изменял экспрессию Hsp70 как в чЭСК, так и в их дифференцированных производных. Мягкий тепловой шок (45 °C, 10 мин) увеличивал экспрессию Hsp70 в обоих типах клеток. В условиях более сильного ТШ (45 °C, 30 мин) уровень Hsp70 уменьшался в чЭСК, но продолжал увеличиваться в дифференцированных клетках (**Рис. 16, А, Б**). Мы выявили, что Hsp70 конститутивно экспрессируется в плюрипотентных и дифференцированных клетках. Уровень экспрессии Hsp70 был выше в чЭСК-ДИФ, что хорошо согласуется с данными об увеличении экспрессии фактора ТШ (HSF1) при формировании эмбрионных теллец (Byun et.al., 2013). С другой стороны, имеются данные, что экспрессия Hsp в процессе дифференцировки уменьшается (Saretzki et al., 2004; Prinsloo et al., 2009). Иммунофлюоресцентный анализ пермеабелизованных клеток показал, что характер локализации Hsp70 в исследуемых клетках был таким же, как и в большинстве соматических

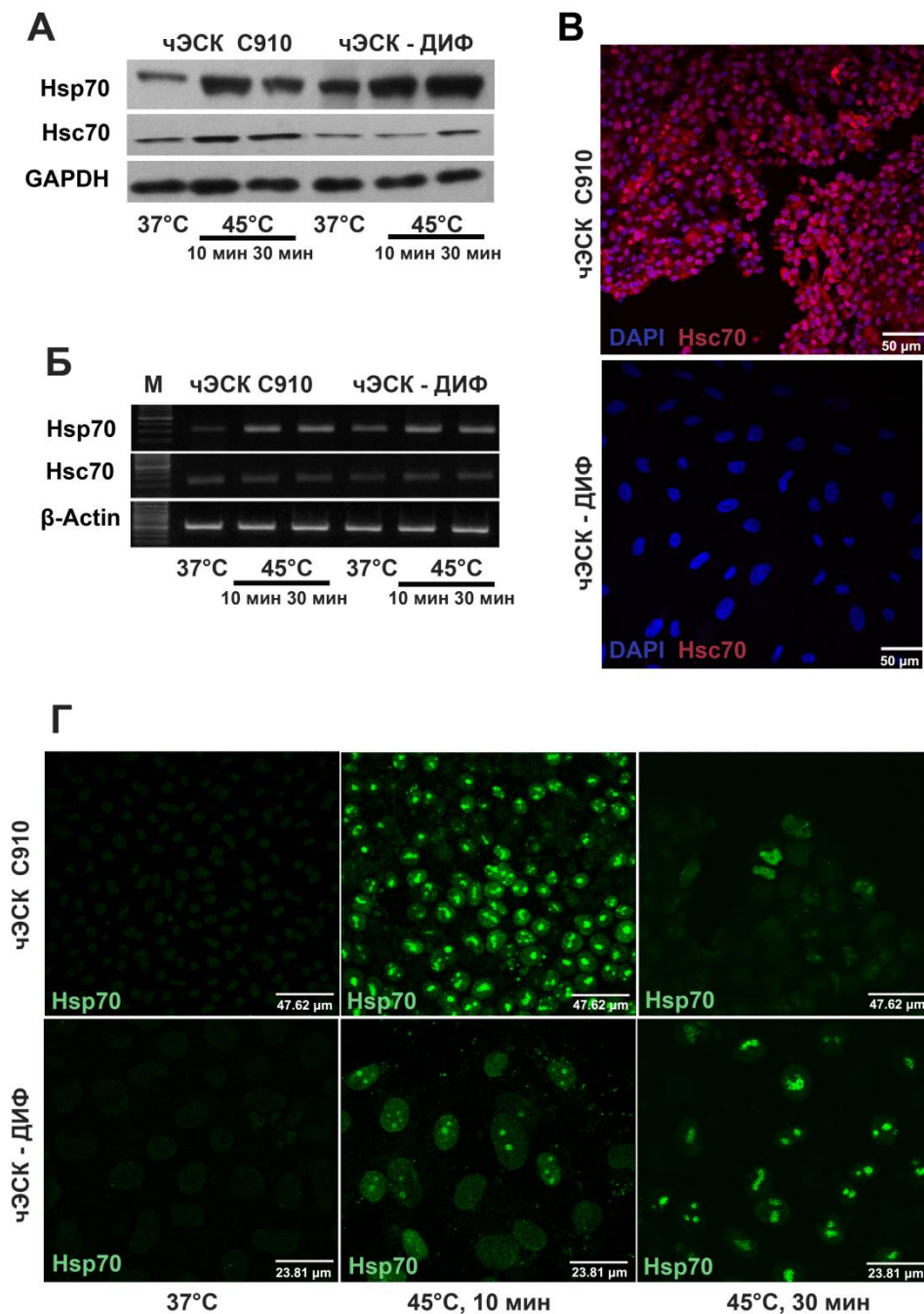


Рис. 16. Экспрессия и локализация белков ТШ в чЭСК и чЭСК-ДИФ

(А, Б) Анализ экспрессии Hsp70 и Hsc70 в чЭСК и чЭСК-ДИФ методами иммуноблоттинга и ОТ-ПЦР. (В) Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии Hsc70 в чЭСК и чЭСК-ДИФ. Эксперимент проводился на живых клетках. Масштабная линейка 50 мкм. (Г) Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии Hsp70 в чЭСК и чЭСК-ДИФ. Масштабная линейка: верхняя панель - 47,62 мкм, нижняя панель - 23,81 мкм.

клеток (**Рис. 16, Г**). Hsp70 слабо детектировался в интактных клетках. После нагрева белок транслоцировался в ядро. Ядерная транслокация Hsp70 в чЭСК была более очевидна при мягком тепловом шоке. При жестком (45 °C, 30 мин) ТШ число Hsp70-положительных клеток значительно уменьшалось в культуре плюрипотентных клеток, но не их дифференцированных производных (**Рис. 16, Г**). **Рис. 16, В** показывает, что на мембране интактных чЭСК, но не чЭСК-ДИФ, экспрессируется конститутивная форма Hsp70 (Hsc70). Эксперимент был проведён на живых клетках. Эти наблюдения согласуются с ранее полученными данными (Son et al., 2005). Было даже предложено рассматривать Hsc70 (HSPA8) в качестве поверхностного клеточного маркера недифференцированных чЭСК. Антитела к Hsp70, которые мы применяли, не выявили присутствия Hsp70 на поверхностной мембране обоих типов клеток. Биологическое значение экспрессии Hsp на поверхности плюрипотентных клеток не ясно, но можно предположить, что они играют важную роль в раннем развитии эмбрионов млекопитающих.

3.2.2. Тепловой шок индуцирует апоптоз в чЭСК, но не в их дифференцированных производных

Апоптотическая гибель была определена методом проточной флуориметрии (комбинированная окраска аннексин V/PI) и при подсчёте клеток с фрагментированными ядрами, окрашенными DAPI (**Рис. 17, Б, В**). Мягкое тепловое воздействие (45 °C, 10 мин) не влияет на жизнеспособность чЭСК и чЭСК-ДИФ. ТШ (45 °C, 30 мин), является сублетальным для плюрипотентных клеток и сокращает число жизнеспособных чЭСК C910 с 88 % до 57.5 %. Жизнеспособность чЭСК-ДИФ при аналогичном воздействии не отличается от жизнеспособности клеток, не подвергавшихся тепловой обработке (**Рис. 17, В**). Необходимо отметить, что чЭСК C910, не подвергшиеся ТШ, имели относительно высокое число аннексин V-положительных и клеток с фрагментированными ядрами (около 10%). Многие исследователи отмечают, что высокий уровень спонтанного апоптоза – типичное явление для чЭСК (Qin H et al. 2007). Так как каспазы обычно вовлечены в регуляцию и реализацию апоптотической программы, мы исследовали экспрессию каспазы-3 в интактных и прогретых недифференцированных и дифференцированных клетках. Было обнаружено, что интактные чЭСК C910 имеют достаточно высокий уровень экспрессии каспазы-3, который после нагрева усиливается. В чЭСК-ДИФ, как в стандартных условиях, так и после нагрева, экспрессия каспазы-3 практически не выявлялась (**Рис. 17, А**).

3.2.3. Сублетальный ТШ (45 °С, 30 мин) вызывает стресс-индуцированное преждевременное старение (SIPS) в чЭСК-ДИФ

Дифференцированные чЭСК не подвергались апоптотической гибели при сублетальном ТШ, и можно было бы предположить, что они более устойчивы к гипертермии, чем плюрипотентные чЭСК. Однако, при построении кривых клеточного роста, нами было установлено, что дифференцированные фибробластоподобные клетки

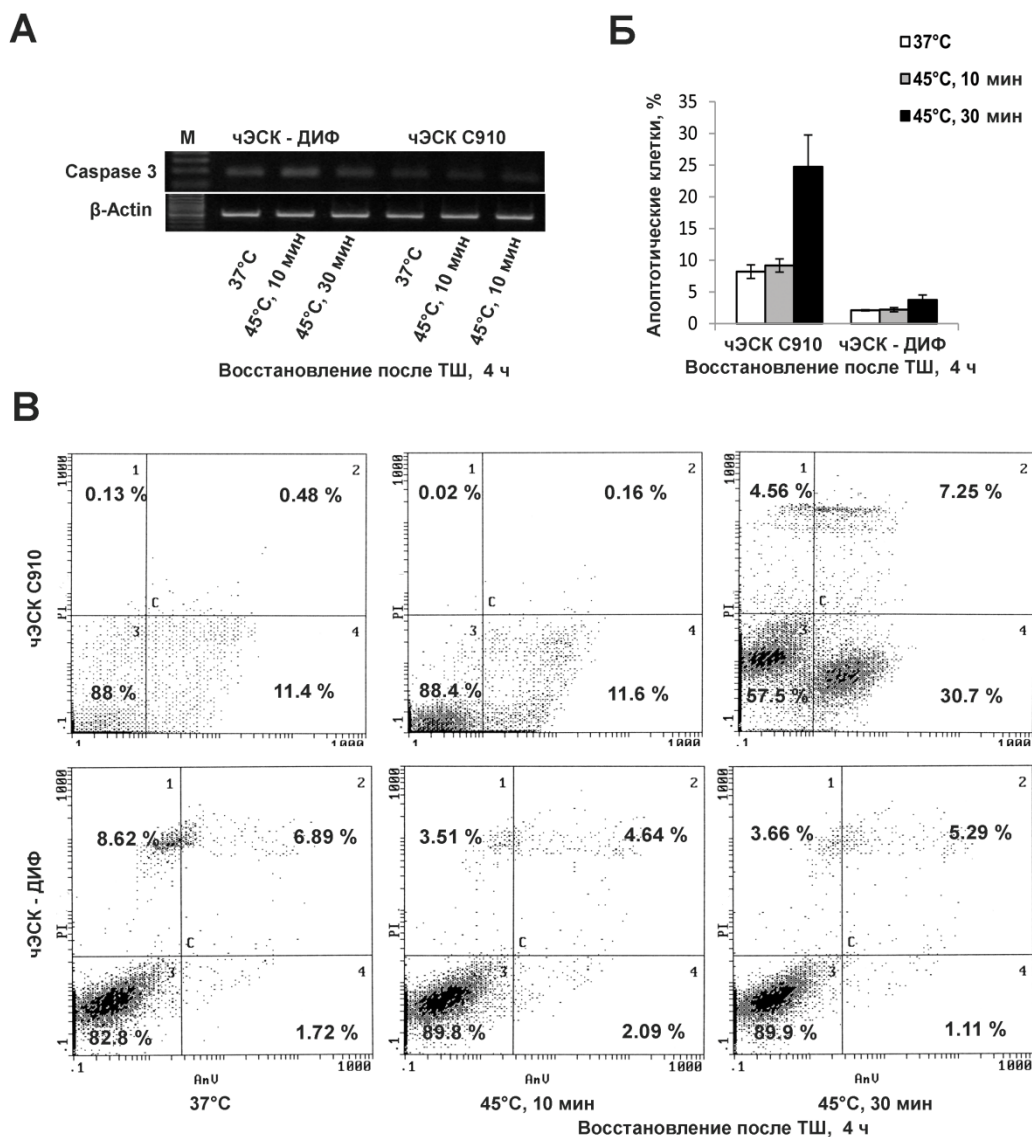


Рис. 17. Сублетальный ТШ индуцирует апоптоз в чЭСК, но не в их дифференцированных производных

(А) Анализ экспрессии каспазы-3 методом ОТ-ПЦР. (Б) Выявление клеток с фрагментированными ядрами, окрашенными DAPI методом цитохимии. (В) Анализ апоптоза методом проточной цитофлуориметрии.

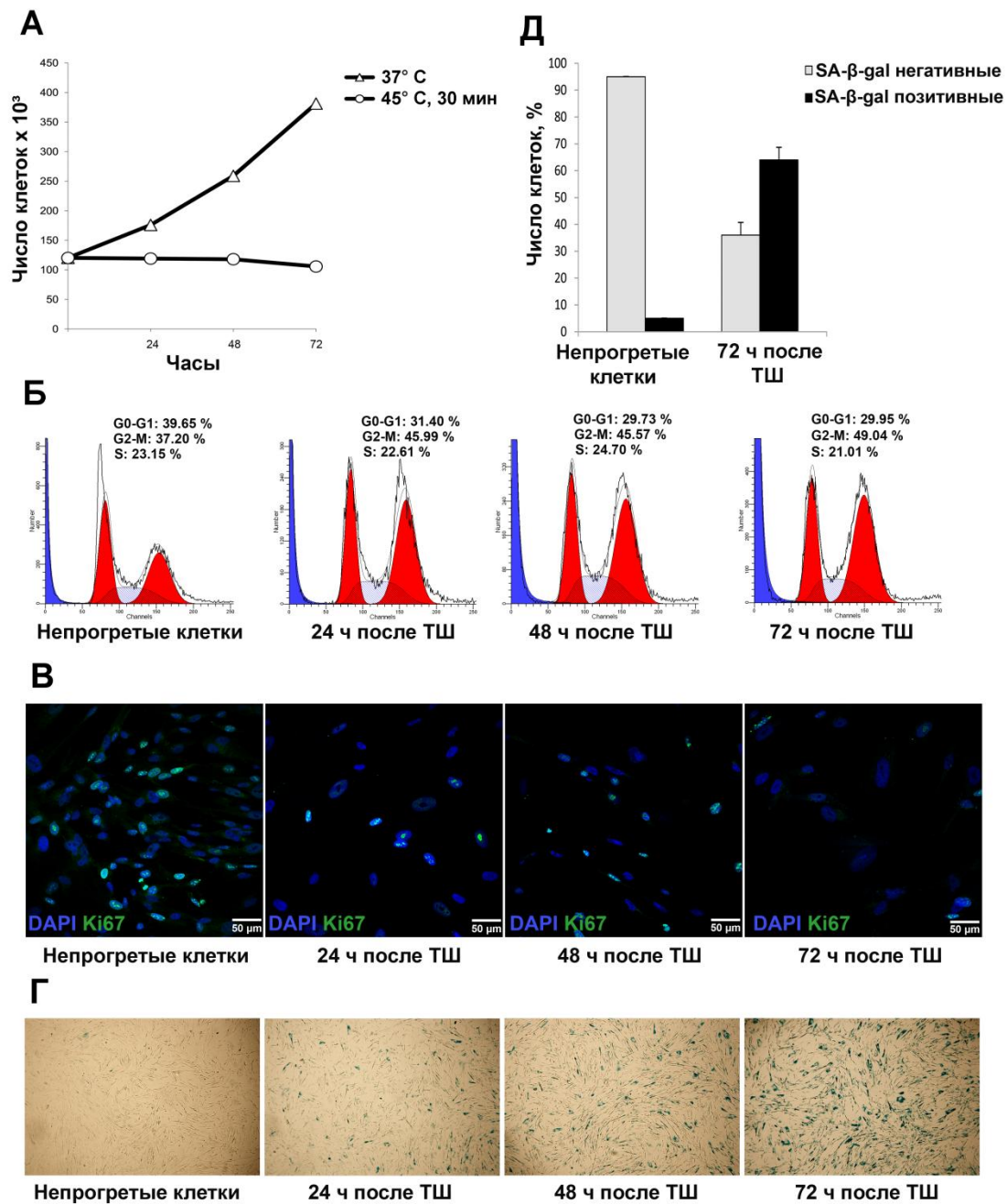


Рис. 18. Сублетальный ТШ вызывает SIPS в чЭСК-ДИФ

(А) Кривая клеточного роста интактных и прогретых чЭСК-ДИФ. (Б) Анализ распределения непрогретых и прогретых чЭСК-ДИФ по фазам клеточного цикла при помощи проточной цитометрии. (В) Иммунофлюоресцентный анализ экспрессии маркера пролиферации Ki67 в чЭСК-ДИФ до и после воздействия сублетального ТШ. Масштабная линейка 50 мкм. (Г) Увеличение числа SA-β-gal-позитивных клеток с измененной морфологией в культуре чЭСК-ДИФ после сублетального ТШ. Об.20х.

после ТШ перестают пролиферировать (**Рис. 18, А**). Анализ клеточного цикла методом проточной цитофлюориметрии показал, что в дифференцированных чЭСК происходит остановка клеточного цикла в фазах G1 и G2/M (**Рис. 18, Б**). Пролиферативный статус этих клеток был проверен при помощи окрашивания антителами против маркера пролиферации Ki67. На **Рис. 18, В** показано, что в течение трёх дней после сублетального ТШ большинство клеток чЭСК-ДИФ являются Ki67–негативными, то есть перестают делиться. Остановка клеточного цикла, вызванная различными стрессовыми факторами, является одним из признаков стресс-индуцированного преждевременного старения (SIPS). Другими маркерами SIPS являются изменение клеточной морфологии и экспрессия β -галактозидазы, ассоциированной со старением (SA- β -Gal) (Blagosklonny, 2012). Усиление активности β -галактозидазы является результатом увеличения числа лизосом в стареющей клетке. Только старые клетки имеют достаточную активность SA- β -Gal для конвертирования неокрашенного субстрата в синий продукт расщепления в неоптимальных для фермента условиях (рН 6, вместо рН 4) (Kurz, 2004). Через 24 часа после ТШ в культуре дифференцированных фибробластов появились более крупные, SA- β -Gal–позитивные клетки. Их число постепенно увеличивалось и на третий день количество SA- β -Gal–позитивных клеток достигало 60% (**Рис. 18, Г, Д**). Эмбриональные СК человека, пережившие сублетальный ТШ, продолжали пролиферировать, так же, как и интактные клетки. Никаких SA- β -Gal–позитивных клеток в прогретых чЭСК C910 обнаружено не было (**Рис. 19**). Таким образом, дифференцированные чЭСК, в отличие от недифференцированных, отвечают

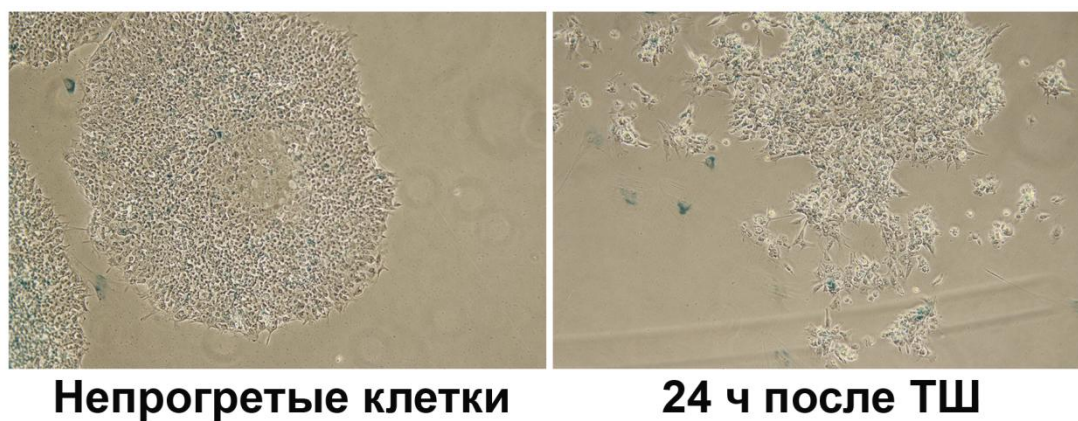


Рис. 19. Сублетальный ТШ не изменяет морфологию и не усиливает активность SA- β -gal в чЭСК

Единичные дифференцированные клетки, окрашенные в синий цвет в интактной и прогретой культуре, являются SA- β -gal-позитивными. Об.10х.

