

На правах рукописи

АЛЕКСЕЕНКО
Лариса Леонидовна

**РЕАКЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
НА ТЕПЛОВОЙ СТРЕСС**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН), Санкт-Петербург

Научный руководитель:

доктор биологических наук, академик РАН
Никольский Николай Николаевич
заведующий Отделом внутриклеточной
сигнализации и транспорта Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки «Институт цитологии» Российской
академии наук, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
Климович Владимир Борисович
руководитель Лаборатории гибридной
технологии Федерального государственного
бюджетного учреждения «Российский
научный центр радиологии и хирургических
технологий», Санкт-Петербург

кандидат биологических наук, доцент
Малашичева Анна Борисовна
заведующая научно-исследовательской
лабораторией молекулярной кардиологии
Федерального медицинского
исследовательского центра имени В.А.
Алмазова Минздрава РФ, Санкт-Петербург

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Научно-исследовательский
институт онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава РФ, Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится « » июня 2014 года в « » часов на заседании

Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе ИНЦ РАН

по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4

Сайт института: www.cytspb.rssi.ru

Электронный адрес: cellbio@incras.ru

Факс: 8(812)297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНЦ РАН

и на сайте www.cytspb.rssi.ru.

Автореферат разослан « » 2014 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Эмбриональные стволовые клетки и стволовые клетки взрослого организма являются хорошей экспериментальной моделью для фундаментальных исследований в области клеточной биологии, фармакологии и регенеративной 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 С (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 протеотоксических 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 клеток (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 клеток 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.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 133 страницах машинописного текста и иллюстрированы 27 рисунками. Работа выполнена при финансовой поддержке программ президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Гос. контракта № 16.512.11.2191 ФЦП.

Личный вклад автора

Большинство экспериментальных процедур, описанных в работе, были проведены автором лично. Структурный кариотипический анализ проводили совместно с Т.М. Гринчук. Анализ проб на проточном цитофлуориметре осуществляли В.В. Зенин и О.Г. Люблинская. Анализ белков методом электрофореза осуществляли совместно с И.В. Гужовой и Е.Б. Буровой. Культивирование эмбриональных стволовых клеток человека проводили совместно с Н.А. Пуговкиной. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Материалы и методы

Культивирование клеток. В работе были использованы эмбриональные стволовые клетки человека линии С910 (чЭСК), фибробластоподобные клетки, полученные в результате спонтанной дифференцировки чЭСК через эмбрионидные тельца (чЭСК-ДИФ) и линия мезенхимных стволовых клеток эндометрия 2304 (эМСК). Для культивирования и дифференцировки чЭСК использовали стандартные процедуры (Кожухарова и др., 2009). Для поддержания чЭСК в качестве фидера использовали МСК эндометрия, инактивированные митомицином С. Для всех экспериментальных исследований клетки выращивали без фидера на 35-миллиметровых культуральных чашках или покровных стёклах, покрытых матригелем (BD Bioscience). Для культивирования эМСК использовали условия, описанные ранее (Земелько и др., 2011).

Температурная обработка клеток. Клетки прогревали в водяной бане в 3.5-сантиметровых чашках, с добавлением 1.8 мл среды при 45 С° в течение 10 и 30 мин.

Построение кривых клеточного роста. Пролиферативную активность клеток оценивали как функцию их количества от времени. Среднее время удвоения популяции T_d считали по формуле $T_d = \frac{t \ln 2}{\ln \frac{N_t}{N_0}}$, где t – время прироста популяции, N_t – количество клеток

через время t , N_0 – исходное количество клеток. Подсчет клеток проводили в трех независимых экспериментах с двумя повторами.

Иммунофенотипический анализ. Иммунофенотипический анализ проводили с использованием проточного цитофотометра Epics XL. Для анализа использовали антитела к CD9, CD11a, CD13, CD34, CD44, CD45, CD105, CD117, CD146, CD90, HLA-2, CD73, CD29, конъюгированные с фикоэритрином (PE) или флуоресцеином изотиоцианатом (FITC).

Анализ клеточного цикла. Клеточную суспензию пермеабелизовали раствором сапонины (250 мкг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре, затем добавляли РНКазу А (250 мкг/мл), йодистый пропиций (50 мкг/мл) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили, используя цитофотометр Epics XL (Beckman Coulter, США). Доля клеток в разных фазах цикла определялась при помощи программного обеспечения WinList и ModFit LT.

Анализ апоптоза. Для выявления фракции апоптотических клеток использовали комбинированную окраску йодистым пропицием (PI) и аннексином V (AnV), конъюгированным с FITC. Клетки были исследованы при помощи проточного цитофотометра Epics XL. Количество апоптотических клеток определяли как долю клеток, окрашенных аннексином V, но не окрашенных йодистым пропицием (фракция AnV^+/PI^-), и выражали в процентах от общего количества анализируемых клеток. Детекцию клеток с конденсированными или фрагментированными ядрами, окрашенными DAPI, проводили при помощи конфокального микроскопа в трех независимых экспериментах. Анализировали не менее 500 клеток в разных полях зрения.

Кариотипирование. Для накопления клеток в стадии метафазы в клеточную культуру в логарифмической фазе роста добавляли демиколцин в конечной концентрации 0.01–0.02 мкг/мл среды, в качестве гипотонического раствора использовали 0.56 % KCl. Фиксацию клеток производили смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1). Для дифференциальной окраски хромосом на G-диски красителем Гимза проводили предварительную обработку 0.25 % трипсином. Метафазные пластинки анализировали с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss). Идентифицировали хромосомы в соответствии со стандартной номенклатурой (Мамаева, 2002). Частоту встречаемости в популяции полиплоидных клеток оценивали при визуальном анализе под микроскопом не менее 200 метафазных пластинок.

Иммуноцитохимия. Клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали 4 %-ным раствором параформальдегида, пермеабелизовали 0.1 %-ным раствором Тритона X-100, блокировали неспецифическое связывание антител в 0.1 %-ном растворе BSA, далее

окрашивали специфическими антителами. Для окраски ядер использовали DAPI. Полученные препараты анализировали с помощью конфокальных лазерных люминесцентных микроскопов Leica TCS CL и Leica TCS SP5. В работе использовали мышинные моноклональные антитела против Hsp70, Ki-67, Oct4, SSEA-4, ABCG2, мышечного α -актина, виментина, α -фетопротейна, кроличьи моноклональные антитела против Hsc70, NF-H, NeuN, III β -тубулина и кроличьи поликлональные антитела против III β -тубулина. В качестве вторых антител применяли козы антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с Dylight 488, овечьи антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с Cy3, и козы антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с Cy2.

Активность щелочной фосфатазы выявляли с использованием набора реагентов «Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit» (Sigma) согласно протоколу производителей.

Выявление активности SA- β -gal проводили при помощи фирменного набора «Senescence galactosidase staining kit» (Cell Signaling Technology) в соответствии с рекомендациями производителя.

Электрофорез и иммуоблоттинг. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976), используя овалбумин для построения калибровочной кривой. Разделение белков производили при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по стандартному протоколу (Laemmli, 1970). Белки переносили из геля на мембрану PVDF при помощи влажного электропереноса и выявляли первыми антигенспецифическими (p21^{Waf1/Cip1}, hsp70, hsc70) и вторыми видоспецифическими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, методом хемилюминесценции. Денситометрию проводили с помощью программы Scion Image, версия 4.0.3.2.