на сублетальное тепловое воздействие остановкой пролиферации и проявлением фенотипа SIPS.

3.3. Свойства плюрипотентных чЭСК и их дифференцированных производных, переживших сублетальный ТШ

Результаты наших исследований показали, что плюрипотентные и дифференцированные клетки являются чувствительными к тепловому воздействию, но отвечают на сублетальный ТШ по-разному. Вне зависимости от того, какой механизм выбирают клетки для защиты от повреждений, на наш взгляд, весьма актуальной проблемой является судьба клеток, переживших сублетальное стрессовое воздействие.

3.3.1. Свойства чЭСК C910, переживших сублетальный ТШ

Для того, чтобы проследить за судьбой чЭСК C910 после сублетального стресса, через 24 после ТШ клетки были пересеяны на свежий фидерный слой и культивировались при стандартных условиях. Выжившие клетки формировали колонии обычной морфологии и активно пролиферировали (**Рис. 20**). Колонии пассировались механически, как и исходные клетки. На 3—5 пассажах после прогрева мы проверили наличие маркеров плюрипотентности в чЭСК C910, переживших сублетальный ТШ. **Рис. 21, А** демонстрирует, что выжившие чЭСК C910 имеют типичную для ЭСК морфологию и экспрессируют стандартные маркеры плюрипотентности Oct4, SSEA4, ABCG2 и щелочную фосфатазу (alkaline phosphatase, AP). Для проверки их дифференцировочных свойств из клеток, переживших гипертермию, были получены эмбриоидные тельца. Эмбриоидные тельца спонтанно дифференцировались в клетки трёх зародышевых листков (**Рис. 21, Б**). В наших экспериментах было продемонстрировано, что после сублетального ТШ, поврежденные чЭСК быстро элиминировались путем апоптоза, но выжившие клетки восстанавливали свои первоначальные свойства: морфологию, высокую пролиферативную активность и свойства плюрипотентности (экспрессию маркеров плюрипотентности, дифференцировку в три зародышевых листка).

3.3.2. Дифференцированные производные чЭСК, пережившие сублетальный ТШ сохраняют свойства исходных клеток

Для того, чтобы проверить влияние сублетального теплового стресса на пролиферативную способность чЭСК-ДИФ, через 4 дня после прогрева клетки были перенесены на новые культуральные чашки. Прикрепившиеся к культуральному пластику клетки имели фибробластоподобную структуру, возобновляли пролиферацию и продолжали

делиться, как и непрогретые клетки. С увеличением числа удвоений, деление клеток замедлялось, появлялись уплощённые клетки увеличенного размера, экспрессирующие β -галактозидазу, ассоциированную со старением. В конечном счёте, клетки переставали делиться и умирали. До достижения признаков репликативного старения пережившие

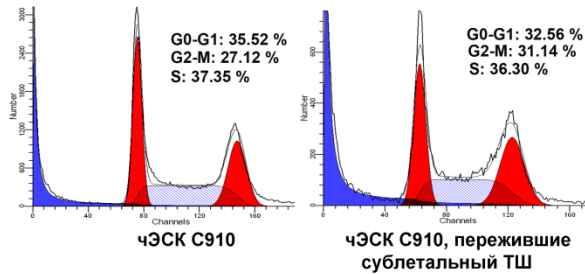
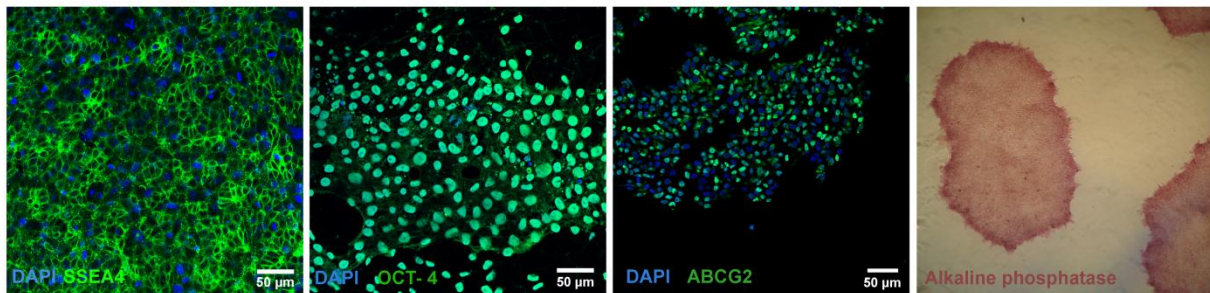


Рис.20. Потомки чЭСК, пережившие сублетальный ТШ, сохраняют высокую пролиферативную активность

А



Б

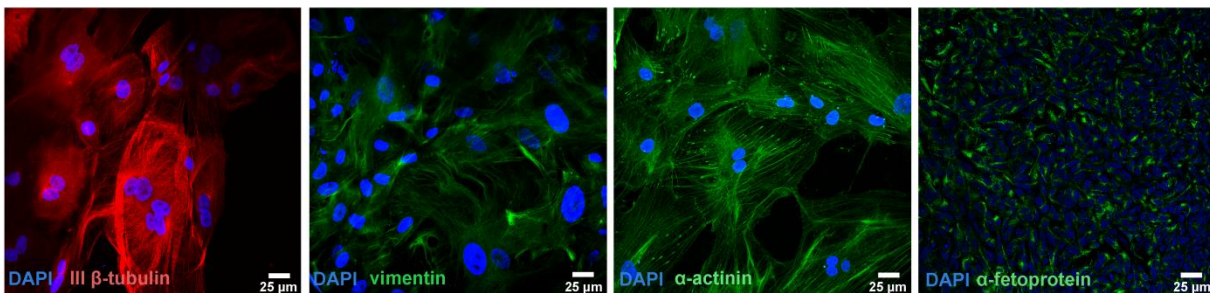


Рис. 21. Выжившие после сублетального ТШ чЭСК сохраняют свойства плюрипотентности

(А) Методом иммунофлуоресценции и при помощи окраски на щелочную фосфатазу (AP), было показано, что выжившие чЭСК экспрессируют маркеры плюрипотентности. (Б) чЭСК, пережившие сублетальный ТШ, могут дифференцироваться в производные трех зародышевых листков: эктодерму (III β -тубулин), мезодерму (виментин, мышечный α -актинин) и энтодерму (α -фетопротеин).

сублетальный ТШ чЭСК-ДИФ, подобно intactным клеткам, проходили от 17 до 19 пассажей (30—35 удвоений популяции) (**Рис. 22**). Таким образом, чЭСК-ДИФ, пережившие сублетальный ТШ, сохраняют морфологическое сходство с непрогретыми клетками, имеют диплоидный кариотип и подвержены репликативному старению.



Рис. 22. Дифференцированные фибробласты, пережившие сублетальный ТШ, сохраняют свойства исходных клеток

(А) Репликативное старение потомков чЭСК-ДИФ. На 12 пассаже после прогрева появляются SA-β-Gal-позитивные клетки с измененной морфологией. (Б) Потомки чЭСК-ДИФ, выжившие после сублетального ТШ, имеют диплоидный кариотип.

3.4. Влияние ТШ на СК взрослого организма (эмСК)

Эмбриональные стволовые клетки и их дифференцированные производные по-разному реагируют на тепловое воздействие. В связи с этим, на следующем этапе нашего исследования мы решили проанализировать особенности ответа на гипертермию взрослых стволовых клеток.

3.4.1. Тепловой шок не индуцирует апоптоз в эмСК

Для исследования реакции эмСК на ТШ был выбран такой же режим прогрева, как и для чЭСК (45С° 10 мин и 30 мин). Жизнеспособность эмСК клеток была исследована методом проточной цитофлюориметрии. При использовании комбинированной окраски йодистым пропидием (PI) и аннексином V (AnV) было показано, что увеличение температуры не влияет на жизнеспособность эмСК (**Рис. 23, А**). На рисунке видно, что при мягком и жестком нагреве, и последующем 4-х часовом восстановлении, количество жизнеспособных и апоптотических клеток не изменилось по сравнению с intactными клетками. Наличие апоптотических клеток так же было исследовано путём подсчета клеток с конденсированными или фрагментированными ядрами, окрашенными DAPI. Достоверных различий между прогретыми и контрольными клетками обнаружено не было (**Рис. 23, Б**).

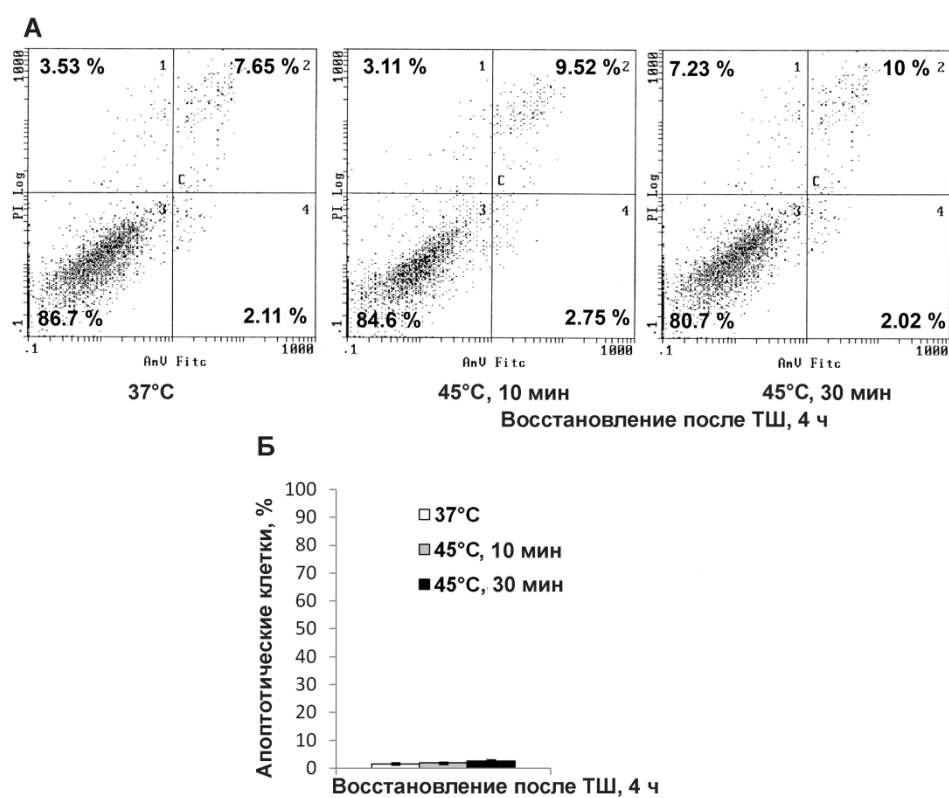


Рис. 23. ТШ не индуцирует апоптоз в ЭМСК

(А) Анализ апоптотической фракции клеток методом проточной цитофлуориметрии. Комбинированная окраска PI/AnV. (Б) Флуоресцентный анализ апоптотических клеток с фрагментированными или конденсированными ядрами, окрашенными DAPI.

3.4.2. ТШ индуцирует SIPS в эМСК

Мы не зарегистрировали снижения жизнеспособности эМСК ни при мягком, ни при сублетальном ТШ. Однако сублетальный ТШ приводит к остановке пролиферации и изменению морфологии эМСК. Количество клеток эМСК, прогретых при 45°C, 30 мин и возвращенных в нормальные условия, подсчитывалось в течение 72 часов. Кривые клеточного роста прогретых и непрогретых эМСК приведены на **Рис. 24**. Рисунок показывает, что при сублетальном ТШ количество клеток остаётся неизменным в течение 72 часов, в то время как число клеток в непрогретой культуре за этот период увеличивается почти в два раза. Ингибирование пролиферативной активности эМСК было подтверждено при помощи окрашивания антителами против маркера пролиферации Ki67 (**Рис. 24, Б**). Через 72 часа после прогрева только некоторые клетки оставались Ki67-позитивными. Анализ клеточного цикла методом проточной цитофлюориметрии показал, что сублетальное тепловое воздействие останавливает прохождение клеток по фазам клеточного цикла, главным образом, в фазе G2/М (**Рис. 24, В**). Остановка клеточного цикла является одним из основных признаков преждевременного клеточного старения. Другими биомаркерами клеточного старения являются увеличение активности SA-β-Gal и усиление экспрессии белка p21, ингибитора циклин-зависимых киназ. **Рис. 24, Г** демонстрирует изменение морфологии эМСК после сублетального ТШ: клетки увеличиваются в размере, становятся более уплощенными и экспрессируют β-галактозидазу, связанную со старением. Через 3 дня после ТШ, количество SA-β-Gal-позитивных клеток увеличивается до 70% (**Рис. 24, Д**). Сублетальный ТШ усиливает экспрессию белка p21, одного из ингибиторов циклин-зависимых киназ клеточного цикла и основного регулятора программы старения. Усиление экспрессии p21 в эМСК, показанное как на транскрипционном уровне методом ОТ-ПЦР (**Рис. 24, Д**), так и на уровне трансляции методом иммуноблоттинга (**Рис. 24, Е**), было зарегистрировано уже через 4 часа после сублетального ТШ. Активность p21 продолжала постепенно возрастать, и через 72 часа увеличилась в 3 раза.

3.4.3. Экспрессия белков теплового шока в эМСК

Чтобы проанализировать индукцию и накопление HSP, мы использовали методы ОТ-ПЦР, иммуноблоттинга и иммунофлюоресценции (**Рис. 25**). Методом ОТ-ПЦР (**Рис. 25, А**) было показано, что в эМСК ТШ вызывает индукцию нескольких *Hsp* генов (*Hsp27*, *Hsp70*, *Hsc70*, *Hsp90*). Наибольшее усиление экспрессии в (4—5 раз) было зафиксировано для *Hsp70*. Через 24 часа экспрессия всех генов вернулась к базальному уровню, за исключением *Hsp27*, экспрессия которого была незначительно увеличена, по крайней мере, в течение 72 часов. Иммунофлюоресцентный анализ *Hsp70* (**Рис. 25, В**) показал, что и мягкий (45 °C, 10

мин) и сублетальный (45 °C, 30 мин) ТШ индуцирует экспрессию Hsp70 в ЭМСК, при этом Hsp70, как и во многих других типах клеток, транслируется из цитоплазмы в ядро.

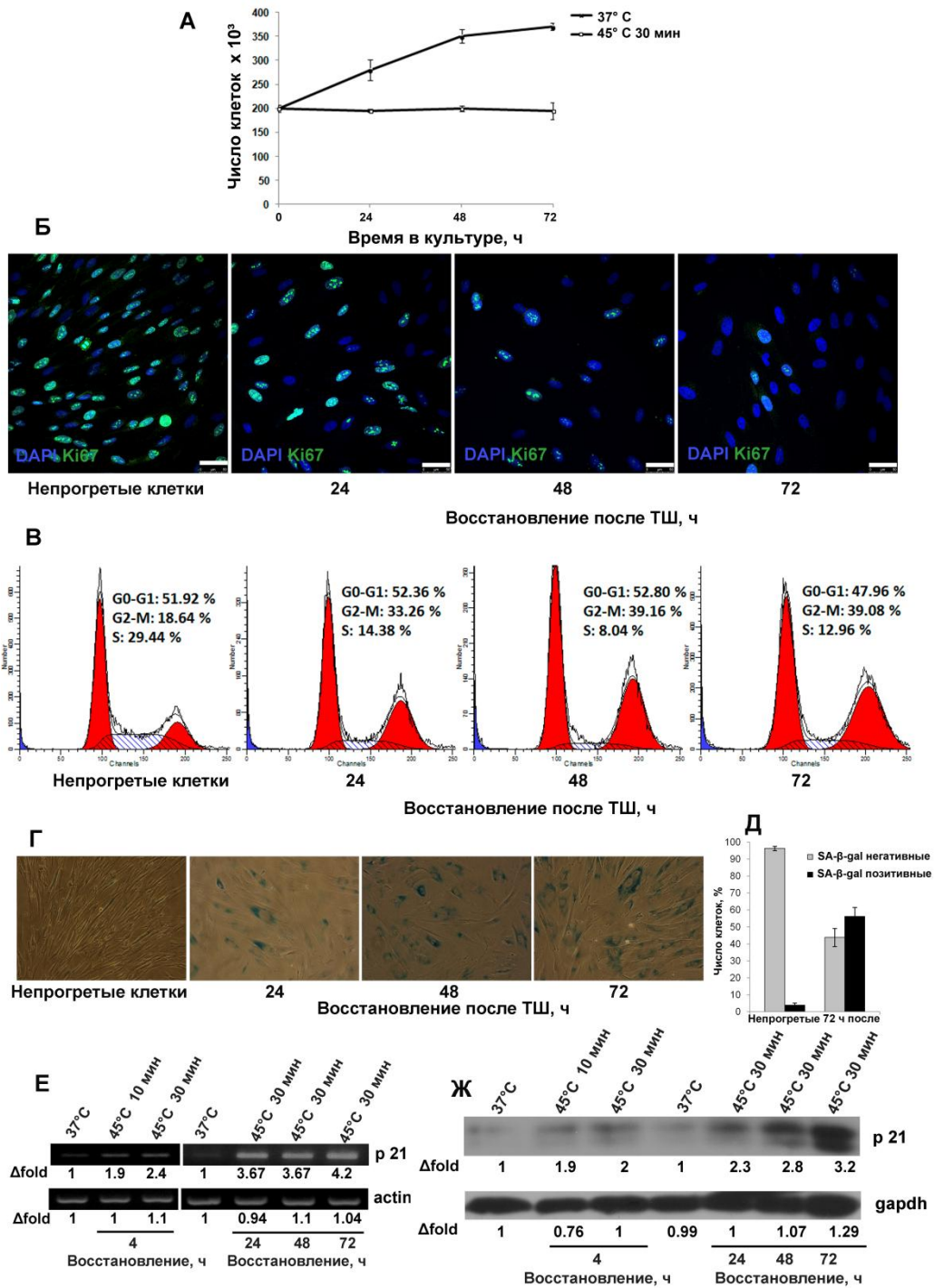


Рис. 24. Сублетальный ТШ индуцирует SIPS в ЭМСК

(А) Кривая роста прогретых и непрогретых клеток. (Б) Анализ пролиферативного статуса культуры методом иммунофлуоресценции. Окраска антителами против Ki67. Масштабная линейка 50 мкм. (В) Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла с помощью проточной цитофлуориметрии. (Г) Детекция SA-β-X-gal-позитивных клеток. Об. 20х. (Д) Количественная оценка SA-β-X-gal-позитивных клеток в прогретой и непрогретой культуре. Е, Ж – анализ экспрессии p21, ингибитора циклин-зависимых киназ, методами ОТ-ПЦР и иммунофлуоресценции.