Анализа генной экспрессии с помощью ОТ-ПЦР. Тотальную РНК выделяли из клеток с помощью системы RNeasy Micro Kit или RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США) согласно протоколу производителя. Синтез кДНК проводили с использованием 1–0.5 мкг тотальной РНК при помощи системы RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) в соответствии с рекомендациями производителя. Десятая часть кДНК каждой линии была амплифицирована при помощи 0.5 единиц ДНК полимеразы с использованием специфичных олигонуклеотидных праймеров (Кожухарова и др., 2009; Alekseenko et al., 2014) на амплификаторе Cycler Temp (CTM, Россия) по следующей программе: денатурация, 93 °C в течение 45 с; отжиг праймеров, 55–70 °C в течение 1 мин; удлинение цепи, 72 °C в течение 1 мин 30 с; завершающее удлинение цепи — 72 °C в течение 10 мин. В качестве количественного контроля кДНК использовали олигонуклеотидные праймеры β -актина и gapdh. Электрофорез амплифицированного продукта проводили в 2 %-ном агарозном геле,

содержащем буфер TAE с бромистым этидием. В качестве маркера молекулярной массы использовали 1000 или 100 Kb DNA ladder (Gibco). 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.

Адипогенную, остеогенную и нейральную дифференцировку проводили по стандартному протоколу, описанному Алексеенко и др. (Alekseenko et al., 2014).

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. Результаты выражены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

1. Клеточные линии, использованные в работе

1.1 Характеристика клеточной линии чЭСК C910. Линия чЭСК C910 получена из

бластоцисты человека с развитой внутренней клеточной массой. Клетки обладают типичной для ЭСК морфологией и способны размножаться в культуре в течение длительного времени. Время удвоения популяции составляет 28 ч. При длительном культивировании клетки сохраняют диплоидный кариотип (Рис. 1, Г). Анализ линии чЭСК C910

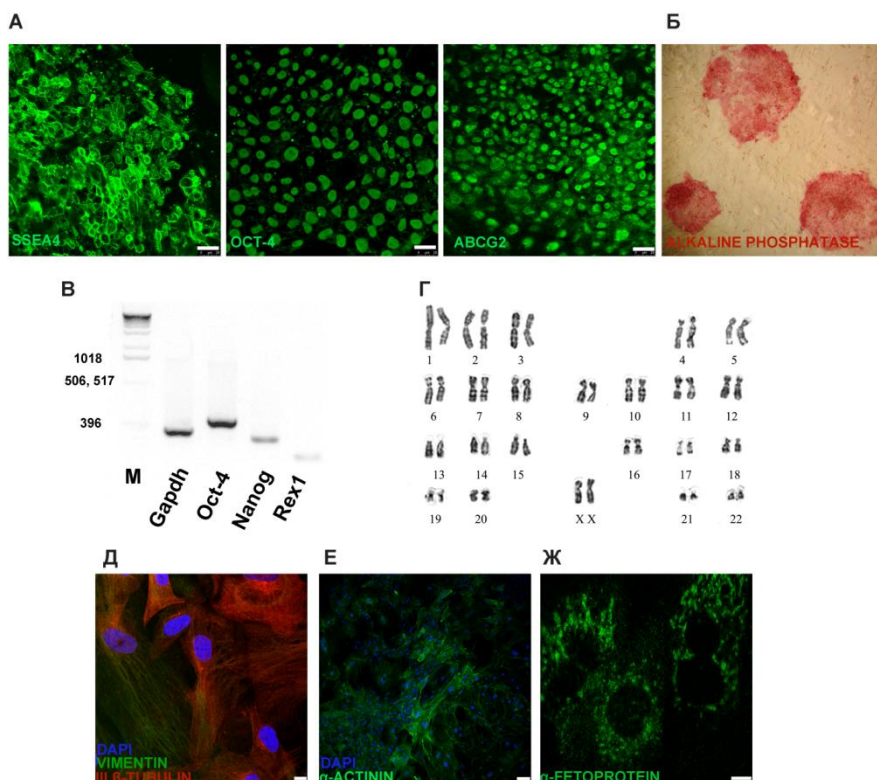


Рис. 1. Клеточная линия чЭСК C910 обладает всеми типичными признаками плюрипотентности

(А) Иммуноцитохимический анализ маркеров плюрипотентности линии ч ЭСК C910. 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 C910. (Г) Кариотип клеток линии чЭСК C910 ($2n = 46 XX$). Об. 40х. (Д, Е, Ж) Дифференцировка чЭСК C910 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.

методами иммуноцитохимии, ОТ-ПЦР и цитохимии выявил экспрессию маркеров плюрипотентности Oct-4, Nanog, SSEA-4, Rex1 (Рис. 1, А, В), характерных для ЭСК человека, а также экспрессию щелочной фосфатазы (Рис. 1, Б). чЭСК могут дифференцироваться в клетки трёх зародышевых листков – эктодерму, мезодерму и энтодерму (Рис. 1, Д, Е, Ж).

1.2 Характеристика фибробластоподобных клеток (чЭСК-ДИФ).

Дифференцировку чЭСК индуцировали получением эмбрионидных телец, как описано ранее (Кожухарова и др., 2009). Дифференцированные производные чЭСК имели диплоидное число хромосом 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, 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. 2). Все эксперименты с чЭСК-ДИФ проводились на 5–7-м пассажах.

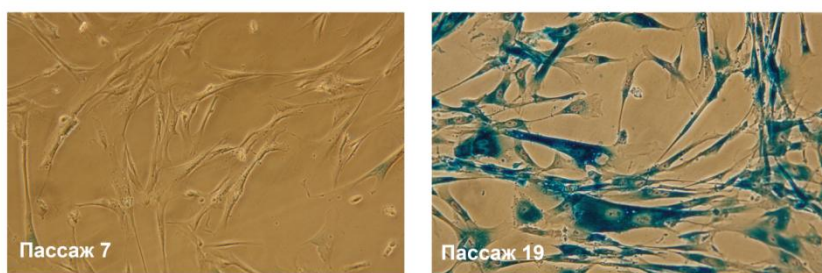


Рис. 2. Репликативное старение чЭСК-ДИФ

Экспрессия β -галактозидазы, ассоциированной со старением, на разных пассажах культивирования чЭСК-ДИФ. Об. 20х.

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., 2011. эМСК морфологически сходны с фибробластами (Рис. 3, А).

А	Б	
	Поверхностный маркер	Доля маркера %
	CD 9	98.00 ± 1.20
	CD 13	99.75 ± 0.15
	CD 29	99.90 ± 0.10
	CD 44	99.60 ± 0.10
	CD 73	99.90 ± 0.10
	CD 90	95.35 ± 1.35
	CD105	99.80 ± 0.10
	CD146	94.45 ± 0.45
	CD11a	3.32 ± 2.76
	CD 19	0.28 ± 0.10
	CD 34	0.22 ± 0.20
	CD 45	0.80 ± 0.10
	CD 117	3.73 ± 2.91
	HLA - DR	0.93 ± 0.47

Рис. 3. Характеристика клеток линии эМСК 2304

(А) Рост клеток в культуре. Об. 10х.
(Б) МСК-поверхностные маркеры.

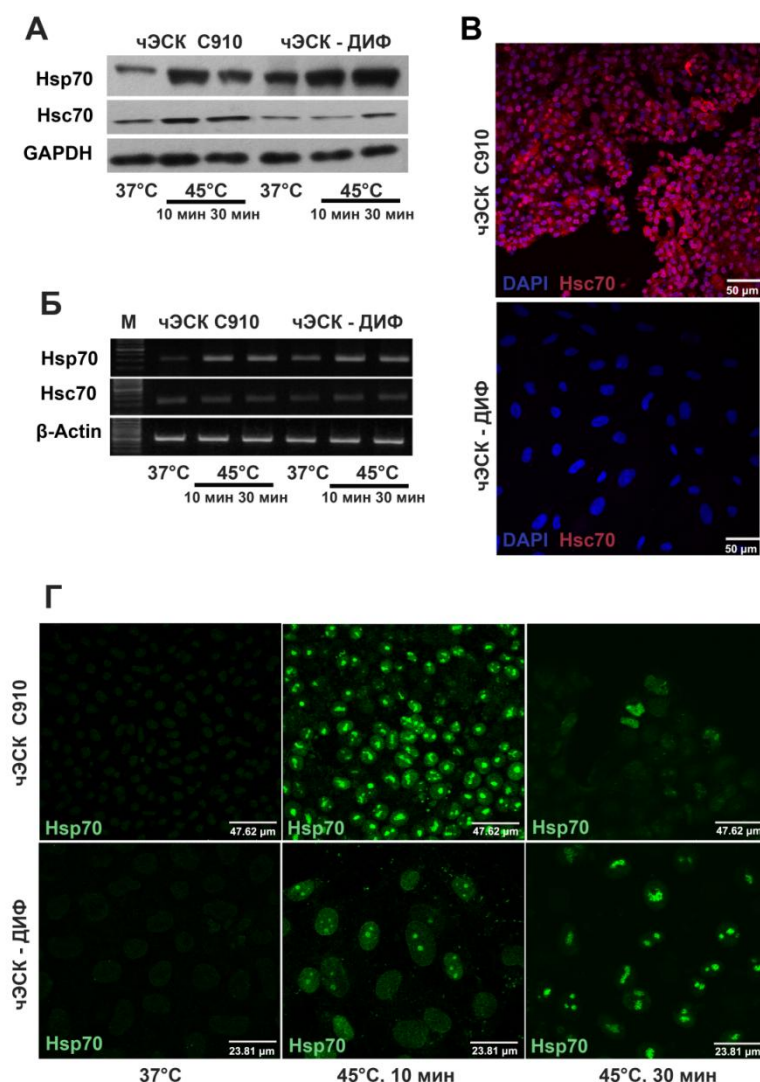
Они характеризуются высоким уровнем пролиферации (время удвоения составляет 26—27 ч) и высокой эффективностью клонирования (более 60 %). В процессе культивирования *in vitro* клетки проходят более 45 удвоений популяции, не подвергаются трансформации и сохраняют нормальный диплоидный кариотип (Домнина и др., 2013). эМСК

характеризуются позитивной экспрессией поверхностных маркеров CD73, CD90, CD105, CD13, CD29 и CD44, а также отсутствием экспрессии маркеров CD19, CD34, CD45, CD117, CD130 и HLA-DR (класса II), что подтверждает их мезенхимное, а не гемопоэтическое происхождение (**Рис. 3, Б**). эМСК являются мультипотентными и могут направленно дифференцироваться в другие типы клеток мезодермы (адипоциты и остеобласты). Все перечисленные выше свойства позволяют говорить о сходстве эМСК с МСК костного мозга (Allickson and Xiang, 2012), которые являются наиболее изученными СК взрослого организма.

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 изучили реакцию чЭСК и их дифференцированных производных на тепловой стресс.

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. 4, 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. 4, 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 эмбрионидных телец (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 клеток (**Рис. 4, 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



присутствия Hsp70 на поверхностной мембране обоих типов клеток. Биологическое значение

Рис. 4. 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.

экспрессии Hsp на поверхности плюрипотентных клеток не ясно, но можно предположить, что они играют важную роль в раннем развитии эмбрионов млекопитающих.

2.2 Тепловой шок индуцирует апоптоз в чЭСК, но не в их дифференцированных производных. Апоптотическая гибель была определена методом проточной флюориметрии (комбинированная окраска аннексин V/PI) и при помощи подсчёта клеток с фрагментированными ядрами, окрашенными DAPI (Рис. 5, 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

культуре плюрипотентных клеток, но не их дифференцированных производных (Рис. 4, Г). Рис. 4, 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

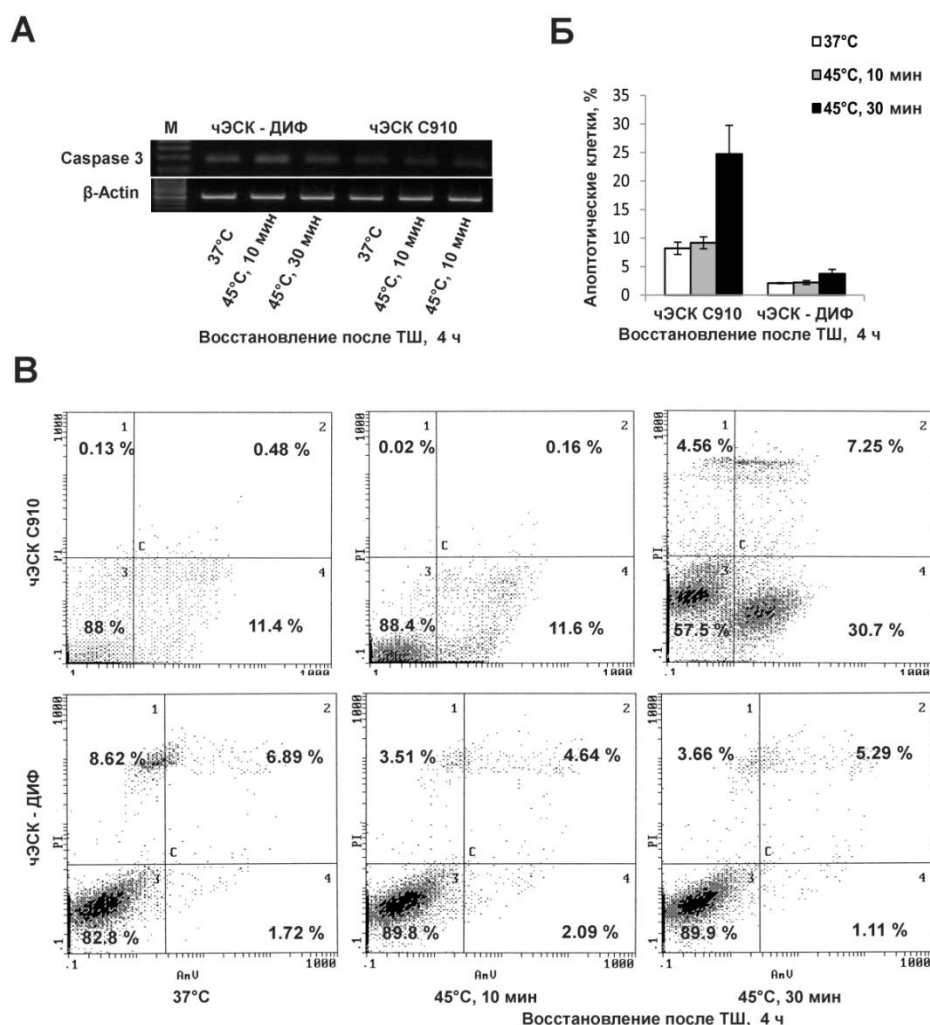


Рис. 5. Сублетальный ТШ индуцирует апоптоз в чЭСК, но не в их дифференцированных производных.

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

жизнеспособных чЭСК С910 с 88 % до 57.5 %. Жизнеспособность чЭСК-ДИФ при аналогичном воздействии не отличается от жизнеспособности негретых клеток (Рис. 5, В). Необходимо отметить, что чЭСК С910, 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 С910 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. 5, А). ЭСК крайне чувствительны к генотоксическим агентам: этопозиду (Grandela et al., 2008; Velichko et al., 2011), воздействию УФ-лучей (Luo, 2012), γ -радиации (Filion et al., 2009) и очень быстро запускают апоптотическую программу. Это происходит за счет предварительной активации Вах, одного из проапоптотических белков, который находится в аппарате Гольджи, но

быстро транслоцируется в митохондрии при действии повреждающих агентов (Dumitru et al., 2012). Для ЭСК характерна более высокая митохондриальная готовность к апоптозу и более низкий апоптотический порог, чем для дифференцированных клеток (Liu et al., 2013). В настоящей работе мы впервые показали, что ТШ, как и другие повреждающие воздействия, является фактором, индуцирующим апоптоз в чЭСК.