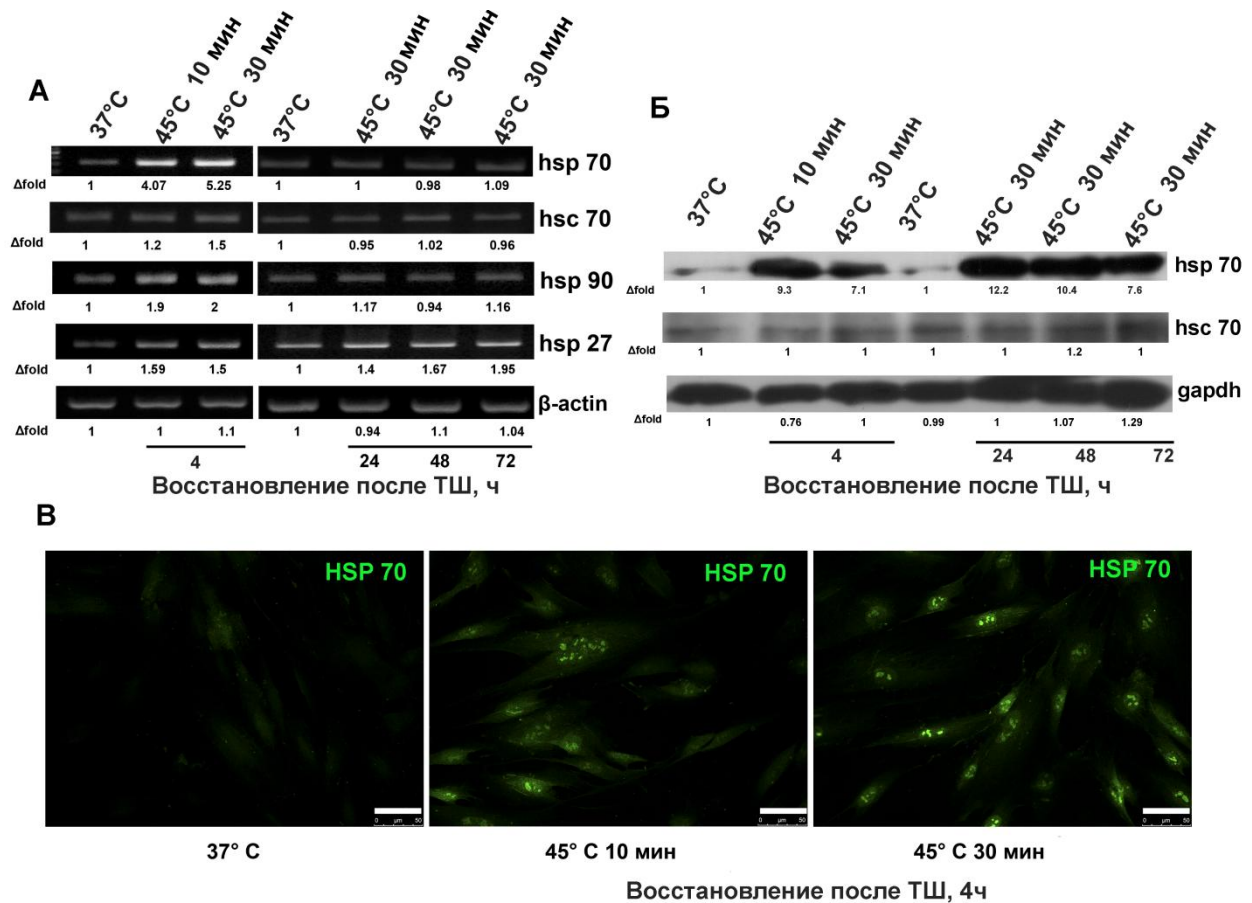


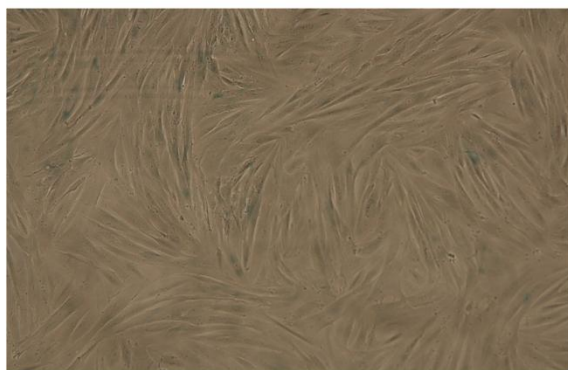
Рис. 25. Индукция и накопление HSP в эМСК после теплового воздействия

(А) Анализ экспрессии *Hsp* методом ОТ-ПЦР. (В) Индукция и накопление *Hsp*, детектированная при помощи иммуноблоттинга. Δ fold – изменение экспрессии относительно контроля (данные денситометрии). (С) Иммуноцитохимический анализ эМСК, подвергшихся ТШ. Масштабная линейка 50 мкм.

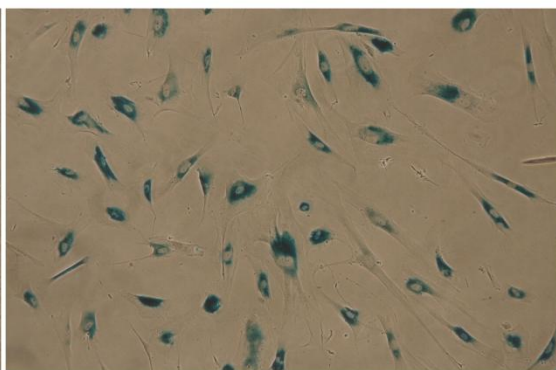
При помощи метода иммуноблоттинга было показано незначительное усиление экспрессии Hsc70, в то время как индукция Hsp70 возрастала в несколько раз, как при мягком, так и при сублетальном тепловом воздействии (**Рис. 25, Б**). Хотя экспрессия мРНК *Hsp70* эМСК, подвергшихся сублетальному ТШ, возвратился к базальному уровню уже через 24 часа, уровень Hsp70 оставался повышенным в течение 72 часов после прогрева. Похожую картину мы наблюдали при действии на эМСК сублетальной дозы H_2O_2 . В наших экспериментах экспрессия Hsp70 оставалась высокой в течение 72 ч после сублетального ТШ. Действительно ли процесс старения сопровождается повышенной экспрессией Hsp70, или накопление Hsp70 происходит в клетках, сохранивших способность пролиферировать, остается непонятным и требует дальнейших исследований.

3.4.4. Свойства эМСК, переживших сублетальное воздействие температуры

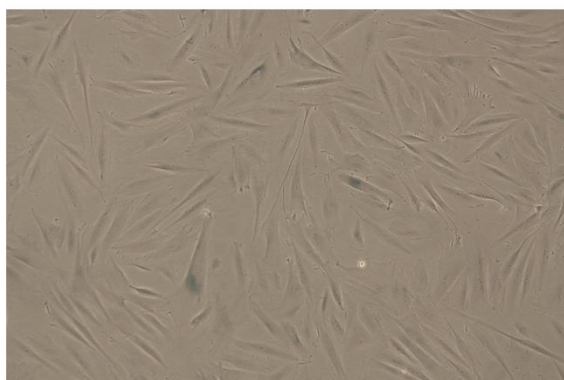
Вопрос о сохранении исходных свойств СК, переживших сублетальный стресс, практически не изучен. Чтобы проследить за судьбой эМСК, переживших сублетальный ТШ, через 4 дня после прогрева клетки были перенесены на новые культуральные чашки в свежеприготовленной стандартной среде. Прикрепившиеся клетки сохранили морфологию исходных клеток и возобновили пролиферацию. **Рис. 26** показывает, что на 3 пассаже после прогрева выжившие после ТШ эМСК сохраняли нормальный диплоидный кариотип и морфологически не отличались от родительских клеток. При длительном культивировании, восстановившиеся после сублетального стресса эМСК, подвергались репликативному старению. С увеличением числа удвоений, клетки морфологически изменялись (увеличивались в размере и уплощались), их пролиферация замедлялась, появлялось значительное число клеток с позитивной экспрессией β -галактозидазы, связанной со старением (**Рис. 26, А, Б**). Выжившие после теплового воздействия эМСК, экспрессировали поверхностные CD маркеры мезенхимных клеток (**Рис. 27, А**) и сохраняли высокую дифференцировочную пластичность. Они были способны дифференцироваться в адипоциты, остеобласты (производные мезодермы) (**Рис. 27, В, Г**) и трансдифференцироваться в нейроноподобные клетки (ектодермальное направление) (**Рис. 27, Д**).

А

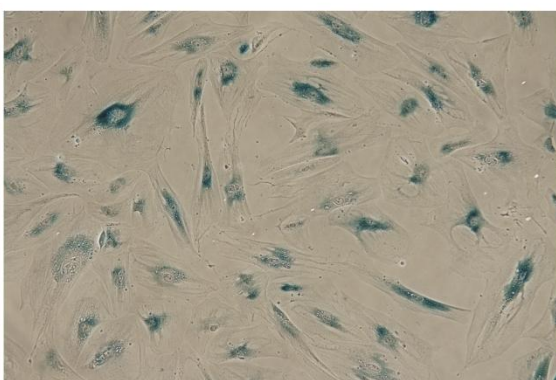
Непрогретые клетки, пассаж 9



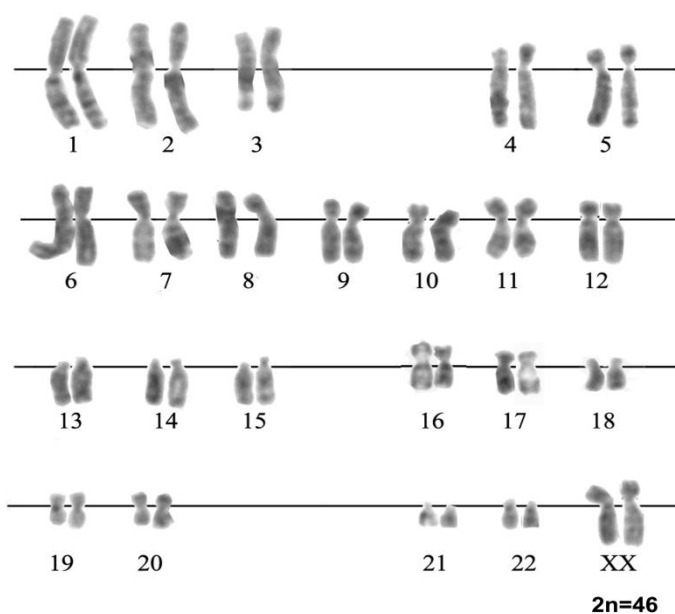
Непрогретые клетки, пассаж 21

Б

Клетки, пережившие сублетальный ТШ, пассаж 3 (в целом 10 пассаж)



Клетки, пережившие сублетальный ТШ, пассаж 12 (в целом 19 пассаж)

В**Рис. 26. Характеристика эМСК, переживших сублетальный ТШ**

(А) Репликативное старение эМСК. (Б) Репликативное старение эМСК, переживших сублетальный ТШ, детектировалось наличием SA-β-X-gal позитивных с измененной морфологией. Об. 20х. (В) Кариотип эМСК, выживших после сублетального ТШ (2n=46).

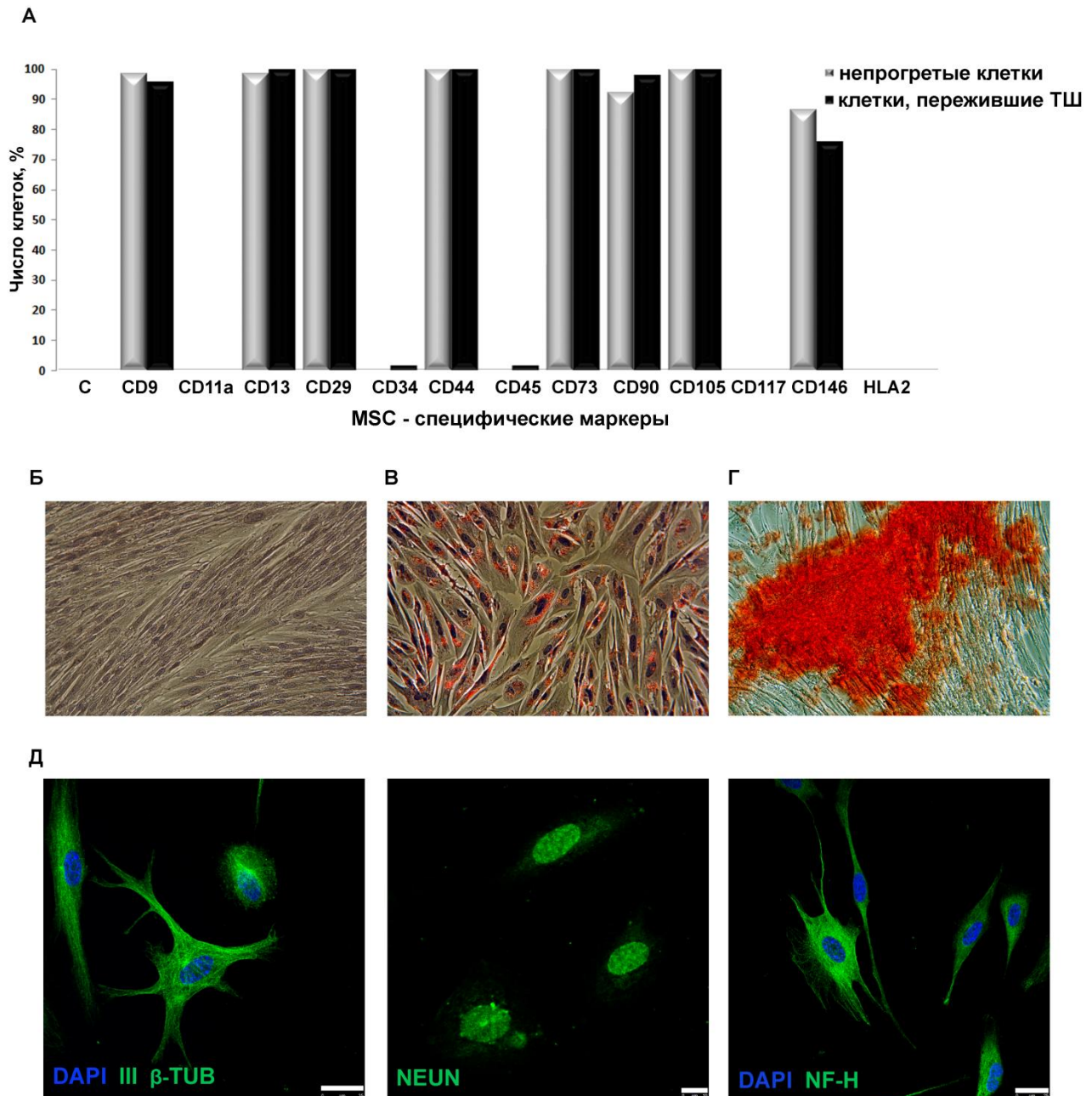


Рис. 27. Пластичность потомков эМСК, переживших сублетальный ТШ

(А) Анализ эМСК-специфичных поверхностных маркеров методом проточной цитофлуориметрии. (Б) Потомки эМСК без индукторов дифференцировки. Ядра подкрашены гематоксилином. (В) Адипогенная дифференцировка потомков эМСК. Окраска жировых включений красителем Oil Red. Ядра подкрашены гематоксилином. Об. 20х. (Г) Остеогенная дифференцировка потомков эМСК. Окраска минеральных компонентов матрикса красителем Alizarin Red. Об. 20х. (Д) Нейральная дифференцировка потомков эМСК. Масштабная линейка при окраске антителами против III β -TUB и NF-H 25 мкм, NEUN 10 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и стволовые клетки взрослого организма являются хорошей экспериментальной моделью для фундаментальных исследований в области клеточной биологии, фармакологии и регенерационной медицины.

На ранней стадии эмбрионального развития клетки являются плюрипотентными и обеспечивают развитие всего клеточного разнообразия взрослого организма. Они должны иметь надёжный механизм для поддержания целостности генома, так как ошибки могут быть унаследованы клетками развивающегося организма. Плюрипотентные стволовые клетки получают из внутриклеточной массы бластоцисты на ранней стадии эмбрионального развития (ЭСК) или путем перепрограммирования соматических клеток (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, *induced pluripotent stem cells*, iPSCs). ЭСК являются иммортальными клетками, способными к неограниченной пролиферации. Показано, что в условиях *in vitro* ЭСК могут самообновляться, поддерживать свойства плюрипотентности и дифференцироваться практически в любые типы соматических клеток (Odorico et al., 2001; Schuldiner and Benvenisty, 2003).

В процессе эмбриогенеза плюрипотентные клетки могут подвергаться воздействию различных стрессовых факторов. Экзогенные источники повреждений ДНК, ультрафиолетовое и ионизирующее излучения, химическое воздействие, могут прямо или косвенно приводить к повреждению ДНК. Эндогенные факторы, например, активные формы кислорода (АФК), вызывают повреждения ДНК путем окислительной модификации оснований ДНК или спонтанного гидролиза нуклеозидов. Для поддержания генетической стабильности эти клетки должны иметь хорошо отлаженные механизмы, обеспечивающие репарацию ДНК. Действительно, ЭСК более эффективно репарируют одно и двунитевые разрывы ДНК при воздействии H_2O_2 , УФ- и γ -излучения (Maynard et al., 2008; Chen et al., 2006) и более устойчивы, чем дифференцированные клетки, к индукции хромосомных aberrаций, при действии митомицина С (Vinoth et al., 2008). Имеются данные, что базальный уровень белков, участвующих в эксцизионной репарации BER (*base excision repair*) ДНК, отвечающей за коррекцию химически модифицированных оснований ДНК и репарацию одностранных разрывов (SSBs), значительно выше в мышечных ЭСК (мЭСК), чем в мышечных эмбриональных фибробластах (Tichy et al., 2011). В чЭСК BER репарация одностранных разрывов происходит лучше и быстрее, чем в дифференцированных клетках (Luo et al., 2012). Для поддержания целостности генома мЭСК важную роль играет mismatch-репарация (MMR), которая устраняет ошибки в азотистых основаниях дочерней цепи ДНК во время репликации (Tichy et al., 2011). ЭСК более эффективно, чем дифференцированные клетки восстанавливают двунитевые разрывы ДНК (DSBs), которые считаются наиболее опасной

формой повреждения ДНК (Nagaria et al., 2013). Чтобы восстановить DSBs, клетки используют два основных пути: гомологичную рекомбинацию (HR, homologous recombination) и негомологичное воссоединение концов (NHEJ, non-homologous end joining). Существует мнение, что в отличие от дифференцированных клеток, HR является преобладающим способом репарации DSBs как в чЭСК, так и в мЭСК, (Adams et al., 2010a; Tichy et al., 2010). чЭСК также способны выполнять эффективную NHEJ, которая не зависит от канонических белков NHEJ, ДНК-РКС (ДНК зависимой протеинкиназы C) и ATM (ataxia-telangiectasia mutated), но в значительной степени зависит от XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4), который в комплексе с ДНК-лигазой IV катализирует окончательный этап NHEJ (Adams et al., 2010b). Показано, что чЭСК имеют высокую экспрессию генов обоих путей репарации DSBs (Maynard et al., 2008; Fan et al., 2011). Наряду с хорошо отлаженным механизмом работы репарационной системы, ЭСК имеют надежный механизм защиты от стресса.

ЭСК обладают эффективной репарационной и стрессозащитной системой, но если восстановление ДНК невозможно, поврежденные плюрипотентные клетки быстро удаляются из популяции или подвергаются дифференцировке (Qin et al., 2007; Stambrook et al. 2010). Элиминация аберрантных плюрипотентных клеток – еще один способ предотвращения наследования геномных повреждений. Поврежденные чЭСК элиминируются апоптозом при воздействии ДНК-повреждающих агентов: этопозида, ингибитора топоизомеразы II, (Grandela et al., 2008; Velichko et al., 2011), УФ-лучей (Luo, 2012), γ -радиации (Filion et al., 2009). Для чЭСК характерны более высокая митохондриальная готовность и более низкий апоптотический порог, чем для дифференцированных клеток (Liu et al., 2013). Этот факт объясняется тем, что в плюрипотентных клетках баланс белков, участвующих в апоптозе, сдвинут в сторону проапоптотических белков, некоторые из которых, например, Bax активны в интактных клетках, но сохраняются в аппарате Гольджи, для предотвращения преждевременного апоптоза. При воздействии стресса, Bax быстро транслоцируется в митохондрии и способствует запуску апоптотической программы (Dumitru et al., 2012).

Для изучения реакции эмбриональных стволовых клеток на температурное воздействие, в настоящей работе была использована линия чЭСК, полученная в нашей лаборатории. Линия чЭСК обладает типичной для ЭСК морфологией и способна размножаться в культуре в течение длительного времени. Клетки полученной нами линии экспрессируют маркеры плюрипотентности Oct-4, Nanog, SSEA-4, Rex1, имеют высокую активность щелочной фосфатазы и могут дифференцироваться в клетки трёх зародышевых листков – эктодерму, мезодерму и энтодерму (Кожухарова и др. 2009). В результате наших исследований было выявлено, что чЭСК, нагретые при 45 °C в течение 10 минут, остаются

жизнеспособными (мягкий ТШ). При воздействии той же температуры, но в течение 30 минут (жесткий ТШ), число жизнеспособных чЭСК уменьшалась до 57.5%. Таким образом, ТШ (45°C, 30 мин), является сублетальным для плюрипотентных клеток, и более 40% чЭСК погибают в результате апоптоза. Необходимо отметить, что чЭСК, не подвергшиеся ТШ, имели относительно высокое число аннексинV–положительных клеток и клеток с фрагментированными ядрами (около 10%). Многие исследователи отмечают, что высокий уровень спонтанного апоптоза – типичное явление для чЭСК (Qin et al. 2007). Так как каспазы (цистеиновые протеазы) обычно вовлечены в регуляцию и реализацию апоптотической программы, мы исследовали экспрессию каспазы-3 в интактных и прогретых недифференцированных и дифференцированных клетках. Было обнаружено, что интактные чЭСК имеют достаточно высокий уровень экспрессии каспазы-3, который после нагрева усиливается. Хотя гипертермия вызывает апоптоз во многих типах клеток, мы впервые показали, что тепловой шок, как и другие факторы стресса, индуцирует его в чЭСК.

В процессе дифференцировки происходит снижение экспрессии большинства генов, вовлеченных в работу стрессозащитного механизма клеток (Saretzki et al. 2008; Armstrong et al. 2010). В их число входят гены, ответственные за экспрессию белков из семейства белков теплового шока (HSP). Одним из аргументов в пользу более высокой стрессоустойчивости ЭСК, являлась пониженная экспрессия HSPA1B (Hsp70), индуцибельной изоформы HSP70, в дифференцированных клетках (Saretzki et al., 2004; Prinsloo et al., 2009). Экспрессия HSP усиливается при воздействии различных стрессовых факторов, одним из которых является гипертермия. Клеточный ответ на повышенную температуру является функцией температуры и времени. Принято считать, что повышенный уровень Hsp70, как правило, коррелирует с устойчивостью клеток к гипертермии. Если это так, и принимая во внимание, что белки теплового шока имеют решающее значение для защиты клеток от повреждения, можно было предположить, что чЭСК будут более устойчивы к гипертермии, чем их дифференцированное потомство. В отличие от предыдущих сообщений о снижении экспрессии Hsp70 в процессе дифференцировки, в наших экспериментах уровень Hsp70 в дифференцированных потомках чЭСК был выше, чем в недифференцированных клетках. Это хорошо согласуется с данными об увеличении экспрессии фактора ТШ (HSF1) при формировании эмбрионных теллец (Byun et al., 2013). Усиление экспрессии Hsp70 наблюдалось также в ЭСК, индуцированных к дифференцировке ингибитором гистондеацетилазы (Park et al., 2011). В результате наших исследований мы обнаружили, что на мембране интактных чЭСК, но не их дифференцированных производных, экспрессируется конститутивная форма Hsp70 (Hsc70). Эксперимент был проведён на живых клетках. Эти наблюдения согласуются с ранее полученными данными (Son et al., 2005).

Было даже предложено рассматривать Hsc70 (HSPA8) в качестве поверхностного клеточного маркера недифференцированных чЭСК. Биологическое значение экспрессии HSP70 на поверхности плюрипотентных клеток не ясно. Можно предположить, что это играет важную роль в раннем развитии эмбрионов млекопитающих. Предположение основано на экспериментах по усилению апоптоза и снижению количества эмбрионов при достижении стадии бластоцисты, если антитела к HSP70 присутствовали в культуральной среде для развития эмбрионов крупного рогатого скота (Matwee et al., 2001). Высокий уровень антител к HSP70 на ранней стадии беременности, коррелирует с повышением дефектов при рождении (Child et al., 2006). Есть множество сообщений об экспрессии HSP70 на поверхности раковых клеток. Появление HSP70 на поверхности чЭСК можно рассматривать как одну из общих особенностей плюрипотентных и раковых клеток. Тем не менее, опухолевые клетки экспрессируют на своей поверхности индуцибельную, а не конститутивную изоформу Hsp70 (Lasunskaja et al., 2010).

В качестве дифференцированных производных ЭСК мы использовали фибробластоподобные клетки, имеющие свойства нормальных фибробластов человека. Фибробластоподобные дифференцированные производные чЭСК были диплоидными и при длительном культивировании подвергались репликативному старению (RS). Фибробласты человека в нормальной культуре имеют ограниченное число удвоений (предел Хейфлика). При RS происходит необратимая остановка клеточного цикла, связанная с дисфункцией теломер. Старение клеток характеризуется определенными признаками: гипертрофия, усиление β -галактозидазной активности, активация сигнальных путей, которые индуцируют и поддерживают состояние старения (индукция ингибиторов циклин-зависимых киназ p16 и p21), появление характерного типа факультативного гетерохроматина, ассоциированного со старением, секреция определенных воспалительных цитокинов. У стареющих клеток подавление пролиферации связано с блоком клеточного цикла, приводящим к изменению активности циклин-киназных комплексов. Предположительно именно блок клеточного цикла является основой переключения на программу старения (Blagosklonny, 2012; de Magalhães and Faragher, 2008). Явление, при котором происходит необратимая остановка пролиферации, быстро приводящая к клеточному старению, называют стресс-индуцированным преждевременным старением (SIPS). Морфологические признаки SIPS такие же, как и при репликативном старении, хотя действие некоторых стрессовых факторов, вызывающих SIPS, не связано с дисфункцией теломер. В наших экспериментах дифференцированные чЭСК клетки после сублетального теплового стресса проявляли морфологические признаки SIPS: прекращение пролиферации, изменение

клеточной морфологии. При сублетальном тепловом воздействии число увеличенных, распластанных и SA- β -Gal-позитивных клеток в культуре возросло до 60 %.

Таким образом, сублетальный ТШ индуцирует апоптоз в ЭСК и преждевременное старение их фибробластоподобных производных. Хотя ТШ вызывает апоптоз в различных клетках, мы не нашли в литературе никаких сведений о тепло-индуцированном преждевременном старении клеток. Тем не менее, документально подтверждено, что шапероны, Hsp70 в частности, принимают участие как в апоптозе, так и в процессе клеточного старения (Söti et al., 2003). Индукция Hsp70 изменяется в фибробластах человека во время их репликативного старения (Gutsmann-Conrad et al., 1998). Его истощение может вызвать старение в раковых клетках (Sherman, 2010). Мутантные клетки CHO-K1, в которых экспрессия Hsp70 была снижена, подверглись быстрому старению при воздействии высокой концентрации NaCl (Dmitrieva et al., 2009). В результате наших исследований было выявлено, что тепловой шок, резко изменял уровень Hsp70 и слегка затрагивал экспрессию Hsc70 как в ЭСК, так и в их дифференцированных производных. Мягкий тепловой шок увеличивал уровень Hsp70 в обоих типах клеток. В условиях жесткого теплового шока уровень Hsp70 уменьшался в чЭСК и продолжал расти в дифференцированных клетках. В настоящий момент трудно сказать, является ли различие в экспрессии и накоплении Hsp70 и различная реакция чЭСК и их дифференцированных производных на сублетальный ТШ (апоптоз и SIPS соответственно) причинно связанными между собой событиями. Весьма вероятно, что поврежденные плюрипотентные клетки не в состоянии восстановиться и обречены на смерть путем апоптоза. Это выгодно для эмбриогенеза; SIPS плюрипотентных клеток будет катастрофой для развития эмбриона. Клетки с нерепарируемыми поломками, появившиеся при стрессовом воздействии, подвергаются либо апоптозу, либо преждевременному старению (Chen and Goligorsky, 2006). Как клетки осуществляют выбор между этими путями, не ясно. Однако, для поврежденных плюрипотентных клеток SIPS, вероятно, является запрещенным путем.

В своей работе мы использовали фибробластоподобные клетки, полученные из ЭСК, как дифференцированные производные плюрипотентных клеток, но в последние годы появилось большое число публикаций, описывающие фибробласты как мультипотентные клетки. Так, дермальные фибробласты по своему дифференцировочному и пролиферативному потенциалу сходны с МСК костного мозга (Toma et al., 2005; Chen et al., 2007; Lorenz et al., 2008; Vaculik et al., 2012). Была идентифицирована и описана популяция так называемых «клеток-предшественников из кожи» (SKPs, skin-derived progenitor cells) (Toma et al., 2001; Toma et al., 2005). Эти клетки были выделены из ниши дермального сосочка волосяного фолликула млекопитающих. SKPs способны в течение длительного

времени пролиферировать в культуре, экспрессируют нестин, фибронектин, виментин и соответствуют МСК по способности дифференцироваться в мезодермальном и нейральном направлениях. Популяция клеток со свойствами SKPs была выделена из неонатальной крайней плоти человека (Toma et al., 2005; Lorenz et al., 2008), а также из кожи человека среднего и пожилого возраста (Fernandes et al., 2008). По мнению авторов, SKPs представляют собой новый тип мультипотентных клеток взрослого организма с разнонаправленной дифференцировкой. Предполагают, что эти клетки находятся в состоянии покоя до момента повреждения ткани. Имеются данные, SKPs как *in vitro*, так и *in vivo* дифференцируются не только в мезодермальном и нейральном направлениях. Они могут дифференцироваться в клетки гладкой мускулатуры и периваскулоциты (Lavoie et al., 2009). По мнению исследователей, свойства SKPs аналогичны свойствам мультипотентных клеток нейрального гребня, и их можно выделить как на стадии эмбриогенеза, так и на стадии взрослого организма. Предполагается, что SKPs представляют собой эмбриональные эндогенные клетки-предшественники, мигрирующие в ткани организма во время развития, и сохраняющие свою мультипотентность во взрослом организме (Gago et al., 2009). Помимо SKPs в дерме крайней плоти были идентифицированы другие клеточные популяции мультипотентных клеток. Одна из них была названа дермальными мультипотентными мезенхимными стволовыми клетками (dermal multipotential mesenchymal stem cells, dermal MSCs) и была способна к дифференцировке в адипоциты, остеоциты и миоциты (Bartsch et al., 2005). Chen с соавт. в дерме ювенильной крайней плоти обнаружили еще одну популяцию клеток, которую называли мультипотентными дермальными фибробластами (MDFs), отличную от SKPs (Chen et al., 2007). С помощью клонального анализа было показано, что MDFs составляют приблизительно 0,3 % от общей популяции фибробластов дермы крайней плоти человека. В противоположность SKPs, обнаруженная исследователями популяция клеток продуцировала виментин и не экспрессировала нестин, а также, помимо эктодермальной и мезодермальной, была способна к энтодермальной дифференцировке в частности, в гепатоциты и клетки поджелудочной железы, вырабатывающие инсулин, глюкагон и соматостатин (Bi et al., 2010). Практически одновременно с предыдущими исследователями в клетках крайней плоти новорожденных были идентифицированы «фибробластподобные мезенхимные стволовые клетки» (FMSCs) (Lorenz et al., 2008), которые экспрессируют виментин, фибронектин, коллаген I типа и в небольшом количестве нестин и мышечный актин. Общий антигенный профиль этих клеток сходен с ММСК костного мозга и жировой ткани. FMSCs обладают остеогенным и адипогенным дифференцировочным потенциалом. При повреждениях кожи клетки этой популяции способны дифференцироваться в миофибробласты.

Многочисленные исследования показывают, что фибробласты человека могут конкурировать с мезенхимными стволовыми клетками по уровню пластичности (Vishnubalaji et al., 2012). Можно предположить, что реакция мезенхимных стволовых клеток взрослого организма на сублетальные стрессовые воздействия будет похожа на реакцию фибробластоподобных клеток. Для подтверждения данного предположения, мы решили проверить реакцию СК взрослого организма на тепловой шок.

Большинство, если не все, ткани взрослого организма, содержат стволовые клетки, названные стволовыми клетками взрослого организма (da Silva Meirelles et al., 2006; Bianco et al., 2008; Paul et al., 2012). В отличие от плюрипотентных стволовых клеток, СК взрослого организма мультипотентны, т.е. способны дифференцироваться в несколько, но не все типы клеток (Ramkisoensing et al., 2011). Тем не менее, в этих клетках заключаются большие перспективы, как для биомедицинских исследований, так и для клеточной терапии (Salem and Thiemermann, 2010). Очевидным преимуществом СК взрослого организма является отсутствие этических и законодательных проблем при их получении, генетическая стабильность, отсутствие туморогенности и возможность аутотрансплантации клеточных продуктов, полученных на их основе, что полностью решает иммунологические вопросы, которые всегда сопровождают терапию стволовыми клетками. Большинство СК, предназначенных для регенеративной терапии, получены из мезенхимных тканей. Основными источниками мезенхимных стволовых клеток (МСК) являются клетки костного мозга. Помимо костного мозга распространенными источниками для выделения МСК являются жировая ткань (Parker and Katz, 2006) и пуповинная кровь (Bieback and Klitter, 2007). Комплексное изучение свойств МСК из различных источников показало, что они могут иметь некоторые отличия, но по морфологии и профилю экспрессии поверхностных маркеров совпадают со свойствами МСК костного мозга (Dominici et al., 2006; Dmitrieva et al., 2012).

В нашем исследовании мы использовали МСК, изолированные из десквамированного эндометрия менструальной крови (Земелько и др., 2011). Эти клетки проявляют все свойства МСК, полученных из других источников и являются перспективной альтернативой широко используемых МСК костного мозга (Allickson and Xiang, 2012). Они могут самообновляться, экспрессируют маркеры мезенхимных клеток CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и не экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток CD34, CD45. МСК эндометрия (эМСК) способны к дифференцировке в остеобласты, хондробласты, адипоциты при соответствующих условиях *in vitro* (Земелько и др., 2011). Преимуществом эМСК является доступность, безболезненный и неинвазивный способ их изоляции.

Ответ стволовых клеток на неблагоприятные воздействия является необходимым условием для восстановления тканей и находится в стадии активного исследования (Cmielova et al. 2012). Для того чтобы выполнить задачу восстановления ткани, стволовые клетки должны оставаться неповрежденными при неблагоприятных условиях. Клетки, могут по-разному реагировать на воздействие стресса: (дифференцировка, преждевременное старение, апоптоз или некроз). Выбор зависит от типа клеток и силы стресса. Мягкий стресс может улучшить дифференцировку стволовых клеток (Stolberg and McCloskey 2009; Hronik-Turaj et al., 2011). Результатом летального стресса является некроз. Сублетальные дозы различных стрессорных факторов приводят к апоптозу или старению (SIPS).

Температура является важным экологическим и лечебным фактором. Тем не менее, реакция МСК человека на ТШ изучена недостаточно. Было показано, что легкий тепловой стресс способствовал дифференцировке миобластов (Yamaguchi et al., 2010) и остеогенезу МСК из костного мозга (Shui and Scutt, 2001; Chen et al., 2013). Жесткий тепловой шок, происходящий при ортопедических процедурах в культивируемых клетках остеобластов, индуцирует апоптоз и некроз (Li et al., 1999; Dolan et al., 2012). Сообщалось, что при повышенной температуре, стволовые клетки гетерогенной популяции клеток зубного фолликула человека могут размножаться и дифференцироваться быстрее, чем не стволовые клетки (Yao et al., 2011; Rezai Rad et al., 2013).

ТШ обычно рассматривается как индуктор апоптоза или некроза. С другой стороны, обычной реакцией стволовых клеток взрослого организма на различные стрессорные воздействия является стресс-индуцированное преждевременное старение (SIPS) (Toussaint et al., 2000; Brandl et al., 2011a, 2011b; Cmielova et al., 2012; Ko et al., 2012). Перечень факторов вызывающих SIPS, который постоянно растет, включает окислительный стресс, H_2O_2 , трет-бутилгидропероксид, этанол, ионизирующих излучений, митомицин С (Toussaint et al., 2000). Однако, мы не нашли указаний на то, что ТШ также является триггером SIPS. Для исследования реакции МСК человека на ТШ, была выбрана температура, которая являлась сублетальной для плюрипотентных чЭСК (45 °C, 30 мин). При воздействии повышенной температуры, культивируемые МСК, проявляли признаки стресс-индуцированного старения. Клетки останавливались в фазе G2/M, изменяли морфологию, проявляли связанную со старением активность β -галактозидазы (SA- β -гал) и повышенную экспрессию белка p21, ингибитора циклин-зависимых киназ из семейства Cip/Kip. Повышение экспрессии p21 вызывает остановку клеточного цикла в поздней G1-фазе, что обусловливается связыванием им комплексов циклин E/Cdk2 и подавлением их способности фосфорилировать белки семейства pRb и высвобождать транскрипционный фактор E2F (Копнин, 2000; Hill et al., 2008), а также в S и G2/M фазах клеточного цикла (Ogryzko et al., 1997; Niculescu et al., 1998).

Это происходит как за счет ингибирования циклиновых комплексов, ответственных за прохождение фазы синтеза ДНК и подготовки клеток к митотическому делению, так и за счет косвенного регулирования генов, участвующих в контроле клеточного цикла (Ferrándiz et al., 2012). Транскрипционная активация гена *p21*, приводящая к необратимой остановке клеточного цикла и SIPS в ответ на повреждение ДНК, опосредована преимущественно p53 (Herbig and Sedivy, 2006), но может проходить и по p53-независимому пути (Macip et al., 2002).

Ответ на тепловой шок является одним из наиболее консервативных клеточных ответов на стресс. Он характеризуется транскрипцией и накоплением белков теплового шока (Hsp). Hsp, как правило, экспрессируются в ответ на различные экологические стрессовые воздействия. Среди них ТШ, оксидативный стресс, воздействие токсических веществ и др. Hsp защищают клетки за счет своей шаперонной функции. Существует широкий спектр литературы по структуре и свойствам Hsp, их функции в нормальных и поврежденных клетках, молекулярные механизмы экспрессии Hsp в ответ на стресс. В данной работе мы изучали экспрессию HSP в MSC человека, подвергшиеся SIPS в ответ на ТШ. Было обнаружено, что гипертермия увеличивала экспрессию генов *Hsp27*, *Hsp70*, *Hsp90* *Hsc70*, которая вернулась к исходному уровню через 24 ч после восстановления клеток, за исключением гена *Hsp27*, экспрессия которого была незначительно увеличена, по крайней мере, в течение 72 часов. На уровне белка мы анализировали изменения уровня и локализации индуцированной формы основного белка теплового шока, Hsp70. Клетки проявляли типичный ответ на ТШ: значительное повышение уровня Hsp70 и его транслокация в ядро. Повышенный уровень белка Hsp70 в МСК, индуцированных сублетальным ТШ, по-видимому, регулируется на посттрансляционном уровне. Хотя уровень экспрессии мРНК *Hsp70* эМСК, подвергшихся сублетальному ТШ, возвратился к базальному уровню уже через 24 часа, уровень Hsp70 оставался повышенным в течение 72 часов после прогрева. Похожую картину мы наблюдали при действии на эМСК сублетальной дозы H₂O₂.