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 анализ кривых клеточного роста показал, что дифференцированные фибробластоподобные клетки после ТШ перестают пролиферировать (**Рис. 6, А**). Анализ клеточного цикла, который проводили методом проточной цитофлуориметрии, показал, что в дифференцированных чЭСК происходит остановка клеточного цикла в фазах G0/G1 и G2/M (**Рис. 6, Б**). Пролиферативный статус этих клеток был проверен при помощи окрашивания антителами против маркера пролиферации Ki67. На **Рис. 6, В** видно, 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 SA-β-gal (Blagosklonny, 2012). Через 24 ч после ТШ в культуре дифференцированных фибробластов появились увеличенные в размере SA-β-gal–позитивные клетки. Их число постепенно увеличивалось и на третий день количество SA-β-gal–позитивных клеток достигало 60 % (**Рис. 6, Г, Д**). Эмбриональные СК человека, пережившие сублетальный ТШ, продолжали пролиферировать так же, как и интактные клетки. SA-β-gal–позитивных клеток в прогретых чЭСК C910 обнаружено не было. Таким образом, дифференцированные чЭСК, в отличие от недифференцированных, отвечают на сублетальное тепловое воздействие остановкой пролиферации и проявлением фенотипа SIPS. Так как фибробласты используются в качестве модельной системы для исследования стволовых клеток (Cmielova et al., 2011), это наблюдение может быть важно в свете растущего интереса к механизмам защиты взрослых стволовых клеток от стрессорных воздействий (Tower, 2012).

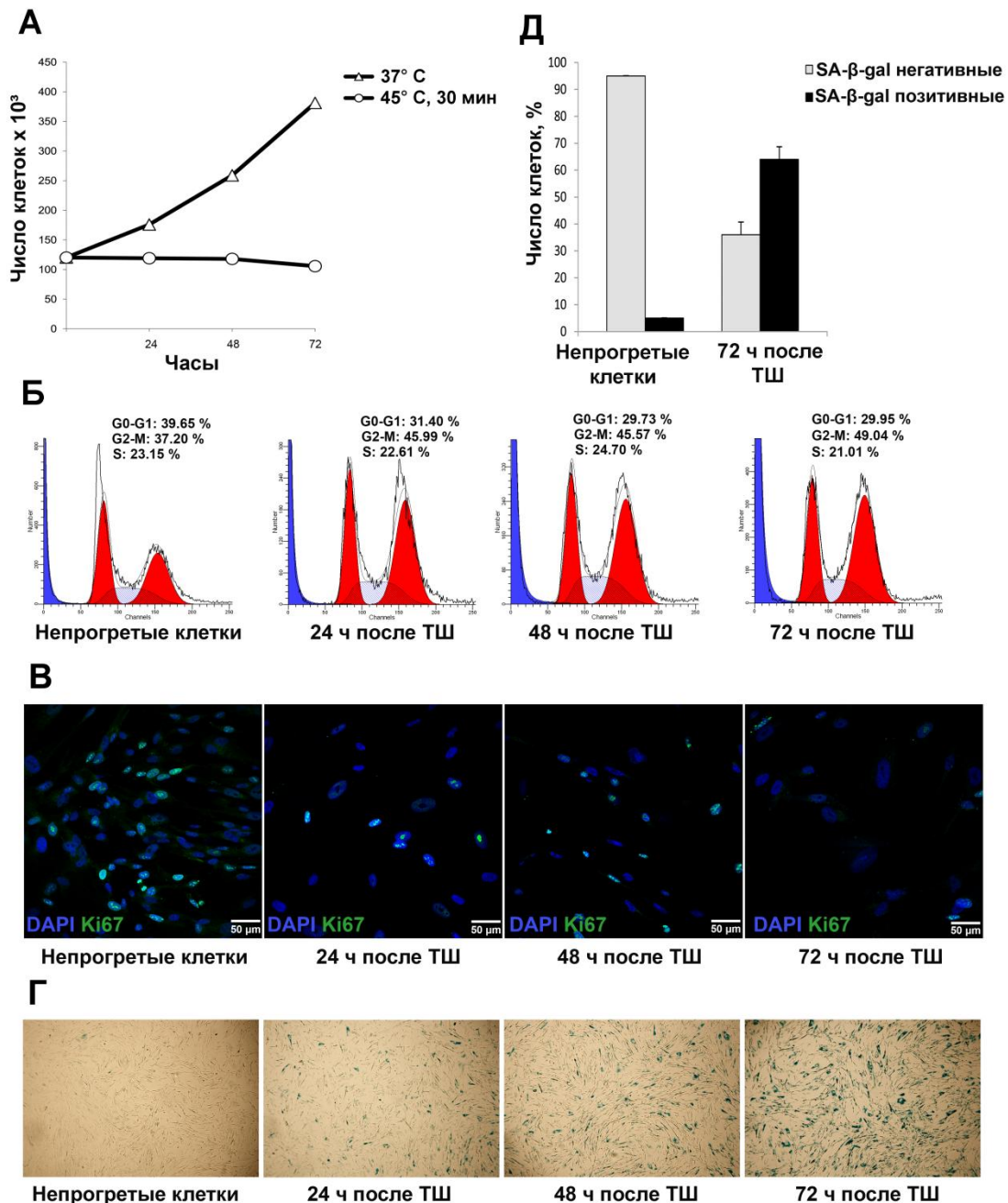


Рис.6. Сублетальный ТШ вызывает SIPS в чЭСК-ДИФ

(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) Иммунофлуоресцентный 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.

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, весьма актуальной проблемой является судьба клеток, переживших сублетальное стрессовое воздействие.

3.1 Свойства чЭСК C910, переживших сублетальный ТШ. Для того чтобы проследить за судьбой чЭСК C910 после сублетального стресса, через 24 ч после ТШ клетки были пересеяны на свежий фидерный слой и далее культивировались при стандартных условиях. Выжившие клетки формировали колонии обычной морфологии и активно пролиферировали. Колонии пассировались механически, как и исходные клетки. На 3–5-м пассажах мы проверили наличие маркеров плюрипотентности в чЭСК C910, переживших сублетальный ТШ. Выжившие чЭСК C910 экспрессировали стандартные маркеры плюрипотентности Oct4, SSEA4, ABCG2 и щелочную фосфатазу. Для проверки их дифференцировочных свойств из клеток, переживших гипертермию, были получены эмбриоидные тельца. Эмбриоидные тельца спонтанно дифференцировались в клетки трёх зародышевых листков. 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 -лучей (Rebuzzini et al., 2012). ЭСК после облучения в дозах, которые вызывают апоптоз этих клеток, были способны генерировать тератомы и экспрессировать гены, отвечающие за плюрипотентность (Sokolov et al., 2010; Wilson et al., 2010). В наших экспериментах было продемонстрировано, что после сублетального ТШ поврежденные чЭСК быстро элиминировались путем апоптоза; выжившие клетки восстанавливали свои первоначальные свойства: морфологию, высокую пролиферативную активность и свойства плюрипотентности (экспрессию маркеров плюрипотентности, генерацию эмбриоидных тел, дифференцировку в три зародышевых листка).