Основной функцией Hsp70 является защита клеток от повреждений, вызываемых различными факторами стресса. Чем выше содержание Hsp70 в клетках, тем выше их жизнеспособность в условиях стресса. Стресс-чувствительные клетки должны иметь небольшое количество Hsp70. Действительно, содержание Hsp70 в апоптотных клетках ниже, чем в интактных (Samali et al., 1999; Lasunskaia et al., 2010). С этой точки зрения, клетки, подвергшиеся SIPS, могут иметь низкий уровень Hsp70. Тем не менее, в наших экспериментах MSC, индуцированные гипертермией к преждевременному старению, имеют повышенное содержанием Hsp70. Известно, что белки семейства HSP участвуют в процессе

старения. Повышенный уровень Hsp27 в стволовых клетках пуповины человека задерживал их старение (Liu et al., 2010), а ингибирование Hsp90 (Restall and Lorimer, 2010) или выключение Hsp70 (Sherman, 2010) в опухолевых клетках индуцировало их преждевременное старение. С другой стороны, эктопическая сверхэкспрессия Hsp27 вызывала ускоренный рост и старение артериальных клеток эндотелия быка (Piotrowicz et al., 1995). Иммортальные мышечные клетки линии NIH 3T3 подвергались клеточному старению при трансфекции цитозольным морталином, членом семейства HSP70 (Wadhwa et al., 1993). В стареющих клетках понижается транскрипционная активность фактора теплового шока HSF1 (Liu et al., 1991; Lee et al., 2009) и ответ на стрессорные воздействия с возрастом ослабевает (Kim et al., 2012), но базальный уровень Hsp у стареющих животных может оставаться увеличенным (Maiello M. et al., 1997). Базальный уровень как конститутивного Hsc70, так и стресс-индуцибельных Hsp70 и Hsp27 увеличивается во время клеточного старения фибробластов кожи человека в отсутствие ТШ (Fonager J. et al. 2002). Экспрессия членов семейства HSP70 в некоторых отделах головного мозга крыс увеличивается с возрастом, и, по мнению авторов, может играть важную роль в подавлении денатурации белка стареющих клеток (Unno K. et al. 2000). Однако при длительном культивировании МСК было зарегистрировано снижение базальных уровней Hsp27, Hsp70 и Hsp90 (Stolzinger et al., 2008). Повышенная экспрессия Hsp70, индуцированная в фибробластах человека субтоксическими дозами солей тяжелых металлов, которые являются потенциальными индукторами SIPS, сохранялась до 7 дней (Strub et al., 2008). С другой стороны, уровень Hsp70 в фибробластах человека с фенотипом преждевременного старения, индуцированного окислительным стрессом, заметно не изменился, хотя экспрессия Hsp27 оставалась высокой в течение 5 дней после воздействия (Chen et al., 2004). В наших экспериментах экспрессия Hsp70 оставалась высокой в течение 72 ч после сублетального ТШ. Сопровождается ли процесс старения повышенной экспрессией Hsp70 или накопление Hsp70 происходит в клетках, сохранивших способность пролиферировать, остается не понятным и требует дальнейших исследований.

Интересно, SIPS, скорее чем апоптоз, является одной из основных реакций стволовых клеток взрослого человека на воздействие сублетальной дозы различных стрессорных факторов: перекись водорода (Orciani et al., 2010; Brandl et al., 2011a, b), ионизирующее излучение (Suzuki and Boothman, 2008), гамма-излучение (Cmielova et al., 2012), доксорубин (Spallarossa et al., 2010), фактор некроза опухоли-альфа (Zhang et al., 2009). По мнению многих исследователей, SIPS является важным механизмом, предотвращающим пролиферацию клеток, которые находятся под угрозой злокачественной трансформации. Однако в последнее время стало очевидно, что SIPS влечет за собой больше, чем просто

подавление роста клеток (Rodier and Campisi, 2011). Клетки, подвергшиеся SIPS, необратимо утрачивают способность к пролиферации, однако, остаются метаболически активными, что может быть полезным для окружающих клеток. Например, фибробласты после воздействия радиации или обработанные митомицином C, широко используются как фидерные клетки для размножения эмбриональных стволовых клеток. Было показано, что при индуцированном старении сателитные клетки печени за счет усиления секреции во внеклеточный матрикс деградирующих ферментов, ограничивают степень фиброза печени, после повреждения печени *in vivo* (Krizhanovsky et al., 2008). Старение миофибробластов рассматривается как запрограммированная реакция заживления раны, которое функционирует как самоограничительный механизм при фиброгенезе (Jun and Lau, 2010).

Эмбриональные и взрослые стволовые клетки чувствительны к сублетальным стрессовым воздействиям, но механизм ответа на стресс у них различается. Каковы бы ни были механизмы, используемые ЭСК и МСК для защиты от повреждений, основной проблемой является судьба выживших клеток: изменились ли их исходные свойства или нет. Многочисленные исследования описывают ответ ЭСК на повреждение, но лишь немногие работы, появившиеся совсем недавно, посвящены потомкам ЭСК, пережившим стресс. Было обнаружено, что ЭСК мыши при воздействии H_2O_2 подверглись апоптозу. Клетки, выжившие после сублетального воздействия H_2O_2 , проявляли пролиферативную активность, сопоставимую с контрольными клетками и экспрессировали маркеры плюрипотентности (Guo et al., 2010). Аналогичные результаты были получены для мышинных ЭСК, выживших после воздействия γ -радиации (Rebuzzini et al., 2012). ЭСК после облучения в дозах, которые, как известно, вызывают апоптоз этих клеток, были способны генерировать тератомы и экспрессировать гены, отвечающие за плюрипотентность (Sokolov et al., 2010; Wilson et al., 2010). Полученные из жировой ткани МСК человека после генотоксического повреждения возобновляли пролиферацию, подвергались репликативному старению (Altanerova et al., 2009). Никаких литературных данных о судьбе СК, переживших сублетальное действие гипертермии, нам обнаружить не удалось.

В наших экспериментах чЭСК, после воздействия сублетального ТШ, подвергались апоптозу, но выжившие клетки восстанавливали свои первоначальные свойства: имели диплоидный кариотип, характерную для ЭСК морфологию, высокую пролиферативную активность, свойства плюрипотентности (экспрессию маркеров плюрипотентности, образование эмбриональных телец, дифференцировку в три зародышевых листка). Дифференцированные потомки ЭСК и МСК эндометрия при сублетальной гипертермии подвергались преждевременному старению. Дифференцированные фибробластоподобные клетки, выжившие после ТШ, возобновили пролиферацию и подвергались репликативному

старению одновременно с родительскими клетками, т.е. восстанавливали свои первоначальные свойства. Эндометриалиновые МСК, пережившие ТШ сохраняли нормальный диплоидный кариотип и морфологически не отличались от родительских клеток. эМСК, выжившие после сублетального ТШ, при длительном культивировании подвергались репликативному старению. С увеличением числа удвоений, клетки морфологически изменялись (увеличивались в размере и уплощались), их пролиферация замедлялась, появлялось значительное число клеток с высокой активностью β -галактозидазы связанной со старением. Эти клетки экспрессировали поверхностные CD маркеры мезенхимных СК и сохраняли высокую пластичность. Они были способны дифференцироваться в адипоциты, остеобласты (производные мезодермы) и трансдифференцироваться в нейроноподобные клетки (эктодермальное направление).

Реакция культивируемых стволовых клеток взрослого организма на стресс активно изучается исследователями, занимающимися проблемами клеточной трансплантации. За последние несколько лет опубликовано большое количество работ, в которых показано, что предварительная обработка трансплантируемых стволовых клеток сублетальными дозами различных стрессорных факторов, увеличивает их толерантность и регенеративные свойства (Yu et al., 2013).

В 2010 году группой исследователей была получена популяция клеток из клеток костного мозга и фибробластов человека, выживших после длительной обработки коллагеназой или трипсином и инкубации в неоптимальных условиях (без сыворотки, при низкой концентрации кислорода) (Kuroda et al., 2010). Уникальность этих клеток, названных Muse (multilineage differentiating stress enduring), заключается в том, что они обладают свойствами как мезенхимных, так и плюрипотентных стволовых клеток. Muse экспрессируют маркеры мезенхимных клеток CD29, CD90, CD105 вместе с SSEA-3 (stage-specific embryonic antigen-3), маркером недифференцированных стволовых клеток. Когда Muse клетки культивируют как адгезивную клеточную культуру, они выглядят как обычные фибробласты, но в суспензии они образуют кластеры, напоминающие эмбриональные тельца, полученные из ЭСК. Производные кластеров Muse экспрессируют маркеры плюрипотентности Nanog, Oct3/4, Sox2 и проявляют активность щелочной фосфатазы, могут самообновляться и образовывать клетки всех трех зародышевых листков. Однако в отличие от ЭСК, Muse клетки не являются иммортализованными. В условиях *in vivo* Muse способны репарировать повреждения различных тканей. При инфузии в периферическую кровь иммунодефицитных мышей с повреждениями костного мозга, дегенерацией скелетных мышц или острым гепатитом, человеческие Muse клетки мигрировали к местам повреждений и восстанавливали поврежденные ткани и клетки (Kuroda et al., 2010; Wakao et al., 2011).

Было высказано предположение, что Muse присутствуют в небольшом количестве (менее 1%) во многих тканях взрослого организма. Действительно, Muse клетки были обнаружены в жировой ткани (Heneidi et al., 2013; Wakao et al., 2014) и клетках пуповины (Amiri et al., 2014). Следует отметить, что Muse клетки из костного мозга, жировой ткани и фибробластов кожи, в отличие от ЭСК и iPCSs, не являются опухоленными и не склонны к образованию тератом (Wakao et al., 2014; Kuroda et al., 2010).

В начале 2014 года появились сенсационные сообщения об уникальных плюрипотентных клетках, полученных при сублетальном воздействии стрессовых факторов на лимфоциты мыши. Стрессоустойчивые клетки были названы STAP (stimulus-triggered acquisition of pluripotency) (Obokata et al., 2014a). Отбор осуществлялся по маркеру гемапоэтических клеток CD45. Отсортированные клетки подвергались механическому, температурному воздействию, культивированию без сыворотки, воздействию стрептолизина для пермеабилзации клеточной мембраны и снижению pH среды. Наиболее эффективным оказалось 20 минутное понижение pH среды до значения 5,7. Через 7 дней после воздействия стрессорного фактора, в культуре появились сферообразные колонии, экспрессирующие маркерные гены *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Ecat1* (*Khdc3*), *Esg1* (*Dppa5a*), *Dax1* (*Nrob1*) и *Rex1* (*Zfp42*) и маркерные белки (Oct4, SSEA1, Nanog и E-cadherin). STAP клетки способны дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков и образуют тератомы, но не тератокарциномы. При подсадке STAP в мышинный зародыш на стадии бластоцисты рождались химерные животные, в тканях которых присутствовали потомки донорских клеток. Большинство STAP погибало при культивировании в стандартной среде в течение 7 дней, но если в среду добавляли адренокортикотропные гормоны, клетки хорошо размножались и оставались жизнеспособными, по крайней мере, 120 дней без потери свойств плюрипотентности. В STAP клетках снижается уровень метилирования ДНК в регуляторных областях генов *Oct4* и *Nanog*, отвечающих за плюрипотентность (Obokata et al., 2014b). Этот факт говорит о том, что образование STAP происходит не за счет клеточного отбора выживших лимфоцитов, а в результате их эпигенетического репрограммирования.

Существование стрессо-устойчивых клеток с приобретенной плюрипотентностью (STAP) вызывает сомнения многих исследователей. Но если факт существования этих клеток подтвердится, то STAP клетки могут совершить революционный переворот в развитии регенеративной медицины.

Терапия стволовыми клетками ограничена из-за низкой жизнеспособности МСК после трансплантации. Исследования на животных моделях и клинические испытания продемонстрировали, что кислородное голодание (Chen et al., 2006), а также присутствие свободных радикалов и воспалительных цитокинов, с которыми сталкиваются пересаженные

клетки в поврежденных тканях, являются основными факторами снижения эффективности клеточной терапии (Li et al., 2004; Barshes et al., 2005). Поврежденные эндогенные клетки, вероятно, продуцируют метаболические токсины и апоптотические факторы, что может в свою очередь оказать неблагоприятное воздействие на трансплантированные клетки.

С целью повышения выживаемости трансплантируемых клеток часто используют генную модификацию СК. Эктопическая экспрессия Hsp70 в мезенхимные стволовые клетки костного мозга крыс увеличивает экспрессию Bcl2 и снижает экспрессию Bax, JNK-PC и активацию каспазы-3. В условиях кислородного голодания выживаемость Hsp70⁺МСК гораздо выше, чем в контрольных клетках. Терапевтический эффект Hsp70⁺МСК был продемонстрирован на модельных животных с окклюзией левой коронарной артерии. Трансплантация МСК, с увеличенной экспрессией Hsp70, способствовала уменьшению области фиброза сердца, и значительно сокращала апоптотическую гибель клеток (Chang et al., 2009). В данном исследовании Hsp70 был доставлен в МСК при помощи лентивирусной конструкции. Аналогичный подход был использован для лечения инфаркта миокарда при трансплантации МСК, несущих конструкцию с экзогенным Hsp27 (McGinley et al., 2013). Использование векторов на основе лентивирусов для усиления стрессо-устойчивости трансплантируемых клеток нежелательно в клинических условиях, из-за возможности возникновения опухолей. В связи с этим, в клинических испытаниях для повышения выживаемости трансплантируемых клеток отдается предпочтение предварительному прогреву, а не технологии рекомбинантной ДНК.

Предварительный прогрев значительно повышает выживаемость стволовых клеток сердца Sca-1⁺ в условиях ишемии. Это связано с усилением активности фактора теплового шока-1 (HSF-1). HSF-1 изменяет регуляцию микроРНК 34a (miR-34a), которая репрессирует транскрипцию Hsp70. В экспериментах *in vivo* было показано, что трансплантация прогретых СК сердца значительно уменьшает апоптоз, ослабляет фиброз и улучшает общую функцию ишемического миокарда. В данном исследовании показано не только ранее неизвестное воздействие ТШ на выживаемость СК сердца, но и предложены новые подходы к клеточной терапии ишемической болезни сердца (Feng et al., 2014).

Изучение реакции стволовых клеток на стресс расширяет наши знания о механизмах восстановления поврежденных тканей и органов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе показано, что эмбриональные стволовые клетки человека (чЭСК) и мезенхимные стволовые клетки (МСК) взрослого организма отвечают на повреждающее воздействие гипертермии по-разному. При сублетальном температурном воздействии чЭСК подвергаются апоптозу, а МСК эндометрия (эМСК) – преждевременному старению.

Апоптоз и преждевременное старение (SIPS) – два возможных механизма элиминации поврежденных стволовых клеток. Как ЭСК и МСК осуществляют выбор между этими путями, пока не ясно. Апоптотическая гибель плюрипотентных клеток (ЭСК) в раннем эмбриогенезе обеспечивает геномную целостность развивающегося организма. SIPS плюрипотентных клеток было бы катастрофой для развития эмбриона. Преждевременное старение мезенхимных стволовых клеток исключает поврежденные клетки из пролиферативного пула, уменьшая риск злокачественной трансформации. Однако такие клетки остаются метаболически активными и, как фидерные клетки в культуре, могут быть полезными для восстановления поврежденных тканей и органов с помощью паракринных механизмов.

Результаты настоящего исследования показали, что чЭСК и эМСК, пережившие сублетальное тепловое воздействие, сохраняют свойства исходных клеток. Выжившие чЭСК самообновляются, сохраняют плюрипотентность и могут дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков. Потомки эндометриальных МСК не меняют свою морфологию, подвержены репликативному старению, сохраняют диплоидный кариотип и экспрессию поверхностных маркеров мезенхимных клеток.

В настоящей работе было выявлено, что мягкий тепловой шок (ТШ) (45 °С, 10 мин), увеличивает уровень Hsp70 как в чЭСК, так и в эМСК. В условиях жесткого ТШ (45 °С, 30 мин) уровень Hsp70 в эмбриональных стволовых клетках уменьшается, в то время как в эМСК при этих условиях уровень Hsp70 остается высоким, по крайней мере, в течение 72 ч. Является ли различие в накоплении Hsp70 и реакции эмбриональных и взрослых стволовых клеток на сублетальный ТШ (апоптоз и SIPS, соответственно) причинно связанными между собой событиями, не известно. Для ответа на этот вопрос необходимы дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

1. Сублетальный тепловой шок (ТШ) вызывает апоптоз эмбриональных стволовых клеток (чЭСК).
2. Сублетальный ТШ вызывает преждевременное старение (SIPS) дифференцированных производных чЭСК и мезенхимных стволовых клеток эндометрия (эМСК).
3. ТШ по-разному влияет на экспрессию индуцибельной изоформы Hsp70 в изученных клетках. При сублетальном ТШ уровень Hsp70 в эмбриональных стволовых клетках (чЭСК) падает; во взрослых стволовых клетках (эМСК) и дифференцированных производных чЭСК уровень Hsp70 возрастает.
4. На поверхности эмбриональных стволовых клеток экспрессируется конститутивная изоформа Hsc70. Hsc70 не выявляется на поверхности дифференцированных производных чЭСК и эМСК. Во всех изученных клетках уровень Hsc70 не меняется под влиянием ТШ.
5. чЭСК, пережившие сублетальный ТШ, сохраняют свойства исходных клеток. Они самообновляются, экспрессируют маркеры плюрипотентности, способны дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков.
6. Потомки эМСК, пережившие ТШ, сохраняют исходную морфологию, экспрессию поверхностных МСК маркеров, диплоидный кариотип, пластичность и подвержены репликативному старению.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Анисимов СВ. 2009. Клеточная терапия болезни Паркинсона. III. Применение неонатальных, фетальных и эмбриональных стволовых клеток. Успехи геронтологии. 22(2): 296—315.

Гаврилова ЛП, Корпачева ИИ, Семушина СГ, Яшин ВА. 2012. Гипертермия индуцирует одновременно перестройки всех известных цитоскелетных филаментов в нормальных интерфазных фибробластах. Цитология. 54(11):837—845.

Домнина АП, Фридлянская ИИ, Земелько ВИ, Пуговкина НА, Ковалева ЗВ, Зенин ВВ, Гринчук ТМ, Никольский НН. 2013. Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека при длительном культивировании не подвергаются спонтанной трансформации. Цитология. 55(1):69—74.

Земелько ВИ, Гринчук ТМ, Домнина АП, Арцыбашева ИВ, Зенин ВВ, Кирсанов АА, Бичева НК, Корсак ВС, Никольский НН. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. 53(12):919—929.

Кожухарова ИВ, Фридлянская ИИ, Ковалева ЗВ, Пуговкина НА, Алексеенко ЛЛ, Зенин ВВ, Иванцов КМ, Гринчук ТМ, Никольский НН. 2009. Новые линии эмбриональных стволовых клеток человека C612 и C910. Цитология. 51(7):551—557.

Копнин БП. 2000. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров — ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. Биохимия. 65(1):5—33.

Мамаева СЕ. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М: Науч. мир.

Маргулис БА, Гужова ИВ. 2000. Белки стресса в эукариотической клетке. Цитология. 42(4):323—342.

Маргулис БА, Гужова ИВ. 2009. Двойная роль шаперонов в ответе клетки и всего организма на стресс. Цитология. 51(3):219—228.

Мусина РА, Белявский АВ, Тарусова ОВ и др. 2008. Мезенхимальные стволовые клетки эндометрия, полученные из менструальной крови. Кл. техн. биол. мед. 2:110—114.

Чертков ИЛ, Фриденштейн АЯ. 1966. Родоначальная кроветворная клетка и ее дифференцировка. Успехи Современной Биологии. 62:97—114.

Abdelalim EM. 2013. Molecular Mechanisms Controlling the Cell Cycle in Embryonic Stem Cells. Stem Cell Reviews and Reports. 9(6):764—773.