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 в 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 уплощенные клетки увеличенного размера, экспрессирующие β -галактозидазу, ассоциированную со старением. В конечном счёте,

клетки переставали делиться и погибали. До достижения признаков репликативного старения пережившие сублетальный ТШ чЭСК-ДИФ, подобно интактным клеткам, проходили от 17 до 19 пассажей (30—35 удвоений популяции) (**Рис. 7**). Таким образом, чЭСК-ДИФ, пережившие сублетальный ТШ, сохраняют морфологическое сходство с непрогретыми клетками, имеют диплоидный кариотип и подвержены репликативному старению.

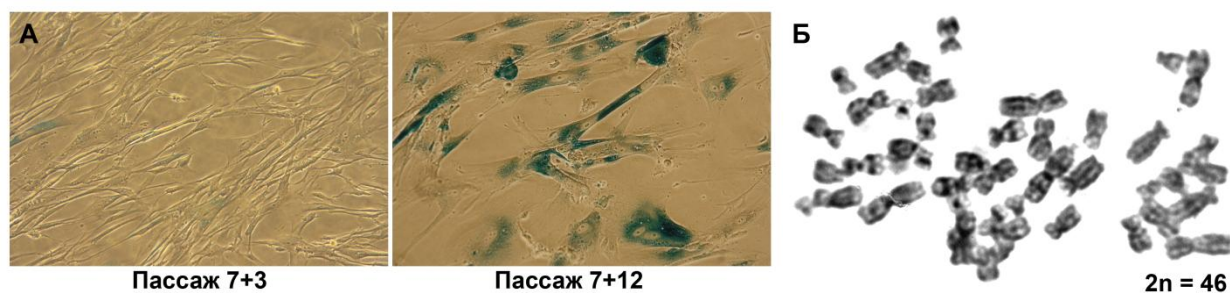


Рис. 7. Дифференцированные фибробласты, пережившие сублетальный ТШ, сохраняют свойства исходных клеток

(А) Репликативное старение потомков чЭСК-ДИФ. На 12-м пассаже после прогрева появляются SA- β -gal-позитивные клетки с измененной морфологией. Об. 20х. (Б) Потомки чЭСК-ДИФ, выжившие после сублетального ТШ, имеют диплоидный кариотип.

4. Влияние ТШ на СК взрослого организма (эМСК)

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 (45 С° 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. 8, А**). На рисунке видно, что при мягком и жестком нагреве и последующем 4- часовом восстановлении, количество жизнеспособных и апоптотических клеток не изменилось по сравнению с интактными клетками. Наличие апоптотических клеток было также исследовано путём подсчета конденсированных или фрагментированных ядер при окраске DAPI. Достоверных различий между прогретыми и контрольными клетками обнаружено не было (**Рис. 8, Б**).

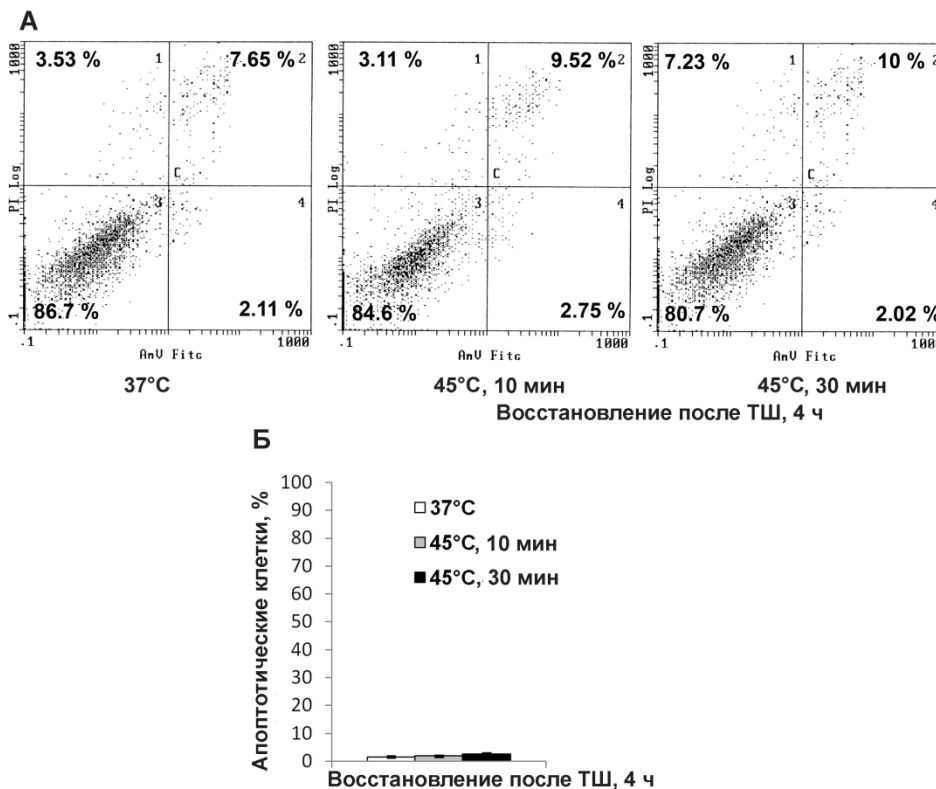


Рис. 8. ТШ не индуцирует апоптоз в эМСК (А) Анализ апоптотической фракции клеток методом проточной цитофлюориметрии. Комбинированная окраска PI/AnV. (Б) Флюоресцентный анализ апоптотических клеток с фрагментированными или конденсированными ядрами, окрашенными DAPI.

4.2 ТШ индуцирует SIPS в эМСК. Снижения жизнеспособности эМСК не было зарегистрировано ни при мягком, ни при сублетальном ТШ. Однако сублетальный ТШ приводит к остановке пролиферации и изменению морфологии эМСК. Количество клеток эМСК, прогретых при 45 °С, 30 мин и возвращенных в нормальные условия, подсчитывалось в течение 72 ч. Кривые клеточного роста прогретых и непрогретых эМСК приведены на **Рис. 9**. Рисунок показывает, что при сублетальном ТШ количество клеток остаётся неизменным в течение 72 ч, в то время как число клеток в непрогретой культуре за этот период увеличивается почти в два раза. Ингибирование пролиферативной активности эМСК было подтверждено окрашиванием антителами против маркера пролиферации Ki67 (**Рис. 9, Б**). Через 72 ч после прогрева единичные 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/M (**Рис. 9, 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. 9, 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. 9, Д**). Сублетальный ТШ усиливает экспрессию белка p21,