- Abujarour R, Valamehr B, Robinson M et al. 2013. Optimized surface markers for the prospective isolation of high-quality hiPSCs using flow cytometry selection. *Scientific reports*. 3.
- Adachi K, Suemori H, Yasuda SY et al. 2010. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells*. 15(5):455—470.
- Adams BR, Golding SE, Rao RR, Valerie K. 2010a. Dynamic dependence on ATR and ATM for double-strand break repair in human embryonic stem cells and neural descendants. *PLoS ONE*. 5:e10001.
- Adams BR, Hawkins AJ, Povirk LF, Valerie K. 2010b. ATM-independent, high-fidelity nonhomologous end joining predominates in human embryonic stem cells. *Aging (Albany, N.Y.)*. 2:582—596.
- Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L et al. 2007. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature biotechnology*. 25(7):803—816.
- Agarraberes FA, Dice JF. 2001. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci*. 114:2491—9.
- Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. 2010. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:545—555.
- Alekseenko LL, Zemelko VI, Domnina AP et al. 2014. Sublethal heat shock induces premature senescence rather than apoptosis in human mesenchymal stem cells. *Cell Stress and Chaperones*. 19(3):355—366.
- Allickson J, Xiang C. 2012. Human adult stem cells from menstrual blood and endometrial tissue. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 13:419—420.
- Altanerova V, Horvathova E, Matuskova M et al. 2009. Genotoxic damage of human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells triggers their terminal differentiation. *Neoplasma*. 56:542—547.
- Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK et al. 1998. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene*. 16:1383—1390.
- Amiri F, Halabian R, Salimian M, Shokrgozar M. A. et al. 2014. Induction of multipotency in umbilical cord-derived mesenchymal stem cells cultivated under suspension conditions. *Cell Stress and Chaperones*. 1—10.
- Amit M, Margulets V, Segev H et al. 2003. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biology of reproduction*. 68(6):2150—2156.
- Anckar J, Sistonen L. 2011. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annual review of biochemistry*. 80:1089—1115.

Angle N. 2008. Regenerative medicine with endometrial regenerative cells for critical ischemia: limb salvage from the cradle of life? *Future Cardiol.* 4:547—450.

Anisimov SV, Christophersen NS, Correia AS et al. 2011. Identification of molecules derived from human fibroblast feeder cells that support the proliferation of human embryonic stem cells. *Cellular & molecular biology letters.* 16(1):9—88.

Armstrong L, Tilger K, Saretzki G, Atkinson S, Stojkovic., Moreno R et al. Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells. *Stem Cell.* 2010; 28:661—73.

Arslan F, Lai RC, Smeets MB et al. 2013. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 10:301—312.

Ashburner M, Bonner JJ. 1979. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell.* 17(2):241—254.

Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA et al. 2008. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells.* 26(12):3068—3074.

Aubert J, Dunstan H, Chambers I, Smith A. 2002. Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nature biotechnology.* 20(12):1240—1245.

Avery S, Inniss K, Moore H. 2006. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. *Stem cells and development.* 15(5):729—740.

Baker DE, Harrison NJ, Maltby et al. 2007. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat. Biotechnol.* 25:207—215.

Balogh G, Péter M, Glatz A, et al. 2013. Key role of lipids in heat stress management. *FEBS letters.* 587(13):1970—1980.

Barshes NR, Wyllie S, Goss JA. 2005. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol.* 77(5):587—597.

Bartsch G, Yoo J, De Coppi P. et al. 2005. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev.* 14:337—48.

Batuello CN, Kelley MR, Dynlacht JR. 2009. Role of Ape1 and base excision repair in the radioresponse and heat-radiosensitization of HeLa Cells. *Anticancer Res.* 29:1319—1325.

Beaujean N, Taylor J, Gardner J et al. 2004. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biology of reproduction.* 71(1):185—193.

Becker K A, Ghule PN, Therrien et al. 2006. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *Journal of cellular physiology*. 209(3):883—893.

Ben-David U, Gan QF, Golan-Lev T et al. 2013. Selective Elimination of Human Pluripotent Stem Cells by an Oleate Synthesis Inhibitor Discovered in a High-Throughput Screen *Cell Stem Cell*. 12(2):167—179.

Benesch JL, Ayoub M, Robinson CV, Aquilina JA. 2008. Small heat shock protein activity is regulated by variable oligomeric substructure. *Journal of Biological Chemistry*. 283(42):28513—28517.

Bernardo ME, Pagliara D, Locatelli F. 2012. Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine? *Bone Marrow Transplant*. 47:164—171.

Bhuyan BK. 1979. Kinetics of cell kill by hyperthermia. *Cancer Res*. 39:2277—2284.

Bi D, Chen F, Zhang W et al. 2010. Differentiation of human multipotent dermal fibroblast into islet-like cell cluster. *BMC Cell Biol*. 11: 46.

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*. 2(4):313—319.

Bieback K, Kluter H. 2007. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr. Stem Cell Res. Ther*. 2:310—323.

Bieback K, Kern S, Kocaomer A et al. 2008. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: Bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng*. 18:71—76.

Blagosklonny MV. 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—65.

Boiani M, Schöler HR. 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6(11):872—881.

Borges FT, Melo SA, Özdemir BC et al. 2013. TGF- β_1 —Containing Exosomes from Injured Epithelial Cells Activate Fibroblasts to Initiate Tissue Regenerative Responses and Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol*. 24:385—392.

Borlongan CV, Kaneko Y, Maki M et al. 2010. Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Dev*. 19:439—451.

Boulon S, Pradet-Balade B, Verheggen C et al. 2010. HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Molecular cell*. 39(6):912—924.

Boyer L A, Lee TI, Cole MF et al. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 122(6):947—956.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1): 248—254.
- Brandl A, Hartmann A, Bechmann V et al. 2011a. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J Orthop Res*. 29:1114—1120.
- Brandl A, Meyer M, Bechmann V, Nerlich M, Angele P. 2011b. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 317:1541—1547.
- Brizzi, M. F., Tarone, G., & Defilippi, P. (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Current opinion in cell biology*, 24(5), 645—651.
- Burton P, Adams DR, Abraham A, et al. 2010. Identification and characterization of small-molecule ligands that maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Biochem. Soc. Trans.* 38:1058—1061.
- Buchan JR, Parker R. 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell*. 36: 932—941.
- Byun K, Kim TK, Oh J et.al. 2013. Heat shock instructs hESCs to exit from the self-renewal program through negative regulation of OCT4 by SAPK/JNK and HSF1 pathway. *Stem Cell Res*. 11(3):1323—34.
- Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL et al. 2007. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*. 450(7169):497—502.
- Caisander G, Park H, Frej K et al. 2005. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines prolonged in vitro culture. *Chromosome Res*. 14:131—137.
- Cameron CM, Harding F, Hu WS, Kaufman DS. 2008. Activation of hypoxic response in human embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 233:1044—1057.
- Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. 2006. Heat shock proteins in cancer: Chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*. 31:164—72.
- Calderwood SK, Xie Y, Wang X et al. 2010. Signal transduction pathways leading to heat shock transcription. *Sign Transduct Insights*. 2: 13—24.
- Carpenter L, Carr C, Yang CT et al. 2012 Efficient Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Generates Cardiac Cells That Provide Protection Following Myocardial Infarction in the Rat. *Stem Cells and Development*. 21(6):977—986.
- Catalá A. 2010. A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 399: 318—323.
- Cervello I, Gil-Sanchis C, Mas A et al. 2010. Human endometrial side population cells exhibit genotypic and functional features of somatic stem cells. *PloS One*. 5:e10964.

- Cervello I, Mas A, Gil-Sanchis C et al. 2011. Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. *PLoS One*. 6:e21221.
- Challen G A, Little M. 2006. A Side order of stem cells: the SP Phenotype. *Stem Cells*. 24: 3—12.
- Chambers I, Colby D, Robertson M et al. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 113(5):643—655.
- Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. 2004. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol. Reprod.* 70:1738—1750.
- Chen JH, Stoeber K, Kingsbury S et al. 2004. Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *J Biol Chem*. 279:49439—49446.
- Chen CP, Lee YJ, Chiu ST, Shyu WC, Lee MY, Huang SP, Li H. 2006. The application of stem cells in the treatment of ischemic diseases. *Histol Histopathol*. 21(11):1209—1216.
- Chen J, Goligorsky MS. 2006. Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 290:H1729—39.
- Chen F, Zhang W, Bi D et al. 2007. Clonal analysis of nestin(-)vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J. Cell Sci*. 120: 2875—83.
- Chen J, Shi ZD, Ji X et al. 2013. Enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells by periodic heat shock in self-assembling. *Tissue Eng Part A*. 19:716—728.
- Chang W, Song BW, Lim S et al. 2009. Mesenchymal Stem Cells Pretreated with Delivered Hph-1-Hsp70 Protein Are Protected from Hypoxia-Mediated Cell Death and Rescue Heart Functions from Myocardial Injury. *Stem Cells*. 27(9):2283—2292.
- Cho NH, Park YK, Kim YT et al. 2004. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil. Steril*. 81:403—407.
- Choi KS, Shin J S, Lee JJ et al. 2005. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochemical and biophysical research communications*. 330(4):1299—1305.
- Choo A, Ngo AS, Ding V et al. 2008. Autogeneic feeders for the culture of undifferentiated human embryonic stem cells in feeder and feeder-free conditions. *Methods Cell Biol*. 86:15—28.
- Chureau C, Prissette M, Bourdet A et al. 2002. Comparative sequence analysis of the X-inactivation center region in mouse, human, and bovine. *Genome research*. 12(6):894—908.
- Child DF, Peter R, Hudson PR et al. 2006. Birth defects and anti-heat shock protein 70 antibodies in early pregnancy. *Cell Stress Chaperones*. 11:101—5.
- Clevers H, Nusse R. 2012. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 149(6):1192—1205.

Cmielova J, Havelek R, Soukup T et al. 2012. Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. *Int J Radiat Biol.* 88:393—404.

Corry PM, Robinson S, Getz S. 1977. Hyperthermic effects on DNA repair mechanisms. *Radiology.* 123:475—482.

Csermely P, Schnaider T, Prohászka Z, Nardai G. 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics.* 79(2):129—168.

Csoboz B, Balogh GE, Kusz E. et al. 2013. Membrane fluidity matters: Hyperthermia from the aspects of lipids and membranes. *International Journal of Hyperthermia.* 29(5):491—499.

Cuervo A M, Wong E. 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging *Cell Research.* 24:92—104.

Cui CH, Uyama T, Miyado K et al. 2007. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol. Biol. Cell.* 18:1586—1594.

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119(11):2204—2213.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten F P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44 (8):1928—1942.

de Magalhães JP, Faragher RG. 2008. Cell divisions and mammalian aging: integrative biology insights from genes that regulate longevity. *Bioessays.* 30(6):567—578.

Dewey WC, Westra A, Miller HH, Nagasawa H. 1971. Heatinduced lethality and chromosomal damage in synchronized Chinese hamster cells treated with 5-bromodeoxyuridine. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 20:505—520.

Dhara SK, Benvenisty, N. 2004. Gene trap as a tool for genome annotation and analysis of X chromosome inactivation in human embryonic stem cells. *Nucleic acids research.* 32(13):3995—4002.

Diaz-Flores LJ, Madrid JF, Gutierrez R et al. 2006. Adult stem and transit-amplifying cell location. *Histol Histopathol.* 21:995—1027.

Dimitrov R, Timeva T, Kyurkchiev D et al. 2008. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction.* 135:551—558.

Dmitrieva NI, Chen HT, Nussenzweig A, Burg MB. 2009. Knockout of Ku86 accelerates cellular senescence induced by high NaCl. *Aging (Albany NY)* 1:245—53.

Dmitrieva RI, Minullina IR, Bilibina AA, et al. 2012. Bone marrow-and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell cycle*. 11(2):377—383.

Dokladny K, Zuhl MN, Mandell M et al. 2013. Regulatory Coordination between Two Major Intracellular Homeostatic Systems HEAT SHOCK RESPONSE AND AUTOPHAGY. *Journal of Biological Chemistry*. 288(21):14959—14972.

Dolan EB, Haugh MG, Tallon D, Casey C, McNamara LM. 2012. Heat-shock-induced cellular responses to temperature elevations occurring during orthopaedic cutting. *J R Soc Interface*. 9:3503—3513.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I. et al. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8:315—7.

Donohoe ME, Silva SS, Pinter SF et al. 2009. The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctf and also controls X-chromosome pairing and counting. *Nature*. 460(7251):128—132.

Dravid G, Ye Z, Hammond H et al. 2005. Defining the Role of Wnt/ β -Catenin Signaling in the Survival, Proliferation, and Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells. *stem cells*. 23(10): 1489—1501.

Duffy M M, Ritter T, Ceredig R, Griffin M D. 2011. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Research & Therapy*. 2:34.

Dvorak P, Dvorakova D, Koskova S et al. 2005. Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem cells*. 23(8):1200—1211.

Dumitru R, Gama V, Fagan BM et al. 2012. Human embryonic stem cells have constitutively active Bax at the Golgi and are primed to undergo rapid apoptosis. *Molecular cell*. 46(5):573—583.

Dynlacht JR, Batuello CN, Lopez JT et al. 2011. Identification of Mre11 as a target for heat radiosensitization. *Radiat Res*. 176:323—332.

Ellis J, Bruneau B G, Keller G et al. 2009. Alternative induced pluripotent stem cell characterization criteria for in vitro applications. *Cell Stem Cell*. 4(3):198—199.

Evans M J, Kaufman M H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292(5819):154—156.

Ema H, Suda T. 2012. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood*. 120(11):2174—2181.

Espada J, Varela I, Flores I et al. 2008. Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *The Journal of cell biology*. 181(1):27—35.

Falcieri E, Luchetti F, Burattini S et al. 2000. Lineage-related sensitivity to apoptosis in human tumor cells undergoing hyperthermia. *Histochem Cell Biol.* 113:135—144.

Fan J, Robert C, Jang Y-Y et al. 2011. Human induced pluripotent cells resemble embryonic stem cells demonstrating enhanced levels of DNA repair and efficacy of nonhomologous end-joining. *Mutat. Res.* 713:8—17.

Fernandes K, Toma J, Miller F. Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2008. 363:185—198.

Ferrándiz N, Caraballo J M, García-Gutierrez L et al. 2012. p21 as a transcriptional co-repressor of S-phase and mitotic control genes. *PloS one*, 7(5), e37759.

Filion TM, Qiao M, Ghule PN, Mandeville M, van Wijnen AJ, Stein JL et al. 2009. Survival responses of human embryonic stem cells to DNA damage. *J Cell Physiol* 220:586—92.

Florek M, Haase M, Marzesco AM et al. 2005. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell and tissue research.* 319(1):15—26.

Fonager J. et al. 2002. Mild stress-induced stimulation of heat-shock protein synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Experimental gerontology.* 37(10):1223—1228.

Fong CY, Sathananthan AH, Wong PC, Bogso A. 2004. Nine-day-old human embryo cultured in vitro: a clue to the origins of embryonic stem cells. *Reprod. Biomed. Online.* 9:321—325.

Fong H, Hohenstein KA, Donovan PJ. 2008. Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26:1931—1938.

Franke J, Eichner S, Zeilinger C, Kirschning A. 2013. Targeting heat-shock-protein 90 (Hsp90) by natural products: geldanamycin, a show case in cancer therapy. *Natural product reports.* 30(10):1299—1323.

FuX, Toh WS, LiuH, Lu K, Li M, Cao T. 2011. Establishment of clinically compliant human embryonic stem cells in an autologous feeder-free system. *Tissue Eng. Part C. Methods.* 17:927—937.

Funasaka T, Tsuka E, Wong RW. 2012. Regulation of autophagy by nucleoporin Tpr. *Scientific reports.* 2.

Furusawa Y, Iizumi T, Fujiwara Y et al. 2012. Inhibition of checkpoint kinase 1 abrogates G2/M checkpoint activation and promotes apoptosis under heat stress. *Apoptosis* 17:102—112.

Fuse T, Yamada K, Asai K, Kato T, Nakanishi M. 1996. Heat shock-mediated cell cycle arrest is accompanied by induction of p21 CKI. *Biochem Biophys Res Commun.* 225:759—763.

Gago N, Perez-Lopes V, Sanz-Jaka J. et al. 2009. Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells. *Stem Cells*. 27:1164—72.

Gargett CE. 2006. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells. *Aust. NZ J. Obstet. Gynaecol.* 46 : 250—253.

Gargett CE. 2007. Review article: stem cells in human reproduction. *Reproductive Sciences*, 14(5), 405—424.

Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM et al. 2009. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol. Reprod.* 80:1136—1145.

Gargett CE, Masuda H. 2010. Adult stem cells in the endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 16: 818—834.

Gargett CE, Healy DL. 2011. Generating receptive endometrium in Asherman's syndrome. *J. Hum. Reprod. Sci.* 4:49—52.

Grandela C, Pera MF, Wolvetang EJ. 2008. p53 is required for etoposide-induced apoptosis of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 1:116—28.

Goligorsky MS, Chen J, Patschan S. 2009. Stress-induced premature senescence of endothelial cells: a perilous state between recovery and point of no return. *Curr Opin Hematol* 16:215—219.

Goodell M A, Brose K, Paradis G et al. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* 183:1797—1806.

Götte M. 2011. Characterization of endometrial mesenchymal stemlike cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil Steril.* 95:423—6.

Götte M, Wolf M, Staebler A et al. 2011. Aberrant expression of the pluripotency marker SOX-2 in endometriosis. *Fertil Steril.* 95:338—41.

Greber B, Lehrach H, Adjaye J. 2007. Fibroblast Growth Factor 2 Modulates Transforming Growth Factor β Signaling in Mouse Embryonic Fibroblasts and Human ESCs (hESCs) to Support hESC Self- Renewal. *Stem Cells*. 25(2):455—464.

Guo YL, Chakraborty S, Rajan SS, Wang R, Huang F. 2010. Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence, and self-renewal. *Stem Cells Dev.* 19: 1321—31.

Gupta S, Knowlton AA. 2002. Cytosolic HSP60, hypoxia and apoptosis. *Circulation*. 106:2727—2733.

Gupta RS, Bowes T, Sadacharan S, Singh B. 2005. Intracellular Disposition of Mitochondrial Molecular Chaperones: HSP60, mHSP70, Cpn10 and TRAP-1. *Molecular chaperones and cell signaling*. Cambridge University Press. 22—42.

Gupta S, Knowlton A.A. 2007. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. *Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 292:H3052—H3056.

Gupta RK, Srinivas UK. 2008. Heat shock induces chromosomal instability in near-tetraploid embryonal carcinoma cells. *Cancer Biol Ther.* 7:1471—1480.

Guzhova IV, Shevtsov MA, Abkin SV, Pankratova KM, Margulis BA. 2013. Intracellular and extracellular Hsp70 chaperone as a target for cancer therapy. *International Journal of Hyperthermia.* 29(5):399—408.

Gutsmann-Conrad A, Heydari AR, You S, Richardson A. 1998. The expression of heat shock protein 70 decreases with cellular senescence in vitro and in cells derived from young and old human subjects. *Exp Cell Res.* 241:404—13.

Han X, Meng X, Yin Z et al. 2009. Inhibition of intracranial glioma growth by endometrial regenerative cells. *Cell Cycle.* 8:606—610.

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S et al. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science.* 318(5858):1920—1923.

Hansis C, Grifo JA, & Krey LC. 2000. Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Molecular human reproduction.* 6(11):999—1004.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 345:458—460.

Hartman CG. 1944. Regeneration of the monkey uterus after surgical removal of the endometrium and accidental endometriosis. *West J Surg Obstet Gynecol.* 52:87—102.

Harmon BV, Corder AM, Collins RJ et al. 1990. Cell death induced in a murine mastocytoma by 42–47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int J Radiat Biol.* 58:845—858.

Hattori N, Abe T, Hattori N, Suzuki M et al. 2004. Preference of DNA methyltransferases for CpG islands in mouse embryonic stem cells. *Genome research.* 14(9):1733—1740.

Hattori N, Imao Y, Nishino K et al. 2007. Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes to Cells.* 12(3). 387—396.

Hay DC, Sutherland L, Clark J, Burdon T. 2004. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 22:225—235.

He S, Zhang C, Shafi AA, Sequeira M et al. 2013. Potent activity of the Hsp90 inhibitor ganetespib in prostate cancer cells irrespective of androgen receptor status or variant receptor expression. *International journal of oncology.* 42(1):35.

Heins N, Englund MC, Sjoblom C. et al. 2004. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 22 (3):367—376.

Heneidi S, Simerman AA, Keller E et al. 2013. Awakened by cellular stress: isolation and characterization of a novel population of pluripotent stem cells derived from human adipose tissue. *PloS one*. 8(6):e64752.

Herbig U, Sedivy JM. 2006. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech. Ageing Develop*. 127:16—24.

Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S. et al. 2008. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*. 26:1695—1704.

Higuchi A, Ling QD, Ko YA et al. 2011. Biomaterials for the feeder-free culture of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Chem. Rev*. 111:3021—3035.

Hilbe W, Dirnhofer S, Greil R, Wöll E. 2004. Biomarkers in non-small cell lung cancer prevention. *European journal of cancer prevention*. 13(5):425—436.

Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O et al. 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 43:33—56.

Hill R, Bodzak E, Blough MD, Lee PW. 2008. P53 binding to the p21 promoter is dependent on the nature of DNA damage. *Cell Cycle*. 7:2535—2543.

Hoffman LM, Hall L, Batten JL et al. 2005. X- Inactivation Status Varies in Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem cells*. 23(10):1468—1478.

Holmberg CI, Hietakangas V, Mikhailov A et al. 2001. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J*. 20:3800—3810.

Holubcova Z, Matula P, Sedlackova M. et al. 2011. Human embryonic stem cells suffer from centrosomal amplification. *Stem Cells*. 29(1):46—56.

Horváth I, Glatz A, Nakamoto H et al. 2012. Heat shock response in photosynthetic organisms: membrane and lipid connections. *Progress in lipid research*. 51(3):208—220.

Hronik-Tupaj M, Rice WL, Cronin-Golomb M, Kaplan DL, Georgakoudi I. 2011. Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields. *Biomed Eng Online*. 10:19.

Hsu SF, Chao CM, Huang WT et al. 2013. Attenuating heat-induced cellular autophagy, apoptosis and damage in H9c2 cardiomyocytes by pre-inducing HSP70 with heat shock preconditioning. *International Journal of Hyperthermia*. 29(3):239—247.

Humphrey RK, Beattie GM, Lopez AD et al. 2004. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells*. 22(4):522—530.

Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L et al. 2011. Biomaterials for the feeder-free culture of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Chem. Rev*. 111:3021—3035.

Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L et al. 2005. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem cells*. 23(8):1035—1043.

Ichim TE, Alexandrescu DT, Solano F, et al. 2010a. Mesenchymal stem cells as antiinflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol* 260(2):75—82.

Ichim TE, Solano F, Lara F, et al. 2010b. Combination stem cell therapy for heart failure. *Int Arch Med*. 3(5).

Iliakis GE, Pantelias GE. 1989. Effects of hyperthermia on chromatin condensation and nucleoli disintegration as visualized by induction of premature chromosome condensation in interphase mammalian cells. *Cancer Res*. 49:1254—1260.

Inzunza J, Gertow K, Stromberg MA. et al. 2005. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells*. 23(4):544—549.

Jäättelä M. 2002. Programmed cell death: many ways for cells to die decently. *Annals of medicine*. 34(6):480—488.

Jäättelä M, Tschopp J. 2003. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nature immunology*. 4(5):416—423.

Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry*. 268(3):1517—1520.

jiang Feng M, Zhang L, Liu Z et al. 2013. The Expression and Release of Hsp60 in 6-OHDA Induced In Vivo and In Vitro Models of Parkinson's Disease. *Neurochemical research*. 38(10): 2180—2189.

James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. 2005 TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*. 132(6):1273—82.

Jolly C, Konecny L, Grady DL et al. 2002. In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J Cell Biol*. 156:775—781.

Jorritsma JB, Konings AW. 1984. The occurrence of DNA strand breaks after hyperthermic treatments of mammalian cells with and without radiation. *Radiat Res*. 98:198—208.

Jun JJ, Lau LF (2010) Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *AGING*. 2:627—631.

Kempner ES. 1993. Damage to proteins due to the direct action of ionizing radiation. *Q Rev Biophys*. 26:27—48.

Kim G, Meriin AB, Gabai VL et.al. 2012. The heat shock transcription factor Hsf1 is downregulated in DNA damage-associated senescence, contributing to the maintenance of senescence phenotype. *Aging Cell*. 11:617—627.

Ko E, Lee KY, Hwang DS. 2012. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells undergo cellular senescence in response to oxidative stress. *Stem Cells Dev* 21:1877—1886.

Kampinga HH, Dynlacht JR, Dikomey E. 2004. Mechanism of radiosensitization by hyperthermia (≥ 43 degrees C) as derived from studies with DNA repair defective mutant cell lines. *Int J Hypertherm* 20:131—139.

Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ et al. 2009. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones*. 14(1):105—111.

Kato K, Yoshimoto M, Kato K, et al. 2007. Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Hum. Reprod.* 22:1214—1223.

Kaushik S, Cuervo AM. 2012. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 22:407—17.

Kim HS, Oh SK, Park YB. et al. 2005. Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 23 (9):1228—1233.

Kedersha N, Anderson P. 2009. Regulation of translation by stress granules and processing bodies. *Progress in molecular biology and translational science*. 90:155—185.

Kedersha N, Ivanov P, Anderson P. 2013. Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends in biochemical sciences*. 38(10):494—506.

Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu S-J, Lanza R. 2006. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*. 444:481—485.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. 2007. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res. Ther.* 9(1):204

Kubikova I, Konecna H, Sedo O et al. 2009. Proteomic profiling of human embryonic stem cell-derived microvesicles reveals a risk of transfer of proteins of bovine and mouse origin. *Cytotherapy*. 11(3):330—340.

Kregel KC. 2002. Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*. 92(5):2177—2186.

Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW (2008) Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 34:657—667.

Kroemer G, Jäättelä M. 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Reviews Cancer*. 5(11):886—897.

Kruuv J, Glofcheski D, Cheng KH et al. 1983. Factors influencing survival and growth of mammalian cells exposed to hypothermia. I. Effects of temperature and membrane lipid perturbors. *J. Cell. Physiol.* 115:179—185.

Kupcova Skalnikova H. 2013 . Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie.* 95(12):2196—2211.

Kuroda Y, Kitada M, Wakao S et al. 2010. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:8639—8643.

Laemmli V. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680—685.

Laine SK, Alm JJ, Virtanen SP et al. 2012. MicroRNAs miR-96, miR-124, and miR-199a regulate gene expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry.* 113(8):2687—2695.

Lässer C. 2013. Identification and analysis of circulating exosomal microRNA in human body fluids. In *Circulating MicroRNAs.* Humana Press. 109—128.

Lasunskaia EB, Fridlianskaia I, Arnholdt AV, Kanashiro M, Guzhova I, Margulis B. 2010. Sub-lethal heat shock induces plasma membrane translocation of 70-kDa heat shock protein in viable, but not in apoptotic, U-937 leukaemia cells. *APMIS.* 118:179—87.

Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I et al. 2011. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell. Stem. Cell.* 8(1):106—118.

Lavoie J-F, Biernaskie J, Chen Y et al. 2009. Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. *Stem cells develop.* 18(6):893—905.

Lee J, Davidow LS, Warshawsky D. 1999. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nature genetics.* 21(4):400—404.

Lee JB, Song JM, Lee JE et al. 2004. Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. *Reproduction.* 128(6):727—735.

Lee J, Kim HK, Rho JY et al. 2006. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *Journal of Biological Chemistry.* 281(44):33554—33565.

Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, et al. 2006. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell.* 125(2):301—313.

Lee J, Go Y, Kang I 2010. Oct-4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells. *Biochem. J.* 426:171—18.

Lee E J, Kang HJ, Lee H N et al. 2012. New culture system for human embryonic stem cells: autologous mesenchymal stem cell feeder without exogenous fibroblast growth factor 2. *Differentiation.* 83:92—100.

- Lee MO, Moon SH, Jeong HC et al. 2013. Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules. *PNAS*.110(35):E3281—E3290.
- Lee YK, Liu DJ, Lu J et al. Aberrant Regulation and Modification of Heat Shock Factor 1 in Senescent Human Diploid Fibroblasts. 2009. *Journal of Cellular Biochemistry*. 106:267—278
- Li S, Chien S, Brånemark PI. 1999. Heat shock-induced necrosis and apoptosis in osteoblasts. *J Orthop Res*. 17:891—899.
- Li X, Chen H, Epstein PN. 2004. Metallothionein protects islets from hypoxia and extends islet graft survival by scavenging most kinds of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 279(1):765—771.
- Li W, Sahu D, Tsen F. 2012. Secreted heat shock protein-90 (Hsp 90) in wound healing and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1823(3):730—741.
- Liu AYC, Choi HS, Lee YK, Chen KY. 1991. Molecular events involved in transcriptional activation of heat shock genes become progressively refractory to heat stimulation during aging of human diploid fibroblasts. *Journal of cellular physiology*. 149(3):560—566.
- Liu JC, Guan X, Ryan JA et al. 2013. High Mitochondrial Priming Sensitizes hESCs to DNA-Damage-Induced Apoptosis. *Cell Stem Cell*. 13:1—9.
- Liu SP, Ding DC, Wang HJ et al. 2010. Nonsenescent Hsp27-upregulated MSCs implantation promotes neuroplasticity in stroke model. *Cell Transplant*. 19:1261—79.
- Liu TT, Hu CH, Tsai CD et al. 2010. Heat stroke induces autophagy as a protection mechanism against neurodegeneration in the brain. *Shock*. 34(6):643—648.
- Loewenbruck K, Storch A. 2011. Stem cell-based therapies in Parkinson's disease: future hope or current treatment option? *J. Neurol*. 258 (Suppl. 2):S346—S353.
- Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB et al. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature genetics*. 38(4):431—440.
- Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E et al. 2008. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp. Dermat*. 17:925—32.
- Lou KJ. 2013. Small molecules vs. teratomas. *SciBX: Science-Business eXchange*, 6(7).
- Lowry E, Richter L. 2006. Signaling in adult stem cells. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 12:3911—3927.
- Lu J, Hou R, Booth CJ, et al. 2006. Defined culture conditions of human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(15):5688—5693.
- Luchetti F, Mannello F, Canonico B et al. 2004. Integrin and cytoskeleton behaviour in human neuroblastoma cells during hyperthermia-related apoptosis. *Apoptosis*. 9:635—648.
- Luo LZ, Gopalakrishna-Pillai S, Nay SL et al. 2012. DNA repair in human pluripotent stem cells is distinct from that in non-pluripotent human cells. *PLoS ONE*. 7: e30541.

- Macip S, Igarashi M, Fang L et al. 2002. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J.* 21(9):2180—2188.
- Madlener S, Rosner M, Krieger S et al. 2009. Short 42 degrees C heat shock induces phosphorylation and degradation of Cdc25A which depends on p38MAPK, Chk2 and 14.3.3. *Hum Mol Genet.* 18:1990—2000.
- Maherali N, Hochedlinger K. 2009 Tgf β Signal Inhibition Cooperates in the Induction of iPSCs and Replaces Sox2 and cMyc. *Curr. Biol.* 19(20):1718—1723.
- Maiello M. et al. 1997. Basal synthesis of heat shock protein 70 increases with age in rat kidneys. *Gerontology.* 44(1):15—20.
- Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N et al. 2005. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 37:1099—1103
- Malik ZA, Kott KS, Poe AJ et al. 2013. Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 304(7):H954—H965.
- Mantel C, Guo Y, Lee MR et al. 2007. Checkpoint-apoptosis uncoupling in human and mouse embryonic stem cells: a source of karyotypic instability. *Blood.* 109(10):4518—4527.
- Marson A, Levine SS, Cole MF et al. 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell.* 134(3):521—533.
- Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:7634—7638.
- Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. 2005. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat. Med.* 11(2):228—232.
- Martins-Taylor K, Xu RH. 2012. Concise review: genomic stability of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 30(1):22—27.
- Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E et al. 2010. Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PLoS One.* 5:e10387.
- Matin MM, Walsh JR, Gokhale PJ et al. 2004. Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells.* 22:659—668.
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K et al. 1999. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *The EMBO journal.* 18(15):4261—4269.
- Matthai C, Horvat R, Noe M et al. 2006. Oct-4 expression in human endometrium. *Mol Hum Reprod.* 12:7—10.
- Matwee C, Kamaruddin M, Betts DH, Basrur W, King A. 2001. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development *Mol Hum Reprod.* 7:829—37.

- Maynard S, Swsitowska AM, Lee JW et al. 2008. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells*. 26:2266—74.
- McCready J, DSims J, Chan D, GJay D 2010. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer*.10:294.
- McGinley LM, McMahon J, Stocca A et al. 2013. Mesenchymal Stem Cell Survival in the Infarcted Heart Is Enhanced by Lentivirus Vector-Mediated Heat Shock Protein 27 Expression. *Human gene therapy*. 24(10):840—851.
- Meshorer E, Misteli T. 2006. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 7(7):540—546.
- Melchior K, Weiss J, Zaehres H et al. 2008. The WNT receptor FZD7 contributes to self-renewal signaling of human embryonic stem cells. *Biol. Chem*. 389:897—903.
- Meng X, Ichim TE, Zhong J et al. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J. Transl. Med*. 5:57.
- Michel M, Kupinski AP, Raabe I, Bökel C. 2012. Hh signalling is essential for somatic stem cell maintenance in the *Drosophila* testis niche. *Development*. 139(15):2663—2669.
- Milleron RS, Bratton SB. 2006. Heat shock induces apoptosis independently of any known initiator caspase-activating complex. *J Biol Chem*. 281:16991—17000.
- Milleron RS, Bratton SB. 2007 ‘Heated’ debates in apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 64:2329—2333.
- Mitalipova MM, Rao RR, Hoyer DM et al. 2005. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol*. 23:19—20.
- Montes R, Ligerio G, Sanchez L, Catalina P et al. 2009. Feeder-free maintenance of hESCs in mesenchymal stem cell-conditioned media: distinct requirements for TGF-beta and IGF-II. *Cell Res*. 19:698—709.
- Morimoto RI. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*. 12:3788—3796.
- Motojima F, Chaudhry C, Fenton WA et al. 2004. Substrate polypeptide presents a load on the apical domains of the chaperonin GroEL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(42):15005—15012.
- Mou X.Z, Lin J, Chen JY et al. 2013. Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells differentiate into functional hepatocyte-like cells. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 14(11):961—972.

Muenyi CS, States VA, Masters JH et al. 2011. Sodium arsenite and hyperthermia modulate cisplatin-DNA damage responses and enhance platinum accumulation in murine metastatic ovarian cancer xenograft after hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). *J Ovarian Res.* 4:9.

Murdoch A, Strachan T, Lako M. 2005. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells.* 23:1035—1043.

Murphy MP, Wang H, Patel AN et al. 2008. Allogeneic endometrial regenerative cells: An «Off the shelf solution» for critical limb ischemia? *J. Transl. Med.* 6:45.

Murshid A, Chou S, Prince T, Zhang Y, Bharti A et al. 2010. Protein kinase A binds and activates heat shock factor 1. *PLoS One.* 5: e13830.

Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB. 2011. Large potentials of small heat shock proteins. *Physiological Reviews.* 91(4):1123—1159.

Nadeau SI, Landry J. 2007. Mechanisms of activation and regulation of the heat shocksensitive signaling pathways. *Adv Exp Med Biol.* 594:100—113.

Nagaria P, Robert C, Rassool FV. 2013. DNA double-strand break response in stem cells: Mechanisms to maintain genomic integrity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 1830(2):2345—2353.

Nagori CB, Panchal SY, Patel H. 2011. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome. *Journal of human reproductive sciences.* 4(1):43.

Nakahata K, Miyakoda M, Suzuki K et al. 2002. Heat shock induces centrosomal dysfunction, and causes non-apoptotic mitotic catastrophe in human tumour cells. *Int J Hyperth.* 18:332—343.

Nakamoto H, Vigh L. 2007. The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci.* 64:294—306.

Navarro P, Chambers I, Karwacki-Neisius V et al. (2008). Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. *Science.* 321(5896):1693—1695.

Nguyen HP, Wu D. 2009. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol. Reprod.* 80:1136—1145.

Netzer WJ, Ulrich Hartl F. 1998. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and-independent mechanisms. *Trends in biochemical sciences.* 23(2):68—73.

Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 95(3), 379—391.

Niculescu AB, Chen X, Smeets M et al. 1998. Effects of p21Cip1/Waf1 at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Molecular and cellular biology.* 18(1):629—643.

- Nishida T, Akagi K, Tanaka Y. 1997. Correlation between cell killing effect and cell membrane potential after heat treatment: analysis using fluorescent dye and flow cytometry. *Int J Hyperth.* 13:227—234.
- Nitta M, Okamura H, Aizawa S, Yamaizumi M. 1997. Heat shock induces transient p53-dependent cell cycle arrest at G1/S. *Oncogene.* 15:561—568.
- Niwa H. 2007. Open conformation chromatin and pluripotency. *Genes & development.* 21(21):2671—2676.
- Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. 2009. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature.* 460(7251):118—122.
- Nospikel T. 2013. Genetic instability in human embryonic stem cells: prospects and caveats. *Future Oncology.* 9(6):867—877.
- Nunes E, Siede W. 1996. Hyperthermia and paraquat-induced G1 arrest in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is independent of the RAD9 gene. *Radiat Environ Biophys.* 35:55—57.
- Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A et al. 2004. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J. Exp. Med.* 200:425—435.
- Oberley TD, Swanlund JM, Zhang HJ, Kregel K.C. 2008. Aging results in increased autophagy of mitochondria and protein nitration in rat hepatocytes following heat stress. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 56(6):615—627.
- Obokata H, Wakayama T, Sasai Y et al. 2014a. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature.* 505(7485):641—647.
- Obokata H, Sasai Y, Niwa H. 2014b. Bidirectional developmental potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency. *Nature.* 505(7485):676—680.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells.* 19(3):193—204.
- Ogryzko VV, Wong P, Howard BH. 1997. WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol.* 17:4877—82.
- Ogura F, Wakao S, Kuroda Y. 2014. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with non-tumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem cells and development.* PMID: 24256547.
- Okamoto K, Okazawa H, Okuda A et al. 1990. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell.* 60(3):461—472.
- O'Neill KL, Fairbairn DW, Smith MJ, Poe BS. 1998. Critical parameters influencing hyperthermia-induced apoptosis in human lymphoid cell lines. *Apoptosis.* 3:369—375

Orciani M, Gorbi S, Benedetti M et al. 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.

Padykula HA, Coles LG, McCracken JA. 1984. A zonal pattern of cell proliferation and differentiation in the rhesus endometrium during the estrogen surge. *Biol Reprod.* 31:1103—18.

Palmieri SL, Peter W, Hess H, Schöler HR. 1994. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Developmental biology.* 166(1):259—267.

Palzer RJ, Heidelberger C. 1973. Studies on the quantitative biology of hyperthermic killing of HeLa cells. *Cancer Res.* 33:415—421.

Park HG, Han SI, Oh SY, Kang HS. 2005. Cellular responses to mild heat stress. *Cell Mol Life Sci.* 62:10—23.

Park JH, Daheron L, Kantarci S, Lee BS, Teixeira JM. 2011. Human endometrial cells express elevated levels of pluripotent factors and are more amenable to reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Endocrinology.* 152:1080—9.

Park JA, Kim YE, Seok HJ et al. 2011. Differentiation and upregulation of heat shock protein 70 induced by a subset of histone deacetylase inhibitors in mouse and human embryonic stem cells. *BMB Rep.* 44:176—81.

Park TS, Huo JS, Peters A et al. 2012. Growth Factor-Activated Stem Cell Circuits and Stromal Signals Cooperatively Accelerate Non-Integrated iPSC Reprogramming of Human Myeloid Progenitors. *PLoS ONE.* 7(8):e42838.

Parker AM, Katz AJ. 2006. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Exp. Opin. Biol. Ther.* 6:567—578.

Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V. 2003. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci.* 4:529—539.

Patel AN, Park E, Kuzman M et al. 2008. Multipotent menstrual blood stromal stem cells, isolation characterization and differentiation. *Cell Transplant.* 17:303—311.