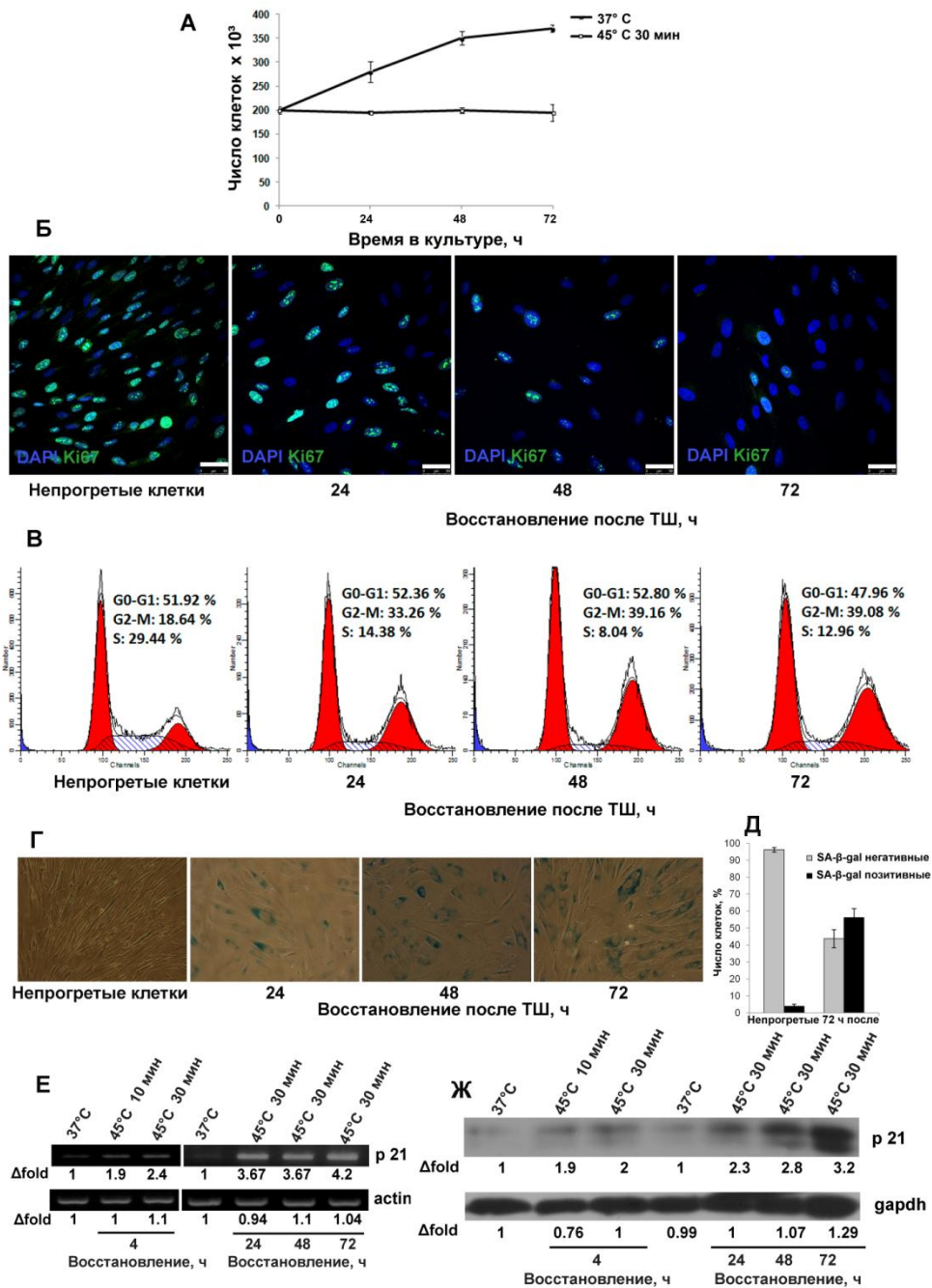


Рис. 9. Сублетальный ТШ индуцирует SIPS в эМСК

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

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. 9, Е), так и на уровне трансляции методом иммуноблоттинга (Рис. 9, Ж), было зарегистрировано уже через 4 ч после сублетального ТШ. Активность p21 продолжала постепенно возрастать и через 72 ч увеличилась в 3 раза. Принято считать, что SIPS, как и апоптоз, является важным опухолево-супрессорным механизмом, предотвращающим пролиферацию клеток, которые находятся под угрозой злокачественной трансформации. Хотя именно SIPS является одной из основных реакций стволовых клеток взрослого человека на воздействие сублетальной дозы различных стрессорных факторов: перекиси

водорода (Orciani et al., 2010; Brandl et al., 2011), ионизирующего излучения (Suzuki and Boothman, 2008), гамма-излучения (Cmielova et al., 2012), доксорубина (Spallarossa et al., 2010), фактора некроза опухоли-альфа (Zhang et al., 2009), мы не нашли доказательств того, что стволовые клетки человека, подвергнутые воздействию повышенных температур, проявляют фенотип преждевременного старения.

4.3 Экспрессия белков теплового шока в эМСК. Индукция и накопление HSP были проанализированы методами ОТ-ПЦР, иммуноблоттинга и иммунофлюоресценции (**Рис. 10**). Методом ОТ-ПЦР (**Рис. 10, А**) было показано, что в эМСК ТШ вызывает индукцию нескольких генов *Hsp* (*Hsp27*, *Hsp70*, *Hsc70*, *Hsp90*). Наибольшее усиление экспрессии (4–5 раз) было зафиксировано для *Hsp70*. Через 24 ч экспрессия всех генов вернулась к базальному уровню, за исключением *Hsp27*, экспрессия которого была незначительно увеличена, по крайней мере, в течение 72 ч. Иммунофлюоресцентный анализ *Hsp70* (**Рис. 10, В**) показал, что и мягкий (45 °С, 10 мин) и сублетальный (45 °С, 30 мин) ТШ индуцирует *Hsp70* в эМСК. *Hsp70*, как и во многих других типах клеток, транслируется из цитоплазмы в ядро. 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. 10, Б**). Хотя уровень экспрессии мРНК *Hsp70* эМСК, подвергшихся сублетальному ТШ, возвратился к базальному уровню уже через 24 ч, уровень *Hsp70* оставался повышенным в течение 72 ч после прогрева. Похожую картину мы наблюдали при действии на эМСК сублетальной дозы H_2O_2 . Известно, что белки семейства HSP участвуют в процессе старения. Повышенная экспрессия *Hsp27* задерживала старение стволовых клеток пуповины человека (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 3Т3 подвергались клеточному старению при введении цитозольного морталина, члена семейства HSP70, с помощью трансфекции (Wadhwa et al., 1993). В стареющих клетках понижается транскрипционная активность фактора теплового шока HSF1 (Lee et al., 2009;) и ответ на стрессорные воздействия с возрастом ослабевает (Liu et al., 1991; Kim et al., 2012), но базальный уровень *Hsp* у стареющих животных может оставаться постоянно увеличенным (Maiello 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