Paul G, Ozen I, Christophersen NS, Reinbothe T, Bengzon J et al. 2012. The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells. *PLoS ONE.* 7(4):e35577.

Pawlik A, Nowak JM, Grzanka D et al. 2012. Hyperthermia induces cytoskeletal alterations and mitotic catastrophe in p53-deficient H1299 lung cancer cells. *Acta Histochem.* 115(1):8—15.

Pfister G, Stroh CM, Perschinka H et al. 2005. Detection of HSP60 on the membrane surface of stressed human endothelial cells by atomic force and confocal microscopy. *J. Cell. Sci.* 118: 1587—1594.

Piotrowicz RS, Weber LA, Hickey EILEEN, Levin EG. 1995. Accelerated growth and senescence of arterial endothelial cells expressing the small molecular weight heat-shock protein HSP27. *The FASEB journal*. 9 (11):1079—1084.

Prinsloo E, Setati MM, Longshaw VM, Blatch GL. 2009. Chaperoning stem cells: a role for heat shock proteins in the modulation of stem cell self-renewal and differentiation? *BioEssays*. 31:370—77.

Qin H, Yu T, Qing T et al. 2007. Regulation of apoptosis and differentiation by p53 in human embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 282:5842—52.

Rahimi RA, Leof, EB. 2007. TGF- β signaling: A tale of two responses. *Journal of cellular biochemistry*. 102(3):593-608.

Ramkisoensing AA, Pijnappels DA, Askar SFA et al. 2011. Human embryonic and fetal mesenchymal stem cells differentiate toward three different cardiac lineages in contrast to their adult counterparts. *PLoS ONE*. 6(9):e24164.

Rebuzzini P, Pignalosa D, Mazzini G et al. 2012. Mouse embryonic stem cells that survive γ -rays exposure maintain pluripotent differentiation potential and genome stability. *J Cell Physiol* 227:1242—9.

Rérole AL, Jegu G, Garrido C. 2011. Hsp70: anti-apoptotic and tumorigenic protein. *Molecular Chaperones*. 205—230.

Restall IJ, Lorimer IAJ. 2010. Induction of Premature Senescence by Hsp90 Inhibition in Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE*. 5(6): e11076.

Rezai Rad M, Wise GE, Brooks H, Flanagan MB, Yao S. 2013. Activation of proliferation and differentiation of dental follicle stem cells (DFSCs) by heat stress. *Cell Prolif*. 46:58—66.

Richards M, Fong CY, Chan WK et al. 2002. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat. Biotech- nol*. 20:933—936.

Richards M, Tan S, Fong CY et al. 2003. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 21(5):546—556.

Richter K, Haslbeck M, Buchner J. 2010. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell*. 40:253—266.

Ringrose L, Paro R. 2004. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu. Rev. Genet*. 38:413—443.

Ritossa F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experimentia*. 18:351—366.

Rivera RM, Kelley KL, Erdos GW, Hansen PJ. 2003. Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiologically relevant heat shock. *Biol Reprod.* 69:2068—2077.

Rodier F, Campisi J. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 192:547—556.

Roozen PPC, Brugman M H, Staal FJT. 2012. Differential requirements for Wnt and Notch signaling in hematopoietic versus thymic niches. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1266:78—93

Rosler E, Fisk GJ, Ares X, Irving J et al. 2004. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Develop. Dyn.* 229 : 259—274.

Rowley A, Johnston GC, Butler B et al. 1993. Heat shock-mediated cell cycle blockage and G1 cyclin expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 13:1034—1041.

Rydberg B. 2001. Radiation-induced DNA damage and chromatin structure. *Acta Oncol* 40: 682—685.

Salem HK, Thiemermann C. 2010. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem cells.* 28(3):585—596.

Salingcarboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K et al. 2003. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp. Cell Res.* 287(2):289—300.

Samali A. 2005. CD95-mediated alteration in Hsp70 levels is dependent on protein stabilization. *Cell Stress Chaperones* 10:59—65.

Sandqvist A, Björk JK, Åkerfelt M et al. 2009. Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Molecular biology of the cell.* 20(5):1340—1347.

Sanchez L, Gitierrez-Aranda I, Ligerio G et al. 2012. Maintenance of hESCs in media conditioned by human mesenchymal stem cells obviates the requirement of exogenous bFGF supplementation. *Tissue Eng. Part C. Methods.* 18:387—396.

Sato N, Meijer L, Skaltsounis L et al. 2003. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature medicine.* 10(1):55—63.

Sato Y, Araki H, Kato J et al. 2005. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood.* 106(2):756—763.

Saretzki G, Armstrong L, Leake A, Lako M, von Zglinicki T. 2004. Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. *Stem Cells.* 22:962—71.

- Saretzki G, Walter T, Atkinson S, Passos JF, Bareth B, Keith WN et al. 2008. Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 26:455—64.
- Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI. 1993. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Molecular and cellular biology*. 13(3):1392—1407.
- Scaffidi P, Misteli T. 2008. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nature Cell Biology*. 10(4):452—459.
- Schüring AN, Schulte N, Kelsch R et al. 2011. Characterization of endometrial mesenchymal stemlike cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil Steril*. 95:423—6.
- Schmitt E, Gehrman M, Brunet M et al. 2007. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J. Leuock Biol*. 81:15—27.
- Schuldiner M, Benvenisty N. 2003. Factors controlling human embryonic stem cell differentiation. *Methods in enzymology*. 365:446—461.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S et al. 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 364(9429):149—155.
- Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32.
- Selye H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal* 1:1383—1392.
- Sherman M. 2010. Major heat shock protein Hsp72 controls oncogene-induced senescence. *Ann N Y Acad Sci*. 1197:152—157.
- Shi Y, Massagué J. 2003. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113(6):685—700.
- Shui C, Scutt A. 2001. Mild heat shock induces proliferation, alkaline phosphatase activity, and mineralization in human bone marrow stromal cells and Mg-63. *Cells In Vitro J Bone Miner Res*. 16:731—741.
- Sidera K, Patsavoudi E. 2009. Extracellular HSP90: An Emerging Target for Cancer Therapy Current Signal Transduction Therapy. 4:51—58.
- Silva SS, Rowntree RK, Mekhoubad S, Lee JT. 2008. X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(12):4820—4825.
- Söti C, Sreedhar AS, Csermely P. 2003. Apoptosis, necrosis and cellular senescence: chaperone occupancy as a potential switch. *Aging Cell*. 1:39—45.

Söti C, Csermely P. 2007. Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease. *J Biosci.* 32:511—515.

Sokolov M, Panyutin I, Onyshchenko M, Panyutin I, Neumann R. 2010. Expression of pluripotency-associated genes in the surviving fraction of cultured human embryonic stem cells is not significantly affected by ionizing radiation. *Gene.* 455:8—15.

Solter D, Knowles BB. 1975. Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72(12):5099—5102

Son YS, Park JH, Kang YK et al. 2005. Heat Shock 70-kDa protein 8 isoform 1 is expressed on the surface of human embryonic stem cells and downregulated upon differentiation. *Stem Cells.* 23:1502—13.

Song X, Kim HC, Kim SY et al. 2012. Hyperthermia- enhanced TRAIL- and mapatumumab- induced apoptotic death is mediated through mitochondria in human colon cancer cells. *Journal of cellular biochemistry.* 113(5):1547—1558.

Spallarossa P, Altieri P, Barisione C, Passalacqua M et al. 2010. p38 MAPK and JNK antagonistically control senescence and cytoplasmic p16INK4A expression in doxorubicin-treated endothelial progenitor cells. *PLoS ONE.* 5(12): e15583.

Spector NL, Ryan C, Samson W et al. 1993. Heat shock protein is a unique marker of growth arrest during macrophage differentiation of HL- 60 cells. *Journal of cellular physiology.* 156(3): 619—625.

Stadtfeld M, Graf T. 2005. Assessing the role of hematopoietic plasticity for endothelial and hepatocyte development by non-invasive lineage tracing. *Development.* 132(1):203-213.

Stahl J, Wobus AM, Ihrig Se H et al. 1992. The small heat shock protein hsp25 is accumulated in P19 embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells of line BLC6 during differentiation. *Differentiation.* 51(1):33—37.

Stagg J. 2007. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue antigens.* 69(1):1—9.

Stambrook PJ, Tichy ED. 2010. Preservation of genomic integrity in mouse embryonic stem cells. *Adv Exp Med Biol.* 695:59—75.

Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP et al. 2005. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem.* 280:38729—39.

Stojkovic P, Lako M, Przyborski S et al. 2005. Human-serum matrix supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 23:895—902.

Stolberg S, McCloskey KE. 2009. Can shear stress direct stem cell fate? *Biotechnol Progress* 25:10—19.

- Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. 2008. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 129:163—73.
- Strelchenko N, Verlinsky Y. 2006. Embryonic stem cells from morula. *Meth. Enzymol.* 418:93—108.
- Stricher F, Macri C, Ruff M, Muller S. 2013. HSPA8/HSC70 chaperone protein. *Autophagy*. 9(12):1937—1954.
- Strub GM, Depcrynski A, Elmore LW, Holt SE. 2008. Recovery from stress is a function of age and telomere length. *Cell Stress Chaperones*. 4:475—82.
- Suemori H, Yasuchika K, Hasegawa K et al. 2006. Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34:926—932.
- Sumi T, Fujimoto Y, Nakatsuji N, Suemori H. 2004. STAT3 Is Dispensable for Maintenance of Self-Renewal in Nonhuman Primate Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 22(5):861—872.
- Suzuki M, Boothman DA. 2008. Stress-induced premature senescence (SIPS) - influence of SIPS on radiotherapy. *J Radiat Res*. 49:105—112.
- Taapken SM, Nisler BS, Newton MA et al. 2011. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29:313—314.
- Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:515—528.
- Takahashi A, Matsumoto H, Nagayama K et al. 2004. Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing. *Cancer Res*. 64:8839—8845.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126: 663—676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131:861—872.
- Takeda J, Seino S, Bell GI. 1992. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic acids research*. 20(17):4613—4620.
- Tang QQ, Lane MD. 2012. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annual review of biochemistry*. 81:715—736.
- Tang C, Lee AS, Volkmer et al. 2011. An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nature biotechnology*, 29(9):829—834.

- Tarnowski M, Sieron AL. 2006. Adult stem cells and their ability to differentiate. *Medical science monitor*. 12(8):RA154.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS. et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282(5391):1145—1147.
- Tichy E.D, Pillai R, Deng L et al. 2010. Mouse embryonic stem cells, but not somatic cells, predominantly use homologous recombination to repair double-strand DNA breaks. *Stem Cells Dev*. 19:1699—1711.
- Tichy ED, Liang L, Deng L et al. 2011. Mismatch and base excision repair proficiency in murine embryonic stem cells. *DNA repair*. 10(4):445—451.
- Toivola DM, Strnad P, Habtezion A, Omary MB. 2010. Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends in cell biology*. 20(2):79—91.
- Toma J, Akhavan M, Fernandes K et al. 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol*. 3:778—84.
- Toma J, McKenzie I, Bagli D et al. 2005. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 23: 727—37.
- Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 35:927—45.
- Tower J. Stress and stem cells. 2012. *WIREs Dev Biol*. doi: 10.1002/wdev.56
- Toyoda M, Cui C, Umezawa A. 2007. Myogenic transdifferentiation of menstrual blood-derived cells. *Acta Myol*. 26:176—178.
- Tresserra F, Grases P, Ubeda A et al. 1999. Morphological changes in hysterectomies after endometrial ablation. *Hum Reprod*. 14:1473—7.
- Tsai ZY, Singh S, Yu SL et al. 2010. A feeder-free culture using autogeneic conditioned medium for undifferentiated growth of human embryonic stem cells: comparative expression profiles of mRNAs, microRNAs and proteins among different feeders and conditioned media. *BMC Cell Biol*. 11:76.
- Tsai SY, Bouwman BA, Ang YS et al. 2011. Single transcription factor reprogramming of hair follicle dermal papilla cells to induced pluripotent stem cells. *Stem cells*. 29(6):964—971.
- Tsuji S, Yoshimoto M, Takahashi K et al. 2008. Side population cells contribute to the genesis of human endometrium. *Fertil Steril*. 90(4 Suppl):1528—37
- Tsutsui H, Valamehr B, Hindoyan A et al. 2011. An optimized small molecule inhibitor cocktail supports long-term maintenance of human embryonic stem cells. *Nat. Commun*. 2:167.

Unno K, Asakura H, Shibuya Y, et al. 2000. Increase in basal level of Hsp70, consisting chiefly of constitutively expressed Hsp70 (Hsc70) in aged rat brain. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 55(7):B329—B335.

Vaculik C, Schuster C, Bauer W, Iram N et al. 2012. Human dermis harbors distinct mesenchymal stromal cell subsets. *Journal of Investigative Dermatology*. 132:563—574.

Valenzuela MT, Nunez MI, Villalobos M et al. 1997. A comparison of p53 and p16 expression in human tumor cells treated with hyperthermia or ionizing radiation. *International journal of cancer*. 72(2):307—312.

Valamehr B, Tsutsui H, Ho CM, Wu H. 2011. Developing defined culture systems for human pluripotent stem cells. *Regen. Med*. 6:623—634.

Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M. 2004. Stem cells and cancer: the polycomb connection. *Cell*. 118(4):409-418.

Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. 2005. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of cell science*. 118(19):4495—4509.

Van Hoof D, D'Amour KA, German MS. 2009. Derivation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Stem Cell Res*. 3(2-3):73—87.

VanderWaal R, Malyapa RS, Higashikubo R, Roti Roti JL. 1997. A comparison of the modes and kinetics of heat-induced cell killing in HeLa and L5178Y cells. *Radiat Res*. 148:455—462.

Vanderwaal RP, Maggi LB Jr, Weber JD et al. 2009. Nucleophosmin redistribution following heat shock: a role in heat-induced radiosensitization. *Cancer Res*. 69:6454—6462.

Vazin T, Freed WJ. 2010. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor. Neurol. Neurosci*. 28:589—603.

Velichko AK, Lagarkova MA, Philonenko ES et al. 2011. Sensitivity of human embryonic and induced pluripotent stem cells to a topoisomerase II poison etoposide. *Cell Cycle*. 10:2035—37.

Velichko AK, Petrova NV, Kantidze OL, Razin SV. 2012. Dual effect of heat shock on DNA replication and genome integrity. *Mol Biol Cell*. 23:3450—3460.

Velichko A K, Markova EN, Petrova NV et al. 2013. Mechanisms of heat shock response in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70(22):4229—4241.

Verheyen EM, Gottardi CJ. 2010. Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases. *Dev Dyn*. 239(1):34—44.

Vidair CA, Dewey WC. 1988. Two distinct modes of hyperthermic cell death. *Radiat Res*. 116:157—171.

- Vigh L, Nakamoto H, Landry J, Gomez-Munoz A, et al. 2007. Membrane regulation of the stress response from prokaryotic models to mammalian cells. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1113:40—51.
- Vinoth KJ, Heng BC, Poonepalli A et al. 2008. Human embryonic stem cells may display higher resistance to genotoxic stress as compared to primary explanted somatic cells. *Stem Cells Dev.* 17:599—607.
- Vishnubalaji R, Al-Nbaheen M, Kadalmani B et al. 2012. Skin-derived multipotent stromal cells—an archrival for mesenchymal stem cells. *Cell and tissue research* 350(1):1—12.
- Vogel JL, Parsell DA, Lindquist S. 1995. Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation. *Current Biology.* 5(3):306—317.
- Vos MJ, Hageman J, Carra S, Kampinga HH. 2008. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry.* 47:7001—7011.
- Wadhwa R, Kaul SC, Sugimoto Y, Mitsui Y. 1993. Induction of cellular senescence by transfection of cytosolic mortalin cDNA in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem.* 268(30):22239—42.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A et al. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology.* 33(11):1402-1416.
- Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Shigemoto T, Matsuse D, et al. 2011. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:9875—9880.
- Wakao S, Kitada, M. Dezawa M. 2013. The elite and stochastic model for iPS cell generation: Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells are readily reprogrammable into iPS cells. *Cytometry*, 83A:18—26.
- Wakao S, Akashi H, Kushida Y, Dezawa M. 2014. Muse cells, newly found non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues. *Pathology international.* 64(1):1—9.
- Wang Y, Guan J, Wang H, Leeper D, Iliakis G. 2001. Regulation of DNA replication after heat shock by replication protein a-nucleolin interactions. *J Biol Chem.* 276:20579—20588.
- Wang S, Qu X, Zhao RC. 2011. Mesenchymal stem cells hold promise for regenerative medicine. *Front. Med.* 5:372— 378.
- Wang Q, Mou X, Cao H et al. 2012. A novel xeno-free and feeder-cell-free system for human pluripotent stem cell culture. *Protein Cell.* 3:51—59.

- Wang SH, Tsai MS, Chiang MF, Li H. 2003. A novel NK-type homeobox gene, ENK (early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells, Gene expression patterns. 3(1):99—103.
- Wang X, Zhao Y, Xiao Z et al. 2009. Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response. Stem Cells. 27(6):1265—1275.
- Wang X, Dai J. 2010. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. Stem cells. 28(5):885—893.
- Ware CB, Nelson AM, Blau CA. 2006. A comparison of NIH-approved human ESC lines. Stem cells. 24(12):2677—2684.
- Warters RL, Brizgys LM, Axtell-Bartlett J. 1985. DNA damage production in CHO cells at elevated temperatures. J Cell Physiol. 124:481—486.
- Welch WJ, Suhan JP. 1985. Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. J Cell Biol. 101:1198—1211.
- Wernig M, Zhao JP, Pruszak J et al. 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences. 105(15):5856—5861.
- Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM Jr, Sistonen L, Morimoto RI. 2009. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. Science. 323:1063—1066.
- Wilson KD, Sun N, Huang M et al. Effects of ionizing radiation on self-renewal and pluripotency of human embryonic stem cell. Cancer Res. 2010; 70: 5539—48.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE et al. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. Dev. Genet. 18:173—179.
- Wobus AM, Boheler KR. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiological reviews. 85(2):635—678.
- Wong SS, Bernstein HS. 2010. Cardiac regeneration using human embryonic stem cells: producing cells for future therapy. Regen. Med. 5(5):763—775.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J. Neurosci. Res. 61(4):364—370.
- Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. 2006. Activin A Maintains Self- Renewal and Regulates Fibroblast Growth Factor, Wnt, and Bone Morphogenic Protein Pathways in Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells. 24(6):1476—1486.
- Xu C, Inokuma MS, Denham J et al. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. 19:971—974.

- Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G. 2009. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*. 137(4):647—658.
- Xu RH, Chen X, Li DS et al. 2002. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nature biotechnology*. 20(12):1261—1264.
- Xu RH, Peck RM, Li DS et al. 2005. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nature methods*. 2(3):185—190.
- Yamaguchi T, Suzuki T, Arai H, Tanabe S, Atomi Y. 2010. Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber type from fast to slow. *Am J Physiol Cell Physiol*. 298:140—148.
- Yao S, Gutierrez DL, He H, Dai Y, Liu D, Wise GE. 2011. Proliferation of dental follicle-derived cell populations in heat-stress conditions. *Cell Prolif*. 44:486—493.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K et al. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318(5858):1917—1920.
- Yu SP, Wei Z, Wei L. 2013. Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy. *Translational stroke research*. 4(1):76—88.
- Zeiner M, Gebauer M, Gehring U. 1997. Mammalian protein RAP46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins. *EMBO J*. 16:5483—5490.
- Zhang Y, Herbert BS, Rajashekhar G et al. 2009. Premature senescence of highly proliferative endothelial progenitor cells is induced by tumor necrosis factor-alpha via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *FASEB J*. 23:1358—1365.
- Zhao Y, Gong S, Shunmei E, Zou J. 2009. Induction of macroautophagy by heat. *Molecular biology reports*. 36(8):2323—2327.
- Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. 2012 . Embryonic stem cell markers. *Molecules*. 17(6):6196—236.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 7:211—228.