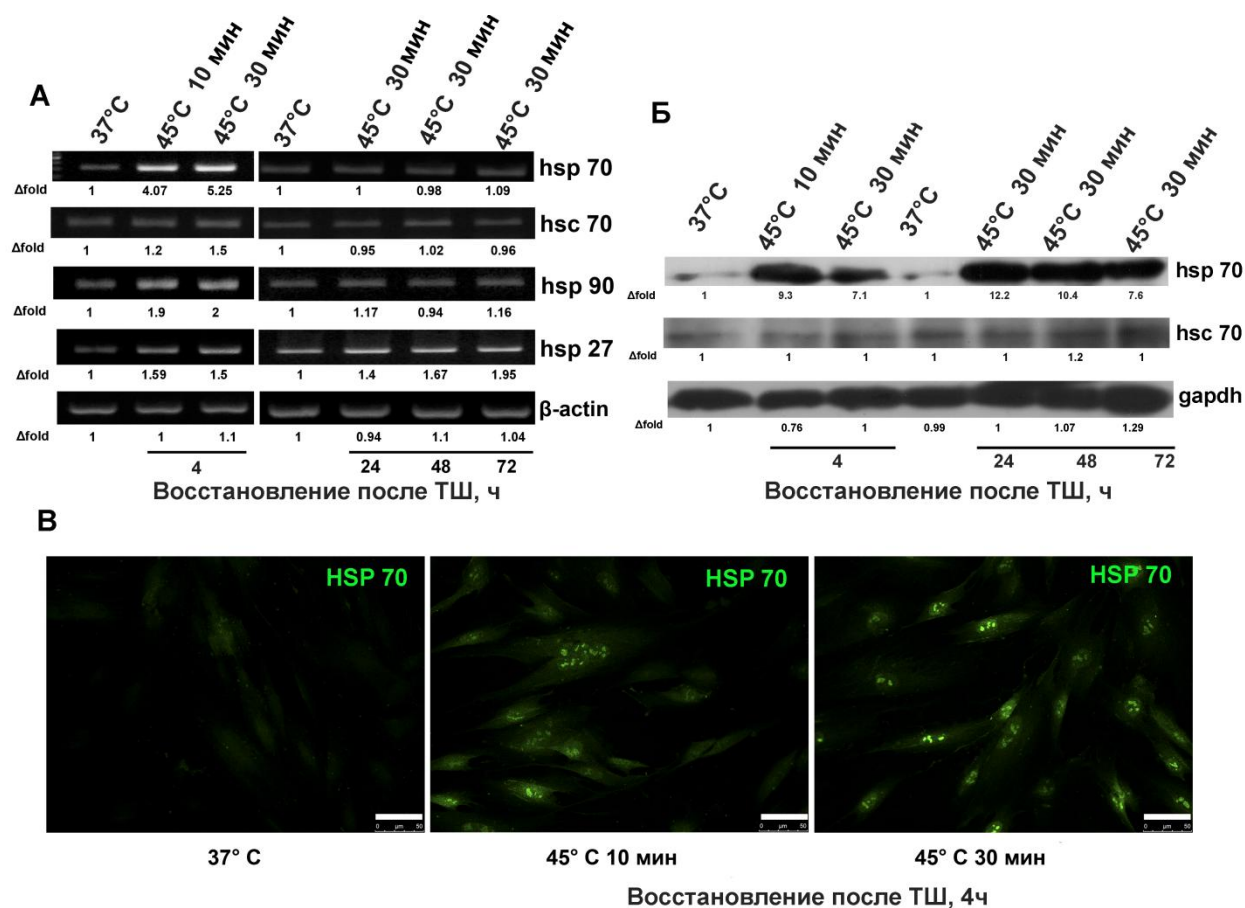


Рис. 10. Индукция и накопление HSP в эМСК после теплового воздействия

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

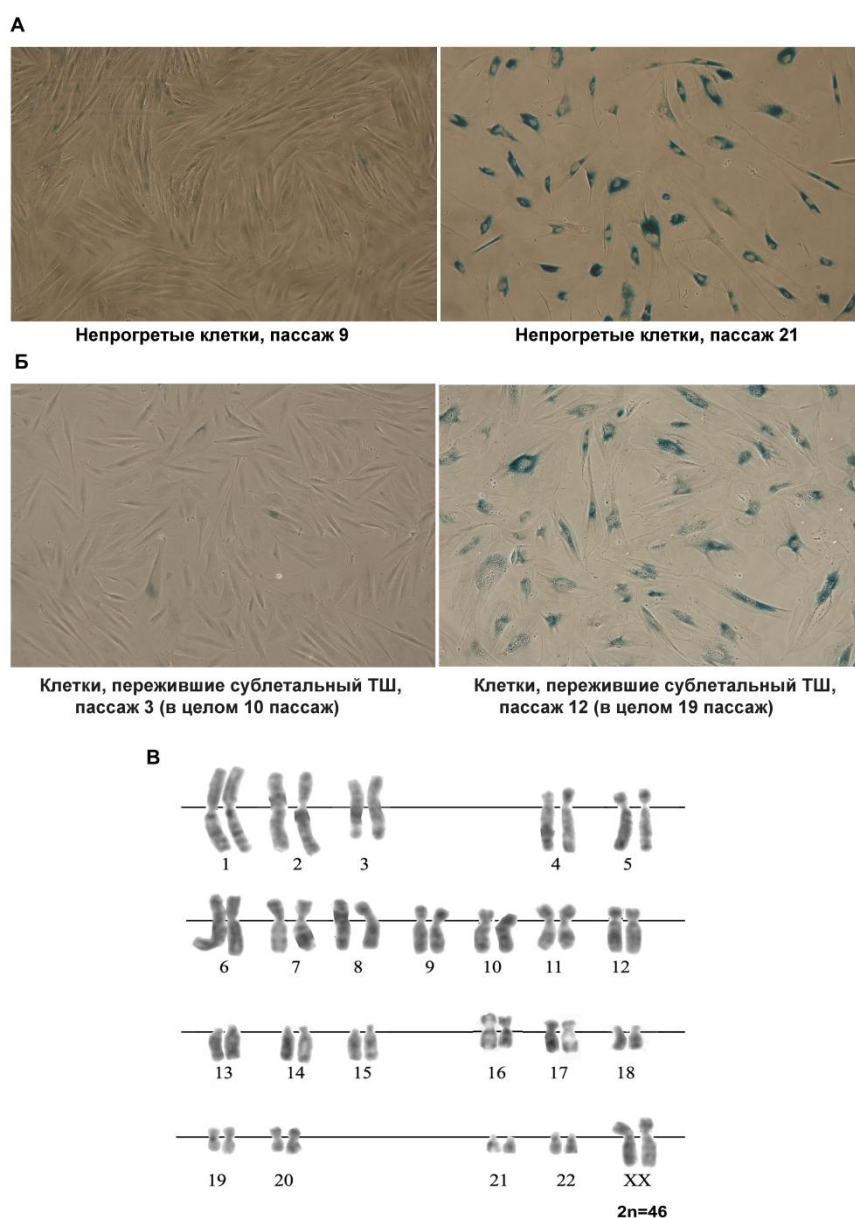
семейства HSP70 в некоторых отделах головного мозга крыс увеличивается с возрастом, и, по мнению авторов, может играть важную роль в подавлении денатурации белка стареющих клеток (Unno et al., 2000). Однако при длительном культивировании МСК было зарегистрировано снижение базальных уровней *Hsp27*, *Hsp70* и *Hsp90* (Stolzing et al., 2008). Основной функцией HSP является защита клеток от повреждений, вызываемых различными стрессорными факторами. Чем выше содержание HSP, тем выше жизнеспособность клеток в условиях стресса. Повышенная экспрессия *Hsp70*, индуцированная в фибробластах человека субтоксическими дозами солей тяжелых металлов, которые являются потенциальными индукторами SIPS, поддерживалась 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 уровень *Hsp70* оставался высоким 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 не понятным и требует дальнейших исследований.

4.4 Свойства эМСК, переживших сублетальное воздействие температуры.

Вопрос о сохранении исходных свойств СК, переживших сублетальный стресс, практически не изучен. Известно, что MSC, полученные из жировой ткани человека, после генотоксического повреждения возобновляли пролиферацию и подвергались репликативному старению (Altanerova et., al., 2009). Чтобы проследить за судьбой эМСК,

переживших сублетальный ТШ, через 4 дня после прогрева клетки были перенесены в новые культуральные чашки в свежеприготовленной стандартной среде. Прикрепившиеся клетки сохранили морфологию исходных клеток и возобновили пролиферацию. **Рис. 11** показывает, что на 3-м 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

Рис. 11. Характеристика эМСК, переживших сублетальный ТШ

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

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. 11, А, Б). Выжившие после теплового воздействия эМСК, экспрессировали поверхностные CD маркеры мезенхимных клеток (Рис. 12, А) и сохраняли пластичность. Они были способны дифференцироваться в адипоциты, остеобласты (производные мезодермы) (Рис. 12, В, Г) и трансдифференцироваться в нейронально-подобные клетки (эктодермальное направление) (Рис. 12, Д).

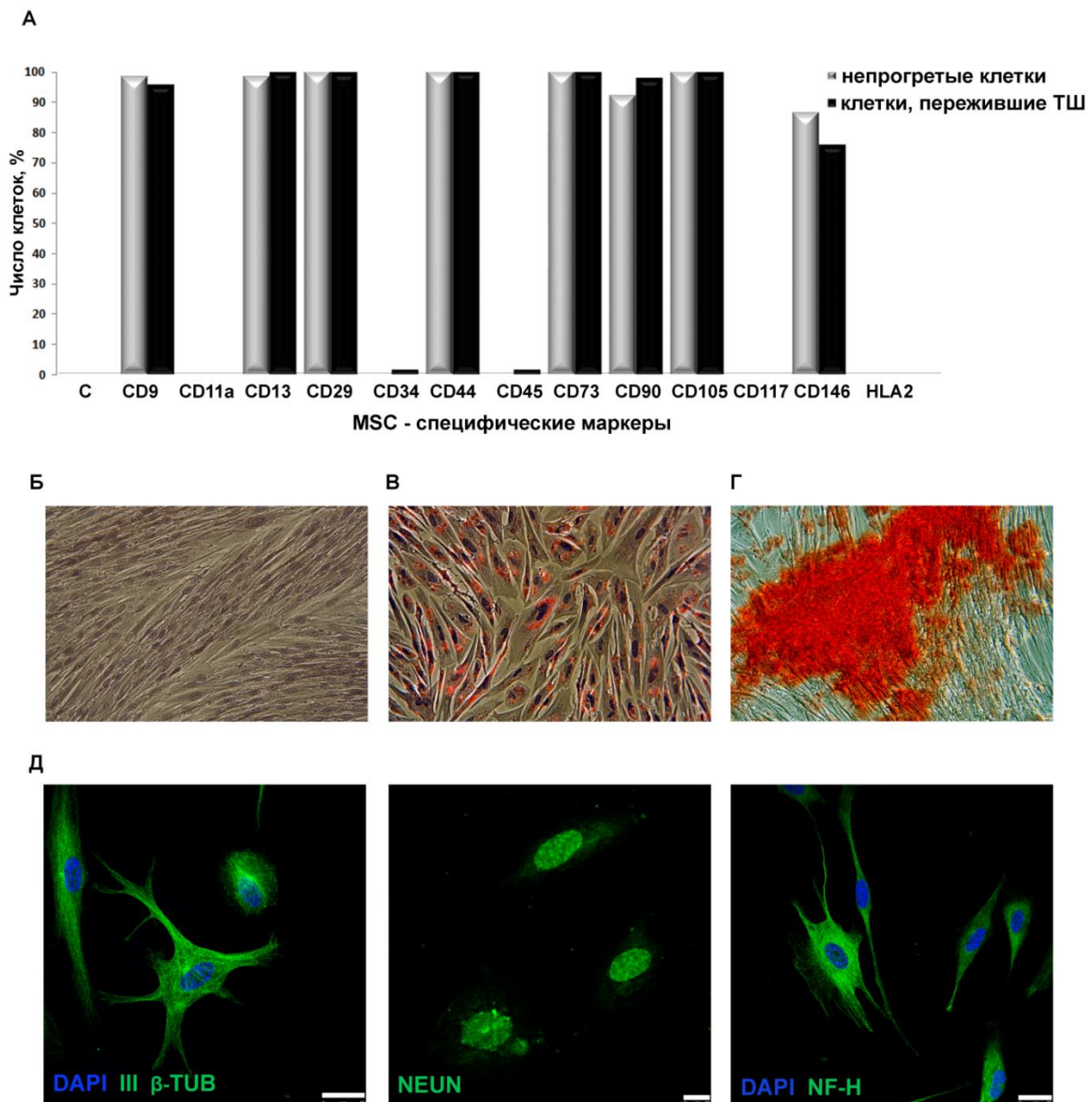


Рис. 12. Пластичность потомков эМСК, переживших сублетальный ТШ

(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.

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 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.

Список цитируемой литературы

- Домнина и др. 2013. Цитология. 55(1):69—74.
 Земелько и др. 2011. Цитология. 53(12): 919—929.
 Кожухарова и др. 2009. Цитология. 51(7):551—557.
 Мамаева 2002. М: Науч. мир.
 Allickson et al. 2012. J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol). 13:419—420.
 Altanerova et.al. 2009. Neoplasma. 56:542—547.
 Armstrong et al. 2010. Stem Cell. 28:661—73.
 Blagosklonny. 2012. Aging (Albany NY). 4:159—365.
 Brandl et al. 2011. 317:1541—1547.
 Byun et al. 2013. Stem Cell Res. 11(3):1323—34.
 Chen et.al. 2006. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 290:1729—39.
 Chen et al. 2004. J Biol Chem. 279:49439—49446.
 Cmielova et al. 2012. Int J Radiat Biol. 88:393—404.
 Dolan, et al. 2012. J R Soc Interface. 9:3503—3513.
 Dumitru, et al. 2012. Molecular cell. 46(5):573—583.
 Goligorsky et al. 2009. Curr Opin Hematol. 16:215—219.
 Grandela et al. 2008. Stem Cell Res. 1:116—328.
 Guo et al. 2010. Stem Cells Dev 19: 1321—31.
 Fillion et al. 2009. J Cell Physiol. 220:586—92.
 Fonager J. et al. 2002. Experimental gerontology. 37(10):1223—1228.
 Hronik-Tupaj et al. 2011. Biomed Eng Online. 10:19.
 Kim et al. 2012. Aging Cell. 11:617—627.
 Laemmli 1970. Nature. 227: 680-685.
 Lee et al. 2009. Journal of Cellular Biochemistry 106:267—278.
 Liu et al. 2013. Cell Stem Cell. 13:1—9.
 Liu et al. 2010. Cell Transplant. 19:1261—79.
 Liu et al. 1991. J of cellular physiology. 149(3):560—566.
 Luo et al. 2012. PLoS ONE. 7: e30541.
 Maiello M. et al. 1997. Gerontology. 44(1):15—20.
 Maynard et al. 2008. Stem Cells. 26:2266—74.
 Orciani et al. 2010. Free Radic Biol Med. 49:830—838.
 Prinsloo et al. 2009. BioEssays. 31:370—77.
 Qin et al. 2007. J Biol Chem. 282:5842—52.
 Piotrowicz et al. 1995. The FASEB journal. 9 (11):1079—1084.
 Rebuzzini et al. 2012.. J Cell Physiol. 227:1242—9.
 Restall et al. 2010. PLoS ONE 5(6): e11076.
 Richter et al. 2010. Mol Cell. 40:253—266.
 Saretzki et al. 2004. Stem Cells. 22:962—71.
 Saretzki et al. 2008. Stem Cells. 26:455—64.
 Sherman. 2010. Ann N Y Acad Sci. 1197:152—157.
 Sokolov et al. 2010. Gene. 455:8—15.
 Son et al. 2005. Stem Cells. 23:1502—13.
 Spallarossa et al. 2010. PLoS ONE. 5(12): e15583
 Söti. 2003. Aging Cell. 1:39—45.
 Stambrook et al. 2010. Adv Exp Med Biol. 695:59—75.
 Stolberg et al. 2009. Biotechnol Progress. 25:10—19.
 Stolzing et al. 2008. Mech Ageing Dev. 129:163—73.
 Strub et al. 2008. Cell Stress Chaperones. 4:475—82.
 Suzuki et al. 2008. J Radiat Res. 49:105—112.
 Tower. 2012. WIREs Dev Biol doi: 10.1002/wdev.56.
 Unno et al. 2000. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences. 55(7): B329—B335.
 Velichko et al. 2011. Cell Cycle. 10:2035—37.
 Vinoth et al. 2008. Stem Cells Dev. 17:599—607.
 Wadhwa et al. 1993. J Biol Chem. 268(30):22239—42.
 Wilson et al. 2010. Cancer Res. 70: 5539—48.
 Yu et al. 2013. Translational stroke research. 4(1):76—88.
 Zhang et al. 2009. FASEB J. 23:1358—1365.